

**Struktur- und  
Funktionsuntersuchungen an  
mesodermdevelopment (MESD), ein  
Chaperon für Rezeptoren der  
LDLR-Familie**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Christian Köhler  
aus  
Halberstadt

Berlin, November 2008

Die hier dargestellte Arbeit wurde zwischen März 2004 und November 2008 am Leibnizinstitut für Molekulare Pharmakologie Berlin in der Arbeitsgruppe “NMR unterstützte Strukturbiologie” unter der Betreuung von Prof. Dr. Hartmut Oschkinat angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat  
AG NMR-unterstützte Strukturforschung  
Leibnizinstitut für Molekulare Pharmakologie  
Robert-Rössle-Str. 10  
13125 Berlin
  
2. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann  
AG Makromolekulare Struktur und Interaktion  
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin  
Robert-Rössle-Str. 10  
13125 Berlin

Tag der Disputation: 04. Februar 2009

## Danksagung

Die hier dargestellte Arbeit wurde am Leibnizinstitut für Molekulare Pharmakologie Berlin in der Arbeitsgruppe “NMR unterstützte Strukturbiologie” unter der Betreuung von Prof. Dr. Hartmut Oschkinat angefertigt. Ich möchte allen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe für die phantastische Atmosphäre danken. Ich habe viele Freunde gewonnen. Einigen Personen möchte ich besonders danken, ohne deren Unterstützung der Erfolg dieser Arbeit undenkbar gewesen wäre.

Ich möchte Hartmut Oschkinat für die Möglichkeit danken, daß ich in einem exzellent ausgestatteten Institut arbeiten konnte. Seiner Unterstützung in jeder Hinsicht konnte ich gewiß sein.

Mein besonderer Dank gilt Annette Diehl. Dank ihrer andauernden Hilfsbereitschaft sind meine Kenntnisse auf dem Gebiet der Molekularbiologie mittlerweile nicht mehr rudimentär. Sie hatte großes Vertrauen in mich und fühlte sich zu jeder Zeit für meine Probleme zuständig.

Olav Andersen aus der Arbeitsgruppe “Molekulare Herzkreislaufforschung” am Max-Delbrück-Centrum Berlin machte mich mit dem ausgesprochen interessanten Thema dieser Arbeit vertraut. Er war an meinen Ergebnissen hoch interessiert und egal wann ich wieviel Diskussionsbedarf hatte, er war immer für mich da.

Weiterhin möchte ich ausdrücklich Peter Schmieder und Christoph Brockmann danken. Mit erstaunlicher Geduld haben mir beide die Tiefen der NMR-Spektroskopie, die Strategien zur Zuordnung von Proteinresonanzen sowie die Methoden zur Berechnung von Proteinstrukturen vermittelt.

Prisca Boisguérin hat mich exzellent bei der Festphasenpeptidsynthese betreut. Die Zusammenarbeit mit ihr und der gesamten Arbeitsgruppe von Rudolf Volkmer am Institut für Medizinische Immunologie der Charité Berlin war ausgesprochen freundlich und interessant.

Andrea Steuer danke ich für ihre Hilfe in allen administrativen Fragen, für die Organisation von Terminen und vor allem für die Erinnerung an diese.

Ich danke meiner gesamten Familie. Meine Eltern und meine Schwester haben im Gegensatz zu mir nie am Erfolg dieser Arbeit gezweifelt. Das ihr immer Recht haben müßt. Auf Euch.

All meinen Freunden danke ich: René, Carsten, Jule, Dorotheé, Franka, Cathleen, Adele, Kathrin, Markus, Marcel, Lene, Chris und Laura für ein Leben zu dritt bis zu

fünft. Peter für die Runde um den Helmholtzplatz. Wir lassen die Seitenstraßen mal aus. Dann schaffen wir es bestimmt noch. Sebastian danke ich, weil er einfach weiß womit man mich richtig ärgern kann. Außerdem danke ich “Rage against the machine” für ihre Musik, die mir von Zeit zu Zeit den Kopf freigebrannt hat.

# Kurzdarstellung

## Struktur- und Funktionsuntersuchungen an mesodermdevelopment (MESD), ein Chaperon für Rezeptoren der LDLR-Familie

Die Familie der “Low Density Lipoprotein Receptors”(LDLR) ist an einer Vielzahl physiologisch bedeutender Prozesse beteiligt. Der namensgebende LDL-Rezeptor ist eingehend für seine Bedeutung in der Cholesterollhomöostase charakterisiert. Er bindet und internalisiert mit Cholesterol angereicherte LDL-Partikel. Die meisten Rezeptoren der LDLR-Familie sind an der Endozytose verschiedenster Substanzen beteiligt. Die Kontrolle des zellulären Transports verschiedener Membranproteine sowie die Initiierung bestimmter Signalwege sind weitere Funktionen. So sind beispielsweise der SorLa- sowie die LRP-Rezeptoren an der Sortierung des Amyloidvorläuferproteins (APP) beteiligt. VLDL- und apoER2-Rezeptoren kontrollieren über die Bindung von Reelin die neuronale Migration. LRP5- und LRP6-Rezeptoren steuern als Korezeptoren des Wnt-Signalwegs die Embryonalentwicklung. Diese Funktionen setzen korrekt gefaltete und an der Zelloberfläche lokalisierte Rezeptoren voraus. Die Faltung der LDLR-Rezeptoren ist eine komplizierte Aufgabe. Einerseits aufgrund der hohen Zahl intramolekularer Disulfidbrücken innerhalb der “complement-type repeat”(CR)-Domänen sowie der “EGF-ähnlichen”-Domänen, andererseits infolge einer komplexen Faltung von sechs aufeinander folgenden YWTD-Motiven zu einer sechsblättrigen  $\beta$ -Propellerstruktur. In Säugetierzellen wird die Faltung dieses  $\beta$ -Propellers durch “mesodermdevelopment” (MESD), ein im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiertes Protein, vermittelt. Über die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von MESD ist wenig bekannt. Insbesondere liegen keine Informationen zum Mechanismus der durch MESD vermittelten Rezeptorfaltung vor.

Mittels  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektroskopie von sechs unterschiedlich langen Konstrukten von MESD konnte ein sowohl strukturierter als auch hoch konservierter Kernbereich zwischen den Resten K43 und K184 identifiziert werden. Die Bestimmung der atomaren Struktur dieses konservierten Kernbereichs mittels NMR-Spektroskopie ergab eine eigenständige Domäne zwischen den Resten T104 bis E177. Diese Kerndomäne ist in der Natur weit verbreitet und besitzt dennoch eine außergewöhnlich geringe Sequenzhomologie. Aufgrund erhöhter Flexibilität der Reste D45-K103 war keine eindeutige Strukturbestimmung dieses Bereichs möglich. Daher wurde in Korrelation mit allen durchgeführten Experimenten eine globuläre Modellstruktur von MESD45-184

berechnet, welche N-terminal der Kerndomäne über eine längere flexible Region durch eine weitere  $\alpha$ -Helix ergänzt wird.

Die Vermittlung der korrekten Rezeptorfaltung durch MESD setzt eine Interaktion mit ungefaltetem Rezeptorprotein voraus. Bindungsstudien mit MESD an einer Bibliothek aus 16 Reste langen Rezeptorfragmenten führte zur Identifizierung der Interaktionsbereiche zwischen MESD und den ungefalteten LDLR-Rezeptoren. Die Art der Wechselwirkungen sind sowohl hydrophob als auch polar. Basierend auf der statistischen Auswertung der Peptidsequenzen mit Bindungsaktivität zu MESD konnte ein Erkennungsmotiv ermittelt werden. Demnach bindet MESD an einen Kern aus hydrophoben Resten, welcher durch einige basische Reste unterbrochen ist. Auf Basis der erhaltenen strukturellen und funktionellen Informationen erfolgt die Diskussion eines durch MESD vermittelten Faltungsmechanismus des  $\beta$ -Propellers.

# Abstract

## Structural and functional investigations of mesodermdevelopment (MESD), a chaperone for receptors of the LDLR-family

The family of low density lipoprotein receptors covers a wide range of physiologically important cellular functions. The founding member, LDLR, has mainly been characterized for its function in systemic cholesterol homeostasis. It rapidly binds cholesterol-rich LDL particles and triggers their internalisation. Indeed, most family members are involved in endocytosis. A different function is the controlling of cellular trafficking of various membrane proteins. The sorLA-receptor and LRP-receptors are, for example, involved in the sorting of the amyloid precursor protein (APP). The binding of other factors does not serve functions in internalization but is initiating specific cellular signalling events, e.g. controlling neuronal migration (Reelin binding to apoER2 and VLDLR) or embryonic development (WNT proteins binding to LRP5 and LRP6). These functions depend on the presence of correctly folded receptors at the cell surface, where the proteins arrive after synthesis and post-translational maturation. The folding of LDLRs is a difficult task, partly because of a very high number of intramolecular disulfide bonds present in either the complement-type repeat (CR)-domains or in the epidermal growth factor (EGF)-domains, and probably also because of the very complex packing of six contiguous YWTD repeats into a six-bladed  $\beta$ -propeller structure. In mammalian cells, the folding of the  $\beta$ -propeller in the endoplasmic reticulum (ER) is assisted by mesoderm development (MESD). Little is known about the structural and functional properties of MESD. In particular, it is not known how this protein serves its function as a molecular chaperone.

Using  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spectroscopy of six different long MESD constructs a both well structured and highly conserved core region corresponding to residues K43-K184 could be identified. By structure determination based on NMR-Spectroscopy this MESD core region could be shown to fold into a single domain between residues T104-E177. This core-domain of MESD is shown to be frequent but of exceptionally low sequence homology. An increased flexibility of residues D45-K103 didn't allow an unambiguous Structure determination of this region. In correlation to all effected experiments a globular model structure of MESD45-184 was calculated instead, in which the core-domain is extended N-terminally over a long flexible part by an additional  $\alpha$ -helix.

For a MESD assisted folding of the LDLR-receptors an interaction of MESD to unfolded nascent receptorprotein has to be considered. By screening a peptide library containing 16 residue long receptor fragments with MESD, the interaction interface between MESD and the unfolded receptors could be identified. These interactions are both hydrophobic and polar induced. Based on the statistical analysis of MESD-binding sequences a recognition motif for MESD could be identified. It consists of a hydrophobic core being interrupted by some basic residues. By means of these structural and functional results a mechanism for the MESD assisted folding of the  $\beta$ -propeller is discussed.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	MESD, ein Chaperon für Rezeptoren der LDL-Rezeptor Familie . . . . .	1
1.1.1	Proteinfaltung . . . . .	1
1.1.2	Chaperone - Proteine als Faltungshelfer . . . . .	3
1.1.3	Das Gen mesd und seine Bedeutung in der Embryonalentwicklung	4
1.1.4	Die Familie der LDL-Rezeptoren . . . . .	5
1.1.5	Faltung der Rezeptoren und Transport zur Zellmembran . . . . .	7
1.2	3D-Strukturaufklärung an Biomolekülen . . . . .	8
1.2.1	NMR Methoden für Proteine in Lösung . . . . .	10
1.2.2	Strukturrechnung mittels NMR-Daten . . . . .	21
1.3	Zielsetzung der Arbeit . . . . .	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1	Herstellung der rekombinanten MESD-Proteine . . . . .	25
2.1.1	Klonierung . . . . .	25
2.1.2	Expression und Aufreinigung . . . . .	27
2.2	Strukturbestimmung . . . . .	30
2.2.1	NMR-Messungen und Resonanzzuordnung . . . . .	30
2.2.2	RDC-Messungen . . . . .	32
2.2.3	Strukturrechnung . . . . .	33
2.2.4	Messungen der Proteindynamik . . . . .	34
2.3	Funktionelle Studien . . . . .	35
2.3.1	Synthese und Bindungsstudien einer Peptidbibliothek . . . . .	35
<b>3</b>	<b>Strukturuntersuchungen an MESD</b>	<b>40</b>
3.1	Eingrenzung des strukturierten Bereichs . . . . .	42
3.2	Die Struktur der Kerndomäne von MESD zwischen Aminosäure T104 und E177 . . . . .	50

3.3	Die Struktur des konservierten Kernbereichs von MESD zwischen Aminosäure D45 und K184 . . . . .	58
3.4	Die Bedeutung der flexiblen terminalen Bereiche . . . . .	67
<b>4</b>	<b>Funktionsuntersuchungen an MESD</b>	<b>70</b>
4.1	Bindungsstudien an einer Peptidbibliothek . . . . .	70
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>90</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>93</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 MESD, ein Chaperon für Rezeptoren der LDL-Rezeptor Familie

### 1.1.1 Proteinfaltung

Im Jahr 1934 zeigten J.D. Bernal und Dorothy Crowfoot Hodgkin, daß ein Kristall des Proteins Pepsin unter Einwirkung eines Röntgenstrahls ein definiertes Beugungsmuster aufweist [8]. Dies bedeutete, daß Pepsin eine geordnete Ansammlung von Atomen darstellt. Proteine wurden bis dahin als nicht strukturiert angenommen. Nachgewiesene enzymatische Aktivitäten einiger Proteine führte man auf unbekannte Komponenten zurück, welche an das Protein als inerten Träger gebunden waren. Diese Theorie ließ sich nicht länger vertreten. Wenn Proteine eine charakteristische Struktur besitzen, so läßt das einen Zusammenhang zu ihrer Funktion vermuten. Damit ergab sich auch die Frage, wie ein neusynthetisiertes Protein seine spezielle räumliche Struktur einnimmt. Cyrus Levinthal bewies mit einer einfachen Rechnung (Gleichung 1.1), daß ein zufälliges Ausprobieren aller möglichen Konformationen bis zum Erreichen der nativen Faltung ausgeschlossen ist [63]. Er betrachtete ein Protein mit einer Anzahl von  $n$  Resten und ging für jeden der Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  von drei stabilen Konformationen aus. Somit ergeben sich  $3^{2n} \approx 10^n$  mögliche Konformationen. Da hierbei die Seitenketten nicht berücksichtigt wurden, kann von einer tatsächlich weitaus höheren Zahl ausgegangen werden. Die Reorientierung einer Einfachbindung erfolgt innerhalb  $10^{-13}s$ . Würde das Protein alle Einstellungen der Bindungswinkel mit dieser Geschwindigkeit verändern, ergibt sich der Zeitaufwand  $t$  (Gleichung 1.1)

$$t = \frac{10^n}{10^{13}} \quad (1.1)$$

Für das Erreichen der nativen Struktur eines kleinen Proteins von 100 Resten würde

dies  $t = 10^{87}s$  erfordern. Das angenommene Alter des Universums beträgt zum Vergleich  $6 * 10^{17}s$ . Da Proteine tatsächlich innerhalb weniger Sekunden ihre native Konformation einnehmen, muß dies mittels gerichteter Mechanismen erfolgen. Christian Anfinsen führte im Jahr 1973 Untersuchungen an pankreatischer Ribonuklease durch. Eine aufgereinigte denaturierte Probe faltete sich *in vitro* unter Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität. Da dies in Abwesenheit anderer Makromoleküle erfolgte, schloß er daraus, daß die Faltung eines Proteins ausschließlich durch dessen Aminosäuresequenz bestimmt wird [3]. Der Faltungsprozeß erfolgt also spontan und freiwillig ohne die Einwirkung anderer Makromoleküle. Die treibende Kraft muß daher ein Energiegewinn sein. Das ungefaltete Protein kann eine Vielzahl von unterschiedlichen Konformationen einnehmen. Es besitzt eine hohe Entropie. Im Verlauf der Faltung werden bestimmte Konformationen bevorzugt, während sich andere als energetisch ungünstig erweisen. Am Ende dieses Prozesses wird die eine native Konformation erreicht. Die sinkende Entropie wird durch die ebenfalls sinkende freie Energie kompensiert, weswegen der Faltungsprozeß freiwillig verläuft [23, 25, 97]. Die Faltung eines Proteins verläuft hierarchisch und beginnt mit der Bildung lokaler Sekundärstrukturelemente. Diese Faltungsprozesse, welche zum sogenannten "molten globule", einem Zustand mit vielen Sekundär- aber wenigen Tertiärstrukturelementen, führen, laufen innerhalb weniger tausendstel Sekunden ab. In den folgenden Schritten bildet sich die Tertiärstruktur aus und der hydrophobe Proteinkern stabilisiert sich. Ist das aktive Protein ein Multimer, so lagern sich im letzten Schritt die Monomere zur Quartärstruktur zusammen. Dieses Prinzip der hierarchischen Proteinfaltung wurde bereits 1976 von Levinthal vermutet [50].

Man stellte allerdings wiederholt fest, daß sich Proteine *in vivo* deutlich schneller falteten als *in vitro*. Desweiteren wurde *in vitro* in Abhängigkeit von äußeren Faktoren wie Temperatur oder Proteinkonzentration eine Aggregatbildung der Proteine beobachtet [45]. Trotz der sehr hohen intrazellulären Molekülkonzentration von geschätzten 200-300 g/l [101, 100, 72, 73], was ein Vielfaches der *in vitro* verwendeten Konzentrationen ist, tritt dieses Problem *in vivo*, abgesehen von pathologischen Fällen, nicht auf. Eine Vielzahl von Krankheiten sind mit zellulären Proteinaggregaten assoziiert, so zum Beispiel die Alzheimer- und die Parkinson-Erkrankung als auch die systemische Amyloidose. Desweiteren alle Krankheiten, die durch die Degeneration und Aggregation von Prion-Proteinen (Creuzfeldt-Jakob, BSE) hervorgerufen werden [24]. Die Zelle beinhaltet offensichtlich unverzichtbare Mechanismen, welche die Faltung der Proteine unterstützen und sie vor der Interaktion mit anderen Makromolekülen schützen.

### 1.1.2 Chaperone - Proteine als Faltungshelfer

Die Entdeckung molekularer Chaperone in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts führte zu einer Ergänzung der Theorie der "spontanen Selbstfaltung". Angebrachter erschien nun der Begriff "unterstützte Selbstfaltung" [27]. Auch in dieser ergänzten Theorie stammt die Faltungsinformation ausschließlich aus der Aminosäuresequenz. Zusätzlich werden aber molekulare Chaperone definiert, welche die Faltungseffizienz unter zellulären Bedingungen erhöhen. Der Begriff Chaperon findet seinen Ursprung in der Beschreibung des Proteins nucleoplasmin [60]. Im Zellkern lokalisiert, vermittelt es den Zusammenbau von Chromatin. Der Begriff "Chaperone", die englische Übersetzung für Anstandsdame, wurde bewußt gewählt, da sie "unreife Proteine vor schädlichen Kontakten bewahren". Bereits 1963 entdeckte Anfinsen ein Enzym, welches einem sich faltenden Protein hilft, die korrekte Verknüpfung seiner Cysteine zu Disulfidbrücken zu finden [35]. Die Proteindisulfidisomerase (PDI) löst Disulfidbrücken und knüpft sie anschließend neu bis die native Konstellation gefunden ist. Ein ähnlich kritischer Schritt im Verlauf der Proteinfaltung ist die Isomerisierung der Amidbindungen zwischen Prolin und anderen Aminosäuren. Im ungefalteten Protein liegt sowohl die cis- als auch trans-Konformation vor. In nativen Proteinen nehmen die Prolinreste vorwiegend eine der beiden Konformationen ein. Das 1984 entdeckte Enzym Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (PPIase) vermittelt im Verlauf der Faltung diese Isomerisierung [29]. Diese Enzyme sind notwendig, um lokale Energiebarrieren während der Faltung zu überwinden. Da sie den Faltungsprozeß beschleunigen, anstatt die Bildung von Aggregaten zu unterbinden, werden sie im klassischen Sinne nicht als Chaperone definiert.

Die eigentliche Bedeutung der Chaperone wurde erst durch die Erforschung der Hitzeschockproteine (HSP) und der Chaperonine erkannt. Die Bezeichnung Hitzeschockproteine beruht auf deren erhöhter Expression infolge von Hitzeeinwirkung. Daher wurden diese Proteine mit der Reparatur bzw. dem Abbau zellstressbedingt denaturierter Proteine in Verbindung gebracht [48, 79]. In den folgenden Jahren konnte gezeigt werden, daß HSP's auch unter Normalbedingungen für die Proteinfaltung einer Vielzahl neusynthetisierter Proteine verantwortlich sind [42, 22, 16, 102, 5, 30]. Die Entdeckung der Klasse der Chaperonine erbrachte deutliche Beweise für die Unverzichtbarkeit von molekularen Chaperonen für die Proteinfaltung *in vivo*. In Zellen aus *Escherichia coli*, deren Gen für das Chaperonin GroEL Mutationen aufwies, konnten keine Bakteriophagenpartikel zusammengebaut werden [32, 18]. In Chloroplasten bilden die Untereinheiten der Ribulose Bisphosphat Carboxylase Oxigenase (Rubisco)

vor ihrem Zusammenbau einen Komplex mit dem GroEL-Homolog Hsp60. Dieser Komplex dissoziiert in einer ATP-abhängigen Reaktion [4, 14]. Zudem konnte mittels aufgereinigtem GroEL bakterielles Rubisco *in vitro* funktionell zusammengebaut werden [37]. Mittlerweile wurden eine Vielzahl molekularer Chaperone charakterisiert. Sie vermitteln nicht nur Faltungs- sowie Rückfaltungsprozesse, sie sind auch an posttranslationalen Modifizierungen beteiligt. Sie bewirken den korrekten Transport neusynthetisierter Proteine an deren Bestimmungsort und unterbinden währenddessen unerwünschte Interaktionen mit Makromolekülen der Umgebung.

### 1.1.3 Das Gen *mesd* und seine Bedeutung in der Embryonalentwicklung

2001 untersuchte die Gruppe um Bernadette Holdener auf dem siebten Chromosom der Maus eine Region, welche die Ausbildung des mittleren Keimblattes (Mesoderm) während der Embryogenese steuert. Diese dementsprechend *mesoderm development (mesd)* benannte Region konnte auf ein einzelnes Gen eingegrenzt werden [96, 51]. Mausembryonen, denen dieses Gen fehlte, bildeten im Verlauf der Gastrulation keine Primitivrinne und infolgedessen auch kein Mesoderm aus. Dies ließ sich auf eine fehlerhafte Ausprägung der embryonalen Polarität und der anschließenden Musterbildung zurückführen [51]. In dieser frühen Phase der Embryogenese unterteilt sich der Embryo in verschiedene Segmente, welche bereits mit späteren Organanlagen in Verbindung gebracht werden können. Diese Prozesse werden durch TGF- $\beta$ - oder WNT-Signalketten gesteuert, deren Unterbrechung zu einer fehlerhaften Spezifizierung von Vorläuferzellen der Primitivrinne führt [11, 69]. Die beobachteten Defekte der MESD-defizienten Mäuse konnten auf die Unterbrechung des WNT-Signalwegs zurückgeführt werden. Die Ursache lag im Fehlen der WNT-Korezeptoren LRP5 und LRP6 (Lipoprotein related protein 5 und 6), zwei Mitgliedern der Low Density Lipoprotein (LDL) Rezeptor Familie [56, 44]. Letztlich konnte Hsieh et.al. zeigen, daß das Genprodukt MESD die Aggregation von neusynthetisiertem LRP5/LRP6 verhindert und deren Lokalisation in der Zellmembran vermittelt [51]. MESD konnte also als ein klassisches Chaperon identifiziert werden. Zeitgleich mit Hsieh et.al. untersuchte Joaquim Culi das MESD-Homolog aus *Drosophila melanogaster*, welches Boca genannt wird. Er konnte zeigen, daß es ebenso für die Faltung und den Transport anderer Mitglieder der LDL Rezeptor Familie essentiell ist [20].

### 1.1.4 Die Familie der LDL-Rezeptoren

Die Familie der Low Density Lipoprotein Rezeptoren (LDLR) ist mit einer Vielzahl physiologischer Funktionen assoziiert. Der namensgebende LDL-Rezeptor wurde eingehend für seine Funktion in der Cholesterollhomöostase charakterisiert. Er bindet

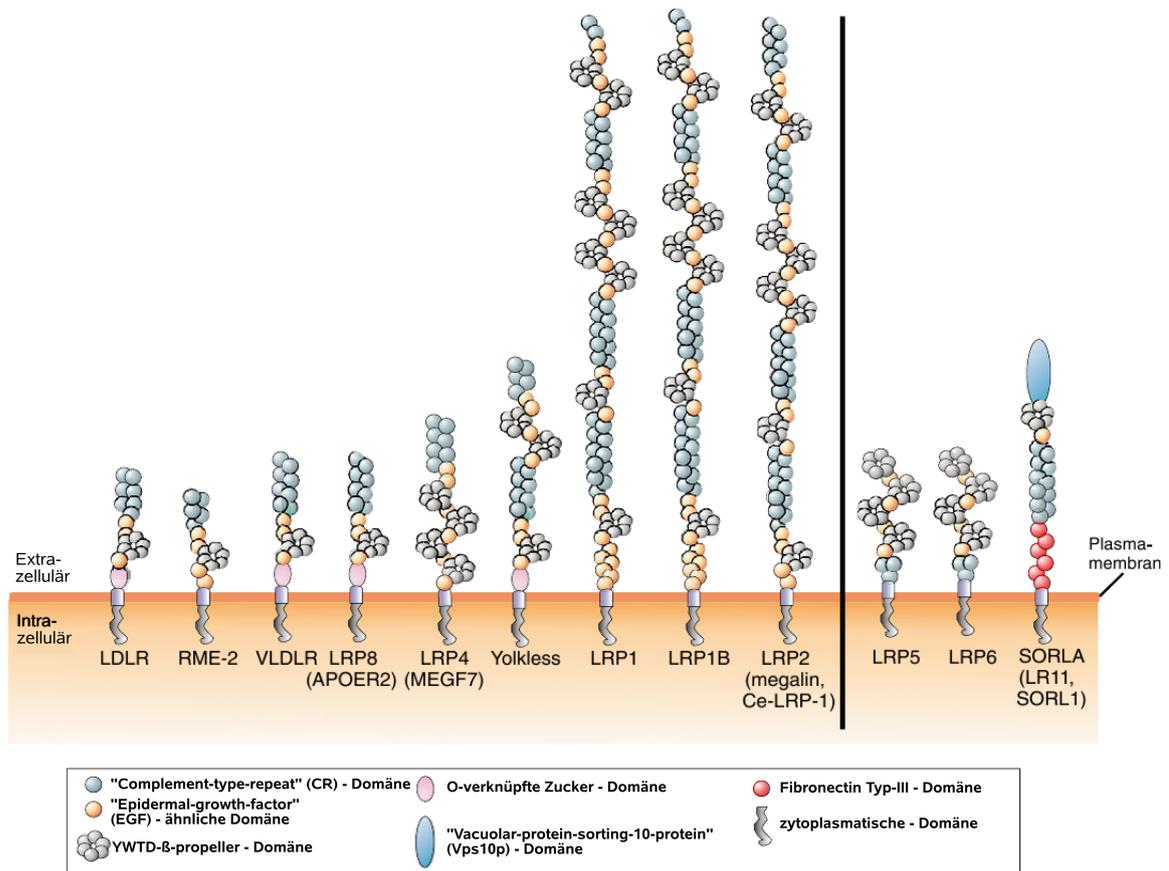


Abbildung 1.1:

#### Strukturelle Organisation der Mitglieder der LDLR-Familie [95].

Die Mitglieder auf der linken Seite werden üblicherweise zum Kern der LDLR-Familie gezählt, da ihre Ektodomänen N-terminal mit mehreren CR-Domänen beginnen, gefolgt von EGF-ähnlichen- sowie YWTD- $\beta$ -Propellerdomänen. Die Rezeptoren auf der rechten Seite weisen eine inverse Organisation auf (LRP5/LRP6), bzw. besitzen weitere für die LDLR-Familie untypische extrazelluläre Domänen (SorLa). **LDLR**: low-density lipoprotein receptor; **RME-2**: Receptor mediated endocytosis-2; **VLDLR**: very low-density lipoprotein receptor; **APOER2**: apolipoprotein E receptor; **MEGF7**: multiple Epidermal growth factor-type repeat containing protein 7; **LRP**: LDL-receptor related protein; **SorLa**: Sortilin-related receptor with A-type repeats; **Ce**: *C.elegans*

**Tabelle 1.1:**

humane Krankheitssyndrome infolge disfunktionaler LDLR-Rezeptoren [95]

Rezeptor	Veränderung	Krankheiten	Referenzen
LDL	verminderte Funktion	Familiäre Hypercholesterolämie (Anreicherung von LDL im Blut)	[36]
VLDL	verminderte Funktion	ponto-cerebelläre Hypoplasie (PCH-Syndrom; Bewegungs- und Entwicklungsstörungen)	[10]
LRP5	verminderte Funktion	Osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG, verminderte Knochendichte)	[38]
	erhöhte Funktion	High-bone-mass syndrome (erhöhte Knochendichte)	[67]
LRP6	verminderte Funktion	Autosomal dominant vererbte frühe Arteriosklerose (erhöhte Blutfettwerte, Bluthochdruck, Diabetes)	[70]
LRPB1	verminderte Funktion	Ösophagus- Plattenepithelkarzinom, großzelliges Bronchialkarzinom	[68, 89]
LRP2 (megalin)	verminderte Funktion	Donnai-Barrow Syndrom (Proteinurie, Fehlbildungen des Gehirns, diaphragmatische Hernie)	[55]
SorLa	verminderte Funktion	Alzheimer Erkrankung	[1, 61, 82]

mit Cholesterol angereicherte LDL-Partikel und vermittelt deren Internalisierung, wodurch der Cholesterolspiegel im Blut konstant gehalten sowie die Zelle mit erforderlichem Cholesterol versorgt wird. Die meisten Mitglieder der LDLR-Familie sind an der Endozytose verschiedenster Substanzen beteiligt [7]. Allerdings erfüllen sie auch andere Aufgaben wie beispielsweise den zellulären Transport verschiedener Membranproteine. So sind der SorLa- sowie die LRP-Rezeptoren an der Verteilung des Amyloidvorläuferproteins (APP) beteiligt [1, 2, 13]. Einige Substanzen werden nach Bindung an die Rezeptoren nicht internalisiert, sondern initiieren eine spezifische zelluläre Signalantwort. So kontrolliert der apoER2- und VLDL-Rezeptor durch Bindung von Reelin die neuronale Migration [88]. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, wirken der LRP5- und der LRP6-Rezeptor als Korezeptoren des WNT-Signalwegs und beeinflussen darüber die Embryogenese. Tabelle 1.1 listet bekannte

humane Krankheitssyndrome auf, die in Zusammenhang mit Funktionsstörungen von Rezeptoren der LDLR-Familie stehen.

Die extrazellulären Regionen der LDLR-Rezeptoren bestehen aus Wiederholungen von drei verschiedenen Domänen. Die “complement-type-repeat” (CR)-Domänen, interagieren mit den Rezeptorliganden. Die YWTD  $\beta$ -Propellerdomäne, welche sich aus sechs aufeinander folgenden YWTD-Motiven faltet, vermittelt die pH-abhängige Ligandabspaltung von den CR-Domänen im Endosom [53]. Die Propellerdomänen werden von “Epidermal growth factor” (EGF) ähnlichen Domänen flankiert. Abb. 1.1 stellt schematisch den Aufbau der bekannten Mitglieder der LDLR-Familie zusammen.

### 1.1.5 Faltung der Rezeptoren und Transport zur Zellmembran

Die Faltung der Rezeptoren der LDLR Familie ist ein komplizierter Vorgang. Dies ergibt sich einerseits aufgrund der hohen Zahl intramolekularer Disulfidbrücken in den CR- und EGF-Domänen, andererseits bereitet die sehr kompakte Faltung von sechs aufeinander folgenden YWTD-Motiven zu einer sechsblättrigen Propellerstruktur Probleme [54, 90]. Die Synthese und der Transport der Rezeptoren geht mit dem Problem einher, die Ligand-bindenden Bereiche vor anderen intrazellulären Molekülen abzuschirmen, bis der Rezeptor seine Position in der Zellmembran erreicht hat. Nach der Synthese der Rezeptoren im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Glykosilierung im Golgiapparat werden sie in kleinen Vesikeln zur Zellmembran transportiert, welche anschließend mit ihr verschmelzen. In Säugetierzellen vermitteln verschiedene Chaperone die korrekte Faltung und den Transport der Rezeptoren der LDLR-Familie. Das Rezeptor assoziierte Protein (RAP) bindet an die CR-Domänen der Rezeptoren und verhindert dadurch eine frühzeitige Interaktion mit intrazellulären Substanzen [94]. Joaquim Culi konnte 2004 zeigen, daß die YWTD- $\beta$ -Propellerdomäne zusammen mit ihrer C-terminal folgenden EGF-Domäne zur korrekten Faltung Boca/MESD benötigt [21]. Abb. 1.2 zeigt schematisch die Vorgänge im Verlauf der Biosynthese von Rezeptoren der LDLR-Familie.

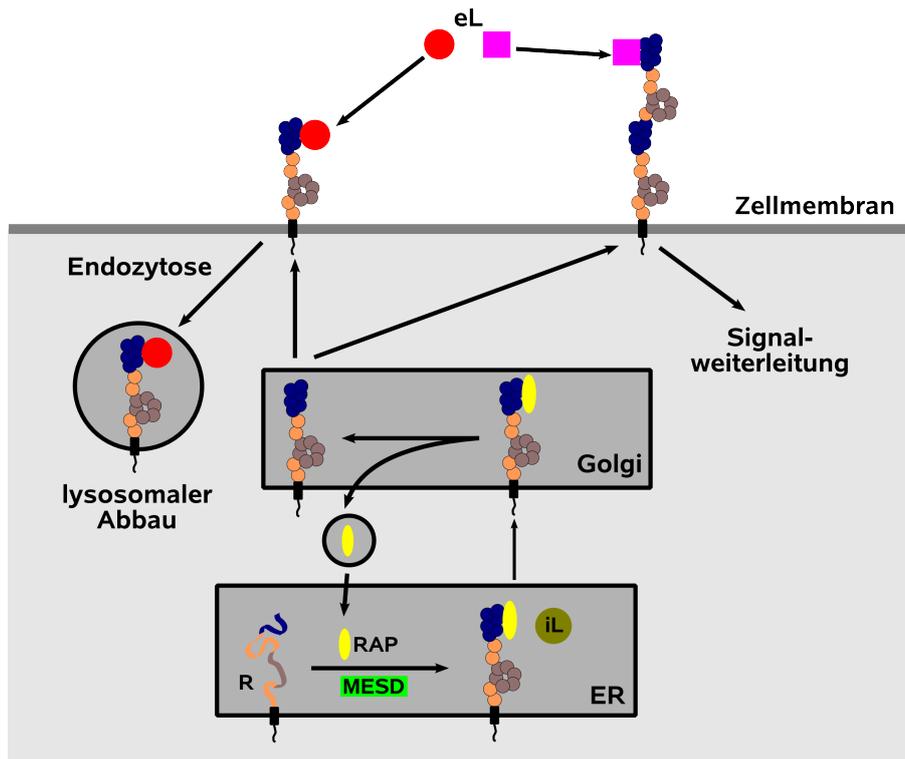


Abbildung 1.2:

### Schematischer Blick auf die Biosynthese der LDLR-Rezeptoren und deren Transport zur Zellmembran

Die molekularen Chaperone (MESD, RAP) unterstützen die Faltung der naszierenden Rezeptoren (R) im ER. RAP konkurriert mit intrazellulären Liganden (iL) um die CR-Domänen und schützt sie dadurch vor unerwünschten Interaktionen. MESD unterstützt die Faltung des sechsblättrigen  $\beta$ -Propellers. Korrekt gefaltete Rezeptoren befinden sich in der Zellmembran und interagieren mit extrazellulären Liganden (eL), was zu deren Internalisierung bzw. zur Aktivierung von Signalwegen führt.

## 1.2 3D-Strukturaufklärung an Biomolekülen

Die erste Struktur eines Biomoleküls, des Myoglobins, wurde Ende der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts von Max Ferdinand Perutz und John Cowdery Kendrew mittels der Röntgenkristallstrukturanalyse gelöst. 30 Jahre später entwickelte Kurt Wüthrich auf Basis der Kernmagnetresonanz Methoden zur Strukturaufklärung von Proteinen. Beide Methoden haben ihre Vor- und Nachteile. Als Grundvoraussetzung für die Röntgenkristallstrukturanalyse müssen Proteinkristalle vorliegen, wobei die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen sehr zeitaufwendig sein kann. Ist dieser Prozeß allerdings abgeschlossen, verläuft die Strukturbestimmung vergleichsweise

schnell, da das Röntgenbeugungsmuster eines Proteins direkt mit dessen atomaren Koordinaten verknüpft ist. Im Gegensatz dazu gestattet die NMR-Spektroskopie Untersuchungen an Proteinen in Lösung. Die Festphasen-NMR-Spektroskopie erweitert den Anwendungsbereich noch. Membranproteine können beispielsweise innerhalb einer Lipiddoppelschicht vermessen werden. Auch werden Strukturuntersuchungen an Proteinen möglich, welche weder löslich noch kristallin sind. Ein solches Beispiel sind Amyloidfibrillen. Neben der Zeitersparnis durch Verzicht auf die Kristallisation, hat dies auch den Vorteil, Strukturuntersuchungen in einer nativeren Umgebung durchführen zu können. Allerdings ist für die Aufnahme und Auswertung der Spektren sowie für die eigentliche Strukturrechnung ein erheblicher Zeitaufwand nötig. Die Entwicklung von Methoden zur automatischen Zuordnung von NMR-Signalen (CANDID/ATNOS [47, 46]) konnte den erforderlichen Zeitaufwand in den letzten Jahren deutlich senken.

Ein Nachteil der NMR-Spektroskopie ist der Umstand, daß die Aufnahme gut aufgelöster und signalintensiver Spektren auf vergleichsweise kleine Proteine beschränkt ist. Die dafür zugrundeliegenden Mechanismen werden im folgenden Kapitel beschrieben. Die Verwendung stärkerer Magnetfelder sowie selektiver Isotopenmarkierung der Aminosäuren erweiterte diesen Größenbereich in den letzten Jahren, dennoch hat die NMR-Spektroskopie von Biomolekülen ihre größte Bedeutung in einem Größenbereich bis 30 kDa.

Nicht zuletzt kann die NMR-Spektroskopie aufgrund der Messung von Proteinen in Lösung, anstatt in einer starren Kristallumgebung, wichtige Informationen über die Proteindynamik liefern. Gerade die Flexibilität von Proteinen ist für ihre Funktion von entscheidender Bedeutung [26]. Die aus NMR-Spektren erhaltenen Informationen sind ein Abbild der chemischen Umgebung eines jeden Atoms im Protein. Interaktionen mit anderen Substanzen können daher, aufgrund von Veränderungen der chemischen Verschiebung spezifischer Signale, welche von Aminosäuren im Interaktionsbereich stammen, auf Atomebene charakterisiert werden [31]. Langsame Veränderungen der Proteinstruktur können in Echtzeit verfolgt werden [74, 26].

Aufgrund der erwähnten Methoden hat die NMR-Spektroskopie im Bereich der Strukturanalyse von Biomolekülen erheblich an Bedeutung gewonnen.

### 1.2.1 NMR Methoden für Proteine in Lösung

Dieses Kapitel soll die grundlegenden Prinzipien der NMR-Spektroskopie vermitteln. Desweiteren sollen die angewandten Strategien, die zur Resonanzzuordnung der Spektren führen, erläutert werden.

Das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz beruht auf der Wechselwirkung des magnetischen Moments  $\vec{\mu}$  eines Atomkerns mit einem äußeren magnetischen Feld. Das magnetische Moment ist direkt proportional zum Eigendrehimpuls  $\vec{J}$  (Kernspin), einer quantenmechanischen Kerneigenschaft (Gleichung 1.2). Die Proportionalitätskonstante  $\gamma$ , auch gyromagnetisches Verhältnis genannt, ist für jede Kernsorte eine charakteristische Konstante und bestimmt die Empfindlichkeit des Kernes in der NMR.

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{J} \quad (1.2)$$

Mit der Abhängigkeit des Eigendrehimpulses von der Kernspinquantenzahl  $I$  und dem Planckschen Wirkungsquantum  $\hbar$  ergibt sich Gleichung 1.3

$$|\vec{\mu}| = \gamma \hbar \sqrt{I(I+1)} \quad (1.3)$$

Dementsprechend besitzen nur Kerne mit  $I \neq 0$  ein magnetisches Moment und zeigen eine kernmagnetische Resonanz. Der Eigendrehimpuls orientiert sich in einem äußeren magnetischen Feld  $B_0$ . Für  $I=1/2$  resultieren eine zur Richtung von  $B_0$  parallele und eine antiparallele Ausrichtung. Die Energiedifferenz dieser Zustände hängt von der Stärke des äußeren Magnetfelds und  $\gamma$  ab (Gleichung 1.4).

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad (1.4)$$

Diese Energiedifferenz kann spektroskopisch mittels elektromagnetischer Felder im MHz Bereich ausgenutzt werden (Gleichung 1.5).

$$\Delta E = h\nu \quad (1.5)$$

Das magnetische Moment jedes Kerns rotiert in einem konstanten Winkel mit der

sogenannten Larmorfrequenz  $\omega_0$  um die Richtung des Feldes  $B_0$  (Gleichung 1.6). Sie entspricht der Resonanzfrequenz des Kerns und damit der Übergangsfrequenz zwischen den Energieniveaus.

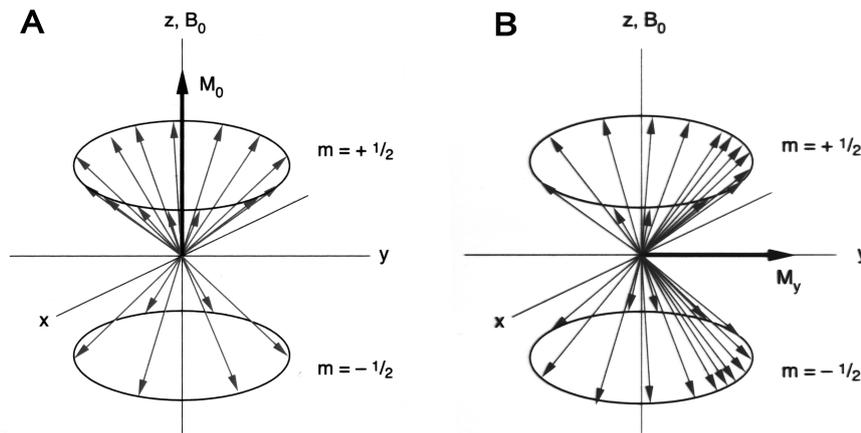
$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (1.6)$$

Da sich die Resonanzfrequenz mit der Stärke des äußeren Magnetfelds ändert, ist es erforderlich, die gemessenen Frequenzen auf eine interne Standardfrequenz zu referenzieren. Die erhaltenen relativen Frequenzen werden chemische Verschiebung genannt und mit "parts per million" (ppm) angegeben. Das lokale magnetische Feld am Ort eines bestimmten Kerns in einem Molekül hängt von der Elektronenverteilung in seiner Umgebung ab. Die einzigartige Umgebung eines Kerns in der Struktur eines biologischen Makromoleküls bestimmt dessen chemische Verschiebung. Daher variieren die gemessenen Resonanzen innerhalb eines strukturierten Biomoleküls erheblich. Dieser Umstand macht es möglich, die Resonanzfrequenzen der meisten Atome eines Biomoleküls zu bestimmen und sie zur Strukturbestimmung zu nutzen [78].

Der Energieunterschied zwischen der parallelen und antiparallelen Ausrichtung der Kernspins ist sehr gering. Dies bewirkt eine fast gleiche Besetzung beider Niveaus, weswegen die NMR Spektroskopie eine vergleichsweise unempfindliche Meßmethode ist. Im Grundzustand sind mehr Kerne parallel zum äußeren Magnetfeld orientiert. Dieser Zustand läßt sich in Form eines Doppelkegels beschreiben (Abb. 1.3). Jeder der beiden Kegel entspricht einem Energieniveau, auf dem die magnetischen Momente mit der Larmorfrequenz um die Richtung von  $B_0$  rotieren. Aus der Summe aller magnetischen Momente resultiert im Grundzustand eine makroskopische Magnetisierung entlang der Feldrichtung von  $B_0$  (longitudinal; Abb. 1.3A). Wird ein geeignet kurzer Radiowellenpuls senkrecht zu  $B_0$  eingestrahlt, gleichen sich die Besetzungsverhältnisse aus und einige Kernspins rotieren gebündelt in Phase um die Feldrichtung  $B_0$  (Abb. 1.3B). In einem angenommenen Koordinatensystem, dessen z-Achse entlang der Feldrichtung  $B_0$  verläuft, ergibt sich im Anregungszustand aus der Summe aller magnetischen Momente eine makroskopische Magnetisierung, welche in der x-y-Ebene rotiert (transversal). Der Anregungspuls bewirkt also, ausgehend von der Feldrichtung  $B_0$ , eine Drehung der makroskopischen Magnetisierung um den Winkel  $\Theta$ , welcher durch Wahl einer entsprechenden Pulsdauer  $\tau_P$  und Pulsintensität  $B_{1i}$  beliebig wählbar ist (Gleichung 1.7).

$$\Theta = \gamma B_{1i} \tau_P \quad (1.7)$$

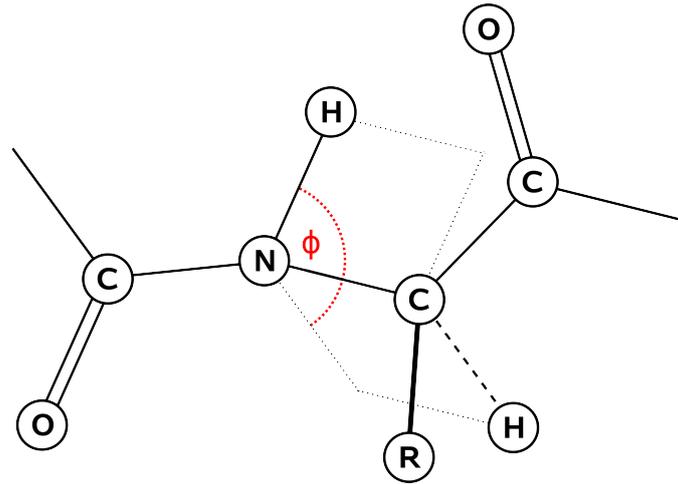
In der Praxis wird bei konstanter Pulsintensität nur die Pulsdauer variiert. Die am häufigsten verwendeten Pulsdauern entsprechen Drehungen der makroskopischen Magnetisierung um  $90^\circ$  bzw  $180^\circ$ .



**Abbildung 1.3:**

Besetzungszustände der Energienniveaus von Spin-1/2-Kernen im **A: Grundzustand:** makroskopische z-Magnetisierung  $M_0$  **B: Anregungszustand:** makroskopische Magnetisierung in x-y-Ebene  $M_y$

Die rotierende transversale Magnetisierung induziert in einer geeigneten Spule einen Strom. Durch Rückkehr der Kernspins in den Grundzustand geht die transversale Magnetisierung verloren. Die gemessene Spannung stellt eine sich exponentiell abschwächende Sinusfunktion dar, der "Free Induction Decay" (FID). Alle Resonanzfrequenzen der Probe werden mittels eines geeignet kurzen Radiofrequenzpulses gleichzeitig angeregt. Die gemessenen Larmor Frequenzen überlagern sich im FID. Durch Fouriertransformation entsteht das Frequenzspektrum. Der Verlust der transversalen Magnetisierung wird durch zwei Relaxationszeiten beschrieben. Einerseits die Spin-Gitter (longitudinale) Relaxationszeit  $T_1$ , welche eine Rückkehr zur z-Magnetisierung bewirkt. Andererseits die Spin-Spin (transversale) Relaxationszeit  $T_2$ , die einen Abbau der Phasenkoherenz in der x-y-Ebene verursacht. Die Relaxationszeiten hängen von der Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  ab. Diese beschreibt die statistische Bewegung des Gesamtmoleküls. Die Messung der Relaxationszeiten läßt also Rückschlüsse auf die

**Abbildung 1.4:**

Die vicinale Kopplung zwischen  $H_\alpha$  und  $H_N$  hängt vom Torsionswinkel  $\phi$  ab.

Moleküldynamik zu. Informationen zu flexiblen Bereichen führen auch zu Hinweisen auf Sekundärstrukturelemente. Da  $\tau_c$  auch vom hydrodynamischen Radius des Moleküls abhängt (Gleichung 1.8), welcher durch die Molekülgröße bestimmt wird, nimmt die Linienbreite in der Lösungs-NMR-Spektroskopie infolge einer schnelleren Relaxation mit der Molekülgröße zu.

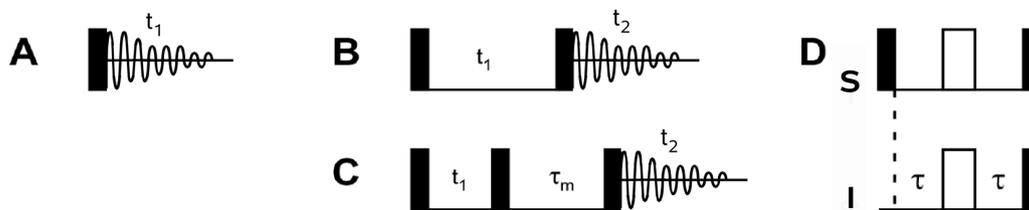
$$\tau_c = \frac{\eta V_{hyd}}{kT} \quad (1.8)$$

Ein bedeutender Effekt in der NMR-Spektroskopie ist die Spin-Spin-Kopplung. Diese Interaktion benachbarter Kernspins, vermittelt durch die Elektronen der chemischen Bindung, wird auch skalare bzw. J-Kopplung genannt. Sie führt zum Aufspalten der Linien im Spektrum und ist unabhängig von  $B_0$ . In Protein-NMR-Spektren sind meist nur Kopplungen über maximal 3 Bindungen zu beobachten. Für die Strukturbestimmung ist insbesondere die vicinale Kopplung über drei Bindungen von Interesse, da sie vom Torsionswinkel zwischen den koppelnden Kernen abhängt (Gleichung 1.9, Abb. 1.4).

$$J(\phi) = A \cos^2(\phi - 60) - B \cos(\phi - 60) + C \quad (1.9)$$

A, B und C sind empirisch bestimmte Konstanten, die für jede Art von Torsionswinkeln verschieden sind. Über die vicinale  $H_N$ - $H_\alpha$ -Kopplungskonstante läßt sich somit z.B. der Torsionswinkel  $\phi$  des Proteinrückgrats bestimmen (Abb. 1.4). Die skalare Kopplung kann

auch zur Übertragung der Magnetisierung auf benachbarte Kernspins genutzt werden. Das  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum (Correlated Spectroscopy, Abb. 1.5B) zeigt Kreuzsignale zwischen miteinander skalar koppelnden  $^1\text{H}$ -Kernen. Der INEPT-Transfer (insensitive nucleus enhancement by polarisation transfer, Abb. 1.5D) verstärkt NMR-Signale durch einen Magnetisierungstransfer [77].



**Abbildung 1.5:**

**Grundlegende 1D und 2D  $^1\text{H}$ -NMR-Experimente sowie der INEPT-Transfer**

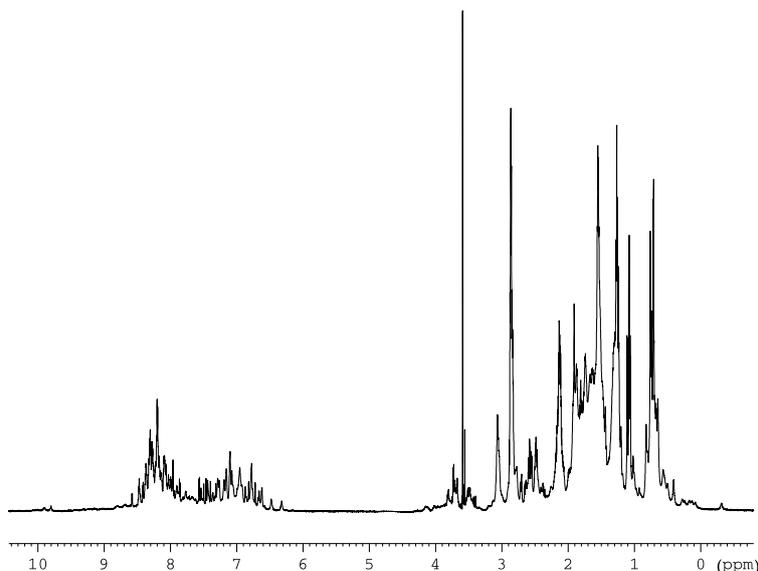
**A:** Das einfachste NMR-Experiment bestehend aus einem  $90^\circ$  Puls und anschließender Detektion. **B:**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY **C:**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY **D:** Beim INEPT Transfer wird Magnetisierung von einem sensitiven Kern S auf einen unsensitiven Kern I übertragen. Schwarze Balken repräsentieren  $90^\circ$  Pulse, weiße Balken  $180^\circ$  Pulse.

Zusätzlich zur skalaren Kopplung über chemische Bindungen ist eine Kopplung über den Raum möglich. Diese dipolaren Kopplungen werden jedoch in der Lösungs-NMR-Spektroskopie durch die Molekülbewegung ausgemittelt. Allerdings treten Dipol-Dipol-Interaktionen zwischen räumlich nahen Spins auf, welche als Nuklear Overhauser Effekt (NOE) bezeichnet werden. Die Kreuzrelaxationsrate  $R_{ij}$  zwischen zwei Spins ist indirekt proportional zur sechsten Potenz ihres Abstands  $r$  (Gleichung 1.10).

$$R_{ij} = \frac{1}{10} \gamma^4 \hbar^2 \frac{1}{r^6} \left( -\tau_c + \frac{6\tau_c}{1 + (2\omega_0\tau_c)^2} \right) \quad (1.10)$$

Diese Abhängigkeit ist für die NMR von Biomolekülen von entscheidender Bedeutung, da sich damit aus den Intensitäten von Kreuzsignalen die Abstände zwischen räumlich nahen Kernen berechnen lassen, was die Grundlage der Strukturbestimmung darstellt. Die Kreuzrelaxationsrate hängt weiterhin von der Rotations-Korrelationszeit  $\tau_c$  ab. Die Stärke des NOE liefert daher auch Informationen zur Moleküldynamik. Ein einfaches Experiment zur Messung des NOE zeigt Abb. 1.5C

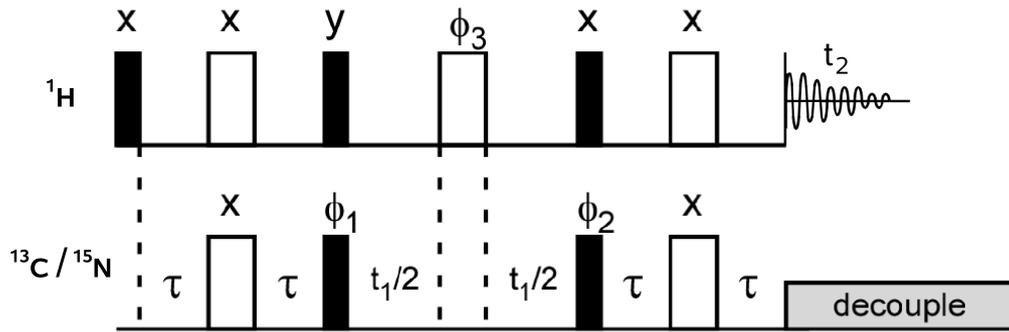
Schon bei kleinen Proteinen überlagern sich im eindimensionalen Spektrum eine Vielzahl von Signalen. Wie Abb. 1.6 am Beispiel des  $^1\text{H}$ -Spektrums eines 97 Aminosäure langen



**Abbildung 1.6:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von MESD89-184

Teils des Proteins MESD erkennen läßt, verhindert die mangelnde Auflösung eine erfolgreiche Resonanzzuordnung. Durch die Erweiterung auf eine zweite Dimension läßt sich dieses Problem lösen. Dies wird durch Einfügen einer Evolutionszeit, in der sich die Magnetisierung entsprechend der Resonanzfrequenz eines weiteren Kerns “entwickeln” kann, gefolgt von einer sogenannten Mischzeit, in der die Magnetisierung auf andere Kernspins übertragen wird, realisiert. Die Auflösung in der indirekten (2.) Dimension wird durch die Zahl der gemessenen Inkremente der Evolutionszeit bestimmt. Das  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (Abb. 1.5B) und  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY (Abb. 1.5C) sind zwei einfache zweidimensionale Experimente.

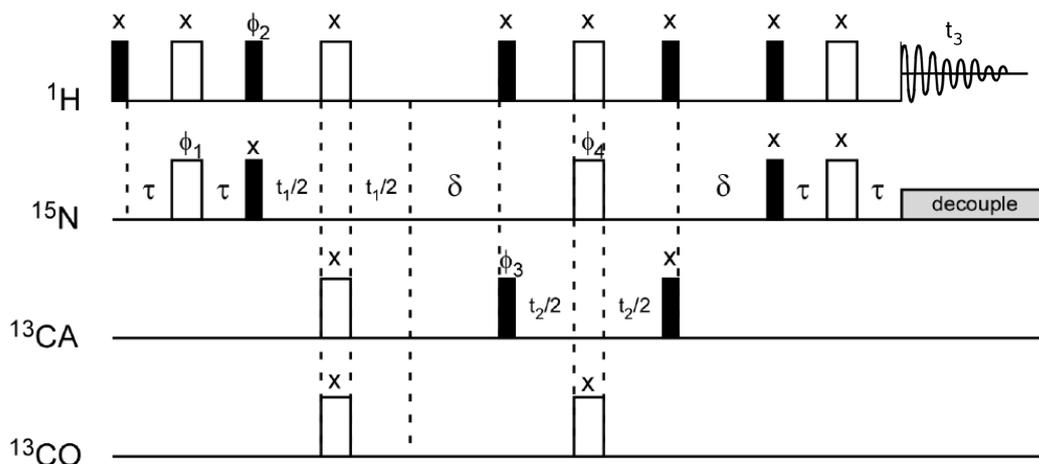
Neben  $^1\text{H}$  enthalten Proteine noch andere magnetisch aktive Kerne, die sogenannten Heterokerne, von denen insbesondere die Spin-1/2-Isotope  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$  für die Strukturaufklärung mittels NMR von Bedeutung sind. Auf die Detektion von Kernen mit höheren Spinzahlen als 1/2 wird aufgrund breiter Signale verzichtet. Allerdings ist die natürliche Häufigkeit mit 0,2 % für  $^{15}\text{N}$  und 1 % für  $^{13}\text{C}$  gering. Dieses Problem wird durch nahezu vollständige Anreicherung der Proteinprobe mit den beiden Isotopen umgangen. Hierzu wird der Zellkultur, die das Protein exprimiert,  $^{13}\text{C}$ -markierte Glukose bzw.  $^{15}\text{N}$ -markiertes  $\text{NH}_4\text{Cl}$  als einzige Kohlenstoff bzw. Stickstoffquelle zugesetzt. Ein weiteres Problem stellt das deutlich geringere gyromagnetische Verhältnis der

**Abbildung 1.7:****Die HSQC-Pulssequenz**

Nach  $^1\text{H}$ -Anregung wird die Magnetisierung mittels eines INEPT-Transfers auf den Heterokern übertragen. Nach Evolution der Magnetisierung am Heterokern überträgt ein inverser INEPT-Transfer die Magnetisierung zurück auf den  $^1\text{H}$ -Kern, dessen Frequenz detektiert wird. Schwarze Balken repräsentieren  $90^\circ$  Pulse, weiße Balken  $180^\circ$  Pulse.

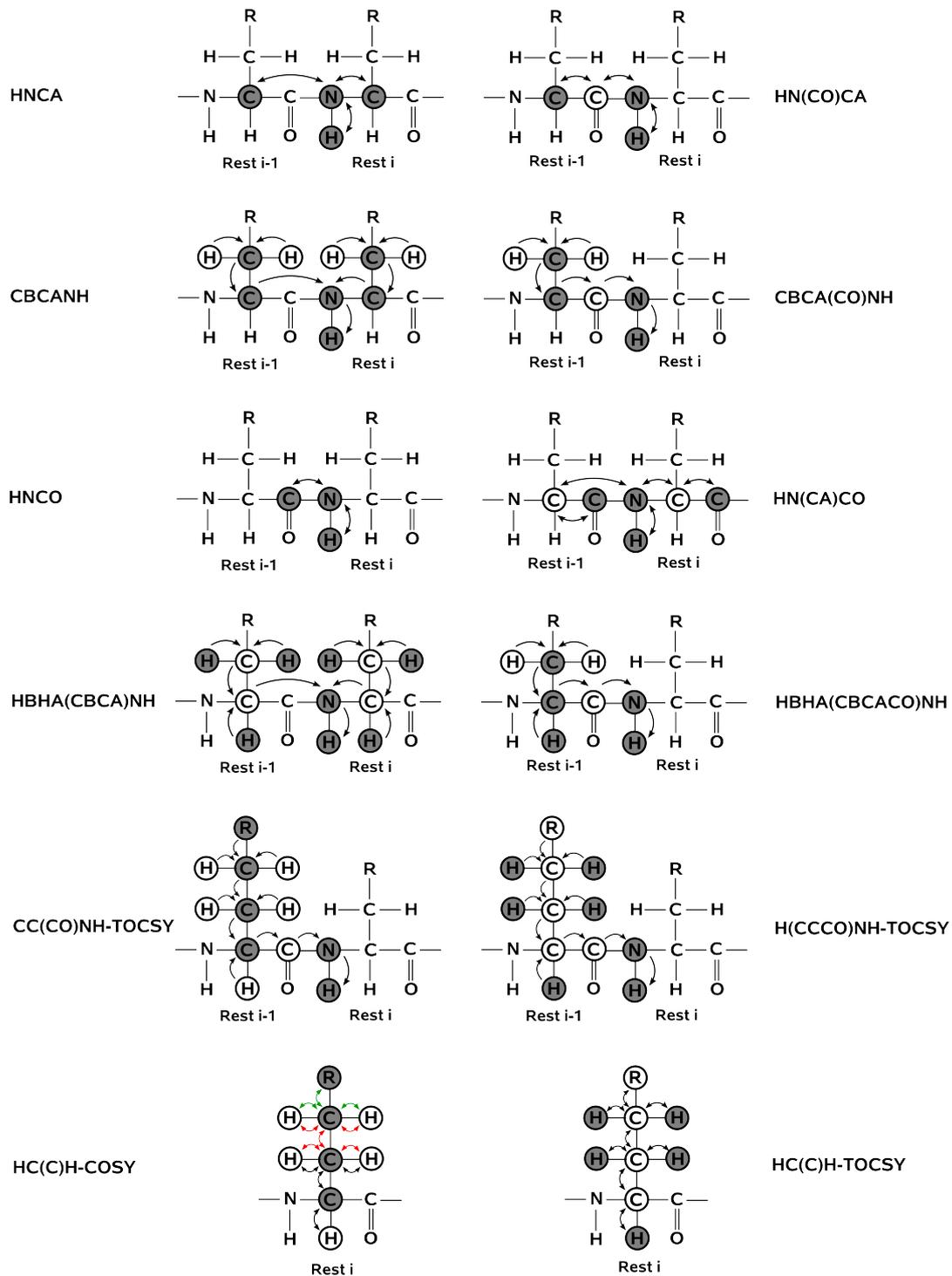
Heteroatome im Vergleich zu  $^1\text{H}$  Wasserstoff dar. Die Empfindlichkeit von  $^{15}\text{N}$  bzw.  $^{13}\text{C}$  liegt im Vergleich zu  $^1\text{H}$  bei 10 % bzw. 25 %. Die direkte Anregung und Detektion der Heterokerne würde daher zu schwachen Signalen führen. Daher starten heteronukleare NMR-Experimente in der Regel mit der Anregung von  $^1\text{H}$ . Die Magnetisierung wird dann vom Wasserstoff auf die Heteroatome übertragen. Ein solcher Transferschritt ist das bereits erwähnte INEPT Element (Abb. 1.5D). Es überträgt die  $^1\text{H}$  Magnetisierung auf ein direkt gebundenes Heteroatom. Das wahrscheinlich bedeutendste NMR Experiment, welches solch einen Magnetisierungstransfer nutzt, ist das HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence, Abb. 1.7). Die  $^1\text{H}$  Magnetisierung wird auf das direkt gebundene  $^{15}\text{N}$ - bzw.  $^{13}\text{C}$ -Atom und zur Detektion wieder zurück auf den Wasserstoff übertragen.

Die NMR-Spektroskopie ist keineswegs auf zwei Dimensionen beschränkt. Im Prinzip können Experimente jeglicher Dimension durch Einfügen weiterer Evolutions- und Mischzeiten durchgeführt werden. Praktisch ist die Dimensionalität der Experimente durch zwei Faktoren limitiert. Einerseits wird die Länge der Pulssequenz durch die Relaxation begrenzt. Andererseits steigt die Meßzeit bei mehrdimensionalen Experimenten erheblich an, da in jeder Dimension eine ausreichende Anzahl von Inkrementen aufgenommen werden muß. Ein einfaches Beispiel für ein dreidimensionales NMR-Experiment ist das HNCA (Abb. 1.8). Es entsteht aus der Kombination eines  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC mit einem  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC.

**Abbildung 1.8:****Einfache Umsetzung eines HNCA-Experiments**

Diese Puls-Sequenz entsteht durch Kombination eines  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC mit einem  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC. Schwarze Balken representieren  $90^\circ$  Pulse, weiße Balken  $180^\circ$  Pulse.

Die Vielzahl der verschiedenen Experimente, die in der Protein-NMR genutzt werden, erfordert eine einheitliche Namensgebung. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die Experimente nach den beteiligten Kernen und in der Reihenfolge des Magnetisierungstransfers zu benennen [84]. Kerne, die nur zum Magnetisierungstransfer genutzt werden, ohne daß ihre chemische Verschiebung detektiert wird, werden in Klammern gesetzt. Der zu Beginn der Pulssequenz angeregte  $^1\text{H}$  Kern wird oft in der Benennung weggelassen. Als Beispiel sollen die Experimente HN(CO)CA bzw. CA(CO)NH betrachtet werden. Beide Experimente führen zum gleichen Spektrum. Die chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  Kerne der Amidgruppe des Proteinrückgrats werden über die CO-Gruppe mit der chemischen Verschiebung des  $\text{C}\alpha$  der vorhergehenden Aminosäure korreliert. Im Falle des HN(CO)CA wird die Magnetisierung nach Anregung des Amid- $^1\text{H}$  auf das Amid- $^{15}\text{N}$  übertragen. Von dort weiter über das Carbonyl- $^{13}\text{C}$  zum  $\text{C}\alpha$  des vorhergehenden Restes. Nach Evolution der chemischen Verschiebung des  $\text{C}\alpha$  gelangt die Magnetisierung auf demselben Weg zurück zum Amid- $^{15}\text{N}$ , wo dessen chemische Verschiebung gemessen wird. Letztlich wird die Magnetisierung zurück auf das Amid- $^1\text{H}$  übertragen und es erfolgt die Aufzeichnung des FID. Das CA(CO)NH Experiment beginnt mit der Anregung des  $\text{H}\alpha$ , von wo die Magnetisierung auf das gebundene  $\text{C}\alpha$  und von dort weiter über das Carbonyl- $^{13}\text{C}$  zum Amid- $^{15}\text{N}$  und letztlich zum Amid- $^1\text{H}$  übertragen wird. Dessen

**Abbildung 1.9:**

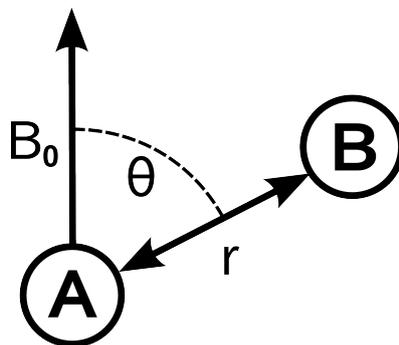
Übersicht einiger für die Strukturaufklärung wichtigen 3D-NMR-Experimente. Die Kerne, deren Resonanzen während des Experiments detektiert werden, sind dunkel unterlegt. Kerne, welche nur zum Magnetisierungstransfer genutzt werden, sind hell unterlegt. Die Pfeile kennzeichnen den Weg des Magnetisierungstransfers. Der Magnetisierungstransfer im HC(C)H-COSY verläuft nur entlang gleichfarbiger Pfeile.

Signal wird wiederum detektiert. In beiden Experimenten werden die chemischen Verschiebungen des  $C\alpha$ , Amid- $^{15}\text{N}$  und Amid- $^1\text{H}$  gemessen. Das Carbonyl- $^{13}\text{C}$  wird nur zum Magnetisierungstransfer genutzt.

Für die sequentielle Zuordnung der Kerne des Protein-Rückgrats werden Paare von dreidimensionalen Experimenten auf Basis eines  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC genutzt. Ein Beispiel ist das CBCA(CO)NH- zusammen mit dem CBCANH-Experiment [39, 40]. Im Falle des CBCA(CO)NH werden die  $C\beta$ - und  $C\alpha$ -Resonanzen der N-terminal vorhergehenden Aminosäure (i-1) mit der Amid-Gruppe der "eigenen" Aminosäure (i) gekoppelt. Im CBCANH werden beide, die vorhergehenden und eigenen  $C\beta$ - und  $C\alpha$ -Resonanzen mit der eigenen Amidgruppe korreliert (Abb. 1.9). Man erhält demzufolge zu jedem N-H-Kreuzsignal im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC die  $C\alpha$ - und  $C\beta$ -Resonanzen des eigenen und vorhergehenden Restes. Durch Abgleich beider  $^{13}\text{C}$ -Resonanzpaare ist die sequentielle Zuordnung möglich. Die charakteristischen  $C\alpha/C\beta$ -Resonanzen der Aminosäuren Serin, Threonin und Alanin sowie die spezielle chemische Verschiebung des  $C\alpha$ -Signals von Glycin lassen eine Zuordnung der bekannten Aminosäuresequenz zu den sequentiell geordneten Resonanzen zu. Ähnliche dreidimensionale NMR-Experiment-Paare können für das Carbonyl- $^{13}\text{C}$  oder die  $\text{H}\alpha/\text{H}\beta$  Resonanzen durchgeführt werden (Abb. 1.9).

Die verbleibenden Resonanzen der Aminosäureseitenketten können mittels dreidimensionaler NMR-Experimenten basierend auf TOCSY- (Total Correlation Spectroscopy) und COSY-Mischsequenzen ermittelt werden (Abb. 1.9). Im H(CCCO)NH-TOCSY und CC(CO)NH-TOCSY [75] werden die chemischen Verschiebungen aller  $^1\text{H}$ - bzw.  $^{13}\text{C}$ -Kerne eines Aminosäurerestes mit der Amidgruppe der folgenden Aminosäure gekoppelt. Durch Abgleich mit einem HC(C)H-COSY erhält man Informationen, welche der Kerne innerhalb der Seitenkette benachbart sind. Diese Strategie versagt bei den Signalen der Seitenkettenaromaten. Diese Resonanzen können mittels eines 3D  $^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY zugeordnet werden. Hierbei werden an Kohlenstoff gebundene  $^1\text{H}$ -Kerne mit anderen räumlich nahen  $^1\text{H}$ -Kernen gekoppelt. Da die benachbarten Protonen innerhalb eines Aromaten sehr dicht beieinander liegen, sind für diese Resonanzen starke Signale zu erwarten.

Sind alle Proteinresonanzen zugeordnet, können mittels NOE-basierter Experimente Kernabstände gemessen werden. Diese stellen die Grundlage der Strukturrechnung dar. Aufgrund der starken Überlagerung der Signale in einem 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY ist es insbesondere bei größeren Proteinen erforderlich, dreidimensionale Spektren aufzunehmen. Ein 3D- $^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY bzw. 3D- $^{15}\text{N}$ -HSQC-NOESY korreliert die

**Abbildung 1.10:**

Die dipolare Kopplung zwischen zwei Atomkernen hängt von deren Abstand  $r$  und dem Winkel  $\Theta$  ihrer Verbindungsachse zur Richtung des externen Magnetfeldes  $B_0$  ab

Signale eines an ein  $^{13}\text{C}$  bzw.  $^{15}\text{N}$  gebundenen Protons mit den Signalen anderer räumlich naher  $^1\text{H}$ -Kerne.

Weitere für die Strukturrechnung nutzbare Informationen sind Bindungswinkel sowie RDC's (Residual Dipolar Couplings). Wie bereits erwähnt, können Bindungswinkel aus der vicinalen Kopplungskonstante abgeleitet werden. RDC-Messungen haben in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Sie liefern Informationen über die Orientierung von Atombindungen zueinander. NOE-Daten können nur für räumlich sehr nahe Atomkerne erhalten werden. Diese Einschränkung trifft für RDC's nicht zu. Informationen über die Orientierung weit voneinander entfernter Proteinbereiche zueinander ergänzen die NOE-Abstands- bzw. Winkelinformationen. Desweiteren bieten RDC's die Möglichkeit, Orientierungsänderungen einzelner Proteinbereiche zu verfolgen. Daher finden RDC-Messungen insbesondere bei der Untersuchung dynamischer Prozesse zunehmend Verwendung. Betrachtet man zwei Atomkerne A und B, so hängt die Stärke ihrer dipolaren Kopplung von ihrer Distanz zueinander, ihrem gyromagnetischen Verhältnis und dem Winkel ihrer Verbindungsachse zur Richtung des externen magnetischen Feldes ab (Abb. 1.10, Gleichung 1.11).

$$H_D = \frac{\hbar\gamma_A\gamma_B}{4\pi r_{AB}^3} [1 - 3\cos^2\Theta] (3A_Z B_Z - A \cdot B) \quad (1.11)$$

In der Festkörper NMR können dipolare Kopplungen von mehreren kHz beobachtet werden. In einer isotropen Umgebung mit uneingeschränkter Beweglichkeit der Moleküle mittelt sich die dipolare Kopplung aufgrund ihrer Winkelabhängigkeit zur Richtung

des äußeren Magnetfeldes aus. Um auch in der Lösungs-NMR-Spektroskopie dipolare Kopplungen messen zu können, muß die Molekülbeweglichkeit eingeschränkt werden. Diamagnetische Moleküle haben in der Regel eine schwache Tendenz sich in einem externen Magnetfeld auszurichten. Dafür verantwortlich ist die Anisotropie ihrer magnetischen Suszeptibilität. So richten sich beispielsweise Nukleinsäuren, aufgrund ihrer parallel gestapelten Aromaten, im Magnetfeld aus, was die Messung schwacher RDC's ermöglicht [17, 59, 93]. Moleküle, bei denen dieser Effekt nicht auftritt, können durch Messung in einem anisotropen Medium in ihrer Molekülbeweglichkeit eingeschränkt werden [92]. Um eine direkte Interaktion zwischen der Matrix und dem Molekül zu vermeiden, ist die Auswahl eines geeigneten anisotropen Mediums von großer Bedeutung. Neben Phospholipiden und Polyacrylamidgelen finden vor allem Phagen Verwendung [43].

### 1.2.2 Strukturrechnung mittels NMR-Daten

Im Gegensatz zur Röntgenkristallstrukturanalyse kann die NMR-Spektroskopie keine direkten Informationen über Atomkoordinaten liefern. Stattdessen erhält man Abstandsinformationen zwischen Atomen, Bindungswinkel sowie Informationen über die Orientierung von Atombindungen zueinander. Zur Strukturberechnung auf Basis dieser Randbedingungen stehen prinzipiell zwei Verfahren zur Verfügung. Die Distanzgeometrie ist ein mathematisches Verfahren zur Berechnung räumlicher Strukturen aus Abständen. Zunächst werden für jedes Atompaar auf Basis aller verfügbaren Randbedingungen Matrizen von Abstandsgrenzen erstellt. Nach Übertragung des Abstandsraums in den Raum eines dreidimensionalen kartesischen Koordinatensystems stehen die Koordinaten aller Atome zur Verfügung. Demgegenüber ist die Moleküldynamik ein molekülmechanisches Verfahren. Hierbei wird die Erhitzung des Proteins auf mehrere 1000 K und anschließende schrittweise Abkühlung auf Raumtemperatur simuliert ("simulated annealing"). Dadurch werden lokale Energiebarrieren auf der Suche nach dem globalen Energieminimum überwunden. Die Proteinstruktur verändert sich im Verlauf der MD-Simulation unter Einwirkung eines Kraftfelds  $V$ , welches alle Informationen des Proteins beinhaltet (Gleichung 1.12).

$$V = E_{emp} + E_{eff} \quad (1.12)$$

Das Kraftfeld  $E_{eff}$  enthält Energiewerte für alle experimentell bestimmten

Randbedingungen (Gleichung 1.13).  $E_{emp}$  umfaßt alle molekularen Parameter wie Bindungslängen, Winkel, Chiralität, van-der-Waals-Abstände usw. (Gleichung 1.14).

$$E_{eff} = \sum E_{NOE} + E_{Torsion} + E_{RDC} \quad (1.13)$$

$$E_{emp} = \sum E_{Bindung} + E_{Winkel} + E_{vanderwaals} + E_{chiral...} \quad (1.14)$$

Die Energieminimierung führt zu einem Ensemble von mehreren Strukturen, welches den durch die Daten eingeschränkten Konformationsraum repräsentiert. Eine Software, die das eben beschriebene Verfahren zur Strukturberechnung nutzt, ist XPLOR-NIH [87].

Aufgrund der Überlagerung von Signalen in NMR-Spektren ist eine eindeutige Resonanzzuordnung nur bedingt möglich. Diese Problematik wird durch die Definition von mehrdeutigen Abstandsrandbedingungen umgangen [65]. Diese beinhalten alle möglichen Randbedingungen, die einem Signal innerhalb des durch das Signolvolumen bestimmten Distanzbereichs zugeordnet werden können (Gleichung 1.15).

$$D \equiv \left( \sum_{a=1}^N d_a^{-6} \right)^{-1/6} \quad (1.15)$$

Dieses Verfahren ermöglicht es, aus mehrdeutigen Daten vernünftige Ausgangsstrukturen zu berechnen, mit deren Hilfe dann eindeutige Zuordnungen möglich sind. Die Software CYANA nutzt solche mehrdeutigen Abstandsinformationen [41].

In anfänglichen Strukturrechnungen werden keine Umgebungsmoleküle in Betracht gezogen. Möchte man die Proteinstruktur in annähernd natürlicher Umgebung darstellen, muß abschließend eine Verfeinerung in simulierter wäßriger Umgebung erfolgen [66]. Hierzu wird für die Moleküldynamiksimulation ein Kraftfeld verwendet, welches diese komplexere Umgebung berücksichtigt.

## 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der strukturellen und funktionellen Untersuchung des Proteins mesodermdevelopment (MESD) aus *Mus musculus*. Dieses im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Chaperon unterstützt die Faltung von Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Familie, sowie deren Transport zur Zellmembran. Die extrazellulären Bereiche dieser Rezeptoren sind hauptsächlich aus drei unterschiedlichen Domänen aufgebaut. Die “complement-type-repeat”(CR)-Domänen vermitteln zusammen mit den sogenannten YWTD- $\beta$ -Propellerdomänen die Ligandbindung sowie deren Abspaltung. Die  $\beta$ -Propellerdomänen werden von “Epidermal-growth-factor”(EGF)-ähnlichen Domänen flankiert. Insbesondere die Faltung der  $\beta$ -Propellerdomäne ist eine komplizierte Aufgabe. Hierbei bilden sechs aufeinanderfolgende Bereiche mit den konservierten Resten YWTD eine aus  $\beta$ -Faltblättern bestehende sechsblättrige Propellerstruktur, welche charakteristisch mit der C-terminal folgenden EGF-ähnlichen Domäne interagiert. Wie gezeigt werden konnte, unterstützt MESD die Faltung dieses Motivs bestehend aus  $\beta$ -Propeller und EGF-ähnlicher Domäne. Die Rezeptoren der LDLR-Familie sind an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt. Neben der Endozytose verschiedener Liganden regulieren sie als Korezeptoren in Signalwegen unterschiedliche Körperfunktionen. Aufgrund der Bedeutung von MESD für die Synthese funktionaler Rezeptoren können viele Krankheitssyndrome auf verändertes MESD zurückgeführt werden.

Bereits Hsieh et.al. beobachtete eine Interaktion zwischen MESD und der gefalteten YWTD- $\beta$ -Propellerdomäne [51]. In Koimmunopräzipitationsstudien konnte MESD gebunden an LRP5- und LRP6-Rezeptoren ausgefällt werden [99, 15, 64, 57]. Desweiteren konnte bewiesen werden, daß der C-terminale Bereich von MESD für die Interaktion mit der gefalteten  $\beta$ -Propellerdomäne erforderlich ist [64].

Zu Beginn dieser Arbeit war keine atomare Struktur von MESD publiziert. Kristallisationsversuche scheiterten an den flexiblen Bereichen von MESD. Primäres Ziel dieser Arbeit ist es daher die strukturierten Regionen von MESD einzugrenzen und deren räumliche Struktur in Lösung mittels NMR-Spektroskopie aufzuklären. Die Beteiligung von MESD an der Faltung eines Motivs aus  $\beta$ -Propeller und EGF-ähnlicher Domäne erfordert eine Interaktion mit ungefaltetem Rezeptorprotein. Alle bisher zur Wechselwirkung von MESD und  $\beta$ -Propeller durchgeführten Studien verwendeten den gefalteten  $\beta$ -Propeller und liefern daher unzureichende Informationen. Bisher liegen keine

---

Informationen über den Mechanismus der MESD unterstützten Faltung des  $\beta$ -Propeller-EGF-Motivs vor. Auch ist unklar wie MESD den intrazellulären Transport der gefalteten Rezeptoren unterstützt. Von uns durchgeführte Interaktionsstudien zwischen MESD und ungefalteten Rezeptorfragmenten sollen zu einem tieferen Verständnis der Funktion von MESD als Chaperon führen. Hierbei sollen vorrangig die Faltungsprozesse am Motiv, bestehend aus dem YWTD- $\beta$ -Propeller und der C-terminal folgenden EGF-ähnlichen-Domäne betrachtet werden.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Herstellung der rekombinanten MESD-Proteine

### 2.1.1 Klonierung

Ausgehend von dem Vergleich der Aminosäuresequenzen von 10 Homologa von MESD aus sehr unterschiedlichen Spezies wurde im Zusammenhang mit einer Sekundärstrukturvorhersage (Jpred; <http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>) von MESD (NCBI-ID: NP\_075892) sechs unterschiedlich lange Konstrukte des Proteins entworfen und mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) generiert. Als Vorlage diente der DNA-Strang des Wildtyps von MESD, welcher uns von J. Herz (Department of Molecular Genetics, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Durch den Entwurf geeigneter PCR-Primer wurden den DNA-Konstrukten N- und C-terminale LIC (Ligase independent cloning, Novagen)-Adaptersequenzen hinzugefügt. In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Konstrukte N-terminal durch eine Erkennungssequenz der TEV-Protease erweitert. Tabelle 2.1 listet die verwendeten PCR-Primer auf.

Der amplifizierte PCR-Ansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese (1,25 % Agarose in Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer<sup>1</sup>) aufgetrennt. 0,1 µg Ethidiumbromid pro ml Gel ermöglichte eine UV-Detektion der aufgetrennten DNA. Die Bande der DNA, welche MESD codiert, wurde aus dem Gel geschnitten und die DNA extrahiert (montage™ “DNA-Gel-Extraktions Kit”). Alle weiteren Klonierungsschritte erfolgten gemäß Protokoll (Xa-LIC-cloning Kit, Novagen). Alle MESD codierenden DNA-Sequenzen wurden in den pET-30 Xa/LIC Vektor (Novagen) kloniert, wodurch die exprimierten Proteine N-terminal durch eine Erkennungssequenz für den Faktor Xa sowie sechs Histidinresten ergänzt wurden. Mit Hilfe des zweiten Klonierungsansatzes wurde

---

<sup>1</sup>**TAE-Puffer:** 40 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris); 1,1 % Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 7,6

**Tabelle 2.1:****PCR: Primer, Reaktionsansatz und Reaktionszyklus**

Die Primer setzen sich aus den angegebenen Sequenzen X und den für die Klonierung nach dem LIC-System erforderlichen Adaptersequenzen zusammen. Die verwendeten Adapter enthalten eine N-terminale Erkennungssequenz für den Faktor Xa. Parallel dazu wurden alle Konstrukte mit einer zusätzlichen N-terminalen Erkennungssequenz für die TEV-Protease versehen. Hierzu wurden die Adaptersequenzen der Vorwärtsprimer um folgende Sequenz (5'⇒3') ergänzt GAAACTTGTATTTCAGGGC. Angegebene Volumina pro 50  $\mu$ l Ansatz. PCR-Gerät (Mastercycler<sup>®</sup>-ep; Eppendorf)

Vorwärtsprimer GGTATTGAGGGTCGC - X		Rückwärtsprimer AGAGGAGAGTTAGAGCCTCA - X	
Primer	Sequenz X (5'⇒3')	Primer	Sequenz X (5'⇒3')
MESD-A30	GCG GAC ACT CCG GGC GAG		
MESD-D45	GAC ATC CGC GAT TAC AAC		
MESD-R56	CGA CTT CTG GAG CAG TGG		
MESD-P89	CCA GGC AAA CCT GAG AGC ATC		
		MESD-K184	TTT GCC AGG ATA CAT CTG TC
		MESD-L224	AAG GTC TTC TCT TCT GCT CCC
Reagenz		Menge	
10 fach konzentrierter PCR Puffer		5 $\mu$ l	
dNTP's <sup>a</sup>		5 $\mu$ l	
MgSO <sub>4</sub>		2 $\mu$ l	
DNA-Vorlage		1 $\mu$ g	
Vorwärtsprimer		15 pmol	
Rückwärtsprimer		15 pmol	
KOD-Polymerase (Novagen)		1 $\mu$ l	
Wasser		auf 50 $\mu$ l	
Schritt	Temperatur	Zeit	
1	94 °C	5 min	
2	54 °C	30 s	
3	72 °C	2 min	
4	zurück zu 1	34 Wiederholungen	
5	72 °C	7 min	
6	4 °C	$\infty$	

<sup>a</sup>Desoxyribonukleosidtriphosphate

zusätzlich eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease zwischen Zielprotein und Histidinresten eingefügt.

Die Korrektheit der rekombinanten Plasmide wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.<sup>2</sup>

### 2.1.2 Expression und Aufreinigung

Nach Transformation der rekombinanten Plasmide in den Expressionsstamm *E.coli* BL21(DE3) und einem Expressionstest im 3 ml Maßstab, erfolgte die Proteinproduktion in 1 l Hauptkulturen. Die Zellen wurden bei 37°C bis auf eine optische Dichte von OD<sub>620</sub>=0.6 vermehrt. Die Expression wurde durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und erfolgte bei 20°C über Nacht in Kolben mit Schikanen bei einer Schüttelfrequenz von 140 rpm. Die Zellen wurden durch Zentrifugation vom Kulturmedium getrennt (20°C, 6000 × g, 10 min), zweimal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Alle weiteren Schritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C. Nach Resuspension der Zellen in 10 ml Aufschlußpuffer<sup>3</sup> pro einem mg Zellfeuchtmasse erfolgte der Zellaufschluß an einem Homogenisator der Marke AVESTIN EMULSIFLEX C3 (ATA Scientific).

Zelltrümmer wurden vom löslichen Protein abzentrifugiert (48000 × g, 30 min), der Überstand mit Trisbase auf pH 8 eingestellt und filtriert (0,45 μm Porengröße). Die N-terminal durch sechs Histidinreste erweiterten Zielproteine wurden anschließend durch Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt (Vision<sup>TM</sup>-Workstation, PerSeptive Biosystems). Tabelle 2.2 listet die verwendeten Parameter auf.

Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE<sup>4</sup> auf die Reinheit des Zielproteins geprüft, entsprechende Fraktionen vereinigt und auf ca. 10 ml

#### <sup>2</sup>PCR-Primer der Sequenzierreaktion

**Vorwärts:** GGCTCCGGTATTGAGGGTCGC **Rückwärts:** GCCAGAGGAGAGTTAGAGCC

<sup>3</sup>**Aufschlußpuffer:** 5 ml (20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol, pH 8), 5 ml BugBuster<sup>TM</sup>-Proteinextraktionsmittel (Novagen), EDTA freier Proteasehemmer (Complete, Roche), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 125 U Benzonase<sup>®</sup>-Nuklease (Novagen)

<sup>4</sup>**Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese**

**Trenngelpuffer:** 0,75 M Tris/HCl, pH 8,8

**Sammelgelpuffer:** 0,625 M Tris/HCl, pH 6,8

**Gelladepuffer:** 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerol, 0,01 % Bromphenolblau; vor der Verwendung 5 Vol% β-Mercaptoethanol hinzufügen und im Verhältnis 1/1 mit der Probe auftragen

**Tabelle 2.2:**

Laufparameter der Nickelaffinitätschromatographie sowie der Größenausschlußchromatographie.

<b>Nickelaffinitätsaufreinigung des Rohextrakts</b>		
<b>Poros<sup>®</sup> MC 20 ml Säule; 8 ml Fraktionen</b>		
Schritt	Puffer	Laufgeschwindigkeit
Auftragen	20 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol, pH 8	1 ml/min
Eluieren	20 mM Tris, 500 mM NaCl, 5-500 mM Imidazolgradient, pH 8	10 ml/min
<b>Nickelaffinitätsaufreinigung nach der Spaltung mit TEV-Protease</b>		
<b>Poros<sup>®</sup> MC 20 ml Säule; 8 ml Fraktionen</b>		
Auftragen	20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8	0,5 ml/min
Eluieren	20 mM Tris, 500 mM NaCl, 5-500 mM Imidazolgradient, pH 8	10 ml/min
<b>Größenausschlußchromatographie nach der Spaltung mit Faktor Xa</b>		
<b>HiLoad<sup>®</sup> 16/60 Superdex<sup>®</sup> 75 prep grade 120 ml Säule; 2 ml Fraktionen</b>		
Schritt	Puffer	Laufgeschwindigkeit und -Volumen
Equilibrieren	150 mM NaCl, 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Puffer, pH 7,5	0,5 ml/min, 3 Säulenvolumen
Lauf	150 mM NaCl, 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Puffer, pH 7,5	0,5 ml/min, 1,5 Säulenvolumen

aufkonzentriert (Amicon Ultra, Millipore). Die Abspaltung der N-terminalen Histidinreste erfolgte mit Faktor Xa<sup>5</sup>(BioLabs) bzw. mit TEV-Protease<sup>6</sup>. Zur Trennung des Zielproteins von Spaltrückständen wurde der Ansatz der Spaltung durch Faktor Xa mit EDTA haltigen Proteaseinhibitoren (Complete, Roche) versetzt, auf 2 ml aufkonzentriert und mittels Größenausschluß-Chromatographie aufgetrennt (Tab. 2.2). Der Spaltansatz unter Verwendung der TEV-Protease wurde umgepuffert (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8) und in einem zweiten Nickelaffinitätsschritt aufgereinigt (Tab. 2.2). Die TEV-Protease sowie alle Spaltrückstände besitzen einen His-Tag. Im

<sup>5</sup>**Spaltung mit Faktor Xa:** Dialyse bei 4°C über Nacht in **Xa-Spaltpuffer:** 20 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>

<sup>6</sup>**Spaltung mit TEV-Protease:** Dialyse bei 4°C über Nacht in **TEV-Spaltpuffer:** 50 mM Tris/HCl pH 8, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT **TEV Protease:** Eigenproduktion; Das Expressionsplasmid wurde freundlichst von Gunter Stier; AG Biomolecular NMR, EMBL, Heidelberg zur Verfügung gestellt

Durchfluß ist daher das aufgereinigte Zielprotein zu erwarten. Nach Überprüfung der gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE wurde das Zielprotein dreimal mit NMR-Puffer<sup>7</sup> gewaschen und auf 1 mM aufkonzentriert (Amicon Ultra, Millipore). Alle Protein- und DNA-Konzentrationsbestimmungen erfolgten per UV-Photometrie. Die korrekte Größe aller Zielproteine wurde durch Massenspektrometrie bestätigt. Die Lagerung erfolgte gefriergetrocknet bei -20°C. Die Produktion unmarkierter Proteine erfolgte in LB-Medium<sup>8</sup>. Einheitlich <sup>15</sup>N bzw. <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C markierte Proben wurden in M9-Minimalmedium<sup>9</sup> durch Zusatz von 0,5 g/l <sup>15</sup>N-NH<sub>4</sub>Cl bzw. 2 g/l <sup>13</sup>C-Glukose als einzige Stickstoff- sowie Kohlenstoffquelle erzeugt.

---

<sup>7</sup>**NMR-Puffer:** 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Puffer, pH 5,5, 50 mM NaCl

<sup>8</sup>**LB Medium:** 10 g Pepton aus Casein, 5 g Hefe Extrakt, 10 g NaCl, mit Wasser auf 1 l, mit NaOH auf pH 7,0

<sup>9</sup>**M9 Minimalmedium:** 800 ml Wasser, 10 ml **Spurenelemente-Lösung**, 1 ml MgSO<sub>4</sub> (1 M), 0,3 ml CaCl<sub>2</sub> (1 M), 100 ml **M9-Salzlösung**, 1,5 ml Thiamin HCl (1 mg/ml), 15 ml Biotin (0,1 mg/ml)  
**Spurenelemente-Lösung:** 2,5 g EDTA, 250 mg FeSO<sub>4</sub>, 25 mg ZnCl<sub>2</sub>, 5 mg CoSO<sub>4</sub>, mit Wasser auf 500 ml, mit NaOH auf pH 7,5

**M9-Salzlösung:** 80 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g NaCl, mit Wasser auf 1 l, pH 7

## 2.2 Strukturbestimmung

### 2.2.1 NMR-Messungen und Resonanzzuordnung

Alle Spektren wurden bei 300 K an einem Bruker DRX600 Spektrometer mit 5 mm TXI Kryoprobekopf sowie an einem Bruker AV900 Spektrometer mit 5 mm TCI Kryoprobekopf in Standardkonfiguration aufgenommen. 600  $\mu\text{l}$  der 1 mM Proteinproben in NMR-Puffer wurden vor Aufnahme der Spektren mit 10 Vol%  $\text{D}_2\text{O}$ , 0,1 mM EDTA sowie 0,02 %  $\text{NaN}_3$  versetzt, Schwebstoffe abzentrifugiert und in 5 mm NMR Röhren transferiert. Mit dieser Art Proben wurden alle  $H_N$  detektierten Spektren aufgenommen. Desweiteren wurden  $^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY-, HC(C)H-COSY- und HC(C)H-TOCSY-Spektren von Proben in 100 %  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommen. Hierzu wurde eine gefriergetrocknete Probe verwendet. Tabelle 2.3 listet die durchgeführten NMR-Experimente auf. Für alle NOESY-Spektren wurde eine Mischzeit von 80 ms verwendet.

Die Prozessierung der Spektren erfolgte mit der Software XWINNMR-Version3.5 (Bruker Biospin GmbH) und Topspin2.1 (Bruker Biospin GmbH). Die verwendeten Prozessierungsparameter sind in Tabelle 2.4 zusammengestellt. Auf eine lineare Vorhersage wurde bei der Prozessierung verzichtet. Die Spektren wurden für alle verwendeten Konstrukte von MESD gleich prozessiert.

Die Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrats erfolgte mittels Tripelresonanz-NMR-Spektren. Anhand der NMR-Experimente CBCA(CO)NH und CBCANH sowie HN(CO)CA und HNCA konnten die Amid- sowie  $C_\alpha$ - und  $C_\beta$ -Resonanzen bestimmt werden. Aus dem NMR-Spektrum HBHA(CBCACO)NH ergaben sich die  $H_\alpha$ - und  $H_\beta$ -Resonanzen. Die chemischen Verschiebungen der Carbonylkohlenstoffe des Proteinrückgrats wurden aus den NMR-Spektren HNCO und HN(CA)CO ermittelt. Die Zuordnung weiterer Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffresonanzen der Seitenketten erfolgte mit Hilfe der CC(CO)NH- bzw. H(CCCO)NH-NMR-Spektren sowie eines HCCH-TOCSY- und HCCH-COSY-NMR-Spektrums. Die Resonanzen der Aminogruppen und Aromaten der Seitenketten wurden mittels eines  $^{15}\text{N}$ -HSQC-NOESY bzw.  $^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY zugeordnet. Für die Resonanzzuordnung wurde die Software Sparky 3.106 [34] verwendet.

**Tabelle 2.3: Durchgeführte NMR-Experimente - Aufnahmeparameter**

Experiment	Probe	Anzahl Aufnahmen	Auflösung: Datenpunkte in Dimension F1; F2; F3	Spektrometer
<b>NMR-Experimente zur Resonanzzuordnung</b>				
<sup>15</sup> N-HSQC	MESD89-184	8	256; 1048	AV900
	MESD45-184	8	256; 1048	
<sup>13</sup> C-HMQC	MESD89-184	8	256; 1024	DRX600
	MESD45-184	8	256; 1024	
CBCA(CO)NH	MESD89-184	8	128; 96; 1024	DRX600
	MESD45-184	8	96; 96; 1024	
CBCANH	MESD89-184	16	128; 96; 1024	DRX600
	MESD45-184	16	96; 96; 1024	
HNCO	MESD45-184	4	96; 96; 1024	DRX600
HN(CA)CO	MESD45-184	16	96; 96; 1024	DRX600
HN(CO)CA	MESD89-184	16	108; 108; 1024	DRX600
HNCA	MESD89-184	16	108; 108; 1024	DRX600
HBHA(CBCACO)NH	MESD89-184	8	128; 96; 1024	DRX600
	MESD45-184	8	96; 96; 1024	
CC(CO)NH	MESD89-184	16	116; 96; 1024	DRX600
	MESD45-184	16	104; 104; 1024	
H(CCCO)NH	MESD89-184	16	116; 96; 1024	DRX600
HCCH-COSY	MESD89-184	8	128; 128; 1024	DRX600
	MESD45-184	8	128; 128; 1024	
HCCH-TOCSY	MESD89-184	8	128; 128; 1024	DRX600
	MESD45-184	8	128; 128; 1024	
<b>NMR-Experimente zum Erhalt von Interprotonabständen</b>				
<sup>15</sup> N-HSQC-NOESY	MESD89-184	8	256; 128; 2048	AV900
	MESD45-184	8	230; 128; 1024	
<sup>13</sup> C-HMQC-NOESY	MESD89-184	8	256; 128; 1024	DRX600
	MESD45-184	8	210; 128; 1024	
<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-NOESY	MESD45-184	64	800; 2048	AV900

**Tabelle 2.4: Durchgeführte NMR-Experimente - Prozessierungsparameter**

Experiment	prozessierte Auflösung: Datenpunkte in Dimension F1; F2; F3	Fensterfunktion in Dimension F1; F2; F3
<b>NMR-Experimente zur Resonanzzuordnung</b>		
$^{15}\text{N}$ -HSQC	1024; 2048	qsine <sup>a</sup> ; qsine
$^{13}\text{C}$ -HMQC	1024; 2048	qsine; qsine
CBCA(CO)NH	256; 256; 2048	qsine; qsine; gm <sup>b</sup>
CBCANH	256; 256; 2048	qsine; qsine; gm
HNCO	256; 256 ;2048	qsine; qsine; gm
HN(CA)CO	256; 256 ;2048	qsine; qsine; gm
HN(CO)CA	256; 256; 2048	qsine; qsine; gm
HNCA	256; 256; 2048	qsine; qsine; gm
HBHA(CBCACO)NH	256; 256; 2048	qsine; qsine; gm
CC(CO)NH	256; 256 ;2048	qsine; qsine; gm
H(CCCO)NH	256; 256 ;2048	qsine; qsine; gm
HCCH-COSY	256; 256 ;2048	qsine; qsine; gm
HCCH-TOCSY	256; 256 ;2048	qsine; qsine; gm
<b>NMR-Experimente zum Erhalt von Interprotonabständen</b>		
$^{15}\text{N}$ -HSQC-NOESY	512; 512; 2048	qsine; qsine; gm
$^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY	512; 512; 2048	qsine; qsine; gm
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY	4096; 4096	qsine; gm

<sup>a</sup>quadratische Sinusfunktion<sup>b</sup>Gaußfunktion

### 2.2.2 RDC-Messungen

Für die RDC-Untersuchungen wurde eine 1 mM Lösung von MESD45-184 in NMR Puffer mit 10 Vol% D<sub>2</sub>O mittels Pf1 Phagen (Profos) in eine anisotrope Umgebung überführt. Die Stärke der magnetischen Ausrichtung in Abhängigkeit der Phagenkonzentration wurde mittels eindimensionalen  $^2\text{H}$ -NMR-Spektren überwacht. Die Aufspaltung des HOD Signals infolge der anisotropen Umgebung diente hierbei als Monitor. Um eine klare Auswertung ohne erhebliche Linienverbreiterung zu ermöglichen, wurde die Phagenkonzentration bis zu einer HOD-Signalaufspaltung von 17 Hz erhöht. Nicht enkoppelte  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren wurden von der Proteinprobe mit bzw. ohne Phagen aufgenommen. Die RDC-Werte berechneten sich aus der Differenz der J-Kopplung in der  $^{15}\text{N}$  Dimension mit Phagen und ohne Phagen (Gleichung 2.1).

$$RDC = J_{Phagen} - J_{Referenz} \quad (2.1)$$

### 2.2.3 Strukturrechnung

Alle durchgeführten Strukturrechnungen basierten grundlegend auf experimentell mittels NOE-Spektren bestimmten Protonabständen. Hinzu kamen Werte für die Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$ . Diese wurden gemäß charakteristischer chemischer Verschiebungen der Atome des Proteinrückgrats empirisch von der Software TALOS 2003.027.13.05 [19] vorhergesagt. Aufgrund typischer NOE-Kopplungsmuster konnten Sekundärstrukturelemente identifiziert werden. Darauf basierend wurden Wasserstoffbrücken definiert. Die Zuordnung der NOE-Kreuzsignale erfolgte automatisch mittels der Software CYANA 2.0 [41]. In einem iterativen Prozeß wurden die Zuordnungen überprüft und falls eindeutig als richtig bewertet, der Software als unveränderbar vorgegeben. Ein letztlich als schlüssig einzustufendes Zuordnungsmuster wurde nach Sparky zurückportiert und entsprechend der Signalintensität in verschiedene Abstandsklassen eingeteilt (Tab. 2.5).

**Tabelle 2.5:**  
**Einteilung der zugeordneten NOE-Signale in Abstandsklassen entsprechend ihrer Signalintensität.**

	Abstandsbereich	
	MESD89-184	MESD45-184
Klasse 1	3 Å- 4 Å	1.8 Å- 4 Å
Klasse 2	3 Å- 5 Å	1.8 Å- 5 Å
Klasse 3	3.5 Å- 6.5 Å	1.8 Å- 6 Å
Klasse 4		1.8 Å- 7 Å

Diese NOE-Abstandsrandbedingungen wurden zusammen mit den von Talos vorhergesagten Winkeln und den definierten Wasserstoffbrücken in einer XPLORE-NIH 2.9.3-Strukturrechnung [87] unter Verwendung des Kraftfelds parallhdg5.3.pro [66] angewandt. Im Falle von MESD45-184 wurden zusätzlich Orientierungsinformationen auf Grundlage von RDC-Daten herangezogen. Iterativ erfolgte eine weitere Überprüfung der verwendeten Randbedingungen und erneute XPLORE-NIH-Rechnung. Abschließend

wurde die Struktur einer wässrigen Umgebung angepaßt. Hierzu erfolgte die XPLOR-NIH-Rechnung unter Verwendung des Kraftfelds parallhdg5.3.pro innerhalb einer simulierten wässrigen Umgebung [66]. Im Falle von MESD45-184 erfolgte diese Strukturverfeinerung in wässriger Umgebung mittels der Software CNS 1.1 [12] ebenfalls unter Verwendung des Kraftfeldes parralhdg5.3.pro und wurde durch Orientierungsinformationen auf Basis von RDC's ergänzt. Die Qualität des Strukturensambles wurde mittels der online zugänglichen Software PSVS 1.3 [9] überprüft.

### 2.2.4 Messungen der Proteindynamik

Zur Untersuchung der dynamischen Eigenschaften des Proteinrückgrats von MESD45-184 wurden die longitudinalen (T1) und transversalen (T2) Relaxationszeiten des Amidstickstoffs bestimmt. Hierzu wurden Serien von modifizierten  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren aufgenommen. Aufgrund einer variablen Wartezeit innerhalb der Pulssequenz stehen die gemessenen Signalintensitäten in direkter Abhängigkeit zu der zu bestimmenden Relaxationsrate [28]. Die longitudinale Relaxationsrate wurde aus einer Serie von 11 Spektren mit Wartezeiten von 12 ms, 52 ms, 102 ms, 152 ms, 202 ms, 302 ms, 402 ms, 602 ms, 902 ms, 2002 ms und 5002 ms bestimmt. Zur Messung der transversalen Relaxationsrate wurde eine Serie von 11 Spektren mit Wartezeiten von 6 ms, 10 ms, 18 ms, 26 ms, 34 ms, 42 ms, 82 ms, 122 ms, 162 ms, 202 ms und 242 ms aufgenommen. Alle Spektren wurden mit 16 Aufnahmen und einer Auflösung von 256 Datenpunkten in der  $^{15}\text{N}$ -Dimension an einer 1 mM Lösung von MESD45-184 in NMR-Puffer aufgenommen. Zur Bestimmung der Relaxationsrate ( $1/T$ ) wurden die Signalintensitäten  $h$  an eine sinkende Exponentialfunktion (Gleichung 2.2) angepaßt. Dies erfolgte mittels der Software Sparky 3.106 [34].

$$h = Ae^{-1/T} \quad (2.2)$$

Die Messung der Signalverstärkung durch den heteronuklearen Nuklearoverhauserereffekt (NOE) erfolgte anhand eines zweidimensionalen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NOE-NMR-Spektrums. Das Verhältnis der Signalintensitäten zu einem Vergleichsspektrum ohne NOE liefert Aussagen zur Proteindynamik.

Zur Bestimmung der Oberflächenbereiche von MESD45-184 wurde die longitudinale

Relaxationszeit ( $T_1$ ) der Amidwasserstoffe in Abwesenheit bzw. Anwesenheit der paramagnetischen Substanz Gadoliniumchlorid bestimmt [80]. Aufgrund der Giftigkeit von freien  $Gd^{3+}$ -Ionen erfolgte deren Komplexierung mit Diethyltriaminpentaessigsäure (DTPA). Hierzu wurden 49mM  $GdCl_3$  (Sigma) mit einer 50mM Stammlösung von DTPA (Sigma) in 150mM NaOH komplexiert. Eine 1 mM Probe von MESD45-184 in NMR-Puffer wurde mit 0,3 mM der  $Gd^{3+}$ -DTPA-Stammlösung versetzt und eine Serie von 11  $T_1$ -editierten  $^1H$ - $^{15}N$ -HSQC-NMR-Spektren mit den Wartezeiten 10 ms, 20 ms, 30 ms, 40 ms, 50 ms, 60 ms, 70 ms, 80 ms, 90 ms, 100 ms und 150 ms aufgenommen. Jedes Spektrum wurde mit 8 Aufnahmen und einer Auflösung von 512 Datenpunkten in der  $^{15}N$ -Dimension aufgenommen. Die Bestimmung der Relaxationsrate erfolgte wie bereits beschrieben. Die Senkung der  $T_1$ -Relaxationszeit des Amidwasserstoffs infolge der Anwesenheit von  $Gd^{3+}$ -DTPA korreliert mit dessen Lösungsmittelzugänglichkeit.

## 2.3 Funktionelle Studien

### 2.3.1 Synthese und Bindungsstudien einer Peptidbibliothek

Die Aminosäuresequenzen aller 10 bekannter humaner Rezeptoren der LDLR-Familie (LRP1, LRP1B, Megalin, MEGF7, LRP5, LRP6, VLDLR, ApoER2, LDLR, SorLa) wurden als 16 Aminosäure lange Peptide auf einer Zellulosemembran synthetisiert. Die Sequenz der Peptide überlappte jeweils um 6 Aminosäuren. Das verwendete Prinzip der Festphasenpeptidsynthese wird im Folgenden protokollarisch und in Abb. 2.1 und Abb. 2.2 schematisch dargestellt.

#### **Membran-Herstellung:**

**Membran ansäuern** 1 ml Perchlorsäure (70 %), 50 ml Methanol,

Whatman<sup>®</sup>-Cellulose-Membran einlegen, 2 min schütteln, Methanol abgießen, Membran trocknen

**Etherbildung mit den OH-Gruppen der Zellulose** 6 ml Epibromhydrin, 54 ml wasserfreies Dioxan, 600  $\mu$ l Perchlorsäure (70 %),

3 h schütteln, Lösung abgießen, 30 min mit Methanol schütteln, 2  $\times$  3 min mit Ethanol und 3  $\times$  3 min mit Dimethylacetamid (DMA) waschen

**Substitution der Br-Funktion zu  $NH_2$ -Gruppen** 30 ml 1,3-Diaminopropan, 30 ml

Dimethylformamid (DMF),  
 Membran über Nacht schütteln,  
 jeweils  $2 \times 3$  min mit DMA, Ethanol, Wasser, Ethanol und Diethylether waschen,  
 trocknen

**Entfernung des Bromids** 50 ml Natriummethanolat (30 %),  
 20 min stehen lassen, abgießen,  
 $3 \times 3$  min mit Methanol waschen, mit Wasser bis pH 7 waschen,  $3 \times 3$  min mit  
 Ethanol und  $2 \times 3$  min mit Diethylether waschen, trocknen

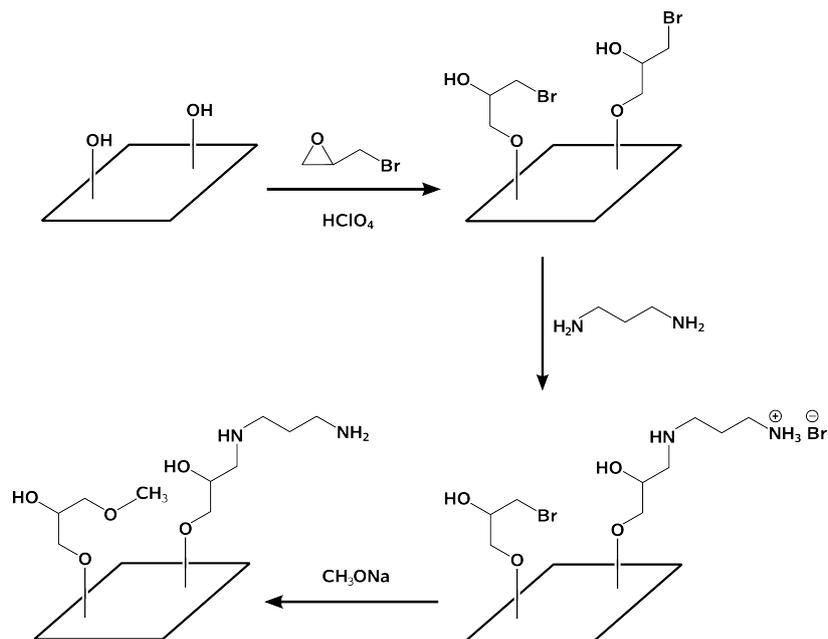


Abbildung 2.1: Aminofunktionalisierung einer Zellulosemembran

**Funktionalitätsbestimmung** 3 Punkte aus der Membran stanzen, 3 Leerwertpunkte aus  
 einer unbehandelten Membran stanzen,  
 $2 \times 15$  min mit 0,3 M Fmoc- $\beta$ -Ala-O-pfP<sup>10</sup> in Dimethylsulfoxid (DMSO)  
 inkubieren,  
 $5 \times$  mit DMF waschen,  
 Fmoc-Abspaltung mit 1 ml Piperidin (20 % in DMA), 20 min schütteln  
 1 ml gegen Piperidin (20 % in DMA) bei 302 nm photometrisch messen (Gleichung  
 2.3)

<sup>10</sup>Fmoc: Fluorenylmethoxycarbonyl  
 O-pfP: Pentafluorophenyl-Ester

$$\text{Beladung} = \frac{E_{302} * 1000}{8,1} (\text{nmol/Spot}) \quad (2.3)$$

**Erste  $\beta$ -Alanin Kopplung**  $2 \times 0,3 \mu\text{l}$  Fmoc- $\beta$ -Ala-OpfP (0,3 M in DMSO) pro Peptidpunkt auftragen, 15 min koppeln lassen

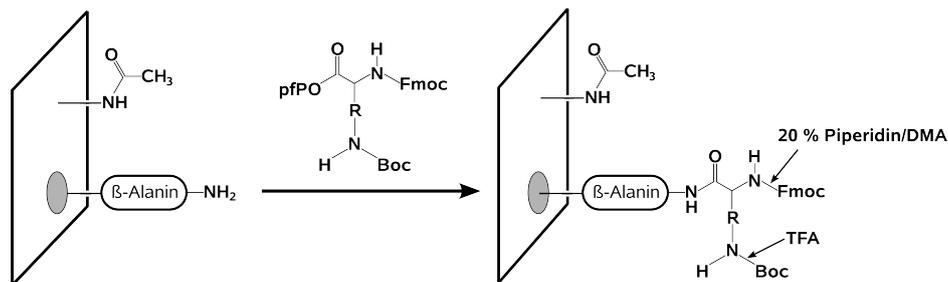
**Acetylierung** 2-3 min mit Acetanhydrid (2 % in DMF) ohne Schütteln inkubieren,  
30 min mit 2 % Acetanhydrid/1 % N-Ethyl-Diisopropylamin(DIPA)/97 % DMF schütteln,  
5  $\times$  3 min mit DMA waschen,  
20 min Fmoc-Abspaltung mit Piperidin (20 % in DMA),  
5  $\times$  3 min mit DMA und 2  $\times$  3 min mit Ethanol waschen,  
1  $\times$  3 min Bromphenolblau(BPB),  
2  $\times$  3 min mit Ethanol und 2  $\times$  3 min mit Diethylether waschen, trocknen

**Aminosäure-Kopplung**  $2 \times 1 \mu\text{l}$  Aminosäure-Lösung (0,3 M in N-Methylpyrrolidon (NMP)) pro Peptidpunkt auftragen, 15 min koppeln lassen,  
3  $\times$  3 min mit DMA waschen,  
20 min Fmoc-Abspaltung mit Piperidin (20 % in DMA),  
5  $\times$  3 min mit DMA und 2  $\times$  3 min mit Ethanol waschen,  
1  $\times$  3 min Bromphenolblau(BPB),  
2  $\times$  3 min mit Ethanol und 2  $\times$  3 min mit Diethylether waschen, trocknen

**Abspaltung der Seitenschutzgruppen** 30 min ohne Schütteln mit 54 ml Trifluor-Essigsäure(TFA), 1,8 ml Triisobutylsilan(TIBS, 3 % in Dichlormethan(DCM)), 60 ml DCM,  
5  $\times$  3 min mit DCM waschen,  
30 ml TFA, 1,8 ml TIBS (3 % in DCM), 60 ml DCM, 2,5 h ohne Schütteln,  
jeweils 3  $\times$  3 min mit DCM und DMA, jeweils 2  $\times$  3 min mit Ethanol und Ether waschen, trocknen

### Bindungsstudien an der Peptidbibliothek

Aufgrund des verwendeten pET-30-Xa/LIC Expressionsvektors wurden alle MESD Proteine mit einem N-terminalen Histidin- sowie S-peptidmotiv exprimiert. Die Detektion der an die Peptidbibliothek gebundenen MESD-Proteine basierte auf der

**Abbildung 2.2:****Aminosäurekopplung an eine aminofunktionalisierte Membran**

Die zu koppelnden Aminosäuren sind C-terminal durch den pfp-Ester aktiviert, N-terminal durch Fmoc (basenlabil) und an den Aminogruppen der Seitenketten durch Boc (säurelabil) geschützt. **Fmoc** Fluorenylmethoxycarbonyl, **pfp** Pentafluorophenyl, **Boc** tert-Butyloxcarbonyl. Der graue Kreis verdeutlicht einen Auftragungspunkt. Aminofunktionsgruppen außerhalb dieser Auftragungspunkte wurden vorher acetyliert.

starken Interaktion des 15 Aminosäure langen S-Peptids mit dem 104 Aminosäure langen S-Protein aus der pankreatischen Ribonuklease A. An das S-Protein gekoppelte Meerettich-Peroxidase(HRP) wurde verwendet, um mittels der bei der Oxidation von Luminol entstehende Chemilumineszenz das gebundene MESD zu visualisieren. Im Folgenden wird der Verlauf der Bindungsstudien dargestellt.

**Bindungstest zwischen S-Peptid-MESD und S-Protein-HRP** Polyvinylidendifluorid

(PVDF)-Membran 1 × 10 min mit Ethanol und 3 × 10 min mit TBS Puffer<sup>11</sup> waschen,

2  $\mu$ l MESD-Lösung (10  $\mu$ g/ml) auf Membran auftragen, eintrocknen lassen,

3 × 10 min mit TBS waschen,

3 h mit BboT<sup>12</sup> schütteln,

2,5 h mit S-Protein-HRP-Konjugat (Novagen) (1/5000 in BboT) schütteln,

Lumineszenz messen mit Luminol (Uptilight HRP blot Reagent A und B, Interchim)

**Bindungsstudie mit der Peptidbibliothek** Membran 1 × 10 min mit Ethanol und 3 ×

10 min mit TBS waschen,

3 h mit BboT bei Raumtemperatur schütteln.

<sup>11</sup>**Tris-buffered-saline:** 50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, mit HCl auf pH 8

<sup>12</sup>**Blockierungs Puffer ohne Tween-Zusatz (BboT):** 5 ml "Blocking Buffer" (10 fach konzentriert, Sigma), 5 ml TBS (10 fach konzentriert), 2,5 g Saccharose, mit Wasser auf 50 ml

über Nacht bei 4°C mit S-Peptid-MESD (1  $\mu$ M in BboT) schütteln,  
3  $\times$  10 min mit TBS waschen,  
3 h mit S-Protein-HRP-Konjugat (1/5000 in BboT) schütteln,  
3  $\times$  10 min mit TBS waschen,  
Lumineszenz messen mit Luminol

**Regeneration der Membran** 3  $\times$  10 min mit TBS waschen,  
1  $\times$  10 min bei 50°C mit Regenerierungspuffer<sup>13</sup> schütteln,  
4  $\times$  10 min mit TBS waschen,  
3 h mit S-Protein-HRP-Konjugat (1/5000 in BboT) schütteln,  
3  $\times$  10 min mit TBS waschen,  
Lumineszenz messen mit Luminol Regeneration wiederholen bis keine Signale mehr  
detektierbar

---

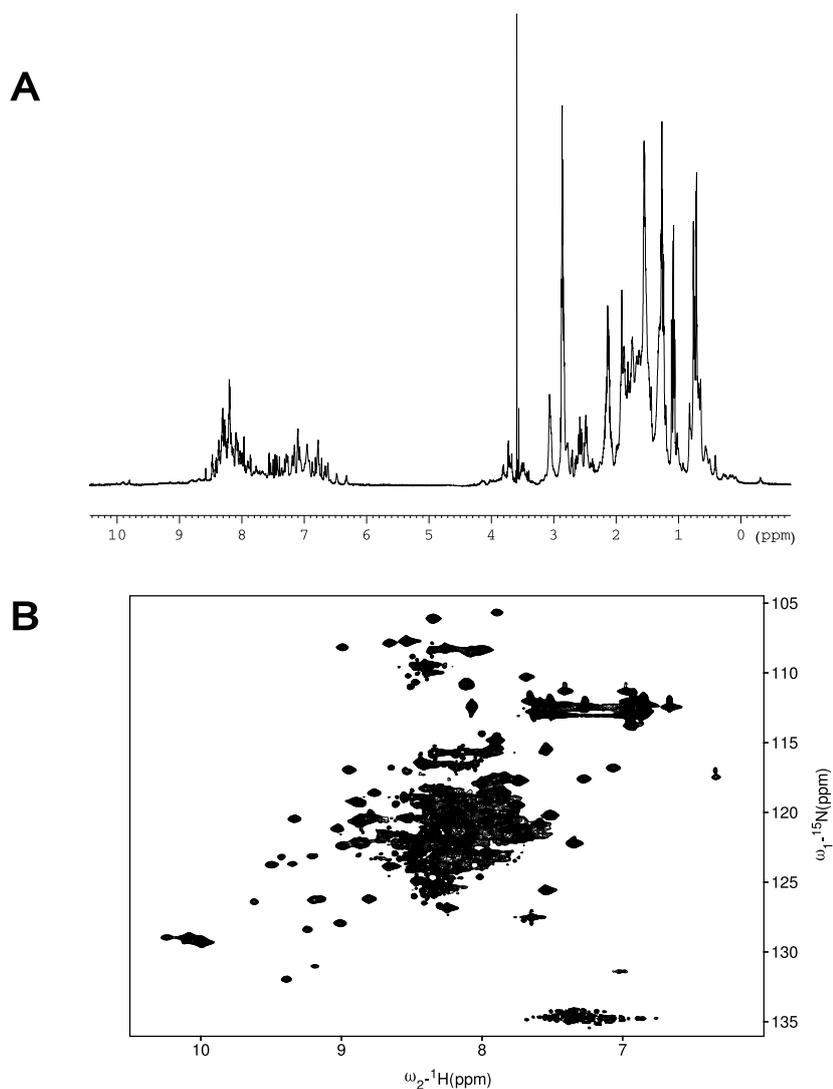
<sup>13</sup>Regenerierungspuffer: 6 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1 % SDS

### 3 Strukturuntersuchungen an MESD

Als Folge der bereits erwähnten Strukturuntersuchungen an Pepsin [8] bestand Konsens darüber, daß die Funktion eines Proteins durch dessen Struktur bestimmt wird. Die Untersuchung der räumlichen Struktur eines Proteins läßt nicht nur Aussagen über dessen Funktion zu, es ist vielmehr möglich, die Funktion auf atomarer Ebene zu erklären. Kenntnisse über den Aufbau des aktiven Zentrums eines Proteins sind der erste Schritt zu einer gezielten Wirkstoffsynthese. Die Bedeutung der Kenntnis der dreidimensionalen Struktur eines Proteins als Grundlage für weitere Forschungen läßt sich nicht hoch genug einschätzen.

Zu Beginn unserer Arbeiten waren keine strukturellen Informationen über MESD verfügbar. In Anbetracht der physiologischen Bedeutung dieses Chaperons und der Vielzahl damit assoziierter Krankheitssyndrome kam der strukturellen Charakterisierung von MESD eine herausragende Bedeutung zu. Anfängliche NMR-Messungen am nativen MESD zeigten erhebliche unstrukturierte Regionen, was bereits mittels eines  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums gezeigt werden konnte (Abb. 3.1A). Da die NH-Gruppen in einem strukturierten Protein mit sehr unterschiedlichen chemischen Umgebungen konfrontiert sind, haben deren Signale entsprechend verschiedene chemische Verschiebungen. Deutliche und separierte Signale in einem  $^1\text{H}$ -Bereich zwischen 6 und 10 ppm sind daher ein Charakteristikum gefalteter Proteine. Im hydrophoben Kern des Proteins interagieren Methylgruppen mit aromatischen Ringsystemen was zu einer Hochfeldverschiebung der Methylresonanzen führt. Definierte Signale im Bereich um 0 ppm verdeutlichen dies. Das in Abbildung 3.1A dargestellte  $^1\text{H}$ -Spektrum des nativen MESD besitzt demgegenüber nur wenige dieser Merkmale. Detailliertere Aussagen zur Strukturierung innerhalb eines Proteins lassen sich erst mittels eines  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums treffen. Durch die Korrelation eines Stickstoffkerns mit einem direkt gebundenen Wasserstoffkern wird der Amidbereich des  $^1\text{H}$ -Spektrums (6-10 ppm) in einer weiteren Dimension, entsprechend der Stickstofffrequenz aufgetrennt. Ein gefaltetes Protein zeichnet sich im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum durch gut aufgelöste, über den

gesamten Frequenzbereich verteilte Signale aus. Das Spektrum des nativen MESD (Abb. 3.1B) läßt hingegen eine Vielzahl der Signale in einem  $^1\text{H}$ -Bereich um 8ppm erkennen und die Signalüberlagerung ist erheblich.



**Abbildung 3.1:**

**wildtyp MESD enthält erhebliche unstrukturierte Bereiche**

**A:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum **B:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektrum. Beide Spektren wurden bei 900 MHz aufgenommen.

Dieses hohe Maß an Flexibilität verhinderte eine strukturelle Charakterisierung des Gesamtproteins. Kristallisationsansätze blieben erfolglos, während NMR-Spektren infolge der Signalüberlagerung nicht auswertbar waren. Daher bestand die Notwendigkeit einen möglichst hoch strukturierten Bereich von MESD einzugrenzen und getrennt zu exprimieren. Im Verlauf unserer strukturellen Untersuchungen klonierten wir auf Basis eines Sequenzvergleichs zwischen MESD-Homologa verschiedener Spezies sowie einer Sekundärstrukturvorhersage sechs unterschiedlich lange Konstrukte von MESD. Mittels  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektroskopie wurde deren Strukturierungsgrad bestimmt, wonach zwei der sechs Konstrukte zur Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie in Frage kamen. Aufgrund geringerer flexibler Bereiche erfolgte zunächst die Strukturbestimmung des Kernbereichs zwischen den Resten P89 und K184. Hierbei bildet der Bereich zwischen Aminosäure T104 und E177 eine eigenständige Domäne aus. Die ungeklärte Strukturierung der hochkonservierten Reste D45 und D88 erforderte eine ergänzende strukturelle Untersuchung des N-terminal erweiterten Kernbereichs zwischen den Resten D45 und K184. Die dazu durchgeführte Resonanzzuordnung sowie Strukturrechnung basierte auf der bereits gelösten Struktur der Kerndomäne. Die stark erhöhte Flexibilität der Reste D45-K103 verhinderte eine klare Strukturbestimmung dieses Bereichs. Daher wurde in Übereinstimmung mit allen durchgeführten Versuchen eine Modelstruktur des konservierten Kernbereichs von MESD zwischen den Resten D45-K184 berechnet. Entsprechend dieser Strukturuntersuchungen faltet sich der hochkonservierte Kernbereich von MESD zwischen den Resten K43 und K184 zu einer eigenständigen Domäne, welche N-terminal über eine längere flexible Region durch eine weitere  $\alpha$ -Helix ergänzt wird.

### 3.1 Eingrenzung des strukturierten Bereichs

Strukturierte Bereiche innerhalb eines Proteins weisen häufig einen hohen Konservierungsgrad auf. Die Analyse eines Sequenzvergleichs von MESD-Homologa aus 10 sehr unterschiedlichen Spezies (Abb. 3.2A), erbrachte einen hochkonservierten Kernbereich zwischen den Resten K43 und K184. 43 % der Sequenz in diesem Bereich ist identisch und 29 % der Reste sind zumindest chemisch ähnlich. Abgesehen von einer Strukturierung innerhalb dieses Bereiches läßt dies vor allem eine funktionelle Bedeutung des Kernbereichs vermuten. Basierend auf der MESD Sequenz wurden mittels der online verfügbaren Software Jpred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www->

jpred/) Sekundärstrukturelemente vorhergesagt. Diese sind in Abbildung 3.2A der Mausequenz zugeordnet. Demnach besitzt MESD einen Kernbereich mit vielen regulären Sekundärstrukturelementen zwischen den Resten 90 und 184. Laut Sekundärstrukturvorhersage wird diese Kernstruktur N-terminal durch eine weitere Helix ergänzt, welche über eine längere Region mit der Kernstruktur verbunden ist, für die keine Strukturvorhersage getroffen werden konnte.

Entsprechend dieser Informationen wurden zusätzlich zum Gesamtprotein fünf unterschiedlich lange Konstrukte von MESD erstellt. Darunter ist die Kernregion zwischen Prolin 89 und Lysin 184. Dieses Konstrukt wurde N-terminal schrittweise bis Arginin 56, Aspartat 45 und Alanin 30 verlängert. Die ersten 29 Reste der MESD-Sequenz blieben unberücksichtigt, da sie als Signalpeptid posttranslational entfernt werden. Desweiteren wurde die Kernstruktur um den C-terminus ergänzt (P89-L224). Abbildung 3.2B zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte.

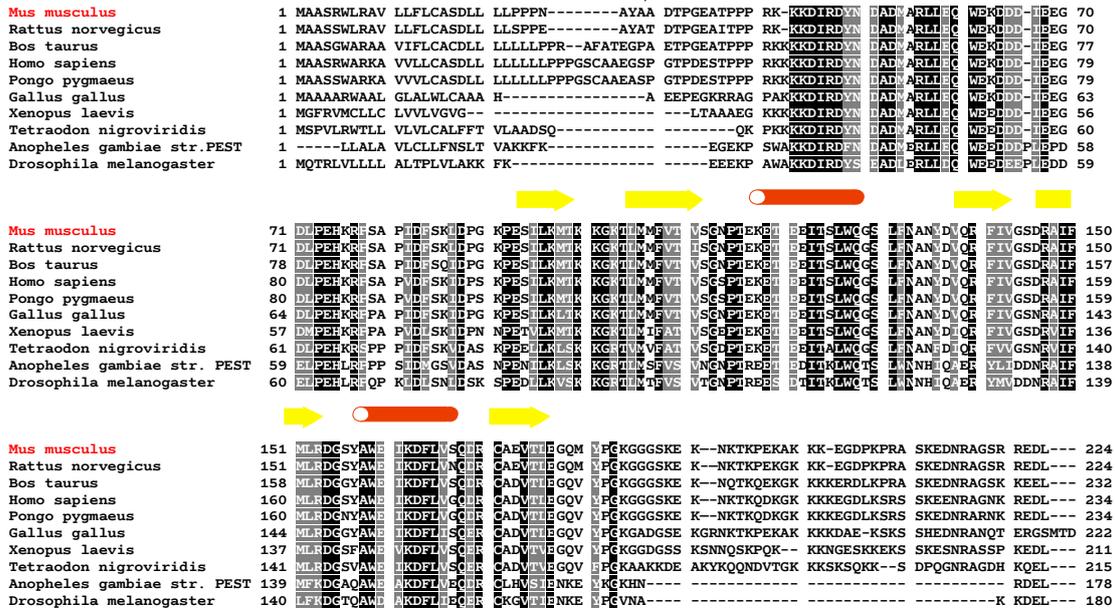
Alle Proteine wurden zur effektiven Aufreinigung N-terminal mit sechs Histidinresten versehen. Eine Proteaseerkennungssequenz im Übergang der Histidinreste zum Zielprotein ermöglicht nach erfolgreicher Aufreinigung deren Abspaltung. Das von uns verwendete Klonierungsverfahren nutzte hierfür die Erkennungssequenz des Faktors Xa. Wie aus Abbildung 3.3B ersichtlich, verliefen die Spaltversuche mit dieser aus der Blutgerinnungskaskade stammenden Protease unspezifisch. Im Falle der mit P89 beginnenden Konstrukte erfolgte die Spaltung sehr langsam und unter Einsatz großer Protease Mengen (Abb. 3.3A). Die verminderte Spaltung durch Faktor Xa vor einem

---

**Abbildung 3.2 (nächste Seite):**

**A:** Sequenzvergleich der MESD-Homologa von Maus (*Mus musculus*; NCBI-ID: Q9ERE7), Ratte (*Rattus norvegicus*; Q5U2R7), Kuh (*Bos taurus*; Q3T0U1), Menchen (*Homo sapiens*; Q14696), Orang Utan (*Pongo pygmaeus*; Q5R6F1), Huhn (*Gallus gallus*; Q5ZKK4), Afrikanischem Klauenfrosch (*Xenopus laevis*; Q4V7K5), grünem Kugelfisch (*Tetraodon nigroviridis*; Q4STS2), Mosquito-Mücke (*Anopheles gambiae str. Pest*; Q7Q9R4) und Frucht-Fliege (*Drosophila melanogaster*; Q9V4N7). Nach jeweils 10 Resten der Mausequenz ist ein Leerzeichen eingefügt. Der Pfeil markiert das Ende des Signalpeptids. Dieses wird posttranslational abgespalten. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Reste grau unterlegt. Die von Jpred vorhergesagten Sekundärstrukturelemente der Mausequenz sind über ihr abgebildet. **B:** Schematische Darstellung der 6 exprimierten MESD Proteine (grün). **C:** 15%ige SDS-PAGE der 6 exprimierten Proteine mit Coomassie Färbung. Die Zielproteine ohne N-terminale Aufreinigungsreste sind markiert. **MSt:** Molmassesstandard

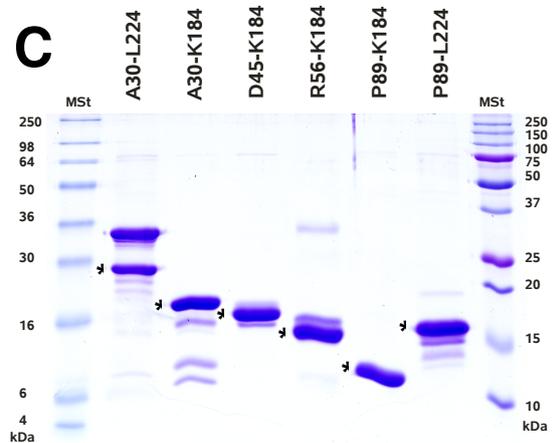
**A**

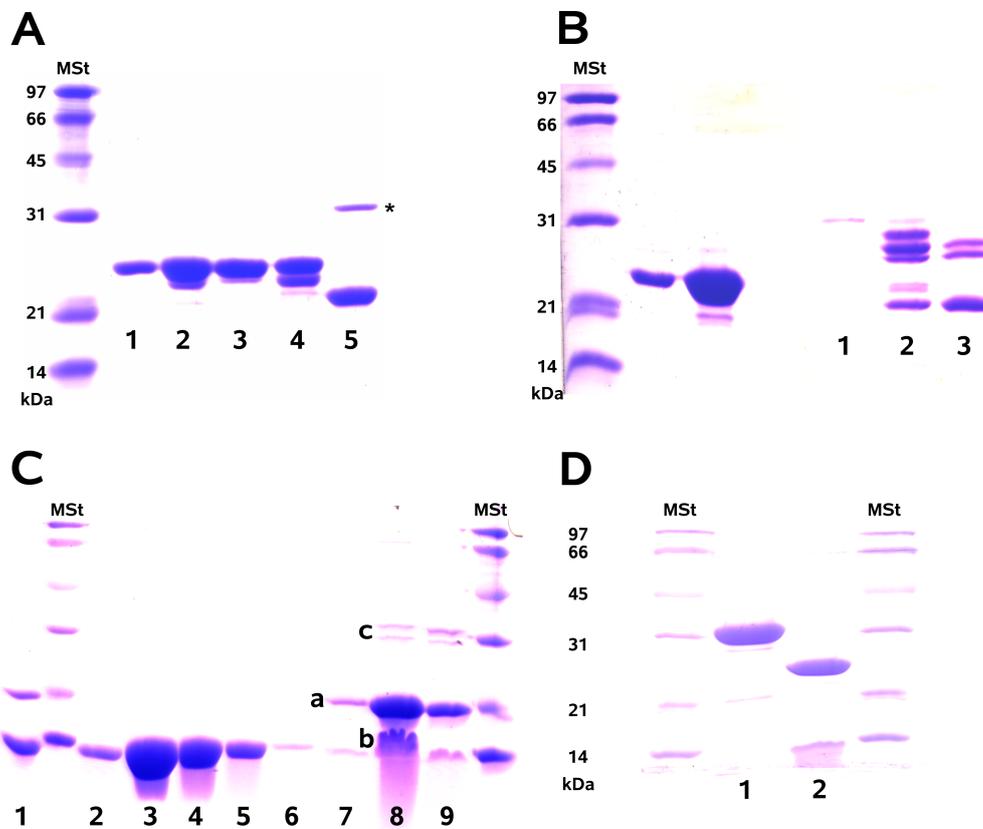


**B**



**C**





**Abbildung 3.3:**

**Vergleich der Spaltung einiger MESD-Fusionsproteine durch Faktor Xa bzw. TEV-Protease**

**A:** Spaltung mit Faktor Xa von His-MESD89-184. **1:** ungespalten **2:** 36 h, 4°C **3:** 36 h, Raumtemperatur **4:** 4 d, 4°C; jeweils 4 U Xa/mg Fusionsprotein **5:** 4d, Raumtemperatur, 10 U Xa/mg Fusionsprotein. Der Stern markiert die Position des Faktors Xa

**B:** Spaltung mit Faktor Xa von His-MESD30-224. **1:** ungespalten **2:** 5 d, 4°C **3:** 5 d, Raumtemperatur jeweils 2 U Xa/mg Fusionsprotein

**C:** Nickelaffinitätsaufreinigung von MESD89-184 nach der Spaltung mit TEV-Protease **1:** nach 3 d Spaltung bei 4°C **2-6:** MESD89-184 im Durchfluß **7-9:** Verunreinigungen im Eluat **a:** ungespaltenes His-MESD89-184 **b:** Histidinreste **c:** TEV-Protease

**D:** Spaltung von His-MESD30-224 mit TEV-Protease **1:** ungespalten **2:** 24 h, 4°C

**MSt:** Molmassesstandard

**Tabelle 3.1:** Ertrag der aufgereinigten MESD-Proteine pro Liter Zellkultur

Konstrukte	Ertrag des Zielproteins pro Liter Zellkultur	
	LB Medium	M9 Medium
TEV-MESD30-224	25 mg	17 mg
TEV-MESD30-184	50 mg	11 mg
TEV-MESD45-184	30 mg	6 mg
Xa-MESD56-184	7 mg	5 mg
TEV-MESD89-184	70 mg	60 mg
TEV-MESD89-224	20 mg	12 mg

Prolinrest wurde auch von Stevens et al beschrieben [91]. Nur das Konstrukt MESD56-184 konnte spezifisch und schnell gespalten werden. Aus diesen Gründen wurde bei allen Konstrukten eine zusätzliche N-terminale Bindungssequenz für die TEV-Protease zwischen Zielprotein und den Histidinresten eingefügt. Die TEV-Protease ist die 27 kDa große katalytische Domäne des “Nuclear inclusion a” proteins aus dem Tabakmosaikvirus. Aufgrund ihrer längeren Erkennungssequenz (ENLYFQ↓G) im Vergleich zum Faktor Xa (IEGR↓) sollte eine erheblich spezifischere Spaltung möglich sein. Zudem stand ein Expressionsplasmid der TEV-Protease zur Verfügung, was eine Eigenproduktion ermöglichte. Die Trennung der Protease sowie aller Spaltprodukte vom Zielprotein erfolgte im Falle der Spaltung mit Faktor Xa unspezifisch mittels Größenausschlußchromatographie. Auch in diesem Punkt war die Verwendung der TEV-Protease vorteilhaft, da sechs Histidinreste innerhalb der aktiven Protease eine spezifische Nickelaffinitätsaufreinigung ermöglichte (Abb. 3.3C). Wie Abbildung 3.3D verdeutlicht, waren die Resultate durch Verwendung der TEV-Protease erheblich zufriedenstellender. Alle MESD-Proteine konnten spezifisch gespalten werden und waren größtenteils stabil (Abb. 3.2C). Die Ausbeuten der jeweiligen MESD-Proteine sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

Der Strukturierungszustand der sechs MESD-Proteine wurde anhand von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren überprüft (Abb. 3.4). Das Spektrum von MESD89-184 (Abb. 3.4D) zeigt deutliche, separierte Signale, was auf ein gut strukturiertes Protein hinweist. Das Spektrum des C-terminal erweiterten Konstrukts (MESD89-224, Abb. 3.4E) enthält zusätzliche Signale fast ausschließlich im  $^1\text{H}$ -Bereich um 8 ppm sowie im  $^{15}\text{N}$ -Bereich

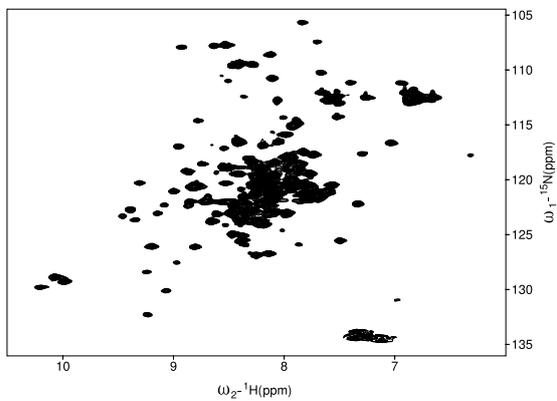
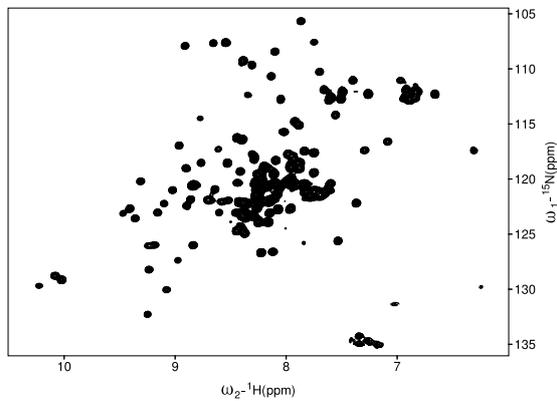
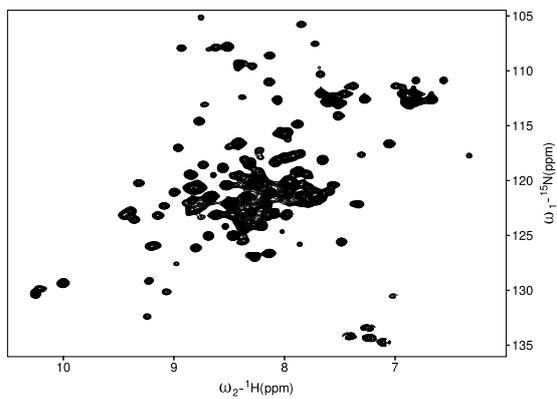
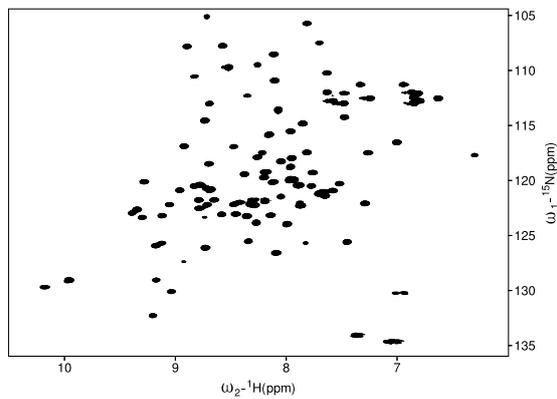
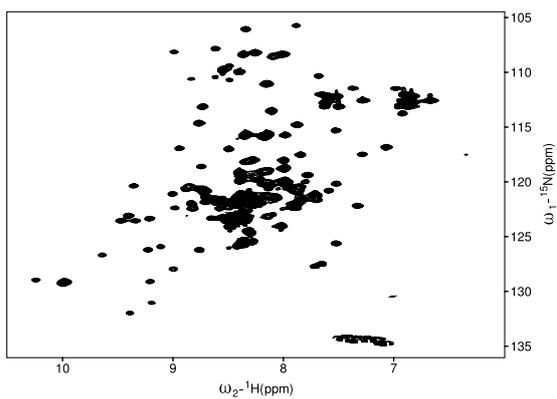
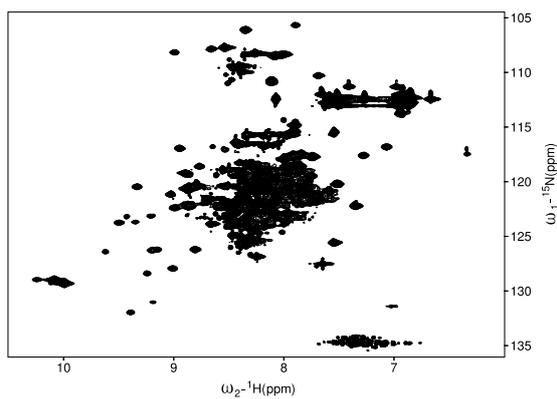
um 120 ppm, was den C-Terminus ab K184 als “random coil” klassifiziert. Auch die N-terminale Verlängerung des Kernproteins führt zu einer Zunahme der Signale in diesem “random coil”-Bereich, wobei das Spektrum von MESD45-184 (Abb. 3.4B) auch zusätzliche Signale jenseits dieses zentralen Bereichs des Spektrums erkennen läßt. Dies wird in der Überlagerung der Spektren von MESD45-184 (grün) und MESD89-184 (rot) in Abbildung 3.5A noch deutlicher. Zusätzliche Signale befinden sich überwiegend im  $^1\text{H}$ -Frequenzbereich 7.5-8.5 ppm, was neben “random coil”-Bereichen charakteristisch für  $\alpha$ -helikale Strukturen ist. Signale von Aminosäuren in einer  $\beta$ -Faltblattumgebung befinden sich hingegen eher tieffeldverschoben im  $^1\text{H}$ -Frequenzbereich von 8.5 ppm aufwärts. Das Spektrum von MESD30-184 läßt hingegen nur zusätzliche Signale im “random-coil”-Bereich erkennen und die Signalüberlagerung hat sich deutlich erhöht (Abb. 3.4A). Von Interesse ist das Spektrum von MESD56-184 (Abb. 3.4C). Obwohl das Protein im Vergleich zu MESD45-184 um 11 Reste verkürzt ist, sind im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum weniger separierte Signale zu erkennen. Entsprechend der Sekundärstrukturvorhersage beinhaltet MESD56-184 nur einen Teil der N-terminalen Helix während MESD45-184 diese Helix komplettiert. Abb. 3.4F zeigt zum Vergleich ein Spektrum des gesamten MESD, welches bei einer  $^1\text{H}$ -Frequenz von 900 MHz aufgenommen wurde. Wie aus der Überlagerung in Abbildung 3.5B ersichtlich wird, sind die Signale von MESD45-184 (grün) im Spektrum des gesamten MESD (blau) nur geringfügig verschoben. Die Beschreibung der strukturierten Kernregion von MESD mittels MESD45-184 ist daher möglich.

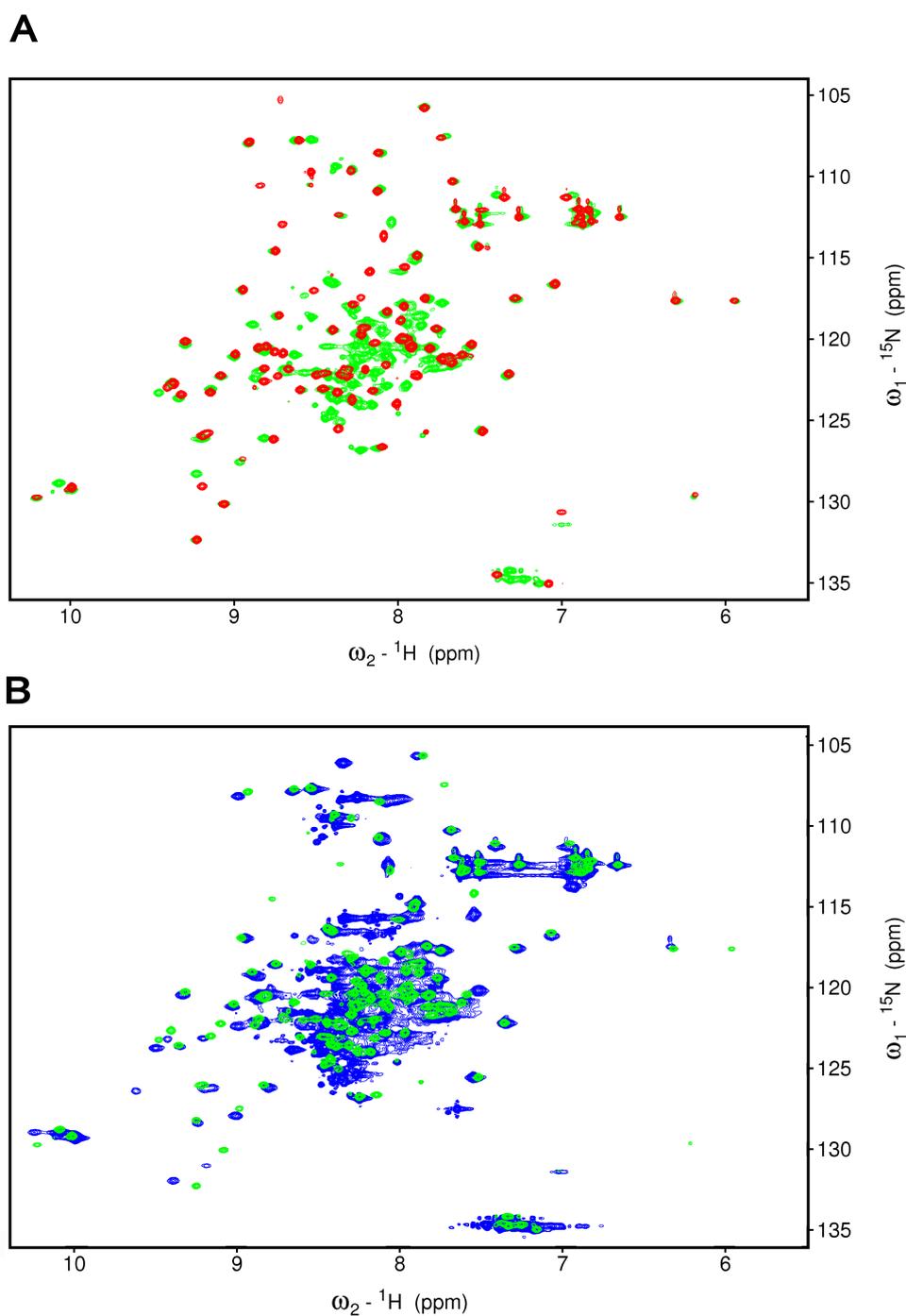
Diese Ergebnisse unterstützten klar die Sekundärstrukturvorhersage von Jpred. MESD besitzt einen gut strukturierte Kernbereich zwischen P89 und K184. Im Anschluß an einen flexiblen Bereich schließt sich N-terminal an diese Kernregion eine weitere Helix an. Die Reste A30-K44 sowie G185-L224 von MESD bilden keine regulären Sekundärstrukturelemente aus.

---

**Abbildung 3.4 (nächste Seite):**

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der 6 MESD Konstrukte. Die Spektren A-E wurden bei 600 MHz, Spektrum F bei 900 MHz aufgenommen. **A:** MESD30-184 **B:** MESD45-184 **C:** MESD56-184 **D:** MESD89-184 **E:** MESD89-224 **F:** MESD30-224

**A****B****C****D****E****F**



**Abbildung 3.5:**

Überlagerung der  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von MESD89-184 (rot), MESD45-184 (grün) und MESD30-224 (blau). Alle Spektren wurden bei einer  $^1\text{H}$ -Frequenz von 900 MHz aufgenommen. **A:** Die zusätzlichen Signale von D45-K88 liegen in einem für  $\alpha$ -Helices bzw. einer “random coil”-Konformation charakteristischen Bereich. **B:** Die Signale aus strukturierten Bereichen unterscheiden sich nur geringfügig zwischen MESD45-184 und dem gesamten MESD.

## 3.2 Die Struktur der Kerndomäne von MESD zwischen Aminosäure T104 und E177

Die vorangegangenen Untersuchungen ergaben einen hoch strukturierten Bereich zwischen den Resten P89 und K184. Obwohl das N-terminal bis D45 verlängerte Fragment weitere strukturierte Reste aufweist, nimmt der Anteil an flexiblen Bereichen erheblich zu. Die geringe Signalüberlagerung im  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von MESD89-184 sollte eine zügige Strukturaufklärung dieses Bereichs ermöglichen. Zudem zeigte die Überlagerung der  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von MESD89-184 und MESD45-184 aus Abbildung 3.5A nur geringe Veränderungen des Kernproteins infolge der N-terminalen Verlängerung. Es konnte angenommen werden, daß sich die strukturelle Charakterisierung des gesamten konservierten Kernbereichs zwischen D45 und K184 auf Basis der zuvor gelösten Struktur von MESD89-184 vereinfachen würde. Aufgrund dieser Überlegungen erfolgte die Strukturbestimmung der MESD-Kernregion zwischen P89 und K184. Die Strukturkoordinaten von MESD89-184 sind in der Proteindatenbank unter der Identifikationsnummer 2i9s abgelegt.

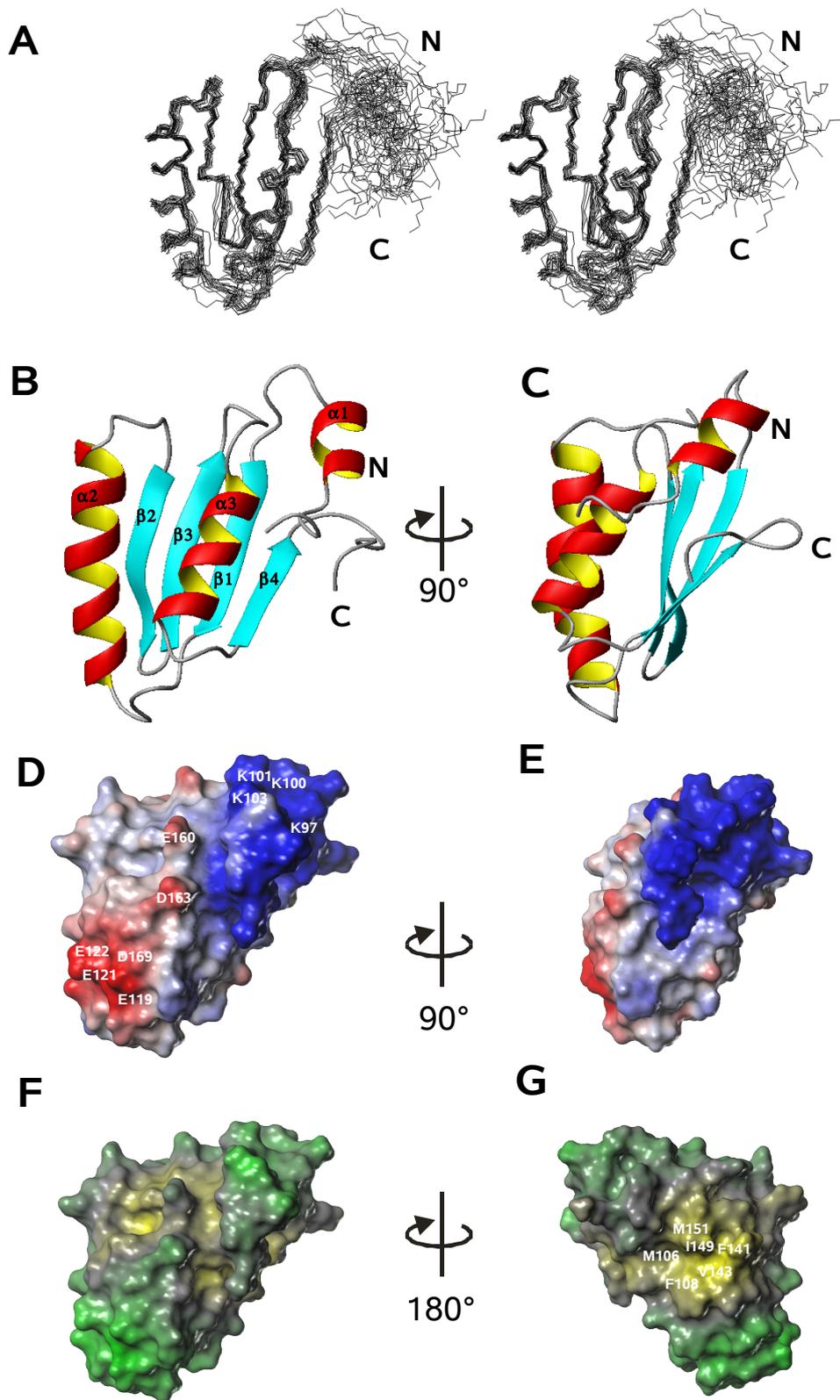
Abbildung 3.6A zeigt die Überlagerung der 20 energieärmsten Konformere als Stereoansicht. Die Sekundärstrukturelemente sind anhand des energieärmsten Konformers in Abbildung 3.6B und 3.6C dargestellt. Die Abfolge der Sekundärstrukturelemente lautet  $\alpha 1 - \beta 1 - \alpha 2 - \beta 2 - \beta 3 - \alpha 3 - \beta 4$ . Die Analyse der  $\Delta\Delta\delta$ -Werte nach Metzler et.al. (Abbildung 3.7; Gleichung 3.1 [71]) bestätigt dies.

---

### Abbildung 3.6 (nächste Seite):

#### Struktur von MESD89-184

**A:** Überlagerung der Rückgratstrukturen der 20 energieärmsten Konformere als Stereoansicht. **B und C:** schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente anhand des energieärmsten Konformers. Abbildung C ist im Uhrzeigersinn um  $90^\circ$  zur Abbildung B gedreht. **D und E:** Elektrostatisches Oberflächenpotential (rot-negativ; blau-positiv); einige konservierte geladene Reste sind markiert; identische Orientierung wie in Darstellung B und C. **F und G:** Lipophiles Oberflächenpotential (braun-grün-blau; hydrophob→hydrophil); die Orientierung von F ist identisch mit B und D, die Orientierung von G ist um  $180^\circ$  zu F gedreht; einige konservierte hydrophobe Reste sind markiert.



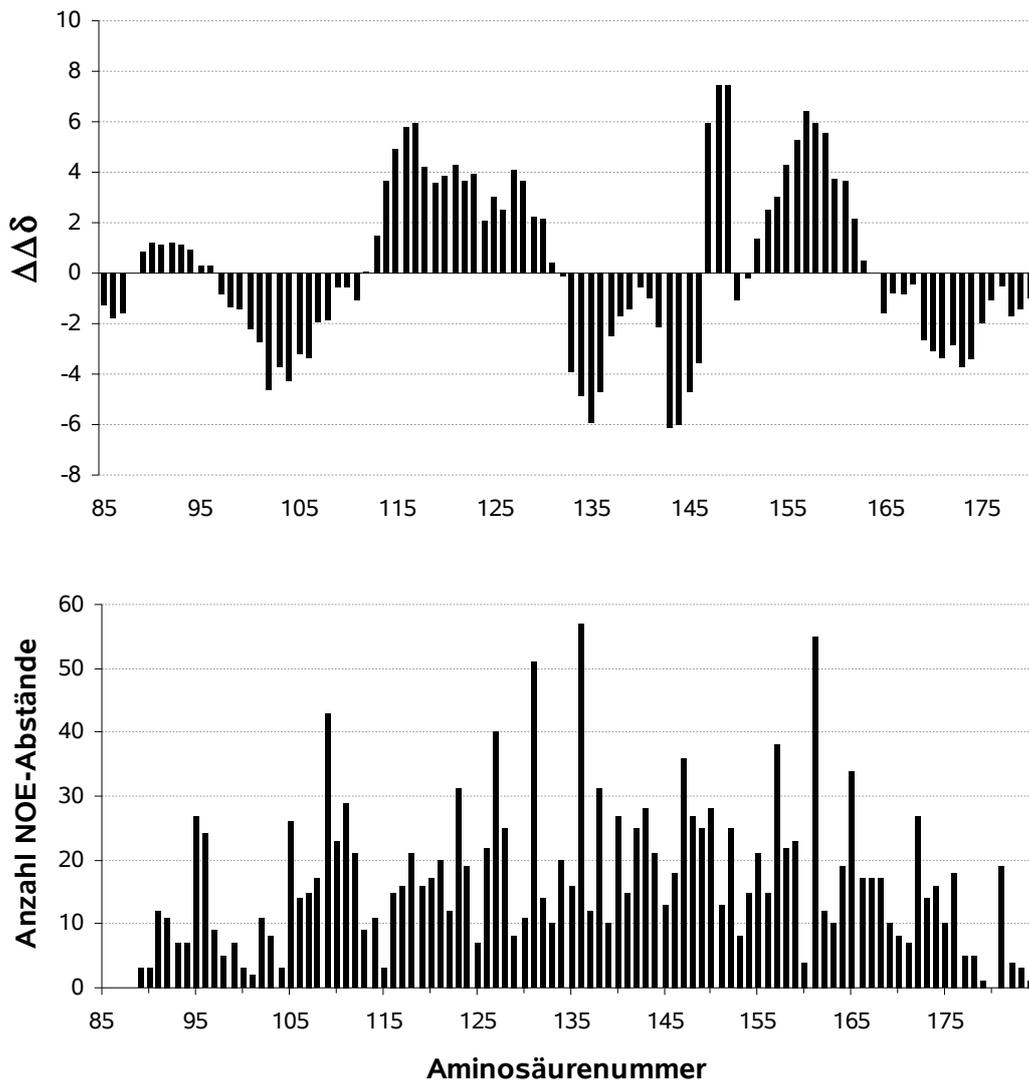


Abbildung 3.7:

**Strukturelle Parameter von MESD89-184**

**Oben:** Die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der  $C\alpha$ - und  $C\beta$ -Atome zu einem random coil Protein dieser Sequenz sind gegen die entsprechende Aminosäure aufgetragen. Die  $\Delta\Delta\delta$ -Werte wurden mittels Gleichung 3.1 berechnet [71]. Positive  $\Delta\Delta\delta$ -Werte weisen auf einen  $\alpha$ -helikalen Bereich, negative Werte auf ein  $\beta$ -Faltblatt hin. **Unten:** Die Anzahl der zur Strukturrechnung verwendeten NOE Abstandsrandbedingungen pro Aminosäurerest sind gegen die entsprechende Aminosäure aufgetragen.

$$\Delta\Delta\delta_i = \frac{1}{3} \sum_{i-1}^{i+1} \Delta\delta_{C\alpha} - \Delta\delta_{C\beta} \quad (3.1)$$

Hierbei sind  $\Delta\delta_{C\alpha}$  und  $\Delta\delta_{C\beta}$  die Differenzen der beobachteten chemischen Verschiebung der  $C\alpha$ - und  $C\beta$ -Atome jeder einzelnen Aminosäure in MESD und deren chemische Verschiebung in einem Protein mit “random coil”-Konformation.

Die Kernstruktur von MESD besteht aus einem viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt und drei  $\alpha$ -Helices, welche sich auf einer Seite des  $\beta$ -Faltblatts befinden. Abbildung 3.6D und Abb. 3.6E veranschaulichen das elektrostatische Oberflächenpotential. Zudem ist die Hydrophobizität der Oberfläche in Abbildung 3.6F und 3.6G dargestellt. Ein charakteristisches Merkmal der Kernstruktur von MESD sind vier N-terminale Lysine und vier Glutamatreste zu Beginn von Helix  $\alpha 2$ . Diese Akkumulation geladener Reste führt zu zwei gegensätzlich geladenen Bereichen auf der Proteinoberfläche. Auf der den Helices gegenüberliegenden Seite des  $\beta$ -Faltblatts bilden sechs konservierte Reste einen hydrophoben exponierten Bereich. Tabelle 3.2 listet die statistischen Merkmale der MESD Kernstruktur auf. In Abbildung 3.7 ist die Verteilung der in der Strukturrechnung verwendeten NOE-Abstände auf die einzelnen Proteinreste dargestellt.

**Tabelle 3.2:**

Statistische Merkmale der 20 energetisch niedrigsten Konformere von MESD89-184; Protein Structure Validation Suite (PSVS V.1.3) [9]

<b>Abstandsrandbedingungen</b>	
interresiduale NOE-basierte Abstandsrandbedingungen	822
Winkelrandbedingungen nach Talos [19]	146
definierte Wasserstoffbrücken <sup>a</sup>	42
<b>Verletzung der Randbedingungen in 20 Strukturen</b>	
NOE-Abstandsrandbedingungen > 0,5 Å	29
Winkelrandbedingungen > 5°	3
Wasserstoffbrücken > 0,5 Å	0
<b>geordnete Reste<sup>b</sup></b>	60 von 97
<b>Ramachandranplot<sup>c</sup></b>	
Reste in bevorzugten Regionen	92 %
Reste in erlaubten Regionen	8 %
Reste in zusätzlich erlaubten Regionen	0 %
Reste in unerlaubten Regionen	0 %
<b>RMSD zu den durchschnittlichen Koordinaten<sup>d</sup></b>	
alle Atome des Proteinerückgrats	0,6 Å
alle Atome außer Wasserstoff	1,2 Å
<b>PSVS Qualitätswerte</b>	
MolProbity Kollisions Wert <sup>e</sup>	67,65
Procheck ( $\phi - \psi$ ) <sup>f</sup>	-0,37
Procheck (alles) <sup>g</sup>	-0,54

<sup>a</sup>Auf Basis charakteristischer Muster von NOE-Kreuzsignalen innerhalb von Sekundärstrukturelementen wurden Wasserstoffbrücken definiert.

<sup>b</sup>Einordnung nach [52]  $S(\phi) + S(\psi) > 1,8$

<sup>c</sup>nur geordnete Reste; Einteilung der Regionen des Ramachandranplots nach Morris et.al. [76].

<sup>d</sup>nur geordnete Reste

<sup>e</sup>Anzahl der Atome mit Überschneidung der Van-der-Waals-Radien um mehr als 0.4 Å pro 1000 Atome

<sup>f</sup>nur geordnete Reste. Der angegebene Wert beschreibt die empirische Wahrscheinlichkeit der durch die Struktur gegebenen  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel. Ein höherer Wert ist charakteristisch für eine höhere Wahrscheinlichkeit.

<sup>g</sup>nur geordnete Reste. Der angegebene Wert beschreibt die empirische Wahrscheinlichkeit aller Winkel der Struktur. Ein höherer Wert ist charakteristisch für eine höhere Wahrscheinlichkeit.

Dicht beieinander liegende C- und N-Termini, wie sie in der Kernstruktur von MESD vorzufinden sind, stellen ein charakteristisches Merkmal eigenständiger Domänen dar. Eine Suche in der Proteindatenbank (PDB) nach strukturell ähnlichen Proteinen mittels des DALI-Servers [49], bestätigte diese Vermutung. Die  $\beta - \alpha - \beta - \beta - \alpha - \beta$ -Faltung von MESD104-177 findet sich in einer Vielzahl von Proteinen wieder. Das Maß für die Ähnlichkeit zwischen den gefundenen Proteindomänen und der MESD-Kernstruktur wird durch den sogenannten Z-Wert ausgedrückt. Er lag bei 35 Strukturen über 5, was eine hohe Ähnlichkeit bedeutet. Abbildung 3.8A zeigt eine Überlagerung der 6 strukturell ähnlichsten von DALI gefundenen Strukturen mit MESD104-177. Der RMSD des Proteinrückgrats variiert zu MESD104-177 in den strukturierten Bereichen zwischen 1,6 Å für 1cc8 und 2,3 Å im Falle von 1rki. Entsprechend dieser Überlagerung wurden die Sequenzen der 7 Proteine verglichen (Abb. 3.8B). Überraschend ist die außerordentlich geringe Sequenzidentität von 6 % bis 15 % zwischen diesen strukturell sehr ähnlichen Proteinen. Nur hydrophobe Reste im Proteinkern, welche die Faltung stabilisieren, sind konserviert. Eine Suche in der SMART-Datenbank [86, 62] nach bekannten Domänen in den sechs betrachteten Proteinen lieferte zum einen die HMA (“heavy metal associated”) Domäne im Protein ATX1 [83] (PDB-ID: 1CC8) sowie in der Menkes ATPase [33] (1AW0). Desweiteren wurde im Stickstoffregulationsprotein P-II [98] (1QY7) die entsprechend benannte P-II Domäne gefunden. Verwendet man die Sequenz von MESD für eine Suche in SMART, erhält man keine sequenziell homologen Domänen.

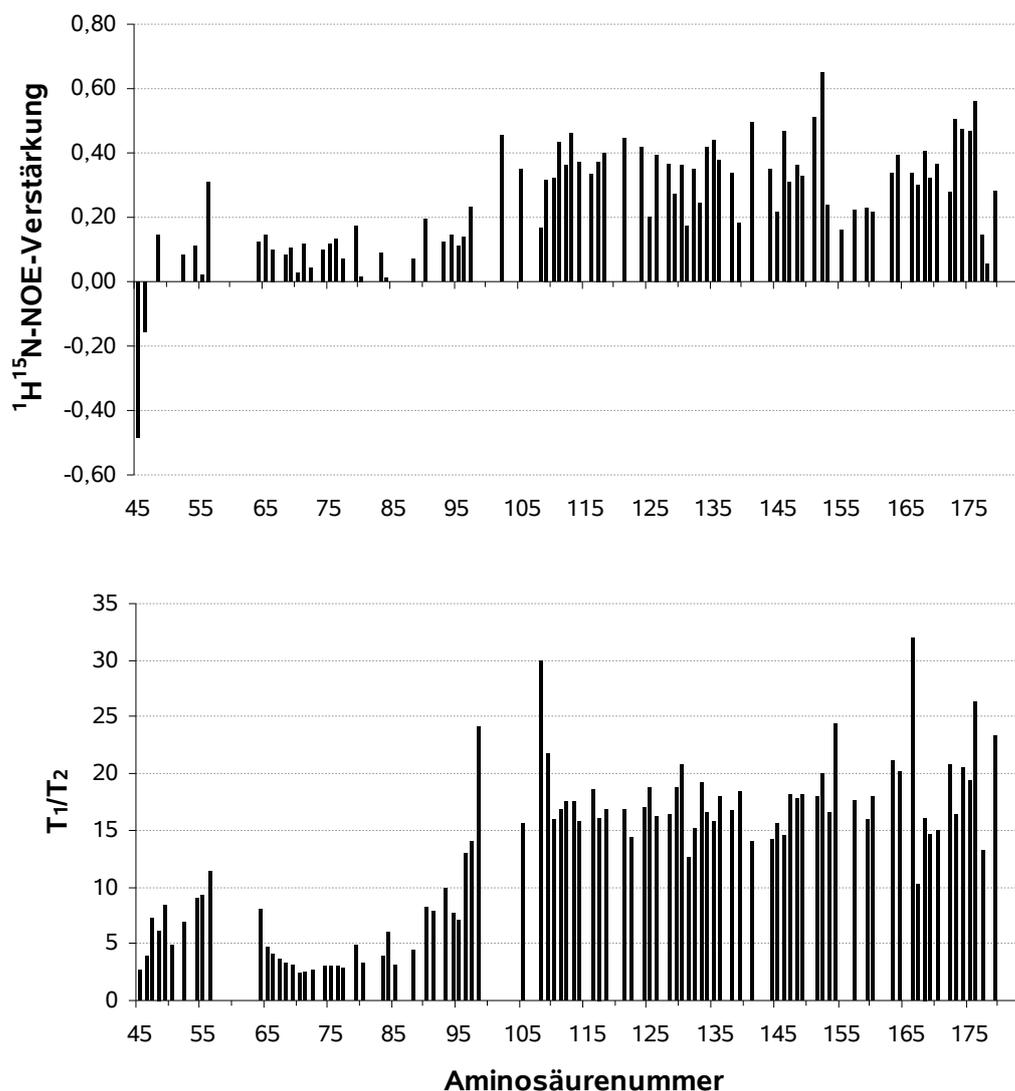
Ein Ziel der DALI-Suche war es, über funktionell bereits charakterisierte Proteine ähnlicher Struktur, Rückschlüsse bezüglich der Funktion von MESD zu erhalten. Das zu MESD104-177 strukturell ähnlichste Protein ist die C-terminale Subdomäne der Formiminotransferase-cyclodeaminase aus *Sus scrofa* (pdbID: 1qd1; NCBI ID: NP 999440; Z-value: 6.6 [58]). Das Enzym ist ein Homodimer. Reste in den Loopregionen der C-terminalen Domäne bilden über Wasserstoffbrücken sowie hydrophobe Wechselwirkungen den Interaktionsbereich zwischen den Monomeren. Dort bindet auch das Substrat. MESD ist demgegenüber als Monomer aktiv. Das Metallochaperon ATX1 (pdbID: 1cc8; NCBI ID: CAA65485; Z-value: 6.6 [83]) aus *Saccharomyces cerevisiae* bindet intrazellulär Kupferionen und transportiert diese zur P-Typ ATPase Ccc2. Diese überträgt die Kupferionen durch intrazelluläre Membranen auf die Kupfer Oxidase Fet3 welche die zelluläre Eisenaufnahme vermittelt. Die Struktur der ATPase Ccc2 und des ATX1 Proteins ähneln sich. Tatsächlich findet sich die Menkes Kupfer Transport ATPase (pdbID: 1aw0; NCBI ID:Q04656; Z-value: 5.6



[33]), welche das Ccc2 Homolog im Menschen ist, ebenfalls in der Überlagerung von Abb. 3.8. Die Bindungsstelle für Kupferionen besteht in diesen Proteinen aus einem konservierten M-T/H-C-X-X-C Motiv, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Das Kupferion wird von den beiden Cysteinen koordiniert. Es wird angenommen, daß der Kupfertransfer von einem konservierten positiv geladenen Rest (K65 in ATX1) vermittelt wird. Das menschliche Homolog Atox1 sowie das Homolog aus Cyanobakterien ScAtx1 besitzen an dieser Position ebenfalls einen basischen Rest. Demgegenüber findet sich in dem Kupferakzeptor Ccc2 an dieser Stelle ein Phenylalanin, was vermutlich die Kupferbindung unterstützt. MESD enthält im Vergleich nur ein Cystein, so daß eine Bindungsaktivität zu Kupferionen nicht zu erwarten ist. Interessanterweise findet sich in MESD in der Loopregion zwischen  $\alpha 3$  und  $\beta 4$  ein stark konservierter Argininrest (R170). Diese Position entspricht dem für den Kupfertransport notwendigen positiven Rest in ATX1. Beeby et al. [6] suchte in thermophilen Organismen nach Proteinen, welche viele Cysteine enthalten und bestimmte die Kristallstruktur eines Proteins mit drei Disulfidbrücken (pdbID: 1rki; NCBI ID: 1rkiA; Z-value: 6.4). Funktionell ist dieses Protein noch nicht charakterisiert. Das P-II Protein aus *Cyanobacteria Synechococcus sp. Pcc 7942* (pdbID: 1qy7; NCBI ID: 1qy7A; Z-value:6.1 [98]) ist an der zellulären Stickstoffregulation beteiligt. Das aktive Protein ist ein Homotrimer mit dem  $\beta$ -Faltblatt als Interaktionsbereich. Infolge der Phosphorylierung des Tyrosin 51 in der Loopregion zwischen  $\beta 2$  und  $\beta 3$  wird eine Signaltransduktion initiiert. Weitere funktionell bedeutende Bereiche des Gesamtproteins beinhalten  $\text{Ca}^{2+}$ - sowie ATP-Bindungsstellen. MESD ist demgegenüber weder ein Multimer noch besitzt es Reste, die eine Metallionenaffinität befürworten würden. Auch in der Literatur wurde eine solche bisher nicht beschrieben. Das *Vibrio cholerae* protein VC0424 (pdbID: 1nxi; NCBI ID: 1nxiA; Z-value: 4.4 [81]) ebenfalls in Abb. 3.8 dargestellt, ist ein bakterielles Protein unbekannter Funktion. Eine häufige Funktion anderer in der Dali-Suche gefundener Proteine, die sich nicht in Abb. 3.8 wiederfinden, ist die Bindung an RNA bzw. DNA. Da MESD ein Protein des Endoplasmatischen Retikulums ist und daher keinen Kontakt zu Nukleinsäuren hat, ist auch diese Funktion nicht übertragbar.

### 3.3 Die Struktur des konservierten Kernbereichs von MESD zwischen Aminosäure D45 und K184

Der Sequenzvergleich der Homologa von MESD aus Abbildung 3.2A verdeutlicht einen stark konservierten Kernbereich zwischen den Resten K43 und K184, was für dessen funktionelle Bedeutung spricht. Dem Fragment MESD89-184 fehlt N-terminal ein unter allen MESD-Homologa nahezu identischer Bereich zwischen den Resten K43 und D88. Diese Region beinhaltet entsprechend der Sekundärstrukturvorhersage von Jpred eine weitere  $\alpha$ -Helix. Mutationsstudien innerhalb dieser Region unterstrichen die funktionelle Bedeutung. So führt der Austausch des Tryptophan 61 zu Arginin zu einem unfunktionalen MESD [20]. Außerdem stellt sich die Frage, ob der exponierte hydrophobe Bereich des  $\beta$ -Faltblatts von MESD89-184 im nativen Protein vom N-Terminus abgedeckt wird. Aus diesen Gründen wurde auch die Struktur von MESD45-184 gelöst. Wie die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von MESD89-184 (Abb. 3.4D) und MESD45-184 (Abb. 3.4B) verdeutlichen, enthält das längere Konstrukt eine größere Anzahl von Resten in flexiblen Bereichen. Dies konnte auch anhand der Bestimmung der Relaxationszeiten der Amidstickstoffatome des Proteinrückgrats sowie der N-H-Kreuzsignalverstärkung aufgrund des heteronuklearen Kernoverhausereffekts (Abb. 3.9) gezeigt werden. Demnach ist der N-terminale Bereich bis K63 noch vergleichsweise starr. Dies korreliert mit der dort vorhergesagten  $\alpha$ -Helix. Auch die Abweichungen der chemischen Verschiebungen von den Werten eines "random coil" Proteins (Abb. 3.10) zeigen in diesem Bereich helikale Tendenzen. Zwischen D64 und K91 folgt eine sehr flexible Region. Der Rest der Struktur, welcher sich zu der MESD-Kerndomäne faltet, ist starr.

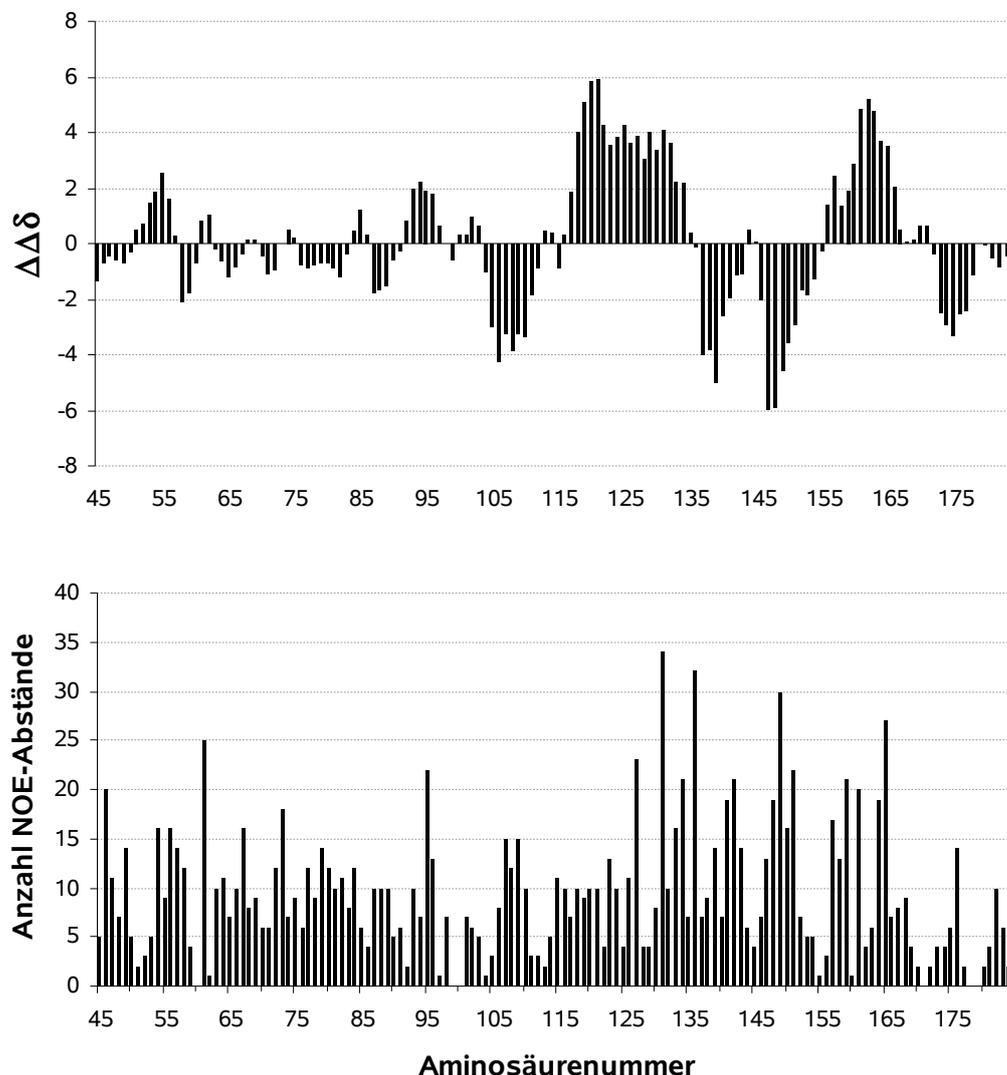


**Abbildung 3.9:**

**Dynamische Parameter von MESD45-184**

**Oben:** Die Verstärkung des  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOE, angegeben als Quotient der Signalintensitäten eines  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOE-NMR-Spektrums und der Signalintensitäten eines Vergleichsspektrums ohne Kernoverhauser effekt ist den einzelnen Resten zugeordnet

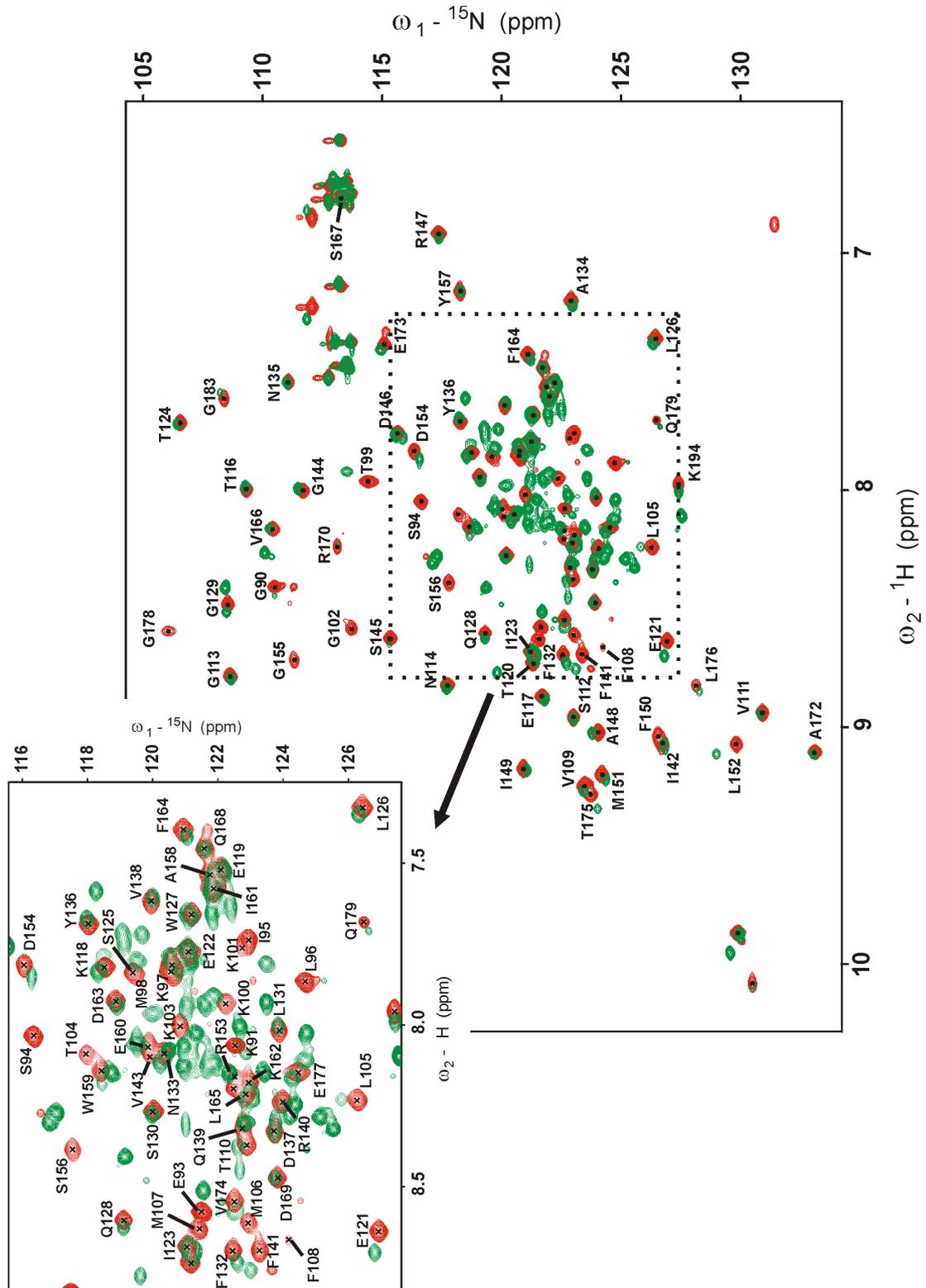
**Unten:** Der Quotient der  $^{15}\text{N}$ -Relaxationszeiten ( $T_1/T_2$ ) des Proteinrückgrats ist den einzelnen Resten zugeordnet. Flexible Bereiche sind durch eine NOE-Abschwächung sowie durch ein geringeres  $T_1/T_2$ -Verhältnis charakterisiert.



**Abbildung 3.10:**

**Strukturelle Parameter von MESD45-184**

**Oben:** Die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der  $C\alpha$ - und  $C\beta$ -Atome zu den "random coil"-Werten sind gegen die entsprechende Aminosäure aufgetragen. Die  $\Delta\Delta\delta$ -Werte wurden mittels Gleichung 3.1 berechnet [71]. Positive  $\Delta\Delta\delta$ -Werte weisen auf einen  $\alpha$ -helikalen Bereich, negative Werte auf ein  $\beta$ -Faltblatt hin. **Unten:** Die Anzahl der zur Strukturrechnung verwendeten NOE Abstandsrandbedingungen pro Aminosäurerest sind gegen die entsprechende Aminosäure aufgetragen.



**Abbildung 3.11:**

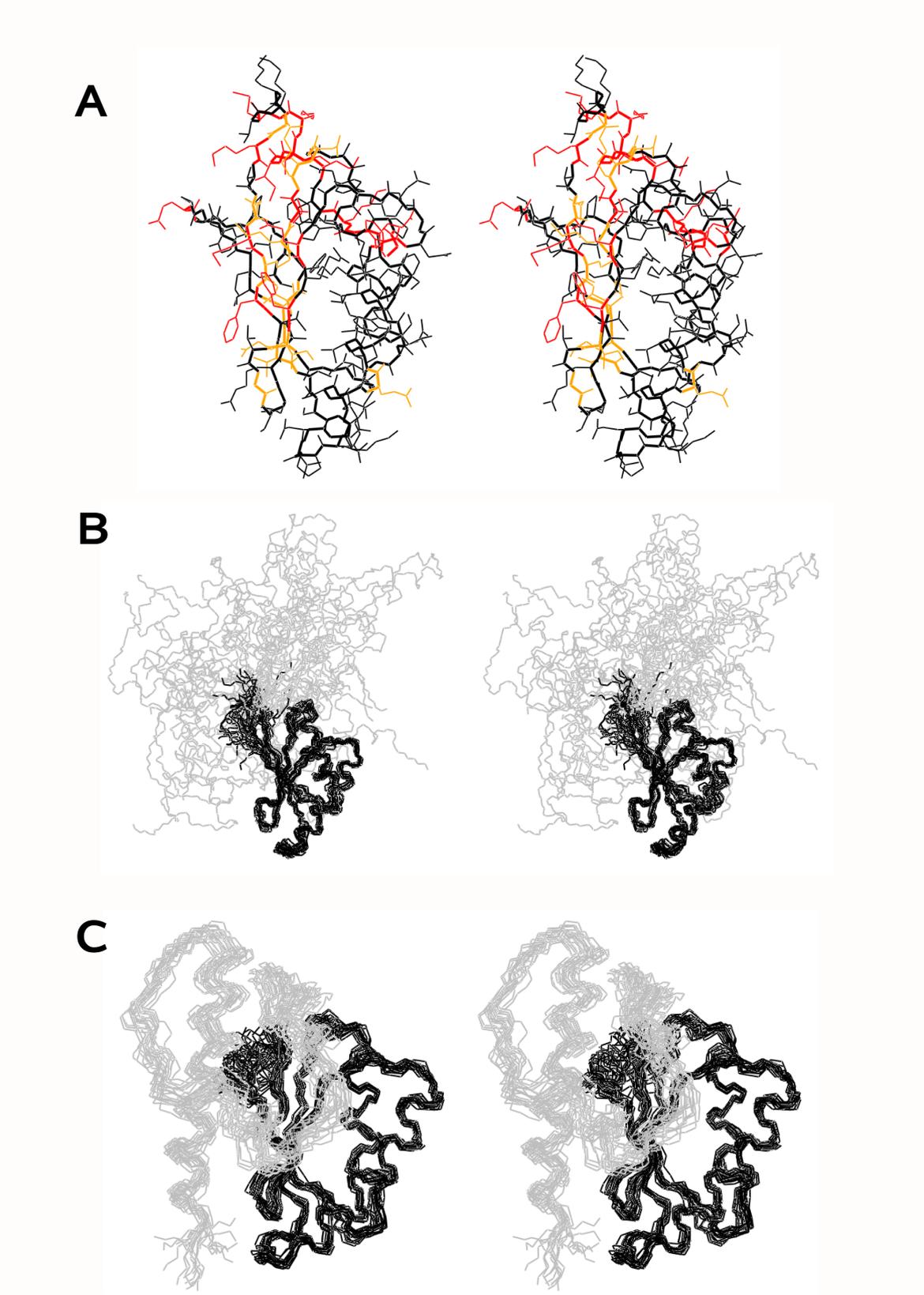
Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von MESD45-184 (grün) und MESD89-184 (rot). Die Signale der Amidgruppen des Proteinrückgrats von MESD89-184 sind zugeordnet.

Die wechselnde Flexibilität innerhalb der Struktur bewirkt stark variierende Signalintensitäten, was die Resonanzzuordnung der aufgenommenen Spektren erschwerte. Charakteristische NOE-Kopplungsmuster konnten zwischen den Resten Y49 bis G70 sowie in der Region I82 bis D88  $\alpha$ -helicale Sekundärstrukturen bestätigen. Dennoch konnten keine eindeutigen NOE-Signalzuordnungen zwischen der MESD-Kerndomäne und den Resten 45 bis 103 getroffen werden. Eine Strukturrechnung mit der Software CYANA 2.0 [41] unter Verwendung von mehrdeutigen Abstandsrandbedingungen und Vorgabe weniger eindeutiger Zuordnungen im Bereich der Kerndomäne ergab keine Strukturierung zwischen den Resten D45 und K103 (Abb. 3.12B). Durch den Vergleich der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von MESD89-184 und MESD45-184 (Abb. 3.11) konnten allerdings Signale der Kerndomäne identifiziert werden, die im erweiterten Protein aufgrund einer veränderten chemischen Umgebung verschoben sind (Abb. 3.12A). Die entsprechenden Reste sollten sich im Interaktionsbereich der Kerndomäne zu den Resten D45-K103 befinden. Auf Basis dieser Daten sowie möglicher Zuordnungen der mehrdeutigen NOE-Abstandsrandbedingungen wurde ein Modell einer möglichen globulären Struktur von MESD45-184 berechnet (Abb. 3.12C). Diese Strukturrechnung wurde durch Orientierungsdaten auf Basis von "Residual Dipolar Couplings" (RDC's) ergänzt.

---

**Abbildung 3.12 (nächste Seite):**

**A:** Struktur von MESD89-184. Die Signale der markierten Reste sind im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von MESD45-184 verschoben. **rot**  $\Delta\delta^1\text{H} > 0,05$  ppm bzw.  $\Delta\delta^{15}\text{N} > 0,5$  ppm **orange**  $\Delta\delta^1\text{H} > 0,02$  ppm  $< 0,05$  ppm bzw.  $\Delta\delta^{15}\text{N} > 0,2$  ppm  $< 0,5$  ppm. **B:** Strukturrechnung von MESD45-184 mit der Software CYANA 2.0 [41] unter Verwendung von mehrdeutigen Abstandsrandbedingungen. **C:** Modellierter Struktur von MESD45-184 unter Berücksichtigung der in A dargestellten Signalverschiebungen sowie möglicher Zuordnungen von mehrdeutigen Abstandsrandbedingungen. Alle Strukturabbildungen in Stereodarstellung. Die Kerndomäne ist in B und C schwarz dargestellt. Der N-terminal ergänzte Bereich zwischen D45 und K103 ist grau dargestellt.



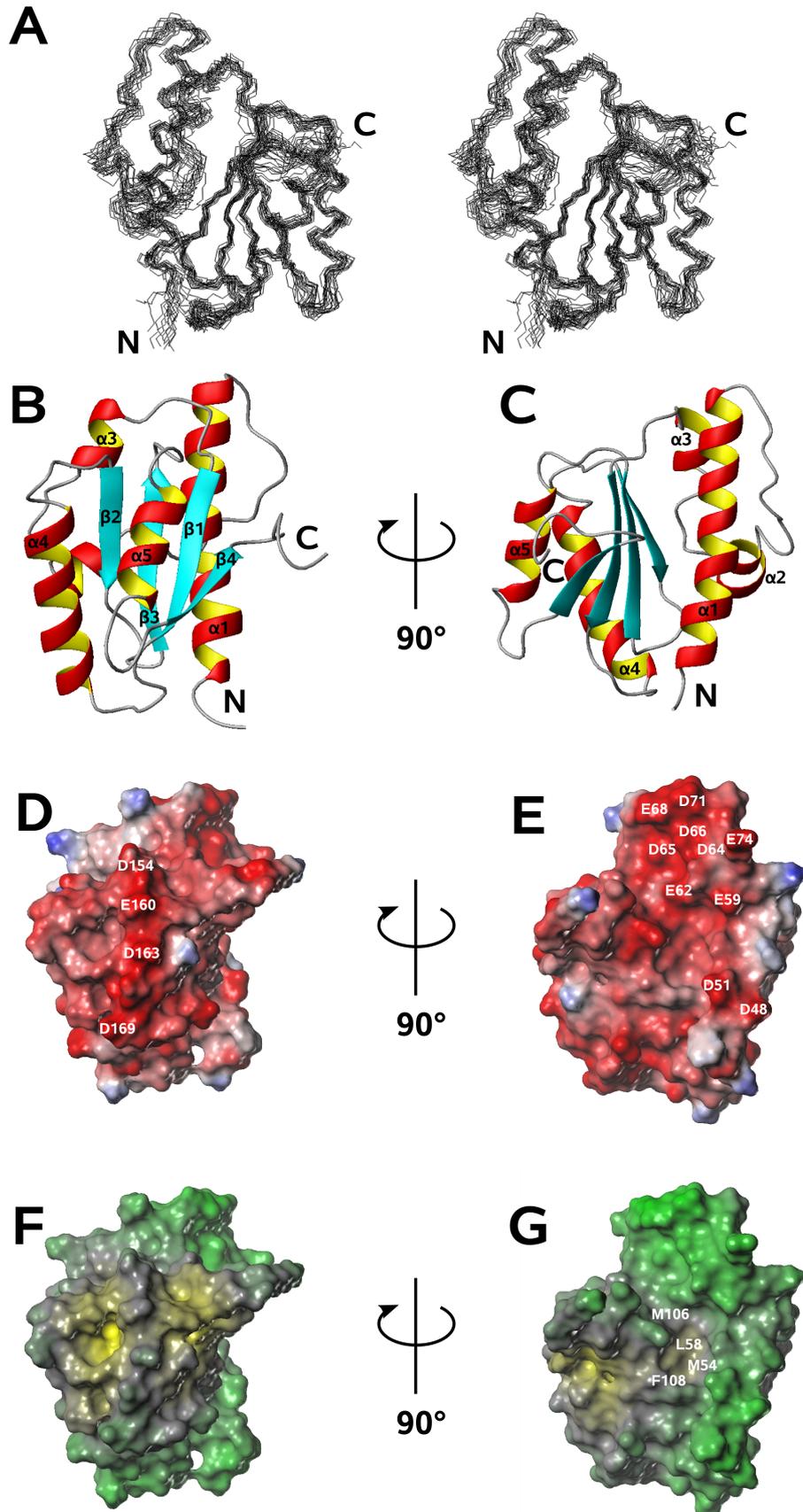
Die globuläre Modellstruktur des konservierten Kernbereichs von MESD soll im folgenden eingehend beschrieben werden. Die 20 energieärmsten Konformere sind in Abbildung 3.13A dargestellt. Abbildung 3.13B und 3.13C zeigen eine schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente im energieärmsten Konformer. Der hydrophobe Oberflächenbereich des  $\beta$ -Faltblatts der Kerndomäne interagiert mit Helix  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  und wird zu einem Großteil bedeckt. Die Reste M106 und F108 sowie einige hydrophobe Reste von  $\alpha 1$  verbleiben exponiert und bilden hydrophobe Oberflächenbereiche (Abb. 3.13G). Hydrophobe Reste in  $\beta 1$ ,  $\beta 4$  sowie  $\alpha 5$  werden unzureichend vom C-terminalen Bereich bedeckt (Abb. 3.13F). Das elektrostatische Oberflächenpotential (Abb. 3.13D und 3.13E) läßt im Vergleich zur Struktur der Kerndomäne eine stärkere Azidität erkennen. Der Grund ist die Umpositionierung des basischen Übergangsbereichs zwischen  $\alpha 3$  und  $\beta 1$ . Diese positiv geladenen Reste interagieren mit dem negativ geladenen C-terminalen Bereich von  $\alpha 1$ . Aufgrund der Akkumulation konservierter azider Reste in Helix  $\alpha 1$  besitzt MESD45-184 eine negativ geladene "Spitze" (Abb. 3.13E). Die 36 gemessenen RDC Werte von N-H-Amidbindungen sind mit der dargestellten Konformation konsistent. Tabelle 3.3 faßt die strukturellen Merkmale von MESD45-184 zusammen.

Eine Suche nach verwandten Strukturen in der Proteinstrukturdatenbank mittels DALI [49] erbrachte zwar 92 Ergebnisse mit einem Z-Wert höher 5, jedoch beschränkte sich die Ähnlichkeit auf die Kerndomäne zwischen den Resten T104-E177. Eine sich N-terminal daran anschließende Helix mit ähnlicher Positionierung wie in MESD45-184 findet sich nur in wenigen Proteinen wie zum Beispiel der Phosphoglycerat Dehydrogenase (pdbID: 1psd; Z-value: 5.6 [85]) Eine funktionelle Analogie ist jedoch nicht erkennbar.

---

**Abbildung 3.13 (nächste Seite):****Struktur des globulären Modells von MESD45-184**

**A:** Überlagerung der Rückgratstrukturen der 20 energieärmsten Konformere als Stereoansicht. **B und C:** schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente anhand des energieärmsten Konformers. Abbildung C ist im Uhrzeigersinn um  $90^\circ$  zur Abbildung B gedreht. **D und E:** Elektrostatisches Oberflächenpotential (rot-negativ; blau-positiv); identische Orientierung wie in Darstellung B und C; einige konservierte geladene Reste sind markiert. **F und G:** Hydrophobes Oberflächenpotential (grün-graugelb; hydrophil→hydrophob); identische Orientierung wie in Darstellung D und E; einige konservierte hydrophobe Reste sind markiert.



**Tabelle 3.3:**

Statistische Merkmale der 20 energetisch niedrigsten Konformere von MESD45-184; Protein Structure Validation Suite (PSVS V.1.3) [9]

<b>Abstandsrandbedingungen</b>	
interresiduale NOE-basierte Abstandsrandbedingungen	656
Winkelrandbedingungen nach Talos [19]	226
definierte Wasserstoffbrücken <sup>a</sup>	106
RDC-basierte NH-Orientierungsrandbedingungen	36
<b>Verletzung der Randbedingungen in 20 Strukturen</b>	
NOE-Abstandsrandbedingungen > 0,3 Å	2
Winkelrandbedingungen > 5°	1
Wasserstoffbrücken Abstandsrandbedingungen > 0,3 Å	0
RDC-Orientierungsrandbedingungen > 3 Hz	5
<b>geordnete Reste<sup>b</sup></b>	130 von 141
<b>Ramachandranplot<sup>c</sup></b>	
Reste in bevorzugten Regionen	86,9 %
Reste in zusätzlich erlaubten Regionen	12,8 %
Reste in gewöhnlich erlaubten Regionen	0,3 %
Reste in unerlaubten Regionen	0 %
<b>RMSD zu den durchschnittlichen Koordinaten<sup>d</sup></b>	
Atome des Proteinrückgrats	0.8 Å
Atome der Seitenketten	1.2 Å
<b>PSVS Qualitätswerte</b>	
MolProbity Kollisions Wert <sup>e</sup>	29,93
Procheck ( $\phi - \psi$ ) <sup>f</sup>	-0,43
Procheck (alles) <sup>g</sup>	-0,52

<sup>a</sup>Auf Basis charakteristischer Muster von NOE-Kreuzsignalen innerhalb von Sekundärstrukturelementen wurden Wasserstoffbrücken definiert.

<sup>b</sup>Einordnung nach [52]  $S(\phi) + S(\psi) > 1,8$

<sup>c</sup>nur geordnete Reste; Einteilung der Regionen des Ramachandranplots nach Morris et.al.[76].

<sup>d</sup>nur geordnete Reste

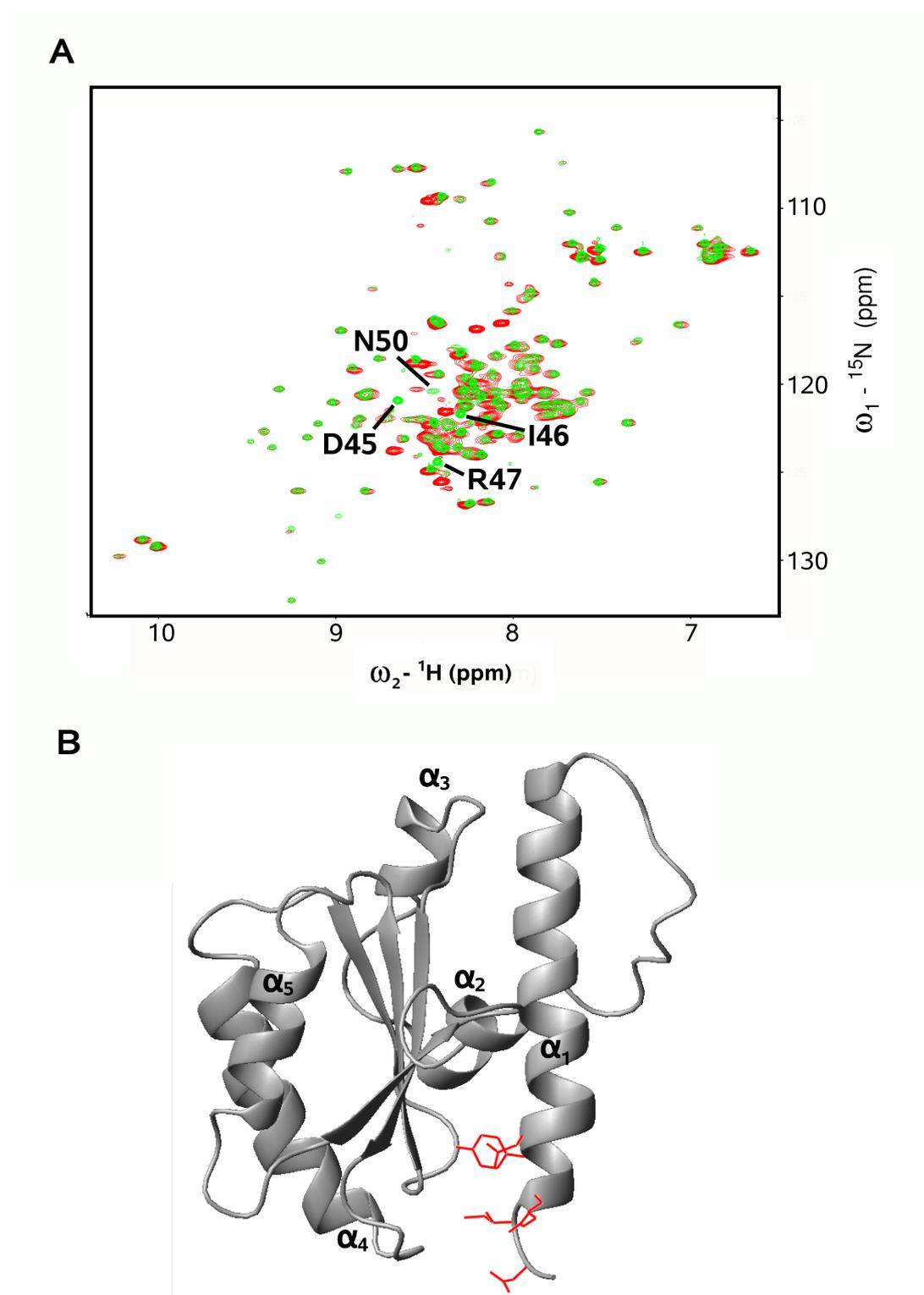
<sup>e</sup>Anzahl der Atome mit Überschneidung der Van-der-Waals-Radien um mehr als 0.4 Å pro 1000 Atome

<sup>f</sup>nur geordnete Reste. Der angegebene Wert beschreibt die empirische Wahrscheinlichkeit der durch die Struktur gegebenen  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel. Ein höherer Wert ist charakteristisch für eine höhere Wahrscheinlichkeit.

<sup>g</sup>nur geordnete Reste. Der angegebene Wert beschreibt die empirische Wahrscheinlichkeit aller Winkel der Struktur. Ein höherer Wert ist charakteristisch für eine höhere Wahrscheinlichkeit.

## 3.4 Die Bedeutung der flexiblen terminalen Bereiche

Wie schon in Abb 3.5B verdeutlicht, unterscheiden sich die Signale der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren zwischen MESD45-184 und dem gesamten Protein (MESD30-224) nur in geringem Maße. Die Struktur des konservierten MESD Kernbereichs bleibt demnach auch im nativen Protein erhalten. Dennoch lassen sich einige Unterschiede charakterisieren. Betrachtet man die Interaktion der N-terminalen Reste A30-K43 mit der Kernstruktur, so läßt die Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von MESD45-184 und dem N-terminal erweiterten Konstrukt MESD30-184 in Abbildung 3.14A nur einige wenige veränderte Signale erkennen. Demnach werden nur Reste im Anfangsbereich der Kernstruktur beeinflusst (Abb. 3.14B). Die Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von MESD45-184 und MESD30-224 läßt hingegen erheblich mehr verschobene Signale erkennen (Abb. 3.15A). Die C-terminalen Reste G185-L224 interagieren daher stärker mit der Kernstruktur. Abbildung 3.15B verdeutlicht anhand der Modellstruktur von MESD45-184 die durch den C-Terminus beeinflussten Bereiche. Insbesondere zeigt der Übergang zwischen  $\beta$ 1 und  $\alpha$ 4, der Interaktionsbereich zwischen  $\alpha$ 4 und  $\alpha$ 5 sowie der letzte Strang des  $\beta$ -Faltblatts deutliche Veränderungen. In Abbildung 3.15B ist die vermutete Position des C-Terminus ab G175 dargestellt. Einige in dem Modell der Kernstruktur exponierte hydrophobe Reste wären demzufolge im nativen Protein bedeckt.

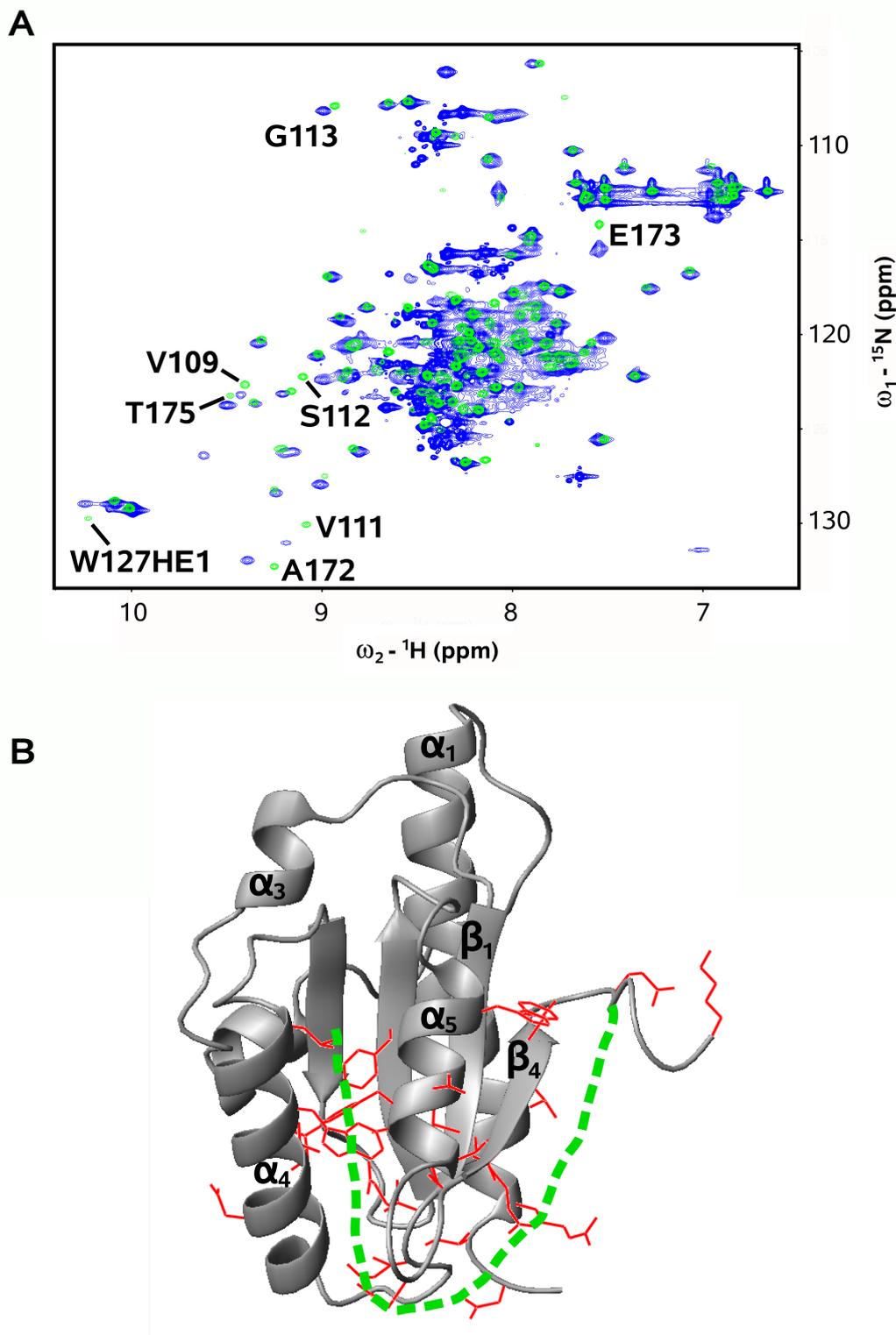


**Abbildung 3.14:**

**Interaktion der N-terminalen Reste A30-K44 mit MESD45-184**

**A:** Überlagerung der  ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von MESD45-184 (grün) und MESD30-184 (rot). Die am deutlichsten verschobenen Signale sind zugeordnet.

**B:** Aminosäuren von MESD45-184, die mit dem N-Terminus interagieren, sind markiert.



**Abbildung 3.15:**

Interaktion der N-terminalen Reste A30-K44 und der C-terminalen Reste G185-L224 mit MESD45-184

**A:** Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von MESD45-184 (grün) und MESD30-224 (blau). Die am deutlichsten verschobenen Signale sind zugeordnet.

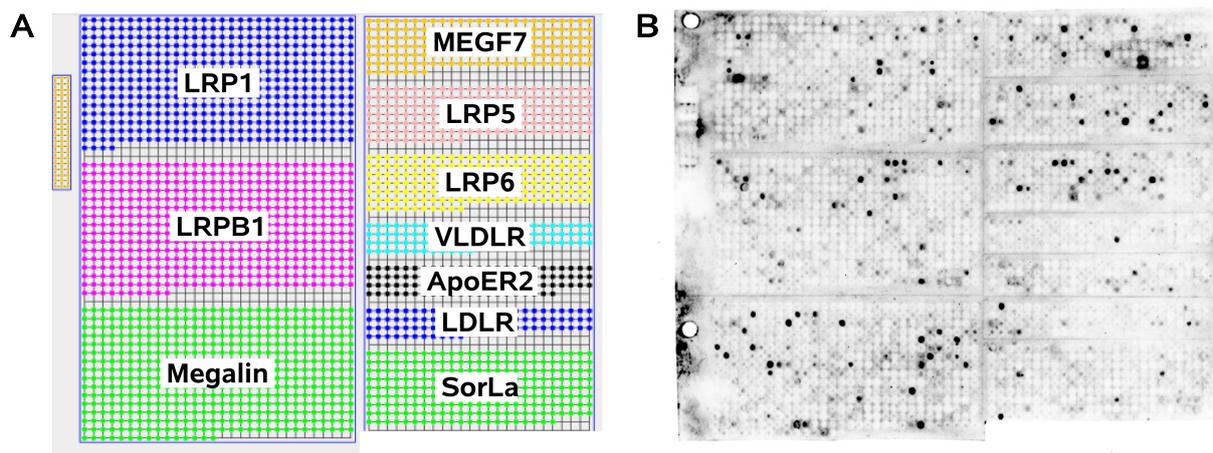
**B:** Aminosäuren von MESD45-184, die mit dem N- und C-Terminus interagieren, sind markiert. Die gestrichelte grüne Linie stellt die vermutete Position des C-Terminus (G178-L224) dar.

## 4 Funktionsuntersuchungen an MESD

Die Bedeutung von MESD für die Faltung und Sekretion nativer Rezeptoren der LDLR-Familie wurde in den Jahren 2003 und 2004 von mehreren Gruppen erkannt [21, 20, 51]. Culi et al. konnte den Bereich der Rezeptoren, dessen Faltung von MESD abhängig ist, auf ein Motiv, bestehend aus  $\beta$ -Propeller-Domäne und C-terminal folgender EGF-ähnlicher-Domäne, eingrenzen. Hierzu führte er *in vivo* Studien mit MESD des Wildtyps und unterschiedlich langen Rezeptorfragmenten durch. Die Menge des exprimierten membranständigen Rezeptorproteins wurde analysiert. Darauf aufbauend wurden eine Vielzahl an Bindungsstudien mit MESD und nativem membranlokalisiertem Rezeptor durchgeführt [99, 15, 64, 57]. Weiterführend wurde beschrieben, daß der C-terminale, unstrukturierte Bereich von MESD für die Interaktion zum gefalteten  $\beta$ -Propeller erforderlich ist [64]. In keiner der bisher durchgeführten Studien konnte ein Funktionsmechanismus für MESD vorgeschlagen werden. Die beobachtete Bedeutung von MESD für die Rezeptorsynthese läßt sich auf zwei grundlegende Prozesse zurückführen. Einerseits kann MESD direkt an der Faltung des  $\beta$ -Propeller-EGF-Motivs beteiligt sein, andererseits kann es durch Bindung an den gefalteten Rezeptor dessen Transport zur Zellmembran unterstützen. Die bisherigen Untersuchungen haben nur die Interaktion zum gefalteten Rezeptor beschrieben. Das Ziel der Arbeiten war es daher, über Bindungsstudien mit ungefalteten Rezeptorfragmenten Aussagen über die Beteiligung von MESD an der Faltung der Rezeptoren treffen zu können. Desweiteren wollten wir die Art der Interaktion charakterisieren.

### 4.1 Bindungsstudien an einer Peptidbibliothek

Basierend auf den Aminosäuresequenzen der 10 bekannten humanen Rezeptoren der LDLR-Familie (LRP1, LRP1B, Megalin, MEGF7, LRP5, LRP6, VLDLR, ApoER2, LDLR, SorLa) wurden Peptide einer Länge von 16 Aminosäuren auf einer Zellulosemembran synthetisiert. Die Sequenz der Peptide überlappte jeweils



**Abbildung 4.1:**

**A:** schematischer Aufbau der synthetisierten Peptidbibliothek. Jeder Punkt entspricht einem Rezeptorfragment aus 16 Aminosäuren. **B:** Chemilumineszenz nach Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  MESD30-224 und fünfminütiger Detektion.

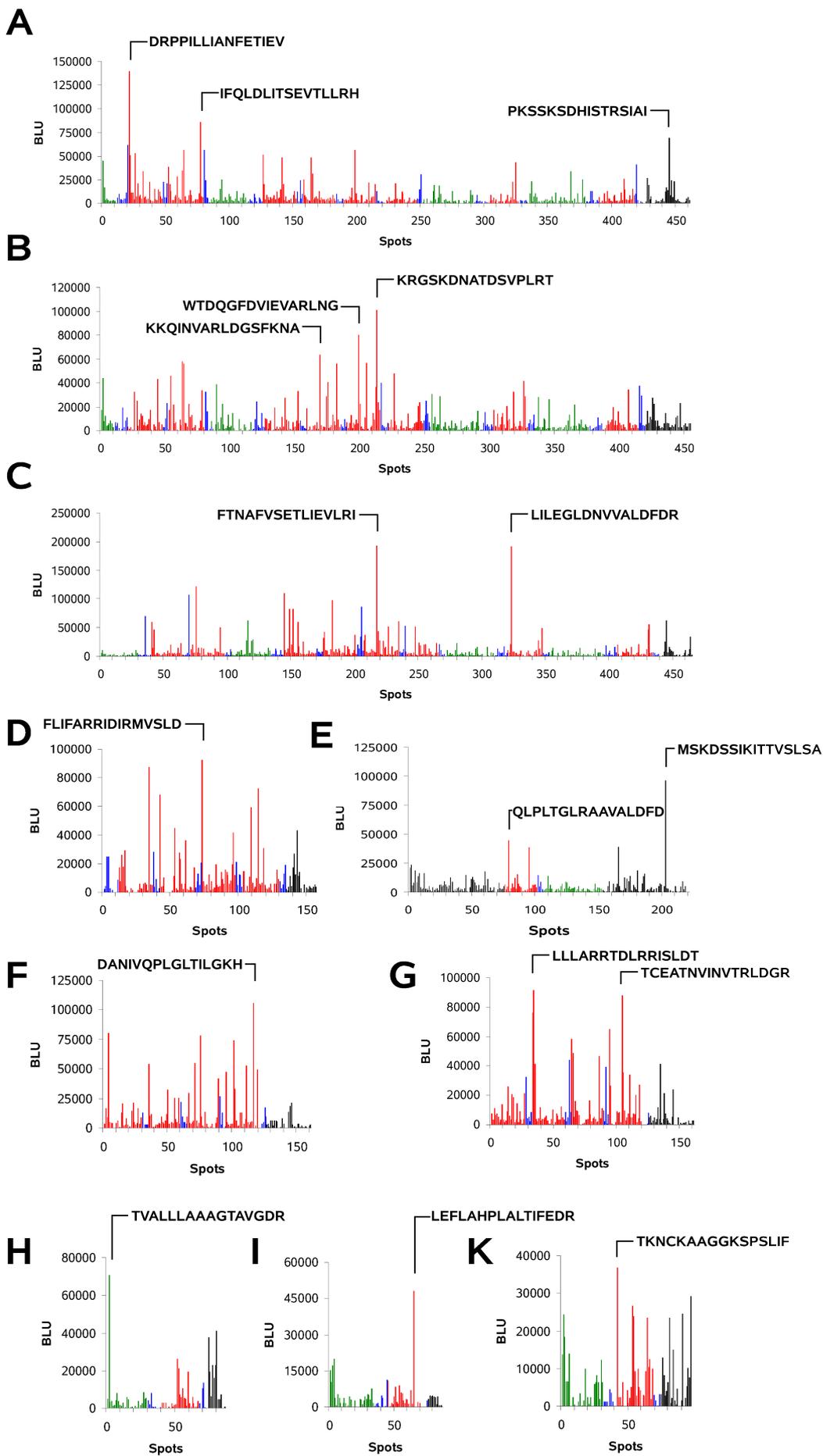
um sechs Aminosäuren. Abbildung 4.1A verdeutlicht schematisch den Aufbau der synthetisierten Peptidbibliothek. Nach Inkubation der Membran mit den sechs von uns klonierten MESD-Konstrukten erfolgte die Detektion des gebundenen MESD mittels eines mit Peroxidase gekoppelten Antikörpers und Luminol. Die von der Peroxidase katalysierte Oxidation des Luminols verläuft unter Abgabe von Licht. Die Stärke dieser Chemilumineszenz ist proportional zur Menge an gebundenem MESD. In Abbildung 4.1B ist die detektierte Chemilumineszenz der Peptidbibliothek nach Inkubation mit MESD30-224 dargestellt.

**Abbildung 4.2 (nächste Seite):**

**Chemilumineszenz gemessen als Boehringer Light Units (BLU) pro Peptid**

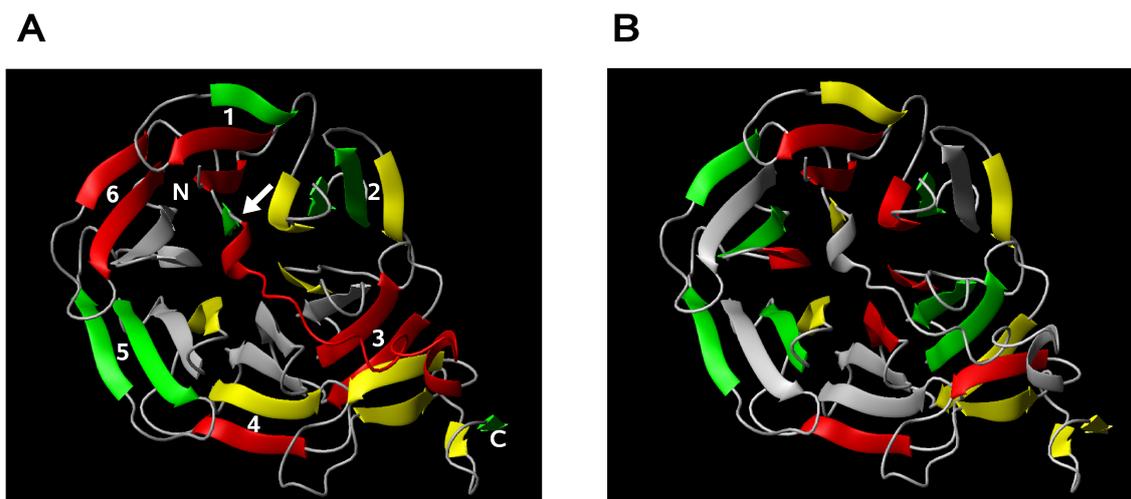
Die gemessene Chemilumineszenz eines Fragments korreliert mit der Menge an gebundenem MESD30-224. Es wurden Fragmente folgender Rezeptoren analysiert. **A:** LRP1 **B:** LRP1 **C:** Megalin **D:** MEGF7 **E:** SorLa **F:** LRP5 **G:** LRP6 **H:** LDLR **I:** VLDLR **K:** ApoER2

Die Peptide sind entsprechend ihrer Domänenzugehörigkeit markiert. **grün:** complement-type-repeat(CR)-Domäne, **blau:** Epidermal-growth-factor(EGF)-ähnliche Domäne, **rot:** YWTD- $\beta$ -Propeller Domäne, **schwarz:** übrige Bereiche. Die Sequenzen einiger Fragmente mit hoher Bindungsaktivität zu MESD sind dargestellt.



Diese Bindungsstudie bietet den Vorteil, daß für die Rezeptorfragmente mit einer Länge von 16 Resten keine Sekundärstrukturausbildung zu erwarten sind, weshalb die gemessenen Lumineszenzen ein Maß für die Bindungsaktivität zwischen MESD und dem ungefalteten Rezeptorprotein darstellt.

In Abbildung 4.2 wurde die gemessene Chemilumineszenz in Boeringer Light Units (BLU) gegen die einzelnen Peptide aufgetragen. Die Zugehörigkeit dieser Fragmente zu den Rezeptordomänen wird durch die Farbgebung veranschaulicht. Entsprechend dieser Resultate binden Peptide aus Bereichen, die sich zur  $\beta$ -Propeller-Domäne und ihrer C-terminal folgenden EGF-ähnlichen-Domäne falten, bevorzugt an MESD. Dies unterstützt die Vermutung das MESD an der Faltung dieser Bereiche beteiligt ist. MESD bindet dabei vorrangig Rezeptorfragmente, die das erste, dritte und letzte Propellerblatt ausbilden. Weiterhin besitzt der Verbindungsbereich zur folgenden EGF-ähnlichen Domäne eine deutliche Bindungsaktivität zu MESD. Diese Bereiche sind für die Faltung von entscheidender Bedeutung, da zwischen dem ersten und sechsten Propellerblatt der Ringschluß erfolgt. Desweiteren besteht im nativen Rezeptor zwischen dem dritten Blatt des  $\beta$ -Propellers und der C-terminal folgenden EGF-ähnlichen Domäne eine enge Interaktion. Abbildung 4.3A verdeutlicht die von MESD bevorzugten Bindungsbereiche des  $\beta$ -Propeller-EGF-Motivs.



**Abbildung 4.3:**

**Interaktionsbereiche zwischen MESD und dem  $\beta$ -Propeller-EGF-Motiv**

**A:** Dargestellt ist die Verteilung der MESD-Bindungsaktivität auf die  $\beta$ -Faltblätter des Motivs, bestehend aus  $\beta$ -Propeller und C-terminal folgender EGF-Domäne. Viel gebundenes MESD  $\rightarrow$  wenig gebundenes MESD (rot-gelb-grün-grau). Die Werte sind der Durchschnitt aus allen untersuchten Rezeptoren. Der C- bzw. N-Terminus ist markiert. Die Propellerblätter sind durchnummeriert. Der Pfeil markiert den Beginn der EGF-ähnlichen Domäne. **B:** Dargestellt ist die Hydrophobizität der einzelnen  $\beta$ -Faltblätter des Motivs, bestehend aus  $\beta$ -Propeller und C-terminal folgender EGF-Domäne. Hydrophob  $\rightarrow$  hydrophil (rot-gelb-grün-grau). Die Werte entsprechen dem Durchschnitt der Hydrophobizitätsindizes nach Kyte & Doolittle (<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>) aus allen untersuchten Rezeptoren. Kristallstruktur von Jeon et. al. [54]

Die hohe Zahl an analysierten Peptiden erlaubt eine verlässliche statistische Auswertung des Aminosäuremotivs, welches von MESD erkannt wird. In Abbildung 4.4A wird das statistische Vorkommen jeder Aminosäure in Peptiden mit und ohne Bindungsaktivität zu nativem MESD (MESD30-224) verglichen. Demnach bindet MESD an Peptide, welche mit den hydrophoben Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Alanin sowie Phenylalanin und den basischen Resten Lysin und Arginin angereichert sind. Die anderen Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten (Tryptophan und Tyrosin), die sauren Reste Aspartat und Glutamat sowie Histidin und Cystein werden gemieden.

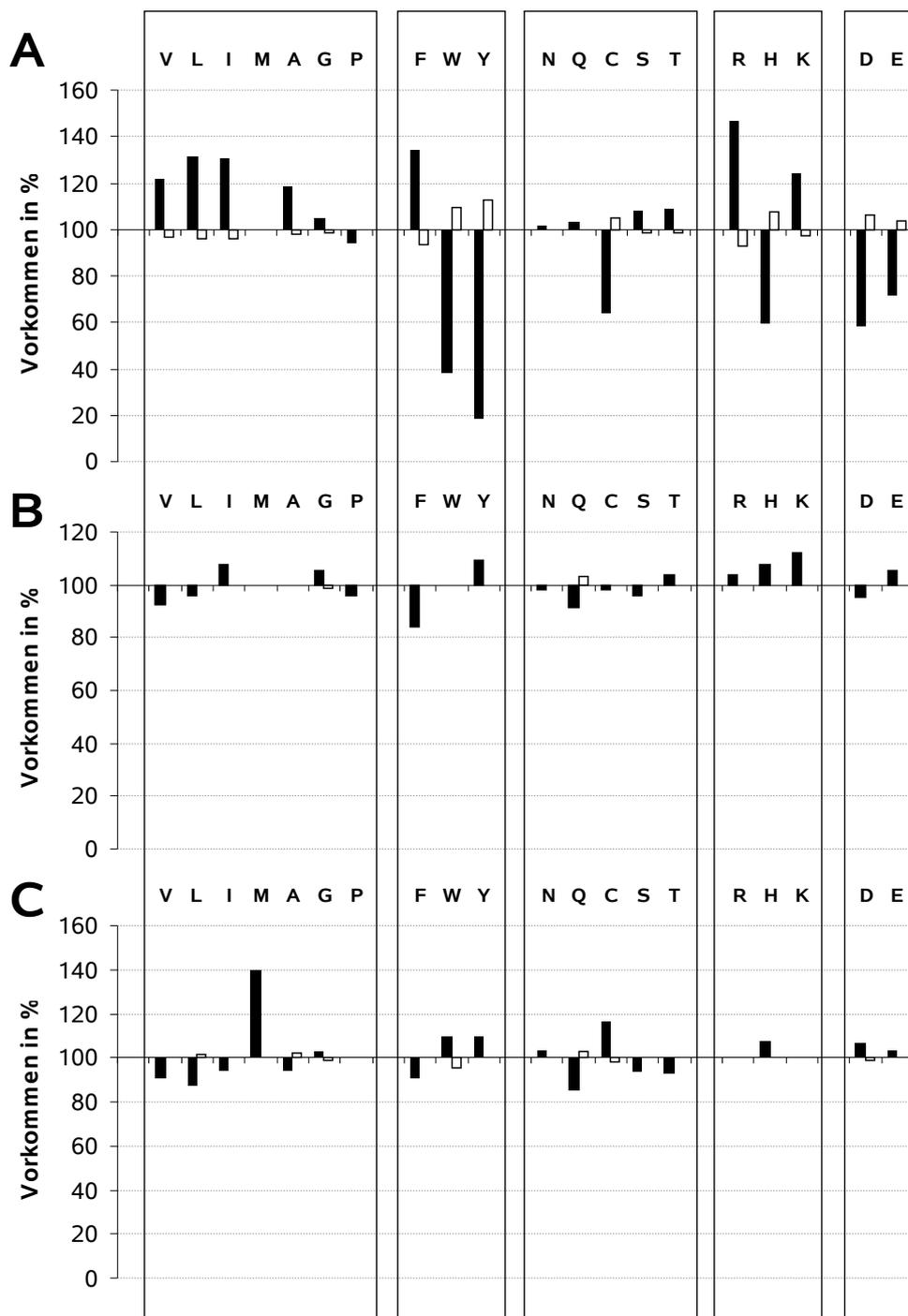


Abbildung 4.4:

#### Aminosäureverteilung in Rezeptorfragmenten mit und ohne Bindungsaktivität zu MESD

Dargestellt ist das Vorkommen der einzelnen Aminosäuren in Peptiden mit Bindungsaktivität (schwarze Balken) und ohne Bindungsaktivität (weiße Balken) **A:** zu nativem MESD (MESD30-224) **B:** zu der konservierten Kernregion (MESD45-184) und **C:** zu der C-terminal verlängerten Kerndomäne (MESD89-224). Alle Werte sind auf das Vorkommen dieser Aminosäure in der gesamten Peptidbibliothek (=100%) normiert. Die Aminosäuren sind nach ihrer chemischen Ähnlichkeit gruppiert.

A

```

SCTSVDPFEAFIIFSIRHEIRRIDLHK
SHACAQSLDKFLIFFARRMDIRRISFDT
GKTCKDGATELLLLLARRTDLRRISLDT
NWLRDVTIFDKQVQPRSPAEVNNNPCL
AKIEPTDRPPILLIANFETIEVFYLNG
VDWVAGNLYFTNAFVSETLIEVLRINT
CPAPAAASPLLLLFANRRDVRLVDAGGV
IKRGSKDNATDSVPLRTGIGVQLKDIK

```

B

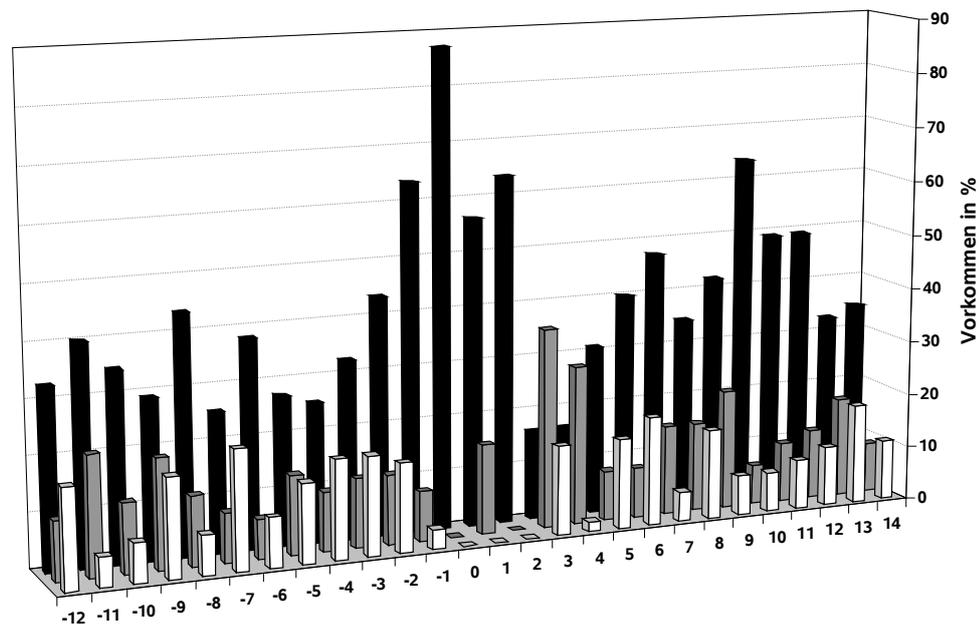


Abbildung 4.5:

MESD bindet an ein Motiv, bestehend aus zwei hydrophoben Kernbereichen, welche durch einige basische Reste unterbrochen sind

Die 55 Peptide mit der höchsten Bindungsaktivität zu nativem MESD (MESD30-224) wurden entsprechend ihrer Aminosäuresequenz verglichen. Der dadurch definierte Bindungsbereich wurde durch Aminosäuren von flankierenden Peptiden ergänzt. **A:** Der Sequenzvergleich ist am Beispiel von 8 Fragmenten dargestellt. Die 16 Reste des Bindungspeptids sind grau unterlegt. Die Position 0 aus dem Diagramm B ist schwarz unterlegt. **B:** Vorkommen jeder Aminosäure an der entsprechenden Position des Bindungsmotivs. Der Kernbereich ist hydrophob (schwarze Balken; Aminosäuren: V, L, I, M, A, F, W, Y). N-terminal folgt ein saurer Bereich (weiße Balken; Aminosäuren: D, E). C-terminal vom Kernbereich folgt im Anschluß an einige basische Reste (graue Balken; Aminosäuren: K, R, H) ein weiterer hydrophober Bereich.

Von den sechs untersuchten MESD-Konstrukten zeigte nur das native MESD (30-224) diese spezifische Interaktion. Weder der konservierte Kernbereich (45-184; Abb. 4.4B) noch die C-terminal erweiterte Kerndomäne (89-224; Abb. 4.4C) wiesen eine bevorzugte Interaktion mit bestimmten Sequenzen auf. Zur Analyse des von MESD erkannten Aminosäuremotivs wurden die Sequenzen der 55 Rezeptorfragmente mit der höchsten Bindungsaktivität zu MESD verglichen (Abb. 4.5A). Dieser Sequenzvergleich lieferte ein mögliches Bindungsmotiv aus 27 Resten. Abbildung 4.5B verdeutlicht das Vorkommen hydrophober, saurer sowie basischer Reste an jeder Position dieses Bindungsmotivs. Demnach bindet MESD an einen hydrophoben Bereich, welcher durch einige basische Reste unterbrochen wird. N-terminal des hydrophoben Kernbereichs ist das Bindungsmotiv mit sauren Resten angereichert. In Korrelation mit diesen Daten veranschaulicht Abbildung 4.3B die hydrophoben Bereiche innerhalb des  $\beta$ -Propeller-EGF-Motivs. Neben dem ersten Propellerblatt weisen die  $\beta$ -Stränge der EGF-ähnlichen Domäne sowohl eine hohe Bindungsaktivität als auch eine hohe Hydrophobizität auf.

Die Bedeutung der positiv geladenen Reste innerhalb des Bindungsmotivs von MESD wird auch aus Abbildung 4.6 ersichtlich. Das elektrostatische Oberflächenpotential einiger ausgewählter Propeller verdeutlicht, daß MESD verstärkt an Peptide bindet, welche sich zu einem  $\beta$ -Propeller mit positiv geladenem Zentrum falten.

Wie aus Abbildung 4.7 deutlich wird, bindet MESD verstärkt an aufeinanderfolgende, in Gruppen organisierte,  $\beta$ -Propeller. Einzelstehende Propeller-EGF Motive binden weniger MESD.

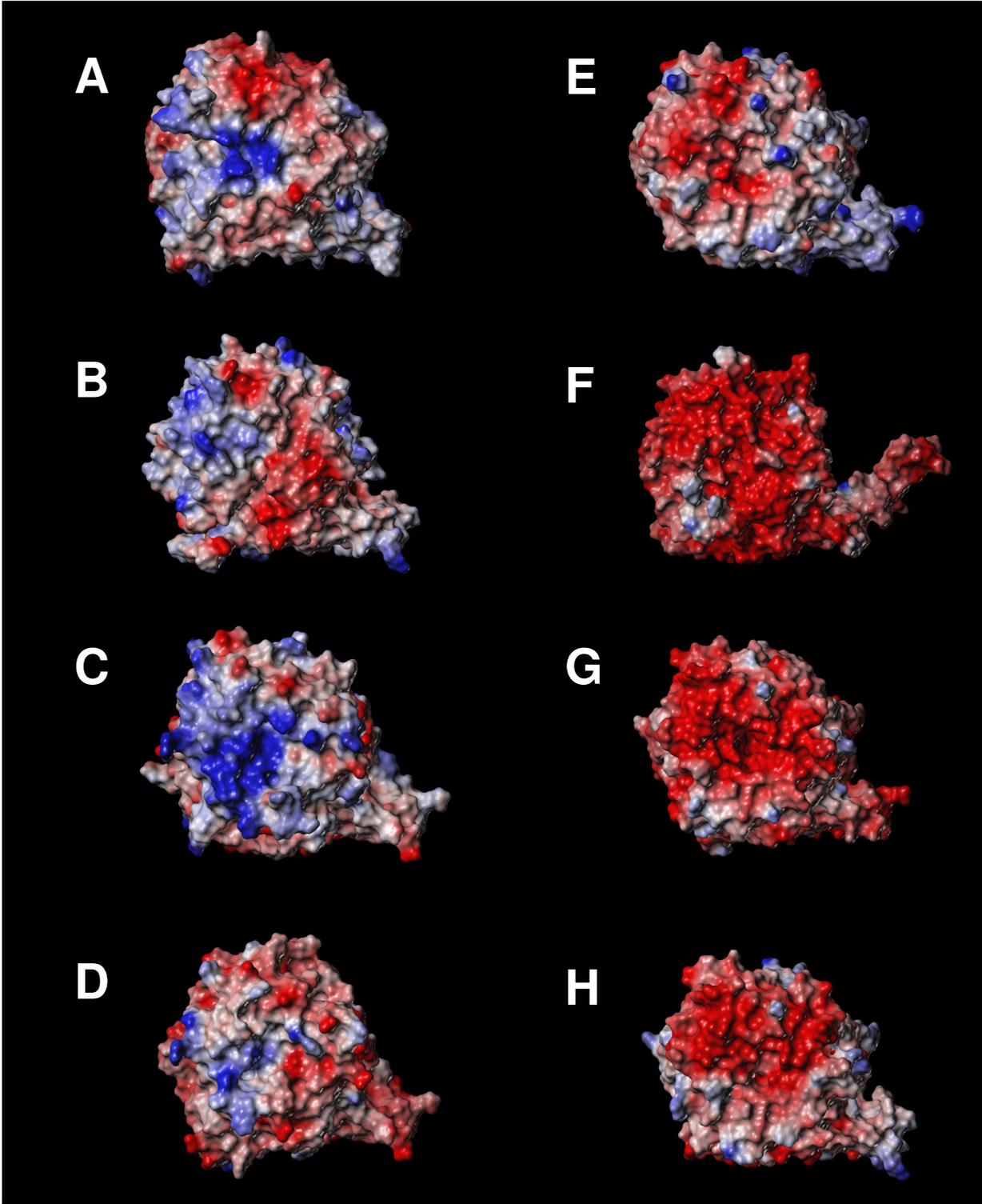
---

**Abbildung 4.6 (nächste Seite):**

**MESD bindet bevorzugt an Fragmente welche sich zu einem  $\beta$ -Propeller mit positiv geladenem Zentrum falten**

Dargestellt ist das elektrostatische Oberflächenpotential einiger Motive, bestehend aus  $\beta$ -Propeller und C-terminal folgender EGF-Domäne. **A:**  $\beta$ -Propeller-EGF-Motiv Nr.5 (vom N-Terminus) des Megalin Rezeptors **B:** Megalin Nr.3 **C:** LRP5 Nr.4 **D:** LRP6 Nr.4 **E:** LDLR **F:** SorLa **G:** VLDLR **H:** ApoER2

Peptide in den Motiven A bis D interagierten stärker mit MESD30-224 als Peptide in E bis H



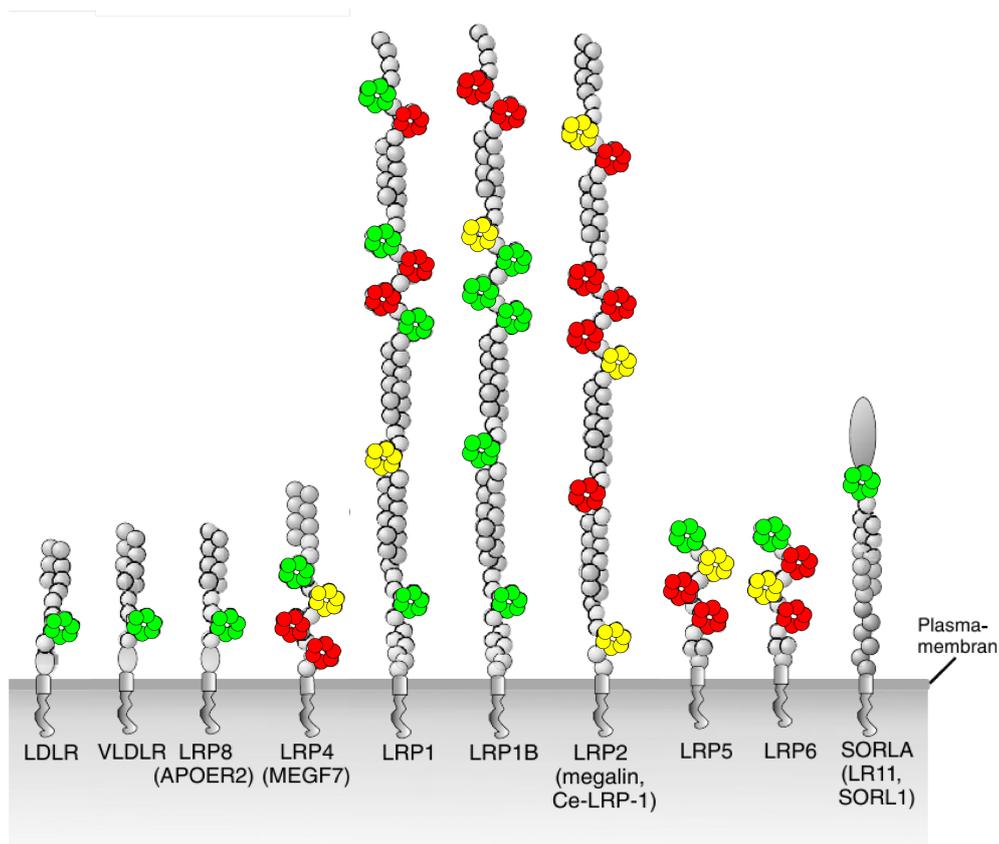


Abbildung 4.7:

Gruppen von  $\beta$ -Propellern binden mehr MESD als einzelstehende  $\beta$ -Propeller

Dargestellt ist die gebundene Menge MESD<sub>30-224</sub> pro  $\beta$ -Propeller-EGF-Motiv. **rot-gelb-grün** viel gebundenes MESD  $\rightarrow$  wenig gebundenes MESD

## 5 Diskussion

Im folgenden Kapitel sollen Zusammenhänge zwischen der Struktur von MESD und dessen Funktion diskutiert werden. Wie lassen sich für Chaperone charakteristische Funktionen wie Unterstützung der Faltung und Schutz vor Aggregation mit der Struktur von MESD belegen? Der Sequenzvergleich aus Abbildung 3.2A verdeutlicht einen hochkonservierten Kernbereich zwischen den Resten K43 und K184. Die außergewöhnlich hohe Identität in dieser Region zwischen evolutionär sehr unterschiedlichen Spezies läßt eine funktionelle Bedeutung dieses Kernbereichs vermuten. Wie aber Koduri et.al. zeigen konnte, genügt das MESD-Fragment D51-Q179 nicht für die Expression von membranständigen Rezeptoren aus. Erst die C-terminale Erweiterung dieses Fragments bis D214 führte zu einem funktionalen MESD [57]. Der unkonservierte C-terminale Bereich von MESD ist demnach funktionell bedeutend. Ein MESD-Fragment, welches ausschließlich aus den C-terminalen Resten R170-L224 besteht, war aber ebenfalls unfunktional. Die Funktion von MESD wird also sowohl durch den konservierten Kernbereich als auch durch den unkonservierten C-Terminus vermittelt. Dies konnte auch durch die von uns durchgeführten Bindungsstudien an ungefalteten Rezeptorfragmenten gezeigt werden. Nur das native MESD (30-224) zeigte eine spezifische Interaktion mit den Rezeptorfragmenten (Abb. 4.4A). Weder der konservierte Kernbereich (45-184; Abb. 4.4B) noch die C-terminal erweiterte Kerndomäne (89-224; Abb. 4.4C) wiesen eine bevorzugte Interaktion mit bestimmten Sequenzen auf. Interessant ist, daß diese C-terminalen Reste in den MESD-Homologa aus *Anopheles gambiae* und *Drosophila melanogaster* fehlen. Li et.al. konnte zeigen, daß ausschließlich die C-terminalen Reste R170-L224 für die Bindung von MESD an native membranständige LRP6-Rezeptoren verantwortlich sind [64]. Bei einer genaueren Betrachtung dieses C-terminalen Bereichs fällt auf, daß trotz seiner Unkonserviertheit eine Akkumulation von positiv geladenen Resten vorliegt. Der Anteil basischer Reste varriert in den untersuchten MESD-Homologa zwischen 27 und 40 %. Der Anteil an sauren Aminosäuren liegt demgegenüber zwischen 15 und 20 % (Abb. 3.2A). Die positive Nettoladung des C-Terminus erklärt daher die starke Bindung zu den überwiegend

negativ geladenen gefalteten  $\beta$ -Propellern.

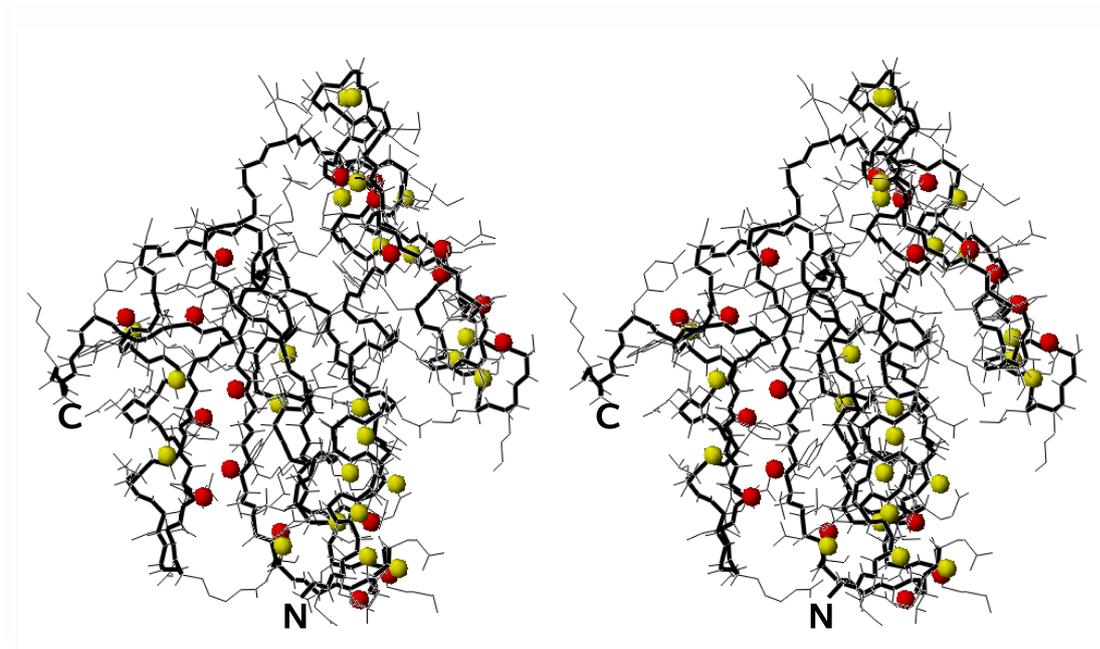
Wie eingangs erwähnt, sind die Vermittlung der nativen Faltung sowie der Schutz vor der Bildung von Aggregaten charakteristische Funktionen von Chaperonen. Diese beiden Prozesse setzen unterschiedliche Interaktionen zwischen MESD und dem Rezeptor voraus. Die Vermittlung der Rezeptorfaltung erfordert die Interaktion mit ungefaltetem Rezeptorprotein. Nach beendeter Faltung erfolgt der Transport des Rezeptors zur Zellmembran. Zum Schutz vor einer Aggregatbildung im Verlauf dieses Prozesses ist eine Interaktion von MESD zum nativ gefalteten Rezeptor notwendig. Die beschriebene Wechselwirkung der C-terminalen Reste R170-L224 von MESD mit dem nativen Rezeptor könnte daher dem intrazellulären Schutz vor einer Aggregation dienen.

Diese Arbeit konnte zeigen, daß die Aminosäuren T104-E177 von MESD eine eigenständige Domäne ausbilden. Eine Suche nach strukturell ähnlichen Proteinen in der Proteinstrukturdatenbank mittels DALI [49] klassifizierte deren  $\beta - \alpha - \beta - \beta - \alpha - \beta$ -Faltung als weitverbreitet. In der SMART-Datenbank [86, 62] konnten zwei sequentiell unterschiedliche Domänen dieses Faltungstyps identifiziert werden. Einerseits die HMA ("Heavy metal associated")-Domäne, welche beispielsweise in den kupferbindenden Proteinen ATX1 oder Menkes ATPase vorkommt, zum anderen die PII-Domäne in den gleichnamigen Proteinen der Stickstoffregulation aus verschiedenen Bakterien. Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu MESD104-177 unterscheiden sich diese Domänen sequentiell erheblich. Nur hydrophobe Reste, welche in den Kern des Proteins gerichtet sind und daher die Faltung stabilisieren, sind konserviert. Eine funktionelle Ähnlichkeit zwischen MESD und anderen Proteinen gleicher Faltung ist nicht erkennbar.

Dem Fragment MESD89-184 fehlt N-terminal ein unter allen MESD Homologa nahezu identischer Bereich zwischen den Resten K43 und D88. Wie Koduri et.al. zeigen konnte, ist gerade diese Region für die Funktion von MESD essentiell [57]. Mutationsstudien innerhalb dieses Bereichs unterstrichen die funktionelle Bedeutung. So führt der Austausch des Tryptophan 61 zu Arginin zu einem unfunktionalen MESD [20]. Entsprechend der Sekundärstrukturvorhersage von Jpred enthält diese Region zudem eine weitere  $\alpha$ -Helix. Die Untersuchung der dynamischen Eigenschaften von MESD45-184 erbrachte erhebliche Unterschiede in den Flexibilitäten einzelner Regionen (Abb. 3.9). Während die Kerndomäne ausgesprochen starr ist, zeigen die Reste D45-D88 eine erhebliche Flexibilität. Nur die N-terminalen Reste bis D64 sind noch vergleichsweise starr, was mit der in diesem Bereich vorhergesagten  $\alpha$ -Helix korreliert. Die wechselnde

Flexibilität innerhalb der Struktur bewirkt stark variierende Signalintensitäten, was die Resonanzzuordnung der aufgenommenen Spektren erschwerte. Charakteristische NOE-Kopplungsmuster konnten zwar  $\alpha$ -helicale Sekundärstrukturen zwischen den Resten Y49 und G70 sowie zwischen I82 und D88 bestätigen, dennoch konnten keine eindeutigen NOE-Signalzuordnungen zwischen der MESD-Kerndomäne und den Resten D45 bis K103 getroffen werden. Eine Strukturrechnung mit der Software CYANA 2.0 [41] unter Verwendung von mehrdeutigen Abstandsrandbedingungen und Vorgabe weniger eindeutiger Zuordnungen im Bereich der Kerndomäne ergab keine Strukturierung zwischen den Resten D45 und K103 (Abb. 3.12B). Durch den Vergleich der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von MESD89-184 und MESD45-184 (Abb. 3.11) konnten allerdings Signale der Kerndomäne identifiziert werden, die im erweiterten Protein aufgrund einer veränderten chemischen Umgebung verschoben sind (Abb. 3.12A). Da sich die entsprechenden Reste im Interaktionsbereich der Kerndomäne zu den Resten D45-K103 befinden sollten, wurde auf Basis dieser Daten sowie wahrscheinlicher Zuordnungen der mehrdeutigen NOE-Abstandsrandbedingungen das Modell einer möglichen globulären Struktur von MESD45-184 berechnet (Abb. 3.12C). Orientierungsdaten auf Basis von "Residual Dipolar Couplings" (RDC's) waren mit diesem Modell konsistent. Die funktionelle Bedeutung des konservierten Kernbereichs von MESD soll im Folgenden anhand dieser Modellstruktur diskutiert werden.

Die Bedeutung von MESD bei der Vermittlung der nativen Rezeptorfaltung erfordert dessen Interaktion mit ungefaltetem Rezeptorprotein. Diese Wechselwirkungen zum naszierenden Protein erfolgen in der Regel zwischen exponierten hydrophoben Resten. Anhand von Bindungsstudien unter Verwendung einer Peptidbibliothek konnte gezeigt werden, daß die Wechselwirkung zwischen MESD und den ungefalteten Rezeptoren zum Teil tatsächlich auf hydrophoben Kontakten basiert (Abb. 4.5). Wie in Abbildung 3.13F und 3.13G erkennbar ist, besitzt MESD45-184 mehrere exponierte hydrophobe Regionen. Die Messung der longitudinalen Relaxationsraten der Amidwasserstoffe von MESD45-184 in Abwesenheit bzw. Anwesenheit der paramagnetischen Substanz  $\text{Gd}^{3+}$ -DTPA, konnte die Lösungsmittelzugänglichkeit dieser hydrophoben Bereiche bestätigen (Abb. 5.1). Parallel dazu bewies Bernadette Holdener (Department of Biochemistry and Cell Biology, State University New York, New York) mittels Mutationsstudien an MESD die funktionelle Bedeutung dieser hydrophoben Oberflächenbereiche (Abb. 5.2). So führt der Austausch der exponierten hydrophoben Reste im Interaktionsbereich von  $\alpha 1$  und dem  $\beta$ -Faltblatt (F108, M54) zu einer deutlichen Aktivitätsminderung von MESD. Hingegen hat die Mutation der von  $\alpha 2$  bedeckten Reste F141 sowie V143 keinen



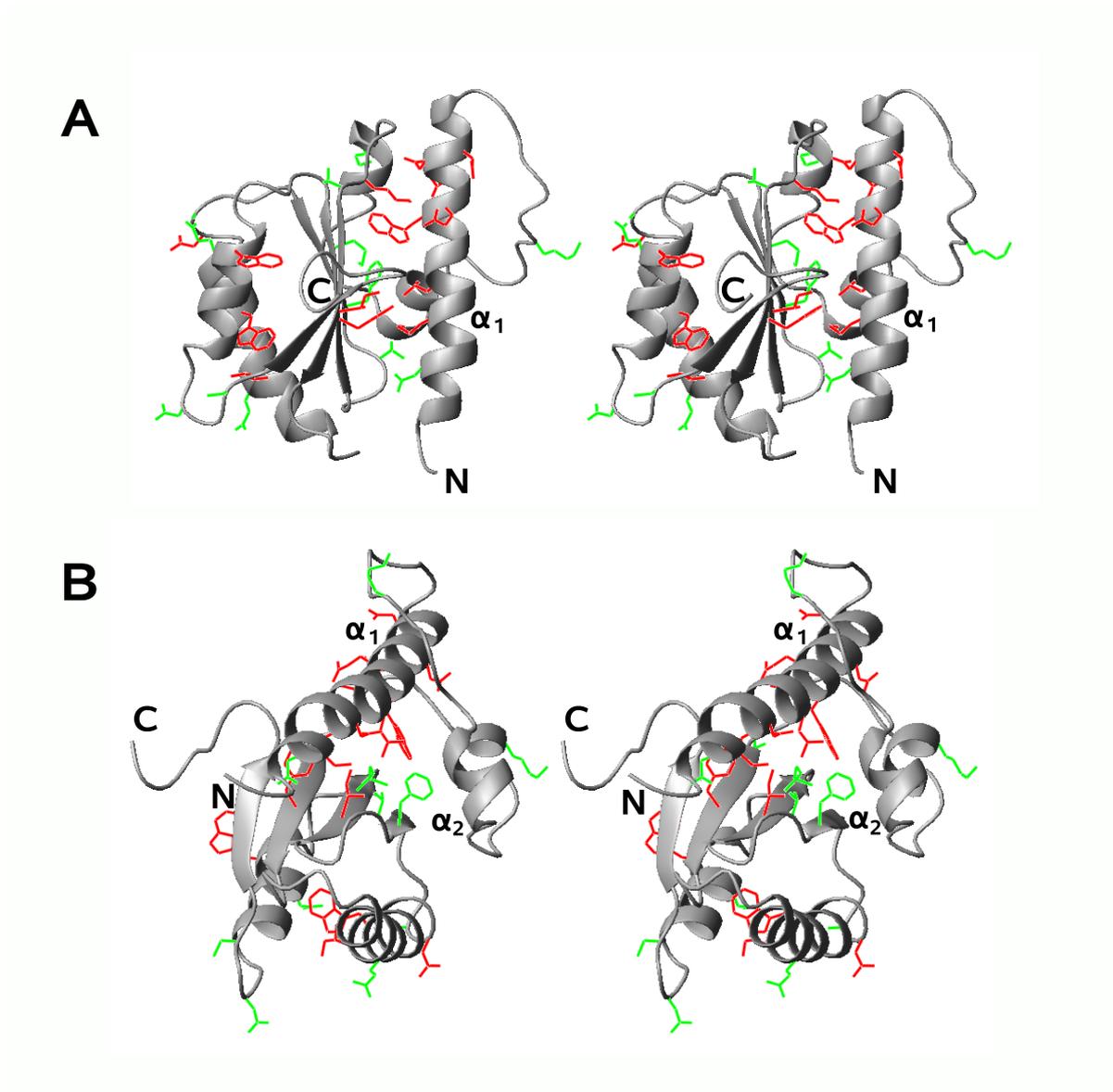
**Abbildung 5.1:**

**Lösungsmittelzugänglichkeit der Oberfläche von MESD45-184**

Das Verhältnis der longitudinalen Relaxationsrate der Amidwasserstoffe in Anwesenheit und Abwesenheit von 0,3 mM  $Gd^{3+}$ -DTPA korreliert indirekt mit der Lösungsmittelzugänglichkeit. Die rot markierten Amidwasserstoffatome weisen ein Verhältnis  $T_1^{Gd}/T_1^0 < 0,8$  auf und sind dem Lösungsmittel gut zugänglich. Die gelb markierten Reste haben ein Verhältnis  $0,8 < T_1^{Gd}/T_1^0 < 0,9$  (mäßige Lösungsmittelzugänglichkeit); Stereoansicht von MESD45-184.

Einfluß auf die Funktion. Auch die anderen in Abbildung 3.13F und 3.13G dargestellten hydrophoben Oberflächenbereiche enthalten Reste, deren Austausch mit einer deutlich reduzierten Aktivität einhergeht (W127, I123, W159). Wie aus Abbildung 3.15 ersichtlich ist, werden jedoch einige dieser Bereiche von den C-terminalen Resten G185-L224 bedeckt, was die Bedeutung dieser Reste für eine spezifische Interaktion zwischen MESD und dem ungefalteten Rezeptorprotein erklärt (Abb. 4.4). Diese Wechselwirkung zwischen dem C-Terminus von MESD und dem konservierten Kernbereich bewirkt, daß nur die hydrophoben Reste im Interaktionsbereich von  $\alpha 1$  und dem  $\beta$ -Faltblatt an der Proteinoberfläche verbleiben, wodurch eine spezifische Interaktion zum Rezeptor ermöglicht wird. Die Abschirmung hydrophober Oberflächen durch die C-terminalen Reste hat noch einen weiteren Effekt. Durch deren Interaktion mit dem  $\beta$ -Propeller würden weitere hydrophobe Bereiche dem Lösungsmittel zugänglich. Der C-terminale

Bereich von MESD könnte demnach eine “Schalterfunktion” besitzen.



**Abbildung 5.2:**  
**Mutationsanalyse an MESD**

Einzelmutationen die zu verminderter MESD-Aktivität führen sind rot markiert, Einzelmutationen ohne Einfluß auf die Aktivität sind grün markiert. **A** Hydrophobe Reste im Interaktionsbereich der Helix  $\alpha_1$  zum  $\beta$ -Faltblatt sowie deren azider C-terminaler Bereich sind funktionell essentiell. **B** die von  $\alpha_2$  bedeckten hydrophoben Reste des  $\beta$ -Faltblatts sind ersetzbar. Beide Strukturabbildungen sind in Stereoansicht dargestellt. Mutationsdaten von Bernadette Holdener (Department of Biochemistry and Cell Biology, State University New York, New York)

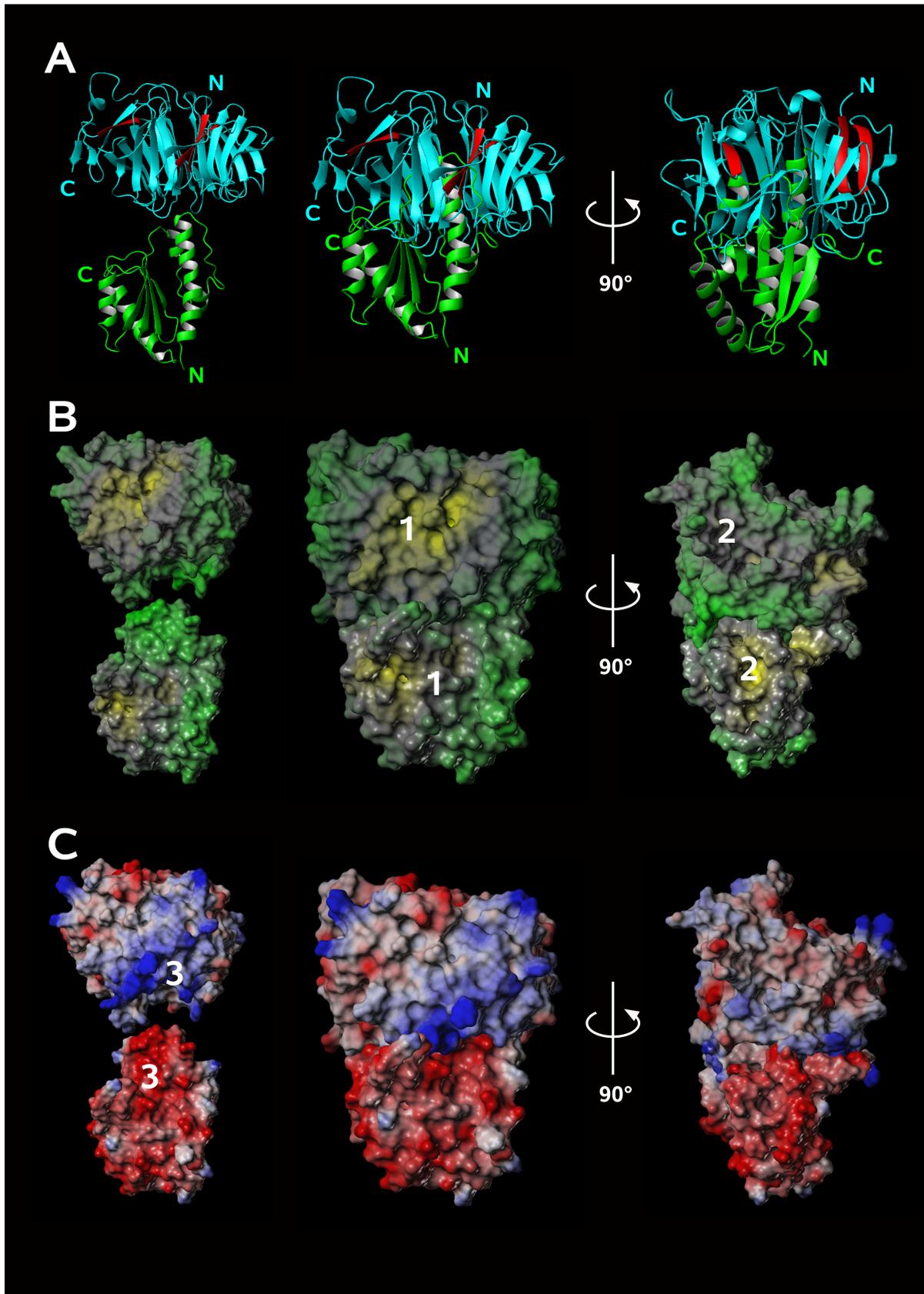
Der  $\beta$ -Propeller als Bindungspartner von MESD besitzt insbesondere im Bereich der N-terminalen  $\beta$ -Stränge hydrophobe Oberflächenbereiche (Abb. 4.3B und Abb. 5.3A und 5.3B).

Wie aus Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6 deutlich wird, sind positiv geladene Reste Bestandteil des Bindungsmotivs von MESD. Die Korrelation eines basischen Propellerzentrums zu der hochkonservierten aziden Helix  $\alpha 1$  von MESD ist auffallend. Mittels dieser Daten läßt sich ein durch MESD vermittelter Faltungsmechanismus für das  $\beta$ -Propeller-EGF-Motiv vorschlagen (Abb. 5.3 und 5.4). Initiierende hydrophobe Kontakte zwischen MESD und dem ersten Propellerblatt könnten demnach im MESD-Interaktionsbereich von  $\alpha$ -Helix1 und dem  $\beta$ -Faltblatt erfolgen (Abb. 5.3-1 und Abb. 5.4-1). Im nächsten Schritt bindet der basische C-terminale Bereich von MESD (K184-L224) an negativ geladene Propellerreste, wodurch weitere hydrophobe Bereiche auf der Oberfläche von MESD freigelegt werden. An diese könnten die hydrophoben  $\beta$ -Stränge der EGF-ähnlichen Domäne binden (Abb. 4.3B; Abb. 5.3-2; Abb. 5.4-2), was zu deren korrekter Positionierung am dritten Propellerblatt führen würde. Im folgenden könnte sich das positiv geladene Propellerzentrum aufgrund polarer Kontakte um die azide MESD-Helix  $\alpha 1$  "wickeln" (Abb. 5.3-3 und Abb. 5.4-3), was den Ringschluß vermitteln würde. Nach Trennung des C-terminalen MESD-Bereichs (K184-L224) vom  $\beta$ -Propeller bedeckt dieser wieder die hydrophoben Regionen auf der MESD-Oberfläche. Die EGF-ähnliche Domäne bindet an das dritte Propellerblatt und MESD löst sich vom nativen Propeller-EGF-Motiv. Unter welchen Bedingungen sich MESD vom  $\beta$ -Propeller löst, ist ungeklärt. Es ist denkbar, daß sich der C-terminale Bereich von MESD erst kurz vor der Sekretion des nativen Rezeptors löst und bis dahin Schutz vor Aggregation bietet.

---

**Abbildung 5.3 (nächste Seite):****vorgeschlagenes Model zur Faltung des  $\beta$ -Propellers durch MESD**

**A:** Ribbondarstellung der vermuteten Interaktion zwischen  $\beta$ -Propeller und MESD. Hydrophobe Propellerbereiche sind rot markiert. **B:** Lipophiles Oberflächenpotential. Hydrophil $\rightarrow$ hydrophob (grün-grau-gelb). Die hydrophoben Bereiche des ersten Propellerblatts und der EGF-ähnlichen Domäne interagieren mit hydrophoben Oberflächenbereichen von MESD. **C:** Elektrostatisches Oberflächenpotential. Acid (rot), basisch (blau). Das positiv geladene Zentrum des  $\beta$ -Propellers interagiert mit dem stark aziden C-terminalen Teil der Helix  $\alpha 1$  von MESD. **1:** hydrophobe Kontakte zwischen dem ersten Propeller Blatt, der MESD-Helix  $\alpha 1$  sowie dem  $\beta$ -Faltblatt von MESD. **2:** hydrophobe Kontakte zwischen EGF-ähnlicher Domäne und den MESD-Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$ . **3:** polare Wechselwirkungen zwischen basischen Resten im Propellerzentrum und aziden Resten in  $\alpha 1$  von MESD.

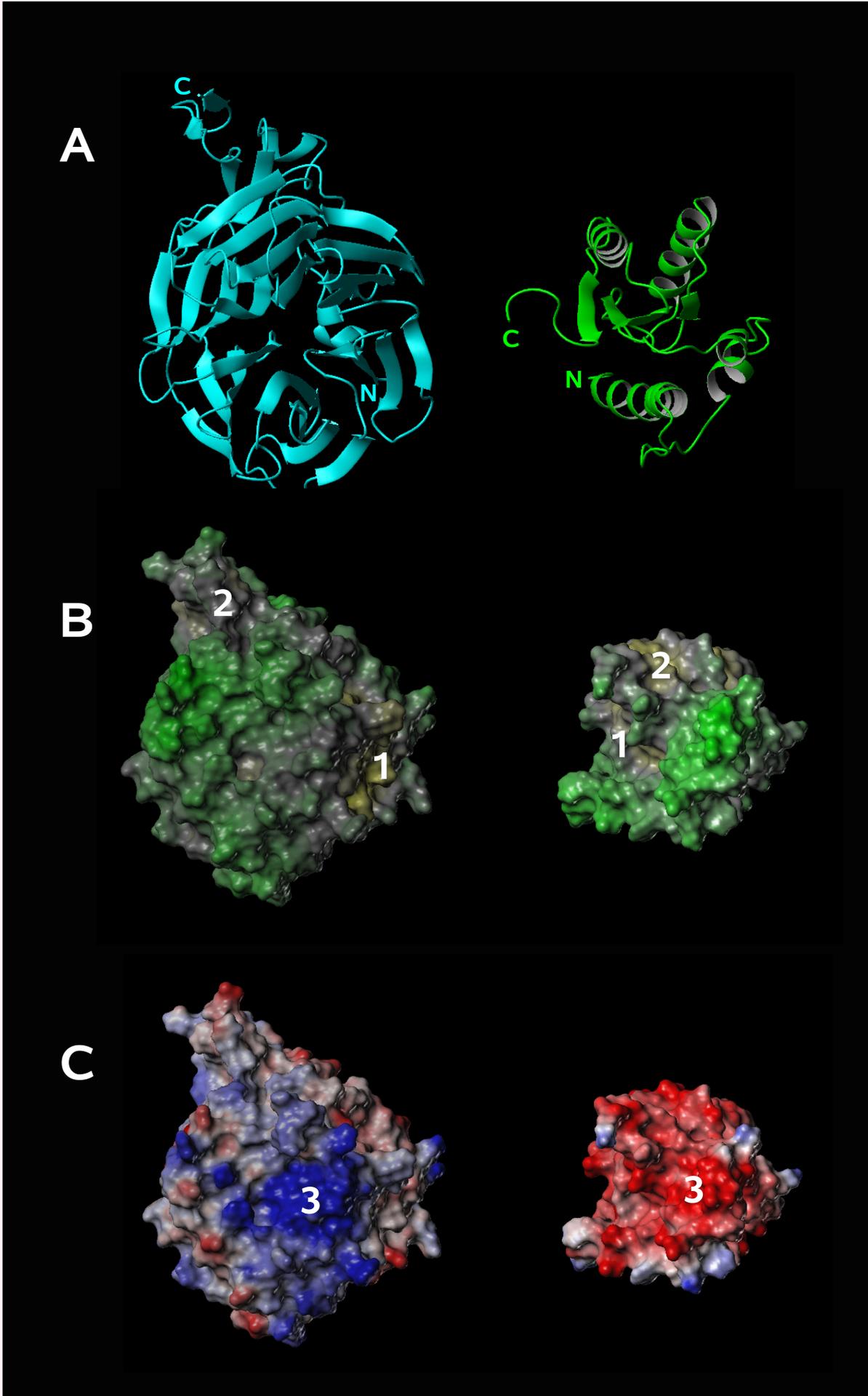


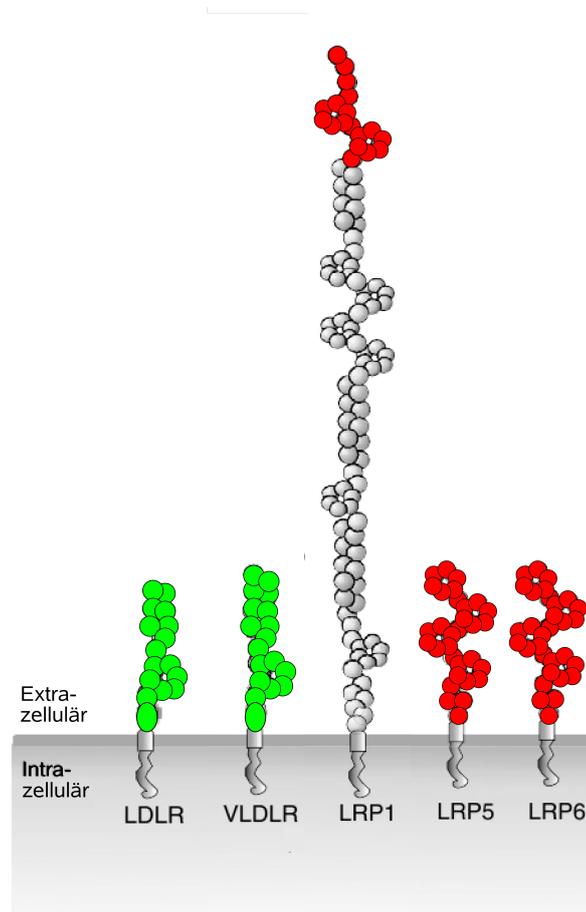
Offen bleibt die Frage, aus welchen Gründen  $\beta$ -Propeller mit einem positiv geladenen Zentrum MESD zur Faltung benötigen, während solche mit azidem Zentrum sich anscheinend ohne die Unterstützung von MESD falten. Wie aus Abbildung 4.7 ersichtlich ist, bindet MESD bevorzugt an Gruppierungen von mehreren  $\beta$ -Propellern. Die Faltung einzelstehender Propellerdomänen scheint weniger abhängig von MESD zu sein. Sekretionsversuche an unterschiedlich langen Rezeptorfragmenten in Abwesenheit bzw. Gegenwart von MESD bestätigen dieses Ergebnis (Abb. 5.5). Die Faltung der extrazellulären Bereiche des LRP5 und LRP6 Rezeptors, welche aus einer Gruppe von vier Propellern bestehen, ist auf die Anwesenheit von MESD angewiesen. Das Gleiche gilt für die N-terminale Gruppe von zwei Propellern des LRP1 Rezeptors. Demgegenüber hat die Anwesenheit von MESD keinen Einfluß auf die Biosynthese der extrazellulären Bereiche des LDL-Rezeptors sowie des VLDL-Rezeptors. Die Faltung von mehreren aufeinander folgenden  $\beta$ -Propellern zu einer Gruppierung scheint ein deutlich komplexerer Vorgang zu sein als die Faltung eines einzelstehenden Propellers. Die dichte Organisation in solch einer Gruppierung erfordert womöglich gegensätzlich geladene Regionen, was die Bedeutung von  $\beta$ -Propellern mit unterschiedlich geladenen Zentren erklären würde. Gegensätzliche Ladungsschwerpunkte eines basischen Zentrums, in einem ansonst sauren  $\beta$ -Propeller, sind vermutlich die Ursache für mehr Mißfaltungen, wobei die räumliche Nähe von mehreren gleich geladenen Resten (positives Zentrum) eine zusätzliche Problematik während der Faltung darstellen dürfte. Nicht zuletzt sollte in einer Gruppierung von mehreren  $\beta$ -Propellern die korrekte Positionierung der C-terminal folgenden EGF-ähnlichen Domäne von großer Bedeutung sein. Auch dies würde die Bedeutung von MESD für die Faltung von  $\beta$ -Propellergruppierungen erklären.

---

**Abbildung 5.4 (nächste Seite):****vorgeschlagenes Model der  $\beta$ -Propeller Faltung durch MESD (Fortsetzung)**

**rechts:** MESD45-184 **links:** der C-terminale  $\beta$ -Propeller des LRP5 Rezeptors **A:** Ribbondarstellung **B:** lipophiles Oberflächenpotential hydrophil→hydrophob (grün-grau-gelb) **C:** elektrostatisches Oberflächenpotential acid (rot), basisch (blau). **1:** hydrophobe Kontakte zwischen dem ersten Propellerblatt, der MESD-Helix  $\alpha 1$  sowie dem  $\beta$ -Faltblatt von MESD. **2:** hydrophobe Kontakte zwischen EGF-ähnlicher Domäne und den MESD-Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$ . **3:** polare Wechselwirkungen zwischen basischen Resten im Propellerzentrum und aziden Resten in  $\alpha 1$  von MESD.





**Abbildung 5.5:**

**Sekretion einiger Rezeptorfragmente in Abhängigkeit von MESD**

rot markierte Rezeptorfragmente benötigen MESD zur Sekretion, grün markierte Rezeptorfragmente werden unabhängig von MESD sekretiert. Daten von Bernadette Holdener (Department of Biochemistry and Cell Biology, State University New York, New York)

## 6 Zusammenfassung

Natives MESD ist ein 195 Aminosäure langes, im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiertes Protein. Seine Bedeutung ergibt sich aus der Funktion als Chaperon für Rezeptoren der “Low Density Lipoprotein Receptor” (LDLR)-Familie. LDLR-Rezeptoren sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt, darunter Endozytose, Signaltransduktion sowie der zelluläre Transport verschiedener Membranproteine. Über den WNT-Signalweg sind sie beispielsweise mit der Embryonalentwicklung und daraus resultierend mit einer Vielzahl von Krankheitssyndromen verknüpft. Aus ihrer Funktion beim Transport des “Amyloid Precursor Proteins” (APP) ergibt sich ihre Bedeutung im Zusammenhang mit der Alzheimer Erkrankung. Innerhalb der Rezeptoren der LDLR-Familie unterstützt MESD die Faltung bzw. den intrazellulären Transport eines Motivs, bestehend aus einem sechsblättrigen  $\beta$ -Propeller und der C-terminal folgenden EGF-ähnlichen Domäne.

Primäres Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der atomaren Struktur von MESD in Lösung mittels NMR-Spektroskopie. Aufgrund erheblicher flexibler Regionen innerhalb des nativen Proteins mußte der strukturierte Bereich eingegrenzt werden. Hierzu wurden sechs unterschiedlich lange MESD-Proteine generiert und mittels  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektroskopie auf ihren Strukturierungsgrad überprüft, wodurch eine sowohl hochkonservierte als auch strukturierte Kernregion zwischen den Resten K43-K184 identifiziert werden konnte. Die Reste T104-E177 falten sich zu einer in der Natur weitverbreiteten Domäne mit  $\beta - \alpha - \beta - \beta - \alpha - \beta$ -Faltung. Trotz der hohen strukturellen Ähnlichkeit in vielen Proteinen zeichnet sich die Kerndomäne von MESD durch eine erstaunlich geringe Sequenzhomologie aus. Funktionelle Analogien zwischen MESD und Proteinen ähnlicher Struktur sind nicht erkennbar. Die wechselnde Flexibilität innerhalb des konservierten Kernbereichs von MESD zwischen den Resten D45 und K184 verhinderte eindeutige NOE-Signalzuordnungen zwischen der MESD-Kerndomäne und den Resten 45 bis 103. Jedoch konnten aufgrund charakteristischer NOE-Kopplungsmuster  $\alpha$ -helicale Sekundärstrukturelemente zwischen den Resten Y49 und G70 sowie zwischen I82 und D88 bestätigt werden. Durch den Vergleich der

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von MESD89-184 und MESD45-184 konnten die Signale der Kerndomäne identifiziert werden, die im erweiterten Protein aufgrund einer veränderten chemischen Umgebung verschoben sind. Die entsprechenden Reste sollten sich im Interaktionsbereich der Kerndomäne zu den Resten 45-103 befinden. Auf Basis dieser Daten sowie möglicher Zuordnungen der mehrdeutigen NOE-Abstandsrandbedingungen, ergänzt durch Orientierungsdaten auf Basis von "Residual Dipolar Couplings" (RDC's), wurde ein Modell einer möglichen globulären Struktur von MESD45-184 berechnet. Entsprechend dieses Modells faltet sich der Kernbereich von MESD zu einem viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt mit 5 beidseitig lokalisierten  $\alpha$ -Helices. Die Akkumulation negativ geladener Reste in der N-terminalen Helix bewirkt eine stark azide Oberfläche. Desweiteren besitzt der MESD-Kernbereich hydrophobe Oberflächenbereiche. Wie durch Vergleich der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren der untersuchten MESD-Konstrukte gezeigt werden konnte, interagiert der N-terminale Bereich von MESD bis K44 nicht mit der Kernstruktur. Demgegenüber bindet der C-Terminus ab K184 an das Kernprotein, wodurch einige hydrophobe Oberflächenbereiche vermutlich abgedeckt werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit befaßte sich mit einer weiterführenden funktionellen Charakterisierung von MESD. Bisherige Arbeiten betrachteten ausschließlich die Bindung zwischen MESD und dem nativen  $\beta$ -Propeller-EGF-Motiv. Diese Interaktion, für die sich der unstrukturierte C-terminale Bereich von MESD ab K184 als notwendig erwies, könnte die Rezeptoren innerhalb der Zelle vor Aggregatbildung schützen. Diese Interaktion liefert keine Informationen bezüglich einer Unterstützung der Faltung des  $\beta$ -Propeller-EGF-Motivs durch MESD. Zur näheren Betrachtung dieser Thematik konzentrierte sich diese Arbeit auf die Interaktion zwischen MESD und ungefaltetem Rezeptorprotein. Hierzu wurde eine Peptidbibliothek erstellt. Die Sequenzen aller bekannter humaner Rezeptoren der LDLR-Familie wurden als Peptide einer Länge von 16 Aminosäuren mit jeweils sechs überlappenden Resten auf einer Zellulose Membran synthetisiert und im Anschluß mit sechs unterschiedlich langen MESD-Konstrukten inkubiert. Es konnte gezeigt werden, daß nur das gesamte Protein (MESD30-224) spezifisch mit den Rezeptorfragmenten interagiert. MESD bindet bevorzugt an Peptide innerhalb des  $\beta$ -Propeller-EGF-Motivs. Die am besten bindenden Peptide lagen im ersten, dritten und letzten Propellerblatt sowie in der folgenden EGF-ähnlichen Domäne. Die statistische Auswertung der Sequenzen von Rezeptorfragmenten mit Bindungsaktivität zu MESD, ergab ein Erkennungsmotiv von MESD, bestehend aus einem Kernbereich der hydrophoben Reste Leucin, Isoleucin, Alanin, Valin und

Phenylalanin, welcher durch einige basische Reste unterbrochen ist. Die Bedeutung positiv geladener Reste innerhalb des Bindungsmotivs konnte auch dadurch bestätigt werden, daß Fragmente von Propellern mit einem positiv geladenen Zentrum deutlich mehr MESD binden als solche, die sich zu einem aziden Propeller falten. Insbesondere in Gruppen organisierte  $\beta$ -Propeller besitzen basische Oberflächenbereiche, was die Bedeutung von MESD für die Faltung dieser strukturell komplizierten Aggregate unterstreicht. Demgegenüber sind  $\beta$ -Propeller mit einem aziden Zentrum, welche in den Rezeptoren häufig einzelstehend vorkommen, weitgehend unabhängig von MESD. Diese Ergebnisse konnten durch *in vivo* Studien (Department of Biochemistry and Cell Biology, State University New York, New York) bestätigt werden. Mittels dieser Ergebnisse konnte abschließend ein Faltungsmechanismus des  $\beta$ -Propeller-EGF-Motivs durch MESD diskutiert werden. Die hydrophoben Propeller Bereiche des naszierenden Rezeptors binden an MESD. Im Anschluß interagieren die basischen C-terminalen MESD-Reste mit sauren Propellerregionen. Infolge dieser "Schalterfunktion" des C-Terminus von MESD werden weitere hydrophobe Oberflächenbereiche von MESD exponiert und können mit der EGF-ähnlichen Domäne interagieren. Auf Basis von polaren Wechselwirkungen "wickelt" sich das positiv geladene Propellerzentrum um die azide MESD-Helix  $\alpha 1$ . Nach erfolgtem Ringschluß trennt sich der C-Terminus von MESD vom Propeller und bedeckt wieder die hydrophoben Bereiche der MESD-Kernregion, wodurch sich das native  $\beta$ -Propeller-EGF-Motiv von MESD löst.

# Literaturverzeichnis

- [1] O.M. Andersen, J. Reiche, V. Schmidt, M. Gotthardt, R. Spoelgen, J. Behlke, C.A.F. von Arnim, T. Breiderhoff, P. Jansen, X. Wu, K.R. Bales, R. Cappai, C.L. Masters, J. Gliemann, E.J. Mufson, B.T. Hyman, S.M. Paul, A. Nykjaer, und T.E. Willnow. Neuronal sorting protein-related receptor sorla/lr11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38):13461–13466, September 2005.
- [2] O.M. Andersen, V. Schmidt, R. Spoelgen, J. Gliemann, J. Behlke, D. Galatis, W.J. McKinstry, M.W. Parker, C.L. Masters, B.T. Hyman, R. Cappai, und T.E. Willnow. Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor sorla/lr11. *Biochemistry*, 45(8):2618–2628, Februar 2006.
- [3] C.B. Anfinsen. Principles that govern fold of protein chains. *Science*, 181:223–230, 1973.
- [4] R. Barraclough und R.J. Ellis. Protein-synthesis in chloroplasts .9. assembly of newly-synthesized large subunits into ribulose biphosphate carboxylase in isolated intact pea-chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 608(1):19–31, 1980.
- [5] R.P. Beckmann, L.A. Mizzen, und W.J. Welch. Interaction of hsp-70 with newly synthesized proteins - implications for protein folding and assembly. *Science*, 248(4957):850–854, Mai 1990.
- [6] M. Beeby, B.D. O’Connor, C. Ryttersgaard, D.R. Boutz, L.J. Perry, und T.O. Yeates. The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles. *Plos Biology*, 3(9):1549–1558, September 2005.
- [7] Uwe Beffert, Peggy C Stolt, und Joachim Herz. Functions of lipoprotein receptors in neurons. *J Lipid Res*, 45(3):403–409, Mar 2004.
- [8] J.D. Bernal und D. Crowfoot. X-ray photographs of crystalline pepsine. *Nature*, 133:794–795, 1934.

- [9] A. Bhattacharya, R. Tejero, und G.T. Montelione. Evaluating protein structures determined by structural genomics consortia., Dezember 2006.
- [10] Kym M Boycott, Shauna Flavelle, Alexandre Bureau, Hannah C Glass, T. Mary Fujiwara, Elaine Wirrell, Krista Davey, Albert E Chudley, James N Scott, D. Ross McLeod, und Jillian S Parboosingh. Homozygous deletion of the very low density lipoprotein receptor gene causes autosomal recessive cerebellar hypoplasia with cerebral gyral simplification. *Am J Hum Genet*, 77(3):477–483, Sep 2005.
- [11] J. Brennan, C.C. Lu, D.P. Norris, T.A. Rodriguez, R.S.P. Beddington, und E.J. Robertson. Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo. *Nature*, 411(6840):965–969, Juni 2001.
- [12] A T Brünger, P D Adams, G M Clore, W L DeLano, P Gros, R W Grosse-Kunstleve, J S Jiang, J Kuszewski, M Nilges, N S Pannu, R J Read, L M Rice, T Simonson, und G L Warren. Crystallography & nmr system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 54(Pt 5):905–921, Sep 1998.
- [13] J.A. Cam, C.V. Zerbinatti, Y.H. Li, und G.J. Bu. Rapid endocytosis of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates cell surface distribution and processing of the beta-amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15):15464–15470, April 2005.
- [14] S. Cannon, P. Wang, und H. Roy. Inhibition of ribulose biphosphate carboxylase assembly by antibody to a binding-protein. *Journal of Cell Biology*, 103(4):1327–1335, Oktober 1986.
- [15] M. Carter, X. Chen, B. Slowinska, S. Minnerath, S. Glickstein, L. Shi, F. Campagne, H. Weinstein, und M.E. Ross. Crooked tail (cd) model of human folate-responsive neural tube defects is mutated in wnt coreceptor lipoprotein receptor-related protein 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36):12843–12848, September 2005.
- [16] W.J. Chirico, M.G. Waters, und G. Blobel. 70k heat-shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, 332(6167):805–810, April 1988.
- [17] G M Clore, A M Gronenborn, und N Tjandra. Direct structure refinement against residual dipolar couplings in the presence of rhombicity of unknown magnitude. *J Magn Reson*, 131(1):159–162, Mar 1998.

- [18] A. Coppo, A. Manzi, J.F. Pulitzer, und TAKAHASH.H. Abortive bacteriophage-t4 head assembly in mutants of escherichia-coli. *Journal of Molecular Biology*, 76(1):61–&, 1973.
- [19] G. Cornilescu, F. Delaglio, und A. Bax. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *Journal of Biomolecular Nmr*, 13(3):289–302, März 1999.
- [20] J. Culi und R.S. Mann. Boca, an endoplasmic reticulum protein required for wingless signaling and trafficking of ldl receptor family members in drosophila. *Cell*, 112(3):343–354, Februar 2003.
- [21] J. Culi, T.A. Springer, und R.S. Mann. Boca-dependent maturation of beta-propeller/egf modules in low-density lipoprotein receptor proteins. *Embo Journal*, 23(6):1372–1380, März 2004.
- [22] R.J. Deshaies, B.D. Koch, M. Wernerwashburne, E.A. Craig, und R. Schekman. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature*, 332(6167):800–805, April 1988.
- [23] K.A. Dill und H.S. Chan. From levinthal to pathways to funnels. *Nature Structural Biology*, 4(1):10–19, Januar 1997.
- [24] C.M. Dobson, R.J. Ellis, und A.R. Fersht. Protein misfolding and disease - preface. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 356(1406):129–131, Februar 2001.
- [25] C.M. Dobson und M. Karplus. The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 9:92–101, 1999.
- [26] H. Jane Dyson und Peter E Wright. Elucidation of the protein folding landscape by nmr. *Methods Enzymol*, 394:299–321, 2005.
- [27] R.J. Ellis und S.M. Hemmingsen. Molecular chaperones - proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends in Biochemical Sciences*, 14(8):339–342, August 1989.
- [28] N A Farrow, R Muhandiram, A U Singer, S M Pascal, C M Kay, G Gish, S E Shoelson, T Pawson, J D Forman-Kay, und L E Kay. Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed src homology 2 domain studied by 15n nmr relaxation. *Biochemistry*, 33(19):5984–6003, May 1994.

- [29] G. Fischer, H. Bang, und C. Mech. Detection of enzyme catalysis for cis-trans-isomerization of peptide-bonds using proline-containing peptides as substrates. *Biomedica Biochimica Acta*, 43(10):1101–1111, 1984.
- [30] G.C. Flynn, J. Pohl, M.T. Flocco, und J.E. Rothman. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone bip. *Nature*, 353(6346):726–730, Oktober 1991.
- [31] Guanghua Gao, Jason G Williams, und Sharon L Campbell. Protein-protein interaction analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Methods Mol Biol*, 261:79–92, 2004.
- [32] CP Georgopoulos, R.W. Hendrix, S.R. Casjens, und A.D. Kaiser. Host participation in bacteriophage-lambda head assembly. *Journal of Molecular Biology*, 76(1):45–&, 1973.
- [33] J. Gitschier, B. Moffat, D. Reilly, W.I. Wood, und W.J. Fairbrother. Solution structure of the fourth metal-binding domain from the menkes copper-transporting atpase. *Nature Structural Biology*, 5(1):47–54, Januar 1998.
- [34] T.D. Goddard und D.G. Kneller. Sparky (computer program). university of california, san francisco., 2002.
- [35] R.F. Goldberger, C.J. Epstein, und C.B. Anfinsen. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 238(2):628–&, 1963.
- [36] J. L. Goldstein, H. H. Hobbs, und M. S. Brown. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, Kapitel Familial hypercholesterolemia, Seiten 2863–2913. New York: McGraw-Hill, 2001.
- [37] P. Goloubinoff, A.A. Gatenby, und G.H. Lorimer. Groe heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose bisphosphate carboxylase oligomers in escherichia-coli. *Nature*, 337(6202):44–47, Januar 1989.
- [38] Y.Q. Gong, R.B. Slee, N. Fukai, G. Rawadi, S. Roman-Roman, A.M. Reginato, H.W. Wang, T. Cundy, F.H. Glorieux, D. Lev, M. Zacharin, K. Oexle, J. Marcelino, W. Suwairi, S. Heeger, G. Sabatakos, S. Apte, W.N. Adkins, J. Allgrove, M. Arslan-Kirchner, J.A. Batch, P. Beighton, G.C.M. Black, R.G. Boles, L.M. Boon, C. Borrone, H.G. Brunner, G.F. Carle, B. Dallapiccola, A. De Paepe, B. Floege, M.L. Halfhide, B. Hall, R.C. Hennekam, T. Hirose, A. Jans, H. Juppner, C.A. Kim, K. Keppler-Noreuil, A. Kohlschuetter, D. LaCombe, M. Lambert, E. Lemyre,

- T. Letteboer, L. Peltonen, R.S. Ramesar, M. Romanengo, H. Somer, E. Steichen-Gersdorf, B. Steinmann, B. Sullivan, A. Superti-Furga, W. Swoboda, M.J. van den Boogaard, V. Van Hul, M. Vikkula, M. Votruba, B. Zabel, T. Garcia, R. Baron, B.R. Olsen, und M.L. Warman. Ldl receptor-related protein 5 (lrp5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 107(4):513–523, November 2001.
- [39] S. Grzesiek und A. Bax. Correlating backbone amide and side-chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance nmr. *Journal of the American Chemical Society*, 114(16):6291–6293, Juli 1992.
- [40] S. Grzesiek und A. Bax. An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins. *Journal of Magnetic Resonance*, 99(1):201–207, August 1992.
- [41] P. Guentert. Automated nmr protein structure calculation with cyana. In A.K. Downing, Herausgeber, *Methods in molecular Biology*, Seiten 353–378. Humana Press, 2004.
- [42] I.G. Haas und M. Wabl. Immunoglobulin heavy-chain binding-protein. *Nature*, 306(5941):387–389, 1983.
- [43] M R Hansen, L Mueller, und A Pardi. Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions. *Nat Struct Biol*, 5(12):1065–1074, Dec 1998.
- [44] X. He, M. Semenov, K. Tamai, und X. Zeng. Ldl receptor-related proteins 5 and 6 in wnt/beta-catenin signaling: Arrows point the way. *Development*, 131(8):1663–1677, April 2004.
- [45] J. Hermans und G. Acampora. Reversible denaturation of spermwhale myoglobin. *Federation Proceedings*, 25(2P1):412–&, 1966.
- [46] Torsten Herrmann, Peter Güntert, und Kurt Wüthrich. Protein nmr structure determination with automated noe assignment using the new software candid and the torsion angle dynamics algorithm dyana. *J Mol Biol*, 319(1):209–227, May 2002.
- [47] Torsten Herrmann, Peter Güntert, und Kurt Wüthrich. Protein nmr structure determination with automated noe-identification in the noesy spectra using the new software atnos. *J Biomol NMR*, 24(3):171–189, Nov 2002.
- [48] L.E. Hightower. Cultured animal-cells exposed to amino-acid-analogs or

- puromycin rapidly synthesize several polypeptides. *Journal of Cellular Physiology*, 102(3):407–427, 1980.
- [49] L. Holm und C. Sander. Protein-structure comparison by alignment of distance matrices. *Journal of Molecular Biology*, 233(1):123–138, September 1993.
- [50] B. Honig, A. Ray, und C. Levinthal. Conformational flexibility and protein folding - rigid structural fragments connected by flexible joints in subtilisin bpn. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(6):1974–1978, 1976.
- [51] J.C. Hsieh, L. Lee, L.Q. Zhang, S. Wefer, K. Brown, C. DeRossi, M.E. Wines, T. Rosenquist, und B.C. Holdener. Mesd encodes an lrp5/6 chaperone essential for specification of mouse embryonic polarity. *Cell*, 112(3):355–367, Februar 2003.
- [52] S G Hyberts, M S Goldberg, T F Havel, und G Wagner. The solution structure of eglin c based on measurements of many noes and coupling constants and its comparison with x-ray structures. *Protein Sci*, 1(6):736–751, Jun 1992.
- [53] H Jeon und S C Blacklow. An intramolecular spin of the ldl receptor beta propeller. *Structure*, 11(2):133–136, Feb 2003.
- [54] H. Jeon, W.Y. Meng, J. Takagi, M.J. Eck, T.A. Springer, und S.C. Blacklow. Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the ldl receptor ywtd-egf domain pair. *Nature Structural Biology*, 8(6):499–504, Juni 2001.
- [55] Sibel Kantarci, Lihadh Al-Gazali, R. Sean Hill, Dian Donnai, Graeme C M Black, Eric Bieth, Nicolas Chassaing, Didier Lacombe, Koen Devriendt, Ahmad Teebi, Maria Loscertales, Caroline Robson, Tianming Liu, David T MacLaughlin, Kristin M Noonan, Meaghan K Russell, Christopher A Walsh, Patricia K Donahoe, und Barbara R Pober. Mutations in lrp2, which encodes the multiligand receptor megalin, cause donnai-barrow and facio-oculo-acoustico-renal syndromes. *Nat Genet*, 39(8):957–959, Aug 2007.
- [56] O.G. Kelly, K.I. Pinson, und W.C. Skarnes. The wnt co-receptors lrp5 and lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development*, 131(12):2803–2815, Juni 2004.
- [57] V. Koduri und S.C. Blacklow. Requirement for natively unstructured regions of mesoderm development candidate 2 in promoting low-density lipoprotein receptor-related protein 6 maturation. *Biochemistry*, 46(22):6570–6577, Juni 2007.
- [58] D. Kohls, T. Sulea, E.O. Purisima, R.E. MacKenzie, und A. Vrieling. The crystal structure of the formiminotransferase domain of formiminotransferase-

- cyclodeaminase: implications for substrate channeling in a bifunctional enzyme. *Structure*, 8(1):35–46, Januar 2000.
- [59] H C Kung, K Y Wang, I Goljer, und P H Bolton. Magnetic alignment of duplex and quadruplex dnas. *J Magn Reson B*, 109(3):323–325, Dec 1995.
- [60] R.A. Laskey, B.M. Honda, A.D. Mills, und J.T. Finch. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to dna. *Nature*, 275(5679):416–420, 1978.
- [61] Joseph H. Lee, Rong Cheng, Nicole Schupf, Jennifer Manly, Rafael Lantigua, Yaakov Stern, Ekaterina Rogaeva, Yosuke Wakutani, Lindsay Farrer, Peter St. George-Hyslop, und Richard Mayeux. The association between genetic variants in sor11 and alzheimer disease in an urban, multiethnic, community-based cohort. *Arch. Neurol.*, 64:501–506, 2007.
- [62] I Letunic, R R Copley, B Pils, S Pinkert, J Schultz, und P Bork. Smart 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue):257–260, Jan 2006.
- [63] C Levinthal. Are there pathways for protein folding. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 65(1):44–&, 1968.
- [64] Y.H. Li, J.L. Chen, W.Y. Lu, L.M. McCormick, J.J. Wang, und G.J. Bu. Mesd binds to mature ldl-receptor-related protein-6 and antagonizes ligand binding. *Journal of Cell Science*, 118(22):5305–5314, November 2005.
- [65] J.P. Linge. *New methods for automated NOE assignment and NMR structure calculation*. Buch auf Anfrage, 2000.
- [66] J.P. Linge, M.A. Williams, C.A.E.M. Spronk, A.M.J.J. Bonvin, und M. Nilges. Refinement of protein structures in explicit solvent. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 50(3):496–506, Februar 2003.
- [67] Randall D Little, John P Carulli, Richard G Del Mastro, Josée Dupuis, Mark Osborne, Colleen Folz, Susan P Manning, Pamela M Swain, Shan-Chuan Zhao, Brenda Eustace, Michelle M Lappe, Lia Spitzer, Susan Zweier, Karen Braunschweiger, Youssef Benchekroun, Xintong Hu, Ronald Adair, Linda Chee, Michael G FitzGerald, Craig Tulig, Anthony Caruso, Nia Tzellas, Alicia Bawa, Barbara Franklin, Shannon McGuire, Xavier Nogues, Gordon Gong, Kristina M Allen, Anthony Anisowicz, Arturo J Morales, Peter T Lomedico, Susan M Recker, Paul Van Eerdewegh, Robert R Recker, und Mark L Johnson. A mutation in the ldl

- receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet*, 70(1):11–19, Jan 2002.
- [68] C. X. Liu, S. Musco, N. M. Lisitsina, E. Forgacs, J. D. Minna, und N. A. Lisitsyn. Lrp-dit, a putative endocytic receptor gene, is frequently inactivated in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res*, 60(7):1961–1967, Apr 2000.
- [69] P.T. Liu, M. Wakamiya, M.J. Shea, U. Albrecht, R.R. Behringer, und A. Bradley. Requirement for *wnt3* in vertebrate axis formation. *Nature Genetics*, 22(4):361–365, August 1999.
- [70] Arya Mani, Jayaram Radhakrishnan, He Wang, Alaleh Mani, Mohammad-Ali Mani, Carol Nelson-Williams, Khary S. Carew, Shrikant Mane, Hossein Najmabadi, Dan Wu, und Richard P. Lifton. Lrp6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science*, 315:1278–1282, 2007.
- [71] W J Metzler, K L Constantine, M S Friedrichs, A J Bell, E G Ernst, T B Lavoie, und L Mueller. Characterization of the three-dimensional solution structure of human profilin: 1h, 13c, and 15n nmr assignments and global folding pattern. *Biochemistry*, 32(50):13818–13829, Dec 1993.
- [72] A.P. Minton. Confinement as a determinant of macromolecular structure and reactivity. *Biophysical Journal*, 63(4):1090–1100, Oktober 1992.
- [73] A.P. Minton. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14):10577–10580, April 2001.
- [74] Mineyuki Mizuguchi, Gerard J Kroon, Peter E Wright, und H. Jane Dyson. Folding of a beta-sheet protein monitored by real-time nmr spectroscopy. *J Mol Biol*, 328(5):1161–1171, May 2003.
- [75] G.T. Montelione, B.A. Lyons, S.D. Emerson, und M. Tashiro. An efficient tripple resonance experiment using carbon-13 isotropic mixing for determining sequence-specific resonance assignments of isotropically enriched proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 114:6291–6293, 1992.
- [76] A L Morris, M W MacArthur, E G Hutchinson, und J M Thornton. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*, 12(4):345–364, Apr 1992.
- [77] G.A. Morris und R. Freeman. Enhancement of nuclear magnetic-resonance signals by polarization transfer. *Journal of the American Chemical Society*, 101(3):760–762, 1979.

- [78] S. Neal, A.M. Nip, H.Y. Zhang, und D.S. Wishart. Rapid and accurate calculation of protein h-1, c-13 and n-15 chemical shifts. *Journal of Biomolecular Nmr*, 26(3):215–240, Juli 2003.
- [79] H.R.B. Pelham. Speculations on the functions of the major heat-shock and glucose-regulated proteins. *Cell*, 46(7):959–961, September 1986.
- [80] G Pintacuda und G Otting. Identification of protein surfaces by nmr measurements with a paramagnetic gd(iii) chelate. *J Am Chem Soc*, 124(3):372–373, Jan 2002.
- [81] T.A. Ramelot, S.S. Ni, S. Goldsmith-Fischman, J.R. Cort, B. Honig, und M.A. Kennedy. Solution structure of vibrio cholerae protein vc0424: A variation of the ferredoxin-like fold. *Protein Science*, 12(7):1556–1561, Juli 2003.
- [82] Ekaterina Rogaeva, Yan Meng, Joseph H Lee, Yongjun Gu, Toshitaka Kawarai, Fanggeng Zou, Taiichi Katayama, Clinton T Baldwin, Rong Cheng, Hiroshi Hasegawa, Fusheng Chen, Nobuto Shibata, Kathryn L Lunetta, Raphaelle Pardossi-Piquard, Christopher Bohm, Yosuke Wakutani, L. Adrienne Cupples, Karen T Cuenco, Robert C Green, Lorenzo Pinessi, Innocenzo Rainero, Sandro Sorbi, Amalia Bruni, Ranjan Duara, Robert P Friedland, Rivka Inzelberg, Wolfgang Hampe, Hideaki Bujo, You-Qiang Song, Olav M Andersen, Thomas E Willnow, Neill Graff-Radford, Ronald C Petersen, Dennis Dickson, Sandy D Der, Paul E Fraser, Gerold Schmitt-Ulms, Steven Younkin, Richard Mayeux, Lindsay A Farrer, und Peter St George-Hyslop. The neuronal sortilin-related receptor sorl1 is genetically associated with alzheimer disease. *Nat Genet*, 39(2):168–177, Feb 2007.
- [83] A.C. Rosenzweig, D.L. Huffman, M.Y. Hou, A.K. Wernimont, R.A. Pufahl, und T.V. O’Halloran. Crystal structure of the atx1 metallochaperone protein at 1.02 angstrom resolution. *Structure*, 7(6):605–617, Juni 1999.
- [84] M. Sattler, J. Schleucher, und C. Griesinger. Heteronuclear multidimensional nmr experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 34(2):93–158, März 1999.
- [85] D J Schuller, G A Grant, und L J Banaszak. The allosteric ligand site in the vmax-type cooperative enzyme phosphoglycerate dehydrogenase. *Nat Struct Biol*, 2(1):69–76, Jan 1995.
- [86] J Schultz, F Milpetz, P Bork, und C P Ponting. Smart, a simple modular

- architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11):5857–5864, May 1998.
- [87] C.D. Schwieters, J.J. Kuszewski, N. Tjandra, und G.M. Clore. The xplor-nih nmr molecular structure determination package. *Journal of Magnetic Resonance*, 160(1):65–73, Januar 2003.
- [88] M. Sinagra, D. Verrier, D. Frankova, K.M. Korwek, J. Blahos, E.J. Weeber, O.J. Manzoni, und P. Chavis. Reelin, very-low-density lipoprotein receptor, and apolipoprotein e receptor 2 control somatic nmda receptor composition during hippocampal maturation in vitro. *Journal of Neuroscience*, 25(26):6127–6136, Juni 2005.
- [89] Itaru Sonoda, Issei Imoto, Jun Inoue, Tatsuhiro Shibata, Yutaka Shimada, Koei Chin, Masayuki Imamura, Teruo Amagasa, Joe W Gray, Setsuo Hirohashi, und Johji Inazawa. Frequent silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1b (lrp1b) expression by genetic and epigenetic mechanisms in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 64(11):3741–3747, Jun 2004.
- [90] T.A. Springer. An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *Journal of Molecular Biology*, 283(4):837–862, November 1998.
- [91] R C Stevens. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Structure*, 8(9):177–185, Sep 2000.
- [92] N Tjandra und A Bax. Direct measurement of distances and angles in biomolecules by nmr in a dilute liquid crystalline medium. *Science*, 278(5340):1111–1114, Nov 1997.
- [93] N Tjandra, J G Omichinski, A M Gronenborn, G M Clore, und A Bax. Use of dipolar  $1\text{h}-15\text{n}$  and  $1\text{h}-13\text{c}$  couplings in the structure determination of magnetically oriented macromolecules in solution. *Nat Struct Biol*, 4(9):732–738, Sep 1997.
- [94] T E Willnow, S A Armstrong, R E Hammer, und J Herz. Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(10):4537–4541, May 1995.
- [95] T E Willnow, A Hammes, und S Eaton. Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance. *Development*, 134(18):3239–3249, Sep 2007.

- [96] M.E. Wines, L. Lee, M.S. Katari, L.Q. Zhang, C. DeRossi, Y. Shi, S. Perkins, M. Feldman, W.R. McCombie, und B.C. Holdener. Identification of mesoderm development (mesd) candidate genes by comparative mapping and genome sequence analysis. *Genomics*, 72(1):88–98, Februar 2001.
- [97] P.G. Wolynes, J.N. Onuchic, und D. Thirumalai. Navigating the folding routes. *Science*, 267(5204):1619–1620, März 1995.
- [98] Y.B. Xu, P.D. Carr, P. Clancy, M. Garcia-Dominguez, K. Forchhammer, F. Florencio, N.T. de Marsac, S.G. Vasudevan, und D.L. Ollis. The structures of the pii proteins from the cyanobacteria *synechococcus* sp pcc 7942 and *synechocystis* sp pcc 6803. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 59:2183–2190, Dezember 2003.
- [99] Y.H. Zhang, Y. Wang, X.F. Li, J.H. Zhang, J.H. Mao, Z. Li, J. Zheng, L. Li, S. Harris, und D.Q. Wu. The lrp5 high-bone-mass g171v mutation disrupts lrp5 interaction with mesd. *Molecular and Cellular Biology*, 24(11):4677–4684, Juni 2004.
- [100] S.B. Zimmerman und A.P. Minton. Macromolecular crowding - biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22:27–65, 1993.
- [101] S.B. Zimmerman und S.O. Trach. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *escherichia-coli*. *Journal of Molecular Biology*, 222(3):599–620, Dezember 1991.
- [102] R. Zimmermann, M. Sagstetter, M.J. Lewis, und H.R.B. Pelham. 70-kilodalton heat-shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of m13 procoat protein into microsomes. *Embo Journal*, 7(9):2875–2880, September 1988.