

**Strukturanalyse eines aminoterminalen Fragments
des neuronalen Zelladhäsionsproteins
Axonin-1 aus dem Huhn**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Universität Konstanz

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Jörg Freigang
aus Rheda-Wiedenbrück

Konstanz 1999

Dissertation der Universität Konstanz

Referenten: Prof. Dr. Wolfram Welte

Prof. Dr. Claudia Stürmer

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Februar 2000

1	Einleitung	7
1.1	Informationsübertragung durch Neuronen	7
1.2	Zielfindung wachsender Axone	8
1.3	Neuronale Zelloberflächenproteine aus der Ig/FnIII-Familie.....	9
1.4	Das neuronale Zelladhäsionsprotein Axonin-1	10
1.5	Der Greek-Key-Superfold.....	11
1.5	Klassifizierung von Ig-Domänen	12
1.6	Methoden zur Strukturbestimmung von Proteinen	14
1.7	Ziele der Arbeit	16
2	Materialien und Geräte	17
2.1	Chemikalien	17
2.1.1	Allgemeine Chemikalien	17
2.2	Laborgeräte und Arbeitsmaterialien	17
2.2.1	Schwermetallverbindungen	18
2.3	Computer.....	18
2.4	Zellkulturmedien	19
2.5	Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i>	19
2.6	Kalter osmotischer Schock.....	19
2.7	Reinigungs-, Chromatographie- und Rückfaltungspuffer.....	20
2.8	Kristallisationslösungen	20
2.9	Chromatographiesäulen und -materialien	20
2.10	SDS-PAGE	21
3	Methoden	22
3.1	Isolierung von Ax1Ig1-4 aus Myelomazellen.....	22
3.1.1	Immunoaffinitätschromatographie.....	22
3.1.2	Schonender Papainverdau.....	22
3.1.2	Anionenaustauschchromatographie (IEC).....	22
3.2	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	23
3.3	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	23
3.4	Isolierung von Ax1Ig1-4 aus dem Periplasma.....	23
3.4.1	Zellaufzucht.....	23
3.4.2	Kalter osmotischer Schock	24
3.4.3	Ultrafiltration und Dialyse.....	24
3.4.4	IMAC.....	24
3.5	Isolierung von Ax1Ig1-4 aus dem Cytosol.....	24
3.5.1	Zellaufzucht.....	24
3.5.2	Zellaufschluss und Zentrifugation	25
3.5.3	IMAC.....	25
3.6	Isolierung von Ax1-Ig1-4 aus Inclusion Bodies.....	25
3.6.1	Zellaufzucht.....	25
3.6.2	Isolierung der Inclusion Bodies	25
3.6.3	Solubilisierung der Inclusion Bodies.....	26
3.6.4	IMAC.....	26
3.7	<i>In vitro</i> Faltung und Reinigung von Ax1Ig1-4	26

3.7.1	Allgemeines zur In-vitro-Faltung von Proteinen	26
3.7.2	In-vitro-Faltung von Ax1Ig1-4	28
3.7.3	Ultrafiltration	28
3.7.4	Gelpermeationschromatographie (GPC).....	29
3.7.5	Ionenaustauschchromatographie (IEC).....	29
3.8	In-vitro-Faltung und Reinigung von E587-Antigen (Ig1-4).....	29
3.9	Proteinbestimmung	29
3.9.1	Proteinbestimmung nach Bradford	29
3.9.2	Proteinbestimmung durch Absorptionsspektroskopie bei 280 nm.....	30
3.10	SDS-PAGE	30
3.10.1	Probenvorbereitung.....	30
3.10.2	Probentrennung.....	30
3.10.3	Färbung der Gele	31
3.11	Dynamische Lichtstreuung.....	31
3.12	CD-Spektroskopie	31
3.13	Kristallisation	31
3.14	Derivatisierung von Kristallen	32
3.15	Schockgefrieren von Kristallen.....	33
3.16	R-Faktoren und verwandte Größen	33
3.16.1	Symmetrie-R-Faktor.....	33
3.16.2	Kristallographischer R-Faktor	33
3.16.3	Freier R-Faktor	33
3.16.4	Real Space R-Faktor und Real Space Korrelation	34
3.16.5	Phasing Power	34
3.16.6	Figure of Merit.....	34
3.17	Röntgenquellen	35
3.17.1	Die Drehanode	35
3.17.2	Synchrotronstrahlung.....	35
3.18	Image-Plate-Detektoren.....	36
3.19	Raumgruppenbestimmung und Datenreduzierung	36
3.19.1	Programmpaket Denzo/Scalepack	36
3.19.2	XDS	37
3.20	Phasenbestimmung.....	38
3.20.1	Molekularer Ersatz.....	38
3.20.2	Bestimmung der Schwermetallatompositionen	38
3.20.3	Verfeinerung der Schwermetallparameter	38
3.20.4	Iterative Solvensglättung	39
3.21	Elektronendichtekarten	39
3.21.1	Experimentelle Elektronendichtekarten.....	39
3.21.2	Differenzelektronendichtekarten	39
3.21.3	$2F_{obs}-F_{calc}$ Elektronendichtekarten.....	39
3.22	Modellbau	40
3.23	Modellverfeinerung	40
3.24	Berechnung der Buried Surface Area	40
3.25	Validierung des finalen Modells.....	40
3.26	Sequenzvergleiche	41
3.27	Überlagerungen von Proteinmodellen.....	41
3.28	Analyse der relativen Domänenbewegung	41

4	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	42
4.1	Überexpression, Reinigung und <i>in vitro</i> Faltung	42
4.1.1	Notwendigkeit einer effektiven heterologen Überexpression	42
4.1.2	Überexpression in Myelomazellen	42
4.1.3	Allgemeine Überlegungen zur Überexpression von Axonin-1 in Bakterien	42
4.1.4	Expression in Bakterien mit defektem TrxB-Gen	43
4.1.5	Expression unter Verwendung einer Signalsequenz zum Export ins Periplasma	44
4.1.6	Expression in unlöslicher Form mit anschließender <i>in vitro</i> Faltung	44
4.2	Proteinchemische Charakterisierung	45
4.2.1	SDS-PAGE und Massenspektroskopie	45
4.2.2	Gelpermeationschromatographie	46
4.2.3	Dynamische Lichtstreuung	46
4.2.4	CD-Spektroskopie	46
4.3	Kristallisation	47
4.3.1	Auffinden vorläufiger Kristallisationsbedingungen durch Screening-Verfahren	47
4.3.2	Verfeinerung der vorläufigen Kristallisationsbedingungen	48
4.4	Kristallographische Datenaufnahme und Phasenbestimmung	49
4.4.1	Aufnahme nativer Datensätze	49
4.4.2	Suche nach Schwermetallatomderivaten	50
4.4.3	SIRAS-Phasenbestimmung	50
4.4.4	Versuche zur Strukturlösung mit molekularem Ersatz	52
4.4.5	Phasenbestimmung mit multipler anomaler Streuung (MAD)	53
4.5	Modellbau und Verfeinerung	54
4.5.1	Erstellung des ersten Modells	54
4.5.2	Verfeinerung des Modells	55
4.6	Qualität des finalen Modells	56
4.6.1	Überblick über das finale Modell	56
4.6.2	R-Faktoren	56
4.6.3	Elektronendichte	57
4.6.4	Real Space Korrelation	57
4.6.5	Ramachandran Plot	58
4.7	Überblick über die Struktur	59
4.7.1	Anordnung der Immunoglobulin-Domänen	59
4.7.2	Vergleich mit anderen Proteinen	61
4.8	Strukturbeschreibung der einzelnen Domänen	61
4.8.1	Struktur motive	61
4.8.2	Klassifizierung der einzelnen Domänen	62
4.9	Intermolekulare Wechselwirkungen	63
4.9.1	Protein-Protein-Wechselwirkungen in Kristallen	63
4.9.2	Kristallkontakt in y-Richtung	64
4.9.3	Wechselwirkungen in x- und z-Richtung	65
4.10	Modell für neuronale Zelladhäsion	66
4.10.1	Das Reißverschlussmodell	66
4.10.2	Folgerungen aus dem Reißverschlussmodell	67
4.10.3	Mögliche Mechanismen zur Quervernetzung linearer Ax1Ig1-4 Anordnungen	68
4.10.4	Hinweise auf einen Induced Fit Mechanismus	68
4.10.5	Die Rolle der Glykosylierung	70
4.11	Die Struktur in verschiedenen Kristallformen	71
4.11.1	Überblick über die verschiedenen Kristallformen	71
4.11.2	Konformationsunterschiede des Proteins in den verschiedenen Raumgruppen	72
4.11.3	Unterschiede in den Kristallpackungen	76
4.12	Implikationen für die Struktur verwandter Proteine	78
4.12.1	Sequenzabstände zwischen Disulfidbrücken	78
4.12.2	Sequenzvergleich mit NgCAM und Nr-CAM	80

4.12.3	Sequenzvergleich mit menschlichem L1	81
4.13	Versuche zur Strukturaufklärung eines N-terminalen Fragments des L1-Homologen aus dem Goldfisch	82
5	<i>Zusammenfassung</i>.....	83
6	<i>Ausblick</i>.....	84
7	<i>Literatur</i>	86

Abkürzungen

CD	Circulardichroismus
DTE	Dithioerythrol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FnIII-Domäne	Fibronectin-TypIII-Domäne
GPC	Gelpermeationschromatographie
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
IEC	Ionenaustauschchromatographie
Ig-Domäne	Immunoglobulindomäne
IMAC	immobilized metal affinity chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kDa	Kilo-Dalton
MAD	multiple wavelength anomalous scattering
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
min	Minute
MIR	multiple isomorphous replacement
M_r	relatives Molekulargewicht
MR	molecular replacement
NgCAM	neuron-glia related cell adhesion molecule
NMR	nuclear magnetic resonance
NrCAM	NgCAM-related cell adhesion molecule
OD	optische Dichte
PDB	protein data bank
PEG	Polyethylenglykol
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

Aminosäure im 3- und im 1-Buchstabencode

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

1 Einleitung

1.1 Informationsübertragung durch Neuronen

Tiere sind in der Lage, Einflüsse aus ihrer Umgebung wahrzunehmen und mit komplexen Verhaltensmustern auf diese zu reagieren. Die schnelle Informationsverarbeitung, die diesen Reaktionen zu Grunde liegt, wird im Wesentlichen durch das Nervensystem vermittelt, das aus einer Vielzahl von hoch spezialisierten Zelltypen gebildet wird. Die für die eigentliche Informationsübertragung funktionell wichtigsten Zellen sind Neuronen. Diese besitzen eine Vielzahl von länglichen Ausläufern, die Neuriten genannt werden. Ein besonders langer Ausläufer, der von Mikrometern bis zu Metern weit reichen kann und sich meist erst nahe seinem Ende verzweigt, wird Axon genannt. Die auffällige Länge des Axons erlaubt die schnelle Signalübertragung über große Entfernungen vom Zellkörper zum Axonende. Die kürzeren, oft stark verzweigten Ausläufer heißen Dendriten. Sie stellen den Kontakt zu den Axonen angrenzender Neuronen über Synapsen her, über die die interzelluläre Signalübertragung erfolgt.

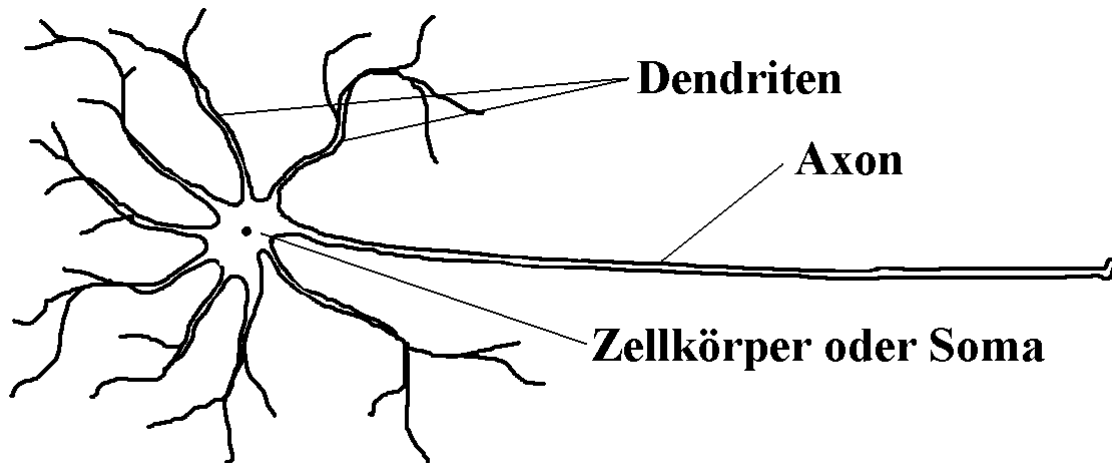


Abbildung 1 Schematische Abbildung eines Neurons.

Bei der Informationsübertragung durch Neuronen sind zwei unterschiedliche Prozesse von Bedeutung: Die intrazelluläre Informationsübertragung von einem Teil der Zelle zu einem anderen und die interzelluläre Informationsübertragung von einem Neuron zum nächsten. Der intrazelluläre Prozess beruht auf dem Fortschreiten eines Nervenimpulses, der auch Aktionspotential genannt wird, entlang der Axonmembran (Hodgkin & Huxley, 1952). Wie in den meisten anderen Zellen besteht auch im Innern von Neuronen eine niedrige Natrium- und eine hohe Kaliumkonzentration, die durch die Na-K-ATPase-Pumpe erzeugt und aufrecht erhalten wird. Im Ruhezustand der Zelle resultiert aus den unterschiedlichen Ionenkonzentrationen innen und außen ein Membranpotential von -60 mV. Wird nun die Membran über einen Schwellenwert von etwa -40 mV depolarisiert, ändert sich zuerst die Leitfähigkeit der Membran für Natriumionen, da sich in der Membran spezifische Natriumkanäle öffnen. Durch den Einstrom von Natrium nähert sich das Membranpotential dem Natrium-Gleichgewichtspotential, das bei etwa $+60$ mV liegt.

Schon nach weniger als einer Millisekunde schließen sich die Natriumkanäle wieder, während sich fast gleichzeitig spezifische Kaliumkanäle öffnen, so dass sich durch den Ausstrom der Ionen das Membranpotential dem Gleichgewichtspotential von Kalium annähert, das bei -80 mV liegt. Nach etwa einer Millisekunde beginnen sich die Kaliumkanäle zu schließen und das System nähert sich wieder dem Ausgangszustand. Die beschriebene, kurzzeitige Veränderung des Membranpotentials setzt sich entlang des Neurons sehr schnell fort.

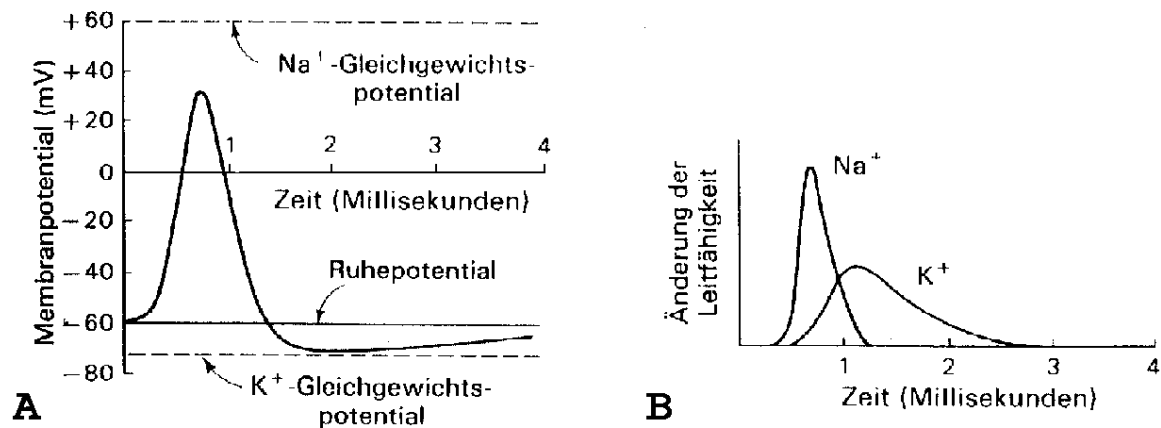


Abbildung 2 Der zeitliche Verlauf des Membranpotentials (A) und der Leitfähigkeit (B) bei der Weiterleitung eines Nervenimpulses (nach Hodgkin & Huxley, 1952).

Da sich das Aktionspotential nur entlang einer Membranoberfläche fortpflanzen kann, erfordert die Signalübertragung zwischen zwei Neuronen einen anderen Mechanismus. Die Informationsübertragung erfolgt an den Kontaktstellen der Neuronen in spezialisierten Bereichen, die man Synapsen nennt. Erreicht ein Aktionspotential die präsynaptische Membran, so kommt es an der Synapse zur Ausschüttung von Acetylcholin oder eines anderen Neurotransmitters. Dieser Neurotransmitter diffundiert durch den nur etwa 50 nm breiten synaptischen Spalt und wird an der postsynaptischen Membran von Rezeptoren gebunden. Die Bindung führt zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran, so dass sich ein neues Aktionspotential entlang der Membran der postsynaptischen Zelle fortpflanzen kann. Das im synaptischen Spalt lokalisierte Enzym Acetylcholinesterase spaltet den Neurotransmitter in Acetat und Cholin und die postsynaptische Membran wird repolarisiert.

1.2 Zielfindung wachsender Axone

Die vielfältigen Funktionen, die das Nervensystem bei der Weiterleitung und Verarbeitung von Informationen erfüllen muss, erfordern die Ausbildung eines komplexen Netzwerks aus sich gegenseitig kontaktierenden Neuronen. Dazu muss ein wachsendes Axon über Entfernungen von bis zu einem Meter den Weg in seine Zielregion finden. Die Signale, die den Weg des Axons bestimmen, können repulsiver (abstoßender) oder attraktiver (anziehender) Natur sein und durch Moleküle vermittelt werden, die löslich sind, sich auf der Oberfläche anderer Zellen befinden oder in immobilisierte Form in der extrazellulären Matrix vorliegen (Lumsden & Davis, 1986). Bestimmte Signalmoleküle können dabei auf

unterschiedliche Neuronen attraktiv oder repulsiv wirken (Colamarino & Tessier-Lavigne, 1995).

Die wichtigsten Prozesse, die die Wachstumsrichtung des Neurons bestimmen, finden vermutlich in einer spezialisierten Region an der Spitze des wachsenden Axons statt, die Wachstumskegel genannt wird (Lockerbie, 1987). Kommt ein Protein im Wachstumskegel in hoher Konzentration vor, kann dieses ein Hinweis darauf sein, dass es Teil des axonalen Sensorapparates ist. Auf molekularer Ebene ist eine komplexe Maschinerie aus extrazellulären, membranständigen und cytoplasmatischen Komponenten am Vorgang der Zielfindung beteiligt. Die beteiligten Membranproteine gehören unterschiedlichen strukturellen Klassen an, wobei unter den bisher charakterisierten Proteinen besonders häufig Mitglieder der Immunoglobulin-Superfamilie anzutreffen sind.

1.3 Neuronale Zelloberflächenproteine aus der Ig/FnIII-Familie

Neben neuronalen Zelladhäsionsproteinen, deren extrazellulärer Teil nur aus Ig-Domänen aufgebaut ist, scheint eine Unterklasse der Ig-Superfamilie eine wichtige Rolle bei der Zielfindung wachsender Axone zu spielen, die neben Ig-Domänen zusätzlich FnIII-Domänen enthalten und daher zu der Ig/FnIII-Familie zusammengefasst werden. Diese Proteine enthalten meist 4-6 N-terminale Ig-Domänen, gefolgt von 2-6 FnIII-Domänen. Sie können entweder einen membranspannenden und einen cytoplasmatischen Teil besitzen oder sind durch einen GPI-Anker an die Membran gebunden.

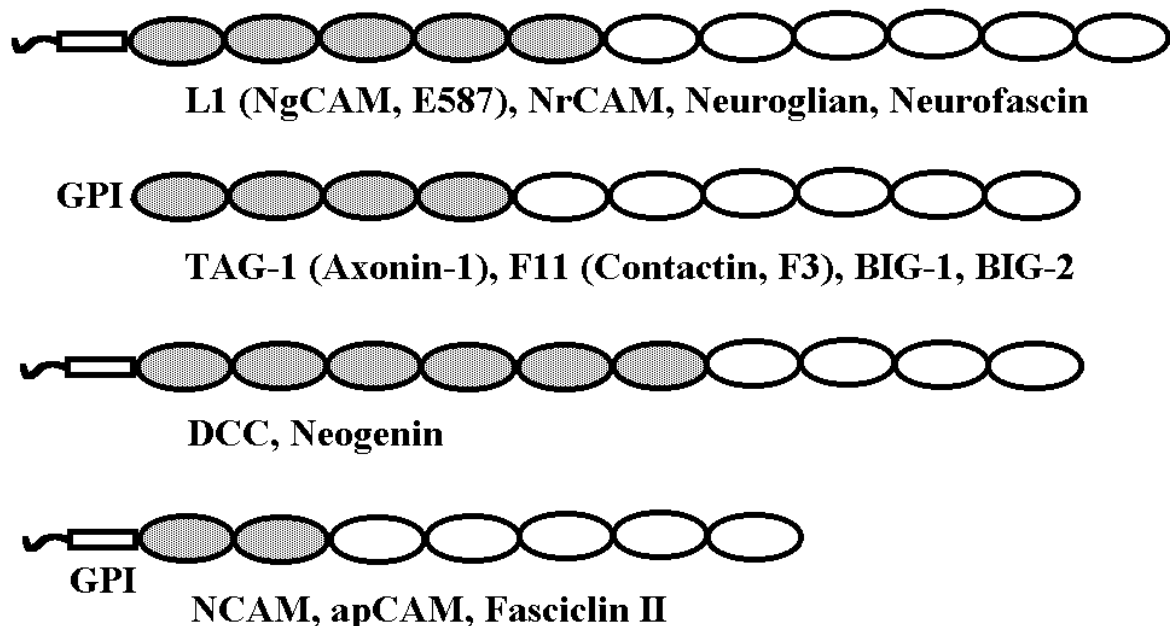


Abbildung 3 Beispiele einiger Vertreter der Ig/FnIII-Familie. Ig-Domänen sind durch leere Ovale symbolisiert, FnIII-Domänen durch gefüllte Ovale, Transmembranhelices durch Vierecke und cytosolische Domänen durch Haken. GPI bedeutet, dass das Protein in einer GPI-verankerten Form an der Membran vorkommen kann. Die C-Termini befinden sich für alle Proteine auf der linken Seite. Die Namen homologer Proteine in unterschiedlichen Spezies sind in Klammer angegeben.

Das erste identifizierte Protein dieser Familie war NCAM, dessen extrazellulärer Teil aus 5 Ig-Domänen und 2 FnIII-Domänen besteht (Cunningham *et al.*, 1987). Von diesem in der Membran von Neuronen sehr häufigen Protein sind membranspannende und GPI-verankerte Formen bekannt. Ein weiterer wichtiger Vertreter der Ig/FnIII-Familie ist L1, das eine Vielzahl von Funktionen bei der Entwicklung und Regenerierung des Nervensystems besitzt. Dieses Protein ist bisher das einzige, von dem eine ganze Reihe von Punktmutationen bekannt sind, die beim Menschen zu schweren Störungen bei der Entwicklung des Nervensystems bis hin zu neonatalem Tod führen können (Kenwrick & Doherty, 1998). Es besteht aus 6 Ig-Domänen, 5 FnIII-Domänen, einer Transmembranhelix und einer cytoplasmatischen Domäne von etwa 100 Aminosäuren. Das homologe Protein im Huhn heißt NgCAM (Burgoon *et al.*, 1991), das homologe im Goldfisch wird mit E587-Antigen bezeichnet (Giordano *et al.*, 1997).

1.4 Das neuronale Zelladhäsionsprotein Axonin-1

Das neuronale Zelladhäsionsprotein Axonin-1 aus dem Huhn besteht aus 6 N-terminalen Ig-Domänen und 4 FnIII-Domänen. Neben einer löslichen Form wird das Protein in einer membranständigen Form gefunden, in der es über einen GPI-Anker an die Membran gebunden ist. Die homologen Proteine im Menschen und in der Ratte werden mit TAG1 bezeichnet (Furley *et al.*, 1990). Das reife Axonin-1 besteht nach Abspaltung einer 21 Reste umfassenden, N-terminalen Signalsequenz aus 1015 Aminosäuren. Die massenspektrometrische Untersuchung lässt darüber hinaus auf eine Glykosylierung mit einer Gesamtmasse von etwa 15 kDa schließen (Denzinger *et al.*, 1997). Axonin-1 kann eine Vielzahl von Bindungen eingehen, wobei die funktionell wichtigsten vermutlich die Interaktionen mit NgCAM und mit NrCAM sind (Stoeckli & Landmesser, 1995). Zusätzlich sind Wechselwirkungen mit NCAM, Neurocan, Phosphacan (Milev *et al.*, 1996) und β 1-Integrin (Felsenfeld *et al.*, 1994) beschrieben. Ausserdem wurde gezeigt, dass homophile trans-Interaktion von Axonin-1 zur Aggregation von Zellen führen kann (Rader *et al.*, 1993).

Die zur Zeit am Besten untersuchte Wechselwirkung von Axonin-1 ist die Bindung an NgCAM. Mittels verschiedener Techniken konnte gezeigt werden, dass Axonin-1 und NgCAM nur eine Bindung eingehen können, wenn sie sich in der Ebene der gleichen Membran befinden (Buchstaller *et al.*, 1996). Axonin-1 und NgCAM bilden durch cis-Interaktion Heterodimere, die sich mit Axonin-1/NgCAM-Heterodimeren aus einer gegenüberliegenden Membran zu Tetrameren vereinigen können (Kunz *et al.*, 1996). Eine systematische Studie, die mittels der Deletion einzelner Domänen die Identifizierung der NgCAM-Bindestelle in Axonin-1 ermöglichte, zeigte die Beteiligung mehrerer Domänen an der Bindung (Rader *et al.*, 1996). Wurde eine der vier aminoterminalen Domänen deletiert, ging die Bindungsfähigkeit verloren, wogegen bei Deletion der übrigen Domänen weiterhin eine NgCAM-Bindung beobachtet werden konnte. Ausserdem wurden mehrere monoklonale Antikörper gefunden, die bei Fehlen einer der vier aminoterminalen Ig-Domänen das Protein nicht mehr erkannten. Zusammengefasst legen die Daten den Schluss nahe, dass diese Domänen ein kompakte Gesamtstruktur bilden. Ein überraschendes Ergebnis war, dass bei der Deletion von Ig5 oder Ig6 eine stärkere NgCAM-Bindung als beim Wildtyp zu beobachten war. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Modell vorgeschlagen, das in guter Übereinstimmung mit negativkontrastierten Elektronenmikroskopieaufnahmen steht, auf denen hufeisenförmige Strukturen erkennbar sind, deren Enden nahe beieinander liegen. In diesem Modell wechselwirken die aminoterminalen Ig-Domänen mit den FnIII-Domänen nahe der Membran, so dass das Gesamtmolekül die in den EM-Aufnahmen sichtbare Hufeisenform annimmt. Die Deletion von Ig5 oder Ig6 würde in diesem Modell eine ausgestreckte Konformation erzwingen, so dass die NgCAM-Bindestelle im aminoterminalen Bereich des Proteins besser zugänglich wäre als in der Hufeisenform.

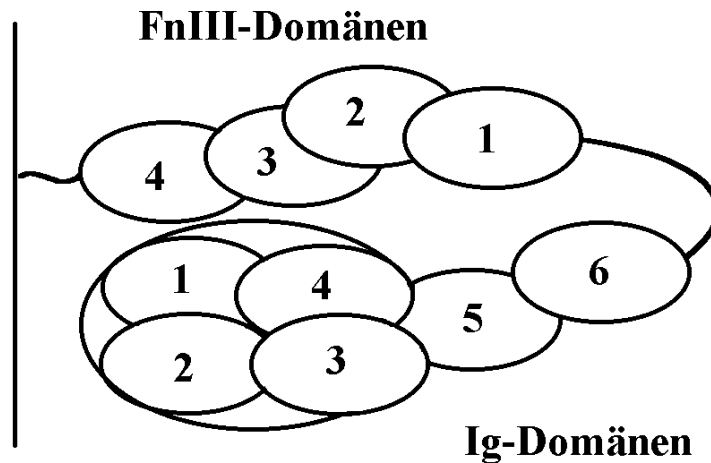


Abbildung 4 Modell für die hufeisenförmige Anordnung der Domänen in Axonin-1 (nach Rader *et al.*, 1996). Die Ig-Domänen 1 bis 4 bilden eine Struktureinheit, die mit den FnIII-Domänen wechselwirkt und daher nahe der Membran lokalisiert ist. Sie steht in der Hufeisenform nur begrenzt zur NgCAM-Bindung zur Verfügung.

Die für die vier aminoterminalen Ig-Domänen vermutete Bildung einer rigiden Struktureinheit machen diesen Molekülteil zu einem für die Röntgenstrukturanalyse geeigneten Untersuchungsobjekt. Der aminoternale Teil des Proteins ist zusätzlich von besonderem Interesse, da er nicht nur die Bindung an NgCAM vermittelt, sondern nach neueren Untersuchungen (Prof. Sonderegger, persönliche Mitteilung) auch an der NrCAM-Bindung und an der homophilen Axonin-1-Bindung beteiligt ist.

1.5 Der Greek-Key-Superfold

Die in Zelladhäsionsproteinen der Ig/FnIII-Familie vorkommenden Domänen werden zusammen mit den Cadherindomänen zu dem Greek-Key-Superfold zusammengefasst. Namensgebend für den Superfold war, dass die Topologiediagramme dieser Faltungstypen an Bandverzierungen erinnern (Abb. 5), wie sie auf klassischen griechischen Vasen gefunden wurden (Richardson, 1977).



Abbildung 5 Muster dieses Typs wurden als Ornamente im klassischen Griechenland verwendet und sind namensgebend für den Greek-Key-Superfold.

Gemeinsam ist den Vertretern des Greek-Key-Superfolds, dass sie aus einem verdrehten ("twisted") Sandwich aus zwei β -Faltblättern gebildet werden. Immunoglobulindomänen bestehen aus etwa 100 Aminosäuren und bilden eine Struktur mit den Abmessungen 40 x 25 x 20 Å (Amzel & Poljak, 1979). Typisch für Ig-Domänen ist das Vorhandensein einer Disulfidbrücke zwischen den Strängen B und F, gegen die ein "invariantes" Tryptophan packt (Ioerger *et al.*, 1999). Allerdings existieren auch Ig-Domänen ohne Disulfidbrücke, wie z. B. Ig3 in CD4 (Brady *et al.*, 1993). FnIII-Domänen besitzen ebenfalls keine Disulfidbrücke und weisen keine Sequenzhomologien zu Ig-Domänen auf. Sie wurden zuerst als sich

wiederholendes Motiv von etwa 90 Aminosäuren in dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin identifiziert (Hynes, 1990). Dieses Strukturmotiv kommt in schätzungsweise 2 % aller tierischen Proteine vor (Bork & Doolittle, 1992). Cadherine sind integrale Membranproteine, deren extrazellulärer Teil aus fünf Domänen gebildet wird, die jeweils etwa 100 Aminosäuren enthalten. Sie vermitteln eine Calcium-abhängige, homophile Zelladhäsion, wobei die Spezifität vor allem durch die aminotermine Domäne bestimmt wird. Cadherin-Domänen enthalten helikale Bereiche in den BC- und CD-Loops. Darüber hinaus sind die Faltblätter stärker als in Ig- oder FnIII-Domänen gegeneinander gedreht, so dass eine fassartige Gesamtstruktur entsteht (Shapiro *et al.*, 1995).

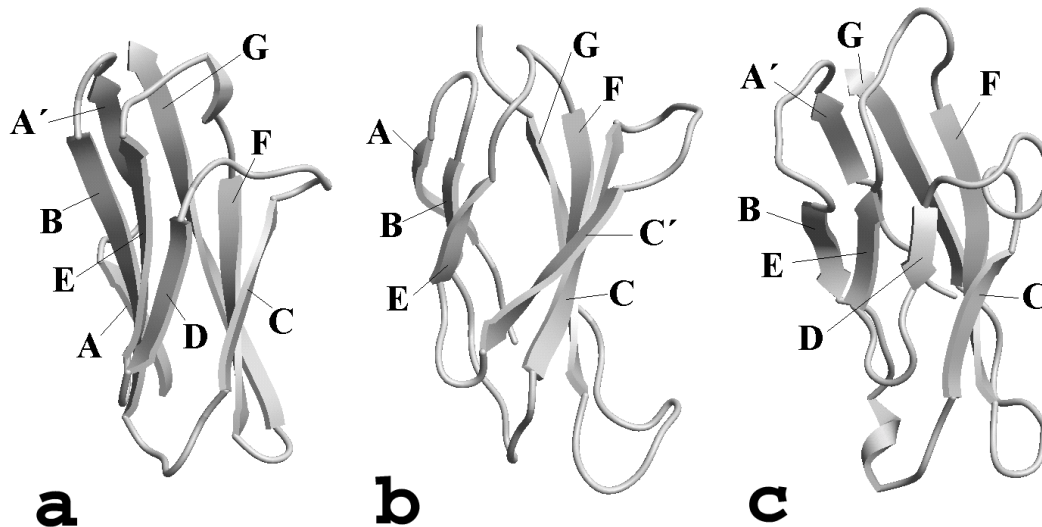


Abbildung 6 Typische Ig-, FnIII- und Cadherindomänen. **a**, Aminotermine Ig-Domäne des menschlichen VCAM-1 (PDB-Code 1vca). **b**, Zehnte FnIII-Domäne des menschlichen Fibronectin (PDB-Code 1fna). **c**, Aminotermine Domäne des N-Cadherin aus der Maus (PDB-Code 1ncg).

1.5 Klassifizierung von Ig-Domänen

Bisher bekannte Proteinstrukturen zeigen eine weite Verbreitung des Ig-Folds vom namensgebenden Immunsystem über Muskelproteine und neuronale Proteine bis hin zu bakteriellen Vertretern. Der Ursprung des Faltungstyps wird im Nervensystem vermutet, aus dem sich später das Immunsystem entwickelt haben könnte (Williams & Barclay, 1988). Für die Entstehung der Strukturen bakterieller Proteine mit Ig-Fold werden sowohl eine konvergente als auch eine divergente Evolution diskutiert. Während die hohe Sequenzhomologie zwischen PapD und CD5 als Hinweis auf einen horizontalen Gentransfer gewertet wurde (Holmgren & Bränden, 1989), sind z.B. für Intimin keine Sequenzhomologie zu eukaryotischen Proteinen mit Ig-Fold bekannt, die analoge Schlüsse zulassen würden (Kelly *et al.*, 1999).

Zur Untersuchung der Verwandtschaften von Proteinen mit Ig-Fold ist aufgrund der geringen Sequenzhomologie der einzelnen Vertreter eine Unterteilung in Sets nützlich, die aufgrund der unterschiedlichen Topologien von Ig-Domänen erfolgt. Die einfachste Topologie, wie sie in den konstanten Domänen von Antikörpern gefunden wird, besteht aus sieben β -Faltblattsträngen, die mit den Buchstaben A bis G bezeichnet werden. Dabei bilden die

Stränge D, E, B und A das eine Faltblatt, während das im β -Sandwich gegenüberliegende Faltblatt von den Strängen G, F und C gebildet wird. Immunoglobulindomänen mit dieser Topologie werden dem C1-Set (von engl. *constant*) zugeordnet. Bei Mitgliedern des C2-Sets hat der Strang, der dem D-Strang des C1-Set entspricht, seine Zugehörigkeit zu einem Faltblatt geändert und wird daher C'-Strang genannt. Folglich wird bei Mitgliedern des C2-Sets das eine Faltblatt nur noch aus den Strängen E, B und A gebildet und das andere umfasst die Stränge G, F, C und C'. Domänen solchen Typs wurden in Zelladhäsionsmolekülen gefunden. Ig-Domänen in den variablen Bereichen von Antikörpern besitzen eine deutlich abweichende Topologie und bilden zusammen mit Domänen aus Zelladhäsionsmolekülen den V-Set (von engl. *variable*). Sie besitzen zwischen Strang C und D zwei zusätzliche Stränge, die mit C' und C'' bezeichnet werden. Ausserdem wechselt der A Strang etwa in der Mitte seine Zugehörigkeit zu einem Faltblatt, wobei der zweite Teil des Strangs mit A' bezeichnet wird. Mitglieder dieses Sets bestehen also aus einem DEBA- und einem A'GFCC'C''-Faltblatt.

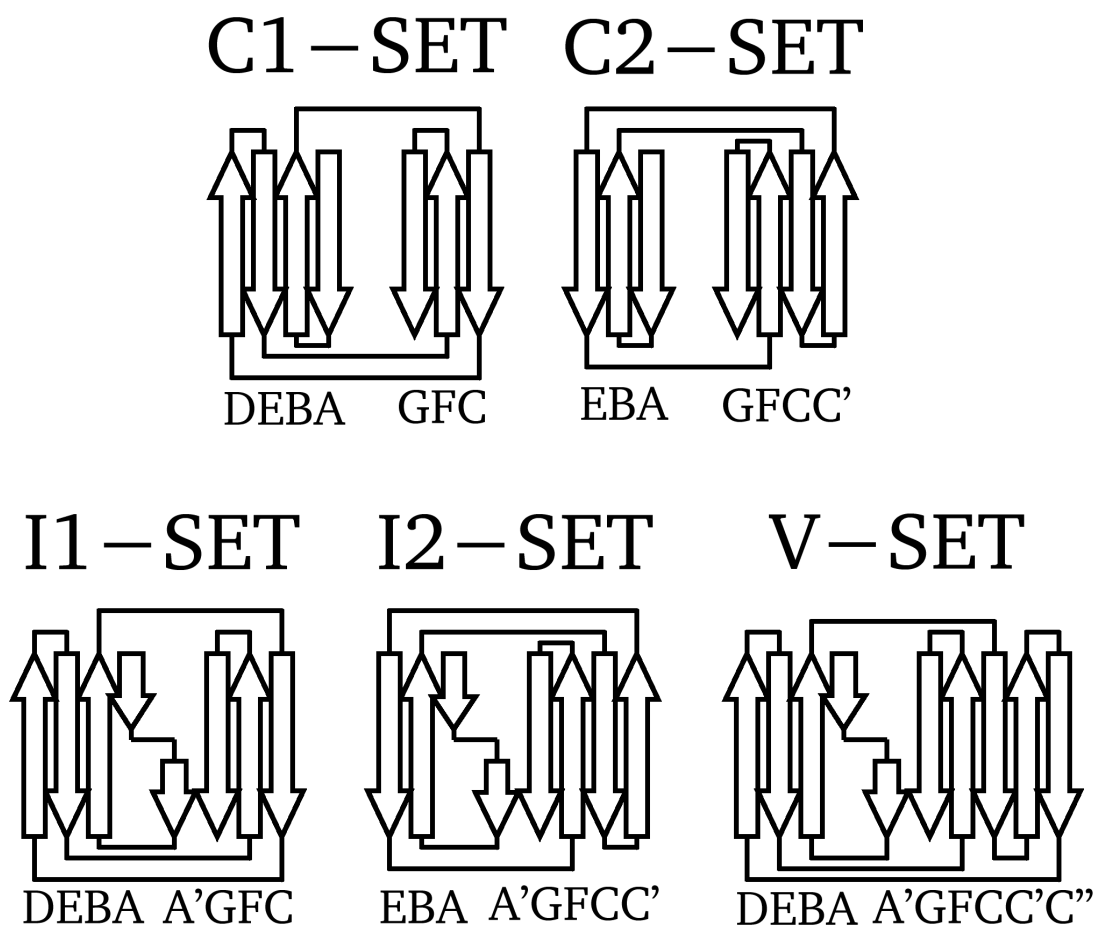


Abbildung 7 Topologiediagramme der unterschiedlichen Ig-Sets. Die Pfeile symbolisieren β -Faltblätter.

Eine Topologie zwischen der des V-Sets und der des C-Sets weisen die Mitglieder des I-Sets (von engl. *intermediate*) auf (Harpaz & Chothia, 1994). Auch bei ihnen wechselt der A-Strang in seinem Verlauf die Zugehörigkeit zu einem Faltblatt und wird dann mit A' bezeichnet. Anders als Mitglieder des V-Sets besitzen sie aber keinen C''-Strang und nicht immer einen C'-Strang. Im einfachsten Fall enthalten sie also ein DEBA- und ein A'GFCC'-Faltblatt. Domänen dieser Topologie wurden bisher in verschiedenen Zelladhäsionsproteinen gefunden. Sequenzvergleiche implizieren außerdem, dass dieser Topologietyp besonders häufig in

neuronalen Oberflächenproteinen vorkommt. Kürzlich wurde bei einer genaueren Analyse der Strukturen von ICAM-2 und VCAM-1 festgestellt, dass der A-Strang wie bei Vertretern des V- oder I-Sets die Zugehörigkeit zu einem Faltblatt wechselt (Casasnovas *et al.*, 1998), obwohl beide bisher dem C2-Set zugeordnet wurden. Daher wurde in Analogie zu der Unterteilung des C-Sets in einen C1- und einen C2-Set eine Unterteilung des I-Sets in einen I1- und einen I2-Set vorgeschlagen. Mitglieder des neuen I2-Sets besitzen keinen D-Strang, im Gegensatz zu Mitgliedern des C2-Sets aber einen A'-Strang.

Alternativ zu der beschriebenen Unterteilung in V-, C- und I-Sets wurde eine Klassifizierung vorgeschlagen, die auch Proteine mit FnIII-Fold mit einbezieht (Bork *et al.*, 1994). Die Domänen werden dabei einem S-Typ (*switched*), H-Typ (*hybrid*), C-Typ (*constant*) oder V-Typ (*variable*) zugeordnet. Offensichtlicher Nachteil dieses Klassifizierungssystems ist, dass Ig-Domänen sich von FnIII-Domänen gleichen Typs deutlicher unterscheiden als von Ig-Domänen eines anderen Typs. Die Einteilung hat daher in der Literatur für die Beschreibung von Ig-Domänen keine Verbreitung gefunden, wird jedoch häufig zur Beschreibung von FnIII-Domänen benutzt.

1.6 Methoden zur Strukturbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Struktur von Proteinen mit atomarer Auflösung ist zur Zeit mit drei Methoden möglich: NMR-Spektroskopie, Elektronenmikroskopie und Röntgenstrukturanalyse. Letzte besitzt bis heute aus einer Vielzahl von Gründen die deutlich größere Bedeutung. So ist die Anwendbarkeit der NMR-Spektroskopie bisher vor allem durch die Größe von Proteinmolekülen eingeschränkt. Nur in Ausnahmefällen gelang die Strukturaufklärung von Proteinen mit bis zu 30 kDa (Kelly *et al.*, 1999), während mit Standardmethoden nur Proteine bis etwa 20 kDa bearbeitet werden können. Weitere Nachteile der Methode bestehen darin, dass große Mengen an Protein benötigt werden, das zusätzlich noch bis zu hohen Proteinkonzentrationen löslich sein muss. Die Notwendigkeit der Verwendung von isotonenangereicherten Spezialreagentien macht die Methode darüber hinaus kostspielig. Die Elektronenmikroskopie dagegen führt normalerweise nur zu einer Auflösung, die keine Strukturaufklärung atomarer Details erlaubt. Nur in wenigen Ausnahmefällen konnte bisher eine Auflösung von unter 3 Å erreicht werden, wie z. B. bei der Strukturaufklärung von Bakteriorhodopsin (Kimura *et al.*, 1997). Ein prinzipielles Problem stellt darüber hinaus die Tatsache dar, dass die Methode 2-dimensionale Kristalle benutzt, die in der Regel nur von Membranproteinen erhalten werden können.

Die Röntgenstrukturanalyse stellt dagegen die am häufigsten zur atomaren Strukturaufklärung von Proteinen benutzte Methode dar. Von den in der Proteindatenbank registrierten 10467 experimentell ermittelten Strukturen (Stand 8.11.99) wurden 8802 mit Röntgenkristallographie, aber nur 1665 mit NMR-Techniken aufgeklärt. Ein Vorteil der Röntgenstrukturanalyse besteht darin, dass prinzipiell keine Obergrenze für die Größe der aufzuklärenden Struktur existiert. Ein Nachteil der Methode ist, dass die Röntgenstrukturanalyse das Vorhandensein eines Proteinkristalls voraussetzt, der den Röntgenstrahl bis zu einer Auflösung von mindestens 3 Å beugt. Diese Voraussetzung schränkt vor allem die Strukturaufklärung integraler Membranproteine ein, die aufgrund ihrer besonderen Oberflächeneigenschaften nur in Ausnahmefällen röntgentaugliche Kristalle bilden. Aus diesem Grund konnten bisher nur wenige Strukturen dieser wichtigen Proteinklasse aufgeklärt werden. Problematisch kann auch die Strukturaufklärung sehr flexibler Proteine sein, die oft Kristalle mit einem unbefriedigenden Streuvermögen bilden. Diese Problematik macht sich besonders bei Zelladhäsionsproteinen bemerkbar, die aus mehreren Domänen bestehen und durch flexible Linker verbunden sind, wie z. B. CD4

(Kwong *et al.*, 1990) oder Neuroglian (Huber *et al.*, 1994). Bei solchen Proteinen konzentriert man sich meist auf die Strukturaufklärung von Proteinfragmenten, die eine geringere Flexibilität als das Gesamtmolekül aufweisen.

Ein Proteinkristall ist eine regelmäßige, dreidimensionale Anordnung von Proteinmolekülen. Zusätzlich besteht der Kristall aus Lösungsmittel, das meist einen Volumenanteil zwischen 40-60 % ausmacht, so dass der Kristall vor Austrocknung geschützt werden muss. Die regelmäßige Anordnung der Proteinmoleküle hat eine wichtige Konsequenz für die Beugung von monochromatischer Strahlung. Während sich die an vielen Molekülen gebeugten Wellen normalerweise gegenseitig auslöschen, kommt es in bestimmten Raumrichtungen zu einer konstruktiven Interferenz. Betrachtet man die Beugung als teilweise Reflexion der Röntgenwelle an einer Netzebenenschar des Kristallgitters, so ergibt sich die Bedingung für die Entstehung eines Reflexes nach dem Bragg'schen Gesetz (Bragg & Bragg, 1913) zu:

$$n \cdot \lambda = 2d \sin \Theta,$$

wobei λ die Wellenlänge, d den Abstand der Netzebenen und Θ den Glanzwinkel bezeichnet. Dem in einer bestimmten Raumrichtung beobachteten Reflex wird ein Miller'scher Index hkl zugeordnet. Dieses Zahlentripel beschreibt die Lage der den Reflex erzeugenden Gitterebenen relativ zur Einheitszelle. Die Intensität und Lage der beobachtbaren Reflexe sind die in der Röntgenkristallographie benutzten Messgrößen. Gesucht ist für die Strukturaufklärung die Elektronendichte ρ des Moleküls. Der Zusammenhang ist gegeben durch:

$$\tilde{\rho}(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{hkl}| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{hkl}].$$

Diese Formel zeigt eine besondere Schwierigkeit der Kristallographie, die mit dem Wort "Phasenproblem" beschrieben wird. Die Messung des Beugungsbildes liefert nur Intensitäten, die die Amplituden der Wellen nach $I_{hkl} = |F_{hkl}|^2$ ergeben. Nicht direkt messbar sind dagegen die Phasen α_{hkl} der Wellen. Drei Verfahren stehen zur Überwindung dieses Problems zur Verfügung:

- Molekularer Ersatz (MR, von engl. *Molecular Replacement*)
- Isomorpher Ersatz (IR, von engl. *Isomorphous Replacement*)
- Anomale Streuung (MAD, von engl. *Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*)

Die Methode des molekularen Ersatzes setzt voraus, dass eine Struktur zur Verfügung steht, die der aufzuklärenden stark ähnelt. Mit Hilfe dieser ähnlichen Struktur können theoretische Phasen berechnet werden, mit denen sich in Kombination mit den gemessenen Amplituden eine Elektronendichtekarte erzeugen lässt. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass die Position und Orientierung des ähnlichen Modells in der Elementarzelle mit der des realen Moleküls übereinstimmt. Die Überführung des Modells in die korrekte Position kann in zwei Teilschritte gegliedert werden: Bei der Rotationssuche wird zuerst die Orientierung des Modells relativ zur Elementarzelle bestimmt. In einer darauffolgenden Translationssuche wird das Modell an die korrekte Position innerhalb der Elementarzelle verschoben.

Die Methode des isomorphen Ersatzes beruht darauf, dass bestimmte Schwermetallverbindungen spezifisch mit Proteinen wechselwirken können. Durch das Hinzufügen elektronenreicher Atome zum Proteinmolekül an definierten Positionen, der sogenannten Derivatisierung, ändern sich die Intensitäten der Reflexe, nicht jedoch deren Lage. Die Differenzen der Intensitäten im Beugungsmuster des nativen und des derivatisierten

Proteinkristalle lassen Rückschlüsse auf die Anzahl und Lage der am Protein gebundenen Schwermetallatome zu. Aus diesen Informationen lassen sich anschließend die Phasen errechnen. Zur eindeutigen Bestimmung der Phasen sind in der Regel mindestens zwei voneinander unabhängige Derivate nötig, so dass man von MIR (von engl. *Multiple Isomorphous Replacement*) spricht. Unter günstigen Voraussetzungen, wenn z. B. mehrere gleiche Proteinmoleküle die asymmetrische Einheit bilden, kann jedoch die Verwendung von einem Derivat hinreichend sein. Diese Art der Phasenbestimmung nennt man SIR (von engl. *Single Isomorphous Replacement*).

Die dritte Methode zur Phasenbestimmung benutzt, dass bei Elementen mit höherer Kernladungszahl eine anomale Streuung der Röntgenstrahlung auftritt, da in diesen die Elektronen der inneren Orbitale stärker mit den höher geladenen Kernen wechselwirken. Dieses führt dazu, dass sich die Intensitäten der Friedelspaare I_{hkl} und $I_{-h,-k,-l}$ um eine anomale Differenz unterscheiden. Aus den Differenzen lassen sich, ähnlich wie beim isomorphen Ersatz, die Anzahl und die Positionen der Schweratome errechnen. Mit diesen Informationen wiederum können Phasen und damit Elektronendichtekarten zur Strukturbestimmung erzeugt werden. Da die anomale Streuung relativ gering ist, muss bei zwei Wellenlängen nahe der Absorptionskante, an denen der Effekt besonders ausgeprägt ist, sowie bei verschiedenen Referenzwellenlängen oberhalb und unterhalb der Absorptionskante gemessen werden. Daher benötigt man zur Benutzung der Methode Synchrotronstrahlung veränderlicher Wellenlänge. Ein zusätzliches Hemmnis bei der Anwendung von MAD besteht darin, dass das Protein eine ausreichende Anzahl von Atomen mit hoher Kernladungszahl enthalten muss. Die Methode ist daher besonders geeignet für Proteine mit natürlichen Kofaktoren, die Metallatome wie z. B. Eisen enthalten.

1.7 Ziele der Arbeit

Die zu Beginn der vorliegenden Arbeit zur Verfügung stehenden Daten legten den Schluss nahe, dass die vier aminoterminalen Ig-Domänen von Axonin-1 eine kompakte Struktur bilden, die für die Bildung von röntgentauglichen Proteinkristallen geeignet ist. Zusätzlich enthält dieser Molekülteil die Bindestellen für die funktionell wichtigen Bindungspartner NgCAM und NrCAM sowie für die homophile Bindung. Ziel der Arbeit war eine Strukturaufklärung der Ig-Domänen 1 bis 4 von Axonin-1 aus dem Huhn (im Folgenden Ax1Ig1-4 genannt) mit röntgenkristallographischen Methoden. Dazu sollte zuerst ein Verfahren entwickelt werden, dass das Proteinfragment im Milligrammmaßstab verfügbar macht. Anschließend sollte das Protein kristallisiert werden. Die Aufnahme von Röntgendaten und die Phasenbestimmung mit einer der drei Standardmethoden sollten erlauben, ein Proteinmodell zu erstellen und zu verfeinern. Die Analyse von strukturellen Details des verfeinerten Modells sollte in Kombination mit Sequenzvergleichen mögliche Mechanismen der homophilen und heterophilen Wechselwirkungen von Axonin-1 aufzeigen, die unter Umständen ein besseres Verständnis molekularer Details der neuronalen Zelladhäsion erlauben könnten.

2 Materialien und Geräte

2.1 Chemikalien

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Aceton	Merck, Darmstadt
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Argininhydrochlorid	Fluka, Buchs
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Diethylamin	Fluka, Buchs
DTE	Merck, Darmstadt
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glycerin	Riedel-de Haen, Hannover
Harnstoff	Fluka, Buchs
HEPES	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Fluka, Buchs
Iodacetamid	Fluka, Buchs
IPTG	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Riedel-de Haen, Hannover
Natriumformiat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Riedel-de Haen, Hannover
Nickelsulfat	Merck, Darmstadt
Oxidiertes Glutathion	Fluka, Buchs
PEG 3350	Hampton Research, USA
PEG 6000, 10000	Fluka, Buchs
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tris	Sigma, Steinheim

2.2 Laborgeräte und Arbeitsmaterialien

Air Jet Crystal Cooler, XR11851	FTS-Systems, USA
Brutschrank	Heraeus Sepatech, Hanau
Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Elektrophoresesystem Phast-System	Pharmacia, Freiburg
FPLC-Pumpen P 500	Pharmacia, Freiburg
Fraktionensammler Frac 100	Pharmacia, Freiburg
French Pressure Cell Press	Aminco, USA
Glaskapillaren	Müller, Berlin
Goniometerkopf	Stoe, Darmstadt
Kühlzentrifuge J 500	Beckmann, München
Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
Schüttelinkubator	Infors, Schweiz
Sterilbank Lamin-air	Heraeus Sepatech, Hanau

Sterilfilter FP030/3, 22 µm
Ultrafiltrationszellen
Ultrazentrifuge
UV/VIS-Spektrophotometer λ 17

Schleicher & Schüll, Dassel
Amicon, Witten
Beckmann, München
Perkin-Elmer, Überlingen

2.2.1 Schwermetallverbindungen

Bis-(ethylendiamin)platin-(II)-chlorid
cis-Platin
Gd₂(SO₄)₃
Ethylmercurphosphat (EMP)
Ethylmercurthiosalicylsäure
HgCl₂
p-Hydroxymercurybenzoat (PHMB)
KAuCl₄
KAu(CN)₂
K₃IrCl₆
K₂PdCl₄
K₂PtCl₄
K₂Pt(CN)₄
K₂PtI₆
K₂ReCl₆
K₃UO₂F₅
Methylquecksilberacetat (MMA)
Na₂WPO₄
Pb(CO₃)₂
Pb(NO₃)₂
Phenylquecksilberhydroxid
SmCl₃
Tetrakis-(acetoxymcury)-methan (TAMM)
Thiomersal
Trimethylbleiaceta (TMBA)
Uranylacetat
Uranylinitrat

Strem, Kehl
Serva, Heidelberg
Strem, Kehl
Dr. G. Petsko, USA
Serva, Heidelberg
Riedel-de Haen, Hannover
Merck, Darmstadt
Strem, Kehl
Strem, Kehl
Strem, Kehl
Strem, Kehl
Strem, Kehl
Strem, Kehl
Ventron, Karlsruhe
Strem, Kehl
Dr. G. Petsko, USA
Aldrich, Steinheim
Aldrich, Steinheim
Riedel-de Haen, Hannover
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Strem, Kehl
Strem, Kehl
Merck, Darmstadt
Aldrich, Steinheim
Riedel-de Haen, Hannover
Merck, Darmstadt

2.3 Computer

DEC VAX Station 3200
DEC VAX Station 4000
Indigo2
O₂
Octane

Digital, USA
Digital, USA
Silicon Graphics, Grasbrunn
Silicon Graphics, Grasbrunn
Silicon Graphics, Grasbrunn

2.4 Zellkulturmedien

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Hefeextrakt 10 g/l NaCl
2xYT-Medium	16 g/l Bacto-Trypton 10g/l Bacto-Hefeextrakt 5 g/l NaCl
LB-Agarplatten	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Hefeextrakt 10 g/l NaCl 20 g/l Agar

2.5 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*

RF1-Puffer:	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ · 4 H ₂ O 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O 15 % (w/v) Glycerin mit Essigsäure auf pH 5.8 eingestellt, sterilfiltriert
--------------------	--

RF2-Puffer:	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O 15 % (w/v) Glycerin mit NaOH auf pH 6.8 eingestellt, sterilfiltriert
--------------------	---

2.6 Kalter osmotischer Schock

KOS-Puffer A	20 % (w/v) Sukrose 1 mM EDTA 30 mM Tris-Cl, pH 8.5
KOS-Puffer B	5 mM MgSO ₄

2.7 Reinigungs-, Chromatographie- und Rückfaltungspuffer

Standardreinigungspuffer	50 mM Tris-Cl, pH 8.5
Denaturierender Reinigungspuffer	8 M Harnstoff
	100 mM Tris-Cl, pH 8.5
IEC-Puffer	25 mM Tris-Cl, pH 8.0
GPC-Puffer	150 mM NaCl
	50 mM Tris-Cl, pH 8.5
Rückfaltungspuffer	2 mM EDTA
	4 mM oxidiertes Glutathion
	400 mM Arginin-HCl
	100 mM Tris-Cl, pH 8.5

2.8 Kristallisationslösungen

Kristallisationspuffer	125 mM NaCl
	25 mM Tris-Cl, pH 8.5

	Ax1Ig1-4	E587 Antigen (Ig1-4)
Vorsättigungspuffer	16-18 % PEG 10 000	24-26 % Peg 6 000
	100 mM Natriumformiat	350 mM CaCl ₂
	100 mM HEPES-NaOH	100 mM Tris-Cl
	pH 7.5	pH 8.5
Reservoirpuffer	14-16 % PEG 10 000	22-24 % Peg 6 000
	100 mM Natriumformiat	350 mM CaCl ₂
	100 mM HEPES-NaOH	100 mM Tris-Cl
	pH 7.5	pH 8.5

2.9 Chromatographiesäulen und -materialien

Anionenaustauschchromatographie

Chromatographiesäule:	HR 10/15 (Pharmacia, Freiburg)
Gelvolumen:	8 ml
Gelmaterial:	Source 30 Q (Pharmacia, Freiburg)

IMAC

Chromatographiesäule:	HR 10/15 (Pharmacia, Freiburg)
Gelvolumen:	8 ml
Gelmaterial:	Chelating Sepharose fast flow (Pharmacia, Freiburg)

Gelpermeationschromatographie

Chromatographiesäule:	HR 10/15 (Pharmacia, Freiburg)
Gelvolumen:	30 ml
Gelmaterial:	Sephacryl S 200 (Pharmacia, Freiburg)

2.10 SDS-PAGE

SDS-Probenpuffer

1 mM EDTA
 2.5 % (w/v) SDS
 1 % (w/v) DTT
 0.01 % Bromphenolblau
 10 mM Tris, pH 7.5

Pufferstreifen

0.55 % (w/v) SDS
 2.0 % (w/v) Agarose
 200 mM Tricine
 200 mM Tris, pH 7.5

SDS-Gele

Geltyp	Acrylamidkonzentration im Sammelgel [% (w/v)]	Acrylamidkonzentration im Sammelgel [% (w/v)]	Gelpuffer
Gradient 8-25	T 4.5 % / C 3.0 %	T 8-25 % / C 2.0 %	112 mM Tris-Acetat, pH6.4
Gradient 10-15	T 4.5 % / C 3.0 %	T 10-15 % / C 2.0 %	112 mM Tris-Acetat, pH6.4
Homogeneous 20	T 7.5 % / C 3.0 %	T 20 % / C 2.0 %	112 mM Tris-Acetat, pH6.4

Entwicklungslösungen

Färbelösung	0.02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure
Konservierungslösung	10 % (w/v) Essigsäure 5-10 % (v/v) Glycerin

Markerproteine

E 5 Markerkit (Serva, Heidelberg)		E 4 Markerkit (Serva, Heidelberg)	
Protein	M _r	Protein	M _r
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	6 500	Carboanhydrase	29 000
Cytochrom c	12 500	Albumin (Hühnererei)	45 000
Trypsin-Inhibitor (Schweinelunge)	21 000	Rinderserumalbumin	67 000
Carboanhydrase	29 000	Phosphorylase B	97 400

3 Methoden

3.1 Isolierung von Ax1Ig1-4 aus Myelomazellen

Die dieser Reinigung zu Grunde liegende Zellkultur wurde von Beat Kunz an der Universität Zürich in der Arbeitsgruppe von Prof. Sonderegger durchgeführt. Bei den Zellen handelte es sich um J558L Myelomazellen, die durch Protoplastenfusion transfiziert wurden. Die Zellen sekretierten ein Fusionsprotein aus Ax1Ig1-4 im aminoterminalen und IgC_κ im carboxyterminalen Bereich. Die Zellüberstände enthielten zwischen 1 und 5 mg/l Fusionsprotein.

3.1.1 Immunoaffinitätschromatographie

Da die Säulenkapazität nur etwa 0.5 mg betrug, erfolgte die Reinigung in mehreren Durchläufen. Die chromatische Reinigung wurde bei 4°C durchgeführt. Die in 25 mM Tris-Cl, pH 8.5 äquilibrierte Säule wurde pro Lauf mit 180 ml Kulturüberstand bei einer Flussrate von 0.2 ml/min beladen. Anschließend wurde die Säule mit 40 ml 25 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8.5 bei gleicher Flussrate gewaschen. Die Elution erfolgte mit 20 ml 50 mM Diethylamin bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die bei der Elution gesammelten 0.5 ml Fraktionen wurden durch die Zugabe von je 100 µl 1 M Tris-HCl, pH 7.0 neutralisiert. Die Fraktionen wurden mit SDS-PAGE analysiert. Fusionsprotein enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und gegen ein 100-faches Volumen 100 mM Kaliumphosphat, 2.5 mM EDTA, pH 7.2 bei 4°C über Nacht dialysiert.

3.1.2 Schonender Papainverdau

Die vereinigten, dialysierten Proteinproben wurden auf 1 ml Gesamtvolumen durch Ultrafiltration mit Centricons (Firma Amicon, Witten) einer Ausschlussgröße von 30 kDa eingengt. Die Proteinkonzentration betrug anschließend 2 mg/ml. Die Proteinlösung wurde mit 3 µl einer 1 M 2-Mercaptoethanol-Stammlösung versetzt. Anschließend wurden 20 µg Papain aus *Carica papaya* zugegeben und die Lösung wurde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach 3 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 5.4 mM Iodacetamid gestoppt. Die Vollständigkeit des Reaktionsverlaufs wurde durch SDS-PAGE überprüft. Im resultierenden Gel konnte kein ungespaltenes Fusionsprotein mehr beobachtet werden.

3.1.2 Anionenaustauschchromatographie (IEC)

Das nach dem schonenden Papainverdau resultierende Gemisch aus Ax1Ig1-4, IgC_κ und inhibiertem Papain wurde mit 10 ml IEC-Puffer verdünnt und auf eine in IEC-Puffer äquilibrierte Anionenaustauschchromatographiesäule bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 40 ml IEC-Puffer bei einer Flussrate von 2 ml/min gespült. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-250 mM NaCl in IEC-Puffer über ein Gesamtvolumen von 80 ml bei einer Flussrate von 1 ml/min. Ax1Ig1-4 eluierte bei etwa 125 mM NaCl-Konzentration. Die Ausbeute betrug etwa 1 mg. Im SDS-PAGE-Gel konnten keine Verunreinigungen beobachtet werden.

3.2 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Eine bei -70°C gelagerte Bakterienkultur wurde mit einer Impfnadel auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und für 24 h bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde mit einer Impfnadel von der Agarplatte in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt, der 50 ml LB-Medium enthielt. Diese Kultur wurde bei 37°C und 220 Upm bis zu einer OD₅₅₀ von 0.5 inkubiert, die nach etwa 4 h erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen 30 min auf Eis abgekühlt und danach bei 10 000 g und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet wurde in 2 ml eiskaltem RF1-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut bei 10000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert. Das Pellet wurde in 350 µl eiskaltem RF2-Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je 50 µl der Suspension in sterile 1.5 ml Eppendorfhütchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die aliquotierten, kompetenten Zellen wurden bis zur ihrer weiteren Verwendung bei -70°C aufbewahrt.

3.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die bei -70°C gelagerten, chemisch kompetenten Zellen wurden durch 10-minütiges Inkubieren der Eppendorfhütchen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1 µl Plasmidlösung hinzupipettiert und vorsichtig mit der Pipettenspitze gerührt. Nach weiterem 10 minütigem Lagern auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock ausgesetzt, indem sie für 45 s in einem 42°C warmen Wasserbad inkubiert wurden. Danach wurden sie für weitere 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 250 µl LB-Medium hinzugefügt und die Zellen wurden für 30 min bei 37°C inkubiert. Je 5 µl, 10 µl und 50 µl wurden anschließend auf LB-Agarplatten ausplattiert, die 50 mg/l Ampicillin enthielten. Die Platten wurden für 24 h bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

3.4 Isolierung von Ax1Ig1-4 aus dem Periplasma

3.4.1 Zellaufzucht

Bakterienstamm *Escherichia coli* SB536

Expressionsvector pIG-6 mit ompA-Signalsequenz, Flag-Peptid, Hexahistidintag, Faktor Xa-Schnittstelle und Ax1Ig1-4

Für die Vorkultur wurden 3-5 Einzelkolonien von einer LB-Agarplatte mit frisch transformierten Zellen mit einer Impfnadel in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt, der 50 ml LB-Medium und 50 mg/l Ampicillin enthielt. Diese Vorkultur wurde für 14 h bei 37°C und 220 Upm inkubiert. Anschließend wurden 1 l LB-Medium mit 50 mg/l Ampicillin in einem 2 l Schikane-Erlenmeyerkolben mit 10 ml Vorkultur angeimpft. Diese Hauptkultur wurde bei 30°C und 220 Upm bis zu einer OD₅₅₀ von 0.8 inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe einer sterilen IPTG-Stammlösung bis zu einer Endkonzentration von 0.1 mM induziert. Die Hauptkultur wurde danach für weitere 90 min bei gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 10 000 g und 4°C für 15 min geerntet.

3.4.2 Kalter osmotischer Schock

Beim kalten osmotischen Schock werden die Proteine aus dem Periplasma abgetrennt, indem die Aussenmembran der Bakterien permeabel gemacht wird, während gleichzeitig die cytosolische Membran intakt bleibt. Dazu wurde das Zellpellet in 250 ml eiskaltem KOS-Puffer A resuspendiert und unter leichtem Schütteln für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend für 20 min bei 10 000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abdekantiert. Anschließend wurde das Pellet in 250 ml eiskaltem KOS-Puffer B erneut resuspendiert und unter starkem Rühren für 10 min im Eisbad inkubiert. Die Zellen wurden danach durch Zentrifugation bei 10 000 g und 4°C für 15 min pelletiert. Der Überstand enthielt die periplasmatischen Proteine.

3.4.3 Ultrafiltration und Dialyse

Der Überstand nach dem kalten osmotischen Schock wurde in einer 350 ml-Ultrafiltrationszelle unter Verwendung einer Nitrozellulosemembran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa auf ein Endvolumen von 15 ml einkonzentriert. Die Ultrafiltration wurde bei einer Temperatur von 10°C und einem Überdruck von 1.3 bar durchgeführt. Anschließend wurden unlösliche Anteile durch Zentrifugation bei 100 000 g und 4°C für 30 min entfernt. Der Überstand wurde zur Entfernung von restlichem EDTA über Nacht gegen 1 l Standardreinigungspuffer bei 10°C dialysiert.

3.4.4 IMAC

Die nach der Ultrafiltration dialysierte Probe wurde auf eine in Standardreinigungspuffer äquilibrierte, mit NiSO₄ beladene IMAC-Säule mit einer Flussrate von 0.5 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde nicht selektiv bindendes Protein durch Spülen der Säule mit 80 ml Standardreinigungspuffer bei einer Flussrate von 0.5 ml/min entfernt. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 0-150 mM Imidazol in Standardreinigungspuffer bei einer Flussrate von 0.2 ml über ein Gesamtvolumen von 40 ml. Fraktionen im Bereich von 80-120 mM Imidazol wurden durch SDS-PAGE auf ihre Proteinzusammensetzung hin analysiert.

3.5 Isolierung von Ax1Ig1-4 aus dem Cytosol

3.5.1 Zellaufzucht

Bakterienstamm *Escherichia coli* AD494(DE3)

Expressionsvector pTFT mit Hexahistidintag, Faktor Xa-Schnittstelle und Ax1Ig1-4

In einem 100 ml Schikane-Erlenmeyerkolben wurden 50 ml LB-Medium, das 50 mg/l Ampicillin enthielt, mit 3-5 Einzelkolonien von einer Agar-Platte mit frisch transformierten Zellen angeimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C und 220 Upm inkubiert. Anschließend wurde ein 2 l Schikane-Erlenmeyerkolben mit 1 l LB-Medium, das 50 mg/l Ampicillin enthielt, mit 10 ml Vorkultur versetzt. Diese Hauptkultur wurde bei 28°C und 220 Upm bis zu einer OD₅₅₀ von 0.5 inkubiert, die nach etwa 7 h erreicht wurde. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe einer sterilen IPTG-Stammlösung bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Anschließend wurden die Zellen weitere 3 h bei gleichen Bedingungen inkubiert. Das Ernten der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 10000 g und 4°C für 15 min.

3.5.2 Zellaufschluss und Zentrifugation

Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet in 20 ml eiskaltem Standardreinigungspuffer resuspendiert, der zusätzlich 1 mM PMSF enthielt. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimaliges Durchlaufen einer vorgekühlten Druckentspannungszelle (French Press, Firma Amicon, Witten) bei einem Druck von 16 000 Psi. Anschließend wurden nicht aufgeschlossene Zellen sowie Membranbestandteile durch Zentrifugation bei 100 000 g und 4°C für 30 min pelletiert. Der Überstand wurde anschließend durch IMAC gereinigt.

3.5.3 IMAC

Zur Reduzierung der proteolytischen Aktivität wurde die Chromatographie bei 4°C durchgeführt. Der Überstand nach Zellaufschluss und Zentrifugation wurde mit einer Flussrate von 0.5 ml/min auf die mit NiSO₄ beladene, in Standardreinigungspuffer äquilibrierte IMAC-Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit 80 ml Standardreinigungspuffer mit einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen. In einem zweiten Schritt wurde die Säule mit 80 ml Standardreinigungspuffer gewaschen, der zusätzlich 50 mM Imidazol und 150 mM NaCl enthielt. Die Flussrate bei diesem Schritt betrug 0.1 ml/min. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradient von 0-150 mM Imidazol in Standardreinigungspuffer über ein Gesamtvolumen von 40 ml bei einer Flussrate von 0.5 ml/min.

3.6 Isolierung von Ax1-Ig1-4 aus Inclusion Bodies

3.6.1 Zellaufzucht

Bakterienstamm *Escherichia coli* BL21(DE3)

Expressionsvector pTFT mit Hexahistidintag, Faktor Xa-Schnittstelle und Ax1Ig1-4

Für die Vorkultur wurden 3-5 Einzelkolonien mit einer Impfnadel von einer Agarplatte mit frisch transformierten Zellen in einen 300 ml Schikane-Erlenmeyerkolben überführt, der 100 ml LB-Medium mit einer Ampicillinkonzentration von 50 mg/l enthielt. Die Vorkultur wurde für 14 h bei 32°C und 220 Upm inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 5 l 2xYT-Medium mit 100 mg/l Ampicillin in fünf 2 l Schikane-Erlenmeyerkolben verwendet. Die einzelnen Kolben wurden mit je 10 ml Vorkultur versetzt und bis zu einer OD₅₅₀ von 0.8 bei 37°C und 220 Upm inkubiert. Bei dieser Zelldichte, die nach etwa 3 h erreicht wurde, erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe einer sterilen IPTG-Stammlösung bis zu einer Endkonzentration von 1 mM. Anschließend wurden die Zellen weitere 3-5 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 10 000 g und 4°C für 15 min geerntet.

3.6.2 Isolierung der Inclusion Bodies

Das Zellpellet wurde in 50 ml deionisiertem Wasser resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimaliges Durchlaufen einer Druckentspannungszelle bei einem Druck von 16 000 Psi. Aus der resultierenden Suspension wurden die Inclusion Bodies durch 15-minütige Zentrifugation bei 10 000 g und 4°C abgetrennt. Der Zentrifugationsüberstand wurde verworfen, und das Pellet wurde in 50 ml deionisiertem Wasser resuspendiert. Nach erneuter, 15-minütiger Zentrifugation bei 10 000 g und 4°C wurden die gereinigten Inclusion Bodies in Form von etwa 1 g eines reinweißen Pellets erhalten.

3.6.3 Solubilisierung der Inclusion Bodies

Die Solubilisierung der vorgereinigten Inclusion Bodies erfolgte durch Resuspendierung in 50 ml denaturierendem Reinigungspuffer mit einer 5 ml Eppendorf-Pipette. Die Suspension wurde 30 min bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührer gerührt. Anschließend wurde zum Entfernen unlöslicher Bestandteile für 30 min bei 100 000 g und 20°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde verworfen und der Überstand durch IMAC weiter aufgereinigt.

3.6.4 IMAC

Die in denaturierendem Reinigungspuffer äquilibrierte, mit NiSO₄ beladene IMAC-Säule wurde mit dem solubilierten Inclusion Body Protein bei einer Flussrate von 0.5 ml/min beladen. Um nicht selektiv an die Chromatographiesäule bindendes Protein zu entfernen, wurde die Säule mit 180 ml denaturierendem Reinigungspuffer bei einer Flussrate von 0.2 ml/min gewaschen. Anschließend wurde gebundenes Protein mit einem linearen Gradienten von 0-150 mM Imidazol in denaturierendem Reinigungspuffer über ein Gesamtvolumen von 80 ml fraktionierend eluiert. Protein enthaltende Fraktionen zwischen 80 und 120 mM Imidazolkonzentration wurden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Die Reinheit der unter denaturierenden Bedingungen erhaltenen Ax1Ig1-4 Präparation betrug, abgeschätzt nach den Ergebnissen der SDS-PAGE, typischerweise über 90 % bei einer Ausbeute von 60-80 mg pro Liter Bakterienkultur.

3.7 In-vitro-Faltung und Reinigung von Ax1Ig1-4

3.7.1 Allgemeines zur In-vitro-Faltung von Proteinen

Für die In-vitro-Faltung von aus Inclusion Bodies gereinigtem Protein stehen eine Reihe unterschiedlicher Verfahren zur Verfügung, wobei die Ausbeuten der einzelnen Methoden bei Anwendung auf unterschiedliche Proteine oder Proteinklassen stark variieren. Es existiert also kein universell anwendbares Verfahren, sondern für jedes Protein müssen In-vitro-Faltungsbedingungen gefunden werden, bei denen befriedigende Ausbeuten von mehreren Prozent erreicht werden können.

Allen gängigen Verfahren ist gemeinsam, dass sie auf der kontrollierten Entfernung eines Denaturierungsmittels basieren. Die am häufigsten zu diesem Zweck verwendeten Substanzen sind Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid, die sowohl polare als auch hydrophobe Interaktionen von Aminosäuren unterdrücken und damit eine vollständige Solubilisation von aggregiertem Protein erlaubt. Überraschenderweise hat die Verwendung unterschiedlicher Denaturierungsmittel in einigen Fällen einen entscheidenden Einfluss auf die Faltungsausbeute. Die Entfernung des Denaturierungsmittel erfolgt entweder schnell, z. B. durch rasches Verdünnung in einer intensiv gerührten Lösung, oder besonders langsam, z. B. durch Dialyse. Eine Schlüsselrolle spielt bei allen Verfahren die Proteinkonzentration, da sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Faltung des Polypeptidmoleküls in die native Konformation in Konkurrenz zur Aggregation von ungefaltetem Protein oder von Faltungsintermediaten steht.

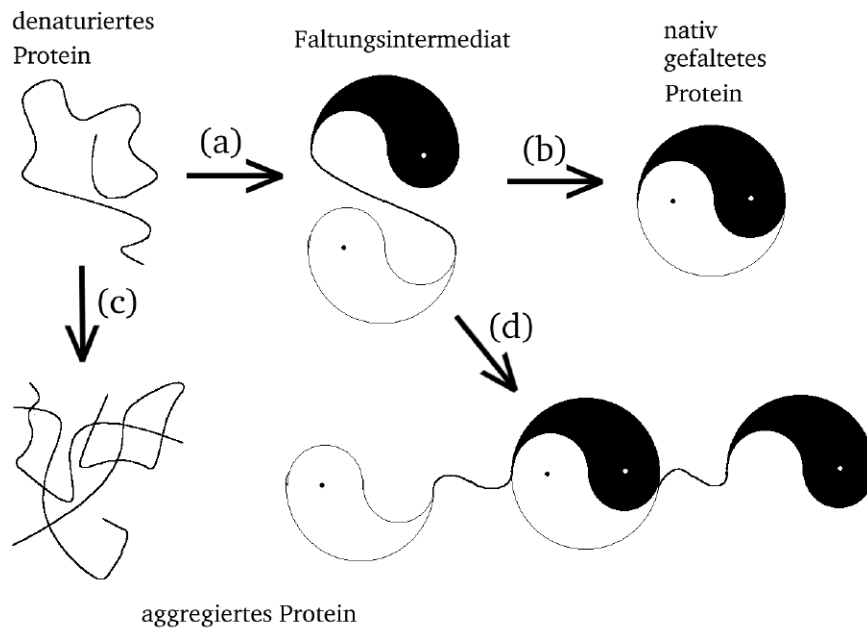


Abbildung 8 Schematische Abbildung der Faltung eines Proteins nach Buchner & Rudolph (1991). (a) und (b) sind monomolekulare, (c) und (d) höhermolekulare Reaktionen.

Die Faltung der Polypeptidkette sollte eine monomolekulare Reaktion darstellen bzw. sich aus mehreren monomolekularen Teilreaktionen zusammensetzen. Die Bildung von Aggregaten sollte dagegen einer Kinetik zweiter Ordnung folgen (Rudolph, 1990). Beträgt die kinetische Konstante für die Faltung k_1 und für die Aggregation k_2 , so ergibt sich aus diesem kinetischen Modell eine Ausbeute y in % in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration an denaturiertem Protein D_0 zu

$$y = 100 \cdot \frac{k_1}{D_0 \cdot k_2} \cdot \ln \left(1 + \frac{D_0 \cdot k_2}{k_1} \right).$$

Niedrige Ausgangskonzentrationen begünstigen daher das Erreichen hoher Rückfaltungsausbeuten. Da unter praktischen Aspekten das Arbeiten mit großen Volumina ungünstig ist, verwendet man meist Proteinkonzentrationen von 50-100 $\mu\text{g/ml}$.

Ein zusätzliches Problem besteht, wenn das zu faltende Protein in seiner nativen Konformation Disulfidbrücken enthält. Da diese in vielen Fällen zur thermodynamischen Stabilität des Proteins einen großen Anteil beitragen, ist die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken meist essentiell für die Faltung. Eine statistische Paarung würde bei Proteinen mit mehreren Disulfidbrücken die mögliche Ausbeute dramatisch verringern, da sich die Anzahl z der möglichen Kombinationen von Disulfidbrücken für ein Protein mit n Cysteinen ergibt zu

$$z = \frac{n!}{2^{n/2} \cdot n/2}.$$

Damit ergeben sich z. B. für Ax1Ig1-4, das 8 Cysteine enthält, 105 theoretische Paarungsmöglichkeiten, so dass bei statistischer Paarung der Cysteine eine maximale Ausbeute von weniger als 1 % erreicht werden könnte. Eine Lösung dieses Problems stellt oft

die In-vitro-Faltung in Gegenwart eines Redoxsystems dar, das die ständige Bildung und Spaltung von Disulfidbrücken erlaubt (Abb. 9). Dabei bilden sich präferenziell die für die native Faltung korrekten Disulfidbrücken, da diese durch die Faltung des übrigen Proteins thermodynamisch stabilisiert werden. In der Praxis hat sich als Redoxsystem die Verwendung von 1-3 mM reduziertem Glutathion und einem Fünftel bis zu einem Zehntel dieser Konzentration an oxidiertem Glutathion etabliert (Rudolph, 1990).

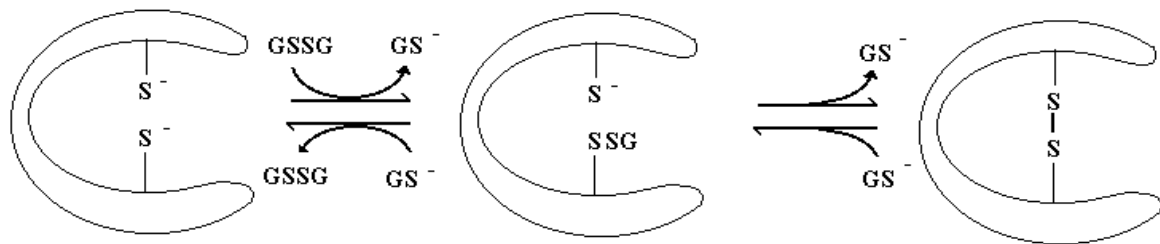


Abbildung 9 In Gegenwart von oxidiertem ($GSSG$) und reduziertem (GS^-) Glutathion können Disulfidbrücken reversibel gebildet und gespalten werden.

Für die In-vitro-Faltung von Ax1Ig1-4 wurde eine Methode verwendet, die für die Faltung von F_{ab} -Fragmenten optimiert wurde. Diese Methode schien besonders geeignet, da F_{ab} -Fragmente wie der N-terminale Molekülteil von Axonin-1 aus Ig-Domänen aufgebaut sind. Für die Faltung beider Proteine sollten also ähnliche kinetische und thermodynamische Parameter eine Rolle spielen. Im Falle des F_{ab} -Fragments konnten Ausbeuten bis zu 40 % erhalten werden.

3.7.2 In-vitro-Faltung von Ax1Ig1-4

Die Proteinlösung in denaturierendem Reinigungspuffer wurde durch Zugabe von 9.25 mg (60 μ mol) festem DTE pro mg Protein vollständig reduziert. Die reduzierte Proteinlösung wurde anschließend unter starkem Rühren tropfenweise zum Rückfaltungspuffer zugegeben, der auf 10°C vorgekühlt und entgast worden war. Die Endkonzentration des Proteins betrug 50 mg/l. Anschließend wurde unter Luftausschluss und bei schwachem Rühren 8-12 Wochen bei Kühlraumtemperatur (etwa 10°C) inkubiert.

3.7.3 Ultrafiltration

Makroskopisch sichtbare Proteinaggregate wurden durch Filtration mit einem Papierfilter entfernt. Der Durchlauf wurde mit einer 350 ml-Rührzelle (Amicon, Witten) unter Verwendung einer Nitrozellulosemembran mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa auf ein Endvolumen von 10 ml eingengt. Die Ultrafiltration wurde bei einer Temperatur von 10°C und einem Überdruck von 1.3 bar durchgeführt. Die weitere Probenbehandlung richtete sich danach, welches Chromatographieverfahren im Anschluss verwendet wurde. Für die Gelpermeationschromatographie wurde die Probe auf ein Endvolumen von 400 μ l unter Verwendung von Centricons (Amicon, Witten) aufkonzentriert. Für die Ionenaustauschchromatographie wurde die Probe auf ein 10-faches Volumen mit deionisiertem Wasser verdünnt.

3.7.4 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Zu der auf ein Volumen von 400 µl aufkonzentrierten Probe wurden 100 µl Glycerin pipettiert. Nach gründlichem Durchmischen wurde die Probe auf die in GPC-Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen, indem die Flüssigkeitssäule über dem Gelmaterial vorsichtig mit der dichteren Probe unterschichtet wurde. Die Trennung erfolgte mit 40 ml GPC-Puffer bei einer Flussrate von 0.2 ml/min. Monomeres Ax1Ig1-4 eluierte bei einem apparenten Molekulargewicht von 40-45 kDa. Protein enthaltende Fraktionen in diesem Bereich wurden vereinigt und gegen ein 100-faches Volumen Kristallisationspuffer dialysiert.

3.7.5 Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Um eine Bindung von Ax1Ig1-4 an die IEC-Säule zu erreichen, musste die Chloridkonzentration weniger als etwa 100 mM betragen. Dazu wurde die in Rückfaltungspuffer befindliche Probe entweder auf das 10-fache Volumen mit deionisiertem Wasser verdünnt oder über Nacht gegen IEC-Puffer bei 4°C dialysiert. Anschließend wurde die Probe mit einer Flussrate von 2 ml/min auf eine in IEC-Puffer äquilibrierte Anionenaustauschchromatographiesäule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 80 ml IEC-Puffer bei gleicher Flussrate gewaschen. Das Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 0-250 mM NaCl in IEC-Puffer über ein Gesamtvolumen von 80 ml von der Säule eluiert, wobei eine Flussrate von 1 ml/min verwendet wurde. Ax1Ig1-4 eluierte bei etwa 125 mM NaCl als scharfer Peak. Fraktionen in diesem Bereich wurden vereinigt und gegen ein 100-faches Volumen Kristallisationspuffer über Nacht bei 4°C dialysiert.

3.8 In-vitro-Faltung und Reinigung von E587-Antigen (Ig1-4)

Die einzelnen Schritte wurden mit E587-Antigen (Ig1-4) in gleicher Weise durchgeführt, wie unter 2.6 und 2.7 für Ax1Ig1-4 beschrieben wurde.

3.9 Proteinbestimmung

3.9.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Fünf 1 ml Plastikküvetten wurden mit je 800 µl deionisiertem Wasser gefüllt. Zu diesen wurden 0 µl (Blindprobe), 1 µl, 3 µl, 5 µl, 7 µl und 9 µl der zu bestimmenden Proteinprobe zupipettiert. Anschließend wurde in jede Küvette 200 µl Bio-Rad Proteinfärbelösung zupipettiert. Die Küvetten wurden mit Parafilm verschlossen und der Inhalt wurde durch mehrfaches Wenden durchgemischt. Anschließend wurde die Absorption der Protein enthaltenden Proben gegen die Blindprobe gemessen. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden grafisch gegen das verwendete Probenvolumen aufgetragen. In gleicher Weise wurde mit einer Standardproteinlösung verfahren. Als Standard diente eine 1.35 mg/ml enthaltende Lösung von IgG aus Rinderserum in 50 mM Tris-Cl, pH 8.5. Aus dem Verhältnis der Steigungen der erhaltenen Ausgleichsgeraden ergab sich die Proteinkonzentration der unbekannt Probe aus:

$$c = 1.35 \text{ mg/ml} \cdot \frac{\text{Geradensteigung (Probe)}}{\text{Geradensteigung (Standard)}}$$

3.9.2 Proteinbestimmung durch Absorptionsspektroskopie bei 280 nm

Der Extinktionskoeffizient eines Proteins lässt sich aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung bestimmen (Gill & Hippel, 1989). Die Extinktion bei 280 nm errechnet sich zu:

$$\epsilon_{280} = (n_W \cdot \epsilon_W) + (n_Y \cdot \epsilon_Y) + (n_C \cdot \epsilon_C)$$

mit n_W , n_Y , n_C : Anzahl der absorbierenden Reste

$$\begin{aligned}\epsilon_W &= 5690 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ \epsilon_Y &= 1280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ \epsilon_C &= 60 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\end{aligned}$$

Damit ergibt sich unter Annahme eines relativen Molekulargewichts von $M_r = 43\,000$ und einer Schichtdicke von 1 cm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Konzentration von Ax1Ig1-4 zu:

$$c[\text{mg/ml}] = \frac{\ddot{A}E_{280} \cdot M_r \cdot d}{\ddot{a}_{280}} \approx \ddot{A}E_{280} \cdot 0.67 \text{ mg/ml}$$

3.10 SDS-PAGE

3.10.1 Probenvorbereitung

Um bei der verwendeten Methode eine optimale Trennung zu erreichen, ist eine Proteingesamtmenge von 1-5 μg günstig. Das entsprechende Volumen Probelösung wurde in ein 1.5 ml Eppendorfhütchen pipettiert und mit 1 ml bei -20°C vorgekühltem Azeton versetzt. Nach gründlichem Durchmischen wurde 30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde für 15 min bei 10 000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert. Verbleibendes Azeton wurde mit einem Fön entfernt. Das Pellet wurde in 5 μl SDS-PAGE-Puffer resuspendiert und 5 min im kochenden Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden je 3 μl der Proben auf den Probenapplikator pipettiert und mit dem Probenkamm auf das Gel aufgetragen.

3.10.2 Probentrennung

Die Bedingungen zur Probentrennung waren von der Verwendung der unterschiedlichen Gelsorten abhängig. Das Gelbett wurde während der Trennung auf 18°C temperiert.

Gelsorte	Spannung	Stromstärke	Laufzeit
Gradient 10-15	250 V	5 mA	90 min
Homogenous 20	250 V	10 mA	120 min

3.10.3 Färbung der Gele

Die Färbung der Gele erfolgte in der Färbereinheit eines PHAST-Systems (Pharmacia, Freiburg). In einem ersten Schritt wurden die Gele in Färbelösung für 20 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde das Gel in drei aufeinander folgenden Schritten mit jeweils frischer Entfärbelösung für je 10 min bei 50°C inkubiert. In einem letzten Schritt wurde das Gel für 5 min mit einer Konservierungslösung bei 50°C behandelt. Danach wurden die Gele an der Luft getrocknet.

3.11 Dynamische Lichtstreuung

Die Brown'sche Molekularbewegung führt zu einer Fluktuation in den Intensitäten von gestreutem Licht. Die Messung dieser Fluktuation erlaubt die Bestimmung eines Diffusionskoeffizienten D_T , aus dem sich der hydrodynamische Radius R_H der streuenden Partikel nach der Stokes-Einstein-Beziehung ergibt zu

$$R_H = \frac{k_b \cdot T}{6\pi\zeta D_T}$$

Es wurde ein DynaPro-801 Lichtstreugerät (Protein Solutions, USA) verwendet, das mit einem 20 mW Laser ausgestattet ist. 200 µl der Probe wurden durch ein Filter in die Probenkammer injiziert. Die Messtemperatur betrug 17°C.

Probe: 3 mg/ml Ax1Ig1-4 in 25 mM Tris-Cl, 120 mM NaCl, pH 8.5

3.12 CD-Spektroskopie

Instrumentparameter:

Zellenlänge	1 mm	Messtemperatur	4°C
Wellenlänge	260-190 nm	Bandbreite	1.0 nm
Auflösung	0.2 nm	Ansprechzeit	4 s
Akkumulation	10	Geschwindigkeit	50 nm/min

Probe: 3 mg/ml Ax1Ig1-4 in 25 mM Tris-Cl, 120 mM NaCl, pH 8.5

3.13 Kristallisation

Für die Kristallisation von Proteinen werden viele, sehr unterschiedliche Verfahren verwendet. Den am häufigsten benutzten Verfahren ist gemeinsam, dass die Kristallisation durch langsame, kontrollierte Erhöhung der Konzentration einer Substanz erreicht wird, die mit dem Protein um Solvensmoleküle konkurriert. Als sogenanntes Fällungsmittel werden neben Salzen wie Ammoniumsulfat oder NaCl vor allem gut lösliche, organische Polymere wie Polyethylenglykol verwendet. Die mit Abstand am häufigsten verwendete apparative Anordnung zur langsamen Erhöhung der Fällungsmittelkonzentration ist die Gasdiffusionsmethode. Bei diesem Verfahren befinden sich in einem gasdichten Kristallisationsbehälter zwei voneinander getrennte Flüssigkeitsbereiche. Der erste enthält zu

Beginn des Kristallisationsprozesses neben dem Protein eine niedrige Konzentration des Fällungsmittels, der zweite Flüssigkeitsbereich, der meist ein größeres Volumen umfasst und Reservoirlösung genannt wird, enthält das Fällungsmittel in einer höheren Konzentration. Da beide Flüssigkeitsbereiche über die Gasphase miteinander Solvensmoleküle austauschen, kommt es durch den osmotischen Effekt zu einer langsamen Angleichung der Fällungsmittelkonzentrationen. Dabei wird der Löslichkeitspunkt des Proteins überschritten und es kommt im günstigen Fall zur Bildung von Proteinkristallen, im ungünstigen Fall zur Bildung eines amorphen Niederschlags. Bei der praktischen Durchführung der Gasdiffusionsmethode unterscheidet man zusätzlich zwischen der Sitting-Drop-Methode, bei der der Protein enthaltende Tropfen in eine Vertiefung pipettiert wird, und der Hanging-Drop-Methode, bei der der Tropfen hängend an ein silikonisiertes Deckglas angebracht wird.

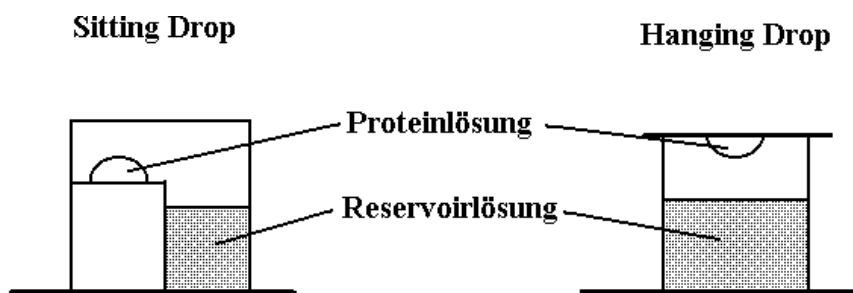


Abbildung 10 Versuchsanordnungen bei der Kristallisation von Proteinen mit der Gasdiffusionsmethode.

Die Kristallisation von Ax1Ig1-4 und E587-Antigen erfolgte nach der Sitting-Drop-Methode in Mikrotiterplatten. Dazu wurden in der Mitte der Platten sechs Vertiefungen mit Filzstift markiert. In diese Vertiefungen wurden je 5 μl einer Lösung, die 3 mg/ml Protein in Kristallisationspuffer enthielt, und 5 μl Vorsättigungspuffer pipettiert. Anschließend wurden in den übrigen Vertiefungen 750 μl Reservoirlösung verteilt. Die Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm verschlossen und bei 17°C bei der Kristallisation von Ax1Ig1-4 bzw. bei 10°C bei der Kristallisation von E587-Antigen gelagert. Die Wachstumszeit der Kristalle betrug für beide Proteine etwa 2-4 Wochen.

3.14 Derivatisierung von Kristallen

Zur Derivatisierung der Proteinkristalle wurden, soweit aus Löslichkeitsgründen möglich, 5 millimolare Stammlösungen der Schwermetallatomsalze in Reservoirpuffer hergestellt. Bei Salzen mit geringerer Löslichkeit wurden gesättigte Lösungen in Reservoirpuffer verwendet. Von den resultierenden Derivatisierungslösungen wurde je 1 μl zu den Kristallansätzen pipettiert. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten mit Parafilm wieder fest verschlossen und zwischen 24 und 72 h bei 17°C inkubiert. Danach wurden die Kristalle für die Datenaufnahme schockgefroren.

3.15 Schockgefrieren von Kristallen

Für das Schockgefrieren der Proteinkristalle war wichtig, dass die Zugabe der Frostschutzlösung sehr langsam erfolgte. Dazu wurden zu den Kristallisationsansätzen 15-mal in Abständen von 15 min je 1 µl Cryolösung zupipettiert. Um ein Austrocknen der Kristallisationsansätze zu vermeiden, wurden die Mikrotiterplatten zwischen den einzelnen Zugaben jeweils wieder fest verschlossen. Anschließend wurden die Kristalle mit einem Cryoloop aus dem Kristallansatz in flüssigen Stickstoff überführt. Bis zur Datenaufnahme wurden sie in einem Dewar-Gefäß in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.16 R-Faktoren und verwandte Größen

3.16.1 Symmetrie-R-Faktor

Der Symmetrie-R-Faktor ergibt sich aus dem Vergleich der gemessenen Intensitäten von symmetrieverwandten Reflexen nach:

$$R_{\text{sym}}(I) = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$$

Der Symmetrie-R-Faktor wird herangezogen, um zu überprüfen, ob die bei der Datenreduktion verwendete Fehlerabschätzung korrekt ist. So sollten symmetrieverwandte Reflexe im Mittel eine Differenz aufweisen, die dem für den Reflex angenommenen Fehler entspricht. Für die Beurteilung der Datenqualität ist der Symmetrie-R-Faktor nur begrenzt geeignet, da er stark von der Redundanz der Messung abhängt (Diederichs & Karplus, 1996).

3.16.2 Kristallographischer R-Faktor

Der kristallographische R-Faktor beschreibt die Übereinstimmung eines Modells mit den gemessenen Röntgendaten nach:

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$$

Er wird zur Beurteilung des Fortschreitens einer Modellverfeinerung und zur Bewertung potentieller Lösungen bei der Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz verwendet. Ein nicht verfeinertes Proteinmodell besitzt typischerweise einen kristallographischen R-Faktor um 50 %, während ein gut verfeinertes Modell, abhängig von der Datenqualität und einigen Moleküleigenschaften, einen R-Faktor von etwa 18 bis 25 % aufweist.

3.16.3 Freier R-Faktor

Der freie R-Faktor errechnet sich analog zum kristallographischen R-Faktor nach:

$$R_{\text{free}} = \frac{\sum_{hkl \subset T} \left| |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{hkl \subset T} |F_{\text{obs}}|}$$

Dabei bedeutet $hkl\subset T$, dass die Reflexe Elemente eines Testsets sind, der für die Verfeinerung des Modells nicht verwendet wird. Der Testset sollte je Anzahl unabhängiger, gemessener Reflexe zwischen 2 und 10 % der Reflexe enthalten, möglichst jedoch mindestens etwa 1000. Anstelle des kristallographischen R-Faktors, der alle Reflexe umfaßt, verwendet man meist zusammen mit dem R_{free} einen R_{work} , für dessen Berechnung die Reflexe mit $hkl\subset T$ benutzt werden. Die Verwendung des R_{free} soll ein "Overfitting" von Daten verhindern, die sich bei der Verfeinerung in einem Ansteigen des R_{free} bemerkbar macht. Die Differenz zwischen R_{free} und R_{work} sollte für das finale Modell nur etwa 5-10 % betragen. Darüber hinaus wird der R_{free} bei der Verfeinerung zum Wichten des kristallographischen Terms gegen den auf idealen Bindungswinkeln und -abständen basierenden theoretischen Term verwendet (Kapitel 3.23).

3.16.4 Real Space R-Faktor und Real Space Korrelation

Der Real Space R-Faktor beschreibt die Übereinstimmung zwischen durch das Modell erklärter und beobachteter Elektronendichte nach:

$$R_{\text{real space}} = \frac{\sum |\tilde{n}_{\text{obs}} - \tilde{n}_{\text{calc}}|}{\sum |\tilde{n}_{\text{obs}} + \tilde{n}_{\text{calc}}|}.$$

Anders als der kristallographische R-Faktor, der nur die Übereinstimmung des Gesamtmodells mit den gemessenen Daten beschreiben kann, läßt sich so die Qualität des Modells für bestimmte Bereiche wie z. B. einzelne Aminosäuren beurteilen. Anstelle des Real Space R-Faktors wird oft ein Korrelationskoeffizient verwendet, der sich ergibt nach:

$$K_{\text{real space}} = 1 - R_{\text{real space}}.$$

3.16.5 Phasing Power

Die Phasing Power wird verwendet, um bei der Suche nach Schwermetallatomderivaten für die Phasenbestimmung durch multiplen isomorphen Ersatz den Beitrag einzelner Derivate zur Phasenbestimmung und damit deren Qualität zu beurteilen. Für die Phasenbestimmung verwertbare Derivate sollten eine Phasing Power von mindestens 1 für Daten bis etwa 3 Å aufweisen. Die Phasing Power ist definiert als:

$$PP = \left[\frac{\sum_n |F_H|^2}{\sum_n |E|^2} \right]^{1/2} \text{ mit } \sum_n |E|^2 = \sum_n \{ |F_{PH}|(\text{obs}) - |F_{PH}|(\text{calc}) \}^2.$$

3.16.6 Figure of Merit

Die Figure of Merit wird als Maß für die Qualität der experimentellen Phasen verwendet. Um eine gut interpretierbare Elektronendichtekarte zu erhalten, sollte die Figure of Merit über einen Auflösungsbereich bis 3 Å mindestens 0.5 betragen. Die Figure of Merit ist definiert als:

$$m = \frac{|F(hkl)_{\text{best}}|}{|F(hkl)|} \text{ mit } F(hkl)_{\text{best}} = \frac{\sum_{\vec{a}} P(\vec{a}) F_{\text{hkl}}(\vec{a})}{\sum_{\vec{a}} P(\vec{a})}.$$

3.17 Röntgenquellen

Für die Erzeugung von Röntgenstrahlung werden in der Proteinkristallographie üblicherweise zwei Arten von Strahlungsquellen benutzt: Mittels einer Drehanode kann im Laboralltag für die Kristallographie geeignete Röntgenstrahlung erzeugt werden, während die an Elektronensynchrotrons entstehende Röntgenstrahlung nur an wenigen Orten in Europa, z. B. am DESY in Hamburg oder am ESRF in Grenoble, zur Verfügung stehen. Für die vorliegende Arbeit wurden beide Arten von Strahlungsquellen verwendet und werden im Folgenden kurz beschrieben.

3.17.1 Die Drehanode

Die Drehanode besteht aus einer Glühkathode aus Wolframdraht, die unter Hochvakuum in einer geschlossenen Glas- oder Metallröhre einer Anode gegenüberliegt. Beim Aufheizen der Kathode auf etwa 4000°C werden Elektronen emittiert, die durch Anlegen einer Hochspannung in Richtung Anode beschleunigt werden. Beim Auftreffen auf die Anode entsteht Bremsstrahlung, die sich über einen Wellenlängenbereich zwischen 0.3 und 1.5 Å erstreckt. Zusätzlich entsteht Strahlung definierter Wellenlänge, da die beschleunigten Elektronen im Anodenmaterial andere Elektronen aus Energieniveaus mit niedriger Hauptquantenzahl herausschlagen. Die leeren Energieniveaus werden aus energetisch höheren Niveaus wieder aufgefüllt. Aus der Differenz zwischen beiden Energieniveaus ist die Energie der beim Übergang emittierten Strahlung vorgegeben. In der Proteinkristallographie wird meist eine Kupferanode verwendet, bei der beim Übergang von der L- zur K-Schale eine Strahlung der Wellenlänge $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$ entsteht. Der auftreffende Elektronenstrahl erzeugt eine starke Aufheizung des Anodenmaterials, so dass zur besseren Kühlbarkeit an Stelle einer starren Anode ein rotierender Zylinder verwendet wird, woraus sich der Name Drehanode ableitet.

Einstellungen:

Spannung	Stromstärke	Rotation
40 kV	100 mA	4000 Upm

3.17.2 Synchrotronstrahlung

In einem Synchrotron werden geladene Partikel auf relativistische Geschwindigkeiten beschleunigt und unter dem Einfluss starker Magnetfelder auf einer Kreisbahn gehalten. Bei der Ablenkung verlieren die Partikel Energie und emittieren nach den Maxwell-Gesetzen Strahlung mit einem kontinuierlichen Spektrum von etwa 0.1-100 Å, aus dem unter Verwendung eines Monochromators ein schmaler Bereich ausgeblendet werden kann. Die Vorteile der Synchrotronstrahlung bestehen in der sehr hohen Intensität und der Veränderbarkeit der Wellenlänge. Letzteres ist vor allem für die Phasenbestimmung durch MAD von Bedeutung, bei der die Datenaufnahme bei mehreren, sehr genau bestimmten

Wellenlängen erforderlich ist. Für die vorliegende Arbeit wurden Messungen an den Messständen X11 und X31 am DESY in Hamburg durchgeführt.

3.18 Image-Plate-Detektoren

Es wurden Image-Plate-Detektoren verschiedener Hersteller verwendet. Detektoren dieses Typs enthalten eine runde Trägerplatte, auf der sich mit Europium dotiertes BaFCl befindet. Unter der Einwirkung von Röntgenstrahlung werden Elektronen in einen metastabilen Zustand angeregt, wobei der Übergang in den Grundzustand spinverboten ist. Die Halbwertszeit des angeregten Zustands beträgt etwa 10 h. Beim Auslesen der Reflexe wird die Platte mit einem He-Ne-Laser bestrahlt. Dadurch werden die Elektronen aus ihrem metastabilen Zustand in einen instabilen angeregt, aus dem sie unter Emission von kurzwelligem Licht in den Grundzustand übergehen. Das während des Scanvorgangs emittierte Licht wird mit einem Photomultiplier registriert und von einem Rechner in ein digitales Beugungsbild umgewandelt.

3.19 Raumgruppenbestimmung und Datenreduzierung

Die Raumgruppenbestimmung erfolgte für alle Datensätze mit dem Programmpaket Denzo/Scalepack sowie davon unabhängig mit dem Programm XDS. Anschließend wurden die Statistiken beider Auswertungen verglichen und in allen weiteren Schritten wurden die Daten der Auswertung verwendet, bei der die R_{sym} -Werte geringer waren. Im Allgemeinen waren die Unterschiede in der Datenqualität sehr gering.

3.19.1 Programmpaket Denzo/Scalepack

Die Datenreduktion mit diesem Programmpaket ist in zwei Prozesse gegliedert: In einem ersten Schritt werden mit dem Programm Denzo die Reflexe einzelner Beugungsbilder indiziert und integriert. Diese Daten werden anschließend mit dem Programm Scalepack skaliert, statistisch bewertet und zu einem Datensatz zusammengefasst. Im Detail wurden die Teilschritte wie folgt durchgeführt.

Denzo

Als Interface zur interaktiven Steuerung von Denzo wurde das Programm Xdisplay verwendet. Aus dem ersten Beugungsbild eines Datensatzes wurden etwa 200 starke Reflexe ausgewählt, aus denen sich das Bravais-Gitter, die Zellparameter und die Anfangsorientierung des Kristalls ergaben. Anschließend wurden eine Reihe experimenteller Parameter wie z. B. Detektorabstand oder -ursprung verfeinert. Interaktiv wurden zusätzlich die Mosaizität und die Reflexgröße optimiert. Basierend auf den anhand des ersten Beugungsbildes optimierten Parametern wurden danach alle weiteren Beugungsbilder eines Datensatzes automatisch indiziert und integriert.

Scalepack

Mit Scalepack wurden, basierend auf der größeren Datenmenge des gesamten Datensatzes, bestimmte Parameter wie z. B. die Zellachsen nachverfeinert. Die einzelnen Bilder wurden aufeinander skaliert und auf mehreren Bildern partiell gemessene Reflexe wurden zu Gesamtreflexen addiert. Zusätzlich wurden Qualitätskriterien überprüft, die zum Aussortieren einzelner Reflexe führten. Am Ende der Datenreduzierung wurde eine Datei erhalten, die für jeden gemessenen Reflex, der den Qualitätskriterien entsprach, die Intensität sowie den

abgeschätzten Messfehler dazu enthielt. Außerdem wurden verschiedene statistische Werte zur Beurteilung der Datenqualität wie z. B. der Symmetrie-R-Faktor für den gesamten Datensatz und für einzelne Beugungsbilder berechnet.

3.19.2 XDS

Die Datenreduktion mit XDS (Kabsch, 1988) gliedert sich in eine Reihe von Einzelschritten, die im folgenden kurz skizziert werden.

INIT

Anhand der ersten Beugungsbilder wird der Untergrund sowie der zuverlässige Bereich des Detektors bestimmt.

COLSPOT

Aus den ersten Bildern werden starke, also verlässlich gemessene Reflexe bestimmt, die in den weiteren Schritten benötigt werden.

IDXREF

Aus den in COLSPOT erhaltenen Reflexen werden das Bravais-Gitter, die Zellparameter sowie die Kristallorientierung bestimmt.

COLPROF

Es werden 3-dimensionale Reflexprofile erstellt, die eine Beurteilung der Qualität einzelner Reflexe und eine Korrektur nur partiell gemessener und überlappender Reflexe erlaubt.

PROFIT

Die Reflexintensitäten werden bestimmt und Reflexe, die zu starke Abweichungen von den Reflexprofilen aufweisen, werden aussortiert.

CORRECT

Die Reflexintensitäten werden um verschiedene Faktoren korrigiert, die z. B. die Luftabsorption berücksichtigen. Ausserdem werden Statistiken zur Datenqualität errechnet. Dieser Schritt erzeugt die Datei mit den Reflexintensitäten des gesamten Datensatzes.

GLOREF

Anhand starker Reflexe aus dem gesamten Messbereich werden erneut die Zellparameter, die Orientierungsmatrix und der Detektorabstand verfeinert. Weichen diese deutlich von den vorläufig in IDXREF bestimmten Parametern ab, werden mit den verbesserten Parametern die Schritte ab COLPROF wiederholt.

XSCALE

Mit diesem Programm lassen sich mehrere Datensätze vereinigen. Ausserdem können Statistiken für einen definierten Auflösungsbereich erzeugt werden.

3.20 Phasenbestimmung

3.20.1 Molekularer Ersatz

3.20.1.1 Versuche zur Phasenbestimmung unter Verwendung des Hemolin-Suchmodells

Für die Versuche zur Phasenbestimmung anhand der Struktur von Hemolin aus *Hyalophora cecropia* wurde zuerst das unmodifizierte Proteinmodell mit dem PDB-Code 1bih verwendet. Zusätzlich wurden durch Mutation aller Aminosäuren ausser Glyzin zu Alanin bzw. Serin mit dem Programm Moleman (Kleyweg & Jones, 1997) ein Polyalanin- und ein Polyserinmodell erzeugt. Ausserdem wurde ein Modell erzeugt, bei dem mit dem Programm o ausschließlich Reste zu Alanin mutiert wurden, die im Sequenzvergleich beider Proteine nicht identisch waren. Basierend auf diesem Modell wurde ein weiteres erzeugt, bei dem die Besetzungszahlen aller Atome in Bereichen mit hohen Temperaturfaktoren, die vor allem in Schleifen zwischen den Faltblättern lagen, auf 0 gesetzt wurden.

Mit allen Modellen wurde mit dem Programm CNS eine Rotationssuche unter Verwendung eines Auflösungsgebietes von 20-3 Å durchgeführt. Anschließend wurden jeweils für die 200 Orientierungen, die die höchsten Korrelationen aufwiesen, eine Pattersonkorrelations-Verfeinerung mit anschließender Translationssuche durchgeführt. Für jede Lösung wurden zusätzlich 20 Zyklen Rigid-Body-Verfeinerung durchgeführt. Die Qualität der erhaltenen Lösungen wurden anhand der resultierenden R-Faktoren und der Raumerfüllung beurteilt. Für die besten Lösungen wurden mit dem Programm o kontrolliert, ob sie ein dreidimensionales, nicht überlappendes Raumgitter aufbauen konnten.

3.20.1.2 Phasenbestimmung der Kristallformen B-E von Ax1Ig1-4

Zur Phasenbestimmung der Kristallformen B-E wurde das in Kristallform A verfeinerte Modell benutzt. Für die Kristallformen B, C und E wurden eindeutige Lösungen der Rotationsfunktion erhalten, die nach der Translationssuche das korrekte Positionieren der Proteinmoleküle in der Elementarzelle ermöglichte. Da die asymmetrische Einheit in Kristallform D zwei Proteinmoleküle umfasste, wurde aus zwei in Kristallform A benachbarten Molekülen ein Dimer erstellt und zur Rotationssuche benutzt. Eine Translationssuche unter Verwendung der besten Lösung der Rotationssuche führte auch in diesem Fall zu der eindeutig korrekten Lösung.

3.20.2 Bestimmung der Schwermetallatompositionen

Zur Bestimmung der Schwermetallpositionen wurde das Programm Solve (Terwilliger & Berendzen, 1999) verwendet. Die Daten wurden skaliert und aus diesen Daten wurden Differenzpattersonkarten erzeugt. Die automatische Interpretation der Differenzpattersonkarten lieferte zwei Platinpositionen, denen Besetzungszahlen und Temperaturfaktoren zugeordnet wurden. Ausserdem wurden Phasen und dazugehörige Statistiken (z. B. die Figure of Merit) berechnet, die eine Bewertung der Qualität des Derivats bzw. der MAD-Phasen erlaubten. Die errechneten Parameter dienten als Ausgangspunkt für die Verfeinerung.

3.20.3 Verfeinerung der Schwermetallparameter

Zur Verfeinerung der Schwermetallatomparameter wurde das Programm Sharp (de la Fortelle & Bricogone, 1997) benutzt. Ausgehend von den mit Solve erhaltenen Parametern wurden

Schwermetallatompositionen, Besetzungszahlen und anisotrope Temperaturfaktoren verfeinert. Bei der Phasenbestimmung mit den MAD-Daten wurden zusätzlich die Streufaktoren f' und f'' ausgehend von den Literaturdaten verfeinert. Eine Einbeziehung der nativen Daten in die MAD-Phasenbestimmung führte zu einer Verschlechterung der Phasenqualität und wurde daher nicht verwendet.

3.20.4 Iterative Solvensglättung

Die Methode der iterativen Solvensglättung benutzt, dass in Proteinkristallen nur etwa die Hälfte des Volumens durch Proteinmoleküle ausgefüllt wird, während der übrige Bereich weitgehend ungeordnete Solvensmoleküle enthält. Mit den experimentellen Phasen wird eine Elektronendichtekarte erzeugt. Bereiche mit niedriger mittlerer Elektronendichte werden als Solvensbereiche angesehen, und in diesen Bereichen wird die Elektronendichte auf den mittleren Wert in der Elementarzelle gesetzt. Mit Hilfe dieser Information werden die experimentellen Phasen modifiziert, woraus sich eine verbesserte Elektronendichte ergibt, die wiederum deutlicher abgegrenzte Solvensbereiche aufweist. Die iterative Solvensglättung wurde mit dem Programm Solomon (Abrahams & Leslie, 1996) durchgeführt. Es wurden 200 Zyklen mit einem Solvensanteil von 48 % gerechnet.

3.21 Elektronendichtekarten

3.21.1 Experimentelle Elektronendichtekarten

Aus den experimentell bestimmten Phasen und den gemessenen Intensitäten ergibt sich die experimentelle Elektronendichte ρ_{exp} zu

$$\tilde{n}_{\text{exp}}(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\tilde{a}_{\text{exp}}].$$

Die experimentelle Elektronendichtekarte wurde mit dem Programm fft unter Verwendung der durch der Solvensglättung modifizierten Phasen erzeugt und zur Erstellung des ersten Modells benutzt.

3.21.2 Differenzelektronendichtekarten

Eine Differenzelektronendichtekarte wird berechnet aus den Differenzen der beobachteten und der aus dem aktuellen Modell errechneten Amplituden. Da die besten zur Verfügung stehenden Phasen die Modellphasen α_{calc} sind, benutzt man

$$\tilde{n}_{\text{diff}}(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\tilde{a}_{\text{calc}}].$$

Differenzelektronendichtekarten benutzt man zu Identifizierung von Fehlern im Modell anhand von negativer oder positiver Differenzelektronendichte. Sie wurden mit dem Programm CNS erzeugt.

3.21.3 $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarten

Eine analog zur experimentellen Elektronendichtekarte erzeugte Karte mit Modellphasen kommt für die Verbesserung des Proteinmodells normalerweise nicht zur Anwendung, da

diese durch die theoretischen Phasen gegenüber den gemessenen Amplituden dominiert werden würde. Stattdessen benutzt man meist

$$\tilde{n}_{2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}}(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} (2|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{\text{calc}}].$$

Diese Karte kann als Überlagerung der Modellkarte mit der Differenzelektronendichtekarte bei halber Gewichtung aufgefasst werden und stellt die am häufigsten für die Verbesserung von Proteinmodellen verwendete Karte dar. Sie wurde ebenfalls mit dem Programm CNS erzeugt.

3.22 Modellbau

Die Visualisierung der Elektronendichtekarten und die Erstellung und Verbesserung des Proteinmodells erfolgte mit dem Programm o (Jones *et al.*, 1991) an Silikon Graphics Workstations.

3.23 Modellverfeinerung

Die Verfeinerung wurde mit dem Programm CNS durchgeführt. Das Grundprinzip besteht darin, dass eine Gesamtenergie E_{tot} minimiert wird, die sich aus einem Röntgenterm E_{xref} und einem theoretischen Term E_{theor} zusammensetzt:

$$E_{\text{tot}} = E_{\text{xref}} + w \cdot E_{\text{theor}}.$$

Der Wichtungsfaktor w wird durch Minimierung des freien R-Faktors (siehe unter 3.16.3) bestimmt. Der Röntgenterm errechnet sich aus den Differenzen zwischen für das Proteinmodell erwarteten und tatsächlich gemessenen Reflexintensitäten. Der theoretische Energieterm setzt sich aus Energien zusammen, die sich aus Abweichungen von idealen Bindungsgeometrien (z. B. Bindungsabstände und -winkel) sowie aus nichtkovalenten Wechselwirkungen (z. B. Wasserstoffbrücken) ergeben.

3.24 Berechnung der Buried Surface Area

Die Buried Surface Area bei der Bildung eines Komplexes wurde mit dem Programm CNS errechnet. Sie ergibt sich aus der Summe der solvenszugänglichen Oberflächen vor der Komplexbildung abzüglich der solvenszugänglichen Oberfläche des Komplexes. Die solvenszugängliche Oberfläche wird erhalten, indem eine Kugel mit dem Radius r_{probe} über die Van-der-Waals-Oberfläche des Proteinmodells abgerollt wird. Um eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der Studien zu zufälligen Kristallkontakten in Proteinkristallen (Janin, 1997) und zu spezifischen Proteinwechselwirkungen (Conte *et al.*, 1999) zu gewährleisten, wurde der gleiche Radius r_{probe} von 1.4 Å verwendet.

3.25 Validierung des finalen Modells

Bei der Identifizierung von Fehlern im Modell und bei der Bewertung der Qualität des fertigen Modells finden Programme Verwendung, die eine Vielzahl von geometrischen Parametern überprüfen (EU 3-D Validation Network, 1998). So lassen sich Abweichungen von Idealwerten erkennen, die sich aus Proteinstrukturen ergeben, welche bei hoher Auflösung mit grosser Genauigkeit bestimmt worden sind. Signifikante Abweichungen von

diesen Idealwerten weisen auf Fehler des Modells oder auf strukturelle, in vielen Fällen auch auf funktionelle Besonderheiten des Proteins hin. Für die Kontrolle der Struktur von Ax1Ig1-4 wurden die Programme PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und WHATCHECK (Hooft *et al.*, 1996) verwendet.

3.26 Sequenzvergleiche

Die Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe des Programms BLAST gegen Sequenzen in den SWISS-Prot- und TREMBL-Datenbanken durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997). Verwendet wurde dabei eine Blossom62-Vergleichsmatrix.

3.27 Überlagerungen von Proteinmodellen

Die Überlagerung von Strukturen unterschiedlicher Proteine (z. B. Hemolin und Ax1Ig1-4) erfolgte mit dem Programm Superimpose (Diederichs, 1995). Dieses Programm basiert auf der Minimierung der Abstände aller C α -Positionen beider Moleküle. Die Strukturen von Ax1Ig1-4 in verschiedenen Raumgruppen wurden mit dem Programm lsq überlagert, dass zu einer besseren Übereinstimmung als Superimpose führte, wobei allerdings Paare von C α -Atomen definiert werden müssen, deren Abstände minimiert werden.

3.28 Analyse der relativen Domänenbewegung

Die Analyse der relativen Domänenbewegung von verschiedenen Ax1Ig1-4-Modellen in unterschiedlichen Kristallformen wurde mit dem Programm DynDom durchgeführt (Hayward & Berendsen, 1998). Dieses Programm errechnete die der Domänenbewegung zu Grunde liegende Rotationsachse und den dazugehörigen Drehwinkel. Ausserdem identifizierte es die als molekulare Scharniere fungierenden Aminosäuren. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Rasmol.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Überexpression, Reinigung und *in vitro* Faltung

4.1.1 Notwendigkeit einer effektiven heterologen Überexpression

Strukturaufklärungen mit der Methode der Röntgenkristallographie setzen voraus, dass das Protein im Milligrammmaßstab zur Verfügung steht (Drenth, 1994). Die Gesamtmenge an benötigtem Protein hängt davon ab, ob bei Kristallisationsversuchen schnell bis zu atomarer Auflösung beugende Proteinkristalle erhalten werden können oder diese erst nach langwieriger Optimierung erhalten werden. Zusätzlich spielt die Methode zur Phasenbestimmung eine Schlüsselrolle, da bei der MR- oder MAD-Methode im Idealfall ein einziger Kristall ausreichend ist, um eine Röntgenstruktur aufzuklären, während bei der MIR-Methode die Aufnahme sehr vieler Datensätze unter Verwendung vieler Kristalle nötig sein kann. In günstigen Fällen werden weniger als 1 mg Protein benötigt, in schwierigeren Fällen werden Mengen über 100 mg zur Strukturlösung verbraucht.

4.1.2 Überexpression in Myelomazellen

Da neuronale Zelladhäsionsproteine nur in sehr geringen Mengen expremiert werden, war eine Isolierung des Proteins aus dem Ursprungsorganismus Huhn in ausreichenden Mengen nicht praktikabel. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit existierte bereits ein von Christoph Rader (AG Sonderegger, Universität Zürich) konstruiertes Expressionssystem, bei dem ein Fusionsprotein aus den ersten vier Immunoglobulindomänen von Axonin-1 und IgC_κ in einer Myelomazelllinie expremiert wurde (Rader *et al.*, 1996). Die Zellkultur wurde von Beat Kunz an der Universität Zürich durchgeführt. Aus den resultierenden Kulturüberständen wurde das Fusionsprotein durch Immunoaffinitätschromatographie isoliert, bei der an einer Chromatographiesäule immobilisierte Antikörper gegen IgC_κ verwendet wurden. Da die Antikörper nur in geringen Mengen zur Verfügung standen und zudem eine geringe Lebensdauer besaßen, konnten auf diese Weise in fünf Chromatographieläufen nur insgesamt ca. 2 mg an Fusionsprotein erhalten werden. Um für Kristallisationsexperimente eine möglichst kompakte Proteineinheit zu erhalten, wurde durch schonenden Papainverdau und einem anschließenden Chromatographieschritt der IgC_κ-Teil des Fusionsprotein entfernt. Durch diesen Schritt reduzierte sich die Gesamtausbeute an Zielprotein auf etwa 1 mg. Mit dem erhaltenen Material wurde ein Kristallisationsscreening durchgeführt (siehe 4.3.1), bei dem jedoch keine Kristallbildung beobachtet werden konnte.

4.1.3 Allgemeine Überlegungen zur Überexpression von Axonin-1 in Bakterien

Um zu größeren Proteinmengen zu gelangen, wurden in Zusammenarbeit mit Karl Proba (AG Sonderegger, Universität Zürich) verschiedene bakterielle Expressionssysteme erstellt. Das Hauptproblem bei der Expression von Immunoglobulindomänen in Bakterien ist die korrekte Ausbildung der Disulfidbrückenstruktur. Da im bakteriellen Cytosol ein reduzierendes Oxidationspotential herrscht, ist dort eine Oxidation der Thiolgruppen von Cysteinen unter Ausbildung korrekter Disulfidbrücken im Allgemeinen nicht möglich. Da die Disulfidbrücken wesentlich zur Stabilisierung der Proteinstruktur beitragen, aggregieren in Bakterien überexpremierte, disulfidverbrückte Proteine zumeist unter Ausbildung sogenannter Inclusion Bodies. Diese bestehen zu 10-90 % aus aggregiertem, überexpremiertem Zielprotein und enthalten darüber hinaus unterschiedliche Anteile an DNA, RNA, Membranproteinen und

Chaperonen (Rudolph, 1990). Zur Überwindung dieses Problems wurden parallel drei unterschiedliche Strategien verfolgt:

- Expression in TrxB-Mutanten
- Periplasmatische Expression
- *In vitro* Proteinfaltung

Die erste Strategie basiert auf der Tatsache, dass in Bakterienzellen mit einem defektem TrxB-Gen durch ein verändertes Redoxpotential in der Zelle in einem geringen Umfang eine Disulfidbrückenbildung im Cytosol möglich ist (Derman *et al.*, 1993). Dass diese Strategie prinzipiell für Ig-Domänen enthaltende Proteine erfolgreich sein kann, wurde durch die Expression funktioneller Antikörperfragmente im Cytosol solcher Bakterien gezeigt (Proba *et al.*, 1995).

Zweitens kann in vielen Fällen eine periplasmatische Expression durch das Hinzufügen einer bakteriellen Signalsequenz an den N-Terminus des reifen Proteins erreicht werden. Der periplasmatische Raum von Bakterien ist als oxidierendes Milieu anzusehen, so dass dort eine Bildung von Disulfidbrücken möglich ist. Zusätzlich existiert im Periplasma eine Disulfidisomerase, die die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken enzymatisch katalysiert (Whitley & von Heijne, 1993). Dieses Verfahren wurde für die bakterielle Expression funktioneller F_v-Fragmente verwendet (Skerra & Pluckthün, 1988) und später u.a. auch zur röntgenkristallographischen Strukturlösung der zwei N-terminalen Ig-Domänen des Zelladhäsionsproteins VCAM-1 benutzt (Bottomley *et al.*, 1994).

Drittens ist neben der Expression in nativer Konformation auch eine Isolierung des Proteins in unlöslicher Form mit anschließender *in vitro* Faltung in eine wasserlösliche Form möglich (Buchner & Rudolph, 1991a). Dazu wird das in Form von Inclusion Bodies aus den Bakterien isolierte Protein zuerst in einer hochkonzentrierten Harnstofflösung solubilisiert, die vor allem hydrophobe Wechselwirkungen unterdrückt. In dieser Lösung liegt die Polypeptidkette im Wesentlichen als strukturloses Knäuel (Random Coil) vor. Durch je nach Verfahren langsames oder rasches Entfernen des Harnstoffs wird bei günstiger Wahl der Systembedingungen (pH-Wert, Temperatur u.ä.) eine Ausbildung der nativen Struktur möglich. Bei disulfidverbrückten Proteinen muss zusätzlich während des Faltungsprozesses die Ausbildung der korrekten Disulfidbrückenpaare erfolgen.

4.1.4 Expression in Bakterien mit defektem TrxB-Gen

Bei der durchgeführten Expression von Ax1Ig1-4 in einem BL21(DE3)-Stamm mit defektem TsX-Gen konnte kein wasserlösliches Zielprotein isoliert werden. Bei Kultivierung der Zellen bei 37°C wurde die Ausbildung von Inclusion Bodies beobachtet. Ein Grund dafür könnte sein, dass auch bei verändertem Redoxpotential im Cytosol der Zellen die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken sehr langsam verläuft. Die Faltung zur nativen Konformation steht in Konkurrenz zur Aggregation und damit zur Ausbildung von Inclusion Bodies. Da die Proteinfaltung in der Regel als monomolekulare Reaktion verläuft, während die Aggregation eine Reaktion höherer Ordnung darstellt, sollte eine Erniedrigung der Konzentration an Faltungsintermediaten zu einer Unterdrückung der Aggregation führen (Buchner & Rudolph, 1991b). Um eine Verminderung des Expressionslevels zu erreichen, wurden die Zellen bei suboptimalen Wachstumsbedingungen bei Temperaturen von 28°C und 30°C kultiviert. Auch in diesen Fällen konnten keine nachweisbaren Mengen an Zielprotein isoliert werden.

4.1.5 Expression unter Verwendung einer Signalsequenz zum Export ins Periplasma

Die Kultivierung der Zellen mit einem Plasmid für den Export des Proteins in das Periplasma erfolgte ebenfalls bei 28°C, um die Aggregation und Bildung von Inclusion Bodies zu unterdrücken, da nur lösliches Protein über die Cytoplasmamembran in das Periplasma exportiert werden kann. Bei diesem Verfahren wurde die periplasmatische Fraktion durch kalten osmotischen Schock abgetrennt und durch IMAC an Ni-NTA gereinigt. Die Methode lieferte eine geringe Menge Protein, dessen apparentes Molekulargewicht in der SDS-PAGE dem des Zielproteins entsprach. Allerdings war die aus einem Liter Bakterienkultur erhaltene Proteinmenge mit etwa 10 µg deutlich zu gering, um für die benötigte Reinigung im Milligrammmaßstab geeignet zu sein.

4.1.6 Expression in unlöslicher Form mit anschließender *in vitro* Faltung

Im Gegensatz zu den ersten geschilderten Expressionsstrategien war bei der Methode der *in vitro* Faltung die Ausbildung von Inclusion Bodies in den Bakterienzellen erwünscht, da durch die einfache mechanische Isolierung der Inclusion Bodies bereits ein Reinigungseffekt erzielt werden kann. Der Anteil von Ax1Ig1-4 am Gesamtprotein in den Inclusion Bodies kann, basierend auf SDS-PAGE, auf etwa 40 % geschätzt werden. Die durch Zentrifugation erhaltenen Inclusion Bodies wurden in einem Puffer, der als Denaturierungsmittel 8 M Harnstoff enthielt, solubilisiert und unter denaturierenden Bedingungen, also ebenfalls in Gegenwart von 8 M Harnstoff, säulenchromatographisch durch IMAC an Ni-NTA gereinigt. Mit diesem Verfahren konnten mit guter Reproduzierbarkeit pro Liter Bakterienkultur etwa 80 mg denaturiertes Ax1Ig1-4 in einer Reinheit von > 95 % erhalten werden. Zur *in vitro* Faltung wurde das Protein in einen Faltungspuffer auf eine niedrige Proteinkonzentration von 80 µg/ml verdünnt, da auch in diesem Fall bei der Konkurrenz zwischen Faltung und Aggregation die monomolekulare Faltungsreaktion gegenüber der höhermolekularen Aggregationsreaktion begünstigt werden sollte. Um die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken zu erlauben, enthielt der verwendete Puffer u.a. als Redoxpaar oxidiertes Glutathion und reduziertes DTE. Die gewählten *in vitro* Faltungsbedingungen entsprachen denen, die bei der Optimierung der Faltungsbedingungen eines Antikörperfragments die höchsten Ausbeuten ergeben hatten (Buchner & Rudolph, 1991).

Bei der Analyse der *in vitro* Faltungsansätze wurde vorausgesetzt, dass das Protein in nativem Faltungszustand monodispers wasserlöslich sein sollte, während partiell oder falsch gefaltetes Protein eine hohe Tendenz zur Ausbildung von Aggregaten besitzen sollte. Die Trennung von aggregiertem und löslichem Protein wurde anfänglich mit Gelpermeationschromatographie durchgeführt. Bei später in größerem Maßstab durchgeführten, präparativen Proteinreinigungen erwies es sich als günstiger, das *in vitro* gefaltete Protein mit Anionenaustauschchromatographie aufzureinigen. Lösliches Protein eluierte dabei im verwendeten Puffer (25 mM Tris, pH 8.5) bei einer NaCl-Konzentration von etwa 125 mM, wogegen aggregiertes Protein nicht mehr von der Säule eluiert werden konnte.

Bei der *in vitro* Faltung von Ax1Ig1-4 wurde eine ungewöhnliche Zeitabhängigkeit beobachtet. Während in der Literatur beschrieben wird, dass bei Proteinen mit mehreren Disulfidbrücken bis zu 24 h bis zu einer annähernd vollständigen Ausbildung der Disulfidbrücken vergehen (Rudolph, 1990), konnte bei Ax1Ig1-4 nach 24 h Faltungszeit nur < 1 % Faltungsausbeute nachgewiesen werden. Bei sehr langen Faltungszeiten von 8 bis 12 Wochen betrugen die Ausbeuten an wasserlöslichem Protein dagegen typischerweise 10 bis 15 % der eingesetzten Proteinmenge. Diese sehr langsame Faltung des Proteins ist wahrscheinlich auf das Vorhandensein von *cis*-Prolinen an Schlüsselpositionen in allen vier Ig-Domänen des

Proteinfragments zurückzuführen. Während der langsame Schritt der Prolinisomerisierung *in vivo* durch Prolinisomerasen katalysiert wird, stehen diese bei der *in vitro* Faltung nicht zur Verfügung.

Die Ausbeuten bei langer Faltungszeit erlaubten in Kombination mit dem effektiven Expressionssystem die Darstellung von etwa 10 mg löslichem Ax1Ig1-4 pro Liter Bakterienkultur. Damit stand eine Methode zur Verfügung, um mit angemessenem Zeit- und Materialaufwand lösliches Ax1Ig1-4 in Milligrammmaßstab herzustellen, so dass Kristallisationsversuche zur Strukturaufklärung möglich wurden.

4.2 Proteinchemische Charakterisierung

4.2.1 SDS-PAGE und Massenspektroskopie

Nach der *in vitro* Faltung und Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie sieht man in der SDS-PAGE erst bei starker Überladung des Gels anfärbbare Verunreinigungen (Abb. 11). Eine von Volker Schnaible (AG Przybylski) durchgeführte Untersuchung des *in vitro* gefalteten Proteins mittels MALDI-MS weist ebenfalls keine identifizierbare Verunreinigungen auf, zeigt allerdings ein deutlich verringertes Molekulargewicht ($M_r=43322$) gegenüber dem aufgrund der Sequenz zu erwartenden Molekulargewicht ($M_r=45026$). Ein solches Molekulargewicht entspricht innerhalb der Messgenauigkeit einem Fragment, das um das N-terminale His-Tag sowie die Faktor Xa Spaltstelle verkürzt wurde ($M_r=43555$). Da diese Spaltstelle auch von anderen Proteasen leicht spaltbar ist, scheint es wahrscheinlich, dass bei der langen Inkubationszeit der *in vitro* Faltung Proteasen, die bei der denaturierenden Reinigung verschleppt wurden, bevorzugt an dieser Spaltstelle angreifen und eine definierte Verkürzung der Proteins am N-Terminus bewirken. Aus der Röntgenstruktur läßt sich der genaue N- und C-Terminus des Proteins nicht erkennen, da die Reste vor Lys7 und nach Ala388 ungeordnet sind.

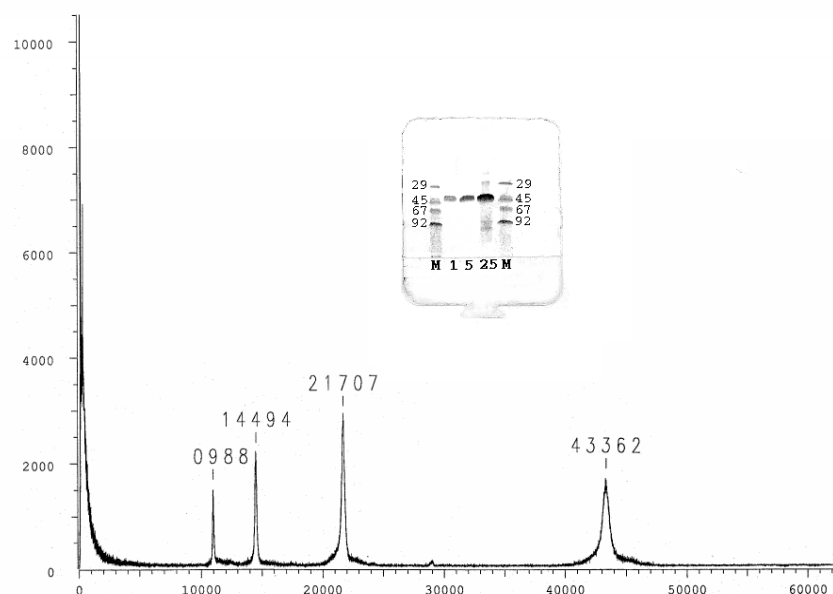


Abbildung 11: MALDI-Massenspektrum von Ax1Ig1-4 und SDS-PAGE (Inlay). Im Gel wurde Protein im Verhältnis 1:5:25 aufgetragen. Die Bahnen mit Markerprotein sind mit M gekennzeichnet. Man erkennt erst bei starker Überlagerung des Gels Verunreinigungen. Die scharfen Maxima des Massenspektrums weisen auf eine definierte Verkürzung des Proteins hin.

4.2.2 Gelpermeationschromatographie

Von einer präparativen Gelpermeationschromatographiesäule eluierte Ax1Ig1-4 in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.5 bei einem apparentem Molekulargewicht von 40-45 kD, was auf einen monomeren Zustand des Proteins in Lösung hindeutet. Darüber hinaus war dieses Ergebnis ein erster experimenteller Hinweis, dass *in vitro* gefaltetes Ax1Ig1-4 keine Stäbchenform aufweist, wie sie sich z. B. in CD4 aus der linearen Aneinanderreihung von vier Immunoglobulindomänen ergibt, sondern eher eine globuläre Gesamtstruktur besitzt, da bei stäbchenförmigen Molekülen in der Regel ein gegenüber dem tatsächlichen Molekulargewicht deutlich erhöhtes apparentes Molekulargewicht beobachtet wird (Huber *et al.*, 1994). Wurde anstelle des Puffers destilliertes Wasser verwendet, eluierte das Protein dagegen im Ausschlussvolumen. Es wurden also Aggregate gebildet, deren Größe über der Ausschlussgrenzen des verwendeten Gelmaterials von etwa 3000 kD lagen. Die beobachtete Aggregation bei niedriger Ionenstärke war durch Erhöhung der Ionenstärke, z. B. durch Zugabe von NaCl, vollständig reversibel.

4.2.3 Dynamische Lichtstreuung

Bei der dynamischen Lichtstreuung werden Frequenzverschiebungen gemessen, die sich durch die Streuung von monochromatischem Licht an diffundierenden Teilchen ergeben. Aus dieser Messung ergibt sich ein Diffusionskoeffizient, aus dem unter Annahme einer globulären Teilchenform mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung der hydrodynamische Radius und daraus das Molekulargewicht des Teilchens errechnet werden kann. Aus den Messdaten der dynamischen Lichtstreuung an *in vitro* gefaltetem Ax1Ig1-4 errechnete sich ein Molekulargewicht von 40 ± 5 kD. Dieser Wert, der in sehr gutem Einklang mit dem Ergebnis der Gelpermeationschromatographie steht, spricht ebenfalls für das Vorhandensein von Monomeren in Lösung. Darüber hinaus deutet die geringe Abweichung gegenüber dem durch MALDI-MS bestimmten Molekulargewicht auf eine globuläre Gesamtstruktur des Proteinfragments hin, da bei einem stäbchenförmigen Molekül deutlich größere Abweichungen zu erwarten wären. Bei Wiederholung der Messungen nach mehrtägigem Stehen bei Raumtemperatur wurde ein deutlich erhöhter Polydispersitätsgrad beobachtet, was auf Bildung von Aggregaten in der Lösung schliessen läßt. Wurden diese Aggregate durch Ultrazentrifugation entfernt, zeigten die dynamischen Lichtstreuendaten erneut eine monodisperse Lösung an. Vermutlich wird die beobachtete Bildung von Aggregaten durch kovalente Polymerisation nicht vollständig oxidiertes Ax1Ig1-4 Moleküle verursacht, die als geringe Verunreinigung der vollständig disulfidverbrückten Ax1Ig1-4 Moleküle vorhanden sind.

4.2.4 CD-Spektroskopie

Bei der Methode der CD-Spektroskopie wird in Abhängigkeit von der Wellenlänge die unterschiedliche Absorption einer Probe von links und rechts polarisiertem Licht gemessen. Da verschiedene Sekundärstrukturelemente charakteristische Spektren liefern, lässt sich aus dem für ein Protein gemessenen Spektrum der Anteil der einzelnen Strukturelemente abschätzen. In Abb. 12 ist das gemessene Spektrum von bakteriell exprimiertem, *in vitro* gefaltetem Ax1Ig1-4 den Modellspektren für α -Helix, β -Faltblatt und Random Coil gegenübergestellt. Aus dem gemessenen Spektrum errechnete sich mit dem Programm k2d (Andrade *et al.*, 1993) eine Sekundärstruktur mit 55 % β -Faltblatt- und 1 % α -Helixanteil. Diese Werte entsprechen im Wesentlichen dem für Immunoglobulindomänen zu erwartenden hohen β -Faltblatt- und geringen α -Helixanteil und waren in dieser Phase des Projekts ein wichtiger Hinweis, dass das *in vitro* gefaltete Protein eine native Konformation besitzt. Für

das verfeinerte Proteinmodell (siehe Kapitel 4.6.1) ergeben sich Werte von 54 % β -Faltblatt und 3 % Helixanteil.

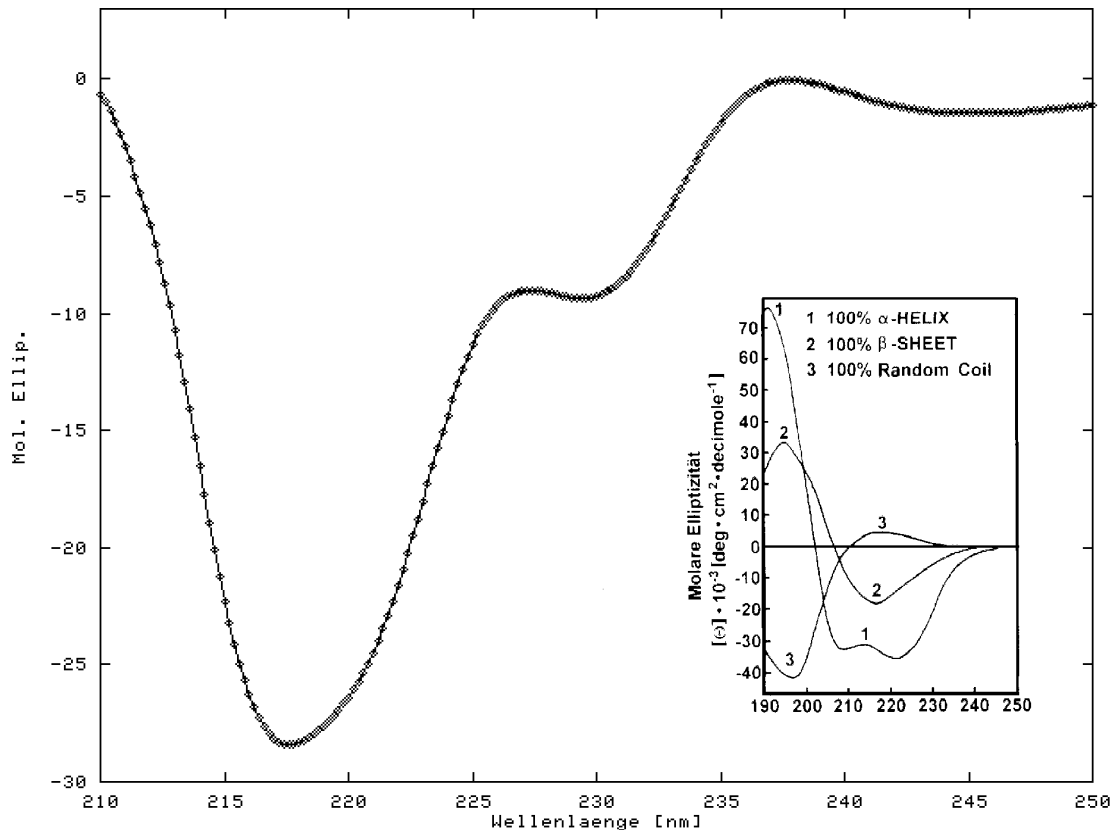


Abbildung 12 CD-Spektrum von Ax1Ig1-4 im Vergleich zu Modellspektren (Inlay). Das Minimum bei 217 nm weist auf einen hohen Anteil an β -Faltblatt hin, wie er für ein Protein aus Ig-Domänen bei nativer Faltung zu erwarten ist.

4.3 Kristallisation

4.3.1 Auffinden vorläufiger Kristallisationsbedingungen durch Screening-Verfahren

Zum Auffinden von Kristallisationsbedingungen für Proteine werden in der Regel sogenannte Screeningverfahren verwendet, bei denen eine große Anzahl unterschiedlicher Bedingungen mit geringem Arbeitsaufwand und Probenverbrauch untersucht werden können. Das am häufigsten verwendete Screeningverfahren stellt das Jancarik-Screening dar (Jancarik & Kim, 1991), bei dem 50 unterschiedliche Kristallisationsbedingungen getestet werden, die sich in pH-Wert, Art und Konzentration des verwendeten Fällungsmittels und zusätzlich verwendeter Salze unterscheiden. Die vorformulierten Lösungen sind kommerziell als Crystall Screen I bei der Firma Hampton Research (Laguna Hills, CA, USA) erhältlich, die auch eine 48 Kristallisationsbedingungen umfassende Erweiterung des ursprünglichen Screening Kits als Crystall Screen II vertreibt (Cudney *et al.*, 1994). Unter Verwendung dieser beiden Screeningverfahren lieferten drei Bedingungen mit Ax1Ig1-4 kleine Kristalle:

- Crystall Screen I, Nr. 6: 30 % PEG 4000, 200 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris-HCl, pH 8.5
- Crystall Screen I, Nr. 17: 30 % PEG 4000, 200 mM Li_2SO_4 , 100 mM Tris-HCl, pH 8.5
- Crystall Screen II, Nr. 38: 20 % PEG 10 000, 100 mM HEPES, pH 7.5

Die erste Bedingung lieferte kugelförmige Cluster aus sehr feinen Kristallnadeln. Unter den anderen beiden Bedingungen wurden stark verwachsene Aggregate aus dünnen Platten beobachtet, deren maximale Kantenlänge etwa 100 µm betrug.

Parallel dazu wurde ein systematischeres Screeningverfahren verwendet, bei dem die Konzentration des Fällungsmittels PEG 3350 gegen den pH-Wert variiert wurde. Dieses Screeningverfahren stellt eine Abwandlung eines zur Kristallisation intakter, monoklonaler Antikörper entwickelten dar (Harris *et al.*, 1995). Da diese mit Ausnahme selten vorkommender, sogenannter Euantikörper bei niedriger Ionenstärke monodispers löslich sind, wird bei diesem Screeningverfahren bei sehr niedriger Ionenstärke gearbeitet. Der Grund für das Arbeiten bei niedriger Ionenstärke ist, dass Änderungen in der Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche, die durch eine Änderung des pH-Wertes hervorgerufen werden, weniger durch Gegenionen kompensiert werden können. Dadurch sollte die Variation des pH-Wertes, die wesentlicher Bestandteil dieses Screening-Verfahrens ist, einen ausgeprägteren Einfluss auf das Kristallisationsverhalten zeigen. Da die Ergebnisse der Gelpermeationschromatographie jedoch ergeben hatten, dass Ax1Ig1-4 bei niedriger Ionenstärke große Aggregate bildet und dies in den meisten Fällen die Bildung von Kristallen nicht zulässt, wurde das Screening in Anwesenheit von 150 mM NaCl durchgeführt. Bei diesem Screeningverfahren konnte über einen sehr weiten pH-Bereich von 5.5 bis 8.5 die Bildung von Ax1Ig1-4 Kristallen beobachtet werden, wobei die Löslichkeit im sauren pH-Bereich deutlich geringer war als im basischen. Die beobachteten Kristalle hatten die Form von stark verwachsenen, dünnen Platten mit maximalen Kantenlängen von etwa 150 µm. Die größten Kristalle wurden bei einem leicht basischen pH-Wert von 7.5 erhalten.

4.3.2 Verfeinerung der vorläufigen Kristallisationsbedingungen

Die durch Jancarik-Screening und systematischem Screening erhaltenen, vorläufigen Kristallisationsbedingungen wurden durch systematische Variation einer Vielzahl von Parametern verfeinert. Dies waren Proteinkonzentration, Temperatur, pH-Wert, Art und Konzentration des verwendeten Fällungsmittels sowie die Zugabe von Additiven. Unter dem Oberbegriff Additive werden sehr verschiedene Stoffklassen zusammengefasst, die in geringen Mengen zum Kristallisationsansatz zugefügt in der Lage sind, den Kristallisationsvorgang leicht zu modifizieren, was im Idealfall zu verbesserten Kristallen führt. Dazu gehören vor allem eine Vielzahl verschiedener Salze (Trakhanov & Quioco, 1995) und organischer Lösungsmittel sowie kleine, organische Moleküle, die ausreichend wasserlöslich sind, wie z. B. Detergenzien oder Kohlenhydrate (Cudney *et al.*, 1994).

Die Optimierungsversuche führten, ausgehend von den unterschiedlichen vorläufigen Kristallisationsbedingungen, alle zu ähnlichen Ergebnissen. Die besten Resultate wurden bei 17°C, einer Proteinkonzentration von etwa 3 mg/ml, annähernd neutralem pH von 7.5 und unter Verwendung von 14-18 % PEG 10 000 erzielt. Die unter diesen Bedingungen erhaltenen Kristalle waren jedoch noch sehr stark verwachsen, was ihre Verwendung für die Röntgenstrukturanalyse ausschloß, da diese nur mit Einkristallen durchführbar ist. Zwei Additive erwiesen sich als geeignet, die Bildung von verwachsenen Kristallclustern zu unterdrücken. In Anwesenheit von 1-2 % N-Acetylglucosaminhydrochlorid wurden vereinzelt regelmäßige Einkristalle gefunden. Diese Kristalle waren jedoch sehr schwer zu reproduzieren, da in einem überwiegendem Teil der Kristallansätze ausschließlich Phasentrennungen auftraten. Dagegen ließen sich durch Zusatz von 80-120 mM Natriumformiat mit höherer Reproduzierbarkeit Einkristalle erhalten. Allerdings konnte auch unter Verwendung der erwähnten Additive die Bildung verwachsener Kristallcluster nicht völlig unterdrückt werden, so dass nur etwa 10-15 % der erhaltenen Kristalle für

Röntgenexperimente geeignet waren. Die unter optimierten Bedingungen beobachteten Proteinkristalle waren in allen Fällen Platten mit einer maximalen Dicke von etwa 100 μm . Das Erscheinungsbild der Platten variierte stark, wobei am häufigsten rautenförmige, sechseckige oder rechteckige Platten beobachtet wurden. Die größten Kristalle hatten typische Kantenlängen von etwa 300 μm .

4.4 Kristallographische Datenaufnahme und Phasenbestimmung

4.4.1 Aufnahme nativer Datensätze

Trotz intensiver Versuche zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen war die Größe der resultierenden Kristalle unbefriedigend. Erste Testmessungen zeigten, dass für das Erreichen einer nominellen Auflösung von etwa 3 \AA Belichtungszeiten von 20 Minuten pro Grad Drehwinkel erforderlich waren. Der am Kristall bei Raumtemperatur entstehende Strahlenschaden führte bei diesen langen Belichtungszeiten schon nach 20-30 Grad Drehwinkel zu einer drastischen Verschlechterung des Beugungslimits. Zur Reduzierung des Strahlenschadens wurden daher die Messungen an schockgefrorenen Kristallen im Stickstoffstrom bei 110 K durchgeführt. Für die Verwendung dieser Technik muß in und um den Proteinkristall die Bildung von Wasserkristallen verhindert werden, was in der Regel durch den Zusatz eines Gefrierschutzmittels erreicht wird (Rogers, 1994). Die Ax1Ig1-4 Kristalle waren allerdings ungewöhnlich sensitiv gegenüber der Zugabe einer Vielzahl von getesteten Gefrierschutzmitteln, so dass auch nach vielen Versuchen zur Optimierung der Schockgefrierung nur etwa 10-20 % der Kristalle keine oder nur geringe Einbußen in der Streuqualität zeigten. Die Sensitivität lässt sich nach Aufklärung der Struktur darauf zurückführen, dass in einer Raumrichtung sehr schwache und unspezifische Wechselwirkungen am Aufbau des Kristallgitters beteiligt sind. Als beste Methode zur Verhinderung eines Einfrierschadens erwies sich die über Stunden erfolgende Erhöhung der Konzentration von Glycerin oder Ethylenglykol bis zu einer maximalen Konzentration von 20 % (v/v) durch sukzessive Zugabe kleiner Volumina Frostschutzmittelstamm-lösung in Reservoirpuffer. Im September 1998 konnte so mit einem einzelnen Kristall ein Datensatz bis zu einer Auflösung von 2.75 \AA und einer Vollständigkeit von über 90 % aufgenommen werden. Die Statistiken zur Datenaufnahme sind in Kapitel 4.4.3 einem Derivat-Datensatz gegenübergestellt ist. Weitere native Datensätze von Kristallen mit deutlich abweichenden Zellparametern wurden bei der unten beschriebenen Suche nach Schwermetallatomderivaten gemessen. Diese werden im Detail in Kapitel 4.11 zusammen mit den zu Grunde liegenden Strukturen und Kristallpackungen besprochen. Der qualitativ beste Datensatz konnte im Februar 1999 am Messstand X11 des Deutschen Elektronensynchrotrons in Hamburg bis zu einer Auflösung von 1.8 \AA aufgenommen werden (Tabelle 1). Der verwendete Kristall besaß erneut deutlich andere Zellparameter, als bei den bis zu diesem Zeitpunkt gemessenen Datensätzen beobachtet worden waren. Diese Daten wurden zur späteren Verfeinerung des Proteinmodells verwendet. Alle in den folgenden Kapiteln beschriebenen Strukturdetails beziehen sich, sofern nicht anders erwähnt, auf diesen Datensatz.

Raumgruppe	P2 ₁
Zellparameter	a=60.58 Å, b=45.54 Å, c=99.55 Å, β=96.14°
Gemessene Reflexe	98,845
Unabhängige Reflexe	48,051
Auflösung	20 – 1.80 (1.86 – 1.80)
Vollständigkeit	95.1 (83.3)
Mittlere Intensität I / σ (I)	12.8 (3.6)
R_{sym}	3.6 (20.6)

Tabelle 1 Statistiken zur Aufnahme des nativen Datensatzes am Synchrotron in Hamburg.

4.4.2 Suche nach Schwermetallatomderivaten

Da zu dem Zeitpunkt, an dem der erste vollständige, native Datensatz aufgenommen werden konnte, noch keine Koordinaten eines verwandten Proteins verfügbar waren, konzentrierten sich die Versuche zur Phasenbestimmungen in den folgenden Monaten auf die Methode des isomorphen Ersatzes. Die Suche nach geeigneten Schwermetallatomderivaten wurde durch eine Reihe experimenteller Schwierigkeiten erschwert. Ein wichtiges Problem stellte die geringe Reproduzierbarkeit ausreichend grosser Einkristalle dar, da die Kristalle wie oben erwähnt eine starke Tendenz zur Ausbildung verwachsener Aggregate besaßen. Darüber hinaus erwiesen sich die Schwierigkeiten bei der Schockgefrierung von Kristallen, die mit Schwermetallatomsalzen behandelt worden waren, als noch ausgeprägter als bei nativen Kristallen. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass ein gegenüber Schwermetallen sehr reaktives Methionin eine Schlüsselposition in den Kristallkontakten aller untersuchten Kristallformen einnimmt. Insgesamt konnten etwa 30 Testdatensätze von Kristallen aufgenommen werden, die mit den statistisch am häufigsten zur Strukturlösung verwendeten Schwermetallatomverbindungen behandelt worden waren. Die Verwendung dieser Daten zur Phasenbestimmung wurde jedoch durch einen ausgeprägten Polymorphismus der vermessenen Kristalle eingeschränkt. Unter gleichen Kristallisationsbedingungen wurden monokline, triklin und orthorhombische Kristalle beobachtet. Die am häufigsten auftretenden monoklinen Kristalle zeigten zudem stark variierende Zellparameter, wobei sich vor allem die z-Achsen einzelner Kristalle um bis zu 14 Å unterschieden. Eine genauere Übersicht über die verschiedenen beobachteten Kristallformen wird bei der Besprechung der zu Grunde liegenden Strukturen gegeben (siehe Kapitel 4.11).

4.4.3 SIRAS-Phasenbestimmung

Von den gemessenen Daten potentieller Schwermetallatomderivate war nur ein mit K₂PtCl₄ behandelter Kristall geeignet, zur Phasenbestimmung beizutragen. Der Kristall war hinreichend isomorph zu einem bei einer nativen Messung verwendeten Kristall, und der Differenz-R-Faktor beider Datensätze war mit 21.9 % für Daten von 20 bis 3 Å in einer Größenordnung, wie sie für eine Derivatisierung des Proteins zu erwarten ist (Blundell &

Johnson, 1976). Folgende Tabelle vergleicht den Datensatz des K_2PtCl_4 -Derivats und den dazugehörigen nativen Datensatzes.

Datensatz	Nativ	Pt-Derivat
Raumgruppe	$P2_1$	$P2_1$
Zellparameter		
a (Å)	60.20	60.10
b (Å)	43.21	43.57
c (Å)	93.80	93.49
β (°)	96.7	96.6
Auflösung (Å)	20 – 2.75 (2.85 – 2.75)	20 – 3.0 (3.11 – 3.00)
Unabhängige Reflexe	12281 (1104)	9600
Vollständigkeit(%)	95.7 (85.8)	99.2 (97.3)
I / σ (I)	11.0 (3.0)	11.7 (2.7)
R_{sym} (%)	6.8 (23.0)	10.7 (39.4)

Tabelle 2 Vergleich des K_2PtCl_4 -Derivatdatensatzes dem isomorphen nativen Datensatz.

Mit Hilfe des Programms SOLVE (Terwilliger & Berendzen, 1999) wurden zwei Schwermetallatompositionen identifiziert. Die daraus resultierenden Phasen wurden durch iterative Solvensglättung mit den Programmen DM (Cowatan, 1994) und SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) modifiziert. In der aus diesen Phasen resultierenden Elektronendichtekarte (Abb. 13) waren deutlich abgegrenzte Protein- und Solvensbereiche zu erkennen. Die Qualität der Karte war jedoch nicht ausreichend, um den Verlauf der Polypeptidkette über längere Bereiche verfolgen zu können. Auch eine Verfeinerung verschiedener Schwermetallatomparameter (Positionen, Temperaturfaktoren, Besetzungszahlen) mit dem Programm SHARP (de la Fortelle & Bricogone, 1997) führte zu keiner deutlichen Verbesserung der Qualität der Elektronendichtekarte. Versuche, mit der Methode der Differenzfourieranalyse unter Verwendung der aus dem Pt-Derivat erhaltenen Phasen weitere Schwermetallatomderivate zu identifizieren, waren ebenfalls nicht erfolgreich.

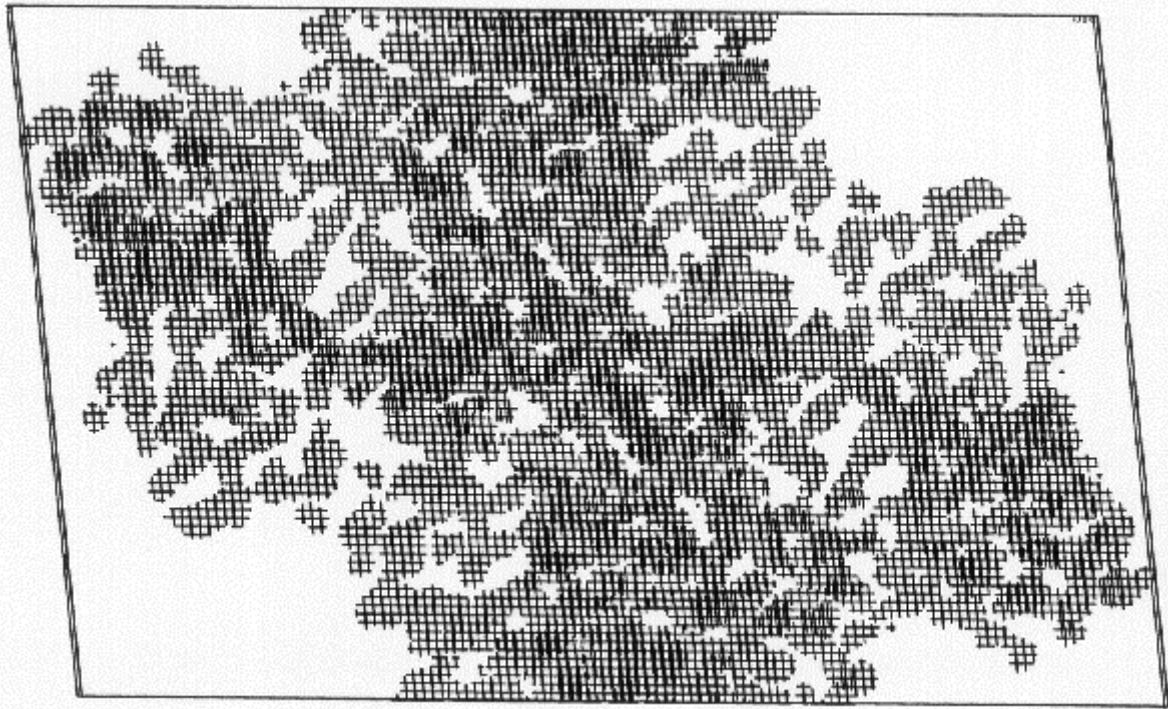


Abbildung 13 SIRAS-Elektronendichtekarte nach Verfeinerung der Phasen mit SHARP und Solvensglättung mit SOLOMON. Gezeigt ist die Elementarzelle mit Blickrichtung entlang der 2-zähligen Schraubenachse. Man erkennt deutlich abgegrenzte Solvens- und Proteinbereiche.

4.4.4 Versuche zur Strukturlösung mit molekularem Ersatz

Ab November 1998 stand ein atomares Modell des entfernt verwandten Zelladhäsionsproteins Hemolin aus *Hyalophora cecropia* zur Verfügung (Su *et al.*, 1998). Mit diesem wurden intensive Versuche zur Phasenbestimmung mit der Methode des molekularen Ersatzes (engl. *molecular replacement*, MR) unternommen, sowohl mit als auch ohne Einbeziehung der aus dem Pt-Derivat erhaltenen Phaseninformation (Brünger, 1990). Darüber hinaus wurde das Suchmodell modifiziert. Neben dem unveränderten Hemolin-Modell wurden Polyserin- und Polyalaninmodelle ebenso verwendet wie unterschiedliche Modelle, in denen identische oder konservierte Seitenkettenatome zusätzlich verwendet und/oder Proteinregionen mit hohen Temperaturfaktoren oder hoher genetischer Variabilität entfernt wurden. Keine der beschriebenen Modelle zeigte bei der Rotationssuche ein deutliches Signal. Die bei der Translationssuche der besten 200 Orientierungen aus der Rotationssuche erhaltenen potentiellen Lösung wurden anhand ihrer Raumerfüllung und der resultierenden kristallographischen R-Faktoren beurteilt. Mit den Phasen, die sich aus den besten Modellen ergaben, und den Amplituden aus der Messung des K_2PtCl_4 -Derivates wurden anschließend Differenzelektronendichtekarten erzeugt. Die Maxima einer solchen Elektronendichtekarte sollte im Falle der richtigen Lösung den bekannten Positionen der Platinatome in der Einheitszelle entsprechen bzw. zu diesen symmetrisch äquivalent sein. Dabei mußte beachtet werden, dass in der vorliegenden Raumgruppe $P2_1$ die Wahl des Ursprungs in y-Richtung beliebig erfolgt, und dieser zusätzlich auf jeder der vier in der Elementarzelle enthaltenen Drehachsen liegen kann. Keine der untersuchten Lösungen zeigte zwei deutliche Maxima an geeigneten Stellen.

Zwei wesentliche Gründe tragen vermutlich zum Scheitern der geschilderten Methode bei: Erstens sind, rückblickend nach Aufklärung der Ax1Ig1-4-Struktur, die Unterschiede zwischen beiden Strukturen für die Methode des molekularen Ersatzes zu groß. Nur im Kern der einzelnen Ig-Domänen verläuft die Polypeptidkette ähnlich, während die Schleifen und Linker, die einen Großteil der Struktur ausmachen, sehr unterschiedlich sind. Zusätzlich sind die einzelnen Domänen unterschiedlich relativ zueinander orientiert. Wählt man eine maximale Entfernung von 1.8 Å, so können nur 180 von 382 C α -Positionen in Ax1Ig1-4 mit denen aus Hemolin überlagert werden, wobei sich eine Wurzel aus dem mittleren Abstandsquadrat (RMSD, von engl. *root mean squared deviation*) von 1.9 Å ergibt. Ein zweiter wichtiger Grund für das Scheitern der Strukturlösung durch molekularen Ersatz ist darüber hinaus die schlechte Qualität des Suchmodells, da die Hemolin Struktur nur bei einer Auflösung von 3.1 Å gelöst wurde.

4.4.5 Phasenbestimmung mit multipler anomaler Streuung (MAD)

Im Februar 1999 stand Messzeit am Messstand X31 des Deutschen Elektronen Synchrotrons (DESY) in Hamburg zur Verfügung. An diesem Messstand besteht die Möglichkeit, die Wellenlänge der verwendeten Strahlung zu verändern. Da von Ax1Ig1-4 ein Platin-Derivat zur Verfügung stand, das ein starkes anomales Signal erzeugt, wurden an diesem Messstand Daten bei drei Wellenlängen (Edge, Peak, Remote High) aufgenommen. Weil mit dem verwendeten Kristall bereits Daten an einer Kupfer-Drehanode aufgenommen worden waren, konnte diese (Remote Low) mit den Synchrotrondaten zusammen verwendet werden. Zur Phasenbestimmung wurden die bekannten Schwermetallatompositionen sowie Temperaturfaktoren, Besetzungszahlen und anomale Streufaktoren mit dem Programm SHARP verfeinert. Ein Überblick über Datenaufnahme- und Phasenbestimmungsstatistiken ist in Tabelle 3 gegeben. Die verfeinerten Phasen wurden anschließend durch iterative Solvensglättung mit dem Programm SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) modifiziert. Die damit erhaltenen Elektronendichtekarte ermöglichte schließlich eine erfolgreiche Strukturaufklärung.

Datensatz	Peak	Edge	Remote High	Remote Low
Wellenlänge (Å)	1.0717	1.0720	0.9051	1.5418
Auflösung (Å)	15-2.8 (2.90-2.80)	15-2.8 (2.90-2.80)	15-2.8 (2.90-2.80)	15-3.0 (3.11-3.00)
Unabhängige Reflexe	12003	12019	12065	9600
Vollständigkeit (%)	98.4 (96.8)	98.0 (92.9)	98.1 (95.0)	99.2 (97.3)
I / σ (I)	13.9 (2.5)	12.9 (2.3)	9.5 (2.0)	11.7 (2.7)
R _{sym}	9.4 (43.1)	9.0 (39.2)	8.7 (35.3)	10.7 (39.4)
Phasing Power				
Dispersive	2.49	2.10	0	0.25
Anomale	0.83	1.18	1.31	1.10
Figure of merit	—	—	0.47	—

Tabelle 3 Statistiken zur Datenaufnahme und Phasenbestimmung durch MAD.

4.5 Modellbau und Verfeinerung

4.5.1 Erstellung des ersten Modells

Die aus der Phasenbestimmung durch MAD und anschließender Solvensglättung erhaltene Elektronendichtekarte war von ausreichender Qualität, um den Verlauf der Polypeptidkette über einen großen Teil des Proteinmoleküls zu verfolgen. So konnte in diese Karte die Hauptkette von ca. 280 Resten in den Ig-Domänen 1 bis 3 als Polyalanin modelliert werden. Der Verlauf der Hauptkette in Ig4 konnte jedoch anhand dieser Karte nicht festgelegt werden. Zu diesem Zeitpunkt des Modellbaus war jedoch schon zu erkennen, dass die relative Orientierung der Ig-Domänen 1 bis 3 denen im Hemolin-Molekül sehr ähnlich war. Es erschien daher sinnvoll anzunehmen, dass auch die relative Position von Ig4 in Axonin-1 der von Hemolin entsprechen würde. Daher wurde für den Modellbau die Hauptketten von Hemolin mit der Hauptkette von Ig1 bis 3 von Ax1Ig1-4 überlagert, und die Position von Ig4 von Hemolin wurde für Axonin-1 in Form eines Polyalaninmodells übernommen. Auf dieser Stufe des Modellbaus konnte zusätzlich schon einige Seitenketten von Aminosäuren modelliert werden, die in der MAD-Elektronendichtekarte bereits deutlich zu erkennen waren (Abb. 14).

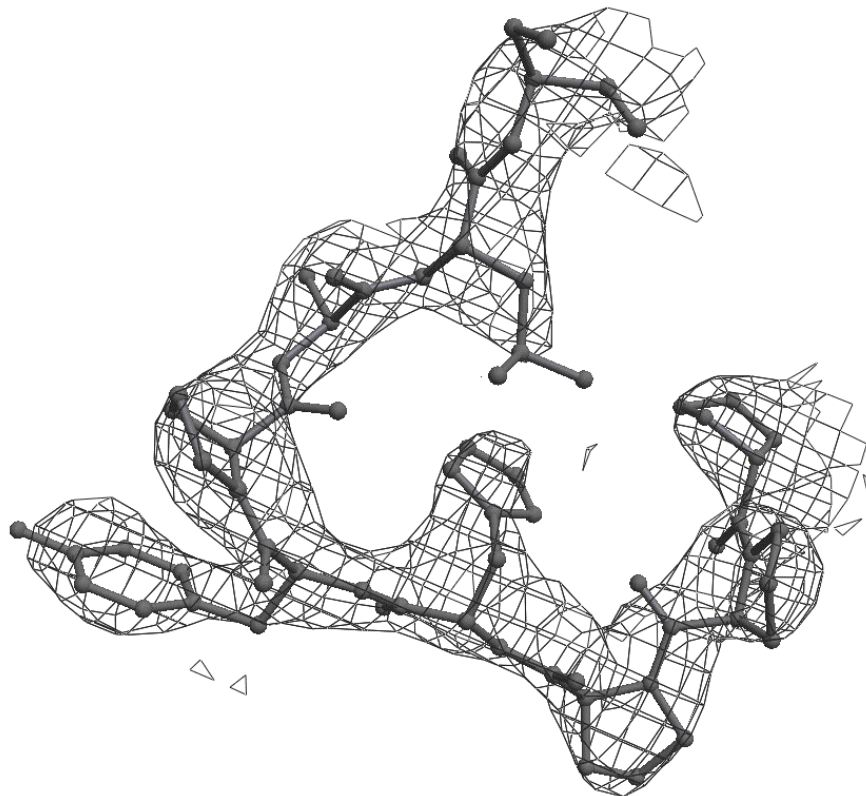


Abbildung 14 MAD-Elektronendichtekarte im Bereich der Reste 131 bis 139 in Ig2, unterlegt mit dem finalen Modell. Man erkennt deutlich den Verlauf der Hauptkette sowie einzelne Seitenketten.

Der Einbau der Sequenz wurde durch die Tatsache erleichtert, dass die Positionen der Disulfidbrücken, die sowohl in der Sequenz als auch in der Struktur von

Immunoglobulindomänen stark konserviert sind, eindeutig zu lokalisieren waren. Das erste Modell enthielt 366 Reste, von denen 64 Seitenkettenatome enthielten, und ergab einen R-Faktor von 52 %.

4.5.2 Verfeinerung des Modells

Die Verfeinerung eines Proteinmodells erfolgt typischerweise in sogenannten Runden, wobei jede Runde in zwei Schritten durchgeführt wird. Der erste Schritt besteht aus einer computergestützten Modifizierung des Modells, bei der mit Hilfe verschiedener Algorithmen eine Angleichung des Proteinmodells an die gemessenen Daten erfolgt. Im zweiten Schritt einer Verfeinerungsrunde wird das verbesserte Modell zur Berechnung einer neuen Elektronendichtekarte benutzt. Mit Hilfe dieser verbesserten Elektronendichtekarte werden dann am Display manuell Veränderungen am Modell vorgenommen, die zu einer besseren Übereinstimmung mit der Elektronendichtekarte führen. In frühen Stadien der Verfeinerung sind solche manuellen Veränderungen vor allem das Einfügen von Seitenketten gemäß der bekannten Sequenz, das Hinzufügen zusätzlicher Reste an den N- oder C-Terminus des Proteins und die Korrektur des Verlaufs der C_α-Kette. In einem späteren Stadium des Modellbaus werden hauptsächlich die Konformationen einzelner Seitenketten korrigiert. Gegen Ende des Verfeinerungsvorganges werden außerdem noch automatisch oder manuell Solvensmoleküle in das Modell aufgenommen. Es werden so viele Verfeinerungsrunden durchgeführt, bis keine Erniedrigung des R_{free}-Wertes mehr beobachtet werden kann.

Bei der Verfeinerung des Ax1Ig1-4-Modells wurde das Programm CNS, Version 0.4 (Brünger *et al.*, 1997) verwendet. In der ersten Verfeinerungsrunde wurde zuerst die Position und Orientierung der vier Ig-Domänen sowie der drei Linker zwischen den Domänen verfeinert. Letztere werden daher als "starre Körper" (engl. *rigid body*) mit festgehaltener Struktur räumlich verschoben und gedreht. In allen weiteren Verfeinerungsrunden stellte die Energieminimierung nach Powell den ersten Verfeinerungsschritt dar (Powell, 1977). Anschließend wurde eine Molekulardynamik simuliert, bei der eine Abkühlung von 3000 K auf 0 K in Schritten von 25 K durchgeführt wurde. Nach der Molekulardynamik wurde erneut eine Energieminimierung nach Powell durchgeführt. Im Anschluß daran wurden individuelle Temperaturfaktoren verfeinert. In späteren Verfeinerungsrunden wurden zusätzlich automatisch Wassermoleküle in das Modell eingefügt, sofern Differenzelektronendichte $> 2 \sigma$ in einem für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken geeignetem Abstand zu Sauerstoff- oder Stickstoffatomen vorhanden war.

Ab der dritten Verfeinerungsrunde wurden anstelle der MAD-Daten die am Synchrotron gemessenen, nativen Beugungsdaten verwendet, da diese von erheblich höherer Qualität waren. Weil der dieser Messung zu Grunde liegende Kristall deutlich andere Zellachsen besaß als der zur Phasenbestimmung verwendete, mußte an dieser Stelle eine Rotations- und Translationssuche durchgeführt werden. In den folgenden Verfeinerungsrunden wurde die verwendete Auflösung sukzessiv von 2.6 Å auf die volle zur Verfügung stehende Auflösung von 1.8 Å erhöht. Nach 14 Verfeinerungsrunden hatte der freie R-Faktor ein Minimum erreicht. Weitere Versuche zur Verbesserung des Modells führten zu einer Erhöhung des freien R-Faktors und wurden daher verworfen.

4.6 Qualität des finalen Modells

4.6.1 Überblick über das finale Modell

Das finale Modell von AxIg1-4 beinhaltet die Aminosäuren 7 bis 388, wobei sich die Nummerierung auf das reife Protein ohne Signalsequenz bezieht. Für zusätzliche Reste vor bzw. nach diesem Sequenzbereich ist keine deutliche Elektronendichte sichtbar, vermutlich weil diese Bereiche keine geordnete Struktur besitzen. Das Modell enthält außerdem 357 Wassermoleküle, die sich in einem Abstand zu Sauerstoff- oder Stickstoffatomen befinden, wie sie für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke erwartet werden. Zusätzlich wurde ein zusammenhängender Elektronendichtebereich an der Kontaktfläche von Ig1 und Ig2 als Glycerinmolekül modelliert. Das Modell wurde unter der Nummer 1CS6 in die Proteindatenbank eingetragen. Die nachfolgende Tabelle 4 gibt einen Überblick über das Modell.

Kristallographische Daten

Auflösungsbereich [Å]	20 - 1.80 (1.91 - 1.80)
Anzahl unabhängiger Reflexe	47550
Vollständigkeit [%]	94.1
R _{work} [%]	22.6 (26.5)
R _{free} [%]	25.7 (28.4)

Im Modell enthaltene Atome

Anzahl der nicht Wasserstoffatome	3362
davon Proteinatome	2999
davon Wasseratome	357
davon Glycerinatome	6

RMS Abweichungen von der Standardgeometrie

Bindungslängen [Å]	0.005
Bindungswinkel [°]	1.30
Diederwinkel [°]	26.60
Improperwinkel [°]	0.79

Tabelle 4 Überblick über Statistiken zur Qualität des finalen Ax1Ig1-4-Modells

4.6.2 R-Faktoren

Zur Kontrolle des Fortschreitens der Verfeinerung werden die gemessenen Beugungsdaten üblicherweise in zwei Teildatensätze unterteilt. Je nach erreichter Auflösung bilden 5-10 % der gemessenen Reflexe einen Testdatensatz, der bei der Durchführung der computergestützten Verfeinerung nicht verwendet wird (Brünger, 1992). Die übrigen Reflexe bilden den Arbeitsdatensatz, gegen den die Struktur verfeinert wird. Die Übereinstimmung des theoretischen Beugungsmusters mit den tatsächlich gemessenen Reflexen wird anhand eines R-Faktors quantifiziert (siehe Material und Methoden). So ergibt die Übereinstimmung mit den Reflexen im Testdatensatz den R_{free} und mit den Reflexen im Arbeitsdatensatz den R_{work}. Eine große Differenz zwischen R_{work} und R_{free} bzw. ein Ansteigen des R_{free} während einer Verfeinerungsrunde sind Indikatoren für ein Overfitting der Daten. In hochaufgelösten Strukturen sollte die Differenz beider R-Faktoren nicht mehr als 5 % betragen, was im vorliegenden Fall mit 3.1 % erfüllt ist.

4.6.3 Elektronendichte

Bei der im vorliegenden Fall erreichten Auflösung von 1.8 Å erlaubt die Elektronendichtekarte in gut definierten Proteinbereichen, in denen die Atome niedrige Temperaturfaktoren besitzen, eine Bestimmung der Position und Konformation der Aminosäuren mit hoher Genauigkeit. Ein Beispiel für die Qualität der finalen Elektronendichtekarte ist in Abb. 15 gegeben. Die dargestellte Aminosäure befindet sich im Kernbereich von Ig3. In diesem Bereich besitzen die Atome sehr niedrige Temperaturfaktoren. Aufgrund der in Kapitel 4.11 beschriebenen ausgeprägten Asymmetrie in der Verteilung der Temperaturfaktoren besitzen die Atome in Ig1 und Ig4 deutlich höhere Temperaturfaktoren. In diesen Bereichen ist dementsprechend die Qualität der Elektronendichtekarte niedriger, was die Genauigkeit der Strukturbestimmung begrenzt. Eine Quantifizierung des beschriebenen Sachverhalts ist über Real Space Koeffizienten möglich.

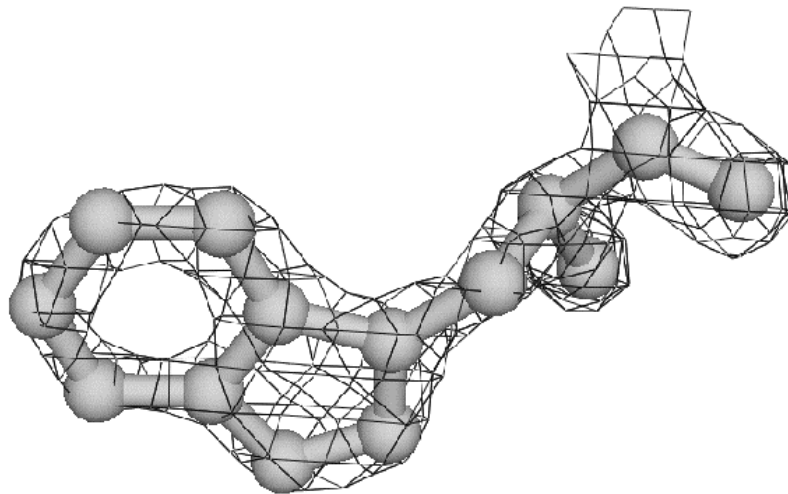


Abbildung 15 Elektronendichte aus Modellphasen für W247 im Zentrum von Ig2. Man erkennt deutlich die Sechsringstruktur des Tryptophans.

4.6.4 Real Space Korrelation

Die Übereinstimmung des Modells mit der Elektronendichte gibt der Real Space Koeffizient (Jones *et al.*, 1991) an. Der Verlauf des Real Space Koeffizienten in Abhängigkeit von der Sequenznummer ist in Abb. 16 dargestellt. Man sieht deutlich, dass im Bereich der Domänen Ig2 und Ig3, also von Rest 104 bis 298, überwiegend eine hohe Korrelation von über 0.95 erreicht wird. Eine Ausnahme bilden lediglich die Bereiche im FG Loop von Ig2 (Reste 187-190) und im CE Loop von Ig3 (Reste 249-64). Diese Bereiche sind an den an späterer Stelle ausführlich beschriebenen Kristallkontakten beteiligt. Die Korrelation im Bereich von Ig1 und Ig4 ist dagegen im Vergleich deutlich geringer. Besonders schlechte Korrelationen ergeben sich erwartungsgemäß in den flexibleren Loop Bereichen zwischen den Faltblättern, so etwa in Ig1 im A'B Loop (Reste 24-29) und im C'D Loop (Reste 53-61) oder in Ig4 ebenfalls im A'B Loop (Reste 314-317) und im EF Loop (Reste 357-3364).

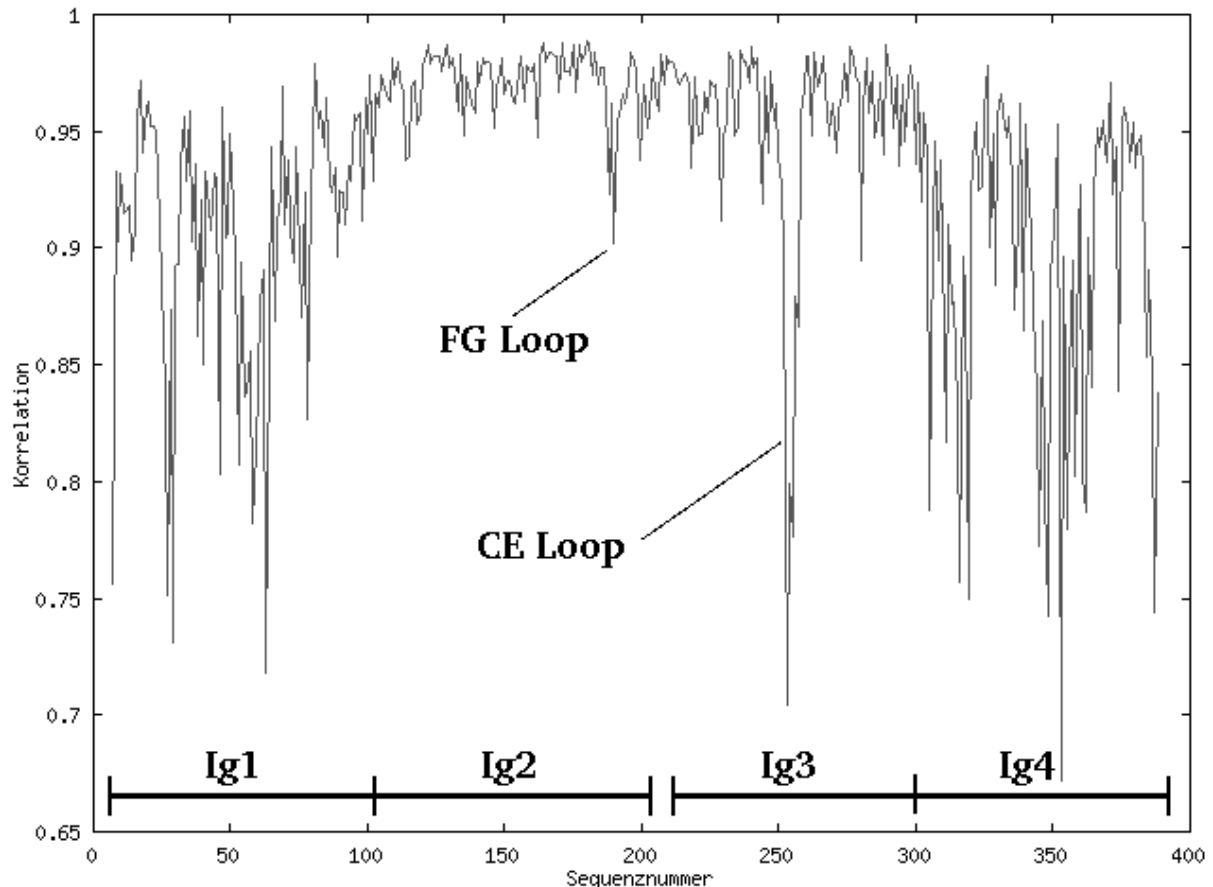


Abbildung 16 Real Space Korrelation zwischen verfeinertem Modell und Elektronendichte. Mit Ausnahme der an den Kristallkontakten beteiligten Loops ergibt sich in Ig2 und Ig3 eine deutlich bessere Korrelation als in Ig1 und Ig4.

4.6.5 Ramachandran Plot

In der Hauptkette eines Proteins kommen drei unterschiedliche Arten von Atomen vor: C_{α} -Kohlenstoff, Carbonylkohlenstoff und Amidstickstoff. Aus der sich wiederholenden Abfolge dieser drei Atomsorten ergeben sich ebenfalls drei Arten von Bindungen. Drehungen um diese Bindungen können anhand der entsprechenden Winkel ϕ ($N-C_{\alpha}$), ψ ($C_{\alpha}-C$) und ω ($C-N$) beschrieben werden. Während ω aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Amidbindung nur bestimmte Winkel entsprechend einer cis- oder einer trans-Konformation annehmen kann, sind für ϕ und ψ viele verschiedene Winkel möglich. Einschränkungen für die möglichen Kombinationen aus ϕ und ψ ergeben sich jedoch durch sterische Wechselwirkungen mit den Seitenkettenatomen und durch Wechselwirkungen innerhalb von Sekundärstrukturen. Energetisch günstige ϕ/ψ -Kombinationen werden als "erlaubt" bezeichnet, energetisch ungünstige dagegen als "verboten". Verbotene Winkelkombinationen deuten entweder auf Fehler des Modells oder auf strukturelle Besonderheiten des Proteins hin, die oft eine funktionelle Relevanz besitzen (Herzberg & Moulton, 1991). Eine Auftragung von ψ gegen ϕ für alle Aminosäuren eines Proteinmodells nennt man Ramachandran Plot (Ramachandran & Sasisekharan, 1968). Ein solcher Plot ist in Abbildung 17 für Ax1Ig1-4 gezeigt.

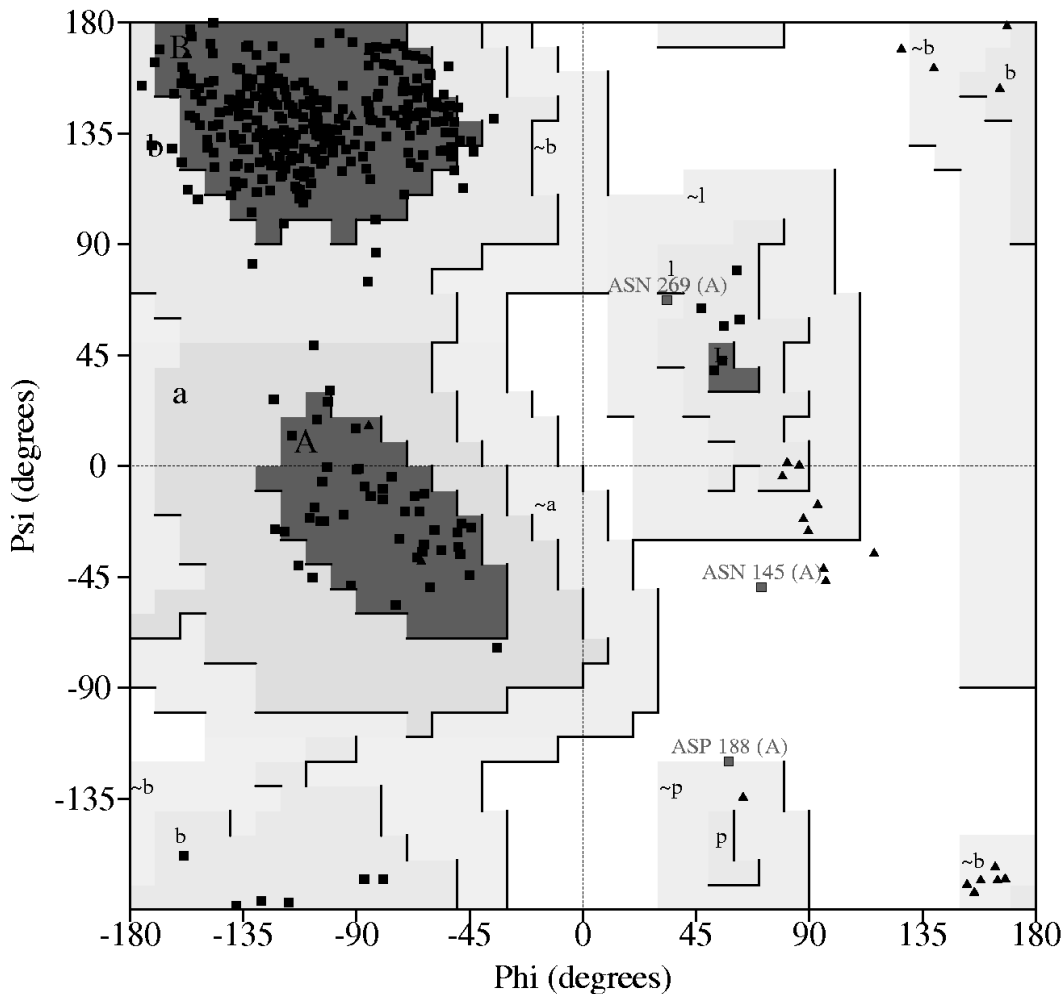


Abbildung 2 Ramachandran-Plot für das verfeinerte Modell von Ax1Ig1-4. Glyzinreste sind als Dreiecke, alle anderen Reste als Quadrate symbolisiert. Die Häufung der Quadrate in der linken oberen Ecke zeigt an, dass das Protein überwiegend aus β -Faltblattstruktur aufgebaut ist.

Im Modell von Ax1Ig1-4 liegen 89 % der Reste im Bereich der günstigsten Winkelkombinationen, die im Englischen als "most favoured regions" bezeichnet wird. Nur die Reste N145 und D188 weisen verbotene Winkelkombinationen auf. D188 spielt eine Schlüsselrolle in der Vermittlung eines Kristallkontakts. Zwei Wasserstoffbrücken von Atomen des Nachbarmoleküls zum Hauptkettensauerstoff und -stickstoff stabilisieren vermutlich die ungewöhnliche Konformation. N145 ist der erste Rest nach Strang C in Ig2. An dieser Stelle macht die Polypeptidkette einen engen Knick. Vermutlich wird die ungewöhnliche Konformation durch starke Wechselwirkungen der angrenzenden Reste erzwungen. Bei beiden Resten stimmt die ungewöhnliche Konformation gut mit der vorhandenen Elektronendichte überein.

4.7 Überblick über die Struktur

4.7.1 Anordnung der Immunoglobulin-Domänen

Wie aus der Aminosäuresequenz abgeleitet wurde, besteht der aminoterminaler Teil von Axonin-1, der aus den Aminosäure 7 bis 388 gebildet wird, aus vier Immunoglobulin-domänen. Die relative Orientierung der einzelnen Domänen zueinander kann am besten als antiparallele Anordnung zweier Tandemeinheiten aus Immunoglobulin-domänen

beschrieben werden. Tandemeinheiten aus zwei Ig-Domänen, die durch starke Wechselwirkungen an ihren Grenzflächen eine rigide Gesamtstruktur ausbilden, sind aus den Röntgenstrukturen einer Reihe strukturell und funktionell sehr unterschiedlicher Zelladhäsionsproteine bekannt, z.B. CD2, VCAM-1 oder MADCAM. Die zwei aminoterminalen Ig-Domänen von Axonin-1 sind in ähnlicher Weise annähernd linear orientiert und bilden durch eine Kontaktfläche zwischen den Domänenoberflächen im Bereich des C-terminus von Ig1 und des N-terminus von Ig2 ebenfalls eine rigide Struktureinheit. Diese Orientierung nennt man auch Kopf zu Schwanz (engl. *head to tail*) Orientierung. Im Anschluss an Ig2 beschreibt die Hauptkette einen halbkreisförmigen Bogen mit einem Durchmesser von etwa 15 Å. Die darauf folgenden Domänen Ig3 und Ig4 bilden ebenfalls eine Tandemeinheit aus Ig-Domänen, die jedoch antiparallel zu der ersten, aus Ig1 und Ig2 gebildeten, orientiert ist. In der resultierenden, U-förmigen Struktur sind der N-Terminus und der C-Terminus des Proteinfragments nur etwa 15 Å voneinander entfernt.

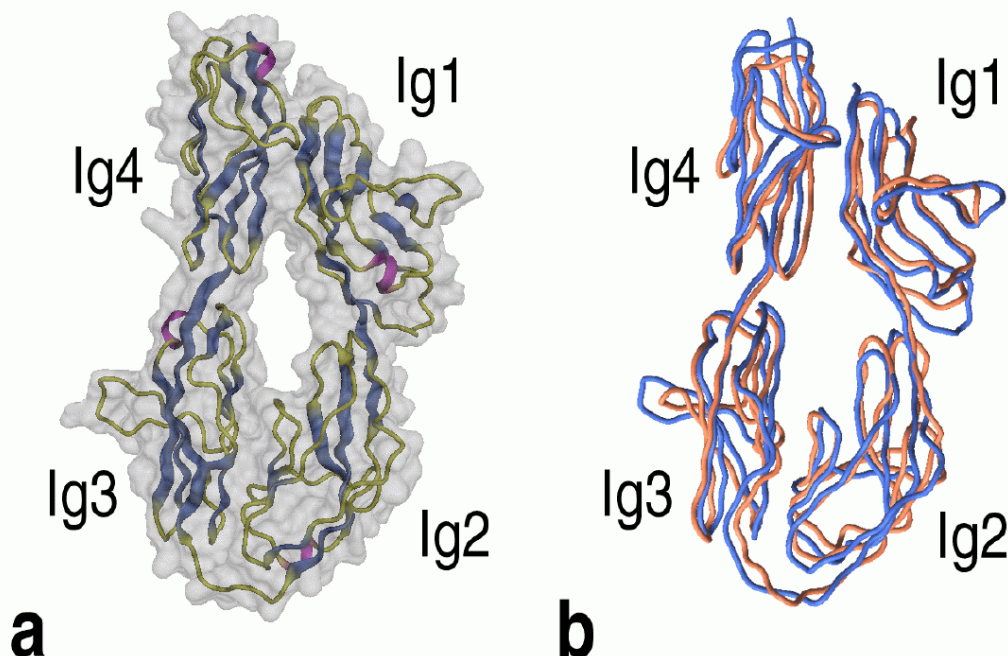


Abbildung 3 In **a** ist ein Überblick über die Gesamtstruktur von Ax1Ig1-4 dargestellt. Faltblattbereiche sind blau, Helixbereiche magenta gefärbt. In **b** ist die beste Überlagerung von Ax1Ig1-4 (blau) mit Hemolin (braun) gezeigt.

Die relative Orientierung der vier aminoterminalen Ig-Domänen entspricht exakt der auf der Basis von molekularbiologischen und biochemischen Daten postulierten Struktur (Rader *et al.*, 1996). Durch starke Wechselwirkungen zwischen den Oberflächen der Domänen Ig2 und Ig3 und der Domänen Ig1 und Ig4 entsteht eine ovale Gesamtform des Moleküls mit Dimensionen von etwa 95 x 45 x 25 Å und einem länglichen Loch in der Mitte zwischen den vier Domänen, das eine Länge von etwa 25 Å und eine Breite von etwa 10 Å besitzt. Die Wechselwirkungen zwischen Ig2 und Ig3 und zwischen Ig1 und Ig4 unterscheiden sich in wesentlichen Punkten. Während an den Kontaktflächen zwischen Ig2 und Ig3 hauptsächlich über aromatische oder aliphatische Seitenketten hydrophobe Interaktionen ausgebildet werden, sind die Wechselwirkungen zwischen den Oberflächen der Domänen Ig1 und Ig4 überwiegend polar. Ig2 und Ig3 bilden also einen gemeinsamen hydrophoben Kern, während

Ig1 und Ig4 auch an ihrer Kontaktfläche eine überwiegend polare Oberfläche besitzen. Darüber hinaus bedeckt die Kontaktfläche zwischen Ig1 und Ig4 mit 760 \AA^2 deutlich weniger solvenszugängliche Oberfläche als die Kontaktfläche zwischen Ig2 und Ig3, die 1193 \AA^2 bedeckt. Im Vergleich bedecken die Kontaktflächen in den Tandemeinheiten zwischen Ig1 und Ig2 489 \AA^2 und zwischen Ig3 und Ig4 535 \AA^2 .

4.7.2 Vergleich mit anderen Proteinen

Die halbkreisförmige Anordnung der Ig-Domänen in Hemolin entspricht nicht der klassischen Vorstellung, dass in Proteinen, die mehrere Ig-Domänen enthalten, diese wie Perlen auf einer Schnur angeordnet sind (Chothia & Jones, 1997). Diese Vorstellung beruht darauf, dass die ersten gelösten Strukturen von Zelladhäsionsproteinen, die mehr als eine Immunoglobulindomäne enthielten, Ig-Domänen in nahezu paralleler Orientierung hintereinander aufwiesen. Im Falle des CD4 Moleküls sind sogar vier Ig Domane nahezu parallel hintereinander orientiert. In neuerer Zeit konnten jedoch einige Strukturen aufgeklärt werden, die deutlich von diesem Schema abweichen. So bilden z. B. die Hauptachsen der zwei N-terminalen Ig-Domänen in Intimin, einem bakteriellen Zelladhäsionsprotein, einen annähernd rechten Winkel (Kelly *et al.*, 1999). Eine ebenfalls neuartige Anordnung der Ig-Domänen wurde auch bei der Strukturbestimmung des schon mehrfach erwähnten Proteins Hemolin aus *Hyalophora cecropia* gefunden (Su *et al.*, 1998). Die relative Orientierung ähnelt in diesem Protein sehr stark der, die in der vorliegenden Arbeit für Ax1Ig1-4 gefunden wurde. Eine solche Ähnlichkeit konnte nicht aufgrund der Sequenz vorhergesagt werden, da Hemolin im Vergleich mit den N-terminalen vier Ig-Domänen von Axonin nur 27 % identische Reste besitzt. Die Tatsache, dass ein Großteil dieser Identität auf stark konservierte, funktionell wichtige Reste in der Immunoglobulindomänenstruktur zurückzuführen ist, ist daraus ersichtlich, dass ein Alignment von Hemolin mit den Ig-Domänen 3 bis 6 von Axonin-1 ebenfalls eine Identität von 24 % aufweist.

Eine Überlagerung der C_α -Positionen beider Proteinstrukturen zeigt neben der groben Ähnlichkeit auch deutliche Unterschiede (Abb. 18). So können unter Verwendung einer Obergrenze für Abstände äquivalenter Atome von 3.8 \AA nur 190 von insgesamt 382 C_α -Atomen, entsprechend 49.7 %, von Axonin-1 mit denen von Hemolin überlagert werden, wobei sich eine Wurzel aus dem mittleren Abstandsquadrat (RMSD) von 1.9 \AA ergab. Dieser relativ geringe Prozentsatz strukturell äquivalenter C_α -Positionen lässt sich zum Teil durch die Tatsache erklären, dass in der besten Überlagerung beider Strukturen Ig1 und Ig4 in Axonin-1 um 8° bzw. 19° gegen ihre Äquivalente in Hemolin verkippt sind. Wie in Kapitel 4.11 ausführlich beschrieben wird, liegt diese Abweichung in einer Größenordnung, wie sie auch in verschiedenen Kristallformen in Ax1Ig1-4 zu finden ist. Es handelten sich also vermutlich nicht um Unterschiede der energieärmsten Konformationen beider Moleküle, sondern um durch Differenzen in den Packungskräften erzeugte Konformationsunterschiede.

4.8 Strukturbeschreibung der einzelnen Domänen

4.8.1 Struktur motive

Wie aufgrund der Sequenz zu erwarten war, besitzen alle vier Einzeldomänen eine Reihe Charakteristika, wie sie für Immunoglobulindomänen typisch sind. So sind in allen vier Domänen die Stränge B und F durch eine Disulfidbrücke verknüpft, gegen die ein konserviertes Tryptophan packt. In den Disulfidbrücken ist jeweils ein Cystein Teil eines

perfekt konservierten "Tyrosine Corner" Motifs (Hemmingsen, 1994) mit der Sequenz D-X-G-X-Y-X-C. Eine weitere Gemeinsamkeit der vier Ig-Domänen ist, dass alle *cis*-Proline im BC Loop enthalten, wie sie an dieser Stelle u. a. auch in den Zelladhäsionsproteinen ICAM-1 (Casasnovas *et al.*, 1998; Bella *et al.*, 1998), ICAM-2 (Casasnovas *et al.*, 1997), VCAM-1 (Wang *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1995) und MAdCAM (Tan *et al.*, 1998) gefunden wurden. In Ig3 und Ig4 von Axonin-1 sind diese *cis*-Proline Teil eines *cis*P-X-*trans*P Motifs, das einen sehr scharfen Turn erlaubt und auch in den strukturell verwandten Proteinen Titin (Pfuhl & Pastore, 1995, Improta *et al.* 1996) und Telokin (Holden *et al.*, 1992) an äquivalenten Stellen vorkommt. Wie schon in Kapitel 4.8.1 angesprochen, stellen diese *cis*-Proline wahrscheinlich den Grund für die ungewöhnlich langsame Kinetik der *in vitro* Faltung dar. Den Domänen ist außerdem ein kurzer helikaler Bereich zwischen dem E und dem F Strang gemeinsam. In Ig4 bilden vier Reste eine α -Helix, in den übrigen Domänen bilden je drei Reste ein kurzes Stück 3_{10} -Helix.

4.8.2 Klassifizierung der einzelnen Domänen

Wie in Kapitel 1.5 erläutert, lassen sich Ig-Domänen aufgrund ihrer Topologiecharakteristika in verschiedene Unterklassen einordnen. Von verschiedenen Autoren wurde anhand der Sequenz von Axonin-1 vorhergesagt, dass zumindest einige der Ig-Domänen typische Vertreter der I-Set bzw. II-Set Topologie sein sollten. Abbildung 19 zeigt schematisch die Gesamttopologie von Ax1Ig1-4.

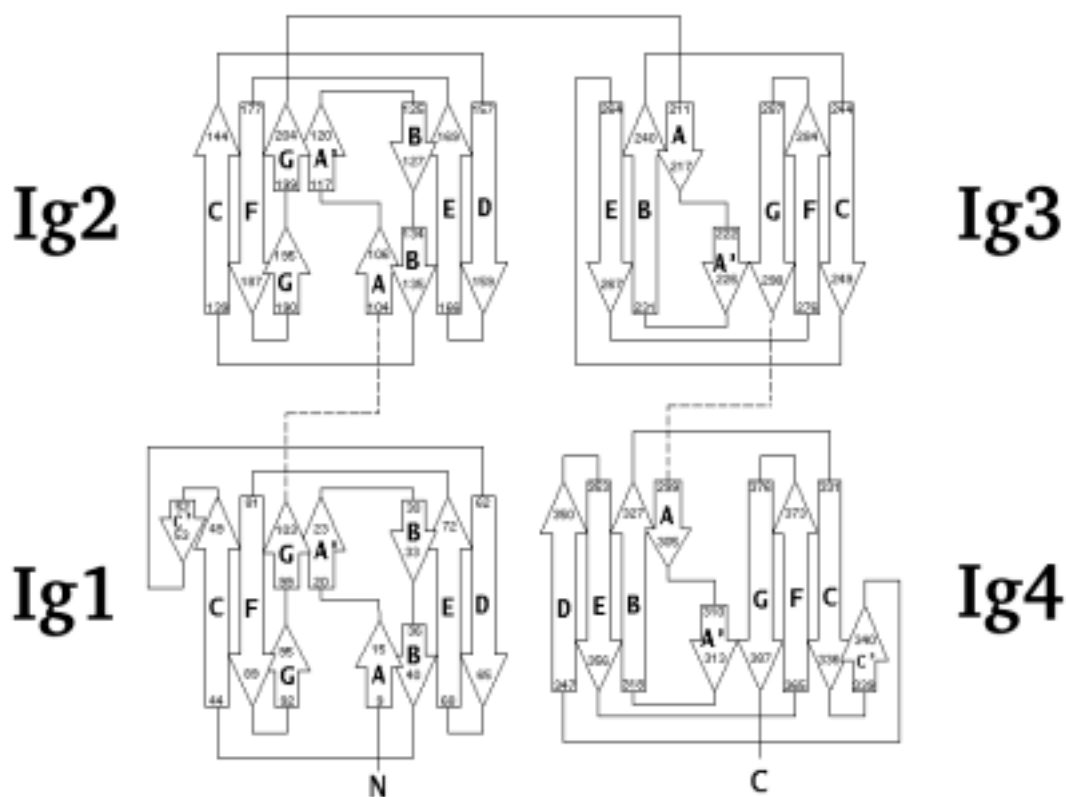


Abbildung 4 Topologieschema von Ax1Ig1-4. Die Zahlen geben jeweils den ersten und letzten Rest in den Faltblattstrukturen an. Die gestrichelten Linien zwischen G und F Strängen symbolisieren die Durchgängigkeit der Faltblätter zwischen Ig1 und Ig2 sowie zwischen Ig3 und Ig4.

Aus Abbildung 19 wird deutlich, dass lediglich Ig4 ideale I1-Set Topologie aufweist. In dieser Domäne wird eine Hälfte des β -Sandwiches von den Strängen A, B und E gebildet, während das andere β -Faltblatt die Stränge G, F, C und C' enthält. In Ig2 und Ig4 sind dagegen die Stränge B und G nicht durchgängig, sondern durch 2 bis 6 Reste unterbrochen. Die Topologie von Ig2 zeigt eine weitere, kleinere Abweichung von der Idealform, da ihr der kurze C'-Strang fehlt. Ein solches Fehlen des C'-Strangs wurde ebenfalls für eine Reihe anderer Zelladhäsionsproteine berichtet, die zur I-Set Topologie gerechnet werden, so z. B. ICAM-1. Dagegen läßt sich Ig3 nur aufgrund seiner Topologie nicht eindeutig einer Topologieunterklasse zuordnen, da es, im Gegensatz zu allen bekannten Proteinen mit Ig-Fold, weder einen D noch einen C' Strang aufweist. Da diese Domäne mit einem D Strang dem I1-Set und mit einem C' Strang dem I2-Set zugeordnet werden könnte, handelt es sich um eine Zwischenform dieser beiden Unterklassen. Allerdings ähnelt die Domäne insgesamt, im Sinne geringster Abweichungen der C_α -Kette, am stärksten Ig4 von Hemolin und ebenfalls Ig4 von Axonin-1. Da beides typische Vertreter der I1-Set Topologie sind, erscheint es sinnvoll, Ig3 als Mitglied des I1-Set ohne D Strang und nicht als Mitglied des I2-Sets ohne C' Strang zu klassifizieren. Die Reste, die sich in Ig3 zwischen den Strängen C und E befinden, bilden statt eines D oder C' Stranges die auffälligste Besonderheit der Ax1Ig1-4 Struktur. Dieser CE Loop bildet eine hakenförmige Struktur, die vom Zentrum der globulären Proteinstruktur weggerichtet ist und darüber hinaus im Kristall die stärksten Protein-Protein Wechselwirkungen vermittelt.

4.9 Intermolekulare Wechselwirkungen

4.9.1 Protein-Protein-Wechselwirkungen in Kristallen

Ein Proteinkristall ist eine regelmäßige, dreidimensionale Anordnung einzelner Proteinmoleküle. Die Kontakte der Proteinmoleküle untereinander, die diese regelmäßige Anordnung ermöglichen, entstehen zumeist, indem zufällig zueinander kompatible Oberflächenregionen auf verschiedenen Molekülen energetisch günstige Wechselwirkungen ausbilden. Darüber hinaus sollten aber im Kristall auch biologisch relevante Protein-Protein-Interaktionen beobachtbar sein, sofern sich die Kristallisationsbedingungen nicht zu sehr von der natürlichen Umgebung des Proteins unterscheiden. Eine Unterscheidung zwischen zufälligen und biologisch relevanten Kristallkontakten gestaltet sich schwierig, da eine Berechnung der freien Bindungsenthalpie aus der Struktur bisher nicht möglich ist. Um dennoch die relative Stärke von Wechselwirkungen in Kristallkontakten zu erhalten, vergleicht man die Buried Surface Area. Sie stellt die Fläche dar, um die sich die solvenszugängliche Oberfläche der am Kristallkontakt beteiligten Moleküle durch die Wechselwirkung verringert. Eine Untersuchung von 1320 zufälligen Kristallkontakten aus Strukturen der Proteindatenbank ergab eine mittlere Buried Surface Area von 570 \AA^2 (Janin, 1997). Trägt man die Häufigkeit von Kristallkontakten einer bestimmten Fläche gegen die Fläche auf, so erhält man für Werte $> 700 \text{ \AA}^2$ einen annähernd exponentiellen Verlauf der Kurve. Daraus kann die Wahrscheinlichkeit $p(B)$, einen zufälligen Kristallkontakt einer Buried Surface Area größer als B zu finden, abgeschätzt werden zu:

$$p(B) \approx 4.2 \exp\left(\frac{-B}{260}\right) \quad (1)$$

4.9.2 Kristallkontakt in y-Richtung

Der Kristall, der die hochaufgelösten Daten lieferte, gegen die das Ax1Ig1-4 Modell verfeinert wurde, gehörte der Raumgruppe $P2_1$ an. In dieser Raumgruppe ist für jede Raumrichtung mindestens ein Kristallkontakt nötig, um das dreidimensionale Gitter aufzubauen. Der Kristallkontakt mit der größten Buried Surface Area ist der Kristallkontakt entlang der 2-zähligen Schraubenachse in y-Richtung. Auffällig ist darüber hinaus, dass an der Ausbildung dieses Kristallkontaktes Proteinbereiche mit einer ungewöhnlichen Struktur beteiligt sind. So wird auf dem einen Proteinmolekül die Wechselwirkung hauptsächlich durch Reste des ungewöhnlichen CE Loops in Ig3 vermittelt. Ähnlich einer Hand, die in einen Rettungsring greift, ragt dieser Loop in das Loch im Zentrum der vier Ig-Domänen des benachbarten Proteinmoleküls (Abb. 20). Im Bereich der Reste 250 bis 261 besitzen 10 von 12 Resten Atome, die kleinere Abstände als 4 Å zu Atomen im benachbarten Proteinmolekül aufweisen. Die an diesen Wechselwirkungen beteiligten Reste sind auf dem Nachbarmolekül ausschliesslich in Ig2 und Ig3 lokalisiert. Die stärksten Wechselwirkungen mit dem CE Loop in Ig3 erfolgen mit den Resten 186 bis 189, die sich im FG Loop von Ig2 des Nachbarmoleküls befinden. Die beiden Aromaten F189 und W258 ermöglichen einen starken hydrophoben Kontakt, der von drei Wasserstoffbrücken flankiert wird. In zwei der drei Wasserstoffbrücken sind sowohl Donor als auch Akzeptor Hauptkettenatome, in der dritten erfolgt die Wasserstoffbrücke von einem Seitenkettenstickstoff in H186 zum Hauptkettensauerstoff in W258. Da die Hauptkette im Allgemeinen weniger Flexibilität aufweist, spricht die starke Beteiligung der Hauptketten an den Wasserstoffbrücken für eine sehr fixierte Wechselwirkung. D188, dessen Hauptkettensauerstoff und -stickstoff beide an den beschriebenen intermolekularen Wasserstoffbrücken beteiligt sind, wird in eine Konformation gezwungen, dessen Phi- und Psiwinkel in einer verbotenen Region im Ramachandran-Plot liegen. Diese ungewöhnliche Konformation ist ein Hinweis auf die Stärke der beobachteten Wechselwirkungen.

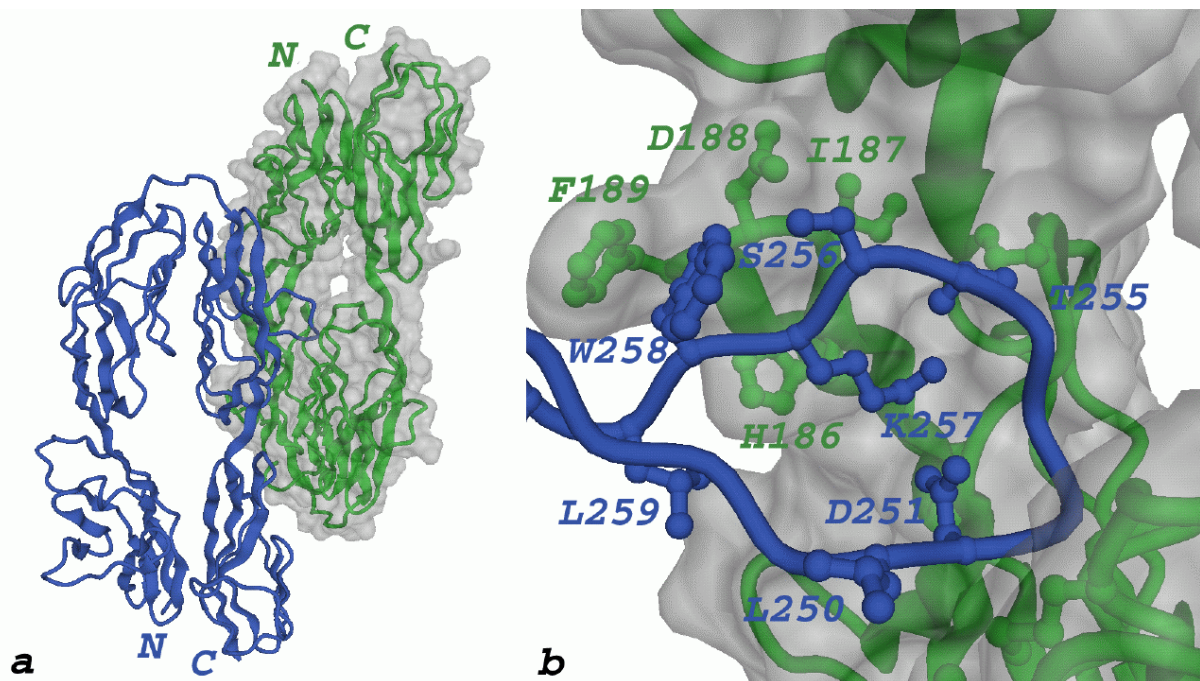


Abbildung 5 Wechselwirkungen zwischen zwei im Kristall benachbarten Ax1Ig1-4 Molekülen. a Übersicht über die relative Orientierung der zwei Moleküle. b Detailansicht der Wechselwirkungen zwischen CE Loop (blau) und FG Loop (grün). Beschriftet sind Reste beider Loops mit Abständen unter 4 Å zu Resten im Nachbarmolekül.

Zwei Beobachtungen stützen die Annahme, dass die beschriebenen Wechselwirkungen, die im Kristall zwischen zwei in y-Richtung benachbarten Proteinmolekülen beobachtet wird, die in *in vivo* auftretende Protein-Protein-Wechselwirkung wiedergeben. Erstens ist die Buried Surface Area im Kristallkontakt, also die Fläche, die durch den Kontakt der beiden benachbarten Moleküle nicht mehr zugänglich für Solvensmoleküle ist, für einen zufälligen Kristallkontakt ungewöhnlich groß. Der beschriebene Kristallkontakt resultiert in einer Buried Surface Area von 1235 \AA^2 , woraus sich gemäß obiger Formel eine Wahrscheinlichkeit von etwa 2 % ergibt, einen zufälligen Kristallkontakt dieser Größe anzutreffen. Ein zweiter Hinweis, dass die beobachtete Wechselwirkung keinen zufälligen Kristallkontakt darstellt, ergibt sich aus dem ungewöhnlichen Verlauf des FG Loops in Ig2. In Abbildung 21 ist der Verlauf des FG Loops in der Überlagerung aller vier Ig-Domänen aus Ax1Ig1-4 dargestellt. Während dieser in Ig1, Ig2 und Ig4 einen nahezu identischen Verlauf aufweist, zeigt sich, dass in Ig3 die Stränge F und G je zwei zusätzliche Reste enthalten, was in einer Verlängerung des A'GFCC'-Faltblatts resultiert. Vier Reste im FG Loop von Ig2, die sich also am äußersten Ende des verlängerten Faltblatts befinden, sind an den starken Wechselwirkungen entlang der 2-zähligen Schraubenachse beteiligt. Die Tatsache, dass zu diesen Resten, die eine Schlüsselrolle beim Kristallaufbau spielen, keine äquivalenten Reste in den anderen Ig-Domänen existieren, unterstützt deutlich die Vermutung, dass die Wechselwirkungen, die im Kristall auftreten, die gleichen sind, die auch bei der homophilen trans Interaktion zwischen benachbarten Zellen eine Rolle spielen.

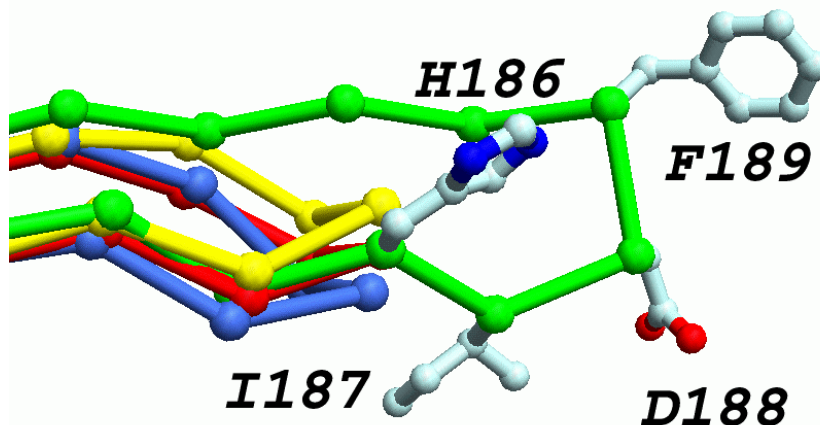


Abbildung 6 Überlagerung der FG Loops von Ig1 (blau), Ig2 (grün), Ig3 (gelb) und Ig4 (rot). Lediglich in Ig2 wird ein deutlich abweichender Verlauf beobachtet. Die dargestellten Seitenketten sind am Kristallkontakt beteiligt.

4.9.3 Wechselwirkungen in x- und z-Richtung

Die Wechselwirkungen, die den Kristall in x-Richtung aufbauen, resultieren in einer verglichen mit den Wechselwirkungen in y-Richtung deutlich kleineren Buried Surface Area von 825 \AA^2 . Im ersten Ax1Ig1-4 Molekül sind an dieser Wechselwirkung die Reste 109 bis 113 beteiligt, die sich in Ig2 zwischen den Teilsträngen A und A' befinden, sowie die Reste 195 bis 198, die in einer Unterbrechung des G Stranges in der gleichen Domäne liegen. Die Bindungspartner dieser Reste sind zwei Reste aus der Linkerregion zwischen Ig2 und Ig3, vier Reste aus dem Strang A von Ig3 sowie W123 aus dem A'B Loop von Ig2. Dieses Tryptophan wechselwirkt mit F195, F198 und dem aliphatischen Teil der Seitenkette von K197. Die starke hydrophobe Wechselwirkung wird flankiert von zwei Wasserstoffbrücken

und einer Salzbrücke zwischen E113 und K216. Die starke Beteiligung aromatischer Reste an der Ausbildung des Kristallkontakts könnte ein Hinweis auf dessen biologische Relevanz sein, wie sie in Kapitel 4.11.3.2 diskutiert wird. Durchschnittlich 21 % der Fläche in Protein-Protein-Kontakten besteht aus aromatischen Resten, während es statistisch an der solvenszugänglichen Oberfläche von Proteinen nur 8 % sind (Conte *et al.*, 1999).

Überraschenderweise läßt sich aus dem verfeinerten Proteinmodell nicht direkt ersehen, welche Wechselwirkungen den Kristall in z-Richtung aufbauen. In dieser Richtung benachbarte Proteinmodelle enthalten kein Atom, das einen kleineren Abstand als 4 Å zu Atomen im nächsten Proteinmodell besitzt. Damit läßt sich das Verhandensein von Wasserstoff- und Salzbrücken ebenso ausschließen wie intensive hydrophobe Kontakte. Aufgrund der sehr schwachen Elektronendichte in diesem Bereich läßt sich nicht unterscheiden, ob die Kristallkontakte durch zusätzliche Reste an N- oder C-terminus des Proteins vermittelt werden, die nicht im gegenwärtigen Modell enthalten sind, oder über Solvensatome vermittelt werden, die keine deutliche Elektronendichte zeigen.

4.10 Modell für neuronale Zelladhäsion

4.10.1 Das Reißverschlussmodell

Die im Kristall beobachtete Wechselwirkung zwischen benachbarten Ax1Ig1-4 Molekülen hat weitreichende Konsequenzen für ein Modell der neuronalen Zelladhäsion, sofern sie durch homophile trans Interaktion von Axonin-1 vermittelt wird. Da die asymmetrische Einheit der für die hochaufgelöste Struktur verwendeten Kristallform nur ein Proteinmolekül enthält, besitzt jedes Proteinmolekül exakt die gleiche molekulare Umgebung. Da außerdem jedes Ax1Ig1-4 Molekül einen CE Loop in Ig3 und ein Loch in der Mitte der vier Ig-Domänen besitzt, fungiert es zugleich als "Donor" wie auch als "Akzeptor" des CE Loops. Daraus resultiert eine lineare Anordnung von Ax1Ig1-4 Molekülen, in der die 2-zählige Schraubenachse jeweils benachbarte "Donor-" und "Akzeptormoleküle" ineinander überführt. Da die N-Termini der Proteinmoleküle in eine Richtung fast senkrecht zur Schraubenachse orientiert sind, zeigen die N-Termini benachbarter Moleküle in entgegengesetzte Richtungen. Eine solche Orientierung entspricht der, die man in der *in vivo* Situation erwarten würde, in der die N-Termini mit den Membranen benachbarter Zellen verknüpft sind. Die geschilderte lineare Anordnung erinnert sehr stark an einen Reißverschluss (engl. *zipper*), in dem in einer ebenfalls linearen Anordnung jedes einzelne Glied mit zwei weiteren Gliedern verknüpft ist, die in die entgegengesetzte Richtung weisen.

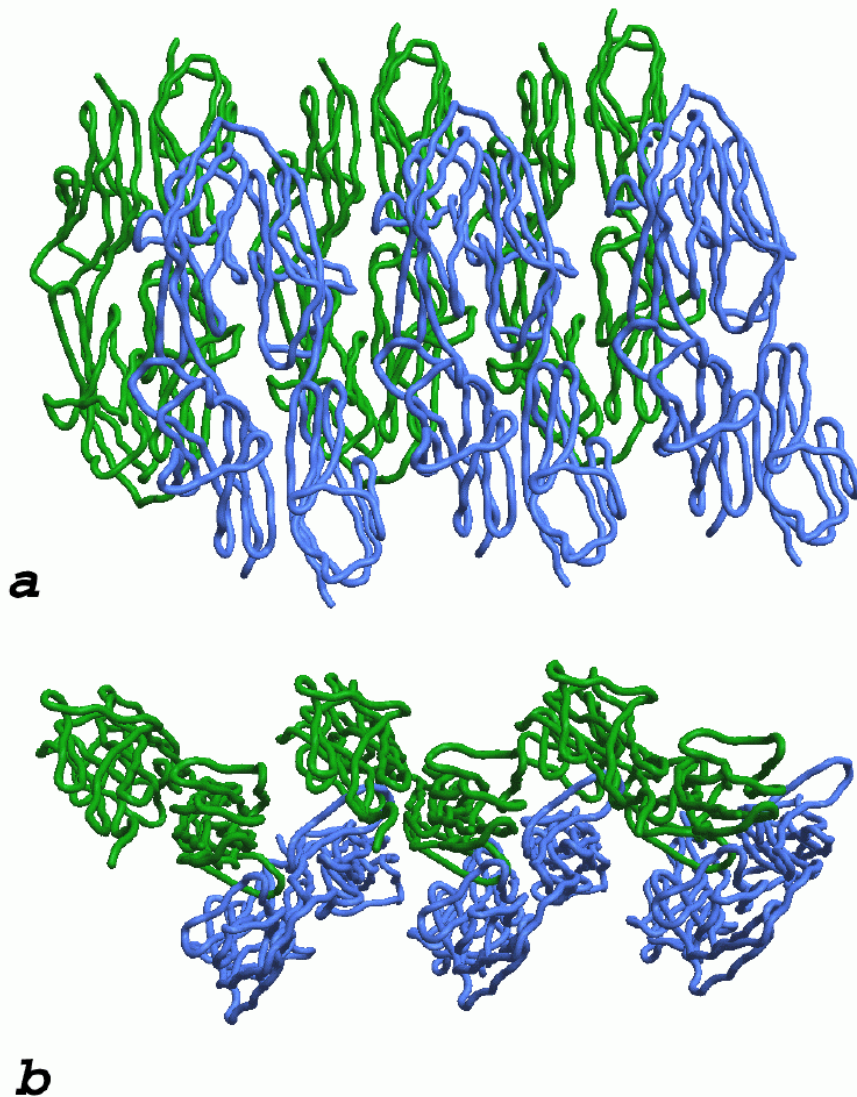


Abbildung 7 Die reißverschlussähnliche Anordnung von Ax1Ig1-4 Molekülen im Proteinkristall. Der Blick in **b** ist um 90° gegenüber dem in **a** um die 2-zählige Schraubenachse rotiert.

4.10.2 Folgerungen aus dem Reißverschlussmodell

Ein Reißverschlussmodell für neuronale Zelladhäsion, wie es aus der Kristallpackung von Ax1Ig1-4 folgt, wurde in ähnlicher Weise auch für die Funktion von Cadherinen vorgeschlagen. In der Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von N-Cadherin (Shapiro *et al.*, 1995) wechselwirken parallel orientierte Dimere mit zwei benachbarten, antiparallel orientierten Dimeren, wodurch eine oligomere, lineare Struktur entsteht. Anders als bei Axonin-1, bei dem die C-Termini in Reißverschlussrichtung angrenzender Monomere in entgegengesetzte Richtungen weisen, bilden in der N-Cadherin Struktur Dimere die Einheiten des Reißverschlusses. Die C-Termini der Protomere sind dabei wie in der Ax1Ig1-4 Struktur annähernd rechtwinklig zur Reißverschlussrichtung orientiert. Neuere Strukturuntersuchungen zu Cadherinen haben dieses Modell jedoch in Frage gestellt, da in den gefundenen Kristallstrukturen für die jeweils zwei zelldistalen Domänen keine vergleichbare Anordnung der Proteinmoleküle gefunden werden konnte (Tamura *et al.*, 1998; Pertz *et al.*, 1999).

Den Reißverschlussmodellen von Cadherin und Axonin-1 ist gemeinsam, dass aus der oligomeren Natur des hypothetischen, die Zelladhäsion vermittelnden Komplexes zwei wichtige Eigenschaften folgen. Erstens erfolgt der Einbau weiterer Einheiten in die lineare Struktur gerichtet. Zur Reißverschlussstruktur können nur am Anfang und am Ende Bausteine in vorgegebener Orientierung hinzugefügt werden. Zweitens können sich in einer oligomeren Struktur kleine Wechselwirkungen zu einer großen Gesamtkraft addieren. Da für die Bindung der Einzelbausteine entsprechend kleinere freie Aktivierungsenthalpien angenommen werden können, kann die Bildung bzw. Auflösung des oligomeren Komplexes sehr schnell erfolgen. Ein weiterer Aspekt der linearen Strukturen könnte sein, dass diese eine Vorform einer 2-dimensionalen, sehr dichten Packung darstellen, die durch Quervernetzung linearer Anordnungen von Zelladhäsionsmolekülen entsteht.

4.10.3 Mögliche Mechanismen zur Quervernetzung linearer Ax1Ig1-4 Anordnungen

Nach bisherigem Erkenntnisstand bieten sich zwei Mechanismen zur Quervernetzung linearer Axonin-1 Oligomere an. Der erste Mechanismus beruht auf der Beobachtung, dass im Axonin-1 Homologen der Ratte TAX1 eine starke homophile Interaktion stattfindet, die durch die FnIII-Domänen vermittelt wird (Zsiotra *et al.*, 1996). Da diese Domänen sehr nahe an der Membran liegen, scheint die Wechselwirkung für die Ausbildung einer *trans*-Interaktion aus sterischen Gründen ungeeignet und sollte daher eine homophile *cis*-Interaktion vermitteln. Sollten diese Wechselwirkungen zwischen Axonin-1 Molekülen auftreten, die in unterschiedlichen Reißverschlussstrukturen gebunden sind, hätten sie eine Quervernetzung zu einer flächigen Struktur zur Folge. Allerdings scheint aus kinetischen Gründen wahrscheinlicher, dass die beschriebene homophile *cis*-Interaktion der FnIII-Domänen zwischen Axonin-1 Molekülen auftritt, die in der selben Reißverschlussstruktur eingebunden sind, da durch die Assoziation in dieser Struktur eine hohe lokale Konzentration dieser Domänen entsteht.

Ein zweiter möglicher Mechanismus zur Quervernetzung der linearen Axonin-1 Strukturen besteht in der im Kristall beobachteten Protein-Protein-Wechselwirkung, die den Proteinkristall in x-Richtung aufbaut. Wie in Kapitel 4.11.3.2 ausführlich beschrieben wird, tritt diese Wechselwirkung in allen untersuchten Kristallformen von Ax1Ig1-4 auf, und weist mit etwa 800 \AA^2 eine Buried Surface Area auf, wie sie auch bei anderen biologisch relevanten Interaktionen zwischen Zelladhäsionsproteinen vorkommt. So beträgt die Buried Surface Area bei der Dimerisierung von menschlichem Fc Rezeptor z. B. 880 \AA^2 (Sondermann *et al.*, 1999). Wie in Kapitel 4.9.3 beschrieben, könnte darüber hinaus die starke Beteiligung der aromatischen Reste an dieser Wechselwirkung ein Hinweis für dessen biologische Bedeutung sein. Sollte diese Interaktion tatsächlich *in vivo* eine Rolle spielen, könnte damit eine sehr hohe Packungsdichte von Axonin-1 zwischen den Membranen angrenzender Zellen erreicht werden.

4.10.4 Hinweise auf einen Induced Fit Mechanismus

Der für Immunoglobulindomänen ungewöhnliche Verlauf der Polypeptidkette im CE Loop von Ig3 wirft die Frage auf, ob dieser Proteinbereich auch im monomeren Protein die gleiche hakenförmige Struktur besitzt, oder ob diese erst bei Bindung eines anderen Axonin-1 Moleküls entsteht. Denkbar wäre, dass dieser Proteinbereich in Monomeren eine ungeordnete (Random Coil) Struktur ausweist, oder dass eine zweite, stabile Konformation für das nicht gebundene Protein existiert. Ein Vergleich der Sequenz von Ig3 mit den anderen drei Ig-

Domänen aus Axonin-1, die alle I1-Set Topologie aufweisen, legt nahe, dass auch Ig3 ohne den Einfluss eines zweiten Axonin-1 Moleküls eine typische I1-Set Topologie ausweisen sollte. Der für eine solche Topologie in Ig3 fehlende D Strang wird in einer typischen Immunoglobulinstruktur von vier Schlüsselresten stabilisiert (Harpaz & Chothia, 1994). Ein konserviertes Aspartat im EF Loop, das in Ax1Ig1-4 in allen Domänen als Teil des konservierten Tyrosine Corner Motifs vorkommt, bildet eine Salzbrücke mit einem basischen Rest, der in der Sequenz etwa 18 Reste vor dem Aspartat liegt. Der auf den basischen Rest folgende ist ein hydrophober Rest, der mit dem letzten Rest im E Strang wechselwirkt. Dieser ist ebenfalls hydrophob und liegt in der Sequenz typischerweise etwa 10 Reste hinter dem basischen. In Ig3 von Axonin-1 sind an allen vier Schlüsselpositionen die im Sequenzprofil erforderlichen Reste für die Ausbildung des D Stranges vorhanden, wie Sequenzvergleich 1 zeigt.

```

Ig1: 61 RYRLVAGDLVISNPVKAKDAGSYQC 85
Ig2: 157 RFVSQTTGNLYIAKTEASDLGNYSY 181
Ig3: 257 KWLSEPELLHIQ-NVDFEDEGTYEC 280
Ig4: 346 RIEVSGGELRFS-KLVLEDSGMYQC 368

#+          $          & § § §

```

Sequenzvergleich 1 Zeichenerklärung: # = basischer Rest, + = hydrophober Rest, \$ = hydrophober Rest, & = konserviertes D im FG Loop, § = übrige Reste des Tyrosine Corner Motifs

Darüber hinaus wurde, basierend auf einem Vergleich mit den Sequenzen von vier Immunoglobulin-domänen bekannter Struktur, die eine I1-Set Topologie aufweisen, für Ig3 in humanem Axonin-1 eine Topologie vorhergesagt, die sowohl einen C' als auch einen D Strang beinhaltet (Thomsen et al, 1996). Da das humane Protein mit dem aus dem Huhn 80 % identische Reste besitzt, sollte diese Vorhersage auch auf Axonin-1 aus dem Huhn übertragbar sein.

In der oligomeren Proteinform, wie sie im Proteinkristall beobachtet wird, wird jedoch in Ig3 weder ein C' noch ein D Strang ausgebildet. Stattdessen ist der hydrophobe Rest W258 wesentlich an der Ausbildung der starken Interaktion mit dem Nachbarmolekül beteiligt, da sein Indolring eine hydrophobe Wechselwirkung mit F189 ausbildet, und zusätzlich eine Wasserstoffbrücke vom Hauptkettenstickstoff des Tryptophans zum Hauptkettenauerstoff von D188 existiert. Der resultierende Verlauf der Hauptkette in Ig3 ist in Abb. 23 dem in Ig4 als typischen Vertreter einer Ig-Domäne mit I1-Set Topologie gegenübergestellt.

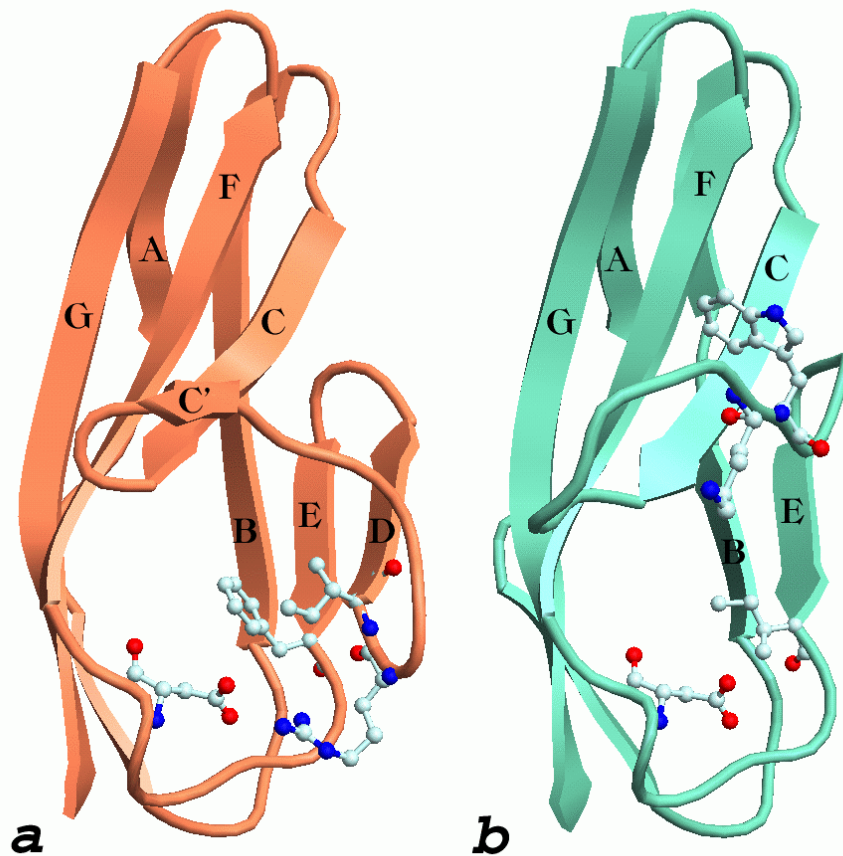


Abbildung 8 a Ig4 als Beispiel einer I1-Set-Architektur. Die dargestellten Seitenketten stabilisieren die Ausbildung des D Strangs. **b** In Ig3 wird der D Strang nicht ausgebildet, obwohl geeignete Aminosäure an den Schlüsselpositionen in der Sequenz vorhanden sind.

Die Diskrepanz zwischen der aus der Sequenz erwarteten und der im Proteinkristall tatsächlich beobachteten Struktur läßt sich am einfachsten durch die Annahme erklären, dass es bei der Oligomerisierung von Axonin-1 zu Konformationsänderungen kommt. In einem solchen Modell würde Ig3 im monomeren Protein einen D und eventuell einen C' Strang enthalten, die sich bei der Oligomerisierung auflösen würden. Ein weiterer Hinweis darauf, dass bei der Bindung größere Konformationsänderungen stattfinden, ist die Buried Surface Area von über 2000 \AA^2 , die in den meisten Kristallformen von Ax1Ig1-4 gefunden wird (siehe Kapitel 4.11). Eine solch große Kontaktfläche führt bei der Ausbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen normalerweise bei zumindest einem Bindungspartner zu ausgeprägten Konformationsänderungen (Conte *et al.*, 1999).

4.10.5 Die Rolle der Glykosylierung

Neben Aminosäuren und einem GPI-Anker enthält aus Hühnerembryonen isoliertes Axonin-1 einen erheblichen Anteil an Kohlenhydraten, die eine Gesamtmasse von etwa 15 kDa aufweisen (Denzinger *et al.*, 1997). Die genaue Rolle der Glykosylierungen in Zelladhäsionsprotein ist nicht geklärt. Neben einer Funktion beim Targeting und bei der Vermittlung von Wasserlöslichkeit wird auch eine strukturelle Funktion bei Wechselwirkungen zwischen Zelladhäsionsproteinen vermutet (Kadmon *et al.*, 1990). In den vier N-terminalen Ig-Domänen von Axonin-1 befinden sich zwei Asparagine, die Teil einer für eine N-verknüpfte Glykosylierung erforderlichen Konsensussequenz von N-X-T/S sind.

Eine massenspektrometrische Analyse der Glykosylierung zeigte, dass N50 glykosyliert wird, während bei N178 vermutlich keine Modifizierung stattfindet.

In der Kristallstruktur von Ax1Ig1-4 liegen die potentiellen Glykosylierungsstellen an der Oberfläche des Proteins, so dass keine sterischen Gründe gegen eine Modifizierung der Asparagine sprechen. N50 ist im CC' Loop in Ig1 lokalisiert, während N178 Teil des EF Loops in Ig3 ist. Beide Reste befinden sich nicht in unmittelbarer Nähe von Kristallkontakten, werden also in der *in vivo* Situation die beschriebenen Wechselwirkungen wahrscheinlich nicht behindern. Eine Interaktion der Zuckerreste mit an den Kristallkontakten beteiligten Aminosäuren kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, da durch einen Lektin-Assay in Axonin-1 auch langkettige Oligosaccharide nachgewiesen wurden, die bis zu 7 linear verknüpfte Zuckereinheiten enthalten (Denzinger, 1999). Eine Wechselwirkung wäre also auch über größere Entfernungen möglich.

4.11 Die Struktur in verschiedenen Kristallformen

4.11.1 Überblick über die verschiedenen Kristallformen

Ein wesentliches Problem der Strukturlösung stellte der ausgeprägte Anisomorphismus der Ax1Ig1-4 Kristalle dar (Kapitel 4.4.2). Unter identischen Kristallisationsbedingungen entstanden Kristalle, die obwohl morphologisch ununterscheidbar orthorhomisch, monoklin oder triklin waren. Darüber hinaus variierten die Achsen der Einheitszellen auch zwischen Kristallen, die der gleichen Raumgruppe angehörten, um bis zu 14 Å. Einen Überblick über die verschiedenen Kristallformen, für die Datensätze aufgenommen werden konnten, gibt folgende Tabelle 5.

Kristallform	A	B	C	D	E
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P1	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a (Å)	60.58	60.20	60.76	60.43	60.33
b (Å)	45.54	43.21	43.00	43.24	43.52
c (Å)	99.55	93.80	85.94	94.38	183.31
α (°)	90	90	90	95.3	90
β (°)	96.2	96.7	92.3	93.0	90
γ (°)	90	90	90	90.0	90
Moleküle / asymmetrische Einheit	1	1	1	2	1
Matthews-Koeffizient (Å ³ /D)	3.03	2.69	2.49	2.72	2.75
Solvensgehalt (%)	59.1	53.8	50.2	54.5	54.8

Tabelle 5 Vergleich der verschiedenen Kristallformen von Ax1Ig1-4, für die vollständige Datensätze aufgenommen werden konnten.

Die bisher geschilderten Einzelheiten der Ax1Ig1-4 Struktur bezogen sich auf ein Modell, das gegen Daten der Kristallform A verfeinert wurde. Für diese Kristallform standen Daten bis zu deutlich höherer Ablösung von 1.8 Å zur Verfügung, u. a. weil diese Daten am DESY in Hamburg gemessen werden konnten. Das verfeinerte Modell der hoch aufgelösten Struktur wurde für die Kristallformen B-E als Suchmodell für die Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz benutzt. In allen Fällen ergaben sich für Rotations- und Translationsuche eindeutige Lösungen. Die Modelle für die Kristallformen B bis D wurden anschließend einem Verfeinerungszyklus unterzogen. Von Kristallform E stand nur ein mit Kaliumtetrachloroplatinat derivatisierter Kristall zur Verfügung. Versuche, bei der Modellverfeinerung Platinatome mit in das Modell einzubauen, führten ebenso wie die Verwendung von Standardprotokollen zu keiner Erniedrigung des freien R-Faktors. Aufgrund der ohnehin unbefriedigenden Datenqualität in dieser Raumgruppe wurde daher auf weitere Versuche zur Verfeinerung des Modells verzichtet. Alle weiteren Angaben beziehen sich daher nur auf die Kristallformen A bis D. Eine Übersicht über Statistiken zur Datenaufnahme und Modellverfeinerung gibt folgende Tabelle 6.

Kristallform	B	C	D	E
Auflösungsbereich (Å)	20-2.75 (2.85-2.75)	20-2.80 (2.90-2.80)	20-3.00 (3.11-3.00)	20-3.30 (3.42-3.20)
Anzahl Reflexe	12281 (1104)	8630 (896)	18432 (1852)	6769
Vollständigkeit (%)	95.7 (85.8)	76.1 (78.8)	97.4 (96.0)	94.5 (95.2)
R _{merge} (%)	6.8 (23.0)	8.6 (22.5)	9.3 (31.1)	13.3 (23.1)
I / σ(I)	11.0 (3.0)	11.0 (3.5)	8.5 (2.6)	7.2 (3.7)
R _{cryst} (%)	23.5	23.2	21.3	41.2
R _{free} (%)	27.9	29.6	26.4	42.3

Tabelle 6 Statistiken zur Datenaufnahme und Verfeinerung in den Kristallformen B-E.

4.11.2 Konformationsunterschiede des Proteins in den verschiedenen Raumgruppen

Die Strukturen der einzelnen Immunoglobulindomänen zeigen in den verschiedenen Raumgruppen keine größeren Abweichungen voneinander. Deutliche Unterschiede sind jedoch in der relativen Orientierung der Domänen zueinander festzustellen. Diese Unterschiede lassen sich am besten als Rotation einer rigiden Ig1/Ig4-Einheit relativ zu einer ebenfalls rigiden Ig2/Ig3-Einheit beschreiben, bei der die Rotationsachse durch die Linker zwischen Ig1 und Ig2 und zwischen Ig3 und Ig4 verläuft. Die deutlichste Differenz relativ zu der hochaufgelösten Struktur in Kristallform A zeigt dabei die Struktur in C, in der besten Überlagerung der Ig2/Ig3 Einheit die Ig1/Ig4 Einheit von C um 8.9° relativ zu A gedreht ist (Abb. 24). Die Strukturen in Kristallform B und D, in der zwei Proteinmoleküle in der asymmetrischen Einheit existieren, weisen Konformationen zwischen diesen beiden Extremen auf. Die Rotation beträgt dabei relativ zu A 3.2° für Kristallform B und 4.5° bzw. 4.6° für die beiden Proteinmoleküle in Kristallform C.

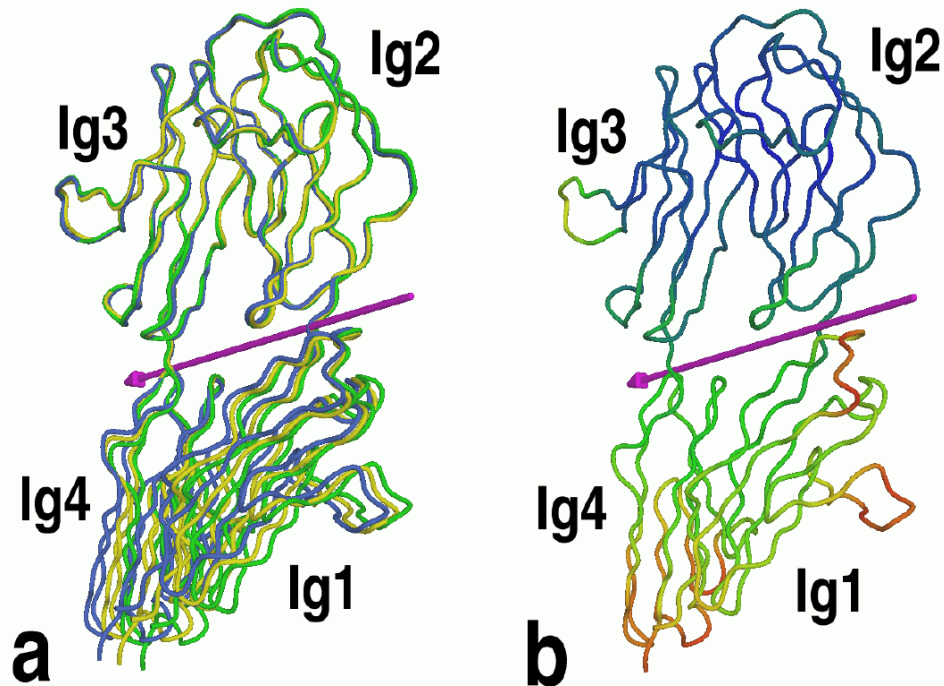


Abbildung 9 a Vergleich der relativen Orientierung der Ig-Domänen in Kristallformen A (blau), B (gelb) und D (grün). Die Rotationsachse, die verschiedenen Konformationen ineinander überführt, ist in magenta dargestellt. In **b** sind die Temperaturfaktoren der Hauptkette für Kristallform A gezeigt. Niedrige Temperaturfaktoren sind durch blaue Farbe, hohe durch rote Farbe gekennzeichnet.

Die hier beschriebenen Unterschiede in der relativen Orientierung der einzelnen Ig-Domänen sind ein Hinweis auf eine intramolekulare Flexibilität des Ax1Ig1-4 Moleküls. In den verschiedenen Kristallformen resultieren die unterschiedlichen Packungskräfte in veränderten Konformationen, die sich aufgrund der Flexibilität energetisch nur geringfügig unterscheiden. Diese Vorstellung steht in sehr gutem Einklang mit der Beobachtung, dass sich in den Raumgruppen A bis D, bei denen eine Verfeinerung der Temperaturfaktoren durchgeführt wurde, eine ausgeprägte asymmetrischen Verteilung der Temperaturfaktoren ergab. Einen Überblick darüber gibt folgende Tabelle 7.

Kristallform	A	B	C	D (Molekül A)	D (Molekül B)
Ig 1	44.4/45.2/44.8	33.5/40.6/36.9	49.4/50.2/49.8	34.9/41.7/38.1	36.1/38.3/37.1
Ig2	16.4/17.4/16.9	16.2/18.7/17.4	21.7/20.9/21.3	12.2/13.8/13.0	12.6/14.6/13.6
Ig3	19.1/21.1/20.1	24.7/30.8/27.7	28.1/35.1/32.0	22.2/27.8/25.0	22.0/28.5/25.3
Ig4	44.7/45.9/45.3	39.0/48.8/43.7	56.1/55.9/56.0	42.9/48.9/45.8	40.5/48.9/44.6

Tabelle 7 Mittlere Temperaturfaktoren in Å^2 für Hauptkettenatome / Seitenkettenatome / alle Atome in den Kristallformen A-D.

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich ist, beträgt der mittlere Temperaturfaktor von Hauptkettenatomen in Ig2 und Ig3 in den verschiedenen Raumgruppen etwa 20 \AA^2 , während er in Ig1 und Ig4 mit ungefähr 40 \AA^2 den doppelten Wert aufweist. Der Grund für die niedrigen Temperaturfaktoren in Ig2 und Ig3 ist sicherlich, dass die stärksten Kristallkontakte in allen Kristallformen in diesen Domänen lokalisiert sind. Vermutlich weisen die im Kristall schwächer fixierten Ig1 und Ig4 daher eine Beweglichkeit gegenüber den anderen Domänen auf, die sich in höheren B-Faktoren niederschlägt. Für eine Schwingungsbewegung um eine Achse durch die Linkerregionen, wie sie auch aus den unterschiedlichen beobachteten Konformationen folgt, spricht ebenfalls die Beobachtung, dass Atome nahe der Ig1/Ig2 und Ig3/Ig4 Kontaktflächen in allen Kristallformen deutlich niedrigere Temperaturfaktoren aufweisen als Atome, die weit von dieser Kontaktfläche entfernt sind (Abb. 24).

Die in Ax1Ig1-4 beobachtete Beweglichkeit der benachbarten Domänen gegeneinander liegt in einer Größenordnung, wie sie ähnlich auch für die Zelladhäsionsproteine VCAM-1 (Wang *et al.* 1995), CD2 (Bodian *et al.* 1994) und CD4 (Wu *et al.* 1997) beobachtet wurden. Während bei VCAM-1 und CD2, bei denen die Kristallstrukturen jeweils die zwei N-terminalen Ig-Domänen umfassen, eine Flexibilität einzelner Domänen gegeneinander beschrieben wurde, enthält CD4 zwei rigide Tandemeinheiten aus je zwei Ig-Domänen, die durch einen flexiblen Linker verbunden sind. Die in verschiedenen Raumgruppen beobachteten Änderungen in den Verkippungen der Domänen zueinander betragen bei beiden Proteinen, ähnlich wie bei Ax1Ig1-4, bis zu etwa 10° . Die in Ax1Ig1-4 gefundene Beweglichkeit unterscheidet sich jedoch von den in VCAM-1, CD2 und CD4 beschriebenen, da in Ax1Ig1-4 zwei Scharniere, die etwa 25 \AA voneinander entfernt sind, eine Rotationsachse definieren und damit die Richtung der Bewegung vorgeben.

Im Linkerbereich zwischen Ig1 und Ig2 wird das Scharnier durch G104 gebildet, das sich im Zentrum zwischen beiden Domänen befindet. Die Lokalisation eines Glycins, das von allen Aminosäuren eine maximale Flexibilität der Hauptkette ermöglicht, an dieser besonderen Position legt nahe, dass die Modifikation der intramolekularen Beweglichkeit von biologischer Bedeutung ist. An der äquivalenten Stelle zwischen Ig3 und Ig4 befindet sich A299. Da die Methylgruppe die Flexibilität der Hauptkette einschränkt, kommt es bei der Rotationsbewegung auch zu Konformationsänderungen der angrenzenden Reste. Durch die Beteiligung weiterer Reste an der Scharnierfunktion verläuft die resultierende Rotationsachse nicht direkt durch des C_α -Atom des Alanin, sondern in etwa 3 \AA zur Hauptkette (Abb. 24). Eine mögliche Bedeutung der dosierten Flexibilität zwischen angrenzenden Ig-Domänen in Zelloberflächen stellt die Funktion als molekulare Stoßdämpfer dar. An den Grenzflächen benachbarter Zellen treten große Kräfte auf. In Zelladhäsionsmolekülen, die wie Axonin-1 aus einer Vielzahl von globulären Einzeldomänen bestehen und somit viele potentielle Scharniere enthalten, konnte sich die Variabilität in den Orientierungen benachbarter Domänen zu einem großen Gesamteffekt addieren. In Proteinen, die FnIII-Domänen enthalten, wird zusätzlich eine reversible Auffaltung bei mechanischer Beanspruchung diskutiert (Parci & Karplus, 1999). Das Gesamtmolekül wäre so in der Lage, ähnlich einer Spiralfeder als molekularer Stoßfänger auftretende Kräfte wirksam zu verteilen.

Die Beobachtung, dass in den verschiedenen Kristallformen eine Bewegung einer rigiden Ig1/Ig4 Einheit relativ zu einer Ig2/Ig3 Einheit zu beobachten ist, während die relative Orientierung innerhalb dieser Einheiten fast unverändert bleibt, entspricht nicht der Beweglichkeit, die aufgrund des Domain Swapping Modells zu erwarten wäre. Bei diesem Modell, das basierend auf der Struktur von Hemolin für Zelladhäsion vorgeschlagen wurde, erfolgt die Verknüpfung benachbarter Membranen entweder durch Dimerisierung oder durch Oligomerisierung (Su *et al.*, 1998). Dabei existiert neben der U-förmigen Konformation des Proteins eine lineare, ausgestreckte Form. In dieser Form stünden Oberflächen zur Verfügung, die mit den gleichen komplementären Wechselwirkungen wie in der U-Form wechselwirken könnten, wobei die komplementären Oberflächen nun aber von anderen identischen Proteinen in ebenfalls linearer Konformation zur Verfügung gestellt werden. (Abb. 25)

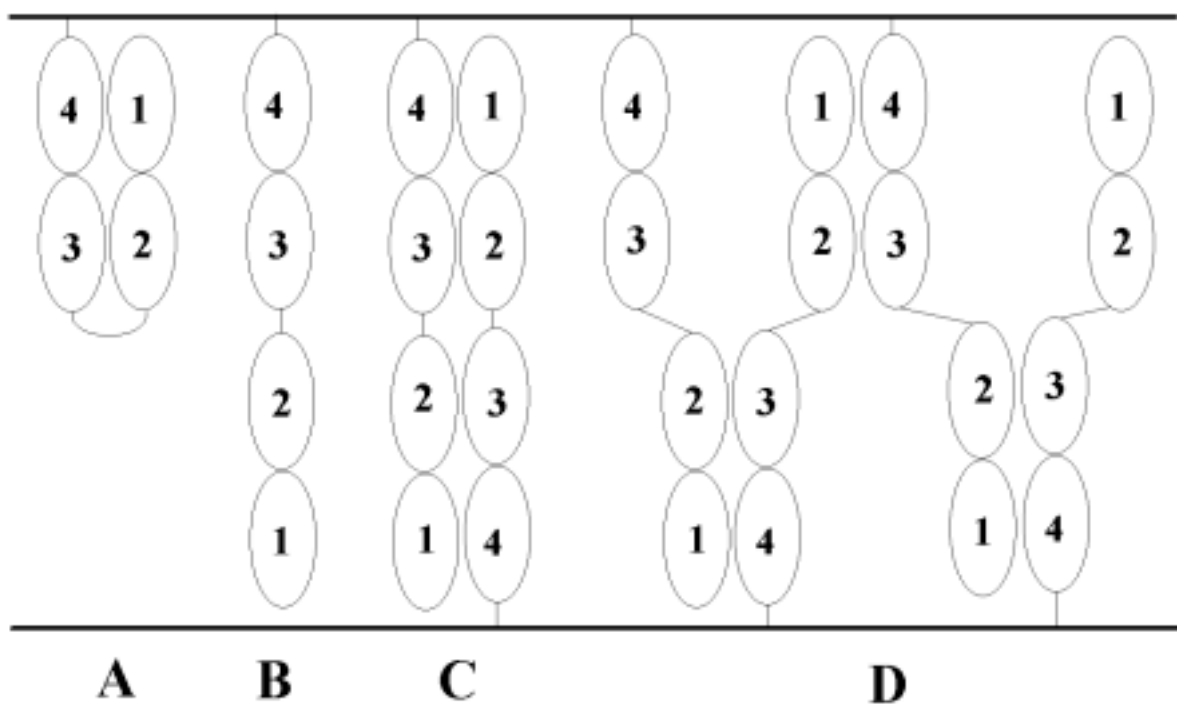


Abbildung 10 Das Domain Swapping Modell für Hemolin (nach Su *et al.*, 1998). A Monomer, B Monomer in offener Konformation, C Dimer, D Multimer.

Der kritische Schritt bei der Ausbildung von Dimeren oder Oligomeren ist in diesem Modell die Konformationsänderung von der U-förmigen zur linearen Struktur. In den verschiedenen Kristallformen von Ax1Ig1-4 ist das Proteinmolekül unterschiedlichen Packungskräften ausgesetzt, deren Differenz ausreichend ist, um deutliche Konformationsänderungen hervorzurufen. Dennoch sind in allen Kristallformen keine Änderung der relativen Orientierungen von Ig1 zu Ig4 und von Ig2 zu Ig3 zu erkennen. Dies impliziert, ebenso wie die große Buried Surface Area zwischen diesen Domänen, dass die Wechselwirkung an den Grenzflächen sehr stark ist. Eine Auffaltung der U-förmigen Struktur in eine lineare scheint unter physiologischen Bedingungen daher aus energetischer Sicht sehr unwahrscheinlich.

4.11.3 Unterschiede in den Kristallpackungen

Die deutliche Variation der Zellachsen in den Kristallformen A-E kann durch die relativ geringen Konformationsunterschiede des Proteinmoleküls nicht erklärt werden und muss daher auf Unterschiede in den Kristallpackungen zurückzuführen sein. Da aus der Art der Kristallpackung in Kristallform A Rückschlüsse auf den Mechanismus der Zelladhäsion gezogen wurden, sollte eine Analyse der Kristallkontakte in mehreren Raumgruppen die Argumentation stützen und das Verständnis der Wechselwirkungen vertiefen.

4.11.3.1 Die Kristallpackung in Reißverschlussrichtung

Die Kristallkontakte, die den Aufbau des Proteinkristalls in y -Richtung ermöglichen, sind in allen Kristallformen sehr ähnlich. Die in Kapitel 4.9.2 beschriebene hydrophobe Interaktion von W258 mit F189 ist in allen Fällen ebenso zu beobachten wie die drei Wasserstoffbrückenbindungen in unmittelbarer Nähe zu dem hydrophoben Kontakt. Dennoch unterscheidet sich die relative Orientierung zwischen in y -Richtung benachbarten Proteinmolekülen in A deutlich von den Orientierungen in den übrigen Kristallformen. So sind in den Kristallformen B bis E die Proteinmoleküle etwas anders als in A gegen die 2-zählige Schraubenachse verkippt, die in Reißverschlussrichtung benachbarte Moleküle ineinander überführt (Abb. 26a).

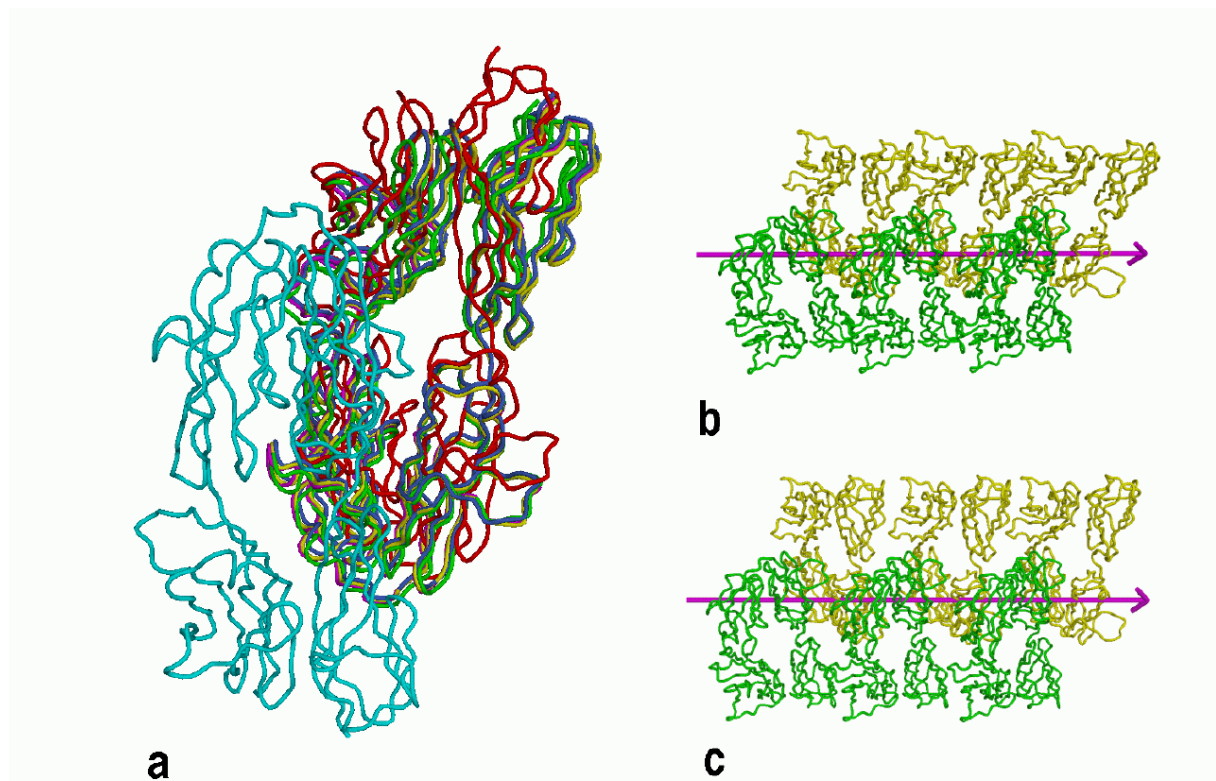


Abbildung 11 a Unterschiedliche Orientierungen benachbarter Monomere in den Kristallformen A (rot), B (gelb), C (grün) und D (blau). Die etwas abweichende Orientierung in Kristallform A hat auf die prinzipielle Anordnung der Moleküle in Reißverschlussrichtung keinen Einfluss, wie ein Vergleich der Anordnungen in Kristallform B in **b** mit Kristallform A in **c** zeigt.

Diese unterschiedliche Verkipfung erklärt, warum die y -Achse in Kristallform A um ca. 2 Å von den fast identischen y -Achsen der übrigen Kristallformen abweicht (siehe Tabelle 5). Dennoch ist die resultierende Reißverschlussstruktur auch in diesen Kristallformen der in A

sehr ähnlich (Abb. 26 b und c). Allerdings ergeben sich wichtige Detailunterschiede. So ist die Buried Surface Area zwischen in Reißverschlussrichtung benachbarten Molekülen in B bis D annähernd doppelt so groß wie in A (Tabelle 8), was auf eine stärkere Verankerung einzelner Proteinmoleküle im Reißverschluß hinweist. Darüber hinaus existiert in diesen Kristallformen ein zusätzlicher Kontakt zwischen übernächsten Molekülen in Reißverschlussrichtung, der etwa 400 Å² Buried Surface Area umfaßt und zwischen Ig1 und Ig4 auftritt (Abb. 27). Dieser Kontakt könnte zusätzlich zur Stabilisierung der Gesamtstruktur beitragen.

Kristallform	A	B	C	D
x-Richtung (Å ²)	754	833	852	815 / 813
y-Richtung (Å ²)	1259	2281 + 357	2191 + 390	2135 / 2105 + 399 / 403
z-Richtung (Å ²)	97	340	203 + 139	195 + 63

Tabelle 8 Die Buried Surface Area in verschiedenen Raumgruppen, aufgeschlüsselt nach Raumrichtungen. Die in Kristallform D durch "/" getrennten Werte beziehen sich auf die beiden Monomere in der asymmetrischen Einheit. "+" bedeutet, dass Kontakte zu unterschiedlich benachbarten Monomeren existieren, in y-Richtung z. B. zu nächsten und übernächsten Nachbarn in Reißverschlussrichtung.

4.11.3.2 Kristallkontakte in x-Richtung und in z-Richtung

Die Tatsache, dass der Kristallkontakt in y-Richtung in ähnlicher Form in allen beobachteten Kristallformen auftritt, entspricht der Erwartung, dass eine biologisch relevante, starke Protein-Protein-Wechselwirkung unabhängig von der Kristallform im Proteinkristall beobachtbar sein sollte, sofern sich die Kristallisationsbedingungen nicht zu stark von physiologischen Bedingungen unterscheiden. Dagegen sollten zufällige Kristallkontakte zwischen verschiedenen Kristallformen variieren.

Tatsächlich variieren die Kristallkontakte in z-Richtung in den Kristallformen stark. In allen Fällen sind ausschließlich Reste von Ig1 und Ig4 beteiligt, wobei innerhalb der Domänen jeweils unterschiedliche Reste die Wechselwirkungen vermitteln. Die aus diesen Kontakten resultierenden Werte für die Buried Surface Area von unter 350 Å² lassen auf vergleichsweise schwache Kräfte im Kristallaufbau in z-Richtung schließen. Dieses erklärt die ausgeprägte mechanische Sensitivität der Kristalle, die die Handhabung der Kristalle sehr erschwert.

Dagegen wird in x-Richtung überraschenderweise in allen Kristallformen ein fast identischer Kristallkontakt gefunden, der wie in Kapitel 4.9.3 bereits beschrieben sowohl eine hydrophobe als auch eine polare Komponente aufweist. Die Werte für die Buried Surface Area liegen bei etwa 800 Å², ein für einen zufälligen Kristallkontakt überdurchschnittlicher Wert, der eine biologische Funktion (Kapitel 4.10.3) zumindest nicht ausschließt.

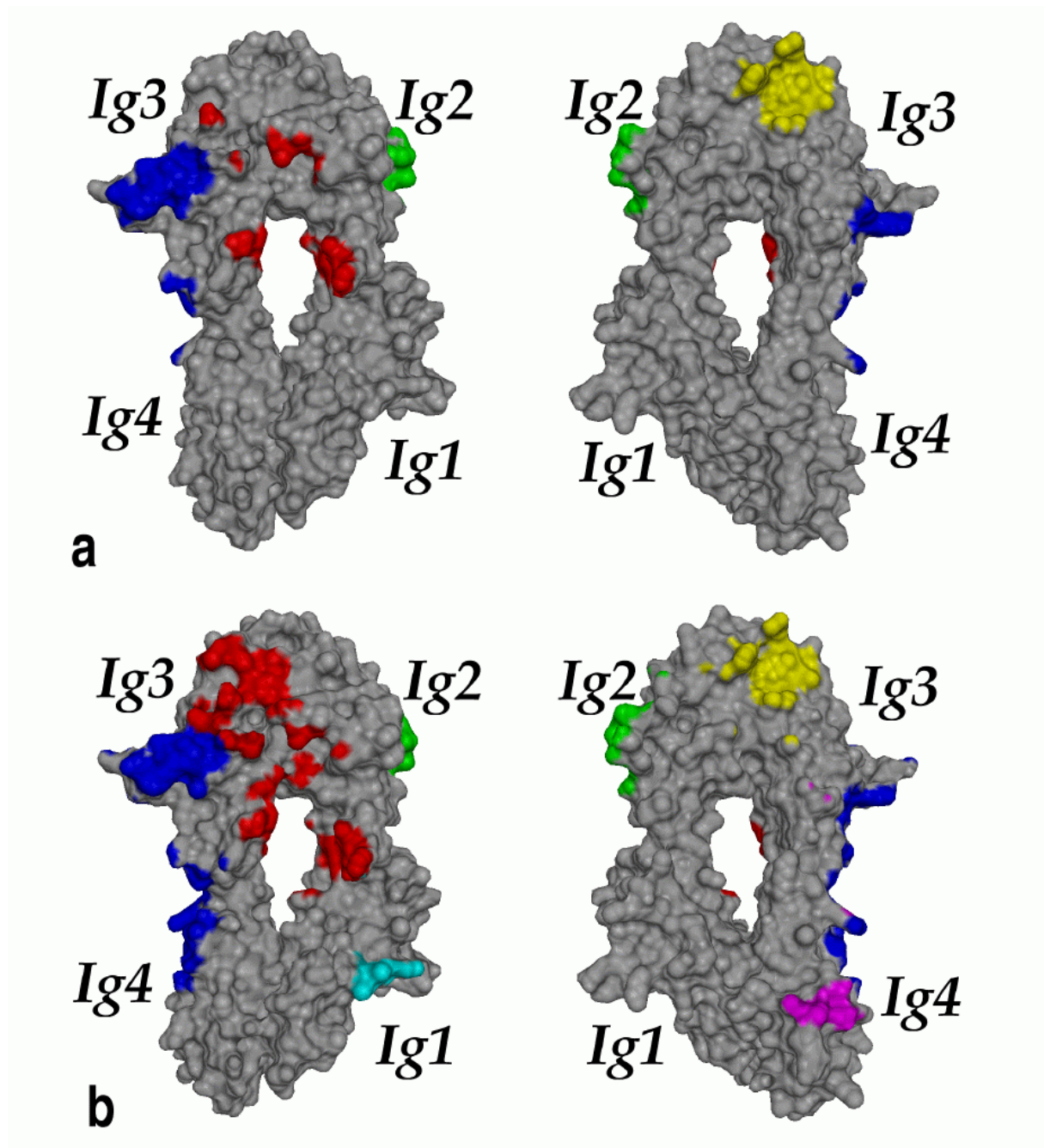


Abbildung 12 Kontaktflächen in Kristallformen A (a) und B (b). Rote und blaue Flächen vermitteln den Kontakt in y-Richtung, gelbe und grüne den Kontakt in x-Richtung. Flächen in cyan und magenta sind am Kontakt zwischen übernächsten Molekülen in Reißverschlussrichtung beteiligt.

4.12 Implikationen für die Struktur verwandter Proteine

4.12.1 Sequenzabstände zwischen Disulfidbrücken

Der N-terminale Bereich von Axonin-1 weist die gleiche U-förmige Gesamtstruktur auf wie Hemolin, obwohl beide Proteine nur 27 % identische Reste ausweisen. Ein sehr großer Anteil der identischen Reste läßt sich zudem auf die starke Konservierung von Resten an Schlüsselpositionen der Immunoglobulindomänen zurückführen. Diese Ähnlichkeit der beiden gefundenen Strukturen läßt vermuten, dass eine Reihe weiterer Proteine, die teilweise nur eine geringe Sequenzhomologie zu Axonin-1 oder Hemolin aufweisen, eine ähnliche, U-

förmige Struktur in ihrem N-terminalen Bereich besitzen. Ein Vergleich der Reste, die in Axonin-1 und Hemolin an den Wechselwirkungen zwischen Ig1 und Ig4 und zwischen Ig2 und Ig3 beteiligt sind, zeigt keine stärkere Konservierung solcher potentieller Schlüsselreste für die Ausbildung der U-Form. Es scheint sinnvoller, zur Vorhersage der U-förmigen Struktur in verwandten Proteinen die Abstände zwischen den Disulfidbrücken benachbarter Ig-Domänen in den Aminosäuresequenzen zur vergleichen. Da in U-förmigen Strukturen zwischen der zweiten und dritten Domäne ein längerer Linker existieren muss, der die antiparallele Orientierung dieser Domänen ermöglicht, sollten die Disulfidbrücken in Ig2 und Ig3 deutlich weiter voneinander entfernt sein als zwischen den übrigen Domänen. Einen Überblick über die Abstände in Axonin-1 und in verwandten Proteinen gibt folgende Tabelle 9, in der Axonin-1 den laut Sequenzvergleich in den Swiss-Prot und TREMBL-Datenbanken ähnlichsten zehn Proteinen gegenübergestellt wird, wobei homologe Proteine aus verschiedenen Organismen nicht berücksichtigt wurden. Zusätzlich wurden in der Tabelle noch das medizinisch wichtige menschliche L1 sowie Hemolin aufgenommen.

Abstand der Disulfidbrücken in Resten	Ig1/Ig2	Ig2/Ig3	Ig3/Ig4	% Identität
Axonin-1 (Huhn)	44	54	42	100
Contactin (Huhn)	44	51	42	55
Big-1 (Ratte)	43	55	42	46
Pang (Maus)	44	55	42	46
Neogenin (Mensch)	44	49	42	31
NgCAM (Huhn)	44	55	42	30
Call (Mensch)	44	75	42	28
Neurofascin (Ratte)	44	55	42	31
Roundabout (Fruchtfliege)	44	43	42	29
NrCAM (Huhn)	44	55	42	28
Punc (Maus)	43	50	44	28
L1 (Mensch)	44	55	42	28
Hemolin (Seidenraupe)	43	53	42	27

Tabelle 9 Vergleich der Abstände zwischen den Disulfidbrücken angrenzender Domänen in zu Axonin-1 homologen Proteinen.

Der Vergleich zeigt, dass der Abstand zwischen erster und zweiter Disulfidbrücke kaum variiert und 43 oder 44 Reste beträgt. Noch konstanter ist der Abstand zwischen der dritten und vierten Disulfidbrücke, der außer in Punc, in der er 44 Reste beträgt, 42 Reste ist. Deutlicher unterscheiden sich die Abstände zwischen zweiter und dritter Disulfidbrücke, die von 43 bis 75 Resten variieren. Allerdings zeigen sechs Proteine mit 55 Resten einen ähnlich großen Abstand wie die beiden U-förmigen Proteine mit bekannter Struktur Axonin-1 und Hemolin. Für diese Proteine scheint das Vorliegen einer ähnlichen U-förmigen Gesamtstruktur möglich. Das Protein Roundabout dagegen weist nur einen Abstand von 43 Resten auf, was ein ähnlicher Abstand wie zwischen den linear angeordneten Domänen ist. Für dieses Protein würde man daher eher eine stabförmige Gesamtstruktur der vier N-terminalen Domänen erwarten. Schwieriger sind dagegen die Verhältnisse in Neogenin, Punc und Contactin zu interpretieren, die Abstände von 49 bis 51 Resten aufweisen, und daher sowohl stab- als auch U-förmig sein könnten. Im Contactin würde man allerdings wegen dem hohen Anteil an identischen Resten von 55 % im relevanten Proteinteil eine sehr ähnliche Gesamtstruktur erwarten. Sollte der in Contactin vorhandene Abstand von 51 Resten ausreichend für die Ausbildung der U-Form sein, so sollten auch Punc mit 50 und Neogenin

mit 49 Resten eine solche Struktur ausbilden können. Die größte Abweichung von den anderen Proteinen zeigt Call, das 75 Reste Abstand aufweist. Die zusätzlichen Reste liegen im Sequenzvergleich mit Axonin-1 größtenteils in dem Bereich, der in Axonin-1 den Linker zwischen Ig2 und Ig3 bildet. Diese könnten z. B. einen ungeordneten Bereich bilden, da ein kurzer, geordneter Linker für die Stabilisierung der U-Form nicht notwendig erscheint.

Die Sequenzvergleiche zeigen zudem, dass die Sequenzbereiche, die in Axonin-1 an der Ausbildung der Reißverschlussstruktur beteiligt sind, in den verwandten Proteinen nicht konserviert sind. Der CE Loop in Ig3 weist eine sehr geringe Konservierung der Sequenz auf und ist in allen untersuchten Proteinen einige Aminosäuren länger. Umgekehrt ist der FG Loop in Ig2, der in Axonin ungewöhnlich lang ist, in den ähnlichen Proteinen um meist 2 Reste kürzer. Diese Unterschiede lassen vermuten, dass die homophile Interaktion diese Proteine einen anderen Mechanismus besitzt.

4.12.2 Sequenzvergleich mit NgCAM und Nr-CAM

Von besonderem Interesse beim Sequenzvergleich mit den beiden wichtigsten Bindungspartner von Axonin-1, NgCAM und Nr-CAM, ist die Frage, ob Aminosäuren, die an der im Kristall beobachteten Protein-Protein Wechselwirkungen beteiligt sind, stärker konserviert sind als andere Reste an der Oberfläche des Proteins. Eine starke Konservierung dieser Reste wäre ein Hinweis, dass die heterophile Wechselwirkung von Axonin-1 mit NgCAM oder NrCAM der beschriebenen homophilen Wechselwirkung von Axonin-1 sehr ähnlich ist. Sollten dagegen die entsprechenden Reste nur sehr schwach konserviert sein, sollte der heterophilen Wechselwirkung andere Mechanismen zu Grunde liegen. In Sequenzvergleich 2 sind die drei Sequenzen gegenübergestellt.

NGCAM	33	LQPPELTEEPPEQLVVFPS---- <td>88</td>	88
		P E P L FP L C A NPP YRW V	
AXO-1	8	SYGPVFEEQPAHTL--FPEGSAAEKVTLTCRARANPPATYRWKMNTE ELKMGPD SRYLIV	65
		P Q E C A PP W NGT D	
NRCAM	37	LSQPPTITQQSPK---DYIVDPRENIVIQCEAKGKPPPSFSWTRNGTHFDIDKDAQVTMK	93
NGCAM	89	PGSGTLVIN--ATLAARL-QGRFRCFATNALGTAVSPEANVIAENTPQWPKEKVTPVEVE	143
		G LVI -- A - G C ATNA GT VS EA E PV	
AXO-1	66	--AG DLVIS --NPVKAKD-AG SYQCVATNARGTVVSREASLRFGLQ EFSAEERDPVKIT	120
		G LV N VKA G YQC A N RG S R E P	
NRCAM	94	PNSGTLVVNIMNGVKA EAYEGVYQCTARNERGA AISNNIVIRPSRSPLWTKEKLEPNHVR	153
NGCAM	144	EGDPVVLPCDPPESAVPPKIYWLNSDIVHI--AQDERVSMG-QDGNLYFSNAMVGD SHPD	200
		EG V C PP WL A R - GNLY D	
AXO-1	121	EGWG VMFT CSPPPHY PALS SYRWLL NEFPNFIPADGRRFVSQ -TTGN LYIAKTEASDLG-N	178
		EG C PP P W N F P R VSQ G LY D	
NRCAM	154	EGDSLVLNCRPPVGLPPPIIFWMDNAFQR-LPQSER--VSQGLNGDLYFSNVQPEDTRVD	210
NGCAM	201	YICHAHFLGPRTIIQKEPLDLRVAPSNVRSRRPRLLLPRDPQTTTIALRGGSVVLECIA	262
		Y C A I A R T AL G V LEC A	
AXO-1	179	YSCFAT-SHIDF ITKSVF SKFSQ LSLAAEDARQYAPS IKAKFPADTYALT GMVTLECF A	237
		Y C A H I S R L G LEC A	
NRCAM	211	YICYARFNHTQTIQKQKQPI SVKVFSTKPVTERPPVLLTPMGSTSNKVELRGNVLLLECIA	270
NGCAM	263	EGLPTPWVRWRRLNGPLLPG---GVGNFNKTLRLWGVTESDDGEYECVAENGRGTARGTH	319
		G P P WR L G --- L V D G YEC AEN G	
AXO-1	238	FGNPVPQIKWRKLDGSQTSK --- WLSS-EPLLHIQ NVDFE DEGT YECEAENIKGRD TYQG	293
		G P P I W K G - L I V D G Y C A N G	
NRCAM	271	AGLPTPVIRWIKEGGELPANRTFFENF-KKTLKIIDVSEADSGNYKCTARNTLGS THHVI	329

NGCAM 320 SVTVEAAPYWVRRPQSGVFGPGETARLDCEVGGKPRPQIQWSINGVPIEAA-GAERRWLR 378
 A P W G R C GKPRP W G P A- R
 AXO-1 294 **RIIIHAQP**DWLDVITDTEADIGSD**DLRWS**CVASGKPRP**PAVR**WLRD**GQPL**--A-SQNR**IEVS** 350
 A P W G D C A G P P WL G P A V
 NRCAM 330 SVTVKAAPYWITAPRNLVLSPEGDGTLICRANGNPKPSISWLTNGVPIAIAPEDP**SRKVD** 389

 NGCAM 379 GGALVLP**EL**RPND**SAV**LQCEARNRHG**PLL**ANAF**LHV**VE 416
 GG L L DS QC A N HG A A L V
 AXO-1 351 GG**EL**RF**SK**L**V**LEDS**GM**Y**QC**V**A**EN**KH**G**TV**Y**AS**A**EL**TV**QA** 388
 G FS S YQC A N G A A V A
 NRCAM 390 GDTIIFSAVQ**ER**SSAVY**QC**NASNEYGYLLANAFV**NV**LA 427

Sequenzvergleich 2 *Vergleich der Sequenz der vier N-terminalen Domänen von Axonin-1 (mitte) mit seinen Bindungspartnern NgCAM (oben) und NrCAM (unten). Unterstrichene Reste sind in Ax1Ig1-4 am Kristallaufbau in y-Richtung beteiligt.*

Der Sequenzvergleich macht deutlich, dass im FG-Loop in Ig2 sowie im CE-Loop in Ig3 die Sequenz nicht konserviert ist. Ob der FG-Loop in Ig3 in NgCAM und in NrCAM wie in Axonin-1 gegenüber der normalen Ig Architektur verlängert ist, kann aufgrund der geringen Verlässlichkeit des Alignment in diesem Bereich nicht unterschieden werden, da der G Strang in Ig2 sowie der folgende Linker zwischen Ig2 und Ig3 kaum konservierte Reste aufweisen. Im Bereich des CE Loops in Ig3 von Axonin-1 weisen NrCAM mit drei Resten und NrCAM mit einem Rest Insertionen auf, die einen anderen Verlauf der Hauptkette erfordern. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass die heterophile Bindung von Axonin-1 an NrCAM und NgCAM zumindest im Detail einen anderen Mechanismus aufweist als die homophile Axonin-1 Bindung.

4.12.3 Sequenzvergleich mit menschlichem L1

Das bisher einzige Zelladhäsionsmolekül, bei dem Mutationen bekannt sind, die zu neurologischen Störungen führen, ist das menschliche NgCAM-Homologe L1. Bisher konnten 31 Missense Mutationen identifiziert werden, die 29 verschiedene Aminosäuren betreffen. Davon liegen 14 Mutationen 13 verschiedener Aminosäuren im Bereich der vier N-terminalen Ig Domänen. Obwohl der Anteil identischer Reste in diesem Bereich zwischen L1 und Axonin-1 nur 28 % beträgt, kann ein Sequenzvergleich bei vielen dieser Mutationen erklären, warum sie eine Beeinträchtigung der Funktion von L1 zur Folge haben. 8 der 13 betroffenen Aminosäure sind in L1 und Axonin-1 identisch, in Hemolin sind es dagegen nur 5. Axonin-1 sollte also ein besseres Modell für das Verständnis der strukturellen Ursachen der beschriebenen Mutationen darstellen.

Mutation L1	Axonin-1	Hemolin	Funktion in Axonin-1
L120V	R91	A103	?
G121S	G92	G104	scharfer Turn im FG Loop
I179S	I151	D165	fixiert CD Loop über hydrophoben WW
R184Q, W	R156	R171	fixiert CD Loop über Salzbrücke
Y194C	Y167	Y181	hydrophobe WW an Kontaktfläche Ig2/Ig3
H210Q	F182	T200	fixiert CD Loop über hydrophoben WW
P240L	I215	V232	packt gegen Disulfidbrücke
C264Y	C235	C252	bildet Disulfidbrücke
G268D	G239	S256	läßt Platz für Ig2/Ig3 Linker
E309K	T277	V302	Kristallkontakt
P333R	P301	P327	Teil des hydrophoben Kerns
G370R	G338	A365	scharfer Turn CC' Loop, Kontaktfläche Ig1/Ig4
L391P	F356	I382	Teil des hydrophoben Kerns

Tabelle 10 *Vergleich der Reste in L1, deren Mutationen zu Erkrankungen führen, mit den äquivalenten Resten in Axonin-1 und Hemolin.*

Von den aufgeführten Mutationen betreffen 5 die Ausbildung des hydrophoben Kerns. Mutationen an diesen Positionen könnten zu einer starken Destabilisierung der Ig Struktur der betroffenen Domäne führen. Der Einfluss dieser Mutationen konnte schon befriedigend durch einen Vergleich der L1-Sequenz mit der von Telokin erklärt werden (Bateman & *et al.*, 1996), das als erstes Protein bekannter Struktur eine Ig-Domäne mit I-Set Topologie enthielt (Holden *et al.*, 1992). An drei weiteren Positionen ist ein Glyzin erforderlich, weil entweder der Verlauf der C_α-Kette eine Kombination von Torsionswinkeln erfordert, die für Aminosäuren mit Seitenketten verboten sind, oder weil die fehlende Seitenkette entscheidenden Platz für den Verlauf der Hauptkette freilässt. Überraschenderweise betreffen vier andere Mutationen die Fixierung des CD Loops in Ig2. Diese Beobachtung legt nahe, dass dieser Bereich eine besondere Bedeutung für die Funktion von L1 besitzt, da ein abweichender Verlauf des CD Loops nicht zu einer deutlichen Destabilisierung der Domäne bzw. der Gesamtstruktur führen sollte. In Axonin-1 ist dieser Molekülteil nicht direkt an der homophilen Wechselwirkung beteiligt. Dennoch existieren über Wassermoleküle vermittelte, indirekte Wechselwirkungen zwischen Seitenketten in diesem Molekülteil und Seitenketten des benachbarten Proteinmoleküls, so dass eine Beeinträchtigung eines ähnlichen Bindungsmechanismus in L1 durch diese Mutation nicht ausgeschlossen werden kann. Nur zwei Mutationen betreffen oberflächenexponierte Reste. Die erste ist in L1 die Mutation L120V, in der eine hydrophobe Aminosäure durch eine sehr ähnliche ersetzt ist. Diese Mutation führt weder zu einer Beeinträchtigung der homophilen L1 Bindung noch der heterophilen Bindung an Axonin-1 oder F11 (De Angelis *et al.*, 1999). An der entsprechenden Stelle befinden sich in Axonin-1 ein Arginin und in Hemolin ein Alanin, die beide keine offensichtliche strukturelle Funktion besitzen und daher die Folgen der Mutation nicht erklären können. Die zweite Mutation, die einen Rest an der Oberfläche des Proteins betrifft, ist E309K. Der Rest T277, der an äquivalenter Stelle in Axonin-1 liegt, ist in den beschriebenen Kristallformen B bis E direkt an den Protein-Protein Wechselwirkungen in Reißverschlussrichtung beteiligt, indem sein Seitenkettensauerstoff eine Wasserstoffbrücke zu Seitenkettensauerstoff in Q268 im Nachbarmolekül ausbildet. Überraschenderweise führt diese Mutation nicht zu einer Beeinträchtigung der homophilen L1 Bindung, vermindert jedoch signifikant die heterophile Bindung zu Axonin-1 und F11. Dieses könnte als Hinweis gewertet werden, dass die homophile Interaktion von L1 einem anderen Bindungsmechanismus folgt, während die erwähnten heterophilen Bindungen der homophilen Axonin-1 Bindung ähneln.

4.13 Versuche zur Strukturaufklärung eines N-terminalen Fragments des L1-Homologen aus dem Goldfisch

Zur Überprüfung, ob die zur Strukturaufklärung von Ax1Ig1-4 benutzte Strategie der bakteriellen Überexpression des Zielproteins in Inclusion Bodies mit anschließender *in vitro* Faltung eine Methode darstellt, die für verwandte Proteine ebenfalls die Isolierung im Milligrammaßstab in wasserlöslicher Form erlaubt, wurden die beschriebenen Verfahren auf vier N-terminale Ig-Domänen des E587-Antigens aus dem Goldfisch angewandt. Dieses Protein stellt vermutlich das Fischhomologe des menschlichen L1 bzw. des NgCAM aus dem Huhn dar (Giordano *et al.*, 1997). Die genetischen Arbeiten dazu wurden von Ute Lässig (AG Stürmer/Universität Konstanz) durchgeführt. Das unter denaturierenden Bedingungen gereinigte Protein konnte nach der *in vitro* Faltungsmethode in einer Ausbeute von 15 % in wasserlöslicher Form erhalten werden. Die Ausbeute entspricht der bei Ax1Ig1-4 erreichten, so dass zumindest für verwandte Proteine dieser Molekülklasse eine Anwendbarkeit dieser Methode gegeben scheint. Von dem Proteinfragment konnten bereits erste Kristalle erhalten werden. Die besten Kristalle wurden unter Verwendung von 22-24 % PEG 6000, 350 mM CaCl₂, 100 mM Tris-HCl bei pH 8.5 und einer Temperatur von 10°C erhalten und erreichten

eine maximale Größe von etwa 80 x 80 x 400 μm . Bei Verwendung einer Drehanode als Strahlungsquelle liegt das beobachtete Beugungslimit bei etwa 3.5 \AA . Die Nutzung von Synchrotronstrahlung sollte daher eine Strukturaufklärung mit atomarer Auflösung erlauben.

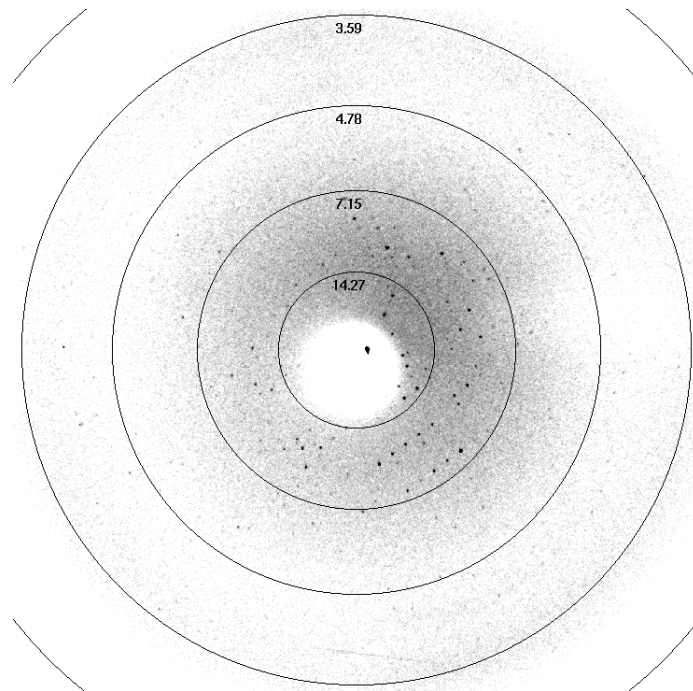


Abbildung 13 Beugungsmuster eines schockgefrorenen E587 Antigen Kristalls bei einer Belichtungszeit von 20 min und einem Drehwinkel von 0.5° . Man erkennt einzelne Reflexe bis zu einer Auflösung von etwa 3.5 \AA .

5 Zusammenfassung

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte der N-terminale Bereich des neuronalen Zelladhäsionsprotein Axonin-1 in Bakterien in unlöslicher Form im Milligrammmaßstab überexpressiert werden. Durch Modifikation einer geeigneten *in vitro* Faltungsmethode gelang es, monodispers lösliches Protein in Ausbeuten von 10 - 15 % zu erhalten, so dass für Strukturuntersuchungen ausreichend Material zur Verfügung stand. Die biochemische Charakterisierung des *in vitro* gefalteten Proteins zeigte, dass es den für einen nativen Faltungszustand zu erwartenden hohe β -Faltblattanteil enthielt und in Lösung als Monomer vorlag. Das Auffinden vorläufiger Kristallisationsbedingungen und deren Verfeinerung ermöglichte die Herstellung röntgentauglicher Einkristalle, mit denen am Deutschen Elektronensynchrotron Beugungsdaten bis zu einer nominellen Auflösung von 1.8 \AA erhalten wurden. Da die Methoden des molekularen Ersatzes (MR) und des einzelnen isomorphen Ersatzes (SIR) trotz intensiver Versuche nicht zur Lösung des Phasenproblems führten, wurden die Phasen durch Messung der anomalen Streuung (MAD) eines Platin-Derivats unter Zuhilfenahme von Synchrotronstrahlung bestimmt. Die Interpretation der experimentellen Elektronendichte erlaubte das Erstellen eines Proteinmodells, das gegen native Daten verfeinert wurde. Am Ende des Verfeinerungsprozesses wurde eine hochaufgelöste Proteinstruktur des vier Immunoglobulineinheiten umfassenden, N-terminalen Fragments von Axonin-1 erhalten.

Die hochaufgelöste Röntgenstruktur zeigt eine U-förmige Gesamtanordnung der vier Ig-Domänen. Ig3 und Ig4 sind, ebenso wie Ig1 und Ig2, fast linear hintereinander angeordnet, dabei jedoch relativ zu den ersten beiden Domänen in entgegengesetzter Richtung orientiert. Diese Struktur wird durch einen Linker zwischen Ig2 und Ig3 ermöglicht, der in einem

halbkreisförmigen Bogen entlang der Oberflächen der beiden Domänen verläuft. Durch starke Wechselwirkungen an den Kontaktflächen zwischen Ig1 und Ig4 sowie zwischen Ig2 und Ig3 wird diese Gesamtstruktur stabilisiert. Die Domänen Ig1, Ig2 und Ig4 weisen eine typische I1-Set Topologie auf, wie sie aus den Strukturen von anderen Zelladhäsionsproteinen bekannt ist. Ig3 besitzt dagegen einen ungewöhnlichen Aufbau, da die Reste, die normalerweise den D-Strang bilden sollten, stattdessen eine hakenförmige Struktur bilden. Dieser ungewöhnliche Teil des Proteins ist außerdem an der Vermittlung der stärksten Kristallkontakte im Proteinkristall beteiligt. Der hakenförmige Loop ragt in das Loch in der Mitte der vier Ig-Domänen des angrenzenden Proteinmoleküls, dessen C-Terminus in die entgegengesetzte Richtung weist wie der des ersten Proteinmoleküls. Da jedes Proteinmolekül in einer solchen Wechselwirkung als Donor oder als Akzeptor wirken kann, entsteht eine lineare Struktur, in der die C-Termini benachbarter Proteinmoleküle in entgegengesetzte Richtungen weisen, während jedes zweite Molekül in die gleiche Richtung zeigt. Diese Struktur erinnert wegen der Orientierung der einzelnen Elemente und deren Verzahnung an einen Reißverschluss.

Mehrere Details der Proteinstruktur weisen darauf hin, dass die im Kristall beobachtete Anordnung der Proteinmoleküle in reißverschlussähnlichen Reihen die gleiche ist, wie sie bei der homophilen, durch Axonin-1 vermittelten trans-Interaktion zwischen Nervenzellen vorkommt. So sind an den Kontaktflächen zweier interagierender Proteinmoleküle jeweils Proteinbereiche mit ungewöhnlicher Struktur an den Wechselwirkungen beteiligt. Außerdem ist die resultierende Kontaktfläche deutlich größer als für zufällige Kristallkontakte zu erwarten ist. Gegen einen zufällig auftretenden Kristallkontakt spricht ebenfalls, dass die reißverschlussähnliche Struktur auch in mehreren weiteren untersuchten Kristallformen von Ax1Ig1-4 gefunden wurde. Ein weiteres Ergebnis der Analyse mehrerer Kristallformen war, dass das Protein eine gewisse Beweglichkeit einer rigiden Ig1/Ig4-Einheit relativ zu einer ebenfalls rigiden Ig2/Ig3-Einheit besitzt.

Sequenzvergleiche mit Proteinen ähnlicher Sequenz zeigen, dass die Abstände zwischen den Disulfidbrücken der zweiten und dritten Ig-Domäne für einige weitere Proteine eine U-förmige Gesamtstruktur des N-terminalen Bereichs implizieren, wie sie in Axonin-1 beobachtet wird. Dagegen weisen die verwandten Proteine in den Sequenzbereichen, die an der Ausbildung der Reißverschlussstruktur beteiligt sind, signifikante Abweichungen gegenüber Axonin-1 auf, so dass der beobachtete Bindungsmechanismus für die homophile Interaktion anderer Proteine vermutlich keine Rolle spielt.

6 Ausblick

Die Strukturaufklärung von Ax1Ig1-4 erlaubt lediglich einen ersten Einblick in die Struktur-Funktions-Beziehung dieser wichtigen Klasse von verwandten Zelladhäsionsproteinen. Das für die homophile Interaktion vorgeschlagene Modell, das sich bisher nur auf die Anordnung der Proteinmoleküle im Kristall stützt, bedarf der experimentellen Überprüfung. Mutationen an Schlüsselpositionen sollten die homophile Bindungsfähigkeit vermindern, und synthetische Peptide, die die Struktur des CE Loops in Ig3 nachahmen, sollten die Bindung kompetitiv hemmen. Die Strukturaufklärung weiterer, verwandter Proteine sollte die Frage beantworten, ob der hier beobachtete Bindungsmechanismus, der zur Ausbildung einer reißverschlussartigen Struktur führt, ein allgemeines Funktionsprinzip darstellt. Die Strukturaufklärung heterophiler Bindungskomplexe, z. B. Axonin-1 in Komplex mit NgCAM, sollte außerdem klären, ob dieser Bindungsmechanismus auch für heterophile Bindung eine Rolle spielt.

Die Übertragbarkeit der Expressionstrategie von Axonin-1 auf das L1-Homologe aus dem Goldfisch zeigt, dass die Strukturaufklärung weiterer Proteine dieser Strukturklasse mit den verwendeten Methoden möglich sein sollte. Der augenblickliche Status der Versuche zur Kristallisation des L1-Homologen legt nahe, dass eine Strukturaufklärung mit atomarer Auflösung innerhalb der nächsten Monate abgeschlossen werden kann.

7 Literatur

- Abrahams, J. P. & Leslie, A. G. W. (1996). Methods used in the structural determination of bovine mitochondrial F₁ ATPase. *Acta Cryst.* **D52**, 30-42.
- Altschul, S. F., Madden, T. C., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lippman, D. J. (1997). Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* **25**, 3389-3402.
- Amzel, L. M. & Poljak, R. J. (1979). Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 961-997.
- Andrade, M. A., Chacon, P., Merelo, J. J. & Moran, F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Engineering* **6**, 383-390.
- Bateman, A., Jouet, M., MacFarlane, J., Du, J.-S., Kenwrick, S. & Chothia, C. (1996). Outline structure of the human L1 cell adhesion molecule and the sites where mutations cause neurological disorders. *EMBO J.* **15**, 6050-6059.
- Bella, J., Kolatkar, P. R., Marlor, C. W., Greve, J. M. & Rossman, M. G. (1998). The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4140-4145.
- Blundell, T. L. & Johnson, L. N. (1976). Protein crystallography, Academic Press, New York, USA.
- Bodia, D. I., Jones, E. Y., Harlos, K., Stuart, D. I. & Davis, S. J. (1994), Crystal structure of the extracellular region of the human cell adhesion molecule CD2 at 2.5 Å resolution. *Structure* **2**, 755-766.
- Bottomley, M. J., Robinson, R. C., Driscoll, P. C., Harlos, K., Stuart, D. I., Aplin, R. T., Clements, J. M., Jones, E. Y. & Dudgeon, T. J. (1994). Crystallization and preliminary x-ray diffraction characterisation of both a native and selenomethionyl VLA-4 binding fragment of VCAM-1. *J. Mol. Biol.* **244**, 464-468
- Brady, R. L., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Lnage, G., Davis, S. J., Williams, A. F. & Barclay, A. N. (1993). Crystal structure of domains 3 and 4 of rat CD4: relation to the NH₂-terminal domains. *Science* **260**, 979-983.
- Brünger, A. T. (1990). Expansion of molecular replacement: an new search strategy based on patterson correlation refinement. *Acta Cryst.* **A46**, 46-57.
- Brünger, A. T. (1992). The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-474.
- Brünger, A. T. , Adams, P.D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* **D54**, 905-921.

- Buchner, J. & Rudolph, R. (1991b). Routes to active protein from transformed microorganisms. *Curr. Opin. Biotech.* **2**, 532-538.
- Buchner, J. & Rudolph, R. (1991a). Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology* **9**, 157-162.
- Burgoon, M. P., Grumet, M., Mauro, V., Edelman, G. M. & Cunningham, B. A. (1991). Structure of the chicken neuron-glia cell adhesion molecule, NgCAM: origin of the polypeptides and relation to the Ig superfamily. *J. Cell. Biol.* **112**, 1017-1029.
- Casasnovas, J. M., Springer, T., Liu, J.-H., Harrison, S. C. & Wang, J.-H. (1997). crystal structure of ICAM-2 reveals a distinctive integrin recognition surface. *Nature* **387**, 312-315.
- Casasnovas, J. M., Stehle, T., Liu, J.-H., Wang, J.-H. & Springer, T. A. (1998). A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4134-4139.
- Chothia, C. & Jones E. Y. (1997). The molecular structure of cell adhesion molecules. *Ann. Rev. Biochem.* **66**, 823-862.
- Conte, L. L., Chothia, C. & Janin, J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J. Mol. Biol.* **285**, 2177-2198.
- Cowatan, K. (1994). DM: An automated procedure for phase improvement by density modification. *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography* **31**, 34-38.
- Cudney, B., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y. & McPherson, A. (1994). Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta Cryst.* **D50**, 414-423.
- Cunningham, B. A., Hemperly, J. J., Murray, B. A., Prediger, E. A., Brackenbury, R. & Edelman, G. M. (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* **236**, 799-806.
- de la Fortelle, E. & Bricogone, G. (1997) Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement in the MIR and MAD methods, *Methods Enzymol.* **276**, 472-494.
- Denzinger, T. (1999). Dissertation, Konstanz.
- Denzinger, T., Przybylski, M., Savoca, R. & Sonderegger, P. (1997). Mass spectrometric characterisation of primary structure, sequence heterogeneity, and intramolecular disulfide loops of the cell adhesion protein axonin-1 from chicken. *Eur. Mass. Spectrom.* **3**, 379-389.
- Derman, A. C., Prinz, A., Belin, D. & Beckwith, J. (1993). Mutation that allow disulphide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* **262**, 1744-1747.
- Diederichs, K. (1995). Structural superposition of proteins with unknown alignment and detection of topological similarity using a six-dimensional search algorithm. *Proteins* **23**, 187-195.

- Diederichs, K. & Karplus, P. A. (1997). Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 269-275.
- Drenth, J. (1994). Principles of protein X-ray crystallography. Springer Verlag, New York.
- EU 3-D Validation Network (1998). Who checks the checkers? Four Validation tools applied to eight atomic resolution structures. *J. Mol. Biol.* **276**, 417-436.
- Felsenfeld, D. P., Hynes, M. A., Skoler, K. M., Furley, A. J. & Jessell, T. M. (1994). TAG-1 can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth of TAG-1 requires an L1-like molecule and β_1 integrins. *Neuron* **12**, 675-690.
- Furley, A. J., Morton, S. B., Manalo, D., Karagogeos, D., Dodd, J. & Jessels, T. M. (1990). The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth promoting activity. *Cell* **61**, 157-170.
- Giordano, S., Lässing, Z., Ankerhold, R., Lottspeich, F. & Stürmer, C. A. (1997). Molecular characterization of E587 antigen: an axonal recognition molecule expressed in the goldfish central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **377**, 286-297.
- Harpaz, Y. & Chothia, C. (1994). Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. *J. Mol. Biol.* **238**, 528-539.
- Harris, L. J., Skaletsky, E. & McPherson, A. (1995). Crystallization of intact monoclonal antibodies. *Proteins* **23**, 285-289.
- Hayward, S. & Berendzen, J. C. (1998). Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change: new results on citrate synthase and T4 lysozyme. *Proteins* **31**, 116-121.
- Hemmingsen, J. M. (1994). The tyrosine corner: a feature of most Greek key beta-barrel proteins. *Protein Sci.* **3**, 1927-1937.
- Herzberg, O. & Moulton, J. (1991). Analysis of the steric strain in the polypeptide backbone of protein molecules. *Proteins* **11**, 223-229.
- Hodkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500-512.
- Holden, H. M., Ito, M., Hartsthorpe, D. J. & Rayment, I. (1992). X-ray structure determination of telokin, the C-terminal domain of myosin light chain kinase, at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **227**, 480-451.
- Holmgren, A. & Bränden, C.-I. (1989). Crystal structure of chaperone protein PapD reveals an immunoglobulin fold. *Nature* **342**, 248-251.
- Hoof, R. W., Sander, C., Vriend, G. & Abola, E. E. (1996). Errors in protein structures. *Nature*, **381**, 272.

- Huber, A. H., Wang, Y., Bieber, A. J. & Bjorkman, P. J. (1994). Crystal structure of tandem type III fibronectin domains from *Drosophila neuroglian* at 2.0 Å resolution. *Neuron* **12**, 717-731
- Hynes, R. O. (1990) *Fibronectins*, Springer-Verlag, New-York.
- Improta, S., Politou, A. S. & Pastore A. (1996). Immunoglobulin-like modules form titin I-band: extensible components of muscle elasticity. *Structure* **4**, 323-337.
- Ioerger, T. R., Du, C. & Linthicum, D. S. (1999). Conservation of cys-cys trp structural triads and their geometry in the protein domains of immunoglobulin superfamily members. *Mol. Immunol.* **36**, 373-386.
- Jancarik, J. & Kim, S. H. (1991). Sparse matrix sampling: A screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 409-411.
- Janin, J. (1997). Specific versus non-specific contacts in protein crystals. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 973-974.
- Jensen, P. H., Soroka, V., Thomsen, N. K., Raets, I., Berenzin, V., Bock, E. & Poulsen, F. M. (1999). Structure and interactions of NCAM modules 1 and 2, basic elements in neural cell adhesion. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 486-493.
- Jones, E. Y., Harlos, K., Bottomley, M.J., Robinson, R. C., Driscoll, P. C., Edwards, R. M., Clements, J. M., Dudgeon, T. J. & Stuart, D. I (1995). Crystal structure of an integrin-binding fragment of vascular cell adhesion molecule-1 at 1.8 Å resolution. *Nature* **373**, 539-544.
- Jones, E. Y., Simon, J. D., Williams, A. F., Harlos, K. & Stuart, D. (1992). Crystal structure at 2.8 Å resolution of a soluble form of the cell adhesion molecule CD2. *Nature* **360**, 232-239.
- Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.* **A47**, 110-119.
- Kabsch, W. & Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637.
- Kabsch, W. (1988). Evaluation of single crystal X-ray diffraction from a position sensitive detector. *J. Appl. Cryst.* **21**, 916-924.
- Kadmon, G. A., Kowitz, A., Atevogt, P. & Schachner, M. (1990). Functional cooperation between the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J. Cell. Biol.* **110**, 209-218.
- Kelly, G., Prasanna, S., Daniell, S., Fleming, K., Frankel, G., Dougan, G., Connerton, I. & Matthews, S. (1999). Structure of the cell-adhesion fragment of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 313-318.
- Kenwick, S. & Doherty, P. (1998). Neural cell adhesion molecule L1: relating disease to function. *BioEssays* **20**, 668-675.

- Kimura, Y., Vassilyev, D. G., Miyazawa, A., Kidera, A., Matsushima, M., Mitsuoka, K., Murata, K., Hirai, T. & Fujiyoshi, Y. (1997). *Nature* **389**, 206-211.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1997) Model-building and refinement practice. *Methods Enzymol.* **277**, 208-230.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **28**, 338-340.
- Lockerbie, R. O. (1987). The neuronal growth cone,: a review of its locomotory, navigational and target recognition capabilities. *Neuroscience* **20**, 719-729.
- Lumsden, A. G. S. & Davis, A. M. (1986). Chemotropic effect of specific target epithelium in the developing mammalian nervous system. *Nature* **323**, 538-539.
- Milev, P., Maurel, P., Häring, M., Margolis, R. K. & Margolis, R. U. (1996). TAG-1/axonin-1 is a high-affinity ligand of neurocan, phosphacan/protein-tyrosine phosphatase $\zeta\beta$, and N-CAM. *J. Biol. Chem.* **271**, 15716-15723.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- Paci, E. & Karplus, M.(1999). Forced unfolding of fibronectin type 3 modules: an analysis by biased molecular dynamics simulations. *J Mol. Biol.* **288**, 441-459
- Pertz, O., Bozic, D., Koch, A. W., Fauser, C., Brancaccio, A. & Engel, J. (1999). A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveals molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J.* **18**, 1738-1747.
- Pfuhl, M. & Pastore, A. (1995). Tertiary structure of an immunoglobulin-like domain from the giant muscle protein titin: a new member of the I set. *Structure* **3**, 391-401.
- Powell, M. J. D. (1977). Restart procedures for the conjugent gradient method. *Mathematical programming* **12**, 241-254.
- Proba, K., Ge, L., Pluckthün, A. (1995). Functional antibody single chain fragments from the cytoplasm of Escherichia coli.: influence of thioredoxin reductase (TrxB). *Gene* **159**, 203-207.
- Rader, C., Stoeckli, E. T., Ziegler, U., Osterwalder, T., Kunz, B. & Sonderegger, P. (1993). Cell-cell adhesion by homophilic interaction of the neuronal recognition molecules axonin-1. *Eur. J. Biochem.* **215**, 133-141.
- Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Prot. Chem.* **23**, 282-437.
- Rader, C., Kunz, N., Lierheimer, R., Giger, R. J., Berger, P., Tittmann, P., Gross, H. & Sonderegger, P. (1996). Implications for the domains arrangement of axonin-1 derived from the mapping of its NgCAM binding site. *EMBO J.* **15**, 2056-2068.

- Richardson, J. S. (1977). β -sheet topology and the relatedness of proteins. *Nature* **268**, 495-500.
- Rogers, D. W. (1994). Cryocrystallography. *Structure* **2**, 1135-1139.
- Rudolph, R. (1990). Renaturation of recombinant, disulfide-bonded proteins from inclusion bodies. in *Modern Methods in Protein- and Nucleic Acid Research* edited by Tschesche, H., Berlin; New York. Walter de Gruyter, 149-171.
- Shapiro, L., Doyle, J. P., Hensley, P., Colman, D. R. & Hendrickson, W. A. (1996). Crystall structure of the extracellular domain from P₀, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron* **17**, 435-449.
- Shapiro, L., Fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Grubel, G., Legrand, J. F., Als-Bilesen, J., Colman, D. R. & Hendrickson, W. A. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**, 327-337.
- Skerra, A. & Pluckthün, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin F_V fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038-1041.
- Sondermann, P., Huber, R. & Jacob, U. (1999). Crystal structure of the soluble form of the human Fc γ -receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 Å resolution. *EMBO J.* **18**, 1095-1103.
- Stoeckli, E. T. & Landmesser, L. T. (1995). Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron* **14**, 1165-1179.
- Su, X.-D., Gastinel, L. N., Vaughn, D. E., Faye, I., Poon, P., Bjorkman, P. J. (1998). Crystal structure of hemolin: A horseshoe shape with implications for homophilic adhesion. *Science* **281**, 991-995.
- Tader, C., Junz, B., Lierheimer, R., Giger, R. J., Berger, P., Tittmann, P., Gross, H. & Sonderegger, P. (1996). Implication for the domain arrangement of axonin-1 derived from the mapping of its NgCAM binding site. *EMBO J.*, **15**, 2056-2068.
- Tamura, K., Shan, W. S., Hendrickson, W. A., Colman, D. R. & Shapiro, L. (1998). Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-)cadherin. *Neuron* **20**, 1153-1163.
- Tan, K., Casanovas, J. M., Liu, J.-H, Briskin, M.J., Springer, T. A. & Wang, J.-H. (1998). The structure of immunoglobulin superfamily domains 1 and 2 of MAdCAM-1 reveals novel features important for intergrin recognition. *Structure* **6**, 793-801.
- Terwilliger, T. C. & Berendzen, J. (1999). Atomated MAD and MIR structure solution. *Acta Cryst.* **D55**, 849-861.
- Thomsen, N. K., Soroka, V., Jensen, P. H., Berezin, V., Kiselyov, V. V., Bock, E. & Poulsen, F. M. (1996). The three-dimensional structure of the first domain of neural cell adhesion molecule. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 581-585.
- Trakhanov, S. & Quijcho, F. A. (1995). Influence of divalent cations in protein crystallization. *Protein Science* **4**, 1914-1919.

- Tsiotra, P. C., Theodorakis, K., Papamatheakis, J. & Karagogeos, D. (1996). The fibronectin domains of the neural adhesion molecule TAX-1 are necessary and sufficient for homophilic binding. *J. Biol. Chem.* **271**, 29216-29222.
- Wang, J.-H, Pepinsky, R. B., Stehle, T., Liu, J.-H., Karpusas, M., Browning, B. & Osborn, L. (1995). The crystal structure fo an N-terminal two-domain fragment of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1): A cyclic peptide based on the domain 1 C-D loop can inhibit VCAM-1- α 4 intergrin interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **92**, 5714-5718.
- Whitley, P. & von Heijne, G. (1993). The DsnA-DsbB system affects the formation of disulfide bonds in periplasmic but not intramembraneous protein domains. *FEBS Lett.* **332**, 49-51.
- Wu, H., Kwong, P. & Hendrickson, W. A. (1997). Dimeric association and segmental variability in th estructure of human CD4. *Nature* **387**, 527-530.
- Zuellig, R. A., Rader, C., Schroeder, A., Kaloused, M. B., von Bohlen und Halbach, F., Osterwalder, R., Inan, C., Stoeckli, E. T., Affolter, H.-U., Fritz, A., Hafen, E. & Sonderegger, P. (1992). The axonally secreted cell adhesion molecule, axonin-1: primary structure, immunoglobulin-like and fibromection-type-III-like domains and glycosyl-phosphatidylinositol anchorage. *Eur. J. Biochem.* **204**, 453-463.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei:

Prof. Dr. Wolfram Welte für die Vergabe des Themas, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft sowie die bei der Durchführung dieser Arbeit gewährten Freiräume.

Prof. Dr. Claudia Stürmer für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Peter Sonderegger für die hilfreichen Diskussionen über Struktur und Funktion von Axonin-1.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Welte für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Den Vertiefungskursstudenten und HiWis, die an den Projekten der letzten Jahre mitgearbeitet haben.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Sonderegger (Zürich), die an der Strukturaufklärung von Ax1Ig1-4 beteiligt waren, für die gute Zusammenarbeit.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Stürmer (Konstanz) für die Geduld und Ausdauer bei den Kooperationen über E587-Antigen und über Neurolin, die hoffentlich bald durch Strukturergebnisse belohnt werden.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Herzog (Bonn) und Paulmichel (Innsbruck) für die gute Zusammenarbeit bei Projekten, die sich leider nicht in dieser Arbeit niedergeschlagen haben.