

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Würzburg**

**Kommissarische Leitung: Professor Dr. Antje Gohla**

**Untersuchungen über die Dimerisierung der HAD-Phosphatase  
Chronophin**



**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Christian Kestler**

**aus Würzburg**

**Würzburg, Juni 2016**

**Referentin:** Prof. Dr. Antje Gohla

**Koreferent:** Prof. Dr. Hermann Schindelin

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Mai 2017

Der Promovend ist Arzt

*Meinen Eltern*



# INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Organisation der Phosphatasen	1
1.2 HAD-Phosphatasen	2
1.2.1 Struktureller Aufbau der Kern-Domäne von HAD-Phosphatasen	2
1.2.2 Sequenzmotive des aktiven Zentrums bei HAD-Phosphatasen	3
1.2.3 Reaktionsmechanismus der HAD-Phosphatasen	6
1.2.4 Aufbau und Funktion der Cap-Domänen bei HAD-Phosphatasen	7
1.2.5 Chronophin als Vertreter der HAD-Phosphatasen	11
1.3 Substrate von Chronophin	13
1.3.1 Pyridoxalphosphat	13
1.3.2 Phospho-Cofilin	17
1.3.3 SRC-3	19
1.4 Fragestellung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Antikörper	22
2.1.2 Bakterienstämme und Zellstämme	22
2.1.3 Chemikalien	22
2.1.4 Kits	25
2.1.5 Marker und Eichlösungen	25
2.1.6 Oligonukleotide	25
2.1.7 Plasmide	26
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.9 Zellkultur-Medium und Reagenzien	27
2.1.10 Materialien und verwendete Software der Rasterkraftmikroskopie	28

2.1.11 Technische Geräte	29
2.1.12 Puffer und Lösungen	31
2.1.13 Enzyme, kommerzielle Puffer und Inhibitoren	36
2.1.14 Software und Webseiten	37
2.2 Methoden	38
2.2.1 Zellkulturmethoden mit HEK AD-293-Zellen	38
2.2.2 GST-Pulldown-Assay	39
2.2.3 SDS-PAGE	40
2.2.4 Western-Blot	41
2.2.5 Ponceau-Färbung	42
2.2.6 Immundetektion	42
2.2.7 Coomassie®-Färbung	43
2.2.8 Klonierung	43
2.2.9 Transformation	48
2.2.10 Mini-DNA-Plasmid-Präparation	49
2.2.11 Midi-DNA-Plasmid-Präparation	50
2.2.12 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion	51
2.2.13 Reinigung von PCR-Produkten	51
2.2.14 Proteinexpression	52
2.2.15 Proteinaufreinigung	53
2.2.16 Größenausschlusschromatographie	56
2.2.17 Proteinkonzentrationsmessung.	57
2.2.18 Thermofluor	57
2.2.19 Rasterkraftmikroskopie	58
2.2.20 Analytische Ultrazentrifugation	61
2.2.21 Aktivitätsmessung von Chronophin	63

2.2.22 Grundlagen der Proteinkristallisation	64
2.2.23 Datenbanksuche und Strukturvergleich	69
3. Ergebnisse	71
3.1 Vergleich der Sekundärstruktur von HAD-Hydrolasen	71
3.2 Grundlagen der Mutagenese in der Dimerisierungsgrenzfläche	72
3.3 Untersuchungen über die Dimerisierung der Mutante mCIN A194K/A195K im Vergleich zu mCIN WT	74
3.3.1 Metallaffinitätschromatographie	74
3.3.2 Größenausschlusschromatographie	77
3.3.3 Rasterkraftmikroskopie	79
3.3.4 Analytische Ultrazentrifugation	81
3.3.5 GST-Pulldown-Assay	83
3.4 Thermofluor zur Verbesserung der Pufferbedingungen	88
3.5 Messung der Phosphataseaktivität	89
3.6 Kristallisation und Ergebnisse der Proteinstrukturanalyse	91
3.7 Strukturvergleich bekannter HAD-Hydrolasen vom C2a-Typ	96
4. Diskussion	100
4.1 Diskussion verwendeter Methoden	100
4.1.1 Größenausschlusschromatographie	100
4.1.2 Rasterkraftmikroskopie	101
4.1.3 Analytische Ultrazentrifugation	102
4.1.4 GST-Pulldown Assay	102
4.1.5 Thermofluor	103
4.1.6 Messung der Phosphataseaktivität	103
4.1.7 Kristallisation und Proteinstrukturanalyse	104

4.2	Diskussion der Ergebnisse	105
4.2.1	Allgemeine Bedeutung von Dimerisierung für Struktur und Enzymfunktion	105
4.2.2	Bedeutung der Cap-Domäne für die Substratspezifität bei HAD-Phosphatasen	107
4.2.3	Zusammenhang zwischen Oligomerisierung und enzymatischer Funktion bei Vertretern der HAD-Phosphatasen	108
4.2.4	Erkenntnisse über die Regulation von Substratspezifität durch Homodimerisierung anhand konstitutiv monomerem Chronophin	110
4.2.5	Möglicher therapeutischer Nutzen einer Hemmung der Dimerisierung von Chronophin	111
5.	Zusammenfassung	114
6.	Literaturverzeichnis	115
7.	Abbildungsverzeichnis	144
8.	Tabellenverzeichnis	146
9.	Anhang	147
	Danksagung	
	Lebenslauf	

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
ADF	Actin depolymerizing factor
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CIN	Chronophin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
engl.	englisch
dest.	destilliert
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HAD	Haloacid Dehalogenase
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
ID	Identifikator
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IMAC	Immobilized-Metal Affinity Chromatography
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KK	Mutation A194K/A195K
mCIN	murines (Maus-) Chronophin
MWCO	Molecular Weight Cut Off (Molekulargewichtstoleranzgrenze)
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pfam	Protein Families
PLP	Pyridoxalphosphat
PDB	Protein Data Bank
rpm	revolutions per minute

r.m.s.d.	root mean square deviation (Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung)
S	Svedberg
TEV	Tobacco etch Virus
U	Unit
V	Volt
WT	Wildtyp

#### Abkürzungen der Aminosäuren

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

Falls nicht anders angegeben sind alle Aminosäuresequenzen im Einbuchstabencode in 5'-3' Richtung angegeben.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Organisation der Phosphatasen

Die Entdeckung, dass „reversible Proteinphosphorylierung als biologischer Regulationsmechanismus“ (1) dient, brachte Edmond H. Fischer und Edwin G. Krebs im Jahr 1992 den Nobelpreis in Physiologie oder Medizin für ihre Arbeit über die Aktivierung des Enzyms Phosphorylase b durch die Übertragung eines anorganischen Phosphatrestes ein (2-4). Diese reversible Phosphorylierung bildet die Grundlage vieler biologischer Signalwege und kommt oft einem molekularen An-Aus-Schalter gleich. Während das Anheften eines Phosphatrestes durch Proteinkinasen katalysiert wird, sorgen Phosphatasen für die Rückreaktion, also die Abspaltung des Phosphatrestes.

Schätzungen gehen davon aus, dass bei etwa einem Drittel der intrazellulär vorkommenden Proteine reversible Phosphorylierung auftritt (5, 6).

Phosphatasen übernehmen dadurch vielfältige Funktionen wie beispielsweise in der Signaltransduktion (7, 8), Zytoskelettregulation (9), als Transkriptionsfaktoren (10), im Metabolismus (11) und in der Regulation des Immunsystems (12).

Phosphatasen können danach klassifiziert werden, an welche Aminosäure der Phosphatrest am Substrat gebunden ist, der durch die Phosphatasen abgespalten wird. Analysen der Phosphorylierungsstellen an humanen Proteinen zeigen, dass davon etwa 86 % Phosphoserine, 12 % Phosphothreonine und 2 % Phosphotyrosine ausmachen (13). So lassen sich Phosphatasen in Phospho-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) und Serin/Threonin-Phosphatasen unterscheiden.

Die Gruppe der Serin/Threonin-Phosphatasen wiederum kann in Phospho-Protein-Phosphatasen (PPP), Metall-abhängige Protein-Phosphatasen (PPM) und Aspartat-abhängige-Phosphatasen unterschieden werden (14). Die Aspartat-abhängigen Phosphatasen können noch weiter in FCP/SCP [*TFIIE* (*transcription initiation factor IIF*)-associating component of *CTD* (*C-terminal*

domain) *phosphatase/small CTD phosphatase*]- und HAD-Phosphatasen unterteilt werden, die beide zur HAD-Superfamilie gehören (15, 16).

## 1.2 HAD-Phosphatasen

Die Superfamilie der HAD-Phosphatasen ist nach dem erstmals in *Pseudomonas*- (17, 18) und *Xanthobacter*-Spezies (19) nachgewiesenen Enzym Haloacid Dehalogenase (HAD) benannt. Vertreter dieser großen und weitverbreiteten Proteinfamilie finden sich jedoch nicht nur in Bakterien, sondern genauso in Eukaryoten und Archaeen (20) und somit in allen drei Domänen des Lebens (21). Von den derzeit über 19000 bekannten DNA-Sequenzen, die für Enzyme der HAD-Superfamilie kodieren, finden sich zum Beispiel 28 in *Escherichia coli* und 183 beim Menschen (22). Die Übertragung von Phosphatgruppen macht einen Großteil, jedoch nicht die Gesamtheit der Funktionen von Enzymen der HAD-Familie aus (23). So besteht diese zu etwa 20% aus ATPasen, also Enzymen, die die Spaltung des energiereichen Adenosintriphosphat (ATP) katalysieren und zu etwa 79% aus Phosphatasen (Phosphatmonoesterhydrolasen) (22). Beim Menschen sind mehr als 40 Gene identifiziert, die theoretisch mehr als 160 HAD-Phosphatasen kodieren könnten (24).

### 1.2.1 Struktureller Aufbau der Kern-Domäne von HAD-Phosphatasen

HAD-Phosphatasen lassen sich der HAD-Superfamilie sowohl über Gemeinsamkeiten in der Aminosäuresequenz, als auch strukturelle Übereinstimmungen zuordnen. Während sich die Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz bei HAD-Phosphatasen auf bestimmte, kurze Aminosäureabfolgen in bestimmten Mustern, sogenannten Motiven (siehe 1.2.2), beschränken, stimmen HAD-Phosphatasen in ihrem strukturellen Grundaufbau sehr stark überein (25).

So besteht die sogenannte Kern-Domäne von HAD-Phosphatasen aus einer charakteristischen Anordnung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Sie bildet das strukturelle Gerüst für das aktive Zentrum, dessen grundsätzliche strukturelle Anordnung allen HAD-Phosphatasen gemeinsam ist (siehe

Abbildung 1). Sich abwechselnd wiederholende  $\beta$ -Faltblattstrukturen und  $\alpha$ -Helices formen ähnlich der sogenannten Rossmann-Faltung (26) eine dreilagige Schichtung (23). Während in dieser rosmannoiden Faltung die  $\alpha$ -Helices vornehmlich die äußeren Regionen und somit die Boden- und Deckstruktur der Kern-Domäne bilden, liegen die  $\beta$ -Faltblattstrukturen annähernd in einer Ebene in der Mitte und somit im Zentrum der Kern-Domäne (siehe Abbildung 1). Werden diesen mindestens fünf  $\beta$ -Faltblattsträngen gemäß ihrer Position in der Aminosäurekette aufeinanderfolgende Zahlen zugewiesen, so sind sie bei HAD-Phosphatasen in der Reihenfolge 54123 angeordnet (23). HAD-Phosphatasen besitzen zusätzlich noch weitere strukturelle Schlüsselmotive. Eine einzelne  $\alpha$ -helicale Windung, der „squiggle“ (engl. *squiggle*: Kringel), folgt auf das erste  $\beta$ -Faltblatt, verbindet es mit einer  $\beta$ -Haarnadelschleife, dem sogenannten „flap“ (engl. *flap*: Klappe) und stellt zusammen mit dem „flap“ einen einfachen Mechanismus dar, das aktive Zentrum teilweise abzuschirmen (23), was für den katalytischen Prozess wichtig ist. Diese Funktion übernehmen bei HAD-Phosphatasen allerdings in noch höherem Maße die sogenannten Cap-Domänen (engl. *cap*: Kappe). Diese Strukturelemente sind an charakteristischen Lokalisationen in die Kerndomäne eingefügt und stellen anders als die konservierte Kerndomäne aufgrund ihrer Varianten ein strukturelles Unterscheidungsmerkmal der HAD-Phosphatasen dar (Details siehe 1.2.4).

### **1.2.2 Sequenzmotive des aktiven Zentrums bei HAD-Phosphatasen**

Im Bereich des oben erwähnten „squiggle“ ist das erste von insgesamt vier sogenannten Motiven lokalisiert. Diese Motive sind für alle HAD-Phosphatasen charakteristische Aminosäureabfolgen, die an vier Schleifen positioniert das aktive Zentrum bilden und anhand derer die Zuordnung zur Familie der HAD-Phosphatasen erfolgen kann (24). Ihre evolutionäre Konservierung spricht für ihre Unabdingbarkeit im katalytischen Prozess.

Insgesamt sind vier Motive identifiziert (siehe Abbildung 1):

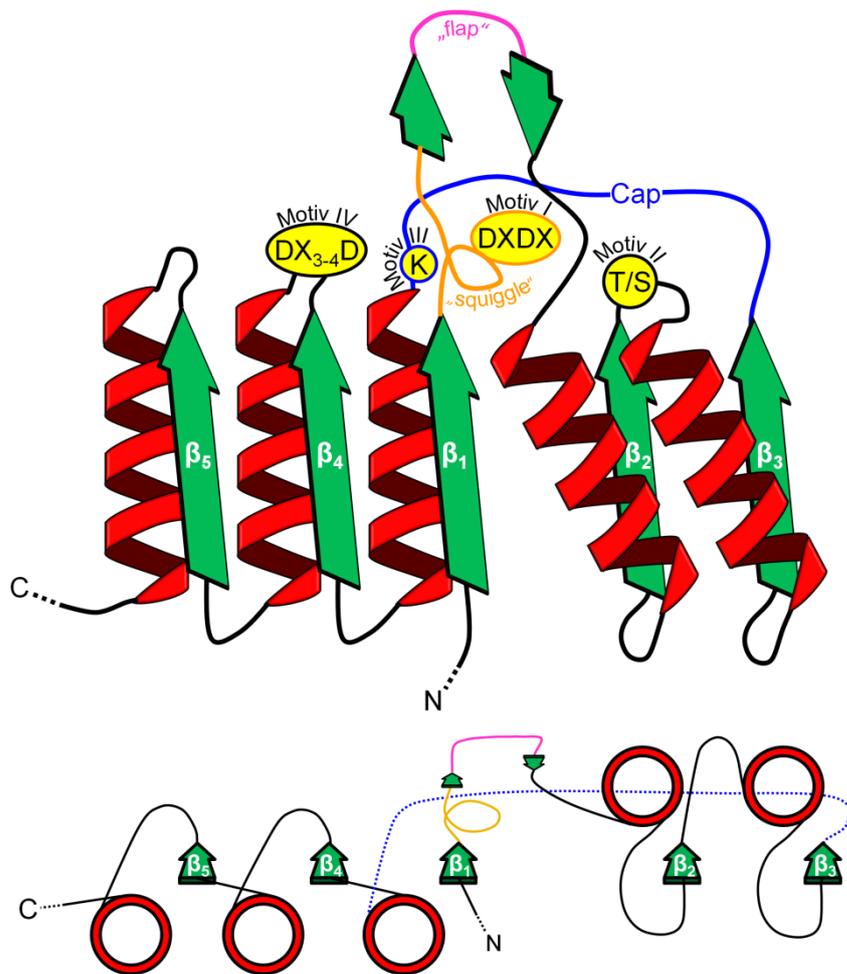
Motiv I ist im „squiggle“ am Ende des ersten  $\beta$ -Faltblatts lokalisiert und ist für die eigentliche katalytische Dephosphorylierung des Substrates essentiell. Es

besitzt die charakteristische Konsensus-Aminosäuresequenz hhhDXDX(T/V)(L/V)h (h steht hier für hydrophobe, X für beliebige Aminosäuren) (23, 24, 27). Das erste Aspartat (im Einbuchstabencode mit D bezeichnet) ist für den nukleophilen Angriff und somit den ersten katalytischen Schritt der Phosphatasereaktion (detaillierter Reaktionsmechanismus siehe Abbildung 2) verantwortlich. Es übernimmt die Phosphatgruppe des Substrats und ist somit für die katalytische Funktion unabdingbar (28). Das zweite Aspartat verhält sich als allgemeine Säure/Base (29). Einerseits ermöglicht dieser Aspartat-Rest die Protonierung der Abgangsgruppe, andererseits wird ein Wassermolekül deprotoniert, welches dann im Zuge eines nukleophilen Angriffs die Hydrolyse einleitet. Darüber hinaus sorgt die Carboxylgruppe des ersten Aspartats zusammen mit der Carbonylgruppe aus der Peptidbindung des zweiten Aspartats mit für die Koordinierung des essentiellen Kofaktors  $Mg^{2+}$  (für Details siehe 1.2.4.1).

Motiv II besteht aus einem konservierten Serin oder Threonin, das auf sechs hydrophobe Aminosäuren folgt, und befindet sich am Ende des zweiten  $\beta$ -Faltblatts (24). Es sorgt für die korrekte Positionierung des Substrats, indem die Hydroxylgruppe des Serins oder Threonins als Wasserstoffdonor mit einem Sauerstoffatom der Phosphorylgruppe des Substrats eine Wasserstoffbrückenbindung eingeht und dieses für die Katalyse positioniert sowie den Übergangszustand stabilisiert.

Motiv III ist durch ein Lysin gekennzeichnet, welches in der Schleife N-terminal vor der  $\alpha$ -Helix, auf die das vierte  $\beta$ -Faltblatt folgt, bei einigen wenigen HAD-Vertretern auch in der  $\alpha$ -Helix selbst liegt (23). Es ist zusammen mit dem Serin/Threonin aus Motiv II (24) wichtig für die Stabilisierung der bei der enzymatischen Phosphatgruppenübertragung entstehenden, negativ geladenen Zwischenprodukte (27).

Motiv IV besteht aus einer Sequenz mit der Abfolge (G/S)(D/S) $X_{3-4}$ (D/E)hhhh und kommt auch variiert als direkte Abfolge DD ohne die dazwischenliegenden Aminosäuren ( $X_{3-4}$ ) vor (24, 30, 31). Die Glutamat- oder Aspartatreste fungieren in beiden Fällen zusammen mit den Aspartatresten aus Motiv I als Koordinationspartner für den Kofaktor Magnesium (siehe 1.2.4.1).

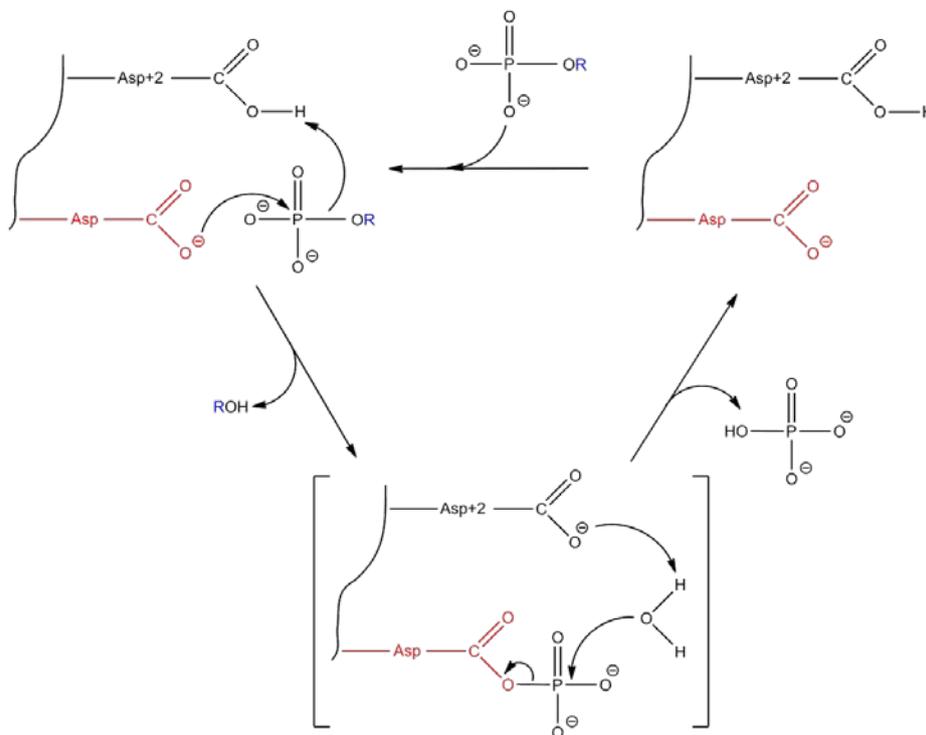


**Abbildung 1: Exemplarische Schemazeichnung der rossmannoiden Faltung bei HAD-Phosphatasen vom Cap-Typ 2.**

HAD-Phosphatasen besitzen eine rossmannoide Faltung aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern. Im oberen Bildabschnitt ist eine schematische Darstellung des Grundaufbaus in Schleifendarstellung ( $\beta$ -Faltblätter in Grün,  $\alpha$ -Helices in Rot) in Aufsicht gezeigt. Die HAD-Motive I-IV sind gelb hervorgehoben und ihre vereinfachte Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode gekennzeichnet (X als Platzhalter für eine beliebige Aminosäure). Die Strukturelemente „squiggle“ (orange) und „flap“ (magenta) sind farbig hervorgehoben. Die Cap-Domäne vom Typ 2 (blau) ist zur Vereinfachung als einfache Linie dargestellt. Im unteren Bildabschnitt ist die Frontalansicht der oberen Schemazeichnung mit Blickrichtung in die Ebene, in der die  $\beta$ -Faltblätter liegen, gezeigt. Hierdurch wird der dreischichtige „sandwich“-artige Aufbau deutlich, da die  $\alpha$ -Helices die  $\beta$ -Faltblätter auf beiden Seiten flankieren. Abbildung in Anlehnung an (22).

### 1.2.3 Reaktionsmechanismus der HAD-Phosphatasen

Bei der Dephosphorylierung durch HAD-Phosphatasen stellt der nukleophile Angriff des ersten Aspartats aus Motiv I mit der Konsensussequenz hhhDXDX(T/V)(L/V)h auf das Phosphoratom den ersten Reaktionsschritt dar (siehe Abbildung 2). Hierdurch entsteht über einen trigonal-bipyramidalen Übergangszustand (32) unter Abspaltung der Abgangsgruppe ein Säureanhydrid, ein Aspartylphosphat (28, 33). Während dem einen Aspartat so die Rolle des Nucleophils zukommt, verhält sich das zweite Aspartat aus Motiv I (Asp+2) in diesem Reaktionsschritt als Säure, indem es die Abgangsgruppe protoniert, während es im darauffolgenden Schritt, der Hydrolyse des Aspartylphosphates, als Base fungiert, indem es das Wassermolekül für die Hydrolyse deprotoniert (29, 34, 35). Durch die Freisetzung von anorganischem Phosphat ist nun der Ausgangszustand wiederhergestellt und der Reaktionszyklus kann erneut mit dem nukleophilen Angriff auf die Phosphorsäureesterbindung eines neuen Substrates beginnen.



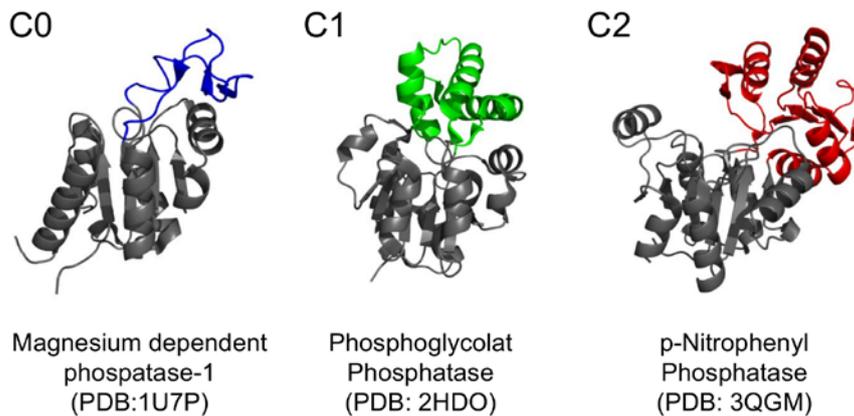
**Abbildung 2: Reaktionsmechanismus von HAD-Phosphatasen.**

Das Aspartat, welches den nukleophilen Angriff ausführt, ist in Rot gekennzeichnet, der phosphattragende Rest in Blau. Die Dephosphorylierung erfolgt über die Ausbildung eines Aspartylphosphat-Übergangszustandes. Details siehe Abschnitt 1.2.3. Abbildung in Anlehnung an (24).

#### **1.2.4 Aufbau und Funktion der Cap-Domänen bei HAD-Phosphatasen**

Um den oben beschriebenen katalytischen Mechanismus zu erfüllen, müssen nacheinander zwei gegensätzliche Bedingungen herrschen. Einerseits muss zunächst für eine effektive Katalyse Wasserausschluss gegeben sein, andererseits erfordert die darauffolgende Hydrolyse des Aspartylphosphates die Anwesenheit von Wasser (35). Um diese zwei unterschiedlichen Erfordernisse erfüllen zu können, wird postuliert, dass bei Phosphatasen, die eine Cap-Domäne besitzen (HAD-Phosphatasen vom Cap-Typ 1 oder 2), diese durch ihre Konformationsänderung zwischen einem offenen und geschlossenen Zustand den Wechsel zwischen Lösungsmittelausschluss und Öffnung des aktiven Zentrums für den Kontakt zum Lösungsmittel vermittelt (36-39). Bei HAD-Phosphatasen ohne Cap-Domäne vom sogenannten Cap-Typ 0 wird vermutet, dass das Substrat den Lösungsmittelausschluss übernimmt (30, 40) oder durch die Oligomerisierung die Untereinheiten diese Rolle wechselseitig übernehmen (41). Neben der Kontrolle der Lösungsmittelzugänglichkeit des aktiven Zentrums sorgen größere Cap-Domänen bei HAD-Phosphatasen auch für Substratspezifität, indem in der Cap-Domäne befindliche Reste mit der Abgangsgruppe des Substrats interagieren und somit für die Positionierung des Substrats entscheidend sind (38, 42-44).

Cap-Domänen werden nach Größe der Domäne und Position in der charakteristischen HAD-Grundstruktur (siehe Abbildung 1) in C0, C1 und C2-Cap-Domänen unterschieden (siehe Abbildung 3, für Vertreter der einzelnen Klassen siehe auch Anhang, Tabelle 8).



**Abbildung 3: Exemplarische Vertreter der verschiedenen Cap-Domänen bei HAD-Phosphatasen.**

Die bei HAD-Phosphatasen vorkommenden Cap-Domänen unterscheiden sich strukturell. In der Abbildung sind die Schleifendiagramme dreier exemplarischer Vertreter der Cap-Typen C0 (Magnesium dependent phosphatase-1, *Mus musculus*), C1 (Phosphoglycolat Phosphatase, *Lactobacillus plantarum*) und C2 (p-Nitrophenyl Phosphatase, *Archaeoglobus fulgidus*) dargestellt. Die jeweilige Cap-Domäne ist farbig (C0 blau, C1 grün, C2 rot) gegenüber der Kern-Domäne (grau) hervorgehoben.

C0-Cap-Domänen bestehen lediglich aus einfachen Schleifen oder  $\beta$ -Faltblättern zwischen den beiden  $\beta$ -Faltblättern des „flap“. C1-Cap-Domänen sind größer als C0-Cap-Domänen, ebenfalls direkt in das „flap“-Motiv nach dem ersten  $\beta$ -Faltblatt (siehe Abbildung 1) eingefügt und weisen einen  $\alpha$ -helikalen Aufbau auf. C2-Cap-Domänen sind an der Position zwischen dem dritten und vierten  $\beta$ -Faltblatt der rossmannoiden Faltung (siehe Abbildung 1) zu finden und bilden eine  $\alpha$ -Helix/ $\beta$ -Faltblatt-Sandwich-Struktur (23). Sie werden nach ihrer Topologie noch weiter in C2a- und C2b-Cap-Domänen unterschieden (22, 23). Neben den Vertretern, die eindeutig einer Klasse zuzuordnen sind (Abbildung 3), gibt es auch HAD-Phosphatasen, die wie zum Beispiel die Phosphorylcholin Phosphatase aus *Pseudomonas aeruginosa* (45) neben einer C1- nach dem ersten  $\beta$ -Faltblatt auch eine C2-Cap-Domäne zwischen dem dritten und vierten  $\beta$ -Faltblatt besitzen (sogenannte C1+C2-Cap-Domäne).

Während die Phosphatasen mit C0-Cap-Domäne das aktive Zentrum aufgrund ihrer sehr kleinen oder nicht vorhandenen Cap-Domäne nicht ausreichend gegenüber dem Lösungsmittel abschirmen können, um den nukleophilen Angriff zu ermöglichen, sind C1- und C2-Typ- Phosphatasen hierzu aufgrund der Größe ihrer Cap-Domäne in der Lage. Bei C0-Typ-Phosphatasen wie der

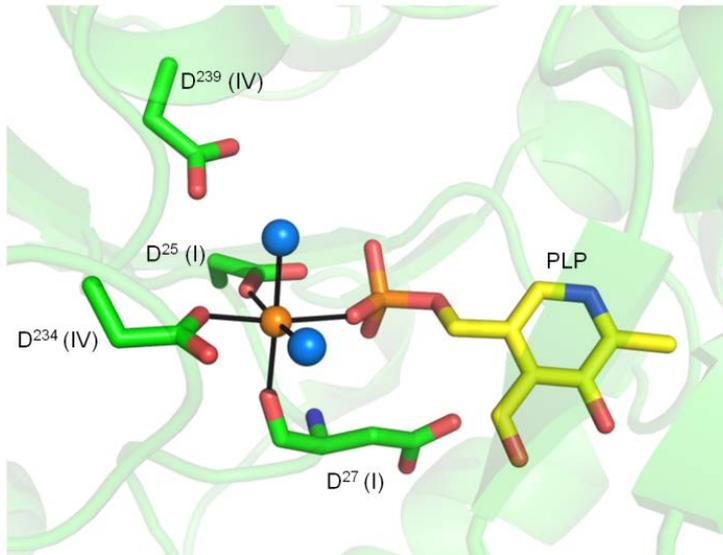
Polynukleotid-Kinase/Phosphatase PNKP und den RNA-Polymerase II C-terminalen Phosphatasen wird diese Eigenschaft der Cap-Domänen durch die vornehmlich makromolekularen Substrate übernommen (24). Eine alternative Strategie weist die KDN-9-P Phosphatase, ebenfalls eine HAD-Phosphatase vom C0-Typ, auf, die über eine kleine Schleife an der C0-Cap-Position zu Tetrameren oligomerisiert und dadurch die Abschirmung des aktiven Zentrums durch die jeweils gegenüberliegende Untereinheit erreicht (41). C1- und C2-Typ-Phosphatasen hingegen katalysieren meist Reaktionen niedermolekularer Substrate, wobei die Cap-Domäne die Abschirmung des aktiven Zentrums übernimmt. Ausnahmen dieser Relation stellen die HAD-Phosphatasen Eyes absent (EYA) und Chronophin dar, die trotz einer Cap-Domäne Makromoleküle wie Histon H2A.X im Fall von EYA (46-48) und Phosphocofilin im Fall von Chronophin (9, 49, 50) dephosphorylieren.

#### 1.2.4.1 Kofaktor Magnesium

Allen HAD-Phosphatasen ist gemeinsam, dass sie ein Magnesium-Ion im aktiven Zentrum gebunden haben (24). So hängt auch die enzymatische Funktionalität der HAD-Phosphatase Chronophin von Magnesium ab (51), das im aktiven Zentrum gebunden ist (50, 52). Einerseits kompensiert bei HAD-Phosphatasen die zweifach positive Ladung des Magnesiums ( $Mg^{2+}$ ) die negativen Ladungen der Phosphorylgruppe (53, 54), die sonst einen Angriff des ebenfalls negativ geladenen Nukleophils, des Aspartats, auf das Phosphoratom verhindern würden, andererseits kann sie die Sauerstoff-Phosphor-Bindung polarisieren und so über eine Verstärkung des Dipolcharakters den nukleophilen Angriff erleichtern (55).

Wie am Beispiel von murinem Chronophin gezeigt, das im Folgenden noch genauer charakterisiert wird, sorgt das  $Mg^{2+}$ -Ion durch Interaktion mit ebendiesen negativen Ladungen auch für eine korrekte Positionierung des Phosphats und somit des gesamten Substrats für den darauffolgenden nukleophilen Angriff durch das Aspartat aus Motiv I (29).

Aus dieser Bedeutung ergibt sich, dass auch das Magnesium-Ion selbst im aktiven Zentrum mittels koordinativer Bindung genau positioniert sein muss, was wiederum von den umgebenden Aminosäureresten abhängt (54). Bei der Koordination von Magnesium-Ionen in Proteinen stammen die freien Elektronenpaare für die koordinative Bindung allerdings häufig nicht nur von Atomen aus dem Aminosäureverband selbst, sondern auch von Atomen aus Wassermolekülen oder Phosphatresten (56). So interagieren am Beispiel von murinem Chronophin freie Elektronenpaare des Sauerstoffs aus den Carboxylgruppen des ersten Aspartats aus Motiv IV ( $Asp^{234}$ ) ebenso wie beide Aspartate aus Motiv I ( $Asp^{25}$  und  $Asp^{27}$ ) direkt mit dem Magnesium-Ion (siehe Abbildung 4). Das zweite Aspartat aus Motiv IV ( $Asp^{239}$ ) hingegen positioniert ein Wassermolekül. Zusammen mit dem freien Elektronenpaar des Sauerstoffs eines weiteren Wassermoleküls sowie einem Sauerstoff der Phosphorylgruppe des Substrats sind so insgesamt sechs Liganden in einem Oktaeder mit dem Magnesium-Ion im Zentrum angeordnet und an dessen Koordination beteiligt.



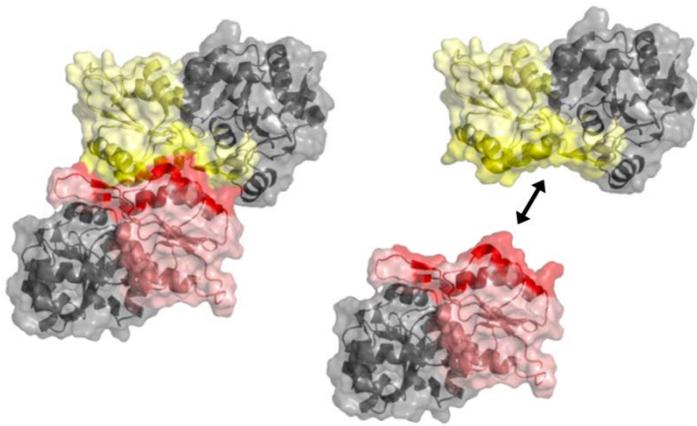
**Abbildung 4: Koordinierung des essentiellen Kofaktors Magnesium.**

Die Abbildung zeigt die Koordinierung des Magnesiums (orange Kugel) am Beispiel von murinem Chronophin (mCIN, PDB: 4BX3, (57)). Sauerstoffatome sind in dem Stäbchenmodell rot, Stickstoffatome blau und Wassermoleküle als blaue Kugeln dargestellt. Das Substrat Pyridoxalphosphat (PLP), das bei mCIN nicht kokristallisiert wurde, ist zur Veranschaulichung aus humanem Chronophin (PDB: 2P69, (50)) eingefügt. Die sechs Koordinationspartner des Magnesiums, die Sauerstoffatome aus den Carboxygruppen von D<sup>25</sup> und D<sup>234</sup>, aus der Peptidbindung von D<sup>27</sup>, der Phosphorylgruppe des PLP und von zwei Wassermolekülen, sind oktaedrisch um das Magnesiumatom angeordnet. Die Position des Phosphatrestes des PLP ist so für den nukleophilen Angriff des D<sup>25</sup> sehr günstig.

### 1.2.5 Chronophin als Vertreter der HAD-Phosphatasen

Chronophin ist eine zytosolisch vorkommende, homodimere Serin/Threonin-Phosphatase der HAD-Familie mit einer C2a-Typ-Cap-Domäne, einer Länge von 296 Aminosäuren beim Menschen (292 Aminosäuren beim murinen Ortholog) und einer molekularen Masse von 31,7 kDa (murines Chronophin 31,5 kDa) (50, 58, 59). Murines Chronophin weist mit humanem Chronophin auf Proteinebene eine Sequenzidentität von 91% auf (60). Die räumliche Struktur von Chronophin ist seit 2007 bekannt (50, 52) und kann mit dem in Abbildung 1 gezeigtem Schema für HAD-Phosphatasen beschrieben werden. Chronophin liegt als Homodimer vor und dimerisiert über eine Interaktion der Cap-Domänen der beiden identischen Untereinheiten, der Protomere (siehe Abbildung 5). Die Cap-Domäne von Chronophin ist wie für den C2a-Cap-Typ typisch zwischen dem dritten und vierten  $\beta$ -Faltblatt der Kerndomäne eingefügt (siehe auch Abbildung 1) und aus fünf parallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern im Zentrum

aufgebaut, die durch  $\alpha$ -Helices miteinander verbunden sind. Chronophin (Genname: Pyridoxalphosphat Phosphatase, *PDXP*) wurde bereits 1992 aus menschlichen Erythrozyten aufgereinigt und als Pyridoxal-5'-Phosphat (Vitamin B6) Phosphatase charakterisiert (58). Später wurde dann seine Cofilin-aktivierende Funktion sowie die Dephosphorylierung von SRC-3 (*steroid receptor coactivator*) beschrieben (9, 61). Chronophin wird beim Menschen ubiquitär exprimiert und zeigt die höchste Expression im Gehirn, gefolgt von Herz, Leber und Skelettmuskel (9).



**Abbildung 5: Darstellung der Homodimerisierung von murinem Chronophin.**

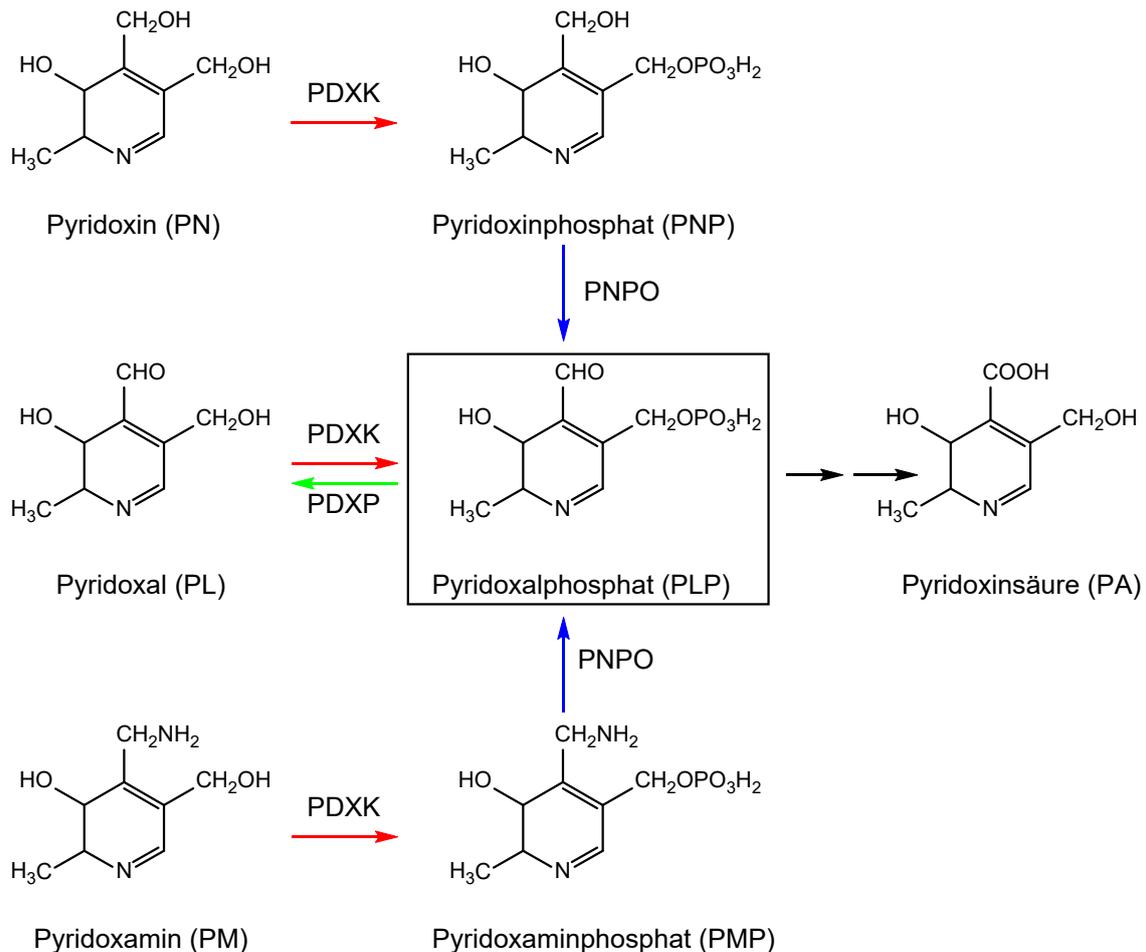
Die Abbildung zeigt links murines Chronophin (mCIN, PDB: 4BX3) als Bändermodell in Überlagerung mit einer Oberflächendarstellung. Die Kern-Domänen beider Protomere sind grau gefärbt, die Cap-Domäne von Protomer A in blasserem Rot, die Cap-Domäne von Protomer B in blasserem Gelb. Die Dimergrenzflächen sind intensiver gefärbt hervorgehoben. Im rechten Teil der Abbildung sind Protomer A und Protomer B in einer Explosionsdarstellung künstlich voneinander separiert dargestellt, um die Berührungspunkte der beiden Protomere ausschließlich über die Cap-Domänen zu verdeutlichen.

Im Folgenden soll näher auf die Funktion von Chronophin anhand seiner Substrate und deren biologischer Relevanz eingegangen werden.

## 1.3 Substrate von Chronophin

### 1.3.1 Pyridoxalphosphat

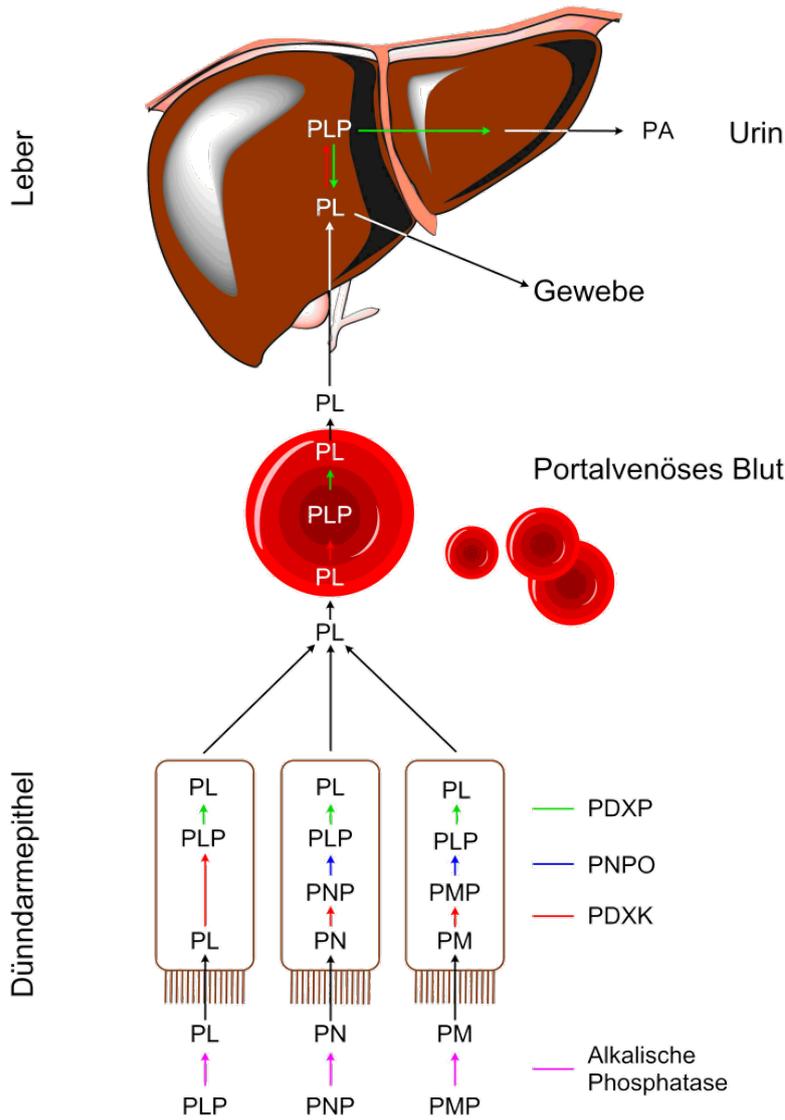
Chronophin dephosphoryliert Pyridoxalphosphat, die biologisch aktive Form von Vitamin B6. Der Begriff Vitamin B6 umfasst die unter dem Begriff Vitamere zusammengefassten, chemisch sehr ähnlichen Strukturen Pyridoxin (PN), Pyridoxal (PL) und Pyridoxamin (PM) sowie deren phosphorylierte Formen Pyridoxin-, Pyridoxal- und Pyridoxaminphosphat (PNP, PLP, PMP). Diese Vitamere können ineinander überführt und schließlich zu Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) phosphoryliert werden, der aktiven Form von Vitamin B6 (siehe Abbildung 6). PLP ist im menschlichen Körper als essentieller Kofaktor an über 140 enzymatischen Reaktionen wie Transaminierungen, Decarboxylierungen und Racemisierung von Aminosäuren beteiligt (62). PLP wird so unter anderem für den Glykogenabbau (63), die Hämbiosynthese (64), die Synthese von biogenen Aminen, wie zum Beispiel Dopamin (65), das als Neurotransmitter und Vorstufe für die Katecholaminsynthese dient, sowie für den Metabolismus der Mehrzahl an Aminosäuren oder für die Synthese von Sphingolipiden (66), speziellen Membranlipiden, benötigt. Erniedrigte Pyridoxalphosphatspiegel im menschlichen Blut wurden mit zahlreichen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Gut etabliert ist der Zusammenhang zwischen PLP-Mangel und dem Auftreten seltener Formen von Epilepsie bei Neugeborenen (67). Weiterhin scheinen niedrige PLP-Spiegel das Atherosklerose-Risiko zu erhöhen (68, 69), und ferner an der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms (70, 71), sowie am Auftreten von Depressionen (72, 73) beteiligt zu sein. Der Spiegel von Pyridoxalphosphat muss beim Menschen wie auch bei den meisten Tieren durch externe Zufuhr von Vitamin B6 gedeckt werden (74). Wo die Umwandlung der enteral resorbierten Vorstufen von Vitamin B6 in die aktive Form von Vitamin B6, PLP, letztlich stattfindet, ist bisher nicht eindeutig geklärt.



**Abbildung 6: Strukturformeln der Vitamin B6 Vitamere und ihre Umwandlung.**

Gezeigt sind die Strukturformeln der Vitamin B6-Vitamere Pyridoxin (PN), Pyridoxal (PL), Pyridoxamin (PM). Durch Phosphorylierung durch die Pyridoxinkinase (PDXK) werden zu Pyridoxin- (PNP), Pyridoxal- (PLP) und Pyridoxaminphosphat (PMP) umgewandelt. Die Pyridox(am)inoxidase (PNPO) katalysiert die Umwandlung von PNP und PMP zu PLP. PLP schließlich kann zu Pyridoxinsäure (PA), dem letztlich ausgeschiedenen Abbauprodukt metabolisiert werden oder wieder durch die Pyridoxalalphosphatphosphatase (PDXP) oder andere Phosphatasen zu PL dephosphoryliert werden.

Wie man sich die Aufnahme und Verteilung von Vitamin B6 im menschlichen Körper vorstellt, zeigt Abbildung 7. Die Leber besitzt grundsätzlich die nötige Enzymausstattung für die Konversionen der Vitamere (75), doch auch das Dünndarmepithel selbst scheint eine Rolle bei der Umwandlung von Pyridoxin und Pyridoxamin zu PLP zu spielen (76).



**Abbildung 7: Möglicher Metabolismus von Vitamin B6 beim Menschen.**

Im Dünndarmepithel werden die aus dem Darmlumen resorbierten Vitamin B6-Vorstufen Pyridoxal (PL), Pyridoxamin (PM) und Pyridoxin (PN) nach Dephosphorylierung ihrer phosphorylierten Vorstufen durch die Alkalische Phosphatase durch das Enzym Pyridoxal-Kinase (PDXK) wieder phosphoryliert. Pyridoxaminphosphat (PMP) und Pyridoxinphosphat (PNP) werden dann durch die Pyridox(am)inphosphat-Oxidase (PNPO) zu Pyridoxalphosphat (PLP) oxidiert. Die Pyridoxalphosphatphosphatase (PDXP) dephosphoryliert PLP zu PL, das ins Plasma abgegeben, dort in Erythrozyten aufgenommen wird und durch die PDXK erneut zu PLP phosphoryliert wird. Eine erneute Dephosphorylierung ermöglicht die Abgabe von PL ins Plasma. Auch in der Leber wird PLP durch die PDXK aus dem resorbierten PL synthetisiert und entweder erneut in den Blutstrom abgegeben, um die Zielgewebe zu erreichen oder schließlich zu 4-Pyridoxinsäure (4-PA) abgebaut, um über den Urin ausgeschieden zu werden. Bei hohen intrazellulären Konzentrationen von PM oder PN in den Enterozyten geht vermutlich ein Teil des PN oder PM auch direkt ins Plasma über und kann so über einen alternativen Weg die Leber erreichen ((76), nicht dargestellt). Abbildung modifiziert nach (76).

Im Blut kommt Vitamin B6 hauptsächlich als an Albumin gebundenes Pyridoxal (77, 78), intrazellulär in Erythrozyten als Pyridoxalphosphat oder an Hämoglobin gebunden vor (79-81) und erreicht so seine Zielgewebe wie beispielsweise den Skelettmuskel. Im Skelettmuskel liegt Pyridoxalphosphat zum Großteil an die Glycogenphosphorylase (82) sowie in der Leber an die dort zahlreichen PLP-abhängigen Enzyme gebunden vor (83).

Die Regulation der PLP-Konzentration im menschlichen Körper ist noch nicht vollständig verstanden. So wurde beispielhaft in Hepatozyten von Ratten gezeigt, dass neben der Produkthemmung der PNPO die Dephosphorylierung von PLP durch Phosphatasen und die Bindung von PLP an Proteine den intrazellulären Spiegel von PLP maßgeblich reguliert (83). Eine verminderte Aktivität der für PLP unspezifischen Alkalischen Phosphatase beispielsweise wie bei dem Krankheitsbild der Hypophosphatasie geht mit einem erhöhten PLP-Plasmaspiegel einher (84).

Neben der Alkalischen Phosphatase, die PLP unspezifisch dephosphoryliert (85) und mit der extrazellulären Dephosphorylierung von PLP zu PL (86) die Voraussetzung für Aufnahme von PLP nach intrazellulär schafft (78), existieren in Säugetieren weitere Phosphatasen beispielsweise in der Leber und Niere, die neben anderen Phospho-Substraten auch PLP dephosphorylieren (87, 88). Sie sind in ihrer Rolle für den PLP-Metabolismus noch nicht näher charakterisiert.

Während die zuvor erwähnten Phosphatasen PLP unspezifisch dephosphorylieren, existiert mit der Pyridoxalphosphatphosphatase PDXP auch eine für Vitamin B6 spezifische intrazelluläre Phosphatase. Die Dephosphorylierung von Pyridoxalphosphat in Erythrozyten, die Pyridoxal ins Plasma frei werden lässt, konnte *in vitro* gezeigt werden (79) und schließlich die Pyridoxalphosphatphosphatase PDXP als intrazelluläre Phosphatase identifiziert werden (58, 59). PDXP ist mit Chronophin identisch (9).

Vorläufige Ergebnisse aus Versuchen mit von unserer Arbeitsgruppe generierten Chronophin-Knockout-Mäusen zeigen stark erhöhte PLP-Spiegel in Gehirn, Skelettmuskel und Erythrozyten (89) und sprechen für die oben

postulierte Rolle von Chronophin als physiologische, intrazelluläre PLP-Phosphatase.

### 1.3.2 Phospho-Cofilin

Ein weiteres Substrat von Chronophin ist Phospho-Cofilin, ein an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligtes Protein.

Eukaryotische Zellen sind in ihrer Motilität und Fähigkeit zu Zellteilungen auf die Möglichkeit angewiesen, einerseits ihre Form flexibel zu verändern, auf der anderen Seite aber auch eben diese Form zu bewahren und gegen Einwirkungen von außen aufrecht zu erhalten. Strukturelles Korrelat dieser Eigenschaften ist das Zytoskelett, ein Endoskelett, das durch ständigen Auf- und Abbau eine große Flexibilität bietet. Seine Bestandteile lassen sich in drei Hauptgruppen unterteilen:

Das Mikrotubulsystem, das unter anderem ein Leitsystem für gerichteten Transport von Proteinen in der Zelle darstellt, die Intermediärfilamente, die sowohl in der Verankerung von Zell-Zell-Kontakten eine Rolle spielen als auch für viele Gewebstypen ein passives Stützgerüst bilden, und Aktinfilamente, deren dynamischer Auf- und Abbau an den randständigen Zellbereichen die Motilität einer Zelle ermöglicht. Aktinfilamente, sogenanntes F-Aktin, sind Polymere und bestehen aus globulären Aktinuntereinheiten, sogenanntem G-Aktin.

Das Wachstum von F-Aktin geschieht durch die Anlagerung von G-Aktin am sogenannten Plus-Ende, während am Minus-Ende G-Aktin abgespalten wird. Es entsteht so ein „Tretmühlenmechanismus“ (90, 91), der der Zelle eine schnelle Änderung ihrer Form erlaubt. Diese Prozesse sind für gerichtete Zellmotilität beispielsweise bei embryonaler Zellmigration oder Chemotaxis adulter Zellen aber auch für die Teilung proliferierender Zellen essentiell und spielen somit auch bei der Entstehung und Ausbreitung von Tumorzellen eine wichtige Rolle (92-97).

In der Regulation des Aktinzytoskeletts spielen die Proteine der *actin-depolymerizing factor* (ADF)/Cofilin-Familie (Cofilin-1, Cofilin-2 und ADF) eine grundlegende Rolle. Unter ihnen ist Cofilin-1 (im Folgenden mit „Cofilin“

bezeichnet) die in den Nicht-Muskel-Geweben von Säugetieren vorherrschende Isoform. Cofilin bewirkt bei niedrigen Konzentrationen die Spaltung von F-Aktin. Einerseits stehen hierdurch neue Plus-Enden zur Verfügung, andererseits werden durch Depolymerisierungsvorgängen an den ebenfalls neu entstandenen Minus-Enden neue G-Aktin-Untereinheiten frei, die für eine erneute Polymerisierung zu F-Aktin und Verzweigung des Aktinskeletts zur Verfügung stehen (49, 95, 98-102). Mittlere Cofilin-Konzentrationen scheinen Aktinfilamente zu stabilisieren (103), während bei hohen Cofilin-Konzentrationen wiederum Cofilin für die Nukleation und Polymerisierung von G-Aktin-Untereinheiten sorgt (104). Durch die geschilderten Prozesse wird die Anpassungsfähigkeit und Fähigkeit zur Neuorganisation des Aktinzytoskeletts sichergestellt und gleichzeitig die Komplexität der Regulation des Aktinzytoskeletts deutlich. Weitere noch nicht vollständig verstandene Funktionen von Cofilin sind seine Funktion als Chaperon für den Transport von Aktin in den Zellkern, wo es vermutlich Einfluss auf Gentranskription nimmt (105-107), und die Rolle von Cofilin in Apoptoseprozessen durch die Freisetzung von Cytochrom c (108, 109)

Die Aktivität von Cofilin hängt neben lokalen pH-Wert-Änderungen (110, 111) und der Interaktion mit Phosphatidylinositolbisphosphat (112, 113), einem für die Signaltransduktion wichtigen Phospholipid, auch von der Phosphorylierung eines Serins an Position 3 der Aminosäuresequenz ab (94, 114). Die Phosphorylierung durch Kinasen wie die LIM-Kinasen oder die sogenannten testikulären Protein Kinasen verhindert, dass Cofilin an Aktin bindet (114, 115), und sorgt so für eine Deaktivierung von Cofilin (116-118), während die Dephosphorylierung durch die Phosphatasen Slingshot (119), PP1 und PP2A (120) sowie Chronophin (9, 49, 121-124) die Funktion von Cofilin wiederherstellt.

Die Dephosphorylierung von Ser<sup>3</sup>-Phospho-Cofilin-1 durch Chronophin stellt eine Besonderheit dar. Während sich die Aktivität von HAD-Phosphatasen mit C2-Cap-Domänen wie oben erläutert vornehmlich auf niedermolekulare Substrate beschränkt, da die großen Cap-Domänen das aktive Zentrum abschirmen, stellt das Makromolekül Phosphocofilin mit etwa 19 kDa eine

Ausnahme dieser Beobachtung dar (24). Eine mögliche Erklärung für die Dephosphorylierung von Phospho-Cofilin trotz der Größe der Cap-Domäne könnte die endständige, N-terminale Phosphorylierung von Cofilin am Serin<sup>3</sup> sein. Wie in (125) gezeigt ist der N-Terminus einschließlich der Position des Serins von Cofilin unstrukturiert, möglicherweise flexibel und ist so vermutlich aufgrund seiner exponierten Lage für das katalytische Zentrum von Chronophin trotz der Größe des Cofilinmoleküls zugänglich.

Chronophin kommt so durch die Aktivierung von Cofilin eine wichtige Rolle in der Regulation des Aktinzytoskeletts und somit auch Zellmigration und Zellinvasivität zu (122, 126).

### 1.3.3 SRC-3

Chronophin nimmt über die Dephosphorylierung von SRC-3 (*steroid receptor coactivator-3*) auch Einfluss auf die Kernrezeptor-vermittelte Gentranskription.

Kernrezeptoren sind intrazelluläre Transkriptionsfaktoren, die durch die Bindung von Steroidhormonen, Schilddrüsenhormonen oder Retinsäure die Transkription von bestimmten Genen regulieren (127). Kernrezeptoren für Steroide wie Östrogene liegen als Monomere im Zytosol vor, homodimerisieren bei Bindung eines Steroidhormons (128, 129), werden in den Zellkern transportiert und binden dort an die DNA. Ein sogenannter *steroid receptor coactivator* (SRC) interagiert mit den an die DNA gebundenen Steroidhormonrezeptoren und rekrutiert weitere, sekundäre Coaktivatoren, was schließlich zur Gentranskription führt (130, 131). SRC-3 ist ein solcher Coaktivator, der aufgrund seiner Überexpression in Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen auch unter dem Namen *Amplified in breast cancer-1* (AIB-1) bekannt ist, daneben aber auch in Ovarialkarzinomen verstärkt exprimiert wird (132). SRC-3 interagiert nicht nur mit Kernrezeptoren, sondern auch mit anderen Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor κB* (NF-κB), *Signal transducer and activator of transcription* (STAT) und p53 (133-135). Die Aktivität von SRC-3 ist von posttranslationalen Modifikationen abhängig, unter anderem auch von Phosphorylierung (136). Die Kombinationsmöglichkeiten im Phosphorylierungsmuster an verschiedenen Aminosäuren von SRC-3 scheinen

so eine Möglichkeit darzustellen, die Spezifität der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen (136). Es konnte gezeigt werden, dass Chronophin SRC-3 dephosphoryliert und somit dessen transkriptionsinitierende Wirkung in Verbindung mit dem Östrogenrezeptor inhibiert (61).

## 1.4 Fragestellung

Chronophin ist eine Phosphatase, die eine wichtige Rolle in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts sowie im Vitamin B6-Metabolismus spielt.

Chronophin oligomerisiert ebenso wie weitere, funktionell sehr unterschiedliche Vertreter der derzeit strukturell charakterisierten humanen HAD-Phosphatasen über eine Interaktion spezieller Strukturelemente, der Cap-Domänen.

Die Konservierung der Cap-Domänen als gemeinsames Strukturelement und deren Interaktion wirft die Frage nach deren Bedeutung auf.

Während bei manchen oligomeren Vertretern der HAD-Phosphatasen die aktiven Zentren erst durch die Assoziation der Untereinheiten gebildet werden, zeigen die Strukturdaten von humanem Chronophin, dass jede Untereinheit ein eigenes aktives Zentrum besitzt, also grundsätzlich das Dimer aus zwei theoretisch auch eigenständig funktionellen Untereinheiten besteht. Andere Vertreter der HAD-Hydrolasen, bei denen ebenfalls jede Untereinheit ein eigenes aktives Zentrum besitzt, zeigen, dass unterschiedliche Oligomerisierungszustände große Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität haben können. Im Fall von Chronophin ist die Rolle der Homodimerisierung bisher ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war deshalb, diese Rolle der Homodimerisierung von Chronophin und ihre Auswirkung auf die enzymatische Aktivität zu analysieren. Es sollte mittels gezielt eingefügter Veränderungen der Aminosäuresequenz die Dimer-Grenzfläche gestört werden.

Anschließend sollten die Folgen einer gestörten Dimerisierung auf die katalytische Aktivität näher untersucht werden und der Versuch unternommen werden, mittels Proteinkristallisation Informationen über die räumliche Struktur der Chronophin-Mutante zu erhalten und so den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion des Enzyms besser zu verstehen. Die Erkenntnisse hierüber könnten schließlich helfen, durch die Rolle von Chronophin in der Zytoskelettregulation oder dem Vitamin B6-Metabolismus neue oder verbesserte Therapieansätze beispielsweise im Hinblick auf Zellteilung und -ausbreitung von Tumorzellen oder Ansprechen auf Chemotherapeutika zu entwickeln.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

Anti- Hase IgG, HRP-konjugiert	Ziege, polyklonal	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Anti- Chronophin/ PDXP (C85E3)	Hase, monoklonal	Cell Signaling Technologies, Danvers, CO, USA

#### 2.1.2 Bakterienstämme und Zellstämme

<i>E. coli</i> DH5α	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Stratagene, La Jolla, CA, USA
HEK AD-293	Stratagene, La Jolla, CA, USA

#### 2.1.3 Chemikalien

Acrylamid/ Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München
BIOMOL GREEN™	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
Chloramphenicol	AppliChem, Darmstadt

cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Tabletten	Roche, Mannheim
Coomassie® Brilliant Blue R 250	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Desoxyribonukleosidtriphosphate	NEB, Ipswich, MA, USA
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem, Darmstadt
Imidazol	Fluka Chemica, Neu- Ulm
Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Fluka Chemica, Neu- Ulm
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Kanamycinsulfat	AppliChem, Darmstadt
LB-Medium-Pulver (Luria/Miller)	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
2-N-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, München

Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Nonyl-phenoethoxylate (NP-40)	Sigma-Aldrich, München
Orange G	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol (PEG) 550 Monomethylether (MME)	Sigma-Aldrich, München
Pefabloc®	Roth, Karlsruhe
Pepstatin A	AppliChem, Darmstadt
Pepton	AppliChem, Darmstadt
Ponceau S	Sigma, St. Louis, MO, USA
Pyridoxal-5'-phosphat Hydrat	Sigma, St. Louis, MO, USA
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
SuperSignal® West Pico Luminol/Enhancer Solution	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
SuperSignal® West Pico Stable Peroxide Solution	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
SYPRO® Orange	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Tetracyclin-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Triethanolamine (TEA)	AppliChem, Darmstadt
Tris HCl	AppliChem, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe

Triton® X-100	Merck, Darmstadt
Trockenmilchpulver, fettfrei	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München

#### 2.1.4 Kits

Gateway® LR Clonase® II enzyme mix	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
QIAGEN® Plasmid <i>Plus</i> Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden

#### 2.1.5 Marker und Eichlösungen

1kb DNA Leiter	NEB, Ipswich, MA, USA, USA
Precision Plus Protein™ Standards Dual Core	Bio-Rad, München
Gel Filtration LMW Calibration Kit	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE
Blue Dextran	Sigma-Aldrich, München

#### 2.1.6 Oligonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg synthetisiert und mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) gereinigt.

### Tabelle 1: Erworbene Oligonukleotide

Primer Name (Orientierung)	Basensequenz (in 5' - 3' Richtung)
CIN A194K A195K (Forward)	GGT ACT GGA AGC CTG GCT AAG AAG GTG GAG ACA GCC TCG GG
CIN A194K A195K (Reverse)	CCC GAG GCT GTC TCC ACC TTC TTA GCC AGG CTT CCA GTA CC
CIN KpnI (Forward)	GGG GGT ACC ATG GCG CGC TGC GAG CGG
CIN XhoI (Reverse)	GGG CTC GAG TCA GTC CTC CAG CCC CTC CAT CAA G

### 2.1.7 Plasmide

#### Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Name	Länge	Antibiotikaresistenz	Hersteller
pcDNA3	5446 Basenpaare	Ampicillin Neomycin	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
pDEST™27	8123 Basenpaare	Ampicillin Chloramphenicol Neomycin	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
pENTR™3C	3756 Basenpaare	Kanamycin	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
pETM-11	6029 Basenpaare	Kanamycin	EMBL, Heidelberg
pG-Tf2	~8300 Basenpaare	Chloramphenicol	Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, JP

### 2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Device	MILLIPORE, Carrigtwohill, IRL
Baysilone-Paste	GE Bayer Silicones, Erkrath
CrystalQuick™ 96 Well, Sitting Drop Plate	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläser silikonisiert	Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA
Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Falcon™ Conical Tube 15 ml, 50ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon™ Polystyrene Round- Bottom Tube 14ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Neobject® Einmalkanülen 0,9x40mm	Dispomed, Gelnhausen
Nitrocellulose Membran Hybond C	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE
Nunclon™ Surface 6-, 96-well Zellkulturplatten	Nunc, Roskilde, DK
Nunclon™ Surface Zellkulturschalen	Nunc, Roskilde, DK
Nunclon™ Δ Surface 6-, 24-, 96-well Multischale	Nunc, Roskilde, DK
Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette G2 10k MWCO	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
TBC Einmalspritzen 1ml	Dispomed, Gelnhausen
Whatman™ 3MM Chr Blottingpapier	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.1.9 Zellkultur-Medium und Reagenzien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Pan Biotech, Aidenbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Pan Biotech, Aidenbach
L-Glutamin	Pan Biotech, Aidenbach
OPTI- MEM® I	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Penicillin/ Streptomycin	Pan Biotech, Aidenbach
<i>TransIT</i> ® - LT1 Transfection Reagent	Mirus Bio, Madison, USA
Trypsin/EDTA	Pan Biotech, Aidenbach

#### **2.1.10 Materialien und verwendete Software der Rasterkraftmikroskopie**

Asylum Research Software	Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA
IGOR Pro Plattform	WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, OR; USA
ImageSXM <a href="http://www.ImageSXM.org.uk">http://www.ImageSXM.org.uk</a>	Steve Barrett, University of Liverpool, UK
Mica	SPI Supplies, Structure Probe, West Chester, PA, USA
Origin Version 6.8	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA

## 2.1.11 Technische Geräte

### 2.1.11.1 Proteinexpression und -aufreinigung

ÄKTApurifier(P-900, UV-900, pH/C-900, Frac-950)	GE Healthcare Life Sciences,Uppsala, SE
ISF-1-V Schüttler	Adolf Kühner AG, Birsfelden, CH
Microfluidizer Processor M-110 P	Microfluidics, Newton, MA, USA
Sonopuls HD 200 Ultraschall Homogenisator	Bandelin, Berlin

### 2.1.11.2 Chromatographie

Glutathione Sepharose™ 4B	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE
HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 pg	GE Healthcare Life Sciences,Uppsala, SE
HisTrap™ HP 1ml Säule	GE Healthcare Life Sciences,Uppsala, SE
Micro Bio-Spin™ Chromatographiesäulen	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Poly Prep® Chromatographiesäule	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Superdex™ 200 10/300 GL	GE Healthcare Life Sciences,Uppsala, SE
TALON® Metal Affinity Resin	Clontech, Mountain View, CA, USA

### 2.1.11.3 Messgeräte

Beckman Optima XL-I Analytische Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
EnVision™ 2104 multilabel reader	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Molecular Force Probe (MFP)-3D-BIO	

NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer

PEQLAB

Biotechnologie,

Erlangen

pH-Elektrode BlueLine 14 pH

Schott, Mainz

Rasterkraftmikroskop

Asylum Research,  
Santa Barbara, CA,  
USA

#### **2.1.11.4 Diverse**

accu-jet® pro Pipettierhelfer

Brand, Wertheim

AxioCam MRC Mikroskopkamera

Zeiss, Oberkochen

Biometra TFX 35 M UV-Schirm

Biometra, Göttingen

C1000™ Thermalcycler

Bio-Rad Laboratories,

Hercules, CA, USA

E.A.S.Y. Win32 Geldokumentationssystem

Herolab, Wiesloch

Eppendorf Research Pipetten

Eppendorf, Hamburg

Heraeus BBD 6220 CO<sub>2</sub>-Inkubator

Thermo Fisher

Scientific, Waltham,  
MA, USA

Hettich Universal 16 R Zentrifuge

Hettich, Tuttlingen

HoneyBee 963 Kristallisationsroboter

Zinsser Analytic,

Frankfurt

ImageQuant LAS 4000

GE Healthcare Life

Sciences, Uppsala, SE

KL 2500 LCD Mikroskoplichtquelle

Zeiss, Oberkochen

Mini -PROTEAN® Tetra Cell Elektrophoresesystem

Bio-Rad, München

PowerPac Basic, PowerPac HC Spannungsquelle

Bio-Rad, München

SteREO Discovery.V12 Mikroskop

Zeiss, Oberkochen

Thermomixer comfort 1,5 ml

Eppendorf, Hamburg

Trans-Blot® SD Semi-Dry Elektrophoresekammer

Bio-Rad, München

Unimax 1010 Plattformschüttler

Heidolph, Schwabach

VM20 Vacuum Manifold

Sigma-Aldrich,

München

**2.1.12 Puffer und Lösungen****2.1.12.1 Immunoblot****Anodenpuffer I**

Aqua dest.	
Tris	0,3 M
Methanol	40 % (v/v)

**Anodenpuffer II**

Aqua dest.	
Tris	25 mM
Methanol	40 % (v/v)

**Antikörperverdünnungslösung (pH 7,4)**

Aqua dest.	
HEPES	10 mM
NaCl	0,5 M
BSA	1 % (w/v)
Tween-20	0,2 % (w/v)
NaN <sub>3</sub>	0,02 % (w/v)

**Blotto Puffer**

Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
NaCl	80 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
Milchpulver	5% (w/v)
NP-40	0.2%

**Kathodenpuffer**

Aqua dest.	
Tris	25 mM
Glycin	40 mM
Methanol	10 % (v/v)

## 2.1.12.2 SDS-PAGE

### Laemmli-Puffer 4x (pH 6,8)

Aqua dest.	
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
Glycerol	20 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	5 % (v/v)
Tris-HCl	62,5 mM

### Sammelgel

Aqua dest.	
(Bis-)/Acrylamid	4 % (v/v)
APS	0,05% (v/v)
TEMED	0,13 %
Tris-HCl (pH 6,4)	125 mM

### Trenngel

Aqua dest.	
(Bis-)/Acrylamid	12 % (v/v)
APS	0,08 % (v/v)
TEMED	0,08 % (v/v)
Tris-HCl (pH 8,8)	375 mM

### Laufpuffer (10x)

Aqua dest.	
Tris	250 mM
Glycin	2 M
SDS	10% (w/v)

### 2.1.12.3 Färbelösungen

#### Coomassie® Färbelösung

Aqua dest.	
Coomassie® Brilliant Blue R 250	0,1 % (w/v)
Essigsäure	10% (v/v)
Ethanol	40% (v/v)

#### Coomassie® Entfärbelösung

Aqua dest.	
Ethanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

#### Ponceau S Lösung

Aqua dest.	
Essigsäure	5% (v/v)
Ponceau S (w/v)	0.2% (w/v)

### 2.1.12.4 Proteinaufreinigung

#### Lyse-Puffer für *E.coli* (pH 7,4)

Aqua dest.	
TEA	100 mM
NaCl	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Imidazol	20 mM
DNase I	50µg/ml
cOmpete, EDTA-free Protease Inhibitor Tablette	

#### Wasch-Puffer für *E.coli* (pH 7,4)

Aqua dest.	
TEA	50 mM
NaCl	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Imidazol	20 mM

**Elutionspuffer für *E.coli* (pH 7,4)**

Aqua dest.	
TEA	50 mM
NaCl	250 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Imidazol	500 mM

**Lyse-Puffer für HEK AD-293**

Aqua dest.	
TEA	50 mM
NaCl	250 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Triton X-100	1% (v/v)
Leupeptin	10 µg/ml
Pepstatin A	10 µg/ml
Aprotinin	50 µg/ml
Pefabloc®	1 mM

**Wasch-Puffer für HEK AD-293**

Aqua dest.	
TEA	50 mM
NaCl	250 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Triton X-100	1% (v/v)

**TNM (pH 7,4)**

Aqua dest.	
TEA	50 mM
NaCl	250 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

## 2.1.12.5 DNA-Präparation und Analyse

### S1-Lösung (pH 8,0)

Aqua dest.	
EDTA (pH 8,0)	10 mM
RNAseA	100µg/ ml
Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM

### S2-Lösung

Aqua dest.	
NaOH	200 mM
SDS	1 % (v/v)

### S3-Lösung (pH 5,2)

Aqua dest.	
Kalium-Acetat	3M
Essigsäure (pH-Wert-Einstellung)	

### SOC-Medium (pH 7,0)

Aqua dest.	
D-Glucose	20 mM
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
KCl	2,5mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
NaCl	8,6 mM
Pepton	2 % (w/v)

### 50x TAE-Puffer (pH 8,5)

Aqua dest.	
Tris-Base	2 M
Essigsäure	950 mM
EDTA	50 mM

### Orange G Loading Farbstoff (5x)

Aqua bidest.	
Glycerol	15 % (v/v)
Orange G	0,2 % (w/v)

### 2.1.12.6 Zellkulturmedien

#### Vollmedium für HEK AD-293

DMEM	
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Glucose	4,5 g/l
FCS	10 % (v/v)
L-Glutamin	1 % (v/v)

#### Einfriermedium für HEK AD-293

Vollmedium für HEK AD-293	
DMSO	10 % (v/v)

### 2.1.13 Enzyme, kommerzielle Puffer und Inhibitoren

#### 2.1.13.1 Restriktionsenzyme

Dpn-I	NEB, Ipswich, MA, USA
Kpn-I	NEB, Ipswich, MA, USA
Xho-I	NEB, Ipswich, MA, USA

#### 2.1.13.2 Ligase

T4-Ligase	NEB, Ipswich, MA, USA
-----------	-----------------------

#### 2.1.13.3 Polymerase

Platinum® Pfx DNA Polymerase	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
------------------------------	--

#### 2.1.13.4 Andere Enzyme

DNaseI	AppliChem, Darmstadt
Lysozym	Roth, Karlsruhe

RNase A	QIAGEN, Hilden
TEV Protease	EMBL, Hamburg
<b>2.1.13.5 Kommerzielle Puffer</b>	
10 x Puffer für T4 DNA Ligase	NEB, Ipswich, MA, USA
NEBuffer 1	NEB, Ipswich, MA, USA
<b>2.1.13.6 Kristallisationsscreens</b>	
Crystal Screen 1 & 2	Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA
Index	Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA
neXtal PEG Suite	QIAGEN, Hilden
neXtal pHClear Suite	QIAGEN, Hilden
OptiMix-3	Fluidigm, San Francisco, CA, USA
Protein Complex Suite	QIAGEN, Hilden
Wizard 1& 2	Rigaku, Bainbridge Island, WA, USA
<b>2.1.14 Software und Webseiten</b>	
CCP4	(137)
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
ImageJ 1.45s	Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
iMosflm	(138)
Phaser crystallographic software	(139)
PHENIX	(140)
PISA, <a href="http://www.ebi.ac.uk/pdbe">http://www.ebi.ac.uk/pdbe</a>	(141)
PROTPARAM <a href="http://web.expasy.org/protparam">http://web.expasy.org/protparam</a>	(142)

PyMol Version 1.3

Schrödinger, LLC,  
Portland, OR, USA

The Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org>

(143)

SCALA

(144)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturmethoden mit HEK AD-293-Zellen

#### 2.2.1.1 Auftauen der HEK AD-293-Zellen

Um die in DMEM mit FCS 10 % (v/v), DMSO 10 % (v/v) eingefrorenen HEK AD-293-Zellen aufzutauen, wurde die Zellsuspension zunächst in einem Wasserbad bei 37 °C angetaut und in noch teilweise gefrorenem Zustand mit 10 ml Vollmedium (DMEM mit Glukose 4,5 g/l, FCS 10 % (v/v), Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, L-Glutamin 1 % (v/v)) vermischt. Anschließend wurde nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 500 rpm an einer Hettich Universal 16 R Zentrifuge der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden in etwa 5-6 ml frischem DMEM mit FCS 10 % (v/v), Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, L-Glutamin 1 % (v/v) auf einer Nunclon™ Surface Zellkulturschale von 6 cm Durchmesser ausgesät. Bei 37 °C, 7 % CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Umgebungsluft und 95 % Luftfeuchtigkeit benötigten die Zellen in der Regel 24-48 Stunden im Inkubator, um eine völlige Konfluenz zu erreichen.

#### 2.2.1.2 Transfektion in HEK AD-293-Zellen

HEK AD-293-Zellen wurden bei einer Dichte von  $4,5 \times 10^3$  Zellen pro Well in einer Nunclon™ Surface 6-Well Zellkulturplatte ausgesät und 18-24 Stunden in 2 ml DMEM Zellkulturmedium mit FCS 10 % (v/v), Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml L-Glutamin 1 % (v/v) pro Well kultiviert. Für jedes Well wurden insgesamt 1 µg DNA mit 250 µl OPTI-MEM® I und 3 µl *TransIT*® - LT1 Transfection Reagent für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Mix wurde daraufhin tropfenweise in die Wells pipettiert und die Zellkulturplatte leicht geschwenkt, um eine gleichmäßige Durchmischung zu erreichen. In der

Folge wurden die Zellkulturplatten für eine Zeit von 18-24 Stunden bei 37°C inkubiert.

### **2.2.1.3 Zellaufschluss der HEK AD-293-Zellen**

Die transfizierten HEK AD-293 Zellen wurden am darauffolgenden Tag zunächst unter dem Mikroskop auf ihre Adhäsion und somit indirekt Vitalität geprüft. Dann wurden die Zellen pro Well vorsichtig in 750 µl TNM-Puffer (TEA 50 mM, NaCl 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit je 250 µl Lyse-Puffer (TEA 50 mM, NaCl 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Triton X-100 1 % (v/v), Leupeptin 10 µg/ml, Pepstatin A 10 µg/ml, Aprotinin 50 µg/ml, Pefabloc® 1 mM) überschichtet, kurz auf Eis inkubiert, abgeschabt, in Lyse-Puffer aufgenommen und bei 4°C für 15 Minuten langsam in einem Überkopfschüttler inkubiert. Um den Zelldetritus vom Zelllysat zu trennen, wurden die Proben daraufhin 15 Minuten lang bei 15871 x g zentrifugiert. Von dem Überstand wurden je 20 µl abgenommen, um später die Expression der Genprodukte überprüfen zu können.

### **2.2.2 GST-Pulldown-Assay**

Der GST-Pulldown ist ein Verfahren, mit dem Protein-Protein-Interaktionen in Zelllysaten nachgewiesen werden können (145). Grundlage der Methode ist, dass durch die Transfektion bestimmter DNA-Vektoren in den Zelllysaten Fusionsproteine vorhanden sind, bei denen das zu untersuchende Protein an eine Glutathion-S-Transferase, kurz GST, gekoppelt ist. Man spricht hierbei von einem sogenannten GST-Tag (engl. *tag*: Anhänger, Etikett). Glutathion-S-Transferasen sind Enzyme, die eine Kopplung von organischen Verbindungen an Glutathion, ein Tripeptid aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin katalysieren. Die hohe Affinität von GST zu Glutathion (GSH) erlaubt dann im Sinne einer Affinitätschromatographie das zu untersuchende Protein über sogenannte Glutathion Sepharose Beads, kleine, Glutathion tragende Sepharose-Kügelchen zu binden und somit anzureichern. Im Falle einer Protein-Protein-Interaktion zwischen dem Protein mit dem GST-Tag und einem weiteren Protein, das diesen GST-Tag nicht aufweist, kann auch letzteres angereichert und nachgewiesen werden. Als Expressionsvektoren wurden

pDEST™27-Vektoren für die Expression N-terminal mit einem GST-Tag versehener Proteine und pcDNA3 für die Expression ungekoppelter Proteine verwendet.

Pro Well wurden 15 µl Glutathione Sepharose™ 4B Kügelchen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt und jeweils drei Mal mit je 1 ml Waschpuffer (TEA 50 mM, NaCl 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Triton X-100 1% (v/v)) gewaschen, indem vorsichtig Waschpuffer auf die Beads pipettiert wurde und nach einer jeweils 2,5-minütigen Zentrifugation bei 244 x g der Überstand abgenommen wurde. Im Anschluss wurden die Kügelchen dann mit den Lysaten für 1,5 Stunden in einem Überkopfschüttler inkubiert. Um die Bindung der ungekoppelten Proteine an die Kügelchen zu überprüfen, wurden die Lysate für 2,5 Minuten bei 244 x g zentrifugiert und je 20 µl des Überstands zur späteren Analyse abgenommen. Daraufhin wurden die erneut resuspendierten Kügelchen auf zuvor mit 1 ml Waschpuffer äquilibrierte Polyacrylamid Chromatographiesäulen aufgetragen und auf einer Vakuumpumpe vier Mal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen. In der Folge wurden die Säulen mit je 30 µl zweifach konzentriertem, kochendem Laemmli-Puffer überschichtet und die gebundenen Proteine direkt im Anschluss für 1,5 Minuten bei 15871 x g in 1,5 ml Reaktionsgefäße eluiert und jeweils 20 µl der gewonnenen Eluate mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.3) auf 12%-Polyacrylamidgelen analysiert, genauso wie die zuvor je 20 µl abgenommenen Lysat- und Überstandskontrollen. Durch Western-Blotting (siehe 2.2.4) wurden die Banden anschließend qualitativ und quantitativ analysiert.

### **2.2.3 SDS-PAGE**

Mittels einer SDS-PAGE (Sulfododecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) können Proteine nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden. Die zugrunde liegende Idee besteht darin, dass geladene Teilchen in einem elektrischen Feld abhängig von Größe, Ladung und Form unterschiedlich weit wandern. Um die Einflussfaktoren Ladung und Form vernachlässigen zu können, wurde den Proteinproben zunächst Laemmli-Puffer nach (146) zugegeben und sie wurden dann für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Neben der Hitze sorgt auch der Laemmli-Puffer für eine Denaturierung der Proteinstruktur

und Unterbindung von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Laemmli-Puffer enthält zu diesem Zweck neben SDS auch  $\beta$ -Mercaptoethanol, was mögliche Disulfidbindungen reduziert und somit zur Denaturierung der Tertiärstruktur beiträgt. SDS wiederum lagert sich als amphiphiles Detergenz in großer Zahl mit seiner hydrophoben Alkylgruppe an die Proteine an und maskiert mittels seines hydrophilen, anionischen Sulfatrestes die Eigenladung der Proteine. Somit erhalten die Proteine ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis und bewegen sich in einem angelegten elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Die siebartige Struktur des quervernetzten Polyacrylamids im Trenngel sorgt schließlich für eine Auftrennung nach ihrer Größe, indem kleine Proteine schneller als größere Proteine durch die Poren des Polyacrylamids wandern.

Um die Proben nach diesem Prinzip nach ihrer Größe auftrennen zu können, wurden in den Versuchen dieser Arbeit kommerzielle Elektrophoresesysteme mit den zugehörigen Spannungsquellen verwendet.

Zunächst wurde eine Spannung von 70 mV angelegt, bis die Proben die markierte Front zwischen Sammelgel und Trenngel erreichten. Entlang dieser Strecke erfolgte die Konzentrierung durch die unterschiedlichen pH-Werte des Sammelgels (pH=6,4) und des Trenngels (pH 8,8). Mit Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 160 mV erhöht und bis zum kompletten Durchlauf der Bromphenolblaubande angelegt. Mittels Precision Plus Protein™ Standards Dual Core, einem ebenfalls mitlaufenden Marker bestehend aus einer Mischung von rekombinanten Proteinen bekannter molekularer Masse, konnte dann die molekulare Masse aus den im anschließenden Western-Blot (siehe 2.2.4) oder in der Coomassie-Färbung (siehe 2.2.7) sichtbar werdenden Banden abgeleitet werden.

#### **2.2.4 Western-Blot**

Als Western-Blot wird die elektrophoretische Übertragung der in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran beispielsweise aus Nitrozellulose, bezeichnet. Die für diese Arbeit angefertigten Western-Blots wurden in der Semi-Dry Technik bei einer

angelegten Spannung von maximal 25 V und konstant gehaltenen Stromstärke von 70 mA für 30 Minuten nach unten stehendem Aufbau durchgeführt. Die negativ geladenen Proteine treten so in die Nitrozellulosemembran über, wo sie immobilisiert für weitere Analyse zugänglich bleiben.



#### **Abbildung 8: Schema des Aufbaus beim Western-Blot in Seitenansicht**

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der Filterpapiere, sowie rechts die Puffer, in denen sie zuvor getränkt wurden. Die Nitrozellulosemembran wurde zuvor mit H<sub>2</sub>O benetzt und in Anodenpuffer II inkubiert, das SDS-Gel in Kathodenpuffer.

#### **2.2.5 Ponceau-Färbung**

Ponceau S bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine. Um den Erfolg des Western-Blots, also die Übertragung auf die Membran zu evaluieren, wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Blotten für etwa 1 Minute in Ponceau S Lösung gefärbt und anschließend in Wasser gewaschen, mittels eines Flachbettscanners digitalisiert und archiviert.

#### **2.2.6 Immundetektion**

Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran für 30 min bei Raumtemperatur in Blotto-Puffer geschwenkt, um durch die darin im Milchpulver enthaltenen Proteine unspezifische Bindungsstellen für die nachfolgende Antikörperinkubation zu blockieren. Danach wurde die Membran gründlich mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und für 24 Stunden mit dem Primärantikörper Anti- Chronophin/ PDXP (C85E3) in einer Verdünnung von 1:1000 in Antikörperverdünnungslösung bei 4 °C unter konstanter Rotation inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran erneut mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, um unspezifisch oder nicht gebundene Antikörper zu entfernen, und für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur unter konstanter Rotation mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten anti-Hase-IgG-Sekundärantikörper in einer

Verdünnung von 1:10000 in Antikörperverdünnungslösung inkubiert und anschließend erneut mit dH<sub>2</sub>O gewaschen.

Zur Entwicklung wurden je 800 µl SuperSignal® West Pico Stable Peroxide Solution und Luminol/Enhancer Solution miteinander vermischt und für etwa zweieinhalb Minuten auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert hierbei die Chemolumineszenzreaktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Luminol. Das Chemolumineszenzsignal wurde mit ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) registriert und mit der Software ImageJ densitometrisch ausgewertet.

### **2.2.7 Coomassie®-Färbung**

Mittels der Coomassie-Färbung können Proteinbanden in Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht werden (147). Hierzu wurden die Gele für etwa 30 Minuten in Coomassie® Färbelösung gelegt und kontinuierlich bewegt. Anschließend erfolgte das Entfärben der Gele zur besseren Abgrenzbarkeit der Proteinbanden gegenüber dem Hintergrund in Coomassie® Entfärbelösung für etwa 18 Stunden bei kontinuierlicher Bewegung.

### **2.2.8 Klonierung**

#### **2.2.8.1 Ortsspezifische Mutagenese**

Die Methode der ortsspezifischen Mutagenese erlaubt es, einzelne Aminosäuren eines Genprodukts gezielt zu verändern. Die Mutationen werden mittels PCR auf DNA-Ebene eingefügt. Hierbei tragen zwei zueinander komplementäre, zuvor synthetisierte Primer-Oligonukleotide die veränderte Basensequenz (Mutation), die für den Aminosäureaustausch kodiert. Die veränderte Basensequenz wird zu beiden Seiten von etwa 20 weiteren Basen flankiert, die komplementär zu den Basen der Zielsequenz des ursprünglich zu verändernden Gens sind. Diese Oligonukleotide, die bis auf die Mutation mit der DNA-Matrize übereinstimmen, können so an die Zielsequenz der DNA-Matrize binden. Als Matrize diente aus dem Gehirn adulter Mäuse gewonnene, murine, unmutierte CIN WT-DNA, die zuvor in pETM-11 und pcDNA3 kloniert worden war. Im Fall der Mutagenese in pETM-11 lag das unmutierte CIN Plasmid in

einer Konzentration von 25 ng, bei der analog durchgeführten Mutagenese in pcDNA3 von 50 ng je 50 µl Reaktionsvolumen vor. Für die Mutagenese A194K/A195K wurden die Primer A194K/A195K forward (GGT ACT GGA AGC CTG GCT AAG AAG GTG GAG ACA GCC TCG GG) und A194K/A195K reverse (CCC GAG GCT GTC TCC ACC TTC TTA GCC AGG CTT CCA GTA CC) in einer Endkonzentration von je 0,5 µM in 50 µl Reaktionsvolumen verwendet. Als Polymerase diente Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen™) mit Pfx Buffer und Pfx Enhancer gemäß den Herstellerangaben sowie, ebenfalls von Invitrogen™, MgSO<sub>4</sub> in einer Endkonzentration von 1 mM und dNTPs in einer Endkonzentration von 0,3 mM. Sämtliche Polymerasekettenreaktionen wurden in einem PCR Thermocycler durchgeführt. Als Voraussetzung für eine erfolgreiche Mutagenese müssen sowohl die Primer-Oligonukleotide als auch die DNA-Vorlage als Einzelstrang-DNA vorliegen. Dies wird durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 95 °C erreicht. Ein darauf folgendes Absenken der Reaktionstemperatur erlaubt dann die Bindung der Primer an die DNA-Matrize, in diesem Fall zirkuläre Plasmid-DNA. Die Länge der Primer ermöglicht daraufhin der ebenfalls in das Reaktionsgemisch zugegebenen DNA-abhängigen-DNA-Polymerase, ausgehend von den Primer-Oligonukleotiden einen zur DNA-Matrize komplementären Nukleotidstrang zu synthetisieren. Durch sogenanntes Thermocycling, nämlich das mehrfache Durchlaufen der für die Reaktionsschritte notwendigen Temperaturveränderungen, entstehen dann ähnlich wie bei einer Polymerasekettenreaktion doppelsträngige Plasmide, die die Mutation tragen.

**Tabelle 3: Thermozyklus der PCR bei der ortsspezifischen Mutagenese**

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95 °C	3 min	1
95 °C	1 min	} 20
58 °C	1 min	
68 °C	7,5 min	
68 °C	5 min	1

Um die neu entstandenen Plasmide, die sich ja nur in wenigen Basenpaaren von der DNA-Matrize des ursprünglichen Plasmids unterscheiden, selektionieren zu können, wurden nach Ende der PCR je Reaktionsvolumen

1 µl DpnI zugegeben und zunächst für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert, darauf nach erneuter Zugabe von 0,5 µl DpnI für weitere 2 Stunden. DpnI erkennt und schneidet als Endonuklease die Sequenz GATC nur dann, wenn das Adenosin methyliert ist. Während das Plasmid, das als Matrize diente, in *E.coli* DH5α methyliert worden ist, sind die neu *in vitro* synthetisierten Stränge, die die Mutation tragen, unmethyliert. Somit werden nur die Matrizen von DpnI verdaut, die neu synthetisierten Plasmide, die die Mutation tragen, hingegen nicht.

Die erfolgreiche ortsspezifische Mutagenese wurde nach einer DNA-Präparation (siehe 2.2.10, 2.2.11) durch Sequenzierung nach der Cycle-Sequenzierung-Methode durch Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg validiert.

Durch die auf dem pETM-11 Vektor liegende Kodierung eines sechsfachen Histidinrestes N-terminal des CIN WT-Gens waren sowohl CIN WT als auch das Genprodukt der aus der Mutagenese entstandenen Mutation A194K/A195K in pETM-11 am N-Terminus mit sechs Histidinresten, dem sogenannten (Hexa-)His-Tag verbunden.

#### **2.2.8.2 PCR zur Insertion neuer Restriktionsschnittstellen**

Um die CIN Mutante A194K/A195K in pENTR™3C klonieren zu können, mussten zunächst neue Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsendonukleasen KpnI und XhoI eingefügt werden.

Hierzu wurde zunächst eine PCR nach Herstellerangaben der verwendeten Enzyme in 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Als Matrize diente pETM-11 mCIN A194K/A195K mit 50 ng in je 50 µl Reaktionsvolumen. Mittels der Primer CIN KpnI Forward (GGG GGT ACC ATG GCG CGC TGC GAG CGG) und CIN XhoI Reverse (GGG CTC GAG TCA GTC CTC CAG CCC CTC CAT CAA G) wurden so direkt vor und nach der für Chronophin A194K/A195K kodierenden Basenfolge Restriktionsschnittstellen für die Enzyme KpnI und XhoI eingefügt. Anschließend wurden die Matrizen mittels DpnI (siehe 2.2.8.1) verdaut, die PCR-Produkte in einer Agarose-Gelelektrophorese und anschließenden Gelelektrophorese (siehe 2.2.12) aufgereinigt und je 4 µl des Gelelektrophoreseeluates als Matrize in einer erneuten PCR mit den Primern CIN KpnI Forward und CIN XhoI Reverse amplifiziert.

**Tabelle 4: Thermozyklus der PCR zur Insertion der Restriktionsschnittstellen in mCIN A194K/A195K**

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95 °C	3 min	1
95 °C	1 min	} 30
60 °C	1 min	
68 °C	1,5 min	
68 °C	5 min	1

### 2.2.8.3 Restriktionsverdau

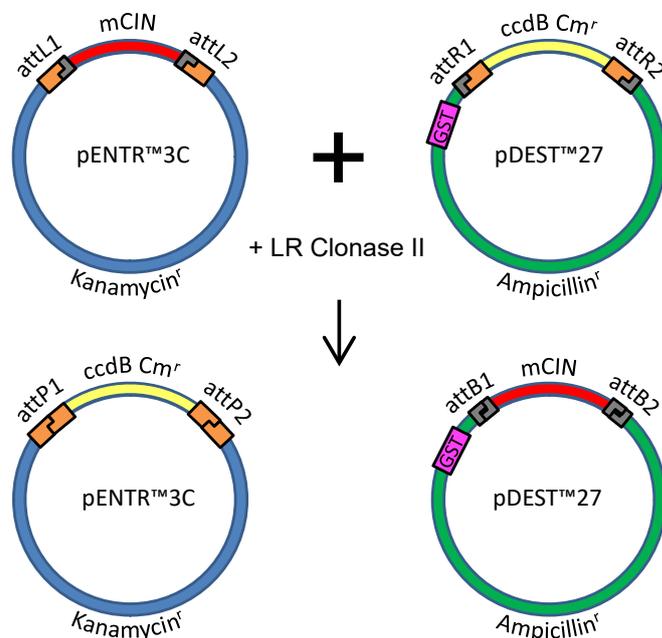
Die in pETM-11 mCIN A194K/A195K inserierten (siehe 2.2.8.2) sowie in der Multiple Cloning Site von pENTR™3C vorhandenen Restriktionsschnittstellen für XhoI (Erkennungssequenz  $5' \text{C} \nabla \text{TGGA} \text{G} 3'$  /  $3' \text{G} \text{AGCT} \nabla \text{C} 5'$ ) und KpnI (Erkennungssequenz  $5' \text{G} \text{GTAC} \nabla \text{C} 3'$  /  $3' \text{C} \nabla \text{CATG} \text{G} 5'$ ) ermöglichten nun einen Verdau mit ebendiesen Restriktionsendonukleasen. Hierzu wurden 25 µl PCR-Produkt mit 6 U KpnI und 6 U XhoI, 5 µl NEBuffer 1 sowie 5 µl BSA (10x) in insgesamt 50 µl bei 37 °C verdaut. Im Fall von pENTR™3C wurden bei sonst identischer Zusammensetzung des Restriktionsverdaus 2 µg DNA in einem Gesamtvolumen von ebenfalls 50 µl verwendet. Die Erfolgskontrolle des Verdaus von pETM-11 mCIN A194K/A195K durch den Nachweis eines DNA-Fragments mit einer Basenlänge von 895 bp erfolgte mittels Gelelektrophorese in 1%- Agarosegelen (siehe 2.2.12). Anschließend wurde die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 2.2.8.4 Ligation

Nach dem oben beschriebenen Restriktionsverdau folgte die Ligation, das heißt der enzymatisch katalysierte Einbau des mCIN A194K/A195K-Inserts in den nun an den Erkennungssequenzen für XhoI und KpnI geschnittenen und somit linear vorliegenden pENTR™3C. Um ein bei der Ligation günstiges molares Verhältnis von 5:1 zu erreichen, wurde die Masse des Inserts nach folgender Formel berechnet:  $5 \times \text{Masse Vektor} \times \text{Länge Insert (0,895 kbp)} / \text{Länge Vektor (2,270 kbp)}$ . Die erfolgreiche Ligation gelang bei 25 ng pENTR™3C und folglich 49 ng Insert, 1 µl T4 DNA Ligase, 2 µl Ligationspuffer 10x sowie destilliertem H<sub>2</sub>O in einem Reaktionsvolumen von 20 µl nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur.

### 2.2.8.5 LR-Rekombination

Der Vektor pENTR™3C erlaubt mittels LR-Rekombination im Rahmen der GATEWAY® Technology von Invitrogen™ einen einfachen Genaustausch zwischen einem pENTR™3C-Vektor und sogenannten pDEST™-Vektoren. Die Buchstaben L und R stehen hierbei für die Rekombinationsstellen attL und attR (Details siehe Abbildung 9). Grundlage dieser Methode ist der wechselseitige Austausch der von Restriktionsstellen flankierten Sequenzen attL1-Gen-attL2 mit attR1- ccdB Cm<sup>r</sup> -attR2 zu attP1-ccdB Cm<sup>r</sup>-attP2 und attB1-Gen-attB2, die auf einer ortsspezifischen Rekombination des Bakteriophagen Lambda beruht (148).



**Abbildung 9: Prinzip der LR-Rekombination zwischen pENTR™3C und einem pDEST™27-Vektor**

pENTR™3C trägt das mutierte mCIN, flankiert von den Restriktionsschnittstellen attL1 und attL2, sowie ein Resistenzgen gegen Kanamycin (Kanamycin<sup>r</sup>). pDEST™-Vektoren enthalten neben einer für das toxische ccdB-Protein und eine Chloramphenicol-Resistenz (Cm<sup>r</sup>) kodierenden Sequenz, die von den Rekombinationssequenzen attR1 und attR2 flankiert ist, ein Resistenzgen gegen Ampicillin (Ampicillin<sup>r</sup>). Der pDEST™27-Vektor enthält zudem eine Sequenz für den Protein-Tag GST (in Magenta hervorgehoben). Die Zugabe von LR Clonase katalysiert die Rekombination. Als Produkte erhält man den gewünschten Expressionsvektor pDEST™27 mit mCIN, flankiert von nun zu attB1 und attB2 rekombinierten DNA-Sequenzen, der eine Resistenz gegen Ampicillin kodiert. Ebenso entsteht pENTR™3C mit für ccdB und eine Chloramphenicol-Resistenz kodierenden Basenfolgen, flankiert von attP1 und attP2.

Durch die Transformation der Produkte in *E. coli* (siehe 2.2.9) kann eine mehrfache Selektion erfolgen. Einerseits tragen die neu entstandenen

pDEST™-Plasmide, die das gewünschte Gen, in diesem Fall mCIN A194K/A195K, tragen, eine Ampicillin-Resistenz, verlieren aber dafür ihre Chloramphenicol-Resistenz. Andererseits ermöglicht das zuvor im unrekombinierten pDEST™-Vektor kodierte ccdB-Genprodukt eine negative Selektion (sogenanntes „Selbstmordgen“). Diese wird durch die Toxizität des ccdB-Proteins für *E.coli* erreicht, wodurch sowohl möglicherweise unrekombinierte pDEST™-Vektoren als auch die rekombinierten pENTR™3C-Vektoren zu keinem Wachstum der *E.coli*-Bakterien führen. Gemäß den Herstellerangaben von Gateway® LR Clonase® II enzyme mix wurden 150 ng des pENTR3C mCIN A194K/A195K mit 150 ng des pDEST™27-Vektors und 6 µl Tris Puffer 10 mM vermischt. Die LR Clonase II wurde 2 Minuten auf Eis aufgetaut, dann zwei Mal kurz gut durchmischt und in einem Volumen von 2 µl zum Reaktionsansatz gegeben. Nach einer Inkubation von 60 Minuten bei 25 °C wurde die Reaktion mit 1 µg Proteinase K gestoppt und nochmals für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 2,5 µl des Reaktionsgemisches in *E.coli* DH5α transformiert (siehe 2.2.9) und anschließend auf Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Darauf wachsende Kolonien wurden zur Kontrolle auf Ampicillin-Chloramphenicol-Agarplatten ausgestrichen. Hierauf ausbleibendes Wachstum, sowie eine Agarosegelelektrophorese eines erneuten Verdau einer Mini-Präparation mit XhoI und KpnI zum Nachweis des mCIN-Inserts dienten als Bestätigung der erfolgreichen Rekombination.

### **2.2.9 Transformation**

Bei der Transformation, also dem Einschleusen rekombinanter DNA in Bakterien, macht man sich die kurze Generationszeit von Bakterien zunutze. Bei der Bakterienteilung wird auch das genetische Material der Ausgangszelle verdoppelt und so nach einigen Zellteilungen exponentiell vermehrt.

Hierzu wurden die bei -20 °C gelagerten kompetenten *E.coli* DH5α oder *E.coli* BL21 in einem Probenvolumen von etwa 100 µl auf Eis aufgetaut und für 30-45 Minuten mit 100-200 ng DNA inkubiert. Im Falle einer vorangehenden Ligation (siehe 2.2.8.4) wurden 5 µl des Ligationsansatzes zur Transformation

verwendet. Ein sich anschließender Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C sollte die Permeabilität der Bakterienmembran erhöhen. Um optimale Bedingungen für das Bakterienwachstum zu schaffen, wurde daraufhin 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension für 45 Minuten bei 37 °C auf einem Thermomixer comfort (Eppendorf) bei leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die suspendierten Bakterien bei 1844 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand bis auf etwa 150 µL verworfen und darin das entstandene Pellet resuspendiert. Diese Suspension wurde anschließend auf Agarplatten mit den entsprechend beigesetzten Antibiotika (siehe 2.1.7) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden daraufhin mit autoklavierten Pipettenspitzen gepickt und je 3 ml LB-Medium für eine Mini-Plasmid-Präparation (siehe 2.2.10 und 2.2.11) sowie 150 ml für eine Midi-Plasmid-Präparation inokuliert. Bei stetigem Schütteln mit 180 rpm bei 37 °C auf einem ISF-1-V Schüttler (Adolf Kühner AG) wurden die Bakteriensuspensionen anschließend über Nacht inkubiert.

### **2.2.10 Mini-DNA-Plasmid-Präparation**

Je nach gewünschter DNA-Ausbeute wurde entweder eine Mini-DNA-Plasmid-Präparation oder eine Midi-DNA-Plasmid-Präparation durchgeführt. Eine Mini-DNA-Plasmid-Präparation ging von einem Bakterienkulturvolumen von 3 ml aus (Midi-DNA-Plasmid-Präparation: 150ml). Bei der Mini-Präparation wurden davon 2 ml der Kultur für 5 min bei 1844 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl S1-Puffer resuspendiert. Der Suspension wurde 300 µl S2-Puffer zugegeben, die Reaktionsgefäße mehrere Male gewendet und bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 300 µl S3-Puffer hinzugegeben, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und die Proben etwa 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 15871 x g für 10 Minuten wurde der plasmidhaltige Überstand in ein frisches 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 700 µl Isopropanol ausgefällt. Danach folgte eine Zentrifugation bei 15871 x g und 4 °C für 20 min. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das DNA-reiche Pellet

mit 500 µl 4 °C kaltem Ethanol 70% (v/v) ohne Resuspension gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 15871 x g zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde getrocknet und in 30 µl Tris HCl Puffer (10 mM) aufgenommen. Die Konzentrationsmessung der DNA erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm mittels NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer. Die so erhaltenen DNA-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

### **2.2.11 Midi-DNA-Plasmid-Präparation**

Die DNA-Präparation in größerem Maßstab aus einem Kulturvolumen von 150 ml erfolgte mit dem QIAGEN® Plasmid *Plus* Midi Kit und wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die im Folgenden genannten Puffer waren Teil des Kits. Zuerst wurden die über Nacht kultivierten Bakterien für 15 min bei 6000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml gekühltem P1 Puffer resuspendiert. Zur Zellsuspension wurden anschließend 4 ml P2 Puffer zugegeben, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 4 ml P3 Puffer zugegeben und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dem schloss sich eine Zentrifugation bei 20000 x g und 4 °C an. Der Überstand wurde daraufhin in neue Reaktionsgefäße überführt und erneut bei 20000 x g zentrifugiert. Das Lysat wurde anschließend auf QIAGEN®-tip 100 Säulen überführt, die zuvor mit 4 ml QBT Puffer äquilibriert worden waren. Anschließend wurde das Säulenmaterial zwei Mal mit je 10 ml QC Puffer gewaschen und schließlich die DNA mit 5 ml QF Puffer eluiert. Um die DNA auszufällen wurden dem Eluat 3,5 ml Isopropanol beigegeben und bei 15871 x g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 2 ml Ethanol 70% (v/v) gewaschen, erneut bei 15871 x g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet 5-10 Minuten lang luftgetrocknet und in 120 µl Tris HCl Puffer 10 mM resuspendiert.

Die Konzentrationsmessung der DNA erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm mittels NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer. Die so erhaltenen DNA-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

### **2.2.12 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion**

Die Agarosegelelektrophorese beruht auf dem Prinzip, dass unterschiedlich große DNA-Stränge unterschiedlich schnell aufgrund ihrer negativen Gesamtladung in einem elektrischen Feld durch quervernetzte Agarosepolymere wandern. Kleinere DNA-Moleküle bewegen sich schneller durch die Poren der Gelmatrix als größere DNA-Moleküle. Bei den für diese Arbeit verwendeten Agarosegelen wurde Agarose 1 % (w/v) in TAE-Puffer gelöst, aufgekocht und Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,08 µg/ml eingerührt. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und erlaubt durch Fluoreszenz bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht die optische Detektion von DNA-Banden im Agarosegel, die mithilfe einer 1 kb DNA-Leiter in Relation gebracht werden konnten. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V. Die optische Detektion wurde mit einem E.A.S.Y. Win32 Geldokumentationssystem durchgeführt.

Die Gelextraktion wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) durchgeführt. Hierzu wurde das Agarosegel kurz auf einen TFX 35 M UV-Schirm (Biometra) gelegt, um durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromids die DNA-Banden eindeutig identifizieren zu können. Anschließend wurde der Bandenbereich mit einem Skalpell ausgeschnitten, das so gewonnene Gel gewogen und in dreifacher Menge (100 mg  $\cong$  100 µl) bei 50 °C in QG Puffer gelöst. Die DNA-bindenden Säulen wurden mit der Lösung beladen und bei 15871 x g für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen erneut bei 15871 x g für 1 Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA mit 30 µl Elutionspuffer bei 15871 x g für 1 Minute in ein frisches Reaktionsgefäß eluiert. Die Konzentrationsmessung der DNA erfolgte durch Absorptionmessung bei 260 nm mittels NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer.

### **2.2.13 Reinigung von PCR-Produkten**

Um die bei der PCR-Reaktion entstandene DNA aufzureinigen, wurde das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. Hierbei wurden je 50 µl des Reaktionsgemisches mit 300 µl QG Puffer vermischt, auf eine Spin-Säule

aufgetragen und für 1 Minute bei 15871 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und es wurden 750 µl PE Puffer auf die Spin-Säule pipettiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 15871 x g mit anschließendem Verwerfen des Durchflusses wurde die DNA mit 30 µl Elutionspuffer bei 15871 x g 1 Minute lang eluiert.

### **2.2.14 Proteinexpression**

Für die Proteinexpression in *E.coli* wurden zunächst 25 g LB-Medium je 1 l dH<sub>2</sub>O gelöst und anschließend autoklaviert. Am Vortag der eigentlichen Expression wurden 50 ml LB Medium mit 50 µg/ml Kanamycin und 20 µg/ml Chloramphenicol mit *E.coli* BL21 (DE3) Kolonien inokuliert, die sowohl ein für mCIN WT oder mCIN A194K/A195K kodierendes Plasmid pETM-11 als auch ein für die Chaperone GroEs, GroEL und tf und für die Chloramphenicol-Resistenz kodierendes Plasmid pG-tf2 trugen (Takara Bio Inc.) (siehe 2.2.9). Die Kolonien wurden hierzu von im Vorfeld mit transformierten *E.coli* beimpften Agarplatten übertragen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 37 °C in einem ISF-1-V Schüttler (Adolf Kühner AG) etwa 16 Stunden lang inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde daraufhin die eigentliche Expressionskultur (ebenfalls mit 50 µg/ml Kanamycin und 20 µg/ml Chloramphenicol) mit einem Volumen von 500 ml auf eine optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0,1 eingestellt und mit Tetrazyklin 10 ng/ml über den auf pG-tf2 kodierten pzt-1 Promoter die Expression der Chaperone induziert. Daraufhin wurden die Expressionskulturen bei 37 °C im Schüttler inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> 0,6-1,0 erreichte. Dann erfolgte die Induktion der Expression von Chronophin durch die Zugabe von 1 mM IPTG und wurde bei 20 °C für 18-20 Stunden unter stetiger Bewegung im Schüttler fortgeführt. Die Induktion der Proteinexpression mittels IPTG erfolgte im Fall von pETM-11 durch das sogenannte lac Operon. IPTG bindet an einen an die DNA gebundenen Repressor, der selbst auf dem Plasmid kodiert ist, und sorgt so für die Dissoziation des Repressors vom DNA-Strang, so dass die mRNA-Polymerase für die Transkription an die DNA binden kann. IPTG kann selbst nicht intrazellulär abgebaut werden, bleibt so in seiner

Konzentration konstant und ermöglicht eine gleichmäßig hohe Expression des gewünschten Proteins.

## **2.2.15 Proteinaufreinigung**

### **2.2.15.1 Zelllyse und Aufreinigung mit TALON® Metallaffinitätschromatographie**

Nach 18-20 Stunden Expression bei 20 °C wurde die Bakteriensuspension bei 4420 x g für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets auf Eis gestellt. Anschließend wurden die pelletierten Bakterien in TNM Puffer resuspendiert und erneut bei 4 °C und 8000 x g 10 Minuten lang abzentrifugiert. Falls die Pellets nicht direkt weiterverarbeitet wurden, wurden sie bei -20 °C eingefroren. Im anderen Fall wurde ein Zellpellet in etwa 12 ml Lyse-Puffer resuspendiert und mit 250 µl einer zuvor in 1 ml Lyse-Puffer gelösten cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Tablette, 120 µl DNaseI (150 U/ml) und 10 mg Lysozym vermischt. Die Zugabe von Protease-Inhibitor ist sinnvoll, um eine Proteolyse zu verhindern, während die von DNaseI die Viskosität des Bakterienlysats vermindert und somit die technische Aufreinigung erleichtert. Anschließend wurde die Zellsuspension für die enzymatische Lyse durch Lysozym 1 Stunde lang bei Raumtemperatur rotiert und daraufhin mit einem Sonopuls HD 200 Ultraschall Homogenisator 30 Mal bei einer Intervalllänge von 1 Sekunde und einer Pulslänge von 0,7 Sekunden sonifiziert, also die Bakterienzellen zusätzlich noch mechanisch lysiert. Durch eine Zentrifugation bei 3000 x g für 30 Minuten bei 4 °C wurde der Zelldebris vom Überstand getrennt und letzterer der TALON® Affinitätschromatographie zugeführt.

Hierbei handelt es sich um ein Verfahren der Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC), einer Metallaffinitätschromatographie, bei der über eine Interaktion zwischen dem Poly-His-Tag von Proteinen und Kobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ) eine Proteinbindung an Sepharosekügelchen stattfindet, an deren Oberfläche  $\text{Co}^{2+}$  Ionen mittels Chelatkomplexbildnern immobilisiert sind. Hierzu wurde eine Poly Prep® Chromatographiesäule drei Mal mit je 5 ml „Wasch-Puffer für *E.coli*“ äquilibriert. Daraufhin wurden etwa 0,6 ml TALON® Kügelchen je Liter Kulturmedium im fünffachen Volumen Waschpuffer auf niedrigster Stufe

5 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Anschließend wurden die Kügelchen auf die Poly Prep® Säulen überführt, erneut mit dem fünffachen Volumen Waschpuffer gewaschen und bei 4 °C 1 Stunde lang unter konstanter Bewegung mit dem Zellyseüberstand inkubiert. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde das Säulenmaterial daraufhin in mehreren Schritten mit insgesamt 12 ml Wasch-Puffer gewaschen. Die geringe Imidazolkonzentration im Wasch-Puffer und im Lyse-Puffer reduziert die Wahrscheinlichkeit von unspezifischer Proteinbindung an die TALON® Kügelchen. Hingegen macht man sich bei der Elution mit je drei Mal 1 ml „Elutionspuffer für *E.coli*“ pro 1 ml TALON® Kügelchen dessen hohe Imidazolkonzentration zunutze, um damit als kompetitivem Agens die His-Tag tragenden Proteine zu eluieren.

#### **2.2.15.2 Zelllyse und Aufreinigung mit ÄKTApurifier**

In Analogie zu 2.2.15.1 wurde nach 18-20 Stunden Expression bei 20 °C die Bakteriensuspension bei 4420 x g 15 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Pellets in Lyse-Puffer resuspendiert und mit 1 cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Tablette pro 50 ml Lyse-Puffer sowie 120 µl DNaseI (150 U/ml) vermischt. Daraufhin wurden die suspendierten Bakterien in mehreren Zyklen in einem Microfluidizer Processor M-110 P aufgeschlossen. Um den Zelldebris zu entfernen, wurde das Zellysat bei 30000 x g für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend vorsichtig abgenommen. Die anschließende Aufreinigung mit einem ÄKTApurifier (GE Healthcare Life Sciences) erfolgte ähnlich zu 2.2.15.1 nach dem Prinzip der Immobilized Metal Affinity Chromatography. Hierbei wird das Lysat und mit ihm die Poly-His-Tag tragenden Proteine mittels eines ÄKTApurifier-Systems über eine HisTrap™ HP 1ml Säule (GE Healthcare Life Sciences) gepumpt. Dabei binden die einen Poly-His-Tag tragenden Proteine an Nickel- ( $\text{Ni}^{2+}$ -) Ionen, die selbst über Chelatgruppen an der Sepharose des Säulenmaterials immobilisiert sind. Hierdurch können die Proteine mit Poly-His-tag aus dem Lysat selektiv entfernt werden und in einem Elutionsschritt über eine kompetitive Verdrängung mit Imidazol aus ihrer Bindung an die  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen eluiert werden.

Hierzu wurde zunächst die HisTrap™ HP 1ml Säule mit Wasch-Puffer (TEA 50 mM, NaCl 500 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Imidazol 20 mM, Aqua dest., pH 7,4) bei einer Flussrate von 1,0 ml/min über mehrere Säulenvolumina äquilibriert. Anschließend wurde das Zelllysate mit 0,7 ml/min komplett aufgetragen und über einen Verlauf von 15 Säulenvolumina und einem linear ansteigenden Mischungsverhältnis bis 50% Elutionspuffer (TEA 50 mM, NaCl 250 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Imidazol 500 mM, Aqua dest., pH 7,4) zu 50% Wasch-Puffer wurden schließlich bei 0,5 ml/min die gebundenen Proteine fraktioniert eluiert. Die Fraktionen, von denen gemäß ihres Elutions- und UV-Absorptionsverhaltens vermutet werden konnte, dass sie His-Tag tragendes mCIN enthielten, wurden anschließend zusammengeführt und mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-Blotting auf das gewünschte Protein untersucht. Anschließend wurde die HisTrap™ HP 1ml Säule über 5 Säulenvolumina bei 100% Elutionspuffer gereinigt.

Um den nun nicht mehr benötigten His-Tag vom aufgereinigten Protein zu trennen, schloss sich ein Verdau mit Tobacco Etch Virus (TEV)-Protease an. Diese ist in der Lage, die Erkennungssequenz Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly enzymatisch an der Stelle zwischen Gln und Gly zu hydrolysieren. Hierzu wurde dem mit einem Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Device (MILLIPORE™) auf etwa 1 ml konzentrierten Proteineluat TEV-Protease und 500 µl NaCl 5 M zugegeben. Um gleichzeitig die hohe Imidazolkonzentration im Elutionspuffer und Auswirkungen auf die Proteinstabilität oder -funktionalität zu vermindern wurde der TEV-Verdau über 24 Stunden bei Raumtemperatur in einer Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette G2 10k MWCO (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt und gegen TNM Puffer dialysiert.

Da die TEV Protease selbst einen Poly-His-Tag trägt, konnte diese aus dem Proteineluat entfernt werden, indem ein weiterer Lauf über die HisTrap™ HP 1ml Säule nach obigem Schema angeschlossen wurde. Hierbei fand nun eine Bindung der TEV Protease an die Säulenmatrix statt, das aufgereinigte mCIN, nach dem TEV-Verdau nun ohne His-Tag, hingegen befand sich in den Durchflussfraktionen und wurde für die sich anschließende Größenausschlusschromatographie gesammelt.

### 2.2.16 Größenausschlusschromatographie

Das Verfahren der Größenausschlusschromatographie, auch Gelpermeationschromatographie genannt, ermöglicht es, Proteine nach ihrem hydrodynamischen Volumen oder ihrer Größe aufzutrennen. Hierzu sind diese in der wässrigen Phase (in diesem Fall TNM Puffer aus der vorangegangenen Dialyse während des TEV Verdaus, siehe 2.2.15.2) gelöst und treten so in das aus quervernetzter Agarose und Dextran bestehende Säulenmaterial ein. Große Proteine können nicht in die kleinporige Gelmatrix eindringen, laufen nur im äußeren Volumen der Säule und eluieren so früher. Dieses sogenannte Leervolumen war im Vorfeld mittels Blue Dextran (Sigma-Aldrich), einem großen, inerten Molekül bestimmt worden. Kleine Proteine hingegen treten in die Poren ein, benötigen somit länger, um das Säulenmaterial zu durchlaufen und eluieren später. Durch die Eichung der Säule mit Proteinen bekannter molekularer Masse aus einem Gel Filtration LMW Calibration Kit (GE Healthcare) war dann eine Umrechnung des Elutionsvolumens im Absorptionsmaximum bei 280 nm in die entsprechende molekulare Masse möglich. Hierbei wurde mit Elutionsvolumen eines Absorptionsmaximums der Quotient  $K_{av}$  nach der Formel

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad [1]$$

berechnet, wo  $K_{av}$  für den Verteilungskoeffizienten,  $V_e$  für das Elutionsvolumen,  $V_o$  für das Leervolumen und  $V_t$  für das Gesamtvolumen der Säule stehen. Nähert sich  $V_e$  dem Leervolumen  $V_o$  an, eluiert ein Protein in einem Bereich, der darauf schließen lässt, dass das Protein nicht in die Poren eingetreten ist, also groß ist. Tritt ein Protein aufgrund seiner geringen Größe hingegen auch in die Poren des Säulenmaterials ein, so nähert sich das Elutionsvolumen dem Gesamtvolumen der Säule  $V_t$  und  $K_{av}$  nähert sich dem Wert 1. Über den linearen Zusammenhang von  $K_{av}$  zum Logarithmus der molekularen Masse, der durch die Eichung säulenspezifisch bekannt war, konnte dann auf die molekulare Masse rückgerechnet werden.

Vor jedem Chromatographielauf wurde die Säule mit 30 ml bei 25 ml Säulenvolumen mit TNM Puffer äquilibriert. Das aufgereinigte Protein wurde

daraufrin mit einem Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Device auf ein Volumen <1 ml konzentriert, mittels einer TBC-Einmalspritze in den Probenstutzen des ÄKTApurifier Systems injiziert, anschließend in TNM Puffer auf die Säule aufgetragen und eluiert. Die Elutionsvolumina wurden fraktioniert, mittels SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot und Immundetektion (siehe 2.2.3 bis 2.2.6) auf die Anwesenheit von mCIN untersucht und die Fraktionen mit prädominierendem mCIN Gehalt für weitere Versuche zusammengeführt und gegebenenfalls nochmals mit Größenausschlusschromatographie aufgereinigt.

### 2.2.17 Proteinkonzentrationsmessung.

Die Konzentration des aufgereinigten Chronophins wurde über die Absorption bei 280 nm mithilfe eines NanoDrop™2000c Spektrophotometers mit der Formel

$$c = \frac{E * MW}{\epsilon * d} \quad [1]$$

mit c (Konzentration des Proteins in mg/ml), E (Extinktion bei 280 nm),  $\epsilon$  (Extinktionskoeffizient in  $l * mol^{-1} * cm^{-1}$ ) und d (Schichtdicke in cm) nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz bestimmt. Der auf dem Gehalt an aromatischen Aminosäuren beruhende Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  wurde mit der Webseite PROTPARAM (<http://web.expasy.org/protparam/>) (142) für mCIN WT und mCIN A194K/A195K mit 18,45 berechnet. Die molekularen Massen beliefen sich nach dem TEV-Verdau (siehe 2.2.15) auf 31,8 kDa (mCIN WT) und 31,9 kDa (mCIN A194K/A195K).

### 2.2.18 Thermofluor

Mittels der Thermofluor-Methode können Rückschlüsse auf die thermische Stabilität eines Proteins gezogen werden und so die Zusammensetzungen der Pufferlösung, in der das Protein aufgereinigt wird, hinsichtlich pH, Salzkonzentration und Zusätzen optimiert werden, insbesondere wenn Probleme mit der Löslichkeit auftreten oder mögliche Pufferbedingungen für Proteinkristallisationsexperimente näher eingegrenzt werden sollen. Die Analyse eines aufgereinigten Proteins mittels Thermofluor basiert auf dem optischen Nachweis der Denaturierung des Proteins. Die schrittweise Erhöhung

der Reaktionstemperatur sorgt hierbei für eine allmähliche Auffaltung des Proteins, was einem im Reaktionsgemisch gelösten, hydrophoben Farbstoff SYPRO® Orange (Invitrogen) ermöglicht, an die zuvor im Proteininneren befindlichen hydrophoben Aminosäuresequenzen zu binden. Bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 492 nm emittiert SYPRO® Orange bei einer Wellenlänge von 610 nm. Während die Fluoreszenz von SYPRO® Orange in polarer Umgebung wie zum Beispiel wässriger Lösung gering ist, steigt sie in unpolaren Umgebungen, wie hier in der Interaktion mit hydrophoben Aminosäuren an (149, 150). Der zeitliche Verlauf der kontinuierlich registrierten Fluoreszenz nimmt eine sigmoidale Form an: Einem flachen Verlauf der Fluoreszenz bei niedrigen Temperaturen und somit gefaltetem Protein schließt sich ein steiler Anstieg der Fluoreszenz im Bereich um den Schmelzpunkt  $T_m$  an. Er markiert als Umkehrpunkt den maximalen Anstieg der Fluoreszenz, also den Punkt, an dem die Hälfte des Proteins gefaltet, die andere aufgefaltet vorliegt. Daraufhin erreicht die Fluoreszenz eine Sättigungsphase, bzw. sinkt durch Präzipitation des Farbstoffes sogar leicht ab (150). In einem Reaktionsvolumen von 25  $\mu$ l wurden 20  $\mu$ l Puffer, 2,5  $\mu$ l aufgereinigtes Protein (5 mg/ml) und 2,5  $\mu$ l SYPRO® Orange (50x) miteinander vermischt. Als Kontrollen wurden das zu untersuchende Protein mit Puffer, SYPRO® Orange mit Puffer und ausschließlich Puffer verwendet. Bei keiner der Kontrollen kam es zu einem auswertbaren Signal. Die Versuche wurden mit einem MX3005P Real-Time PCR Thermalcycler durchgeführt.

### **2.2.19 Rasterkraftmikroskopie**

Da konventionelle optische Mikroskope physikalisch bedingt lediglich Objekte auflösen können, die größer als die halbe Wellenlänge des verwendeten, sichtbaren Lichts sind, ist die Anwendbarkeit auf Objekte beschränkt, die deutlich größer als 200 nm sind (151). Diese Grenze wird als das sogenannte Abbe-Limit bezeichnet, das erst durch neuere optische Fluoreszenzmikroskopietechniken wie STED (Stimulated Emission Depletion) (152) und STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) (153) unterschritten werden konnte. Für die Darstellung von einzelnen Proteinen, die wie

Chronophin gemäß ihrer kristallographischen Strukturdaten Größenordnungen von etwa 10 nm im Durchmesser erwarten lassen, ist die konventionelle optische Mikroskopie demnach nicht geeignet, während Fluoreszenzmikroskopie das Vorhandensein von Fluoreszenzproteinen erfordert.

Die Rasterkraftmikroskopie, erstmals beschrieben in (154), hingegen erlaubt eine indirekte Oberflächenmikroskopie und kann als nicht-optische Mikroskopietechnik Objekte im Nanometerbereich auflösen. Dies wird dadurch möglich, dass die Interaktion zwischen einer kleinen, über der Probenoberfläche oszillierenden Messnadel, dem Cantilever, und dem zu untersuchenden Objekt messtechnisch erfasst und in ein oberflächentopographisches Bild umgerechnet wird. Voraussetzung hierfür ist die Deposition der Probe auf einer sehr glatten Oberfläche. Mica, ein Schichtsilikat, lässt sich in äußerst glatte Oberflächen spalten und ist deshalb für diese Anwendung sehr geeignet. Das grundsätzliche Prinzip beruht auf der Erregung des Cantilevers nahe seiner Resonanzfrequenz und deren Änderung durch Kräfte, die zwischen Cantilever und Probe auftreten. Hierbei spielen unter anderem Van-der-Waals-Kräfte, Kapillarkräfte und quantenmechanische Wechselwirkungen, auf deren Details an dieser Stelle jedoch nicht näher eingegangen werden soll, eine Rolle. Der schematische Aufbau wird in Abbildung 10 deutlich. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der Software Image SXM von Steve Barrett.

Mit den gewonnenen Daten über die Proteinhöhe, die Grundfläche der Proteine konnte das Molekülvolumen mit der Formel nach (155) berechnet werden:

$$V = (H - b) * A \quad [2]$$

mit H (durchschnittliche Proteinhöhe), b (Höhe des Hintergrunds, Höhe des Micas), A (Grundfläche der gemessenen Proteine) berechnet. Anschließend konnte daraus mit der Formel

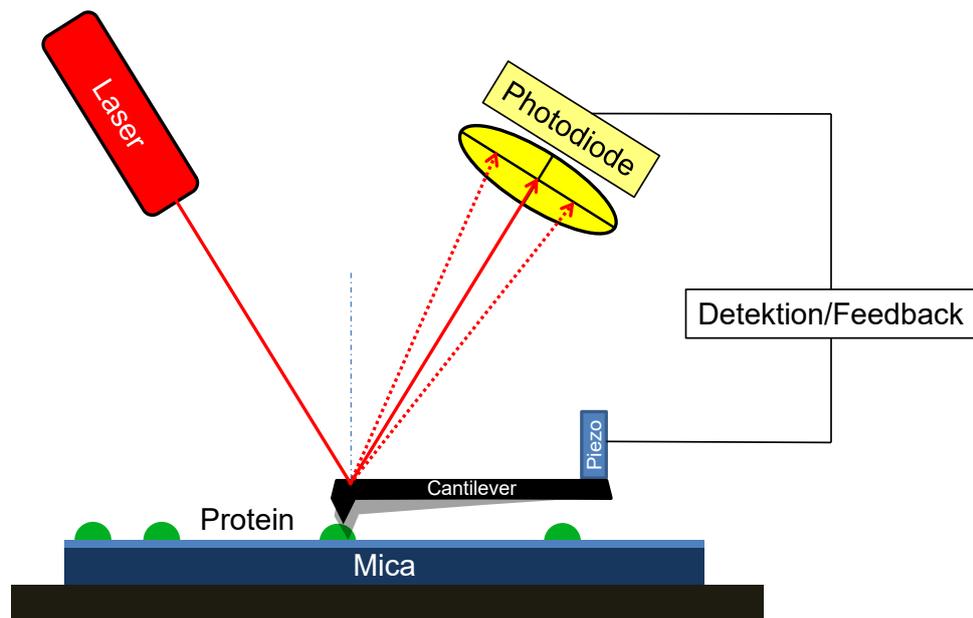
$$MW = \frac{(V + 5,9)}{1,2} \quad [3]$$

mit V (Volumen) das Molekulgewicht (MW) berechnet werden. Diese Korrelation wurde von Dr. Ingrid Tessmer empirisch für den Rasterkraftmikroskopieaufbau

mit dem Modell Molecular Force Probe (MFP)-3D-BIO von Asylum Research erstellt.

Zu diesem Zweck wurde das aufgereinigte und in AFM Depositionspuffer (HEPES 25 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,5) auf 1 µM, 500 nM und 300 nM verdünnte Protein auf frisch gespaltenes Mica aufgebracht, mit vollentsalztem Wasser überspült und anschließend vorsichtig unter einem gasförmigen Stickstoffstrahl getrocknet.

Die Aufnahmen wurden daraufhin im Oszillationsmodus eines MFP-3D-BIO Rasterkraftmikroskop erstellt. Die Bilderfassung und -verarbeitung erfolgte mit Asylum Research Software auf der IGOR Pro Plattform bei einer gescannten Fläche von 2 x 2 µm<sup>2</sup>, einer Scanfrequenz von 0,5 Hz und einer Auflösung von 1024 x 1024 Bildpunkten. Die Molekülvolumina wurden mit der NIH Image Software ImageSXM gemessen und in molekulare Masse umgerechnet. Die molekulare Masse und deren Messabweichungen wurden aus dem Maximum und zwei Standardabweichungen von Gauß'schen Normalverteilungen mit  $R^2 > 0,79$  für mCIN WT und  $R^2 > 0,96$  für mCIN A194K/A195K mittels der Software Origin (Origin-Lab, Version 8.6) bestimmt. Die gezeigten Daten stammen aus dreifach durchgeführten Experimenten.

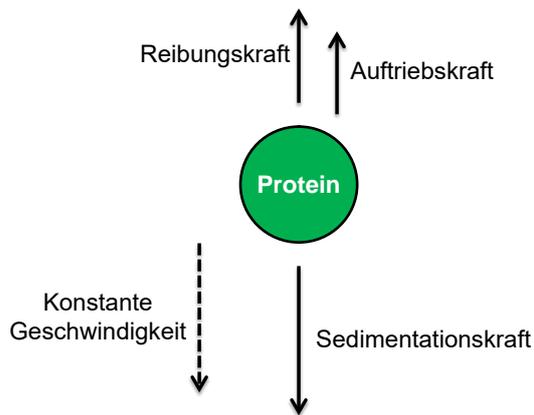


**Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops (Darstellung stark vereinfacht).**

Das Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskop beruht auf den Interaktionen zwischen dem auf Mica aufgebrachtem Protein und dem sogenannten Cantilever. Hierbei auftretende wechselwirkende Kräfte verändern die Resonanzfrequenz des durch einen Piezo-Kristall in Schwingung versetzten Cantilevers. Diese Änderung wird durch die Ablenkung eines Laserstrahls, der auf den Rücken des Cantilevers gerichtet ist, auf einer Photodiode detektiert. Eine Feedbackschleife sorgt für eine konstante Oszillation des Cantilevers, der rasterartig über die zu untersuchende Fläche bewegt wird.

### 2.2.20 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation (AUC, Sedimentationslauf) ist ein Verfahren, bei dem das Verhalten von Proteinen während einer Zentrifugation Rückschlüsse auf die molekulare Masse zulässt. Ausschlaggebend hierbei ist die Proteingrenzfront, die sich während der Zentrifugation ausbildet und die sich entlang der wirkenden Zentrifugalkraft radial nach außen bewegt. Die genaue Bestimmung der Proteingrenzfront erfolgte mittels kontinuierlicher Messung der  $OD_{280}$  in Schritten von 0,003 cm ohne Mittelung. Die auf das Protein wirkenden Kräfte sind in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11: Schematisierte Darstellung eines exemplarischen Proteinmoleküls und der bei der AUC wirkenden Kräfte.**

Während die Sedimentationskraft das Protein nach außen treibt, wirken ihr sowohl die Reibungskraft des Proteins mit dem Lösungsmittel als auch die Auftriebskraft entgegen und bewirken so ein Kräftegleichgewicht. Das Proteinmolekül sedimentiert so mit konstanter Geschwindigkeit.

Während der Zentrifugation bewirkt die gleichzeitig stattfindende Diffusion ein Verstreichen und eine Verbreiterung der Proteingrenzfront. Die Bewegung der Proteingrenzfront, also die Veränderung der Konzentration über die Zeit und die radiale Position sind somit ein Zusammenspiel aus Sedimentationsfluss und Diffusionsfluss, was in der sogenannten Lamm-Gleichung (156), einer partiellen Differentialgleichung ausgedrückt wird. Der Sedimentationskoeffizient  $s$  als Geschwindigkeit des Partikels pro Einheit der radialen Beschleunigung vereint die in Abbildung 11 dargestellt wirkenden Kräfte und findet Ausdruck in der Svedberg Gleichung (157),

$$\frac{s}{D} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{RT} \quad [4]$$

wobei  $s$  für den Sedimentationskoeffizient,  $D$  für den Diffusionskoeffizient,  $M$  für Molmasse,  $\bar{v}$  für „partialspezifisches Volumen“, das in Näherung der reziproken Dichte des Partikels entspricht,  $\rho$  für die Dichte des Lösungsmittels,  $R$  für die universelle Gaskonstante und  $T$  für Temperatur steht.

Die Bestimmung von  $s$  und  $D$  im Rahmen der Lösung der Lamm-Gleichung erlaubt dann im Gleichgewichtsfall der wirkenden Kräfte über den obigen Zusammenhang die molekulare Masse der Proteinpartikel zu bestimmen.

Nach diesem Prinzip wurde die analytische Ultrazentrifugation mit einer Beckman Optima XL-I Analytische Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) in einem An-50Ti Rotor bei  $128794 \times g$  bei  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die Proteine mCIN WT und mCIN A194K/A195K wurden in *E.coli* exprimiert, mit dem ÄKTApurifizierer aufgereinigt (siehe 2.2.14 und 2.2.15) und in TNM-Puffer auf eine  $\text{OD}_{280}$  von 0,5-0,8 verdünnt. Die Proteinlösungen sowie TNM-Puffer als Referenz wurden in Volumina von 380-400  $\mu\text{l}$  in die Doppelsektor-Messzellen aus kohleverstärktem Epon-Kunstharz pipettiert, in die zuvor Fenstergläser aus Saphir eingesetzt wurden. Die anschließend gemessenen Daten wurden mit der Software SEDFIT ausgewertet, um Verteilungen für den Sedimentationskoeffizienten  $c(s)$  als Lösungen der Lamm-Gleichung zu bestimmen. Die Verteilung des Sedimentationskoeffizienten  $c(s)$  kann dann in eine Molekularmassenverteilung  $c(M)$  umgewandelt werden (158).

Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten gewonnen. Die Datenanalyse erfolgte mit Regularisierung bei einem Konfidenzintervall von 0,68 und *r.m.s.d.* (Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung)-Werten von 0,007 bis 0,012 für das Reibungskoeffizientenverhältnis  $f/f_0$ , das Rückschlüsse auf die Proteinform erlaubt, für Zeit-unabhängiges Rauschen, die Baseline und die Meniskusposition.

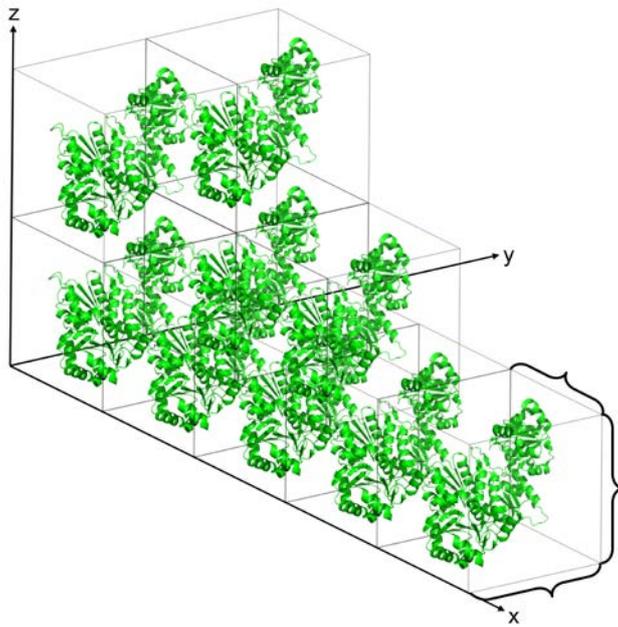
### **2.2.21 Aktivitätsmessung von Chronophin**

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Chronophin wurde die Dephosphorylierung von Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) durch Chronophin (58) gemessen. Hierzu wurden in einer Nunclon™ Surface 96-well Platte je Well 45  $\mu\text{l}$  Chronophin auf eine Konzentration von 222 nM in TNM Puffer verdünnt und in Triplikaten vorgelegt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe von PLP in TNM Puffer in den Schritten 10 mM, 5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM, 625  $\mu\text{M}$ , 313  $\mu\text{M}$ , 156  $\mu\text{M}$  und 78,1  $\mu\text{M}$  angelegt und je 5  $\mu\text{l}$  davon zu den Chronophin-Ansätzen zugegeben. In dem Gesamtreaktionsvolumen von 50  $\mu\text{l}$  lag Chronophin nun in einer Konzentration von 200 nM, PLP in Konzentrationen von 1 mM, 500  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 62,5  $\mu\text{M}$ , 31,3  $\mu\text{M}$ , 15,6  $\mu\text{M}$  und 7,81  $\mu\text{M}$  vor. Als Leerwerte dienten Triplikate mit jeweils 45  $\mu\text{l}$  TNM Puffer, zu denen in

gleicher Weise jeweils 5  $\mu\text{l}$  PLP in absteigender Konzentrationsreihe ausgehend von 10 mM zugegeben wurde. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des PLP gestartet. Nach 5 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  BIOMOL GREEN™ malachite green reagent (Enzo® Life Sciences) gestoppt. Das darin enthaltene Molybdat reagiert mit dem durch die Dephosphorylierung von PLP frei gewordenen Orthophosphat zu Phosphomolybdat-Komplexen (159). Deren Absorption bei 620 nm wurde nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einem EnVision™ 2104 multilabel reader (PerkinElmer) erfasst. Um die Absorptionswerte bei 620 nm in nmol Phosphat umrechnen zu können, wurde durch eine Verdünnungsreihe von 1 nmol, 0,5 nmol, 250 pmol, 125 pmol, 62,5 pmol, 31,25 pmol Phosphat eine Eichgerade für jede BIOMOL GREEN™ Reagenz erstellt. Die Auswertung der so gewonnenen Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.). Unter Annahme einer Michaelis-Menten-Kinetik (160) wurde hierbei mittels nicht linearer Regression die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\text{max}}$ , die Michaeliskonstante  $K_m$ , sowie der Quotient aus  $v_{\text{max}}$  und Enzymkonzentration,  $k_{\text{cat}}$ , sowie die sogenannte Leistungskonstante  $k_{\text{cat}}/K_m$  ermittelt.

### **2.2.22 Grundlagen der Proteinkristallisation**

Die Größe eines Proteins, im Fall des Chronophin-Dimers von etwa 10 nm Durchmesser, ist der Grund, weshalb optische Methoden für die genaue Bestimmung der Struktur ausscheiden. Röntgenstrahlen hingegen mit Wellenlängen um 0,1 nm bieten eine ausreichende Auflösung. Grundvoraussetzung für die Strukturanalyse eines Proteins ist dessen Anordnung in einem Kristallgitter. Die kleinste Einheit dieses Kristallgitters ist die sogenannte Elementarzelle. Durch periodische Translation der Elementarzelle in alle drei Raumrichtungen lassen sich alle Gitterpunkte des Kristallgitters beschreiben.



**Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Kristallgitters aus Elementarzellen.**

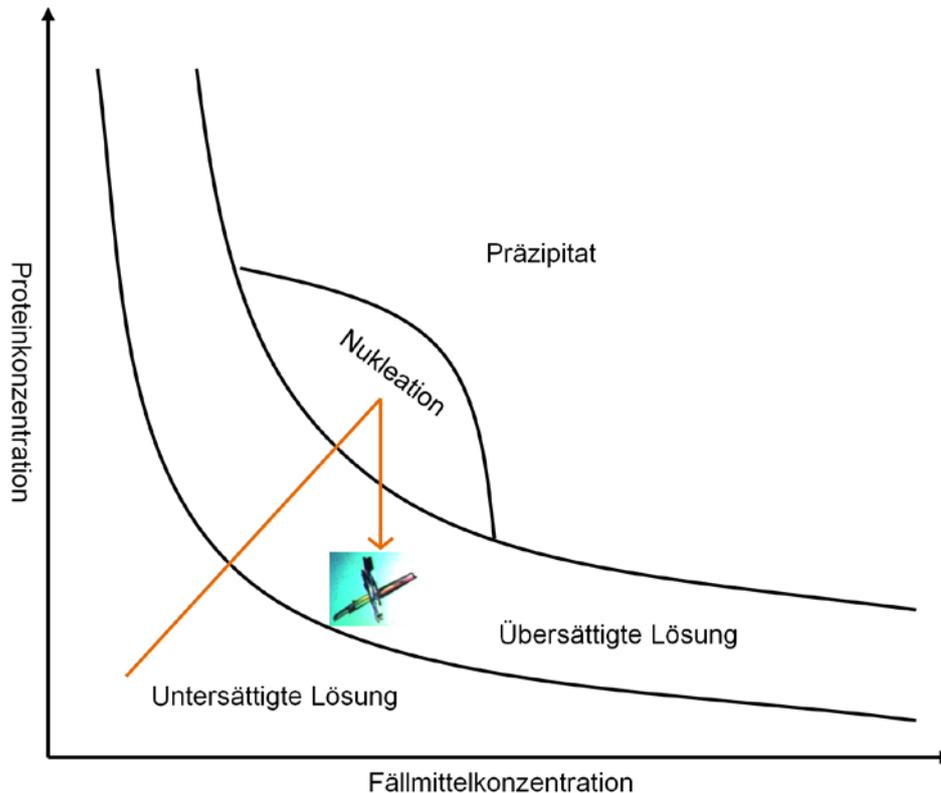
Dargestellt ist eine schematisches Kristallgitter aus mCIN Dimeren (PDB: 4BX3). Dieses entsteht durch die Translation der Elementarzelle (in geschwungenen Klammern abgegrenzt) in die Raumrichtungen  $x, y, z$ .

Durch die periodisch gleichmäßige Ausrichtung des Proteinmoleküls in einer Gitteranordnung entstehen bei der Beugung der Röntgenstrahlen Summationseffekte. Die auftretenden Interferenzmuster können detektiert werden und lassen so Rückschlüsse auf die zugrunde liegende Elementarzelle zu. Mittels einer mathematischen Operation, der Fourier-Synthese, kann aus dem Interferenzmuster auf die Elektronendichte innerhalb der Elementarzelle geschlossen werden. Während durch die Detektion des Interferenzmusters lediglich Amplituden der Röntgenstrahlung gemessen werden können, gehen die Informationen über die Phase verloren. Diese Phasenverschiebung, also die Verschiebung der Nulldurchgänge der wellenförmigen Röntgenstrahlung, tritt durch die Beugung der Röntgenstrahlung an den Elektronen auf und liefert eine unverzichtbare Information für die Elektronendichte innerhalb der Elementarzelle (161). Um dieses Phasenproblem zu lösen, wurde im Fall von mCIN A194K/A195K auf die Methode des molekularen Ersatzes (162-164) zurückgegriffen, die mithilfe von Analogien bekannter Proteinstrukturen wie hier humanem Chronophin (PDB: 2OYC) die unbekannt Phasen liefern kann. Mit

diesen Informationen kann dann die Elektronendichtekarte und schließlich die räumliche Struktur des Proteins erstellt werden. Für detaillierte Hintergründe bezüglich Proteinkristallisation, Datenakquisition und -auswertung und zugrunde liegender mathematisch und physikalischer Überlegungen sei an dieser Stelle auf einschlägige Lehrbücher verwiesen. (165-167)

### **2.2.22.1 Dampfdiffusionsmethode**

Zytosolische Proteine liegen grundsätzlich in wässriger Lösung vor. Um sie zur Kristallisation zu bringen, muss ein Zustand der Übersättigung erreicht werden (siehe Abbildung 13). Um dies zu erreichen, bedient man sich der Dampfdiffusion und der Zugabe von Fällmitteln. Der Dampfdiffusionsmethode liegt zugrunde, dass zwei unterschiedlich konzentrierte Lösungen, die Proteinlösung und die Stammlösung, in einem abgeschlossenen Reaktionsraum danach streben, den herrschenden Konzentrationsunterschied über Dampfdiffusion auszugleichen. Dadurch, dass die Proteinlösung eine geringere Fällmittelkonzentration als die Stammlösung aufweist, hat die Dampfdiffusion eine allmähliche Dehydrierung der Proteinlösung bis zur Übersättigung zur Folge. Gleichzeitig sorgt die Zugabe von Fällmitteln, wozu meistens stark wasserbindende Polyethylenglykole verwendet werden, dafür, dass weniger Wasser für die Hydratation des Proteins zur Verfügung steht (167). Aus dieser allmählichen Übersättigung entstehen dann durch weiteren Anstieg der Proteinkonzentration Kristallisationskeime, an denen die Nukleation stattfindet. Durch das zunehmende Kristallwachstum nimmt dann die Proteinkonzentration in der Lösung wieder ab. Kristallwachstum ist allerdings nicht nur von der herrschenden Protein- und Fällmittelkonzentration abhängig, sondern wird von vielen Faktoren wie Additivzugabe, Temperatur und pH-Wert beeinflusst.



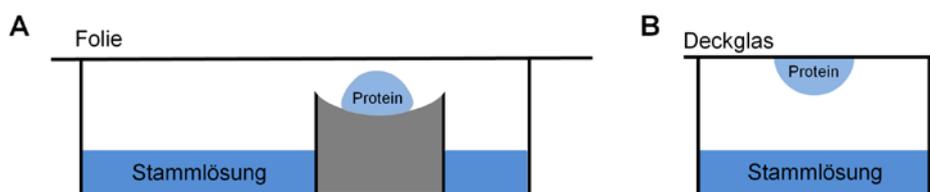
**Abbildung 13: Phasendiagramm einer Proteinlösung.**

Das Verhalten einer Proteinlösung ist von der Proteinkonzentration und der Konzentration des Fällmittels abhängig. Durch das allmähliche Ansteigen beider Konzentrationen im Rahmen der Dampfdiffusionsmethode bewegt sich die Proteinlösung im Phasendiagramm entlang der gelben Strecke in den Bereich der übersättigten Lösung. Durch weiteres Konzentrieren kommt es zur Kristallnukleation, das Kristallwachstum selbst findet dann im Bereich der übersättigten Lösung statt. Dargestellter Kristall: mCIN A194K/A195K .

Das zu kristallisierende Protein wurde nach der Aufreinigung mit 10 kDa MWCO Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Device (MILLIPORE™) in TNM Puffer (50 mM TEA, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) konzentriert, bis eine Konzentration von 8-10 mg/ml erreicht war (siehe 2.2.17).

Um geeignete Kristallisationsbedingungen für mCIN A194K/A195K zu finden, wurden zunächst Screening-Untersuchungen in sitting-drop-Technik (siehe Abbildung 14) durchgeführt, die geeignete Bedingungen hinsichtlich Fällmittel, Additiva, Puffersubstanz sowie pH-Wert näher eingrenzen sollte. Hierzu wurden mithilfe des Kristallisationsroboters HoneyBee 963 (Zinsser Analytic) auf CrystalQuick™ 96 Well Sitting-Drop Platten (Greiner Bio-One) zu je 0,3 µl vorgelegter Proteinlösung je 0,3 µl Stammlösung pipettiert und mit 40 µl Stammlösung im Reservoir äquilibriert. Die Stammlösungen entstammten den

kommerziell erhältlichen Kristallisationspuffersammlungen Crystal Screen 1 & 2, Index (Hampton Research); neXtal PEG Suite, neXtal pHClear Suite, Protein Complex Suite (QIAGEN), OptiMix-3 (Fluidigm), Wizard 1 & 2 (Rigaku). Die Sitting-Drop Platten wurden anschließend mit Folie verschlossen, bei 20 °C gelagert und anfangs täglich, später im Abstand von einigen Tagen mit einem SteREO Discovery.V12 Mikroskop (Zeiss) auf Wachstum von Kristallen überprüft.



**Abbildung 14: Sitting-drop und Hanging-drop Technik.**

Bei der Sitting-drop Technik in **A** ruht der Proteintropfen auf einer Art Podest und steht mit der höher konzentrierten Stammlösung über Dampfdiffusion in Verbindung. Bei der Hanging-drop Technik in **B** hängt der Proteintropfen an einem Deckglas über der Stammlösung. Wichtig ist in beiden Fällen der luftdichte Abschluss gegenüber der Umgebung, damit keine Verdunstung nach außen auftreten kann.

In den sitting-drop Screens vielversprechende Pufferbedingungen wurden in Hanging-drop-Technik (siehe Abbildung 14) weiter bezüglich der Konzentrationen von Additiva, Fällmittel, Puffer und des pH variiert, um die Kristalle hinsichtlich ihrer Form und Größe zu optimieren. Die Proteinkonzentration von mCIN A194K/A195K gelöst in TNM-Puffer (50 mM TEA, NaCl 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) betrug 7-12 mg/ml. Pro Well wurden 1 ml Puffer in eine Nunclon™ Δ Surface 24-well Multischale (Nunc) pipettiert und je 3 µl der Stammlösung mit je 3 µl der Proteinlösung auf silikonisierte Deckgläser (Hampton Research) pipettiert. Anschließend wurden die Wells vorsichtig mit den Deckgläsern verschlossen, so dass die Protein-Puffer-Tropfen an deren Unterseite hingen. Um Verdunstung zu vermeiden, wurden die Ränder der Deckgläser mit Baysilone Paste (GE Bayer Silicones) verschlossen. Die Multiwellplatten wurden anschließend bei 20 °C aufbewahrt und mit einem Binokular auf Kristallwachstum überprüft. Unter den Kristallisationsbedingungen MES 0,1M (pH 6,5), Polyethylenglykolmonomethylether 550 25% (w/v) erschienen mCIN A194K/A195K-Kristalle nach 3-4 Tagen als dünne Platten.

Entstandene Kristalle wurden mit einer Nylonschleife aufgenommen. Um Gefrierschäden zu vermeiden wurde der Kristall in Stammlösung mit 30 % (v/v) Glycerin als Kryoprotektivum getränkt. Anschließend wurde der Kristall in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### **2.2.22.2 Sammlung, Auswertung und Darstellung von Strukturdaten**

Die Datensammlung erfolgte mittels Beamline 14.1, Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY), Berlin bei einer Wellenlänge von 0,91861 Å. Sämtliche kristallographischen Daten wurden durch Gunnar Knobloch (Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg) mit iMosflm (138) und Scala (144) aus der CCP4 Programmsammlung (137) ausgewertet und weiterverarbeitet. Die Struktur von mCIN A194K/A195K wurde mittels molekularem Ersatz mit dem Programm Phaser (139) mit humaner Pyridoxal-5'-Phosphatase (PDB: 2OYC) als Suchmodell gelöst und bei einer Auflösung von 1,75 Å mit dem Programm PHENIX (140) weiter verfeinert.

Die Abbildungen sämtlicher dargestellter Proteinstrukturen wurden mit dem Programm PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC) erstellt.

#### **2.2.23 Datenbanksuche und Strukturvergleich**

Die initial von Gunnar Knobloch in (57) durchgeführte Datenbanksuche und der anschließende Strukturvergleich wurde für diese Arbeit nochmals ausgeführt und um zwischenzeitlich neu publizierte Strukturdaten ergänzt.

In diesem Zusammenhang wurde auf die The Protein Data Bank, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) (143) zurückgegriffen, in der Strukturdaten für Proteine hinterlegt werden, um strukturelle Gemeinsamkeiten von HAD-Hydrolasen näher untersuchen zu können. Es wurden die unter den Pfam Einträgen PF00702, PF08282, PF12710, PF13344, PF13242 und PF13419 dem Begriff HAD-Hydrolasen zugeordneten Einträge durchsucht und mit der Liste aus (25) abgeglichen. Sequenzen mit einer mindestens 90%-igen Sequenzentsprechung wurden als einfacher Eintrag gewertet, um so Mehrfacheinträge und mutierte Strukturen nur einmal in die Auswertung eingehen zu lassen. Informationen über die Quartärstruktur sowie über die Dimerrenzfläche und  $\Delta^iG$  wurden gemäß den

Angaben vom „Protein interfaces, surfaces and assemblies“ Service PISA am Europäischen Institut für Bioinformatik (141) bezogen.

Der Vergleich von Proteinstrukturen erfolgte mittels strukturellem Alignment der Software PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC).

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Vergleich der Sekundärstruktur von HAD-Hydrolasen

Die Suche bei The Protein Data Bank (siehe 2.2.23) nach HAD-Hydrolasen, von denen zahlenmäßig die HAD-Phosphatasen die größte Gruppe darstellen, ergab insgesamt 186 Einträge, für die die dreidimensionale Struktur bekannt ist (siehe Tabelle 5 und Anhang, Tabelle 8). 108 (~58%) davon sind vermutlich Homooligomere, 77 (~41%) Monomere und ein Protein geht ein Heterodimer ein. Während bei publizierten Datensätzen von unselektierten Oligomeren mit Vertretern aus verschiedenen Proteinfamilien mehr als 60% als Dimer vorliegen (168), machen bei HAD-Hydrolasen Dimere 71 % (n=77) der Gesamtzahl an Oligomeren (n=109) aus. In der Familie der HAD-Hydrolasen scheinen Dimere somit in repräsentativer Weise vertreten zu sein. Die nähere strukturelle Unterscheidung der HAD-Hydrolasen hinsichtlich ihrer Cap-Domänen ergab, dass bei HAD-Hydrolasen mit C1-Cap-Domänen annähernd die Hälfte der Vertreter (~45%, n=44) als Monomere vorliegt. Demgegenüber liegen Proteine mit einer C2a-Cap-Domäne ausschließlich als Oligomere vor, nämlich als Dimere (n=12) oder Tetramere (n=6).

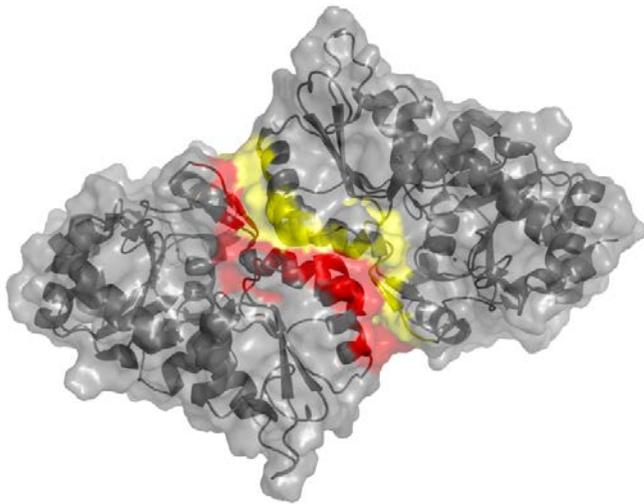
**Tabelle 5: Zuordnung von Cap-Typ und Quartärstruktur von strukturbestimmten HAD-Hydrolasen**

	C0	C1	C1+C2	C2a	C2b	Gesamt
Monomer	11	44	6		16	77
Dimer	3	44	6	12	11	76
Heterodimer	-	1	-	-	-	1
Trimer	-	2	-	-	-	2
Tetramer	12	4	-	6	1	23
Hexamer	-	1	-	-	-	1
Oktamer	4	1	-	-	-	5
Dodekamer	-	1	-	-	-	1
Summe	30	98	12	18	28	186

### 3.2 Grundlagen der Mutagenese in der Dimerisierungsgrenzfläche

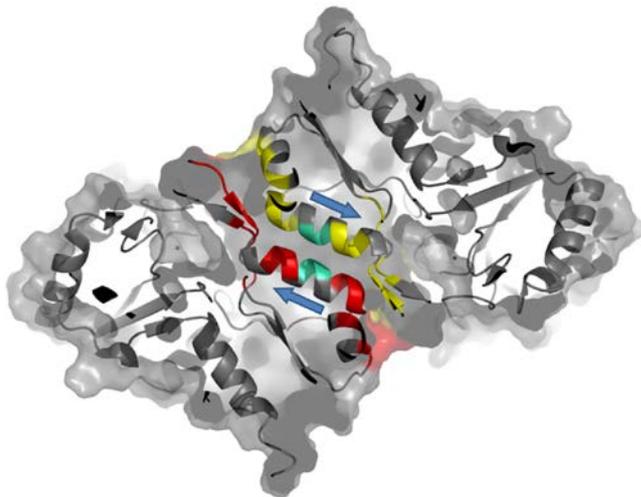
Um die Dimerisierung von Chronophin näher zu untersuchen, rückten die für die Dimerisierung verantwortlichen Aminosäuren und die Oberfläche, die durch die Dimerisierung von den beiden Untereinheiten bedeckt wird, die Dimerergrenzfläche, oder auch Dimer-Interface genannt, in den Fokus. Im Bereich des Dimer-Interfaces findet die Interaktion der beiden Untereinheiten statt und hier sollte versucht werden, durch Punktmutationen die Dimerisierung von Chronophin zu stören, um eine konstitutiv monomere Chronophin-Mutante zu erhalten. Im Fall von murinem Chronophin (PDB: 4BX3) bilden 257 Aminosäuren von insgesamt 292 Aminosäuren die Proteinoberfläche, während die verbleibenden 35 Aminosäuren nicht oberflächengebend sind. Bei einer Gesamtproteinoberfläche eines Chronophinmoleküls von  $13356 \text{ \AA}^2$  nimmt das Dimer-Interface mit 29 Aminosäuren (siehe Abbildung 17) eine Fläche von  $992 \text{ \AA}^2$  ein, somit also einen Anteil von etwa 7,4% der Gesamtoberfläche. Dabei kommt zwei Alaninen an Position 194 und 195 in der Aminosäureabfolge eine besondere Stellung zu. Sie befinden sich in einer  $\alpha$ -Helix, die der antiparallel verlaufenden  $\alpha$ -Helix der zweiten Untereinheit im Homodimer direkt gegenüber (siehe Abbildung 16), also nahe dem Symmetriezentrum liegt.

Ein Aminosäureaustausch in diesem Bereich muss vor allem gewährleisten, dass die Sekundärstruktur, also in diesem Fall die  $\alpha$ -Helix, erhalten bleibt. Ebenso sollte die Mutation nicht andere derart grundlegende Konformationsveränderungen der Proteinstruktur zur Folge haben, dass durch eine Fehlfaltung des Proteins keinerlei Rückschlüsse mehr über die Dimerisierung oder sonstige funktionelle Eigenschaften von Chronophin getroffen werden können.



**Abbildung 15: Chronophytinhomodimer in Oberflächendarstellung.**

Für Untereinheit A ist das Dimerengrenzfläche rot eingefärbt, für Untereinheit B gelb. Diese kolorierten Bereiche repräsentieren die Kontaktflächen, entlang derer die Protein-Protein-Interaktion der Untereinheiten stattfinden, die schließlich für die Dimerisierung verantwortlich sind. PDB: 4BX3.



**Abbildung 16: Chronophytinhomodimer in Schnittbilddarstellung.**

Schnittbilddarstellung von Abbildung 16 mit den alpha-Helices von <sup>188</sup>Glycin bis <sup>201</sup>Glycin als Teil der jeweiligen in Gelb und Rot unterschiedenen Dimerengrenzflächen. Die blauen Pfeile repräsentieren die Orientierung der Aminosäurekette von N-terminal nach C-terminal und verdeutlichen die antiparallele Orientierung der  $\alpha$ -Helices. In Cyan sind die Lokalisationen von <sup>194</sup>Alanin und <sup>195</sup>Alanin markiert, die sich genau gegenüber liegen und somit geeignete Aminosäurereste für die Mutagenese darstellen. PDB: 4BX3 (modifiziert).

Die Alanine an Position 194 und 195 (siehe Abbildung 17) zu substituieren, erschien aufgrund der in Abbildung 16 ersichtlichen antiparallelen Lage im Bereich der Drehachse der bei Homooligomeren vorherrschenden C2-Symmetrie (168, 169) hierfür als vielversprechendste Variante. Eine

Substitution der Alanine durch Lysine versprach aus zwei Gründen, die Dimerisierung an dieser Stelle zu inhibieren: Lysine sind mit einem typischen  $pK_s = 10,8$  der  $\epsilon$ -Aminogruppe (170) bei einem intrazellulären pH-Wert von typischerweise etwa 7,2 (171) positiv geladen. Neben der dadurch herrschenden elektrostatischen Abstoßung der sich gegenüberliegenden Lysine könnte andererseits auch die alleinige Größe der Lysine eine Annäherung der Homodimeruntereinheiten erschweren. So nimmt ein Alanin ein Van-der-Waals Volumen von  $67 \text{ \AA}^3$ , ein Lysin hingegen von  $135 \text{ \AA}^3$  ein (172). Die tatsächliche Relevanz dieser Überlegungen zeigt sich auch in der vorherrschenden relativen Unterrepräsentation von Lysinen in Dimer-Interfaces im Vergleich zur Gesamtheit der in Proteinen vorkommenden Aminosäuren (173).

#### A mCIN WT

<sup>144</sup>VGYDEQFSFS RLTEACAHLR DPDCLLVATD RDPWHPLSDG SRTPGTGSLA AAVETASGR<sup>202</sup>

#### B mCIN A194K/A195K

<sup>144</sup>VGYDEQFSFS RLTEACAHLR DPDCLLVATD RDPWHPLSDG SRTPGTGSLA KKVETASGR<sup>202</sup>

#### Abbildung 17: Aminosäuresequenz der Dimerrenzfläche von mCIN.

(A) mCIN WT und (B) mCIN A194K/A195K. Die an der Dimerbildung beteiligten Aminosäuren, die das sogenannte Dimer-Interface bilden, sind gelb hinterlegt. In (B) sind die mutierten Aminosäuren Lysin194 und Lysin195 blau gekennzeichnet.

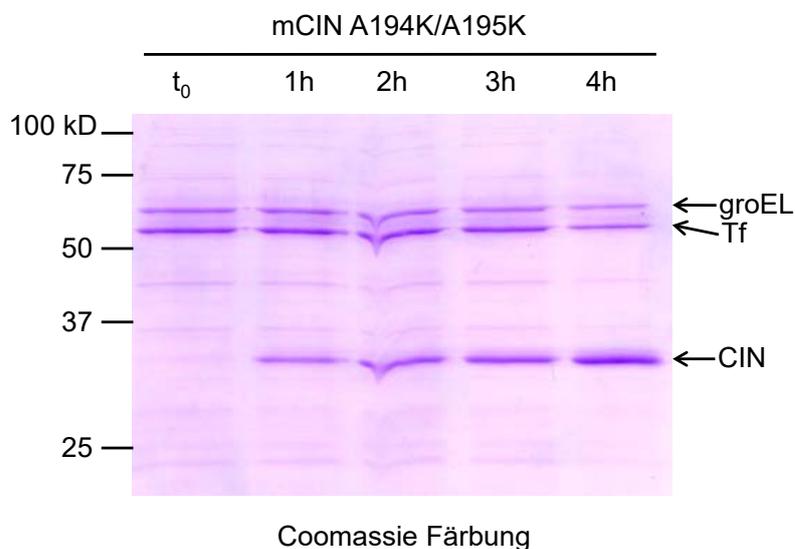
### 3.3 Untersuchungen über die Dimerisierung der Mutante mCIN A194K/A195K im Vergleich zu mCIN WT

#### 3.3.1 Metallaffinitätschromatographie

Als Expressionssystem für das mittels ortsspezifischer Mutagenese (siehe 2.2.8.1) generierte Konstrukt pETM-11 mCIN A194K/A195K dienten *Escherichia coli* BL21 pG-Tf2. Dieser speziell für Proteinexpression geeignete Stamm enthält, auf dem pG-Tf2 Plasmid kodiert, zusätzlich die Chaperone GroEL mit einer molekularen Masse von 60 kDa, GroES von 10 kDa und Tf von 56 kDa (Werte als Näherung gemäß Herstellerangaben). Während GroEL und GroES im Komplex einen Hohlraum bilden, in dem ATP-abhängig missgefaltete Proteine in ihre native Konformation gebracht werden (174, 175), sorgt Tf durch die kotranslationale Anlagerung an das Ribosom für eine korrekte Faltung

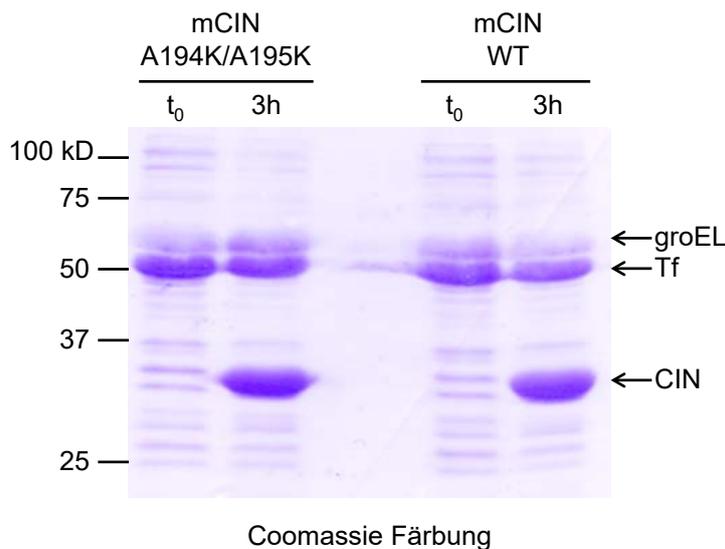
(176). Somit sollte die regelrechte Proteinfaltung und damit auch die ausreichende Löslichkeit der Chronophin A194K/A195K Mutante sichergestellt werden.

Die Proteine mCIN A194K/A195K und mCIN WT wurden, wie in 2.2.14 beschrieben, exprimiert. Wie in Abbildung 18 zu sehen, gelang die Induktion der Expression von mCIN A194K/A195K mit IPTG. Auch im Vergleich mit mCIN WT zeigte mCIN A194K/A195K eine regelhafte Expression (siehe Abbildung 19) nach 3 Stunden.



**Abbildung 18: SDS-Gel der Überexpression von mCIN A194K/A195K, groEL, groES sowie Tf in *E.coli* BL21 pG-Tf2.**

Die Induktion der Koexpression von groEL (60 kDa), groES (10 kDa, hier aufgrund der niedrigen molekularen Masse bereits aus dem Gel ausgetreten) und Tf (56 kDa) in *E.coli* BL21 pG-Tf2 erfolgte bereits mit dem Animpfen der Expressionskulturen mit Tetrazyklin (10 ng/μl). Die Überexpression von mCIN A194K/A195K wurde zum Zeitpunkt t<sub>0</sub> bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6-1,0 durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. In stündlichem Abstand wurden Proben entnommen, deren Volumina sich umgekehrt proportional zur OD<sub>600</sub> verhielten (OD<sub>600</sub> t<sub>0</sub>=0,680; t<sub>1</sub>=0,902; t<sub>2</sub>=1,014; t<sub>3</sub>=1,096; t<sub>4</sub>=1,805; Probenvolumina t<sub>0</sub>=14,7 μl; t<sub>1</sub>=11,1 μl; t<sub>2</sub>=9,9 μl; t<sub>3</sub>=9,1 μl; t<sub>4</sub>=5,5 μl). Die Proben wurden mit dem entsprechend doppeltem Volumen Laemmli-Puffer (2x) komplett auf einem Polyacrylamidgel 12 % aufgetragen, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie Färbelösung gefärbt.



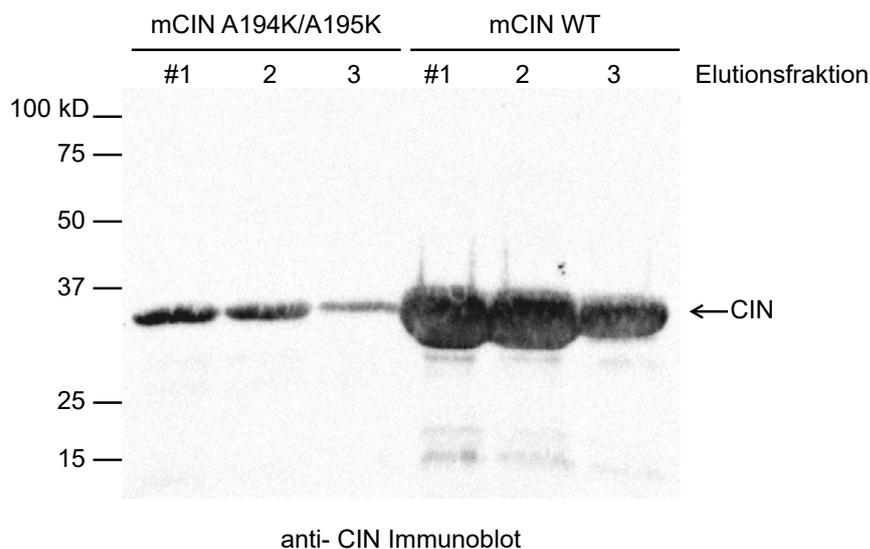
**Abbildung 19: SDS-Gel der Überexpression von mCIN A194K/A195K und mCIN WT in *E. coli* BL21 pG-Tf2 im Vergleich.**

Die Induktion der Expression von groES, groEL und Tf erfolgte mit 10 ng/μl Tetrazyklin bei dem Animpfen der Kulturen. Die Expression von mCIN A194K/A195K und mCIN WT wurde zum Zeitpunkt  $t_0$  durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet. Zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t=3h$  wurden jeweils 1ml der Bakteriensuspension abgenommen, abzentrifugiert und das Pellet in Laemmli-Puffer (1x) auf eine  $OD_{600}=10$  gebracht. Es wurden davon je 10 μl auf ein SDS-Gel 12 % aufgetragen, das anschließend mit Coomassie-Färbelösung gefärbt wurde. Nach einer Expressionszeit von  $t=3h$  zeigten sowohl mCIN 194K/A195K und mCIN WT vergleichbare Expressionsstärken.

Mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine Aussage über die generelle Expression eines Proteins möglich, da die *E. coli*-Zellen während der Probenvorbereitung aufgeschlossen und die Proteine denaturiert werden.

Um genauer zwischen löslichem und unlöslichem, möglicherweise missgefaltetem Chronophin unterscheiden zu können, wurden die Proteine mittels TALON® Metal Affinity Resin der Firma Clontech aufgereinigt (siehe 2.2.15). Dies ist ein Verfahren der Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC), einer Metallaffinitätschromatographie, bei der mit einem Poly-His-Tag versehene Proteine in Lösung über ihre Interaktion mit  $Co^{2+}$  spezifisch aufgereinigt werden können. Die Proteinbindung findet an Sepharosekügelchen statt, an deren Oberfläche  $Co^{2+}$  Ionen mittels Chelatkomplexbildnern gebunden sind. Diese Methode eignet sich zur Aufreinigung kleiner Kulturvolumina und lässt über die Konzentration der Proteine durch den Aufreinigungsprozess unter nativen Bedingungen einen Rückschluss auf deren Löslichkeit zu. Im Zytosol der Zelle vorliegende Proteine können so nach Zellaufschluss über die Bindung

an Sepharosekügelchen nachgewiesen werden, während unlösliche und in Einschlusskörperchen vorkommende Proteine durch Zentrifugation entfernt werden. Im Fall von mCIN A194K/A195K war im Western-Blot nach der Metallaffinitätschromatographie eine im Vergleich zu mCIN WT verminderte Signalstärke (Abbildung 20) bei vergleichbarer Expressionsstärke (siehe Abbildung 19) auffällig, was als Hinweis darauf dienen konnte, dass die mCIN A194K/A195K Mutante vermehrt in Einschlusskörperchen vorlag und sich so teilweise der löslichen Fraktion entzog.



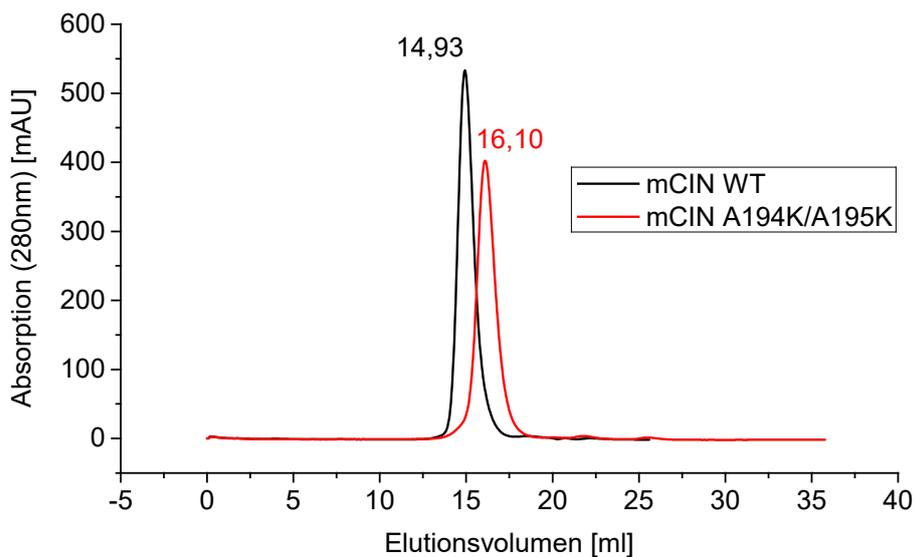
**Abbildung 20: anti-CIN Immunoblot der Elutionsfraktionen einer Talonaufreinigung von mCIN A194K/A195K und mCIN WT.**

Aufgetragen sind die Elutionsfraktionen einer Talonaufreinigung aus identischen Ausgangsvolumina mit einem gesamten Elutionsvolumen von 3 ml je Aufreinigung. Aufgrund der abnehmenden Proteinkonzentration bei steigenden Elutionsvolumina wurden für die Elutionsfraktion 1 5 µl, für die Elutionsfraktion 2 15 µl und für die Elutionsfraktion 3 20 µl abgenommen und mit Laemmli-Puffer (4x) mittels SDS-Page und anschließendem Western-Blot analysiert. Die Inkubation erfolgte mit Anti- Chronophin/ PDXP (C85E3)- Antikörper. Die im Vergleich größere Signalintensität bei mCIN WT spricht für eine geringere Löslichkeit von mCIN A194K/A195K bei vergleichbarer Expression nach 3 h (siehe Abbildung 19).

### 3.3.2 Größenausschlusschromatographie

Trotz der geringeren Löslichkeit der mCIN A194K/A195K und der Tendenz des Proteins auszufallen waren die Proteinmengen nach Zusammenführen der Elutionsfraktionen aus der Metallaffinitätschromatographie für eine weitere Analyse ausreichend. Um zu untersuchen, ob es sich bei der mCIN A194K/A195K Mutante wie bei mCIN WT um ein Homodimer handelte, oder ob

die zweifache Aminosäuresubstitution ausreichend war, um die Dimerisierung zu stören, wurden beide Proteine chromatographisch analysiert. Als Methode der Wahl diente die Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex™ 200 10/300 GL Säule. Der Vergleich des Elutionsverhaltens von mCIN WT und mCIN A194K/A195K zeigte eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 14,93 ml für mCIN WT auf 16,10 ml für mCIN A194K/A195K (siehe Abbildung 21). Eine Umrechnung des Elutionsvolumens in molekulare Masse ergab für mCIN WT 60,7 kDa (theoretischer Wert für ein mCIN Dimer inklusive Poly-His-Tag:  $2 \times 34,8 \text{ kDa} = 69,6 \text{ kDa}$ ) und für mCIN A194K/A195K 34,7 kDa (theoretischer Wert für Monomer inklusive Poly-His-Tag: 34,9 kDa). Somit lag ein erster Anhaltspunkt für ein Vorliegen einer monomeren Chronophin-Mutante im Fall von mCIN A194K/A195K vor.



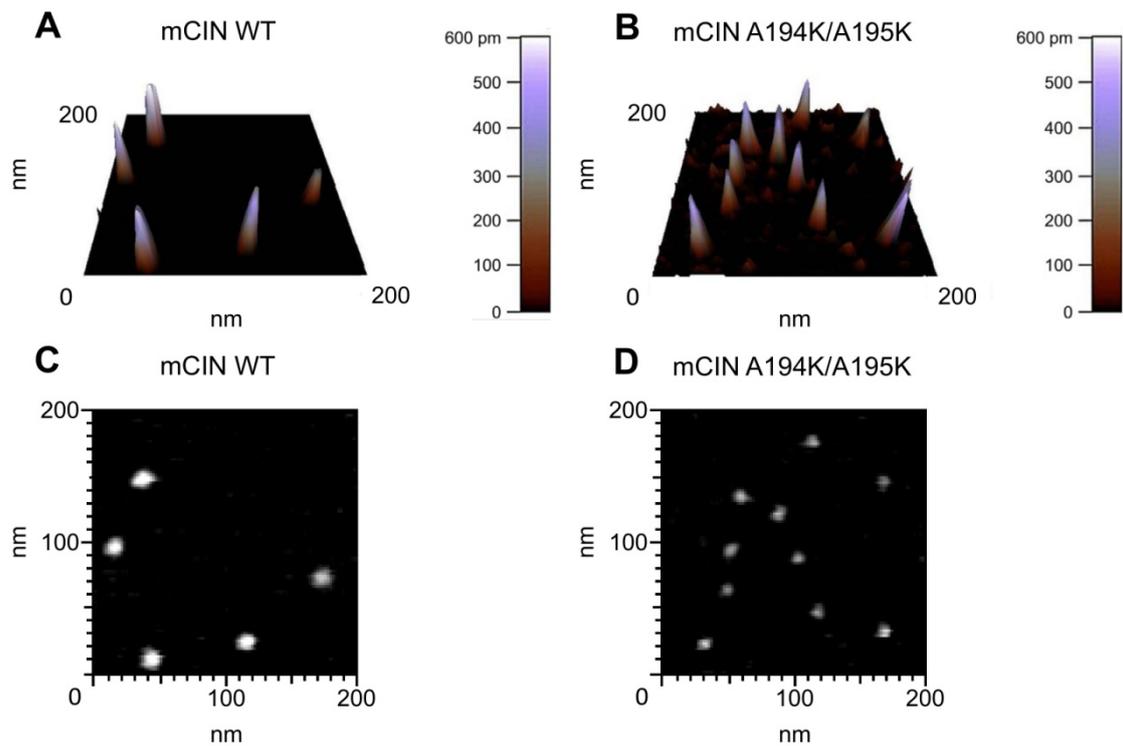
	Absorptionsmaximum	Molekulare Masse
mCIN WT	14,93 ml	60,7 kDa
mCIN A194K/A195K	16,10 ml	33,7 kDa

**Abbildung 21: Vergleichende graphische Darstellung des Elutionsverhaltens von mCIN WT und mCIN A194K/A195K.**

Dargestellt ist die Absorption in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen einer Superdex™ 200 10/300 GL Größenausschlusschromatographiesäule für mCIN WT und mCIN A194K/A195K. Beide Proteine wurden in Elutionspuffer (TEA 50 mM, NaCl 250 mM, Imidazol 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) gelöst aufgetragen und mit TNM-Puffer (TEA 50 mM, NaCl 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) eluiert. Die Verschiebung des Elutionsmaximums von mCIN WT 14,93 ml auf mCIN A194K/A195K 16,10 ml als Ausdruck einer geringeren molekularen Masse spricht für das Vorliegen eines Monomers.

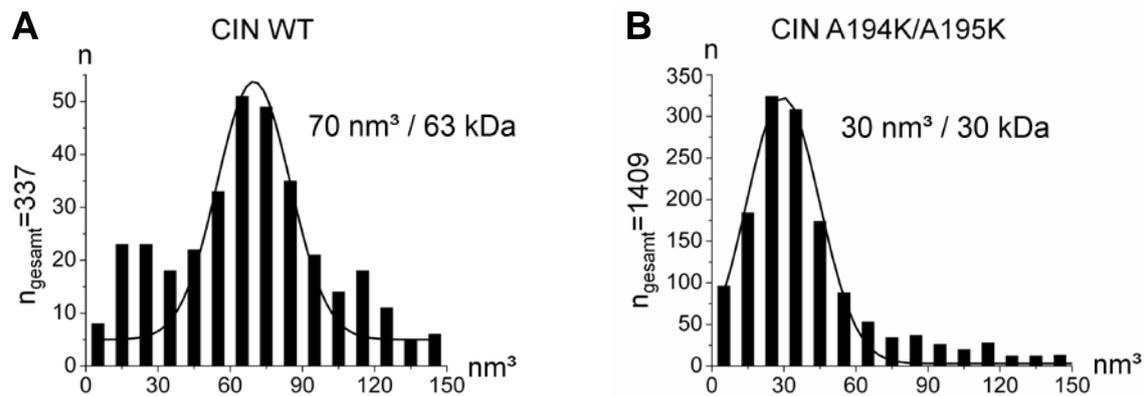
### 3.3.3 Rasterkraftmikroskopie

Durch Zusammenarbeit mit Dr. Ingrid Tessmer am Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg, konnten mCIN WT und mCIN A194K/A195K mithilfe der Rasterkraftmikroskopie analysiert werden. Dieses Verfahren erlaubt eine indirekte Betrachtung von Proteinen, indem, stark vereinfacht gesagt, eine sehr feine, oszillierende Nadelspitze, der sogenannte Cantilever, in Schwingung versetzt wird (siehe Schema in Abbildung 10) und an das Protein angenähert wird. Die zwischen dem Cantilever und dem Protein wirkenden Kräfte werden registriert und ausgeglichen, so dass die Schwingung des Cantilevers konstant bleibt. Somit kann eine Oberflächendarstellung der abgerasterten Oberfläche erstellt werden (siehe Abbildung 22). Im Fall von mCIN WT und mCIN A194K/A195K konnte hierbei ein großer Unterschied bezüglich der vom Protein eingenommenen Fläche in xy-Richtung und der Höhe der Proteine in z-Richtung gemessen werden. Das daraus resultierende weitaus geringere Molekülvolumen von  $30 \text{ nm}^3$  für mCIN A194K/A195K im Vergleich zu  $70 \text{ nm}^3$  für mCIN WT bestätigte erneut die Monomerisierung der mCIN A194K/A195K Mutante. Auch umgerechnet in molekulare Masse wiesen  $30 \text{ kDa}$  für mCIN A194K/A195K (theoretisch zu erwartende molekulare Masse ohne Hexa-His-Tag:  $31,9 \text{ kDa}$ ) und  $63 \text{ kDa}$  für mCIN WT (theoretisch zu erwartende molekulare Masse ohne Hexa-His-Tag:  $2 \times 31,8 \text{ kDa} = 63,6 \text{ kDa}$ ) den Wildtyp als Dimer und die Mutante als Monomer aus (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 22: Flächen- und Höhenausdehnung von mCIN WT- und mCIN A194K/A195K Molekülen in der Rasterkraftmikroskopie.**

Die Abbildungen (A) für mCIN WT und (B) für mCIN A194K/A195K, zeigen jeweils die dreidimensionale Darstellung eines Ausschnitts von 200 nm x 200 nm (Proteinkonzentration 500 nM). Die Peaks (A,B) sind in ihrer Höhe in z-Richtung farblich kodiert. Auf den Abbildungen (C) und (D) sind die jeweiligen Entsprechungen in zweidimensionaler Darstellung dargestellt. Hier werden die größeren Flächen, die die mCIN WT Moleküle im Vergleich zu mCIN A194K/A195K in der xy-Ebene der abgerasterten Oberfläche einnehmen, deutlich.



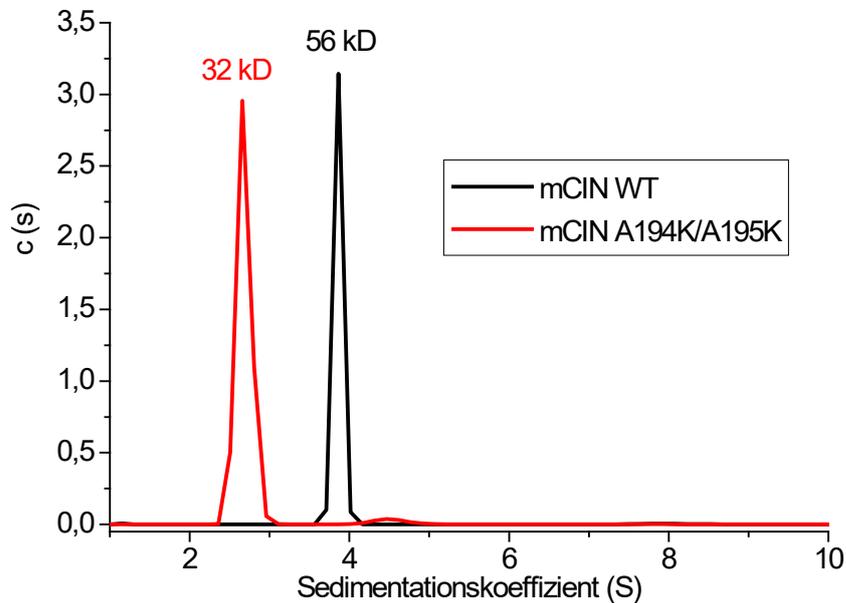
**Abbildung 23: Häufigkeitsverteilung der errechneten Molekülvolumina für mCIN WT und mCIN A194K/A195K.**

Als Balken sind die Häufigkeiten der ermittelten Molekülvolumina (siehe 2.2.19) in einem Bereich von 0-150 nm<sup>3</sup> dargestellt. Die angenommene Normalverteilung wird durch eine durchgehende Linie repräsentiert. Die Daten wurden in Triplikaten einer abgetasteten Fläche von 2 µm x 2 µm bei einer Proteinkonzentration von je 500 nM erhoben. Für mCIN WT (A) liegt das am häufigsten gemessene Molekülvolumen bei 70 nm<sup>3</sup>, also umgerechnet 63 kDa. Es sind auch Proteinvolumina vorhanden, die auf eine monomere Zustandsform hinweisen. Für mCIN A194K/A195K (B) liegt das häufigste Molekülvolumen bei 30 nm<sup>3</sup>, umgerechnet 30 kDa.

### 3.3.4 Analytische Ultrazentrifugation

Ebenfalls dank einer Kooperation mit Dr. Ingrid Tessmer vom Rudolf-Virchow-Zentrum Würzburg konnten mCIN WT und mCIN A194K/A195K mittels der analytischen Ultrazentrifugation (siehe 2.2.20) untersucht werden. Es wurden von mCIN WT und von mCIN A194K/A195K Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe durchgeführt, um aus den Messungen die molekulare Masse und auch die Molekülform ableiten zu können. Das Reibungskoeffizientenverhältnis  $f/f_0$ , das den Reibungskoeffizienten  $f$  mit dem eines nicht hydratierten, sphärischen Makromoleküls gleicher Molekülmasse  $f_0$  vergleicht, wich im Fall von mCIN A194K/A195K mit 1,34 nur geringfügig vom Wert für mCIN WT mit 1,32 ab. Ein Reibungskoeffizientenverhältnis von 1,0 steht für eine perfekte Kugelform, mit steigendem Wert nimmt die Asymmetrie zu. Beide Makromoleküle wiesen somit eine ähnlich globuläre Form auf. Diese Beobachtung ist auch mit den Strukturdaten des mCIN WT Homodimers (PDB: 4BX3, Strukturaufklärung von Gunnar Knobloch, (57)) konsistent. Wie in Abbildung 24 ersichtlich, unterschieden sich die errechneten molekularen Massen zwischen mCIN WT und mCIN A194K/A195K deutlich. Während mCIN

WT mit 56 kDa erneut im Bereich der zu erwartenden molekularen Masse für ein Dimer lag, entsprach die molekulare Masse von mCIN A194K/A195K mit 32 kDa abermals der zu erwartenden molekularen Masse eines Monomers.

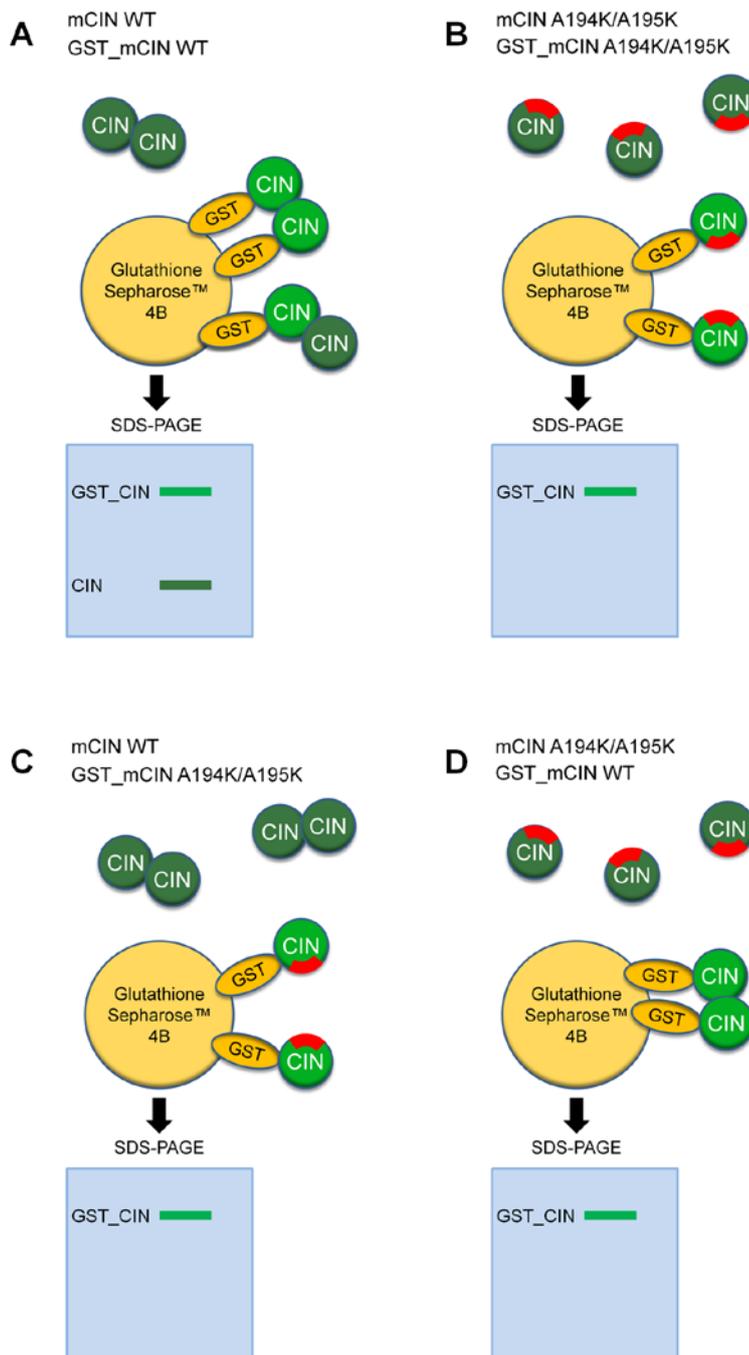


**Abbildung 24: Verteilungen der Sedimentationskoeffizienten von mCIN WT und mCIN A194K/A195K aus einem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf.**

Gezeigt ist die Verteilung des Sedimentationskoeffizienten  $c(s)$  als Lösungen der Lamm-Gleichung in Abhängigkeit vom berechneten Sedimentationskoeffizienten. Die Umwandlung in eine Massenverteilung ergab für mCIN WT 56 kDa, für mCIN A194K/A195K 32 kDa.

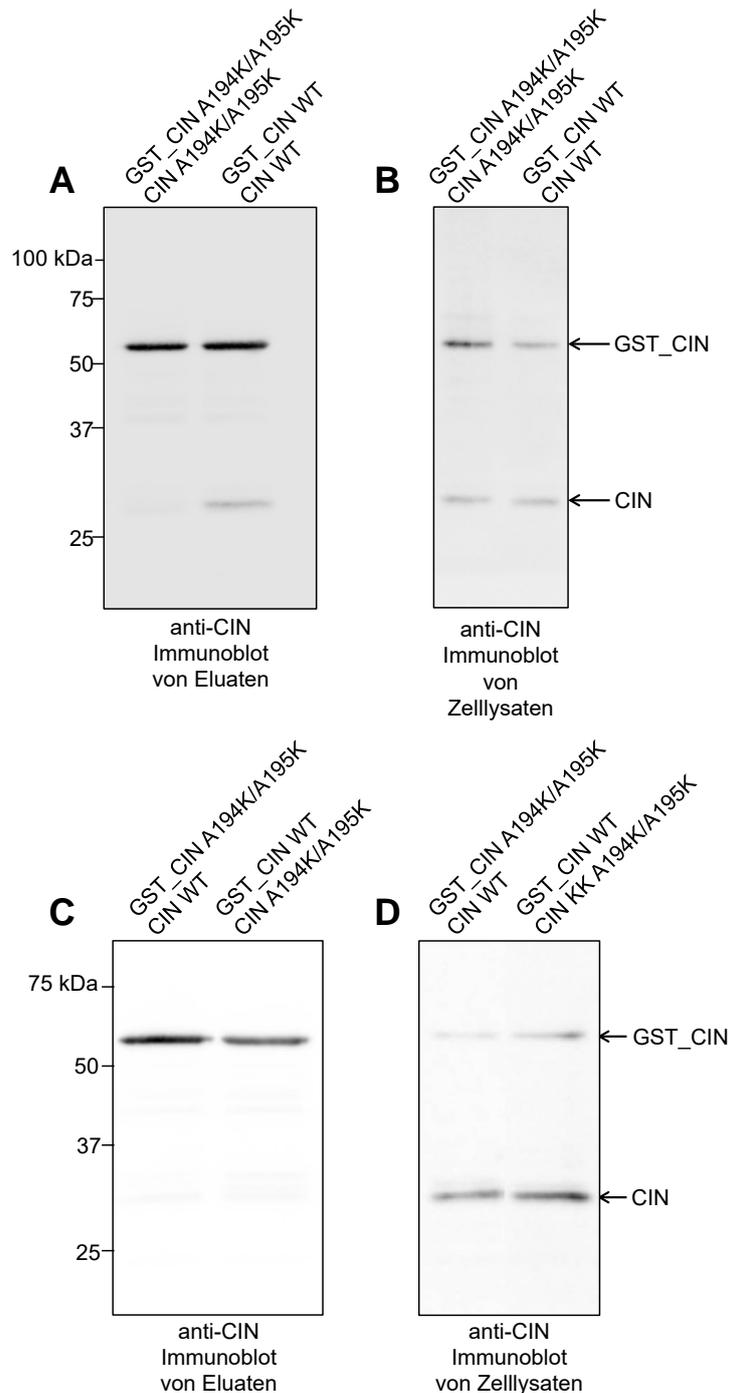
### 3.3.5 GST-Pulldown-Assay

Wie in 2.2.2 beschrieben stellt der GST-Pulldown-Assay eine Möglichkeit dar, die Dimerisierung von mCIN in Zellen zu untersuchen. Mit Glutathion-S-Transfersase (GST) gekoppeltes mCIN wurde mit ungekoppeltem mCIN in HEK AD-293-Zellen kotransfiziert. Abschließend wurden die Lysate mit Glutathione Sepharose™ 4B, also mit Glutathion kovalent verbundenen Sepharosekügelchen, inkubiert. Daraufhin wurden die gebundenen Proteine eluiert und mittels SDS-Page und Immunoblot analysiert. In Einklang mit den vorherigen Ergebnissen des aufgereinigten Proteins aus Chromatographie, Rasterkraftmikroskopie und Analytischer Ultrazentrifugation war zu erwarten, dass die Dimerisierung von mCIN WT zu einer Kopräzipitation von ungekoppeltem mCIN führen würde, die, falls mCIN A194K/A195K als Monomer vorläge, ausbliebe. Um zu untersuchen, ob bereits die Mutation eines Bindungspartners der Dimerisierungsdomäne die Assoziation zu einem Dimer mit einer mCIN WT Untereinheit inhibieren würde, wurden zudem die Kombinationen GST-gekoppeltes mCIN WT mit ungekoppeltem mCIN A194K/A195K und GST-gekoppeltes mCIN A194K/A195K mit ungekoppeltem mCIN WT transfiziert (siehe Abbildung 25).



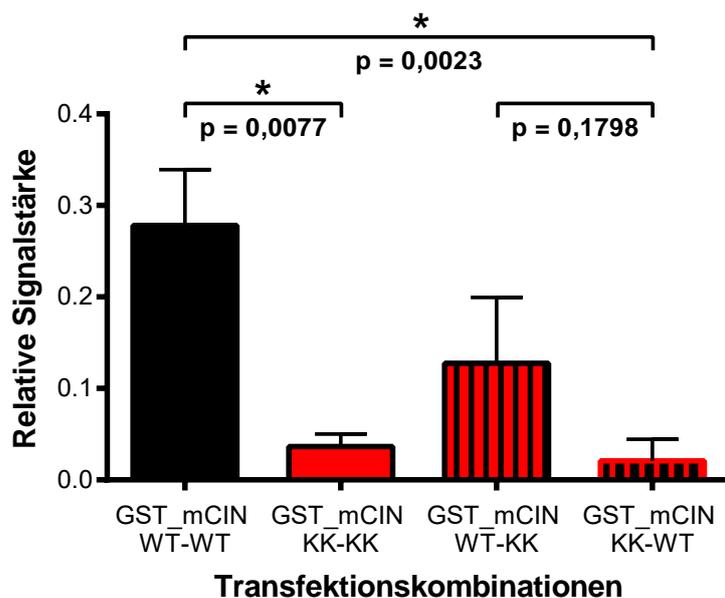
**Abbildung 25: Schema des GST-Pulldown-Assays und Interpretation der SDS-PAGE der in Abbildung 26 gezeigten Eluate.**

Dargestellt sind die jeweiligen Expressionskombinationen aus ungekoppeltem CIN (dunkelgrüne Kugeln) und GST-gekoppeltem CIN (hellgrüne Kugeln mit gelbem GST-Tag) und die Bandenmuster in der SDS-PAGE der Eluate aus Abbildung 26 (zur Verdeutlichung entsprechend hell- oder dunkelgrün gefärbt) (A-D) Die A194K/A195K-Mutation ist durch ein rotes Ringsegment dargestellt (B-D). Bei einer Dimerisierung in (A) sind in einer SDS-PAGE Banden für GST\_CIN und für das über die Dimerisierung kopräzipitierte ungekoppelte CIN nachzuweisen. In den übrigen Fällen verhindert die A194K/A195K-Mutation die Dimerisierung (B-D) und es ist in der SDS-PAGE lediglich eine Bande für das gebundene GST\_CIN nachweisbar, da ungebundene Proteine durch Waschschrte entfernt wurden.



**Abbildung 26: Immunoblots der Eluate und Lysate des GST-Pulldown-Assays.**

(A) anti-CIN Immunoblot von Eluaten (je 20 µl) des GST-Pulldowns: Lysate der Transfektionskombinationen GST\_mCIN A194K/A195K mit mCIN A194K/A195K und GST\_mCIN WT mit mCIN WT wurden mit GSH-Sepharose Kügelchen inkubiert und die gebundenen Proteine anschließend eluiert. (B) Immunoblot der entsprechenden Lysate (je 20 µl) vor Inkubation mit GSH-Sepharose Kügelchen. (C) Versuchsaufbau wie in (A) von den Kombinationen GST\_mCIN A194K/A195K mit mCIN WT und GST\_mCIN WT mit mCIN A194K/A195K. (D) Immunoblot der entsprechenden Lysate (je 20 µl) vor Inkubation mit GSH-Sepharose Kügelchen. Die zu erwartenden molekularen Massen im SDS-Page lagen für mCIN und mCIN A194K/A195K bei 32 kDa, für GST\_mCIN WT und GST\_mCIN A194K/A195K bei 59 kDa. Eine Unterscheidung von mCIN WT und mCIN A194K/A195K ist im Immunoblot nicht möglich



**Abbildung 27: Densitometrische Auswertung der GST-Pulldown Eluate.**

Dargestellt sind die relativen Signalstärken der Banden von ungekoppeltem Chronophin aus dem Versuchsaufbau aus Abbildung 25 mit den Transfektionskombinationen GST\_mCIN WT mit mCIN WT (schwarzer Balken), GST\_mCIN A194K/A195K mit mCIN A194K/A195K (Mutation jeweils als KK abgekürzt, roter Balken) sowie GST\_mCIN WT mit mCIN KK (schwarz-roter Balken) und GST\_mCIN KK mit mCIN WT (rot-schwarzer Balken) jeweils normalisiert auf die Intensität der zugehörigen GST\_mCIN Banden (nicht dargestellt). Es besteht ein signifikanter Unterschied ( $p=0,0077$ ) zwischen den Transfektionskombinationen GST\_mCIN WT-WT und GST\_mCIN KK-KK als Ausdruck einer geringeren Kopräzipitation des freien mCIN A194K/A195K an GST-gekoppeltem mCIN A194K/A195K und somit Hinweis auf ein Ausbleiben einer Dimerisierung bei mCIN A194K/A195K. Ebenso zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Kombinationen GST\_mCIN WT-WT mit GST\_mCIN KK-WT ( $p=0,0023$ ), was Hinweis darauf ist, dass bereits die Mutation eines Bindungspartners ausreicht, die Dimerisierung zu stören. Die unerwartet unterschiedlich hohen Signalstärken für GST\_mCIN WT-KK im Vergleich zu GST-mCIN KK-WT sind möglicherweise durch endogen in den HEK-Zellen exprimiertes Chronophin zu erklären, das an das GST\_mCIN WT bindet, im SDS-PAGE nicht von mCIN A194K/A195K unterschieden werden kann und so einen Signalanstieg verursacht. Dieser Unterschied ( $p=0,1798$ ) war jedoch ebenso wie die Vergleiche der übrigen Transfektionskombinationen untereinander (nicht dargestellt) nicht signifikant. Die Versuche wurden unabhängig voneinander wiederholt ( $n=4$  für GST\_mCIN WT-WT und GST\_mCIN KK-KK und  $n=5$  für GST\_mCIN WT-KK und GST-mCIN KK-WT), die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test, die post-hoc Anpassung des p-Wertes erfolgte nach Bonferroni mit einem adjustierten Signifikanzniveau von 0,0083, die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

Wie in Abbildung 26A gezeigt, konnte bei der Transfektionskombination GST\_mCIN WT mit mCIN WT eine Kopräzipitation von mCIN WT durch die Dimerisierung mit GST\_mCIN WT nachgewiesen werden. Hingegen konnte bei der Kombination GST\_mCIN A194K/A195K mit mCIN A194K/A195K nur eine

sehr geringe Signalintensität für ungekoppeltes mCIN detektiert werden, das heißt es hatte keine relevante Interaktion zwischen dem an den Sepharosekügelchen immobilisierten GST\_mCIN A194K/195K und dem ungekoppelten mCIN A194K/A195K stattgefunden (siehe Schema in Abbildung 25B). Die zugehörigen Lysate in Abbildung 26B zeigen die vergleichbaren Expressionsstärken der mit den Glutathione Sepharose™ 4B inkubierten Lysate. Die densitometrische Auswertung der Intensitäten aus mehreren Pulldown-Experimenten in Abbildung 27 zeigt, dass ein signifikanter Unterschied ( $p=0,0077$ ) zwischen den CIN-Banden für die Kombination GST\_mCIN WT mit mCIN WT und GST\_mCIN A194K/A195K mit mCIN A194K/A195K besteht (Abbildung 27). Er ist Ausdruck der fehlenden Dimerisierung der mCIN A194K/A195K-Mutante.

In Abbildung 26C/D ist eine Abwandlung des Experiments zu sehen. Hier wurde überprüft, ob bereits die Mutation eines Bindungspartners ausreichend ist, die Dimerisierung in Zellen zu stören. Die signifikant niedrigeren Signalintensitäten des ungekoppelten Chronophins bei der Kombination GST\_mCIN A194K/195K mit mCIN WT im Vergleich zu GST\_mCIN WT mit mCIN WT ( $p=0,0023$ ) legen nahe, dass bereits die Mutation eines Bindungspartners eine Störung der Dimerisierung zur Folge hat. Die im Vergleich, wenn auch nicht signifikant, unerwartet höheren Signalintensitäten für die Kombination GST\_mCIN WT mit mCIN A194K/A195K im Vergleich zu GST\_mCIN A194K/195K mit mCIN WT können durch eine Dimerisierung von endogen in den HEK-Zellen exprimiertem, humanem Wildtyp-Chronophin mit GST\_mCIN WT erklärt werden, das im SDS-PAGE nicht von mCIN A194K/A195K unterschieden werden kann und so möglicherweise einen Signalanstieg bewirkt.

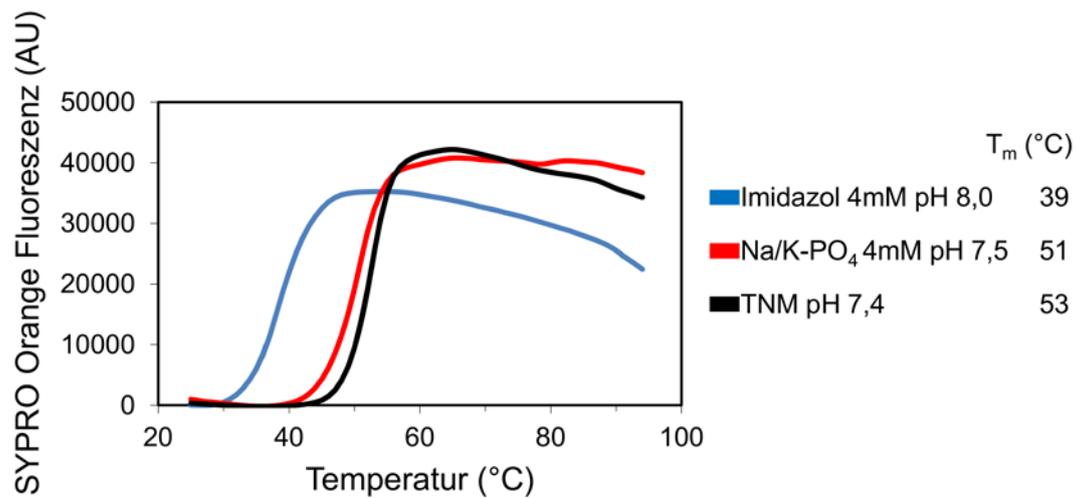
Zusammenfassend wurden die Beobachtungen *in vitro*, wo die Mutation A194K/A195K für eine Monomerisierung von Chronophin sorgte, auch im Zellexperiment bestätigt.

### 3.4 Thermofluor zur Verbesserung der Pufferbedingungen

Die Puffer, in denen rekombinante Enzyme wie mCIN A194K/A195K und mCIN WT aufgereinigt oder auch aufbewahrt werden, sind entscheidend für deren Aktivität und Löslichkeit. Geladene Aminosäurereste in der Sequenz sind ein Grund für den Zusammenhang zwischen pH-Wert und korrekter Faltung eines Proteins. Neben dem pH-Wert kann auch die Wahl der Puffersubstanz und möglicher Additiva die Aktivität und Konformation beeinflussen. Um die Anwendbarkeit der zuvor von Gunnar Knobloch für mCIN WT etablierten Aufreinigungsbedingungen auch für mCIN A194K/A195K zu evaluieren, wurden mittels Thermofluor-Assay (siehe 2.2.18) die Schmelzpunkte  $T_m$  für verschiedene Pufferbedingungen verglichen. Hintergrund dieser Untersuchung war, dass Aminosäuren, die bei mCIN WT durch die Dimerisierung dem Lösungsmittel nicht zugänglich sind, im Fall einer monomeren mCIN Mutante exponiert wären und somit möglicherweise andere Pufferbedingungen für die mCIN A194K/A195K Mutante günstig wären. Wie in Abbildung 28 zu sehen, sorgte Imidazol 4 mM pH 8,0 für eine Auffaltung des Proteins bei bereits 39 °C und ließ so eine destabilisierende Wirkung vermuten, während Natrium/Kalium-Phosphat 4 mM Puffer bei pH 7,5 mit einem Schmelzpunkt um 51 °C ähnlich günstige Bedingungen für mCIN A194K/A195K wie der bereits für mCIN WT etablierte TNM-Puffer (siehe 2.1.12.4), abgewandelt nach (58), versprach.

Eine stabilisierende Wirkung von Phosphat auf mCIN A194K/A195K lässt sich durch eine teilweise Einlagerung des Phosphats in die katalytische Tasche von mCIN und somit einer Strukturstabilisierung erklären, während Imidazol keinen stabilisierenden Effekt zeigte. Die Pufferbedingungen für die Aufreinigung von mCIN WT (TNM: 50 mM TEA, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) wiesen sich auch für die mCIN A194K/A195K Mutante bei einem Schmelzpunkt von 53 °C als günstige Pufferbedingungen aus. Die unterschiedliche Höhe der Fluoreszenzplateaus lässt sich durch optische Kanteneffekte des CCD-Detektors und durch nicht völlig gleichmäßige Anregung bei 492 nm erklären.

(150)



**Abbildung 28: Thermofluor-Assay für mCIN A194K/A195K**

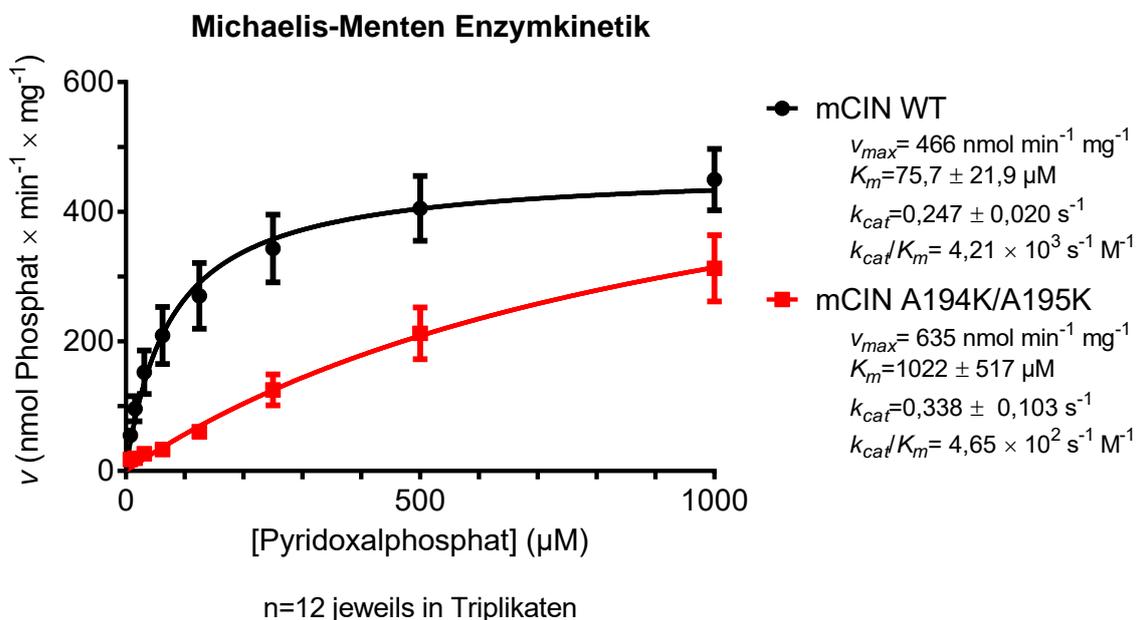
Dargestellt ist die absolute SYPRO® Orange Fluoreszenz (AU) für ausgewählte Pufferbedingungen in Abhängigkeit von der schrittweise erhöhten Temperatur (°C). Die aufgeführten Schmelztemperaturen  $T_m$  entsprechen den Maxima der ersten Ableitung der dargestellten Kurven.

### 3.5 Messung der Phosphataseaktivität

Nachdem sich mCIN A194K/A195K in Chromatographie, Rasterkraftmikroskopie, analytischer Ultrazentrifugation und im GST-Pulldown Assay als monomeres Protein verhalten hatte, sollte untersucht werden, inwieweit diese Veränderung der Quartärstruktur Auswirkungen auf die Enzymfunktion von Chronophin hat. Hierzu sollte der Erhalt der Funktionalität der Mutante im Vergleich zum Wildtyp evaluiert werden. Chronophin dephosphoryliert neben Phospho-Cofilin auch Pyridoxalphosphat (58, 177). Letzteres lässt sich für *in vitro* Phosphatase-Assays nutzen, bei denen Pyridoxalphosphat durch Chronophin dephosphoryliert wird und das frei werdende Phosphat durch eine Farbkomplexreaktion optisch quantifiziert werden kann (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Nach der Proteinexpression, -aufreinigung und dem Verdau mit TEV-Protease (siehe 2.2.14, 2.2.15) wurden mit mCIN WT und mCIN A194K/A195K wie in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** beschrieben Aktivitätsassays bei einer Enzymkonzentration von 200 nM und einer absteigenden Substratkonzentration (Pyridoxalphosphat) von 1 mM, 500  $\mu$ M,

250  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 62,5  $\mu\text{M}$ , 31,3  $\mu\text{M}$ , 15,6  $\mu\text{M}$  und 7,81  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Gemäß der Michaelis-Menten-Theorie (160, 170) sollte Chronophin bei einer Konzentration von 200 nM durch die hohen Substratkonzentrationen von 1 mM in einen Sättigungszustand gebracht werden, bei dem alle katalytischen Zentren besetzt sind und die Reaktionsgeschwindigkeit durch Steigerung des Substratangebots nicht mehr relevant ansteigt. Mittels nicht-linearer Regression konnten aus diesem Sättigungszustand die maximale Enzymgeschwindigkeit  $v_{max}$  sowie die Substratkonzentration  $K_m$ , bei der die halbmaximale Enzymgeschwindigkeit vorliegt, bestimmt werden und daraus die Wechselzahl  $k_{cat}$  und die katalytische Effizienz  $k_m/k_{cat}$  berechnet werden.



**Abbildung 29: Michaelis Menten Enzymkinetik für mCIN WT und mCIN A194K/A195K.**

Enzymkinetiken wurden bei einer Enzymkonzentration von jeweils 200 nM Chronophin und einer absteigenden Konzentrationsreihe ausgehend von 1 mM Pyridoxalphosphat durchgeführt. Der Nachweis von freigesetztem Phosphat erfolgte über photometrische Absorptionsmessung bei 620 nm der gebildeten Phospho-Molybdatkomplexe. Dargestellt ist die Enzymgeschwindigkeit  $v$  (nmol freigesetztes Phosphat  $\times$  min<sup>-1</sup>  $\times$  mg<sup>-1</sup>) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ( $\mu\text{M}$  Pyridoxalphosphat) mit den jeweiligen Standardfehlern des Mittelwertes als Balken sowie den daraus jeweils berechneten Parametern  $v_{max}$  (maximale Enzymgeschwindigkeit),  $K_m$  (Michaelis-Menten-Konstante),  $k_{cat}$  (Wechselzahl) und  $k_{cat}/K_m$  (katalytische Effizienz) mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die Messdaten wurden in Triplikaten aus insgesamt 12 Experimenten von drei separaten Proteinaufreinigungen erhoben.

Wie in Abbildung 29 ersichtlich wurde bei mCIN A194K/A195K bei sonst gleichen Bedingungen im Vergleich zu mCIN WT weniger Phosphat frei, was

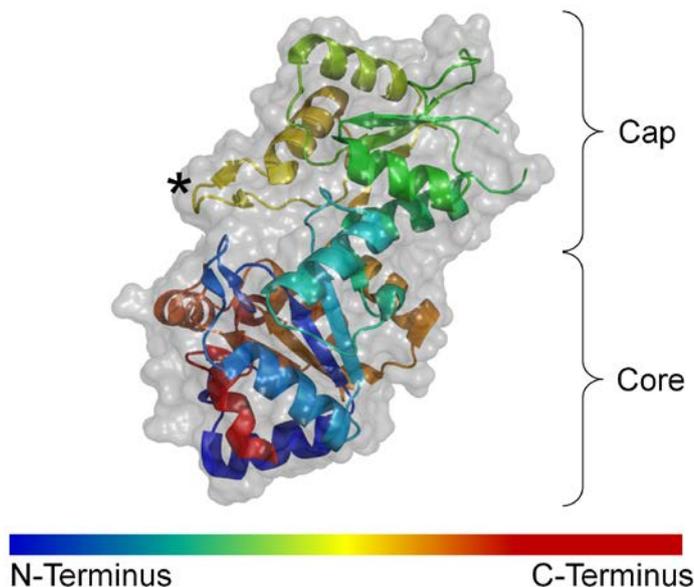
somit einer geringeren Reaktionsgeschwindigkeit und einer verminderten Enzymaktivität entspricht. Dies kann unterschiedliche Ursachen haben. Der  $K_m$ -Wert lässt näherungsweise eine Aussage über die Affinität des Enzyms zum Substrat zu. Während mCIN WT einen  $K_m$ -Wert von  $75,7 \pm 21,9 \mu\text{M}$  aufwies, war der von mCIN A194K/A195K mit  $1022 \pm 517 \mu\text{M}$  ungleich höher und wies in Näherung auf eine geringere Substrataffinität hin. Die Wechselzahl  $k_{cat}$  beschreibt, wie viele Substratmoleküle pro Reaktionszentrum und Zeit umgesetzt werden, wenn das Enzym vollständig mit Substrat gesättigt ist. Sie lässt sich über die Maximalgeschwindigkeit  $v_{max}$  und die Gesamtkonzentration der aktiven Zentren (über die molekularen Massen von  $31,8 \cdot 10^3 \text{ g/mol}$  für mCIN WT und  $31,9 \cdot 10^3 \text{ g/mol}$  für mCIN A194K/A195K zu berechnen) bestimmen. Die Wechselzahlen von  $0,247 \pm 0,020 \text{ s}^{-1}$  für mCIN WT und  $0,338 \pm 0,103 \text{ s}^{-1}$  für mCIN A194K/A195K unterschieden sich nicht relevant. Sowohl  $v_{max}$  als auch  $k_{cat}$  beziehen sich auf einen vorliegenden Substratüberschuss, bei dem die katalytischen Zentren komplett besetzt sind. Unter physiologischen Bedingungen hingegen, bei denen die Substratkonzentration den Wert  $K_m$  in der Regel nicht um ein Vielfaches übersteigt, kann  $k_{cat}$  nicht mit der tatsächlichen Substratumsetzungsrate gleichgesetzt werden, da nicht alle katalytischen Zentren besetzt sind. Um eine Vergleichbarkeit auch für physiologische Substratsättigungsbedingungen zu erreichen, bedient man sich des Quotienten  $k_{cat}/K_m$ , der sogenannten katalytischen Effizienz oder Leistungskonstante (178). Für mCIN WT lag dieser bei  $4,21 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  und für mCIN A194K/A195K bei  $4,65 \times 10^2 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Die hier etwa um den Faktor 10 geringere Leistungskonstante für mCIN A194K/A195K wies wie die übrigen Parameter auf eine verminderte Aktivität der Mutante hin.

### **3.6 Kristallisation und Ergebnisse der Proteinstrukturanalyse**

Die Ursachen für eine verminderte Enzymaktivität können vielfältig sein. Mögliche Ansatzpunkte können die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für das Substrat, aber auch Veränderungen der Anordnung und damit des Zusammenspiels der katalytischen Reste selbst sein. Idealerweise können diese Fragen geklärt werden, wenn die dreidimensionale Struktur des Enzyms

bekannt ist. Wie in 2.2.22 beschrieben, erlaubt die Röntgenstrukturanalyse, Informationen über die Anordnung der Aminosäuren zu erhalten, die es ermöglichen, räumliche Strukturmodelle von Proteinen zu erstellen.

Bei den Kristallisationsbedingungen 2-N-Morpholinoethansulfonsäure (MES) 0,1M (pH 6,5), Polyethylenglykolmonomethylether 550 25% (w/v) kristallisierte mCIN A194K/A195K nach 3-4 Tagen als dünne Platten, die meist in Clustern angeordnet waren, wobei eine einzelne Platte aber ausreichende Brechungseigenschaften für die Röntgenstrukturanalyse besaß. Die Datenauswertung (detaillierte Wertetabelle im Anhang, Gunnar Knobloch) bestätigte die vorangehenden Ergebnisse dahingehend, dass mCIN A194K/A195K tatsächlich als Monomer kristallisierte (PDB: 4BX0, Gunnar Knobloch, (57)).



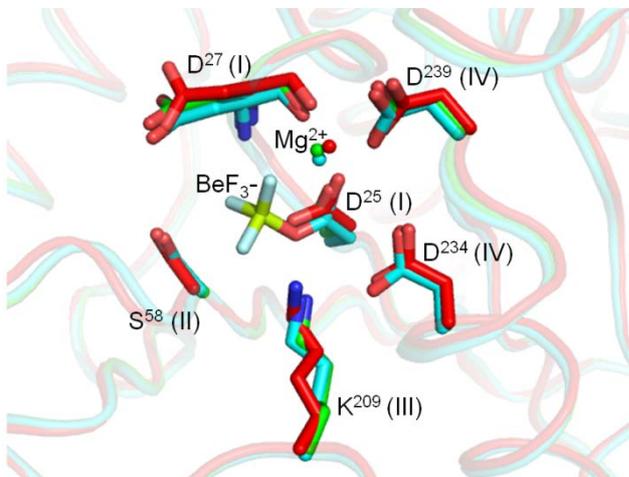
**Abbildung 30: Monomere Chronophinstruktur von mCIN A194K/A195K.**

Murines Chronophin A194K/A195K ist in einer Kombination aus Oberflächendarstellung und Bändermodell abgebildet. Der Aminosäurekettenverlauf ist von N-terminal (blau) bis C-terminal (rot) gemäß obigem Farbverlauf farbkodiert. Cap- und Kern-Domäne sind mit geschwungenen Klammern abgegrenzt, die  $\beta$ -Haarnadelschleife (Substratspezifitätsschleife) ist mit einem Stern markiert. PDB: 4BX0.

Chronophin A194K/A195K kristallisierte in der Raumgruppe P2 und die Struktur konnte bis zu einer Auflösung von 1,75 Å mit einem  $R_{work}$  von 19,1 % und einem  $R_{free}$  von 23,6 % verfeinert werden (Protein Data Bank Code 4BX0 und Tabelle 7). Die grundsätzliche Faltung eines Chronophin-Protomers wurde durch die Mutation von A<sup>194</sup> und A<sup>195</sup> zu K<sup>194</sup> und K<sup>195</sup> nicht beeinflusst, was in der r.m.s.d.

(*root mean square deviation*, Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung) von 0,47 Å für die Abstände der einander entsprechenden C $\alpha$ -Atome der Hauptketten zwischen mCIN A194K/A195K (PDB: 4BX0) und mCIN WT (PDB: 4BX3) deutlich wurde.

Die nähere Betrachtung des katalytischen Zentrums zeigte, dass sich durch die Monomerisierung von mCIN keine relevanten Veränderungen der Anordnung der katalytischen Reste ergeben hatten (siehe Abbildung 31). Der Vergleich des aktiven Zentrums in der Struktur von mCIN A194K/A195K erfolgte mit der von mCIN WT und zusätzlich mit der von mCIN WT, bei der mit BeF $_3^-$  ein phosphat-imitierender Inhibitor an Asp $^{25}$  gebunden ist (PDB: 4BX2, Kristallisation und Lösung beider Strukturen durch Gunnar Knobloch). Die fehlende räumliche Abweichung der Reste untereinander und die korrekte Koordinierung des Kofaktors Mg $^{2+}$  spricht für die strukturelle Integrität des aktiven Zentrums der monomeren Phosphatase mCIN A194K/A195K und lieferte somit keine Erklärung für die verminderte Aktivität.

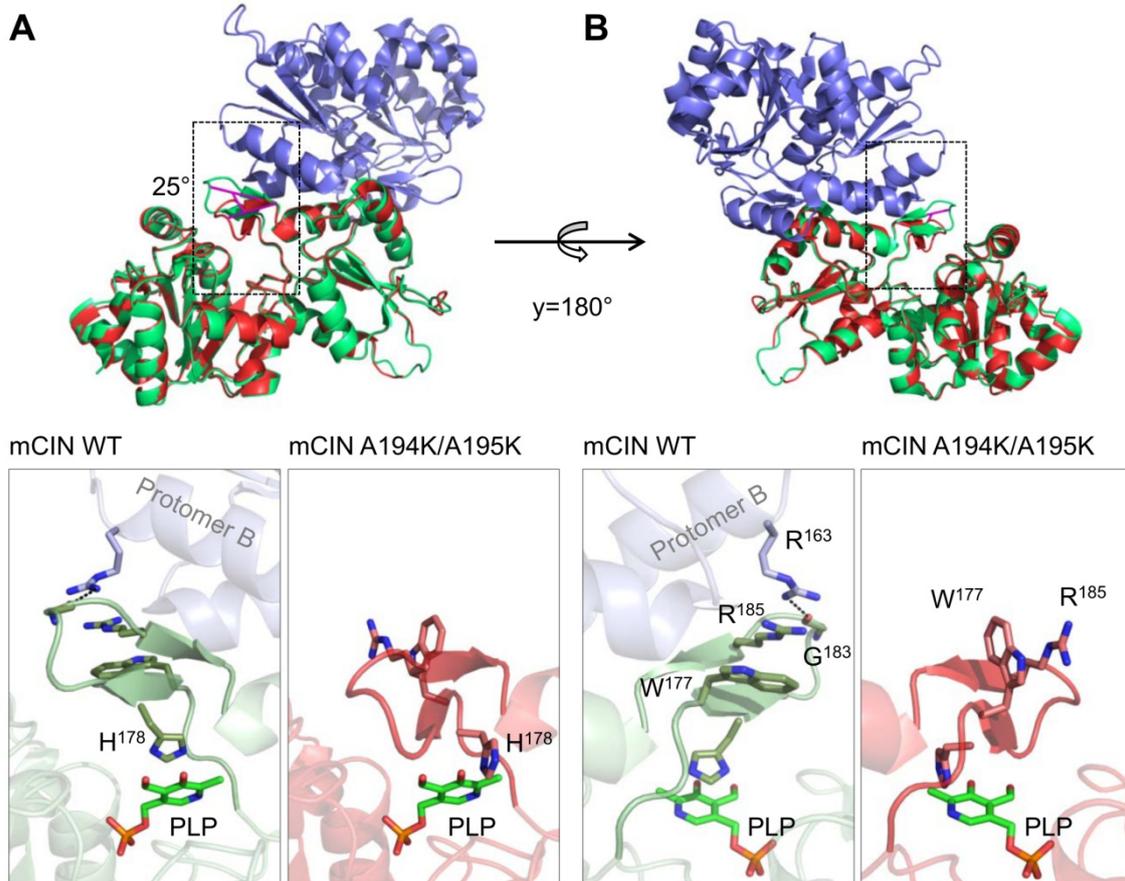


**Abbildung 31: Überlagerungsdarstellung der aktiven Zentren von mCIN A194K/A195K, mCIN WT und mCIN WT mit BeF $_3^-$ .**

Die am aktiven Zentrum beteiligten Reste sind für mCIN A194K/A195K (PDB: 4BX0) in Rot, für mCIN WT (PDB: 4BX3) in Grün und für den Komplex aus mCIN WT mit BeF $_3^-$  (PDB: 4BX2) in Cyan dargestellt. Die Zugehörigkeit der Aminosäuren zu den HAD Motiven I-IV ist in Klammern angegeben. Die katalytischen Reste bei mCIN A194K/A195K überlagern sich annähernd deckungsgleich mit denen von mCIN WT und weisen so mit der ebenfalls erhaltenen Koordinierung des Mg $^{2+}$ -Ions auf ein strukturell unverändertes aktives Zentrum hin. Abbildung in Anlehnung an (57).

Eine mögliche Erklärung für die verminderte Aktivität ergab der Strukturvergleich von mCIN A194K/A195K mit mCIN WT (siehe Abbildung 32)

hinsichtlich der sogenannten Substratspezifitätsschleife (43, 179), einer  $\beta$ -Haarnadelschleife, die wie auch bei anderen HAD-Hydrolasen bei Chronophin für die Substratspezifität wichtige Aminosäuren beherbergt (44).



**Abbildung 32: Strukturvergleich von mCIN WT und mCIN A194K/A195K.**

**A (oben):** Die Strukturen von mCIN WT (PDB: 4BX3, Protomer A in Grün, Protomer B in Blau) und mCIN A194K/A195K (PDB: 4BX0, in Rot) sind überlagert abgebildet. Bei mCIN A194K/A195K ist im Bereich des vergrößerten Ausschnitts (gestrichelter Kasten) die Abkippung der  $\beta$ -Haarnadelschleife im Vergleich zu mCIN WT im Winkel (in Magenta hervorgehoben) zwischen den C $\alpha$ -Atomen von Aspartat<sup>182</sup> und Prolin<sup>187</sup> von etwa 25° dargestellt. **A (unten):** Separierte Detailansicht der in A (oben) überlagerten Strukturen. PLP wurde aus PDB: 2P69 zur Veranschaulichung eingefügt. Bei mCIN WT geht das Histidin<sup>178</sup> mit seinem Imidazolring ein  $\pi$ - $\pi$ -Stacking mit dem Pyridinring des PLP ein. Im Fall von mCIN A194K/A195K steht der Imidazolring aufgrund der veränderten Stellung fast senkrecht auf dem Pyridinring des PLP. **B:** Rückansicht der in A gezeigten Strukturen. Bei mCIN WT wird deutlich, dass die markierten Aminosäuren Arginin<sup>185</sup> und Tryptophan<sup>177</sup> von Protomer A mit Arginin<sup>163</sup> von Protomer B zueinander parallel orientiert sind und ein stabilisierendes Stacking eingehen. Die zusätzlich stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung zwischen Glycin<sup>183</sup> und Arginin<sup>163</sup> von Protomer B ist durch eine gestrichelte Linie visualisiert. Bei mCIN A194K/A195K hingegen fehlen durch die Monomerisierung diese stabilisierenden Interaktionen durch Protomer B. Abbildung in Anlehnung an (57).

Sowohl im Fall von mCIN WT als auch von mCIN A194K/A195K gehen die Reste Trp<sup>177</sup> und Arg<sup>185</sup>, die in der Substratspezifitätsschleife liegen, eine sogenannte Kation- $\pi$ -Interaktion ein. Diese intraprotomere Wechselwirkung wird bei mCIN WT um eine interprotomere Interaktion erweitert, die die Freiheitsgrade der Substratspezifitätsschleife einschränkt: Dies geschieht durch die stapelartige Anordnung (engl.: *stacking*) von Trp<sup>177</sup>, Arg<sup>185</sup> von Protomer A und Arg<sup>163</sup> von Protomer B sowie zusätzlich durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung der Länge 3,2 Å zwischen Gly<sup>183</sup> der Substratspezifitätsschleife mit Arg<sup>163</sup> von Protomer B (siehe vergrößerte Darstellungen in Abbildung 32B). Dem His<sup>178</sup> der Substratspezifitätsschleife kommt eine besondere Bedeutung zu. Der Imidazolring des Histidins geht mit dem Pyridinring des PLP ein sogenanntes  $\pi$ - $\pi$ -Stacking ein. In der parallel versetzten Anordnung der Ringsysteme interagieren dabei die delokalisierten Elektronen ober- und unterhalb der Ringebenen miteinander und üben auf die Reste eine gegenseitige Anziehungskraft aus, die die Position des Pyridoxalphosphats im aktiven Zentrum festlegt.

Beim monomeren mCIN A194K/A195K fehlt diese Stabilisierung der Substratspezifitätsschleife durch die zweite Untereinheit, was sich im Abkippen der Substratspezifitätsschleife im Vergleich zu mCIN WT um etwa 25° zeigt. Damit ist auch die Position von His<sup>178</sup> nicht mehr festgelegt, was sich in dessen räumlichem Abweichen und nun fast senkrechter Orientierung in Bezug auf die Position des Substrats Pyridoxalphosphat im aktiven Zentrum zeigt. Somit ist der Mechanismus der Substratpositionierung durch paralleles  $\pi$ - $\pi$ -Stacking gestört, was eine mögliche Erklärung für die verminderte katalytische Aktivität von mCIN A194K/A195K liefert.

### 3.7 Strukturvergleich bekannter HAD-Hydrolasen vom C2a-Typ

Durch die Erkenntnisse über die Bedeutung der Dimerisierung für die Enzymaktivität von mCIN A194K/A195K stellte sich die Frage, ob der im Vergleich mit mCIN WT beobachtete Mechanismus der Koordinierung der Substratspezifitätsschleife ein für Chronophin einzigartiger Mechanismus ist, oder ob sich daraus Gemeinsamkeiten für andere oligomere Vertreter der HAD-Hydrolasen mit C2a-Cap-Domäne ableiten lassen. Durch die Ergebnisse der Datenbanksuche aus 3.1 waren 18 Vertreter der HAD-Hydrolasen vom C2a-Typ bekannt und konnten so hinsichtlich ihrer Dimerisierung untersucht und mit der von mCIN WT verglichen werden. Ein Vergleich der Größe der Dimergrenzflächen und bei der Dimerisierung freiwerdenden Energie, also der Triebkraft für die Dimerisierung, ergab für die Dimerisierungsgrenzflächen aller C2a-Typ HAD-Hydrolasen vergleichbare Werte um 1000 Å (siehe Tabelle 6). Alle beschriebenen Proteine liegen somit sehr wahrscheinlich als Homodimere vor, fünf davon bilden daraus mutmaßlich Tetramere durch zusätzliche Dimerisierung von Homodimeren. Ein Vergleich der Vertreter vom C2a-Typ mit der Struktur von mCIN WT (PDB: 4BX3) durch strukturelles Alignment mittels der Software PyMOL ergab eine deutliche Übereinstimmung der räumlichen Struktur bei einer durchschnittlichen Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (r.m.s.d.) von 2,55 Å bei einer größtmöglichen Übereinstimmung einer r.m.s.d. von 0,67 Å (mit humanem Chronophin, PDB: 2OYC) bis zur geringsten Übereinstimmung einer r.m.s.d. von 10,61 Å (mit Protein YKR070W, PDB: 3RF6).

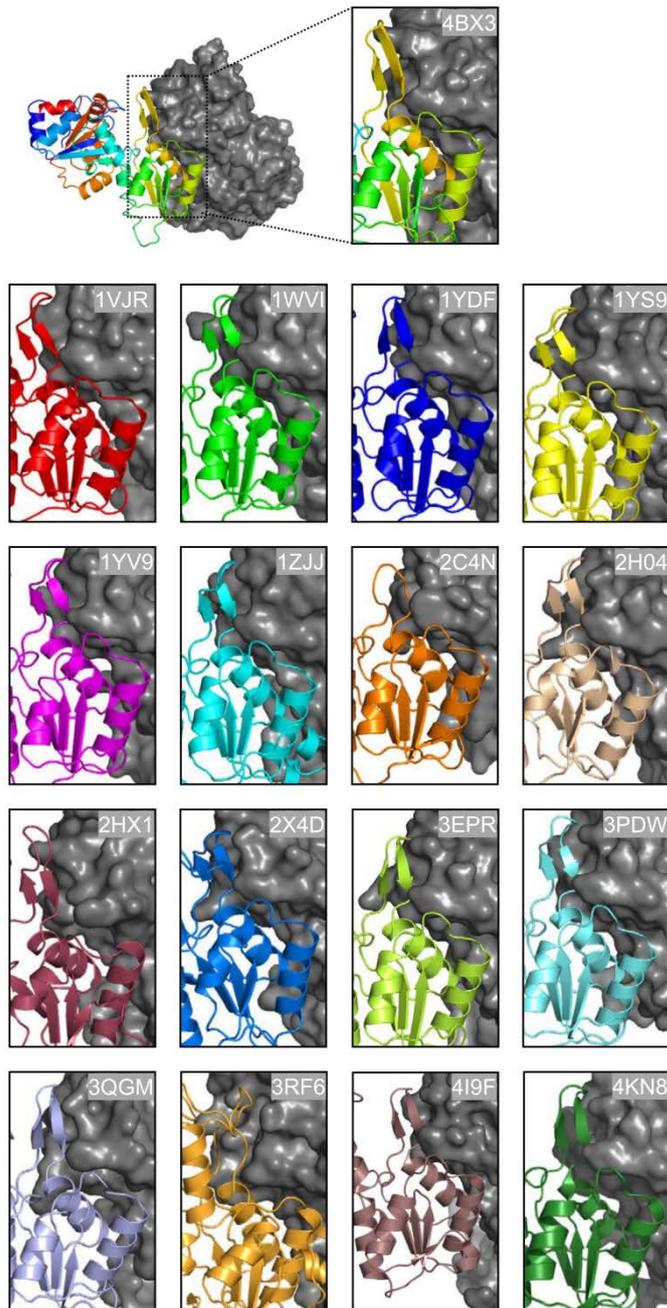
### Tabelle 6: Übersicht der strukturell charakterisierten HAD-Hydrolasen vom C2a-Typ.

Aufgeführt sind die HAD-Hydrolasen vom C2a-Typ, deren Struktur bekannt ist. Chronophin ist durch den Vergleich mit PDB: 4BX3 doppelt vertreten (PDB: 2OYC). Die r.m.s.d. bei Strukturüberlagerung mittels PyMOL ist in Bezug auf die C $\alpha$ -Atome von PDB: 4BX3 angegeben. Die Dimergrenzfläche beschreibt die Fläche, die durch die Dimerisierung von den Untereinheiten bedeckt wird.  $\Delta^iG$  gibt den Betrag der bei der Dimerisierung freiwerdenden Energie an. Negative Werte korrespondieren mit hydrophoben Grenzflächen oder positiver Proteinaffinität. Der Effekt von Wasserstoffbrücken und Salzbrücken geht nicht in den Wert von  $\Delta^iG$  ein (141). Die Werte für Dimergrenzfläche und  $\Delta^iG$  wurden mit PDBePISA berechnet. In kursiver Schrift sind Grenzflächen und  $\Delta^iG$ -Werte für potentielle Tetramerbildung angegeben. Tabelle modifiziert nach Gunnar Knobloch, (57).

PDB Code (UniProtKB)	Organismus	r.m.s.d	Dimer- grenzfläche (Å <sup>2</sup> )	$\Delta^iG$ (kcal/mol)
1VJR (Q9X264)	Thermotoga maritima	1,91	1033	-14,7
1WVI (Q8DTD6)	Streptococcus mutans	1,94	1157 955	-15,3 -4,3
1YDF (Q97Q24)	Streptococcus pneumoniae	2,13	1080	-12,7
1YS9 (Q99ZW4)	Streptococcus pyogenes	1,67	1185 868	-14,1 -4,8
1YV9 (Q836C7)	Enterococcus faecalis	1,66	1151	-12,2
1ZJJ (O59622)	Pyrococcus horikoshii	1,78	1162	-18,9
2C4N (P0AF24)	Escherichia coli	2,02	1097 1072	-23,8 -6,6
2HO4 (Q3UGR5)	Mus musculus	3,08	1300	-13,6
2HX1 (Q11S56)	Cytophaga hutchinsonii	2,44	980 1273	-13,7 -5,2
2OYC (Q96GD0)	Homo sapiens	0,67	1036	-16,4
2X4D (Q9H008)	Homo sapiens	2,17	1307	-17,9
3EPR (Q8E044)	Streptococcus. agalactiae	1,69	1143 1048	-12,9 -5,8
3HLT (Q9H0R4)	Homo sapiens	2,47	1315	-13,9

3PDW (O32125)	Bacillus subtilis	2,69	1203	-15,3
3QGM (O29873)	Archaeoglobus fulgidus	1,71	1315	-23,8
3RF6 (P36151)	Saccharomyces cerevisiae	10,61	1866	-25,7
4BX3 (P60487)	Mus musculus	-	992	-14,7
4I9F (L7N4Y2)	Mycobacterium tuberculosis	2,31	1146	-19,3
4KN8 (Q8L1N9)	Geobacillus stearothermophilus	3,03	1202	-16,0

Um die statistisch festgestellte strukturelle Übereinstimmung der C2a-Typ HAD-Hydrolasen zu veranschaulichen, wurden die Dimergrenzflächen der untersuchten Proteine mittels PyMOL dargestellt (siehe Abbildung 33). Hierbei fiel auf, dass sämtlichen Vertretern die Dimerisierung über zwei homologe  $\alpha$ -Helices im Bereich der Cap-Domäne sowie das Strukturelement einer  $\beta$ -Haarnadelschleife ähnlich der Substratspezifitätsschleife bei Chronophin gemeinsam ist.



**Abbildung 33: Vergleich der Homodimerisierungsgrenzflächen bei HAD-Hydrolasen vom C2a-Typ.**

Oben im Bild ist für mCIN WT (PDB: 4BX3) das Protomer A in Schleifendarstellung (regenbogenfarben), Protomer B in einer Oberflächenansicht (grau) abgebildet. Die übrigen Ausschnitte der Strukturen aus dem Datensatz (siehe Tabelle 6) sind entsprechend mit PDB Codes jeweils in der rechten oberen Bildecke dargestellt. Die Dimerbegrenzflächen werden in allen Fällen durch zwei homologe  $\alpha$ -Helices gebildet und beinhalten eine  $\beta$ -Haarnadelschleife, die der Substratspezifitätsschleife in Chronophin ähnelt. Bei PDB: 2C4N und 3RF6 werden die Schleifen durch die softwarebasierte Sekundärstrukturzuweisung, obwohl Wasserstoffbrücken vorliegen, nicht als  $\beta$ -Faltblätter dargestellt, da die beteiligten Reste in der Aminosäuresequenz nicht benachbart sind. Die Strukturen von humanem CIN (PDB: 2OYC) und humaner HDHD2 (PDB: 3HLT) ähneln den murinen, orthologen Proteinen stark und sind deshalb nicht mit aufgeführt. Abbildung erweitert und modifiziert nach Gunnar Knobloch, (57).

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Diskussion verwendeter Methoden

#### 4.1.1 Größenausschlusschromatographie

Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung von Oligomerisierungszuständen bei bekannter Aminosäuresequenz ist eine weit angewandte und etablierte Methode (180). Das Elutionsverhalten von mCIN A194K/A195K in der Größenausschlusschromatographie zeigte eine Verzögerung des Elutionsmaximums im Vergleich zu mCIN WT, die auf eine molekulare Masse von 33,7 kDa und somit das Vorliegen der Chronophinmutante als Monomer hinwies. Die Einschränkungen der Größenausschlusschromatographie beruhen darauf, dass bei dieser Methode nicht die molekulare Masse selbst gemessen wird, sondern indirekt über das Elutionsverhalten also das hydrodynamische Volumen eines Moleküls darauf rückgeschlossen wird. Somit kann eine verzögerte Porenpassage aufgrund von weiteren Effekten eine kleinere molekulare Masse suggerieren. Hierbei sind Adsorptionseffekte zwischen Molekül und Säulenmaterial zu nennen, beispielsweise Interaktionen von aromatischen Aminosäuren mit dem Sepharose-Säulenmaterial der verwendeten Superdex™-Säulen (181, 182). Die Mutation A194K/195K hätte durch starke Konformationsänderungen in der Proteinfaltung zusätzliche aromatische Aminosäuren an der Proteinoberfläche exponieren können, die bei mCIN WT im Proteininneren verborgen sind. Eine daraus resultierende Verzögerung des Elutionsmaximums hätte eine geringere molekulare Masse vortäuschen können. Durch die später erhaltenen Strukturdaten der Proteinkristallisation konnte allerdings die identische Faltung von mCIN A194K/A195K im Vergleich zu mCIN WT bestätigt werden. In der Tat ist von einer wenn auch nur in geringem Maße vermehrten Exposition von aromatischen Aminosäuren im Fall von der monomeren Mutante mCIN A194K/A195K auszugehen. Die in der Dimerrenzfläche enthaltenen und im Fall des monomeren mCIN A194K/A195K exponierten, aromatischen

Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin (siehe Abbildung 17) könnten tatsächlich zu einer, wenn auch vermutlich nur sehr geringen, Elutionsverzögerung führen. Die Verschiebung des Elutionsmaximums bei mCIN A194K/A195K basierte somit zum überwiegenden Teil auf der Monomerisierung des Proteins und der geringeren molekularen Masse.

#### **4.1.2 Rasterkraftmikroskopie**

Rasterkraftmikroskopie stellt eine probate Methode dar, über die Messung von Proteinvolumina auf deren molekulare Masse und somit auch Oligomerisierungszustände rückzuschließen (183, 184). Die Experimente der Rasterkraftmikroskopie erlaubten eine indirekte Visualisierung der Molekülvolumina von mCIN A194K/A195K und mCIN WT. Die Umrechnung der jeweils am häufigsten vorkommenden Molekülvolumina von  $70 \text{ nm}^3$  für mCIN WT und  $30 \text{ nm}^3$  für mCIN A194K/A195K ergaben mit 63 kDa für mCIN WT und 30 kDa für mCIN A194K/A195K Werte, die die Monomerisierung von Chronophin bei mCIN A194K/A195K bestätigten. Bei mCIN WT fiel ein lokales Maximum in der Molekülvoluminaverteilung (siehe Abbildung 23) auf, das mit dem Auftreten von Monomeren vereinbar war. Die Ursache hierfür könnte in der starken Verdünnung der Proben auf Konzentrationen um 500 nM gelegen haben. Erreicht die Konzentration eines Proteins Bereiche der Dissoziationskonstante der Protomerdimerisierung, liegen umso mehr Protomere als Monomere vor, je tiefer die Proteinkonzentration fällt. Die Dissoziationskonstante der Dimerisierung von Chronophin ist aus der Literatur nicht bekannt, kann aber aus AFM-Daten abgeschätzt werden (155). Während bei mCIN WT durch den Versuchsaufbau der Rasterkraftmikroskopie eine Monomerisierung durch einen derartigen Verdünnungseffekt oder auch eine Artefaktbildung zu dem beobachteten lokalen Maximum geführt haben könnte, legt bei mCIN A194K/A195K die Abwesenheit eines lokalen Maximums im Bereich um 60 kDa nahe, dass das absolute Maximum um 30 kDa bei mCIN A194K/A195K nicht alleine durch verdünnungsinduzierte Dissoziation zustande gekommen ist.

### 4.1.3 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation erlaubt Proteinassoziationen über unterschiedliches Sedimentationsverhalten durch ein größeres Volumen und höhere molekulare Masse der assoziierten Partikel während der Zentrifugalbeschleunigung nachzuweisen (190). Mögliche Einschränkungen der Auswertbarkeit der Daten könnten sich durch reversible Assoziations- und Dissoziationsvorgänge während der Zentrifugation ergeben. Die hier erhaltenen molekularen Massen für mCIN A194K/A195K (32 kDa) und mCIN WT (56 kDa) entsprechen den zu erwartenden Werten für ein monomeres beziehungsweise dimeres Protein ohne intermediäre Zustände während der Zentrifugation.

### 4.1.4 GST-Pulldown Assay

Die *in vitro* Daten, die die Monomerisierung von mCIN A194K/A195K zeigten, konnten auch in Zelllysaten bestätigt werden.

So wurde die Dimerisierung bei der Expressionskombination GST\_mCIN A194K/A195K mit unmarkiertem mCIN A194K/A195K inhibiert, während bei der entsprechenden Versuchsanordnung der Kombination von mCIN WT eine Kopräzipitation nachgewiesen werden konnte. Bei den Kombinationen GST\_mCIN A194K/A195K mit unmarkiertem mCIN WT sowie GST\_mCIN WT mit unmarkiertem mCIN A194K/A195K war die Mutation in einem Protomer ausreichend, um die Dimerisierung zu verhindern.

Kritik an dem angewendeten Verfahren zum Nachweis von Proteininteraktionen basiert in der Regel auf dem möglichen falsch-positiven Nachweis von Interaktionen durch veränderte Faltung und Exposition von hydrophoben Resten, die eine Aggregation begünstigen (185, 186). Der Nachweis, dass keine Interaktion stattfindet, wie im Fall von mCIN A194K/A195K, bleibt von dieser Kritik unberührt.

Allerdings müssen die Ergebnisse in dem Wissen interpretiert werden, dass GST selbst Dimere bildet und dies Auswirkungen auf die Assoziation der gekoppelten Proteine haben kann (187, 188). Eine Dimerisierung zweier an Glutathion Sepharose gebundener GST\_CIN WT Moleküle ist durchaus anzunehmen, aber im SDS-Page methodenbedingt nicht nachzuweisen.

Allerdings könnte die Dimerisierung der GST-Tags die gekoppelten CIN-Moleküle so aneinander annähern, dass dadurch die Dimerisierung mit einem ungekoppelten CIN-Molekül blockiert werden würde. Der Nachweis der Bande von ungekoppeltem mCIN WT in Kombination mit GST\_mCIN WT (siehe Abbildung 26A) widerlegt diese These einer vollständigen Blockierung, lässt aber Spielraum für die Annahme einer teilweisen Behinderung der Dimerisierung von GST\_CIN mit ungekoppeltem CIN durch die Dimerisierung der gekoppelten GST-Tags. Hierbei ist davon auszugehen, dass sie bei mCIN A194K/A195K und mCIN WT in gleichem Maße auftreten würde und so zu keiner Verfälschung der Daten führen könnte.

#### **4.1.5 Thermofluor**

Die aus den Thermofluorexperimenten erhaltenen Daten ergaben keine wesentliche Proteinstabilisierung durch Variation der Pufferbedingungen im Vergleich zum zuvor verwendeten TNM Puffer (50 mM TEA, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Die höheren Schmelzpunkte von Chronophin WT und – A194K/A195K Mutante im phosphathaltigen Puffer war wahrscheinlich auf die Stabilisierung des aktiven Zentrums zurückzuführen. Die Verwendung phosphathaltiger Puffer war allerdings für Phosphatase-Aktivitätsmessungen aufgrund der Produkthemmung und der Verfälschung des Nachweises von freiem Phosphat hinfällig. Für Kristallisationszwecke sind phosphathaltige Puffer ferner ebenfalls ungeeignet, da das Phosphat selbst in Verbindung mit Kationen wie Magnesium auskristallisiert (165).

#### **4.1.6 Messung der Phosphataseaktivität**

Die Aktivität von mCIN A194K/A195K gegenüber PLP erschien in den Aktivitätsassays vermindert, was sich in einer stark erhöhten Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$ , näherungsweise als Ausdruck der geringeren Affinität von mCIN A194K/A195K zum Substrat PLP, in einer erniedrigten Wechselzahl  $k_{cat}$ , die den Substratumsatz pro Sekunde widerspiegelt, sowie in einer geringeren Leistungskonstante  $k_{cat}/K_m$  äußerte. Die hierbei gemessenen Werte wichen von den in der Literatur publizierten ab. So waren die Größenordnungen der von Gunnar Knobloch gemessenen und in (57) veröffentlichten Werte für  $K_m$  für

mCIN WT und mCIN A194K/A195K noch vergleichbar, während die für  $k_{cat}$  im Fall von mCIN WT dort um den Faktor 6 höher, bei mCIN A194K/A195K sogar um den Faktor 10 höher lagen als die Ergebnisse aus dieser Arbeit. Bei ansonsten identischer Proteinaufreinigung bestand ein möglicherweise entscheidender Unterschied in der Elution von Chronophin bei der Größenausschlusschromatographie. Dem TNM Puffer für die Elution und für die spätere Lagerung von Chronophin wurde in (57) 5% (v/v) Glycerol zugesetzt. Es ist bekannt, dass Glycerol durch den amphiphilen Charakter die Aggregation von Proteinen über hydrophobe Proteinoberflächen vermindert (189). Während die Bestimmung von  $K_m$  unabhängig von der verwendeten Proteinkonzentration ist, hängen Werte wie  $k_{cat}$  und damit auch  $k_{cat}/K_m$  von der Proteinkonzentration ab. Möglicherweise ist die Ursache für die Abweichung der gemessenen Werte in einer Präzipitation oder Aggregation zu suchen, die nicht durch die Absorptionsmessung bei 280 nm detektiert werden konnte, aber die Konzentration des enzymatisch aktiven Proteins verminderte.

Außerdem lieferten die Versuche der Rasterkraftmikroskopie Hinweise darauf, dass bei Verdünnungen um 500 nM bereits eine offenbar verdünnungsinduzierte Monomerisierung von mCIN WT stattfand, weswegen die tatsächliche Aktivität von mCIN WT-Dimeren möglicherweise noch höher liegt als die bei 200 nM gemessene.

#### **4.1.7 Kristallisation und Proteinstrukturanalyse**

Die Auswertung der kristallographischen Daten ergab insbesondere in Bezug auf die Orientierung der Substratspezifitätsschleife und so Positionierung von Histidin<sup>178</sup> Unterschiede zwischen mCIN WT und mCIN A194K/A195K.

Während das Histidin<sup>178</sup> bei mCIN WT ein sogenanntes paralleles  $\pi$ - $\pi$ -Stacking mit dem Pyridinring des Pyridoxalphosphat eingeht und dadurch diese Konformation stabilisiert, ist das Histidin<sup>178</sup> bei mCIN A194K/A195K annähernd senkrecht zur Ebene des Pyridinrings des Pyridoxalphosphats orientiert.

Es existieren mehrere Arten des  $\pi$ - $\pi$ -Stackings, eine parallel verschobene, wie sie auch bei der Positionierung des PLP bei mCIN WT zu beobachten ist und auch Formen, bei denen ähnlich wie bei der Orientierung des His<sup>178</sup> eine

aromatische Gruppe senkrecht auf die andere steht, die sogenannte T-Form (191). Eine senkrechte Ausrichtung ist grundsätzlich kein Ausschlussgrund für eine Stabilisierung im Sinne eines  $\pi$ - $\pi$ -Stacking. Die veränderte Orientierung des His<sup>178</sup> von mCIN A194K/A195K bei im Übrigen starker struktureller Übereinstimmung mit mCIN WT lässt jedoch vermuten, dass das PLP weniger stabil im aktiven Zentrum positioniert ist, was Grund für die geringere katalytischen Aktivität von mCIN A194K/A195K sein könnte. Ob tatsächlich im Fall von mCIN A194K/A195K eine  $\pi$ -Interaktion der T-Form im Sinne einer Positionierung des Substrats stattfindet, könnte eine Kokristallisation von mCIN A194K/A195K mit kürzlich publizierten PLP-ähnlichen Inhibitoren (192) klären.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Allgemeine Bedeutung von Dimerisierung für Struktur und Enzymfunktion**

Selbstassoziation bei Proteinen, um Dimere oder Oligomere höherer Ordnung zu bilden, ist eine weit verbreitete Eigenschaft und kann allgemein betrachtet sowohl die Stabilität (193) als auch Komplexität erhöhen sowie Spezifität und Zugänglichkeit des aktiven Zentrums regulieren (194) und so Auswirkungen auf die Enzymfunktion haben.

Man nimmt an, dass sich große, symmetrische Dimer-Grenzflächen evolutionsbiologisch früher als kleine, asymmetrische Grenzflächen entwickelt haben und stark konservierte Strukturmerkmale darstellen (168). Die Vorteile dieser evolutiv bewährten symmetrischen Oligomerisierung, wie sie im Beispiel von Chronophin vorliegt, bestehen in der Möglichkeit, durch eine stabile Protein-Protein-Interaktion das Auftreten von Interaktionen mit ungewünschten Bindungspartnern und auch die Wahrscheinlichkeit einer Aggregation zu minimieren (169, 195-197).

Die Symmetrie in Homodimeren hat noch einen weiteren Vorteil. Im Vergleich zu monomeren Proteinen oder Heterodimeren hat eine einzelne Mutation bei Homodimeren einen wesentlich größeren Einfluss auf die Struktur und somit auch Funktion des Proteins, da die Veränderung symmetrisch stattfindet und ihr

so, wenn man das Homodimer als strukturelle Einheit ansieht, ein größeres Gewicht zukommt. Evolutionsbiologisch gesehen wird so ein möglicher Effekt einer Mutation durch die Symmetrie des Moleküls verstärkt. (198)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Mutagenese von Chronophin ein Effekt hervorgerufen, der die Untereinheiten nicht wesentlich in ihrem strukturellen Grundaufbau störte, aber für die Struktur des Homodimers große Auswirkungen, nämlich die Trennung der Protomere, zur Folge hatte.

Die stabile Assoziation der Untereinheiten ist bei einigen oligomeren Proteinen Grundlage ihrer Funktionalität, vermutlich auch bei den bisher bekannten konstitutiv oligomeren HAD-Phosphatasen. So bildet auch die Alkalische Phosphatase in *E.coli*, eine „klassische“ Phosphatase, die nicht zur HAD-Familie gehört, obligate Homodimere und durch Störung der Dimerisierung durch die Mutation einer Aminosäure werden sowohl die Stabilität der Proteinfaltung, als auch die Fähigkeit Cofaktoren zu binden und schließlich die katalytische Aktivität selbst vermindert (199). Bei anderen Enzymen, wie etwa der homodimeren Chorismat-Mutase, wird das aktive Zentrum aus Aminosäuren von zwei Untereinheiten gebildet (200), wohingegen bei Chronophin die dem aktiven Zentrum zugehörigen Aminosäuren von einer einzigen Untereinheit stammen. Anders als bei der Chorismat-Mutase ist bei Chronophin die Dimerisierung also nicht dadurch erklärbar, dass dadurch das aktive Zentrum gebildet wird.

Reversible Oligomerisierung kann auch zur dynamischen Regulation der Enzymaktivität genutzt werden, wie das Beispiel einiger rezeptor-ähnlicher Protein-Tyrosin-Phosphatasen zeigt. Die Dimerisierung wird bei den transmembran verankerten Vertretern dieser Klasse CD45 (201, 202) und Protein-Tyrosin-Phosphatase  $\alpha$  (203) durch Ligandenbindung oder oxidativen Stress bei der Protein-Tyrosin-Phosphatase  $\alpha$  (204, 205) reguliert. Hierbei wird das katalytische Zentrum bei der Dimerisierung durch die Protomere wechselseitig verschlossen und Protein-Tyrosin-Phosphatase  $\alpha$  und CD45 dadurch reversibel gehemmt (206, 207). Es kommen aber auch gegenteilige Mechanismen vor, zum Beispiel bei der transmembranen Protein-Tyrosin-Phosphatase  $\sigma$ , die für ihre katalytische Aktivität auf die Dimerisierung

angewiesen ist um Liganden zu binden (208). Auch das Beispiel der Familie II Pyrophosphatase, deren Dimerisierung und Aktivität von dem Vorhandensein des Kofaktors Mangan abhängt (209), zeigt, auf welche vielfältige Weise Dimerisierung induziert und kontrolliert werden kann.

Neben der durch Ligandenbindung oder andere externe Einflüsse regulierten Oligomerisierung existieren auch Formen der reversiblen Assoziation und Dissoziation von Untereinheiten, die von der Proteinkonzentration selbst abhängen. Ein solcher konzentrationsabhängiger Mechanismus kann ebenfalls die Enzymaktivität regulieren (210, 211), beispielsweise beim Vorgang der Zellapoptose, wo Caspase-9 durch einen Konzentrationsanstieg dimerisiert und so aktiviert wird (194, 212).

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, lässt sich auch bei der HAD-Phosphatase Chronophin ein Zusammenhang zwischen Oligomerisierungszustand und katalytischer Aktivität beobachten. Die konstitutiv monomere mCIN A194K/A195K-Mutante zeigte eine deutlich niedrigere katalytische Aktivität im Vergleich mit dem dimeren mCIN WT. Ob eine Änderung des Oligomerisierungszustands von Chronophin mit Folgen auf die Enzymaktivität auch physiologisch eine Rolle spielt, ist derzeit noch unklar.

#### **4.2.2 Bedeutung der Cap-Domäne für die Substratspezifität bei HAD-Phosphatasen**

Dadurch, dass im katalytischen Zentrum von HAD-Phosphatasen wie Chronophin mit Ausnahme der Bindung der Abgangsgruppe durch das Asp+2 (siehe Abbildung 2) wenig spezifische Interaktion zwischen dem Substrat und den katalytischen Resten stattfindet, übernehmen bei HAD-Phosphatasen andere Reste abseits des katalytischen Zentrums die Interaktionen, die für die Substratspezifität entscheidend sind. Sowohl Bewegungen der Cap-Domäne, die den Lösungsmittelausschluss des aktiven Zentrums erleichtern, als auch die Anordnung bestimmter Aminosäuren in der Cap-Domäne selbst sorgen so für Substratspezifität. So enthält beispielsweise die C1-Typ-Cap-Domäne der  $\beta$ -Phosphoglucomutase in *Lactococcus lactis* Reste, die das Substrat binden und für die Schließung der Cap-Domäne über dem aktiven Zentrum wichtig sind (36,

42, 43). Bei der HAD-Hydrolase Phosphonatase übernimmt ein Lysin aus der C1-Typ-Cap-Domäne die Rolle des mit dem Substrat interagierenden Asp+2 als allgemeine Säure/Base im katalytischen Mechanismus(34, 213). Bei einer weiteren HAD-Phosphatase, der KdsC vom C0-Typ, die demgemäß keine Cap-Domäne besitzt, kompensieren die Untereinheiten in tetramerer Anordnung die Abwesenheit einer Cap-Domäne, indem sie das aktive Zentrum einer benachbarten Untereinheit abschirmen und Reste beitragen, die der Substratspezifität dienen (214). Eine ähnlicher tetramerer Aufbau findet sich auch bei der 2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-9-phosphononic acid Phosphatase (KDN-9-P) in *Bacteroides thetaiotaomicron* (41).

Evolutionär betrachtet profitieren Phosphatasen der HAD-Superfamilie auch von der konservierten strukturellen Stabilität der Kerndomäne, die die Reste des aktiven Zentrums beherbergt. Die Rossmann-ähnliche Faltung scheint gegenüber Mutationen und Insertionen relativ robust zu sein und so ein stabiles strukturelles Grundgerüst für evolutionäre Modifikationen darzustellen (25).

Die oben genannten Vertreter von HAD-Phosphatasen sind Beispiele dafür, dass die Trennung von Resten, die für die eigentliche chemische Katalysereaktion verantwortlich sind, von Resten, die die Substratspezifität bestimmen, den Vorteil birgt, dass Mutationen die Substratspezifität ohne Beeinträchtigung des aktiven Zentrums verändern können. Diese Fähigkeit stellt einen in der Evolution von Enzymen und Veränderung der Substratspezifität entscheidenden Vorteil dar (215). Auch in der vorliegenden Arbeit ließ sich dies am Beispiel des konstitutiv monomeren mCIN A194K/A195K beobachten, wo die Anordnung der Reste des aktiven Zentrums von den Mutationen, die zur Monomerisierung und zum Abkippen der Substratspezifitätsschleife führten, unbeeinträchtigt blieb.

#### **4.2.3 Zusammenhang zwischen Oligomerisierung und enzymatischer Funktion bei Vertretern der HAD-Phosphatasen**

Während die Rolle der Homodimerisierung in der C2a-Typ-Familie bislang nicht näher untersucht worden ist, gibt es einige Erkenntnisse über die Oligomerisierung von HAD-Hydrolasen des C1- und C0-Typs.

Im Fall der C1-Typ *Haemophilus influenzae* e (P4) Sauren Phosphatase sorgen wechselseitige Kontakte der Untereinheiten dafür, dass die Konformation der katalytischen Schleife IV (HAD Motiv IV) des aktiven Zentrum der einen Untereinheit durch die jeweils andere Untereinheit stabilisiert wird. Es wird vermutet, dass diese interprotomeren Kontakte, die bis in das aktive Zentrum reichen, auch bei der Substraterkennung von Bedeutung sind (216).

Die zytosolische 5'-Nukleotidase (cN-II), eine in Säugetieren vorkommende C1-Typ-HAD-Hydrolase liegt in seiner nativen Form als Tetramer vor. Die Beobachtung, dass eine dimere Mutante von cN-II noch aktiv ist, eine monomere allerdings die katalytische Aktivität einbüßt, liefert Hinweise, dass die Veränderung des oligomeren Zustands die enzymatische Aktivität reguliert, wobei der zugrundeliegende Mechanismus noch unbekannt ist (217, 218).

Bei der bifunktionalen C0-Typ T4 Polynukleotid Kinase/Phosphatase PNKP trägt das Dimerinterface zwischen zwei gleichen Phosphatase-Untereinheiten vermutlich auch zur korrekten Faltung oder Stabilität des aktiven Zentrums bei, was sich darin zeigt, dass die Phosphataseaktivität durch Störung der Dimerisierung entlang der Phosphatase-Phosphatase-Grenzfläche inhibiert wird (219).

Zusammenfassend fällt auf, dass die konstitutive Dimerisierung von oligomeren HAD-Phosphatasen eine Voraussetzung für deren katalytische Aktivität zu sein scheint und mitunter auch bei der Koordinierung des Substrats eine Rolle spielt.

Die Ergebnisse am Beispiel der Typ C2a HAD-Phosphatase Chronophin, bei der die Homodimerisierung die korrekte Positionierung der Substratspezifitätsschleife bedingt, stehen so in Einklang mit den Ergebnissen anderer Vertreter der HAD-Phosphatasen und dem dort beobachteten Zusammenhang zwischen Oligomerisierungszustand und enzymatischer Funktion. Ob monomere HAD-Phosphatasen möglicherweise auch intrazellulär konzentrationsabhängig zu Homo- oder Heterooligomeren assoziieren können, ist derzeit noch unklar. Ebenso wäre denkbar, dass oligomere HAD-Phosphatasen vom C2a-Typ wie Chronophin auch durch spezielle posttranslationale Modifikationen oder in subzellulären Kompartimenten *in vivo* auch in monomerer Form vorliegen. Dies konnte bisher allerdings noch nicht gezeigt werden.

#### **4.2.4 Erkenntnisse über die Regulation von Substratspezifität durch Homodimerisierung anhand konstitutiv monomeren Chronophin**

In dieser Arbeit konnte durch mehrere Methoden gezeigt werden, dass die Mutation A194K/195K in Chronophin zu einer Störung der Dimerisierung führt, die sich wiederum in einer verminderten Enzymaktivität zeigt. Es kann hieraus allerdings nicht abgeleitet werden, dass die Alanine<sup>194-195</sup> für die Dimerisierung entscheidend sind. Vielmehr wurde durch die Insertion von zwei Lysinen die Integrität der gesamten Dimer Grenzfläche ausreichend gestört und somit eine Dimerisierung verhindert. Theoretisch wäre dies auch durch eine Mutation an einer anderen Position der Dimer Grenzfläche möglich und könnte weiteren ortsspezifischen Mutagenesen zur Überprüfung der hier gezeigten Zusammenhänge zwischen Dimerisierung und Substratspezifität als Anlass dienen.

Der Vergleich der räumlichen Strukturen von mCIN A194K/A195K mit mCIN WT ließ beim Wildtyp einen Mechanismus der wechselseitigen Stabilisierung der Substratspezifitätsschleife durch die jeweils andere Untereinheit deutlich werden. Dieser Zusammenhang, dass Homodimerisierung über Cap-Domänen vom C2a-Typ die Substratspezifität kontrolliert, wurde bislang nicht beschrieben. Um Pyridoxalphosphat effizient zu dephosphorylieren, ist bei Chronophin die korrekte Positionierung der Substratspezifitätsschleife nötig. Grundvoraussetzung für diese Ausrichtung ist die Homodimerisierung von Chronophin. Die homophile intermolekulare Interaktion der Dimerisierung entlang der Dimer Grenzfläche und somit abseits des aktiven Zentrums beeinflusst also im Sinne eines allosterischen Effekts die Spezifität von Chronophin. Die Positionierung der  $\beta$ -Haarnadelschleife, die möglicherweise auch bei anderen HAD-Phosphatasen als Substratspezifitätsschleife dient, mittels Homodimerisierung stellte sich im Vergleich mit den bekannten Kristallstrukturen oligomerer HAD-Hydrolasen mit C2a-Typ-Cap-Domäne als evolutionär konservierte und weit verbreitete Eigenschaft in dieser Strukturunterfamilie heraus. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse weisen auf ein allgemeines Prinzip hin, nach dem die Dimerisierung von HAD-Hydrolasen mit C2a-Typ-Cap-Domäne die

Substratspezifität reguliert und könnten auch für viele andere HAD-Phosphatasen neue Ansätze eröffnen, wie deren Aktivitäten gegenüber den vielfältigen Substraten möglicherweise auch therapeutisch beeinflusst werden könnten.

#### **4.2.5 Möglicher therapeutischer Nutzen einer Hemmung der Dimerisierung von Chronophin**

Die Dephosphorylierung von Pyridoxalphosphat durch Chronophin und die beobachtete enzymatische Aktivitätsminderung der monomeren Chronophin-Mutante könnte man sich möglicherweise therapeutisch zu Nutze machen. Die Rolle von Pyridoxalphosphat und seiner Bedeutung für Neoplasien ist bereits seit den 1950er Jahren Gegenstand der Forschung. Während anfangs die Überzeugung vorherrschte, die Einschränkung der Bioverfügbarkeit von Vitamin B6 würde eine antineoplastische Wirkung haben (220, 221), kamen neuere, auch auf klinischen Daten basierende Untersuchungen zu einem gegenteiligen Ergebnis. So korrelieren Serumspiegel von Vitamin B6 invers mit dem Risiko für Lungenkrebs (222). Auch stellt ein niedriges Expressionslevel der Pyridoxal Kinase (PDXK), die für die Umwandlung von Vitamin B6 in seine aktive Form Pyridoxalphosphat sorgt (siehe auch 1.3.1), auf Proteinebene einen prognostischen Marker für ein schlechtes medizinisches Outcome beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) dar (223). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Expression von PDXK verringerte Ansprechraten von NSCLC-Zellen auf das Chemotherapeutikum Cisplatin zur Folge hat, die Hemmung von Chronophin oder auch die Gabe von Pyridoxin dagegen ein verbessertes Ansprechen (223). Es wurde auch ein Zusammenhang zwischen gesteigertem PLP-Metabolismus und erhöhtem Risiko für Lungenkarzinome festgestellt (224). Ergebnisse über den gegenläufigen Zusammenhang zwischen PLP-Spiegeln im Serum und dem Risiko, ein kolorektales Karzinom oder Brustkrebs zu entwickeln, bestätigen ebenfalls die Vermutungen, die auf einen positiven Einfluss von PLP hindeuten (225-227).

Zusammenfassend wird vermutet, dass Vitamin B6 zwar für das initiale Wachstum eines Tumors wichtig ist, da es als Kofaktor vieler anaboler Prozesse dient, im weiteren Verlauf allerdings niedrige Vitamin B6-Spiegel das Tumorstadium oder dessen Fortbestehen fördern, da sie die Immunantwort des Körpers abschwächen und die Resistenz der Tumorzellen gegenüber stressinduziertem Zelltod erhöhen (223, 228).

Dies würde einen möglichen therapeutischen Ansatz ins Blickfeld rücken, der den PLP-Metabolismus einschränkt, somit die PLP-Spiegel in den Tumorzellen anhebt und sie so für „Zellstress“ wie Chemotherapie oder Bestrahlung empfänglicher macht. Ein mögliches Ziel dieser Therapie wäre Chronophin, das als Pyridoxalphosphatase den Abbau von PLP einleitet. Wie kürzlich berichtet, könnten auf PLP basierende Inhibitoren das aktive Zentrum von Chronophin hemmen, so durch möglicherweise gezielte Applikation die lokalen Vitamin B6 Spiegel anheben und die Sensitivität von Krebszellen gegenüber zytotoxischer Behandlung erhöhen (192).

Ein weiterer Ansatzpunkt ergibt sich aus dem in dieser Arbeit festgestellten Zusammenhang der Homodimerisierung und katalytischen Aktivität von Chronophin. Eine Monomerisierung von Chronophin würde eine funktionelle Hemmung des Enzyms und damit auch des Vitamin B6-Metabolismus zur Folge haben. Als Vorbilder könnten hierbei die HIV-1 Protease und die HIV-1 Reverse Transkriptase dienen, deren Aktivität ebenfalls von ihrem Homodimerisierungszustand abhängt (229, 230). Es wurde beschrieben, dass Peptidsequenzen, die der Struktur der Dimer Grenzfläche nachempfunden sind, die Dimerisierung inhibieren und so auch die Aktivität der HIV-1 Protease und der Reversen Transkriptase mindern (231-236).

Die Erkenntnis der Pulldown-Experimente, dass bereits die A194K/A195K Mutation in einem der beiden Protomere für die Inhibierung der Dimerisierung ausreichend ist (siehe 3.3.5), lässt das Prinzip eines Peptidinhibitors vielversprechend erscheinen, da das Peptid in der Interaktion mit unmutierten Chronophinmolekülen die Rolle des mutierten Dimerinterfaces übernehmen könnte und so die Dimerisierung, ähnlich wie in den GST-Pulldown-Experimenten gezeigt, hemmen könnte. Allerdings müssten bei einer

potentiellen Inhibierung von Chronophin auch dessen Funktion und die Auswirkungen einer möglichen Hemmung der Phosphatasefunktion gegenüber Substraten wie Phospho-Cofilin berücksichtigt werden. Neueste Ergebnisse, dass das Wachstum Chronophin-depletierter Glioblastomzellen *in vivo* gehemmt ist, aber gleichzeitig im Zellmodell die Invasivität dieser Zellen erhöht ist (126), zeigen, dass durch die zahlreichen Substrate von Chronophin und die nachgeschalteten Mechanismen beispielsweise im Vitamin B6-Stoffwechsel oder auch in der Aktin-Zytoskelettregulation die Effekte einer Chronophin-inhibierung noch nicht vollständig verstanden sind und deshalb weitere Forschung auf diesem Feld erfordern.

Die Gemeinsamkeiten der Dimerisierung von Chronophin und anderen HAD-Hydrolasen mit C2a-Cap-Domäne und die zu vermutende Analogie des Zusammenhangs zwischen Dimerisierung und Enzymaktivität eröffnen zudem noch weitere Ansätze, die Ergebnisse dieser Arbeit auch im Transfer auf andere HAD-Hydrolasen anzuwenden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Phosphatasen der HAD (haloacid dehalogenase)-Familie sind weit verbreitet in allen Domänen des Lebens und erfüllen die verschiedensten zellulären Aufgaben, beispielsweise in Metabolismus und Zellregulation. Die HAD-Phosphatase Chronophin zeigt Phosphataseaktivität unter anderem gegenüber Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP), einem essentiellen Kofaktor vieler biochemischer Prozesse, und Phosphocofilin, einem Regulator des Aktinzytoskeletts. Chronophin dimerisiert über die Interaktion zweier identischer Untereinheiten zu einem Homodimer. Ziel dieser Arbeit war, die Rolle dieser Dimerisierung, eines bei HAD-Phosphatasen weit verbreiteten Oligomerisierungszustandes, näher zu untersuchen.

Hierzu wurde die Dimerisierung erfolgreich durch den Austausch der Aminosäuren Alanin 194 und 195 zu Lysinen (Mutation A194K/A195K) gestört. Der Nachweis einer konstitutiv monomeren Chronophin-Mutante mittels Größenausschlusschromatographie, Rasterkraftmikroskopie, analytischer Ultrazentrifugation und Zellexperimenten wurde schließlich über die Strukturauflösung mittels Röntgenstrukturanalyse bestätigt. Aktivitätsmessungen der monomeren Mutante gegenüber dem Substrat PLP zeigten eine deutliche Verminderung der Phosphataseaktivität. Die Röntgenstrukturanalyse von Chronophin A194K/A195K im Vergleich mit Wildtyp-Chronophin enthüllte einen Mechanismus, wie die sogenannte Substratspezifitätsschleife, die für die korrekte Positionierung des PLP sorgt, im Homodimer des Wildtyps durch Interaktionen mit dem zweiten Protomer stabilisiert wird. Diese Stabilisierung fehlt bei der monomeren Mutante und äußert sich in einer veränderten Stellung der Substratspezifitätsschleife. Der Strukturvergleich von Chronophin mit weiteren HAD-Phosphatasen der selben strukturellen Untergruppe vom C2a-Typ lässt eine allgemeine Gültigkeit der hier beschriebenen allosterischen Kontrolle von Substratspezifität über Homodimerisierung bei HAD-Phosphatasen vermuten und könnte so neue Ansatzpunkte für möglicherweise auch therapeutisch nutzbare Aktivitätshemmungen liefern.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ringertz N. Nobel Lectures, Physiology Or Medicine, 1991-1995: World scientific; 1997.
2. Fischer EH, Krebs EG. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. The Journal of biological chemistry. 1955;216(1):121-32. Epub 1955/09/01.
3. Krebs EG, Fischer EH. Phosphorylase activity of skeletal muscle extracts. The Journal of biological chemistry. 1955;216(1):113-20. Epub 1955/09/01.
4. Krebs EG, Kent AB, Fischer EH. The muscle phosphorylase b kinase reaction. The Journal of biological chemistry. 1958;231(1):73-83. Epub 1958/03/01.
5. Barford D, Das AK, Egloff MP. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. Annual review of biophysics and biomolecular structure. 1998;27:133-64. Epub 1998/07/01.
6. Cohen P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. Trends in biochemical sciences. 2000;25(12):596-601. Epub 2000/12/16.
7. Hughes WE, Cooke FT, Parker PJ. Sac phosphatase domain proteins. The Biochemical journal. 2000;350 Pt 2:337-52. Epub 2000/08/19.
8. Neel BG, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. Current opinion in cell biology. 1997;9(2):193-204. Epub 1997/04/01.
9. Gohla A, Birkenfeld J, Bokoch GM. Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. Nature cell biology. 2005;7(1):21-9. Epub 2004/12/08.

10. Epstein JA, Neel BG. Signal transduction: an eye on organ development. *Nature*. 2003;426(6964):238-9. Epub 2003/11/25.
11. Cori GT, Cori CF. Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *The Journal of biological chemistry*. 1952;199(2):661-7. Epub 1952/12/01.
12. Gjörlöf-Wingren A, Saxena M, Williams S, Hammi D, Mustelin T. Characterization of TCR-induced receptor-proximal signaling events negatively regulated by the protein tyrosine phosphatase PEP. *European journal of immunology*. 1999;29(12):3845-54. Epub 1999/12/22.
13. Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*. 2006;127(3):635-48. Epub 2006/11/04.
14. Shi Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*. 2009;139(3):468-84. Epub 2009/11/03.
15. Moorhead GB, De Wever V, Templeton G, Kerk D. Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *The Biochemical journal*. 2009;417(2):401-9. Epub 2008/12/23.
16. Zhang M, Liu J, Kim Y, Dixon JE, Pfaff SL, Gill GN, et al. Structural and functional analysis of the phosphoryl transfer reaction mediated by the human small C-terminal domain phosphatase, Scp1. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2010;19(5):974-86. Epub 2010/03/12.
17. Motosugi K, Esaki N, Soda K. Purification and properties of a new enzyme, DL-2-haloacid dehalogenase, from *Pseudomonas* sp. *Journal of bacteriology*. 1982;150(2):522-7. Epub 1982/05/01.
18. Hisano T, Hata Y, Fujii T, Liu JQ, Kurihara T, Esaki N, et al. Crystal structure of L-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. YL. An alpha/beta hydrolase structure that is different from the alpha/beta hydrolase fold. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(34):20322-30. Epub 1996/08/23.

19. Ridder IS, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkstra BW. Crystal structures of intermediates in the dehalogenation of haloalkanoates by L-2-haloacid dehalogenase. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(43):30672-8. Epub 1999/10/16.
20. Koonin EV, Tatusov RL. Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. *Journal of molecular biology*. 1994;244(1):125-32. Epub 1994/11/18.
21. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(12):4576-9. Epub 1990/06/01.
22. Allen KN, Dunaway-Mariano D. Markers of fitness in a successful enzyme superfamily. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19(6):658-65.
23. Burroughs AM, Allen KN, Dunaway-Mariano D, Aravind L. Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes. *Journal of molecular biology*. 2006;361(5):1003-34. Epub 2006/08/08.
24. Seifried A, Schultz J, Gohla A. Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *The FEBS journal*. 2013;280(2):549-71. Epub 2012/05/23.
25. Pandya C, Brown S, Pieper U, Sali A, Dunaway-Mariano D, Babbitt PC, et al. Consequences of domain insertion on sequence-structure divergence in a superfold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(36):E3381-7. Epub 2013/08/21.
26. Rossmann MG, Moras D, Olsen KW. Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*. 1974;250(463):194-9. Epub 1974/07/19.

27. Aravind L, Galperin MY, Koonin EV. The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. *Trends in biochemical sciences*. 1998;23(4):127-9. Epub 1998/05/19.
28. Collet JF, Stroobant V, Pirard M, Delpierre G, Van Schaftingen E. A new class of phosphotransferases phosphorylated on an aspartate residue in an amino-terminal DXDX(T/V) motif. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(23):14107-12. Epub 1998/06/11.
29. Rinaldo-Matthis A, Rampazzo C, Reichard P, Bianchi V, Nordlund P. Crystal structure of a human mitochondrial deoxyribonucleotidase. *Nature structural biology*. 2002;9(10):779-87. Epub 2002/09/28.
30. Peisach E, Selengut JD, Dunaway-Mariano D, Allen KN. X-ray crystal structure of the hypothetical phosphotyrosine phosphatase MDP-1 of the haloacid dehalogenase superfamily. *Biochemistry*. 2004;43(40):12770-9. Epub 2004/10/06.
31. Kamenski T, Heilmeyer S, Meinhart A, Cramer P. Structure and mechanism of RNA polymerase II CTD phosphatases. *Molecular cell*. 2004;15(3):399-407. Epub 2004/08/12.
32. Lahiri SD, Zhang G, Dunaway-Mariano D, Allen KN. The pentacovalent phosphorus intermediate of a phosphoryl transfer reaction. *Science*. 2003;299(5615):2067-71. Epub 2003/03/15.
33. Collet JF, Stroobant V, Van Schaftingen E. Evidence for phosphotransferases phosphorylated on aspartate residue in N-terminal DXDX(T/V) motif. *Methods in enzymology*. 2002;354:177-88. Epub 2002/11/07.
34. Lahiri SD, Zhang G, Dunaway-Mariano D, Allen KN. Diversification of function in the haloacid dehalogenase enzyme superfamily: The role of the cap domain in hydrolytic phosphorus-carbon bond cleavage. *Bioorganic chemistry*. 2006;34(6):394-409. Epub 2006/10/31.

35. Lahiri SD, Zhang G, Dunaway-Mariano D, Allen KN. Caught in the act: the structure of phosphorylated beta-phosphoglucomutase from *Lactococcus lactis*. *Biochemistry*. 2002;41(26):8351-9. Epub 2002/06/26.
36. Dai JY, Finci L, Zhang CC, Lahiri S, Zhang GF, Peisach E, et al. Analysis of the Structural Determinants Underlying Discrimination between Substrate and Solvent in beta-Phosphoglucomutase Catalysis. *Biochemistry*. 2009;48(9):1984-95.
37. Zhang G, Mazurkie AS, Dunaway-Mariano D, Allen KN. Kinetic evidence for a substrate-induced fit in phosphonoacetaldehyde hydrolase catalysis. *Biochemistry*. 2002;41(45):13370-7. Epub 2002/11/06.
38. Kim HY, Heo YS, Kim JH, Park MH, Moon J, Kim E, et al. Molecular basis for the local conformational rearrangement of human phosphoserine phosphatase. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(48):46651-8. Epub 2002/09/06.
39. Park J, Guggisberg AM, Odom AR, Tolia NH. Cap-domain closure enables diverse substrate recognition by the C2-type haloacid dehalogenase-like sugar phosphatase *Plasmodium falciparum* HAD1. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2015;71(Pt 9):1824-34. Epub 2015/09/04.
40. Galburt EA, Pelletier J, Wilson G, Stoddard BL. Structure of a tRNA repair enzyme and molecular biology workhorse: T4 polynucleotide kinase. *Structure*. 2002;10(9):1249-60. Epub 2002/09/11.
41. Lu Z, Wang L, Dunaway-Mariano D, Allen KN. Structure-function analysis of 2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactonononate-9-phosphate phosphatase defines specificity elements in type C0 haloalkanoate dehalogenase family members. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(2):1224-33. Epub 2008/11/07.

42. Zhang G, Dai J, Wang L, Dunaway-Mariano D, Tremblay LW, Allen KN. Catalytic cycling in beta-phosphoglucomutase: a kinetic and structural analysis. *Biochemistry*. 2005;44(27):9404-16. Epub 2005/07/06.
43. Lahiri SD, Zhang G, Dai J, Dunaway-Mariano D, Allen KN. Analysis of the substrate specificity loop of the HAD superfamily cap domain. *Biochemistry*. 2004;43(10):2812-20. Epub 2004/03/10.
44. Seifried A, Knobloch G, Duraphe PS, Segerer G, Manhard J, Schindelin H, et al. Evolutionary and structural analyses of mammalian haloacid dehalogenase-type phosphatases AUM and chronophin provide insight into the basis of their different substrate specificities. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(6):3416-31. Epub 2013/12/18.
45. Infantes L, Otero LH, Beassoni PR, Boetsch C, Lisa AT, Domenech CE, et al. The structural domains of *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase cooperate in substrate hydrolysis: 3D structure and enzymatic mechanism. *Journal of molecular biology*. 2012;423(4):503-14. Epub 2012/08/28.
46. Krishnan N, Jeong DG, Jung SK, Ryu SE, Xiao A, Allis CD, et al. Dephosphorylation of the C-terminal tyrosyl residue of the DNA damage-related histone H2A.X is mediated by the protein phosphatase eyes absent. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(24):16066-70. Epub 2009/04/09.
47. Tootle TL, Silver SJ, Davies EL, Newman V, Latek RR, Mills IA, et al. The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase. *Nature*. 2003;426(6964):299-302. Epub 2003/11/25.
48. Rayapureddi JP, Kattamuri C, Steinmetz BD, Frankfort BJ, Ostrin EJ, Mardon G, et al. Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. *Nature*. 2003;426(6964):295-8. Epub 2003/11/25.

49. Sun CX, Magalhaes MA, Glogauer M. Rac1 and Rac2 differentially regulate actin free barbed end formation downstream of the fMLP receptor. *The Journal of cell biology*. 2007;179(2):239-45. Epub 2007/10/24.
50. Almo SC, Bonanno JB, Sauder JM, Emtage S, Dilorenzo TP, Malashkevich V, et al. Structural genomics of protein phosphatases. *Journal of structural and functional genomics*. 2007;8(2-3):121-40. Epub 2007/12/07.
51. Fonda ML, Zhang YN. Kinetic mechanism and divalent metal activation of human erythrocyte pyridoxal phosphatase. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1995;320(2):345-52. Epub 1995/07/10.
52. Kang BSC, H.J.; Kim, K.J.; Kwon, O.S. Crystal Structure of Human Pyridoxal 5'-Phosphate Phosphatase, PDB: 2CFR. Dept of Biochemistry, Kyungpook National University, Taegu, Korea. 2007.
53. Morais MC, Zhang W, Baker AS, Zhang G, Dunaway-Mariano D, Allen KN. The crystal structure of bacillus cereus phosphonoacetaldehyde hydrolase: insight into catalysis of phosphorus bond cleavage and catalytic diversification within the HAD enzyme superfamily. *Biochemistry*. 2000;39(34):10385-96. Epub 2000/08/24.
54. Zhang G, Morais MC, Dai J, Zhang W, Dunaway-Mariano D, Allen KN. Investigation of metal ion binding in phosphonoacetaldehyde hydrolase identifies sequence markers for metal-activated enzymes of the HAD enzyme superfamily. *Biochemistry*. 2004;43(17):4990-7. Epub 2004/04/28.
55. Ridder IS, Dijkstra BW. Identification of the Mg<sup>2+</sup>-binding site in the P-type ATPase and phosphatase members of the HAD (haloacid dehalogenase) superfamily by structural similarity to the response regulator protein CheY. *The Biochemical journal*. 1999;339 ( Pt 2):223-6. Epub 1999/04/07.
56. Harding MM, Nowicki MW, Walkinshaw MD. Metals in protein structures: a review of their principal features. *Crystallogr Rev*. 2010;16(4):247-302.

57. Kestler C, Knobloch G, Tessmer I, Jeanclos E, Schindelin H, Gohla A. Chronophin dimerization is required for proper positioning of its substrate specificity loop. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(5):3094-103. Epub 2013/12/18.
58. Fonda ML. Purification and characterization of vitamin B6-phosphate phosphatase from human erythrocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(22):15978-83. Epub 1992/08/05.
59. Jang YM, Kim DW, Kang TC, Won MH, Baek NI, Moon BJ, et al. Human pyridoxal phosphatase. Molecular cloning, functional expression, and tissue distribution. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(50):50040-6. Epub 2003/10/03.
60. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 1990;215(3):403-10. Epub 1990/10/05.
61. Li C, Liang YY, Feng XH, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Essential phosphatases and a phospho-degron are critical for regulation of SRC-3/AIB1 coactivator function and turnover. *Molecular cell*. 2008;31(6):835-49. Epub 2008/10/17.
62. Percudani R, Peracchi A. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO reports*. 2003;4(9):850-4. Epub 2003/09/02.
63. Palm D, Klein HW, Schinzel R, Buehner M, Helmreich EJ. The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis. *Biochemistry*. 1990;29(5):1099-107. Epub 1990/02/06.
64. Kikuchi G, Kumar A, Talmage P, Shemin D. The enzymatic synthesis of delta-aminolevulinic acid. *The Journal of biological chemistry*. 1958;233(5):1214-9. Epub 1958/11/01.
65. Awapara J, Sandman RP, Hanly C. Activation of DOPA decarboxylase by pyridoxal phosphate. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1962;98:520-5. Epub 1962/09/01.

66. Yard BA, Carter LG, Johnson KA, Overton IM, Dorward M, Liu H, et al. The structure of serine palmitoyltransferase; gateway to sphingolipid biosynthesis. *Journal of molecular biology*. 2007;370(5):870-86. Epub 2007/06/15.
67. Mills PB, Surtees RA, Champion MP, Beesley CE, Dalton N, Scambler PJ, et al. Neonatal epileptic encephalopathy caused by mutations in the PNPO gene encoding pyridox(am)ine 5'-phosphate oxidase. *Human molecular genetics*. 2005;14(8):1077-86. Epub 2005/03/18.
68. Robinson K, Mayer EL, Miller DP, Green R, van Lente F, Gupta A, et al. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation*. 1995;92(10):2825-30. Epub 1995/11/15.
69. Lin PT, Cheng CH, Liaw YP, Lee BJ, Lee TW, Huang YC. Low pyridoxal 5'-phosphate is associated with increased risk of coronary artery disease. *Nutrition*. 2006;22(11-12):1146-51. Epub 2006/10/19.
70. Wei EK, Giovannucci E, Selhub J, Fuchs CS, Hankinson SE, Ma J. Plasma vitamin B6 and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(9):684-92. Epub 2005/05/05.
71. Zhang XH, Ma J, Smith-Warner SA, Lee JE, Giovannucci E. Vitamin B6 and colorectal cancer: current evidence and future directions. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2013;19(7):1005-10. Epub 2013/03/08.
72. Adams PW, Rose DP, Folkard J, Wynn V, Seed M, Strong R. Effect of pyridoxine hydrochloride (vitamin B 6 ) upon depression associated with oral contraception. *Lancet*. 1973;1(7809):899-904. Epub 1973/04/28.
73. Hvas AM, Juul S, Bech P, Nexø E. Vitamin B6 level is associated with symptoms of depression. *Psychotherapy and psychosomatics*. 2004;73(6):340-3. Epub 2004/10/14.

74. Mooney S, Leuendorf JE, Hendrickson C, Hellmann H. Vitamin B6: a long known compound of surprising complexity. *Molecules*. 2009;14(1):329-51. Epub 2009/01/16.
75. Merrill AH, Jr., Henderson JM, Wang E, McDonald BW, Millikan WJ. Metabolism of vitamin B-6 by human liver. *The Journal of nutrition*. 1984;114(9):1664-74. Epub 1984/09/01.
76. Albersen M, Bosma M, Knoers NV, de Ruyter BH, Diekman EF, de Ruijter J, et al. The intestine plays a substantial role in human vitamin B6 metabolism: a Caco-2 cell model. *PloS one*. 2013;8(1):e54113. Epub 2013/01/24.
77. Anderson BB, Newmark PA, Rawlins M, Green R. Plasma binding of vitamin B6 compounds. *Nature*. 1974;250(5466):502-4. Epub 1974/08/09.
78. Lumeng L, Brashear RE, Li TK. Pyridoxal 5'-phosphate in plasma: source, protein-binding, and cellular transport. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1974;84(3):334-43. Epub 1974/09/01.
79. Anderson BB, Fulford-Jones CE, Child JA, Beard ME, Bateman CJ. Conversion of vitamin B 6 compounds to active forms in the red blood cell. *The Journal of clinical investigation*. 1971;50(9):1901-9. Epub 1971/09/01.
80. Fonda ML, Harker CW. Metabolism of pyridoxine and protein binding of the metabolites in human erythrocytes. *The American journal of clinical nutrition*. 1982;35(6):1391-9. Epub 1982/06/01.
81. Ink SL, Mehansho H, Henderson LM. The binding of pyridoxal to hemoglobin. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257(9):4753-7. Epub 1982/05/10.
82. Krebs EG, Fischer EH. Phosphorylase and Related Enzymes of Glycogen Metabolism. *Vitamins and hormones*. 1964;22:399-410. Epub 1964/01/01.

83. Li TK, Lumeng L, Veitch RL. Regulation of pyridoxal 5'-phosphate metabolism in liver. *Biochemical and biophysical research communications*. 1974;61(2):677-84. Epub 1974/11/27.
84. Whyte MP, Mahuren JD, Vrabel LA, Coburn SP. Markedly increased circulating pyridoxal-5'-phosphate levels in hypophosphatasia. Alkaline phosphatase acts in vitamin B6 metabolism. *The Journal of clinical investigation*. 1985;76(2):752-6. Epub 1985/08/01.
85. Turner JM. Pyridoxal phosphate breakdown by an alkaline-phosphatase preparation. *The Biochemical journal*. 1961;80:663-8. Epub 1961/09/01.
86. Whyte MP, Mahuren JD, Fedde KN, Cole FS, McCabe ER, Coburn SP. Perinatal hypophosphatasia: tissue levels of vitamin B6 are unremarkable despite markedly increased circulating concentrations of pyridoxal-5'-phosphate. Evidence for an ectoenzyme role for tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *The Journal of clinical investigation*. 1988;81(4):1234-9. Epub 1988/04/01.
87. Fujimoto S, Urata Y, Nakagawa T, Ohara A. Characterization of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from bovine kidney cortex. *Journal of biochemistry*. 1984;96(4):1079-88. Epub 1984/10/01.
88. Murakami K, Fujimoto S, Ohara A. Subcellular localization and some properties of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from rat liver. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 1986;34(8):3320-7. Epub 1986/08/01.
89. Gohla A, Raab A, Albersen M, Duif NV, Jeanclos E. WHOLE-BODY DELETION OF THE PYRIDOXAL PHOSPHATASE CHRONOPHIN IN MICE ELEVATES GABA LEVELS IN THE BRAIN AND TRIGGERS ANXIETY-LIKE BEHAVIOR. *The FASEB Journal*. 2016;30(1 Supplement):1119.10.

90. Small JV, Herzog M, Anderson K. Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium. *The Journal of cell biology*. 1995;129(5):1275-86. Epub 1995/06/01.
91. Bugyi B, Carlier MF. Control of actin filament treadmilling in cell motility. *Annual review of biophysics*. 2010;39:449-70. Epub 2010/03/03.
92. DesMarais V, Ghosh M, Eddy R, Condeelis J. Cofilin takes the lead. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 1):19-26. Epub 2004/12/24.
93. Mouneimne G, DesMarais V, Sidani M, Scemes E, Wang W, Song X, et al. Spatial and temporal control of cofilin activity is required for directional sensing during chemotaxis. *Current biology : CB*. 2006;16(22):2193-205. Epub 2006/11/23.
94. Bamburg JR. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annual review of cell and developmental biology*. 1999;15:185-230. Epub 1999/12/28.
95. Ghosh M, Song X, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS, Condeelis JS. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science*. 2004;304(5671):743-6. Epub 2004/05/01.
96. Hall A. The cytoskeleton and cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2009;28(1-2):5-14. Epub 2009/01/21.
97. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(5):362-74. Epub 2003/05/02.
98. Kiuchi T, Ohashi K, Kurita S, Mizuno K. Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers. *The Journal of cell biology*. 2007;177(3):465-76. Epub 2007/05/02.
99. Wang W, Eddy R, Condeelis J. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(6):429-40. Epub 2007/05/25.

100. Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerkhove J, Ampe C. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *European journal of cell biology*. 2008;87(8-9):649-67. Epub 2008/05/24.
101. Hotulainen P, Paunola E, Vartiainen MK, Lappalainen P. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(2):649-64. Epub 2004/11/19.
102. Ichetovkin I, Grant W, Condeelis J. Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Current biology : CB*. 2002;12(1):79-84. Epub 2002/01/16.
103. Chan C, Beltzner CC, Pollard TD. Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Current biology : CB*. 2009;19(7):537-45. Epub 2009/04/14.
104. Andrianantoandro E, Pollard TD. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Molecular cell*. 2006;24(1):13-23. Epub 2006/10/05.
105. Zheng B, Han M, Bernier M, Wen JK. Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *The FEBS journal*. 2009;276(10):2669-85. Epub 2009/05/23.
106. Olson EN, Nordheim A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(5):353-65. Epub 2010/04/24.
107. Nebel G, Meuer SC, Samstag Y. Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(42):26276-80. Epub 1996/10/18.
108. Chua BT, Volbracht C, Tan KO, Li R, Yu VC, Li P. Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction. *Nature cell biology*. 2003;5(12):1083-9. Epub 2003/11/25.

109. Klamt F, Zdanov S, Levine RL, Pariser A, Zhang Y, Zhang B, et al. Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nature cell biology*. 2009;11(10):1241-6. Epub 2009/09/08.
110. Bernstein BW, Painter WB, Chen H, Minamide LS, Abe H, Bamburg JR. Intracellular pH modulation of ADF/cofilin proteins. *Cell motility and the cytoskeleton*. 2000;47(4):319-36. Epub 2000/11/28.
111. Frantz C, Barreiro G, Dominguez L, Chen X, Eddy R, Condeelis J, et al. Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. *The Journal of cell biology*. 2008;183(5):865-79. Epub 2008/11/26.
112. Yonezawa N, Nishida E, Iida K, Yahara I, Sakai H. Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(15):8382-6. Epub 1990/05/25.
113. Gorbatyuk VY, Nosworthy NJ, Robson SA, Bains NP, Maciejewski MW, Dos Remedios CG, et al. Mapping the phosphoinositide-binding site on chick cofilin explains how PIP2 regulates the cofilin-actin interaction. *Molecular cell*. 2006;24(4):511-22. Epub 2006/11/23.
114. Agnew BJ, Minamide LS, Bamburg JR. Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(29):17582-7. Epub 1995/07/21.
115. Moriyama K, Iida K, Yahara I. Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 1996;1(1):73-86. Epub 1996/01/01.
116. Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, et al. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*. 1998;393(6687):805-9. Epub 1998/07/09.

117. Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, et al. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*. 1998;393(6687):809-12. Epub 1998/07/09.
118. Toshima J, Toshima JY, Takeuchi K, Mori R, Mizuno K. Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(33):31449-58. Epub 2001/06/22.
119. Niwa R, Nagata-Ohashi K, Takeichi M, Mizuno K, Uemura T. Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell*. 2002;108(2):233-46. Epub 2002/02/08.
120. Ambach A, Saunus J, Konstandin M, Wesselborg S, Meuer SC, Samstag Y. The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *European journal of immunology*. 2000;30(12):3422-31. Epub 2000/11/28.
121. Huang TY, Minamide LS, Bamburg JR, Bokoch GM. Chronophin mediates an ATP-sensing mechanism for cofilin dephosphorylation and neuronal cofilin-actin rod formation. *Developmental cell*. 2008;15(5):691-703. Epub 2008/11/13.
122. Delorme-Walker V, Seo JY, Gohla A, Fowler B, Bohl B, DerMardirossian C. Chronophin coordinates cell leading edge dynamics by controlling active cofilin levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(37):E5150-9. Epub 2015/09/02.
123. Zoudilova M, Kumar P, Ge L, Wang P, Bokoch GM, DeFea KA. Beta-arrestin-dependent regulation of the cofilin pathway downstream of protease-activated receptor-2. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(28):20634-46. Epub 2007/05/15.

124. Kim JE, Ryu HJ, Kim MJ, Kim DW, Kwon OS, Choi SY, et al. Pyridoxal-5'-phosphate phosphatase/chronophin induces astroglial apoptosis via actin-depolymerizing factor/cofilin system in the rat brain following status epilepticus. *Glia*. 2010;58(16):1937-48. Epub 2010/08/26.
125. Pope BJ, Zierler-Gould KM, Kuhne R, Weeds AG, Ball LJ. Solution structure of human cofilin: actin binding, pH sensitivity, and relationship to actin-depolymerizing factor. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(6):4840-8. Epub 2003/11/25.
126. Schulze M, Fedorchenko O, Zink TG, Knobbe-Thomsen CB, Kraus S, Schwinn S, et al. Chronophin is a glial tumor modifier involved in the regulation of glioblastoma growth and invasiveness. *Oncogene*. 2015. Epub 2015/11/10.
127. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemie*. 7. Aufl. ed. Berlin u.a.: Springer Spektrum; 2013. XLII, 1198 S. 2022 Abb p.
128. Kumar V, Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*. 1988;55(1):145-56. Epub 1988/10/07.
129. Tsai SY, Carlstedt-Duke J, Weigel NL, Dahlman K, Gustafsson JA, Tsai MJ, et al. Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell*. 1988;55(2):361-9. Epub 1988/10/21.
130. Kumar R. *Nuclear Signaling Pathways and Targeting Transcription in Cancer*: Humana Press; 2013.
131. Lonard DM, O'Malley BW. Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends in biochemical sciences*. 2005;30(3):126-32. Epub 2005/03/09.
132. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*. 1997;277(5328):965-8. Epub 1997/08/15.

133. Wu RC, Qin J, Hashimoto Y, Wong J, Xu J, Tsai SY, et al. Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(10):3549-61. Epub 2002/04/25.
134. Lee SK, Kim HJ, Kim JW, Lee JW. Steroid receptor coactivator-1 and its family members differentially regulate transactivation by the tumor suppressor protein p53. *Mol Endocrinol*. 1999;13(11):1924-33. Epub 1999/11/07.
135. Arimura A, van Peer M, Schroder AJ, Rothman PB. The transcriptional coactivator pCIP (NCoA-3) is up-regulated by STAT6 and serves as a positive regulator of transcriptional activation by STAT6. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(30):31105-12. Epub 2004/05/18.
136. Wu RC, Qin J, Yi P, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, et al. Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Molecular cell*. 2004;15(6):937-49. Epub 2004/09/24.
137. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2011;67(Pt 4):235-42. Epub 2011/04/05.
138. Leslie AG. The integration of macromolecular diffraction data. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2006;62(Pt 1):48-57. Epub 2005/12/22.
139. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography*. 2007;40(Pt 4):658-74. Epub 2007/08/01.

140. Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2010;66(Pt 2):213-21. Epub 2010/02/04.
141. Krissinel E, Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of molecular biology*. 2007;372(3):774-97. Epub 2007/08/08.
142. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud Se, Wilkins M, Appel R, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker J, editor. *The Proteomics Protocols Handbook*: Humana Press; 2005. p. 571-607.
143. Berman HM. The Protein Data Bank and the Nucleic Acid Database. *Biophysical journal*. 2001;80(1):32a-a.
144. Evans P. Scaling and assessment of data quality. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2006;62(Pt 1):72-82. Epub 2005/12/22.
145. Kaelin WG, Jr., Pallas DC, DeCaprio JA, Kaye FJ, Livingston DM. Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell*. 1991;64(3):521-32. Epub 1991/02/18.
146. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5. Epub 1970/08/15.
147. Meyer TS, Lamberts BL. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochimica et biophysica acta*. 1965;107(1):144-5. Epub 1965/08/24.

148. Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual review of biochemistry*. 1989;58:913-49. Epub 1989/01/01.
149. Ericsson UB, Hallberg BM, Detitta GT, Dekker N, Nordlund P. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Analytical biochemistry*. 2006;357(2):289-98. Epub 2006/09/12.
150. Lo MC, Aulabaugh A, Jin G, Cowling R, Bard J, Malamas M, et al. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Analytical biochemistry*. 2004;332(1):153-9. Epub 2004/08/11.
151. Boas DA, Pitris C. *Handbook of biomedical optics*. Boca Raton, Fla. [u.a.]: CRC Press; 2011. XIX, 787 S. p.
152. Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*. 1994;19(11):780-2. Epub 1994/06/01.
153. Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods*. 2006;3(10):793-5. Epub 2006/08/10.
154. Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Physical review letters*. 1986;56(9):930-3. Epub 1986/03/03.
155. Ratcliff GC, Erie DA. A novel single-molecule study to determine protein-protein association constants. *J Am Chem Soc*. 2001;123(24):5632-5. Epub 2001/06/14.
156. Lamm O. *Die Differentialgleichung der Ultrazentrifugierung*. Stockholm [u.a.]: Almqvist & Wiksell [u.a.]; 1929. 4 S p.
157. Svedberg T, Pedersen KO. *The Ultracentrifuge*. The Ultracentrifuge. 1940.

158. Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophysical journal*. 2000;78(3):1606-19. Epub 2000/02/29.
159. Martin B, Pallen CJ, Wang JH, Graves DJ. Use of fluorinated tyrosine phosphates to probe the substrate specificity of the low molecular weight phosphatase activity of calcineurin. *The Journal of biological chemistry*. 1985;260(28):14932-7. Epub 1985/12/05.
160. Menten L, Michaelis M. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z*. 1913;49:333-69.
161. Glusker JP, Lewis M, Rossi M. *Crystal structure analysis for chemists and biologists*. New York: VCH; 1994. xvii, 854 p. p.
162. Rossmann MG, Blow DM. Detection of Sub-Units within Crystallographic Asymmetric Unit. *Acta Crystallogr*. 1962;15(Jan10):24-&.
163. Huber R. Die Automatisierte Faltmolekulmethode. *Acta Crystallogr*. 1965;19:353-&.
164. Hoppe W. Die Faltmolekülmethode - Eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannter Molekülstruktur. *Acta Crystallogr*. 1957;10(12):750-1.
165. McRee DE. *Practical protein crystallography*. San Diego: Academic Press; 1993. xvi, 386 p. p.
166. McPherson A. *Introduction to macromolecular crystallography*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell; 2009. x, 267 p. p.
167. Rhodes G. *Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models*. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press; 2006. xxv, 306 p. p.
168. Levy ED, Boeri Erba E, Robinson CV, Teichmann SA. Assembly reflects evolution of protein complexes. *Nature*. 2008;453(7199):1262-5. Epub 2008/06/20.

169. Goodsell DS, Olson AJ. Structural symmetry and protein function. Annual review of biophysics and biomolecular structure. 2000;29:105-53. Epub 2000/08/15.
170. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemie. 5. Aufl. ed. Heidelberg [u.a.]: Spektrum Akad. Verl.; 2003. XXXV, 1153 S. p.
171. Vaughan-Jones RD, Spitzer KW, Swietach P. Intracellular pH regulation in heart. Journal of molecular and cellular cardiology. 2009;46(3):318-31. Epub 2008/12/02.
172. Rupp B. Biomolecular crystallography : principles, practice, and application to structural biology. New York, NY [u.a.]: Garland Science; 2010. XXI, 809 S. p.
173. Ofran Y, Rost B. Analysing six types of protein-protein interfaces. Journal of molecular biology. 2003;325(2):377-87. Epub 2002/12/19.
174. Xu Z, Horwich AL, Sigler PB. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex. Nature. 1997;388(6644):741-50. Epub 1997/08/21.
175. Fenton WA, Horwich AL. GroEL-mediated protein folding. Protein science : a publication of the Protein Society. 1997;6(4):743-60. Epub 1997/04/01.
176. Hesterkamp T, Hauser S, Lutcke H, Bukau B. Escherichia coli trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996;93(9):4437-41. Epub 1996/04/30.
177. Gao GJ, Fonda ML. Kinetic analysis and chemical modification of vitamin B6 phosphatase from human erythrocytes. The Journal of biological chemistry. 1994;269(10):7163-8. Epub 1994/03/11.
178. Koshland DE. The application and usefulness of the ratio  $k(\text{cat})/K(\text{M})$ . Bioorganic chemistry. 2002;30(3):211-3. Epub 2002/10/31.

179. Lu Z, Dunaway-Mariano D, Allen KN. HAD superfamily phosphotransferase substrate diversification: structure and function analysis of HAD subclass IIB sugar phosphatase BT4131. *Biochemistry*. 2005;44(24):8684-96. Epub 2005/06/15.
180. Wen J, Arakawa T, Philo JS. Size-exclusion chromatography with on-line light-scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions. *Analytical biochemistry*. 1996;240(2):155-66. Epub 1996/09/05.
181. Wu C-s. *Column handbook for size exclusion chromatography*. San Diego, Calif. ; London: Academic; 1999. xxiii, 637 p. p.
182. Berek D. Size exclusion chromatography--a blessing and a curse of science and technology of synthetic polymers. *Journal of separation science*. 2010;33(3):315-35. Epub 2010/02/04.
183. Brar SS, Sacho EJ, Tessmer I, Croteau DL, Erie DA, Diaz M. Activation-induced deaminase, AID, is catalytically active as a monomer on single-stranded DNA. *DNA repair*. 2008;7(1):77-87. Epub 2007/09/25.
184. Schneider SW, Larmer J, Henderson RM, Oberleithner H. Molecular weights of individual proteins correlate with molecular volumes measured by atomic force microscopy. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1998;435(3):362-7. Epub 1998/02/28.
185. Mackay JP, Sunde M, Lowry JA, Crossley M, Matthews JM. Protein interactions: is seeing believing? *Trends in biochemical sciences*. 2007;32(12):530-1. Epub 2007/11/06.
186. Wissmueller S, Font J, Liew CW, Cram E, Schroeder T, Turner J, et al. Protein-protein interactions: analysis of a false positive GST pulldown result. *Proteins*. 2011;79(8):2365-71. Epub 2011/06/04.

187. Riley LG, Ralston GB, Weiss AS. Multimer formation as a consequence of separate homodimerization domains: the human c-Jun leucine zipper is a transplantable dimerization module. *Protein engineering*. 1996;9(2):223-30. Epub 1996/02/01.
188. Dirr H, Reinemer P, Huber R. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1994;220(3):645-61. Epub 1994/03/15.
189. Vagenende V, Yap MG, Trout BL. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*. 2009;48(46):11084-96. Epub 2009/10/13.
190. Schuck P. On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Analytical biochemistry*. 2003;320(1):104-24. Epub 2003/08/05.
191. Martinez CR, Iverson BL. Rethinking the term "pi-stacking". *Chem Sci*. 2012;3(7):2191-201.
192. Knobloch G, Jabari N, Stadlbauer S, Schindelin H, Köhn M, Gohla A. Synthesis of hydrolysis-resistant pyridoxal 5'-phosphate analogs and their biochemical and X-ray crystallographic characterization with the pyridoxal phosphatase chronophin. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2015.
193. Neet KE, Timm DE. Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1994;3(12):2167-74. Epub 1994/12/01.
194. Marianayagam NJ, Sunde M, Matthews JM. The power of two: protein dimerization in biology. *Trends in biochemical sciences*. 2004;29(11):618-25. Epub 2004/10/27.
195. Hashimoto K, Nishi H, Bryant S, Panchenko AR. Caught in self-interaction: evolutionary and functional mechanisms of protein homooligomerization. *Physical biology*. 2011;8(3):035007. Epub 2011/05/17.

196. Dayhoff JE, Shoemaker BA, Bryant SH, Panchenko AR. Evolution of protein binding modes in homooligomers. *Journal of molecular biology*. 2010;395(4):860-70. Epub 2009/11/03.
197. Chen Y, Dokholyan NV. Natural selection against protein aggregation on self-interacting and essential proteins in yeast, fly, and worm. *Molecular biology and evolution*. 2008;25(8):1530-3. Epub 2008/05/27.
198. Monod J, Wyman J, Changeux JP. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *Journal of molecular biology*. 1965;12:88-118. Epub 1965/05/01.
199. Boulanger RR, Jr., Kantrowitz ER. Characterization of a monomeric *Escherichia coli* alkaline phosphatase formed upon a single amino acid substitution. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(26):23497-501. Epub 2003/04/23.
200. MacBeath G, Kast P, Hilvert D. Redesigning enzyme topology by directed evolution. *Science*. 1998;279(5358):1958-61. Epub 1998/04/16.
201. Majeti R, Bilwes AM, Noel JP, Hunter T, Weiss A. Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science*. 1998;279(5347):88-91. Epub 1998/01/24.
202. Desai DM, Sap J, Schlessinger J, Weiss A. Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase. *Cell*. 1993;73(3):541-54. Epub 1993/05/07.
203. Bilwes AM, den Hertog J, Hunter T, Noel JP. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. *Nature*. 1996;382(6591):555-9. Epub 1996/08/08.
204. Blanchetot C, Tertoolen LG, den Hertog J. Regulation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha by oxidative stress. *The EMBO journal*. 2002;21(4):493-503. Epub 2002/02/16.

205. van der Wijk T, Blanchetot C, Overvoorde J, den Hertog J. Redox-regulated rotational coupling of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha dimers. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(16):13968-74. Epub 2003/02/13.
206. Chin CN, Sachs JN, Engelman DM. Transmembrane homodimerization of receptor-like protein tyrosine phosphatases. *FEBS letters*. 2005;579(17):3855-8. Epub 2005/06/28.
207. Jiang G, den Hertog J, Su J, Noel J, Sap J, Hunter T. Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase-alpha. *Nature*. 1999;401(6753):606-10. Epub 1999/10/19.
208. Lee S, Faux C, Nixon J, Alete D, Chilton J, Hawadle M, et al. Dimerization of protein tyrosine phosphatase sigma governs both ligand binding and isoform specificity. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(5):1795-808. Epub 2006/12/21.
209. Parfenyev AN, Salminen A, Halonen P, Hachimori A, Baykov AA, Lahti R. Quaternary structure and metal ion requirement of family II pyrophosphatases from *Bacillus subtilis*, *Streptococcus gordonii*, and *Streptococcus mutans*. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(27):24511-8. Epub 2001/05/09.
210. Mei G, Di Venere A, Rosato N, Finazzi-Agro A. The importance of being dimeric. *FEBS Journal*. 2005;272(1):16-27.
211. Nooren IM, Thornton JM. Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. *Journal of molecular biology*. 2003;325(5):991-1018. Epub 2003/01/16.
212. Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(25):14250-5. Epub 2001/12/06.

213. Baker AS, Ciocci MJ, Metcalf WW, Kim J, Babbitt PC, Wanner BL, et al. Insights into the mechanism of catalysis by the P-C bond-cleaving enzyme phosphonoacetaldehyde hydrolase derived from gene sequence analysis and mutagenesis. *Biochemistry*. 1998;37(26):9305-15. Epub 1998/07/02.
214. Biswas T, Yi L, Aggarwal P, Wu J, Rubin JR, Stuckey JA, et al. The tail of KdsC: conformational changes control the activity of a haloacid dehalogenase superfamily phosphatase. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(44):30594-603. Epub 2009/09/04.
215. Nguyen HH, Wang L, Huang H, Peisach E, Dunaway-Mariano D, Allen KN. Structural determinants of substrate recognition in the HAD superfamily member D-glycero-D-manno-heptose-1,7-bisphosphate phosphatase (GmhB). *Biochemistry*. 2010;49(6):1082-92. Epub 2010/01/07.
216. Felts RL, Ou Z, Reilly TJ, Tanner JJ. Structure of recombinant *Haemophilus influenzae* e (P4) acid phosphatase reveals a new member of the haloacid dehalogenase superfamily. *Biochemistry*. 2007;46(39):11110-9. Epub 2007/09/11.
217. Sychala J, Chen V, Oka J, Mitchell BS. ATP and phosphate reciprocally affect subunit association of human recombinant High Km 5'-nucleotidase. Role for the C-terminal polyglutamic acid tract in subunit association and catalytic activity. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1999;259(3):851-8. Epub 1999/03/27.
218. Pesi R, Allegrini S, Careddu MG, Filoni DN, Camici M, Tozzi MG. Active and regulatory sites of cytosolic 5'-nucleotidase. *The FEBS journal*. 2010;277(23):4863-72. Epub 2010/10/30.
219. Zhu H, Smith P, Wang LK, Shuman S. Structure-function analysis of the 3' phosphatase component of T4 polynucleotide kinase/phosphatase. *Virology*. 2007;366(1):126-36. Epub 2007/05/12.

220. Stoerk HC. Growth retardation of lymphosarcoma implants in pyridoxine deficient rats by testosterone and cortisone. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1950;74(4):798-800. Epub 1950/08/01.
221. Yuspa SH, Blaustein AS. Inhibitory effect of pyridoxine deficiency on growth of a transplanted tumor in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1966;123(2):398-403. Epub 1966/11/01.
222. Johansson M, Relton C, Ueland PM, Vollset SE, Midttun O, Nygard O, et al. Serum B vitamin levels and risk of lung cancer. *Jama.* 2010;303(23):2377-85. Epub 2010/06/17.
223. Galluzzi L, Vitale I, Senovilla L, Olaussen KA, Pinna G, Eisenberg T, et al. Prognostic impact of vitamin B6 metabolism in lung cancer. *Cell reports.* 2012;2(2):257-69. Epub 2012/08/03.
224. Zuo H, Ueland PM, Eussen SJ, Tell GS, Vollset SE, Nygard O, et al. Markers of vitamin B6 status and metabolism as predictors of incident cancer: The Hordaland Health Study. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2014. Epub 2014/11/19.
225. Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Vitamin B6 and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Jama.* 2010;303(11):1077-83. Epub 2010/03/18.
226. Eussen SJ, Vollset SE, Hustad S, Midttun O, Meyer K, Fredriksen A, et al. Plasma vitamins B2, B6, and B12, and related genetic variants as predictors of colorectal cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2010;19(10):2549-61. Epub 2010/09/04.
227. Wu W, Kang S, Zhang D. Association of vitamin B6, vitamin B12 and methionine with risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis. *British journal of cancer.* 2013;109(7):1926-44. Epub 2013/08/03.

228. Galluzzi L, Vacchelli E, Michels J, Garcia P, Kepp O, Senovilla L, et al. Effects of vitamin B6 metabolism on oncogenesis, tumor progression and therapeutic responses. *Oncogene*. 2013;32(42):4995-5004. Epub 2013/01/22.
229. Restle T, Muller B, Goody RS. RNase H activity of HIV reverse transcriptases is confined exclusively to the dimeric forms. *FEBS letters*. 1992;300(1):97-100. Epub 1992/03/23.
230. Cheng YS, Yin FH, Foundling S, Blomstrom D, Kettner CA. Stability and activity of human immunodeficiency virus protease: comparison of the natural dimer with a homologous, single-chain tethered dimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(24):9660-4. Epub 1990/12/01.
231. Zhang ZY, Poorman RA, Maggiora LL, Heinrikson RL, Kezdy FJ. Dissociative Inhibition of Dimeric Enzymes - Kinetic Characterization of the Inhibition of Hiv-1 Protease by Its CooH-Terminal Tetrapeptide. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(24):15591-4.
232. Schramm HJ, Boetzel J, Buttner J, Fritsche E, Gohring W, Jaeger E, et al. The inhibition of human immunodeficiency virus proteases by 'interface peptides'. *Antiviral research*. 1996;30(2-3):155-70. Epub 1996/05/01.
233. Divita G, Restle T, Goody RS, Chermann JC, Baillon JG. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase dimerization using synthetic peptides derived from the connection domain. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(18):13080-3. Epub 1994/05/06.
234. Sluis-Cremer N, Tachedjian G. Modulation of the oligomeric structures of HIV-1 retroviral enzymes by synthetic peptides and small molecules. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2002;269(21):5103-11. Epub 2002/10/24.

235. Camarasa MJ, Velazquez S, San-Felix A, Perez-Perez MJ, Gago F. Dimerization inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase, protease and integrase: a single mode of inhibition for the three HIV enzymes? *Antiviral research*. 2006;71(2-3):260-7. Epub 2006/07/29.
236. Frutos S, Rodriguez-Mias RA, Madurga S, Collinet B, Reboud-Ravaux M, Ludevid D, et al. Disruption of the HIV-1 protease dimer with interface peptides: structural studies using NMR spectroscopy combined with [2-(13)C]-Trp selective labeling. *Biopolymers*. 2007;88(2):164-73. Epub 2007/01/20.
237. Chen VB, Arendall WB, 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2010;66(Pt 1):12-21. Epub 2010/01/09.

Teile dieser Arbeit wurden im *Journal of Biological Chemistry* unter dem Titel „Chronophin dimerization is required for proper positioning of its substrate specificity loop“, Kestler Christian, Knobloch Gunnar, Tessmer Ingrid, Jeanclos Elisabeth, Schindelin, Hermann und Gohla Antje, Volume 289, 5, 3094-3103, 2013 veröffentlicht, © The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

## 7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Exemplarische Schemazeichnung der rossmannoiden Faltung bei HAD-Phosphatasen vom Cap-Typ 2.....	5
Abbildung 2: Reaktionsmechanismus von HAD-Phosphatasen .....	6
Abbildung 3: Exemplarische Vertreter der verschiedenen Cap-Domänen bei HAD-Phosphatasen.....	8
Abbildung 4: Koordinierung des essentiellen Kofaktors Magnesium.....	11
Abbildung 5: Darstellung der Homodimerisierung von murinem Chronophin. 12	
Abbildung 6: Strukturformeln der Vitamin B6 Vitamere und ihre Umwandlung. ....	14
Abbildung 7: Möglicher Metabolismus von Vitamin B6 beim Menschen.....	15
Abbildung 8: Schema des Aufbaus beim Western-Blot in Seitenansicht.....	42
Abbildung 9: Prinzip der LR-Rekombination zwischen pENTR™3C und einem pDEST™27-Vektor.....	47
Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops (Darstellung stark vereinfacht).....	61
Abbildung 11: Schematisierte Darstellung eines exemplarischen Proteinmoleküls und der bei der AUC wirkenden Kräfte.....	62
Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Kristallgitters aus Elementarzellen.....	65
Abbildung 13: Phasendiagramm einer Proteinlösung.....	67
Abbildung 14: Sitting-drop und Hanging-drop Technik.....	68
Abbildung 15: Chronophinhomodimer in Oberflächendarstellung. ....	73
Abbildung 16: Chronophinhomodimer in Schnittbilddarstellung. ....	73
Abbildung 17: Aminosäuresequenz der Dimerrenzfläche von mCIN.....	74
Abbildung 18: SDS-Gel der Überexpression von mCIN A194K/A195K, groEL, groES sowie Tf in <i>E.coli</i> BL21 pG-Tf2. ....	75
Abbildung 19: SDS-Gel der Überexpression von mCIN A194K/A195K und mCIN WT in <i>E.coli</i> BL21 pG-Tf2 im Vergleich. ....	76

Abbildung 20: anti-CIN Immunoblot der Elutionsfraktionen einer Talon-Aufreinigung von mCIN A194K/A195K und mCIN WT. ....	77
Abbildung 21: Vergleichende graphische Darstellung des Elutionsverhaltens von mCIN WT und mCIN A194K/A195K. ....	78
Abbildung 22: Thermofluor-Assay für mCIN A194K/A195K.....	89
Abbildung 23: Flächen- und Höhenausdehnung von mCIN WT- und mCIN A194K/A195K Molekülen in der Rasterkraftmikroskopie. ....	80
Abbildung 24: Häufigkeitsverteilung der errechneten Molekülvolumina für mCIN WT und mCIN A194K/A195K. ....	81
Abbildung 25: Verteilungen der Sedimentationskoeffizienten von mCIN WT und mCIN A194K/A195K aus einem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf. ....	82
Abbildung 26: Schema des GST-Pulldown-Assays und Interpretation der SDS-PAGE der in Abbildung 27 gezeigten Eluate. ....	84
Abbildung 27: Immunoblots von GST-Pulldown-Assay mit Eluaten und Lysaten. ....	85
Abbildung 28: Densitometrische Auswertung der GST-Pulldown Eluate.....	86
Abbildung 29: Michaelis Menten Enzymkinetik für mCIN WT und mCIN A194K/A195K. ....	90
Abbildung 30: Monomere Chronophinstruktur von mCIN A194K/A195K.....	92
Abbildung 31: Überlagerungsdarstellung der aktiven Zentren von mCIN A194K/A195K, mCIN WT und mCIN WT mit $\text{BeF}_3^-$ . ....	93
Abbildung 32: Strukturvergleich von mCIN WT und mCIN A194K/A195K.....	94
Abbildung 33: Vergleich der Homodimerisierungsgrenzflächen bei HAD-Hydrolasen vom C2a-Typ. ....	99

## 8. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Erworbene Oligonukleotide.....	26
Tabelle 2:	Verwendete Plasmide.....	26
Tabelle 3:	Thermozyklus der PCR bei der ortsspezifischen Mutagenese ..	44
Tabelle 4:	Thermozyklus der PCR zur Insertion der Restriktionsschnittstellen in mCIN A194K/A195K.....	46
Tabelle 5:	Zuordnung von Cap-Typ und Quartärstruktur von strukturbestimmten HAD-Hydrolasen .....	71
Tabelle 6:	Übersicht der strukturell charakterisierten HAD-Hydrolasen vom C2a-Typ.....	97
Tabelle 7:	Datensammlung und Verfeinerungsstatistik von 4BX0.....	147
Tabelle 8:	Datensatz der HAD-Hydrolasen mit bekannter Struktur .....	149

## 9. ANHANG

**Tabelle 7: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik von 4BX0.**

### **Datensammlung**

Wellenlänge (Å)	0,91841
Raumgruppe	P2
Elementarzell Parameter	
<i>a,b,c</i> (Å)	36,13; 91,82; 39,19
$\alpha,\beta,\gamma$ (°)	
Auflösungsbereich (Å) <sup>a</sup>	
$R_{sym}$ <sup>b</sup>	0,093 (0,658)
$R_{p.i.m.}$ <sup>c</sup>	0,049 (0,347)
$I/\sigma$ <sup>d</sup>	10,2(2,3)
Vollständigkeit (%)	99,8 (99,9)
Vielfachheit	3,5 (3,5)
Gesamtzahl der Reflexionen	89076
Unabhängige Reflexionen	25494 (3709)

### **Verfeinerungsstatistik**

Wilson B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	
Durchschnitt B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	28,6
Makromoleküle	28,0
Lösungsmittel	34,2
$R_{cryst}$ <sup>e</sup>	0,1913
$R_{free}$ <sup>e</sup>	0,2363
Zahl an	2496
nicht-Wasserstoff Atomen	
Makromolekülen	2247
Liganden	7
Wassermolekülen	242

r.m.s. Abweichungen bei	
Bindungslängen (Å)	0,005
Bindungswinkeln (°)	1,006
Planaren Gruppen (Å)	0,004
Diederwinkeln	13,14
Koordinatenfehler (Å) <sup>f</sup>	0,28
Ramachandran	
Statistiken <sup>g</sup>	
Günstig (%)	99,32
Erlaubt (%)	0,34
Ausreißer (%)	0,34
MolProbity clashscore <sup>h</sup>	11,63

<sup>a</sup> Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale höchster Auflösung

<sup>b</sup>  $R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i - \langle I \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i}$ , wobei  $I_i$  die  $i$ -te Messung und  $\langle I \rangle$  der gewichtete Mittelwert aus allen Messungen von  $I$  ist

<sup>c</sup>  $R_{\text{p.i.m.}} = \frac{\sum_{hkl} (1/(n-1))^{1/2} \sum_i |I_i - \langle I \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i}$ , wobei  $n$  die Vielfachheit des beobachteten Reflexes ist

<sup>d</sup> Steht für die durchschnittliche Intensität geteilt durch ihre Standardabweichung (signal-to-noise ratio)

<sup>e</sup>  $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum |F_o - F_c|}{\sum |F_o|}$ , wobei  $F_o$  und  $F_c$  die beobachteten und berechneten Strukturfaktoramplituden sind.  $R_{\text{free}}$  und  $R_{\text{cryst}}$  wurden unter zufälliger Auslassung von 5% der Daten von der Verfeinerung berechnet

<sup>f</sup> Geschätzter Koordinatenfehler basierend auf  $R_{\text{free}}$

<sup>g</sup> Die Ramachandran Statistiken stehen für den Anteil an Resten in den günstigen, erlaubten oder nicht erlaubten Regionen des Ramachandran-Plots von MolProbity (237)

<sup>h</sup> Anzahl ernsthafter Konflikte pro 1000 Atome (237).

**Tabelle 8: Datensatz der HAD-Hydrolasen mit bekannter Struktur**

PDB ID	Quartärstruktur	Cap	Hinterlegte Bezeichnung	Spezies	Proteinkennung (UniProt)
1K1E	Tetramer	C0	Deoxy-D-mannose-octulosonate 8-phosphate phosphatase	Haemophilus influenzae Rd	P45314
1U7P	Monomer	C0	magnesium-dependent phosphatase-1	Mus musculus	Q9D967
1XPJ	Tetramer	C0	hypothetical protein	Vibrio cholerae	Q9KVB4
1YJ5	Dimer	C0	5' polynucleotide kinase-3' phosphatase catalytic domain	Mus musculus	Q9JLV6
2FPR	Dimer	C0	Histidine biosynthesis bifunctional protein HisB	Escherichia coli	Q9S5G5
2GHT	Monomer	C0	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 1	Homo sapiens	Q9GZU7
2HHL	Monomer	C0	CTD small phosphatase-like protein	Homo sapiens	O15194
2IA5	Tetramer	C0	Polynucleotide kinase	Enterobakterien-phage T4	P06855
2O2X	Monomer	C0	hypothetical protein	Mesorhizobium loti	Q98156
2OBB	Dimer	C0	Hypothetical protein	Bacteroides thetaiotaomicron	Q8A9J5
2P9J	Oktamer	C0	Hypothetical protein AQ2171	Aquifex aeolicus	O67920
2PR7	Monomer	C0	Haloacid dehalogenase/epoxide hydrolase family	Corynebacterium glutamicum	Q6M720
2Q5E	Monomer	C0	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 2	Homo sapiens	O14595

PDB ID	Quartärstruktur	Cap	Hinterlegte Bezeichnung	Spezies	Protein-kennung (UniProt)
2R8E	Oktamer	C0	3-deoxy-D-manno- octulosonate 8- phosphate phosphatase KdsC	Escherichia coli	P67653
2WM8	Monomer	C0	MAGNESIUM- DEPENDENT PHOSPHATASE 1	Homo sapiens	Q86V88
3E8M	Tetramer	C0	2-keto-3-deoxy-D- glycero-D- galactonononate-9- phosphate phosphatase	Bacteroides thetaiotaomicron	Q8A712
3EF0	Monomer	C0	RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase	Schizo- saccharomyces pombe	Q9P376
3EWI	Tetramer	C0	N-acylneuraminate cytidyltransferase	Mus Musculus	Q99KK2
3IB6	Tetramer	C0	Uncharacterized protein	Listeria monocytogenes	C1KYJ5
3IJ5	Tetramer	C0	3-deoxy-D-manno- octulosonate 8- phosphate phosphatase	Yersinia pestis	Q8ZB47
3L8E	Monomer	C0	D,D-heptose 1,7- bisphosphate phosphatase	Escherichia coli	P63228
3L8H	Monomer	C0	Putative haloacid dehalogenase-like hydrolase	Bordetella bronchiseptica	Q7WG29
3MMZ	Oktamer	C0	putative HAD-family hydrolase	Streptomyces avermitilis	Q82HY3
3MN1	Tetramer	C0	probable yrbi family phosphatase	Pseudomonas syringae pv. phaseolicola	Q48EB9
3N07	Tetramer	C0	3-deoxy-D-manno- octulosonate 8- phosphate phosphatase	Vibrio cholerae	Q9KP52
3N1U	Tetramer	C0	Hydrolase, HAD- superfamily, subfamily III A	Legionella pneumophila	Q5ZX93

PDB ID	Quartärstruktur	Cap	Hinterlegte Bezeichnung	Spezies	Proteinkennung (UniProt)
3QLE	Monomer	C0	Tim50p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	C8ZIW7
4HGN	Tetramer	C0	2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphohydrolase	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Q8A748
4NAV	Tetramer	C0	Hypothetical protein XCC279	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Q8P716
3E81	Oktamer	C0	Acylneuraminate cytidyltransferase	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Q8A712
1EK1	Dimer	C1	EPOXIDE HYDROLASE	<i>Mus musculus</i>	P34914
1MHS	Dimer	C1	Plasma membrane ATPase	<i>Neurospora crassa</i>	P07038
1O08	Monomer	C1	beta-phosphoglucomutase	<i>Lactococcus lactis</i>	P71447
1Q92	Dimer	C1	5(3)-deoxyribonucleotidase	<i>Homo sapiens</i>	Q9NPB1
1QQ5	Dimer	C1	PROTEIN (L-2-HALOACID DEHALOGENASE)	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	Q60099
1QYI	Monomer	C1	hypothetical protein	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Q8NW41
1RKU	Dimer	C1	homoserine kinase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Q9I2Y2
1SWV	Dimer	C1	PHOSPHONOACETAL DEHYDE HYDROLASE	<i>Bacillus cereus</i>	O31156
1TE2	Dimer	C1	putative phosphatase	<i>Escherichia coli</i>	Q7ADF8
1X42	Monomer	C1	hypothetical protein PH0459	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	O58216
1YNS	Monomer	C1	E-1 enzyme	<i>Homo sapiens</i>	Q9UHY7
1Z88	Tetramer	C1	AphA protein	<i>Salmonella typhimurium</i>	Q540U1
1ZRN	Dimer	C1	L-2-HALOACID DEHALOGENASE	<i>Pseudomonas</i> sp.	Q53464
2AH5	Monomer	C1	COG0546: Predicted phosphatases	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Q97T51

PDB ID	Quartärstruktur	Cap	Hinterlegte Bezeichnung	Spezies	Protein-kennung (UniProt)
2B0C	Dimer	C1	putative phosphatase	Escherichia coli	P0A8Y3
2B82	Tetramer	C1	class B acid phosphatase	Escherichia coli	P0AE22
2FDR	Monomer	C1	conserved hypothetical protein	Agrobacterium tumefaciens	A9CJW3
2FEA	Monomer	C1	2-hydroxy-3-keto-5-methylthiopentenyl-1-phosphate phosphatase	Bacillus subtilis	O31667
2FI1	Dimer	C1	hydrolase, haloacid dehalogenase-like family	Streptococcus pneumoniae	Q97RK1
2G09	Monomer	C1	Cytosolic 5'-nucleotidase III	Mus musculus	Q9D020
2G80	Monomer	C1	Protein UTR4	Saccharomyces cerevisiae	P32626
2GFH	Dimer	C1	N-acylneuraminate-9-phosphatase	Mus musculus	Q9CPT3
2GO7	Dimer	C1	hydrolase, haloacid dehalogenase-like family	Streptococcus pneumoniae	Q97NG6
2HCF	Monomer	C1	Hydrolase, haloacid dehalogenase-like family	Chlorobaculum tepidum	Q8KBS5
2HDO	Monomer	C1	Phosphoglycolate phosphatase	Lactobacillus plantarum	F9UM81
2HI0	Monomer	C1	Putative phosphoglycolate phosphatase	Lactobacillus delbrueckii	Q04AA0
2HOQ	Dimer	C1	Putative HAD-hydrolase PH1655	Pyrococcus horikoshii	O59346
2HSZ	Monomer	C1	novel predicted phosphatase	Haemophilus somnus	Q0I1W8
2I33	Dimer	C1	Acid phosphatase	Bacillus anthracis	Q81L82
2I6X	Monomer	C1	Hydrolase, haloacid dehalogenase-like family	Porphyromonas gingivalis	Q7MWA6
2I7D	Dimer	C1	5'(3')-deoxyribonucleotidase, cytosolic type	Homo sapiens	Q8TCD5

PDB ID	Quartärstruktur	Cap	Hinterlegte Bezeichnung	Spezies	Protein-kennung (UniProt)
2IYE	Monomer	C1	COPPER-TRANSPORTING ATPASE	Sulfolobus solfataricus	Q97UU7
2J2C	Tetramer	C1	CYTOSOLIC PURINE 5'-NUCLEOTIDASE	Homo sapiens	P49902
2JAR	Dimer	C1	5'(3')-DEOXYRIBONUCLEOTIDASE	Mus musculus	Q9JM14
2NO4	Dimer	C1	(S)-2-haloacid dehalogenase IVA	Burkholderia cepacia	Q51645
2NYV	Monomer	C1	Phosphoglycolate phosphatase	Aquifex aeolicus	O67359
2ODA	Dimer	C1	Hypothetical protein PSPTO_2114	Pseudomonas syringae pv. tomato	Q884H9
2OM6	Dimer	C1	Probable phosphoserine phosphatase	Pyrococcus horikoshii	O57991
2P11	Dimer	C1	Hypothetical protein	Burkholderia xenovorans	Q13MR9
2PKE	Dimer	C1	Haloacid dehalogenase-like family hydrolase	Xanthomonas campestris pv. campestris	Q8P4B4
2QLT	Monomer	C1	(DL)-glycerol-3-phosphatase 1	Saccharomyces cerevisiae	P41277
2VKQ	Monomer	C1	CYTOSOLIC 5'-NUCLEOTIDASE III	Homo sapiens	Q9H0P0
2VOY	Dodekamer	C1	Copper-exporting P-type ATPase A	Bacillus subtilis	O30085
2W43	Dimer	C1	HYPOTHETICAL 2-HALOALKANOIC ACID DEHALOGENASE	Sulfolobus tokodaii	Q96XE7
2W4M	Dimer	C1	N-ACYL-NEURAMINATE-9-PHOSPHATASE	Homo sapiens	Q8TBE9
2YMM	Dimer	C1	L-haloacid dehalogenase	Rhodobacteraceae	R4GRT2
2YN9	Hetero-Dimer	C1	H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase	Sus scrofa	P19156

PDB ID	Quartärstruktur	Cap	Hinterlegte Bezeichnung	Spezies	Protein-kennung (UniProt)
2ZBF	Monomer	C1	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	Oryctolagus cuniculus	P04191
2ZG6	Dimer	C1	Putative uncharacterized protein ST2620	Sulfolobus tokodaii	Q96X90
2ZXE	Trimer	C1	Na, K-ATPase alpha subunit	Squalus acanthias	Q4H132
3A1D	Tetramer	C1	Probable copper-exporting P-type ATPase A	Archaeoglobus fulgidus	O29777
3B8C	Monomer	C1	ATPase 2, plasma membrane-type	Arabidopsis thaliana	P19456
3B8E	Trimer	C1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Sus scrofa	P05024
3BWV	Dimer	C1	Putative 5'(3')-deoxyribonucleotidase	Staphylococcus epidermidis	Q8CTG7
3CNH	Monomer	C1	Hydrolase family protein	Deinococcus radiodurans	Q9RTQ1
3D6J	Monomer	C1	Putative haloacid dehalogenase-like hydrolase	Bacteroides fragilis	Q5LGR4
3DDH	Dimer	C1	Putative haloacid dehalogenase-like family hydrolase	Bacteroides thetaiotaomicron	Q8A5Q8
3DV9	Monomer	C1	beta-phosphoglucomutase	Bacteroides vulgatus	A6L7P8
3ED5	Monomer	C1	YfnB	Bacillus subtilis	O06480
3ET4	Dimer	C1	Outer membrane protein P4, NADP phosphatase	Haemophilus influenzae	Q4QMM5
3HB0	Monomer	C1	Eyes absent homolog 2 (Drosophila)	Homo sapiens	O00167
3I28	Dimer	C1	Epoxide hydrolase 2	Homo sapiens	P34913
3IRU	Hexamer	C1	phosphonoacetaldehyde hydrolase like protein	Oleispira antarctica	D0VWZ7
3K1Z	Monomer	C1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3	Homo sapiens	Q9BSH5

PDB ID	Quartärstruktur	Cap	Hinterlegte Bezeichnung	Spezies	Proteinkennung (UniProt)
3KBB	Monomer	C1	Phosphorylated carbohydrates phosphatase TM_1254	<i>Thermotoga maritima</i> msb8	Q9X0Y1
3KZX	Monomer	C1	HAD-superfamily hydrolase, subfamily IA, variant 1	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Q2GHD1
3L5K	Monomer	C1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 1A	<i>Homo sapiens</i>	Q08623
3M9L	Dimer	C1	Hydrolase, haloacid dehalogenase-like family	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Q4K5L5
3MC1	Monomer	C1	Predicted phosphatase, HAD-family	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Q97LY2
3NAS	Dimer	C1	beta-phosphoglucomutase	<i>Bacillus subtilis</i>	O06995
3NUQ	Monomer	C1	putative nucleotide phosphatase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P53078
3OCY	Dimer	C1	Lipoprotein E	<i>Haemophilus influenzae</i>	P26093
3PCT	Dimer	C1	Class C acid phosphatase	<i>Pasteurella multocida</i>	B9VWB2
3QNM	Monomer	C1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Q8A5G8
3QUQ	Monomer	C1	INORGANIC PYROPHOSPHATASE	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Q8A5V9
3RFU	Monomer	C1	Copper efflux ATPase	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	Q5ZWR1
3S6J	Dimer	C1	Hydrolase, haloacid dehalogenase-like family	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Q88AV7
3SD7	Monomer	C1	Putative phosphatase	<i>Clostridium difficile</i>	Q181K6
3SKX	Dimer	C1	Copper-exporting P-type ATPase B	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	O30085
3SMV	Monomer	C1	S-(-)-azetidine-2-carboxylate hydrolase	<i>Pseudomonas</i> sp.	B2Z3V8

PDB ID	Quartärstruktur	Cap	Hinterlegte Bezeichnung	Spezies	Proteinkennung (UniProt)
3UM9	Dimer	C1	Haloacid dehalogenase, type II	Polaromonas sp.	Q12G50
3UMB	Dimer	C1	Putative dehalogenase-like hydrolase protein	Ralstonia solanacearum	Q8XZN3
3UMC	Dimer	C1	Probable haloacid dehalogenase	Pseudomonas aeruginosa	Q9I5C9
3UMG	Dimer	C1	Haloacid dehalogenase	Rhodococcus sp.	Q0SK70
3VAY	Dimer	C1	HAD-superfamily hydrolase	Pseudomonas syringae pv. tomato	Q88B12
4AP9	Oktamer	C1	Hypothetical phosphoserine phosphatase	Thermococcus onnurineus	B6YX36
4DFD	Monomer	C1	Putative haloacid dehalogenase-like hydrolase	Bacteroides thetaiotaomicron	Q8A4Q5
4EEK	Dimer	C1	Beta-phosphoglucomutase-related protein	Deinococcus radiodurans	Q9RTX8
4EX6	Monomer	C1	AlnB	Streptomyces sp.	B6SEG4
4G9B	Dimer	C1	Beta-phosphoglucomutase	Escherichia coli	P77366
4GIB	Monomer	C1	Beta-phosphoglucomutase (Beta-D-Glucose 1,6-phosphomutase)	Clostridium difficile	Q185X7
4JB3	Monomer	C1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	Bacteroides thetaiotaomicron	Q8A947
4OVY	Dimer	C1	Haloacid dehalogenase domain protein hydrolase	Planctomyces limnophilus	D5SUM3
4RN3	Monomer	C1	HAD-superfamily hydrolase	Geobacter sulfurreducens	Q74BH2
4UAS	Monomer	C1	Protein CbbY	Rhodobacter sphaeroides	P95649

PDB ID	Quartärstruktur	Cap	Hinterlegte Bezeichnung	Spezies	Protein-kennung (UniProt)
4UAV	Monomer	C1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein At3g48420	Arabidopsis thaliana	Q94K71
4UMW	Monomer	C1	ZINC-TRANSPORTING ATPASE	Shigella sonnei	Q3YW59
3E58	Dimer	C1	putative Beta-phosphoglucomutase	Streptococcus thermophilus	Q5M5S4
1J97	Monomer	C1+C2	PHOSPHOSERINE PHOSPHATASE (PSP)	Methanocaldococcus jannaschii	Q58989
1NNL	Dimer	C1+C2	phosphoserine phosphatase	Homo sapiens	P78330
1Y8A	Monomer	C1+C2	hypothetical protein AF1437	Archaeoglobus fulgidus	O28835
2BDE	Dimer	C1+C2	Cytosolic IMP-GMP specific 5'-nucleotidase	Legionella pneumophila subsp. pneumophila	Q5ZZB6
3FVV	Monomer	C1+C2	uncharacterized protein	Bordetella pertussis	Q7W0A9
3KD3	Monomer	C1+C2	Phosphoserine phosphohydrolase-like protein	Francisella tularensis subsp. tularensis	Q5NH99
3M1Y	Dimer	C1+C2	Phosphoserine phosphatase (SerB)	Helicobacter pylori	O25367
3N28	Dimer	C1+C2	Phosphoserine phosphatase	Vibrio cholerae	Q9KPM2
3P96	Dimer	C1+C2	Phosphoserine phosphatase SerB	Mycobacterium avium	A0QJ11
4AS2	Dimer	C1+C2	Phosphorylcholine phosphatase	Pseudomonas aeruginosa	Q9HTR2

PDB ID	Quartärstruktur	Cap	Hinterlegte Bezeichnung	Spezies	Protein-kennung (UniProt)
4EZE	Monomer	C1+C2	Putative hydrolase	Salmonella typhi	Q8Z598
4GXT	Monomer	C1+C2	Uncharacterized protein	Anaerococcus prevotii	C7RF86
1VJR	Dimer	C2a	4-nitro-phenylphosphatase	Thermotoga maritima	Q9X264
1WVI	Tetramer	C2a	putative phosphatases involved in N-acetyl-glucosamine catabolism	Streptococcus mutans	Q8DTD6
1YDF	Dimer	C2a	hydrolase, haloacid dehalogenase-like family	Streptococcus pneumoniae	Q97Q24
1YS9	Tetramer	C2a	Protein SPy1043	Streptococcus pyogenes	Q99ZW4
1YV9	Dimer	C2a	hydrolase, haloacid dehalogenase family	Enterococcus faecalis	Q836C7
1ZJJ	Dimer	C2a	hypothetical protein PH1952	Pyrococcus horikoshii	O59622
2C4N	Tetramer	C2a	PROTEIN NAGD	Escherichia coli	P0AF24
2HO4	Dimer	C2a	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2	Mus musculus	Q3UGR5
2HX1	Tetramer	C2a	Predicted sugar phosphatases of the HAD-superfamily	Cytophaga hutchinsonii	Q11S56
2OYC	Dimer	C2a	PYRIDOXAL PHOSPHATE PHOSPHATASE	Homo sapiens	Q96GD0
2X4D	Dimer	C2a	PHOSPHOLYSINE PHOSPHOHISTIDINE INORGANIC PYROPHOSPHATE PHOSPHATASE	Homo sapiens	Q9H008
3EPR	Tetramer	C2a	Hydrolase, haloacid dehalogenase-like family	Streptococcus agalactiae serogroup V	Q8E044

PDB ID	Quartärstruktur	Cap	Hinterlegte Bezeichnung	Spezies	Protein-kennung (UniProt)
3HLT	Tetramer	C2a	HDHD2	Homo sapiens	Q9H0R4
3PDW	Dimer	C2a	Uncharacterized hydrolase yutF	Bacillus subtilis	O32125
3QGM	Dimer	C2a	p-nitrophenyl phosphatase (Pho2)	Archaeoglobus fulgidus	O29873
3RF6	Dimer	C2a	Uncharacterized protein YKR070W	Saccharomyces cerevisiae	P36151
4I9F	Dimer	C2a	Glycerol 3-phosphate phosphatase	Mycobacterium tuberculosis	L7N4Y2
4KN8	Dimer	C2a	Thermostable p-nitrophenyl-phosphatase	Geobacillus stearothermophilus	Q8L1N9
1L6R	Dimer	C2b	HYPOTHETICAL PROTEIN TA0175	Thermoplasma acidophilum	Q9HLQ2
1NF2	Monomer	C2b	phosphatase	Thermotoga maritima	Q9WZB9
1NRW	Monomer	C2b	hypothetical protein, haloacid dehalogenase-like hydrolase	Bacillus subtilis	P94592
1RKQ	Dimer	C2b	Hypothetical protein yidA	Escherichia coli	P0A8Y5
1RLM	Monomer	C2b	Phosphatase	Escherichia coli	P75792
1S2O	Monomer	C2b	sucrose-phosphatase	Synechocystis sp.	P74325
1U02	Monomer	C2b	trehalose-6-phosphate phosphatase related protein	Thermoplasma acidophilum	Q9HIW7
1WR8	Dimer	C2b	Phosphoglycolate phosphatase	Pyrococcus horikoshii	O50129
1XVI	Dimer	C2b	Putative mannosyl-3-phosphoglycerate phosphatase	Escherichia coli	P76329
2AMY	Monomer	C2b	Phosphomannomutase 2	Homo sapiens	O15305
2B30	Dimer	C2b	PvivaX hypothetical protein	Plasmodium vivax	A5K063

PDB ID	Quartärstruktur	Cap	Hinterlegte Bezeichnung	Spezies	Protein-kennung (UniProt)
2FUE	Dimer	C2b	Phospho-mannomutase 1	Homo sapiens	Q92871
2I54	Dimer	C2b	Phosphomannomutase	Leishmania mexicana	Q95ZD7
2QYH	Dimer	C2b	Hypothetical conserved protein, GK1056	Geobacillus kaustophilus	Q5L139
2RBK	Monomer	C2b	Putative uncharacterized protein	Bacteroides thetaiotaomicron	Q8A090
2ZOS	Monomer	C2b	Mannosyl-3-phosphoglycerate phosphatase	Pyrococcus horikoshii	O58690
3DAO	Monomer	C2b	Putative Phosphate	Eubacterium rectale	D0VWU2
3DNP	Dimer	C2b	Stress response protein yhaX	Bacillus subtilis	O07539
3F9R	Monomer	C2b	Phosphomannomutase	Trypanosoma brucei	Q38AW2
3FZQ	Dimer	C2b	Putative hydrolase	Clostridium difficile	Q188R2
3GYG	Tetramer	C2b	NTD biosynthesis operon putative hydrolase ntdB	Bacillus subtilis subsp. subtilis	O07565
3L7Y	Monomer	C2b	Putative uncharacterized protein smu.1108c	Streptococcus mutans	Q8DU45
3MPO	Monomer	C2b	Predicted hydrolase of the HAD-superfamily	Lactobacillus brevis	Q03T33
3NIW	Monomer	C2b	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	Bacteroides thetaiotaomicron	Q8A2F3
3PGV	Monomer	C2b	haloacid dehalogenase-like hydrolase	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae	A6TGK6
3R4C	Monomer	C2b	Hydrolase, haloacid dehalogenase-like hydrolase	Bacteroides thetaiotaomicron	Q8A759
3ZX4	Dimer	C2b	MANNOSYL-3-PHOSPHOGLYCERATE PHOSPHATASE	Thermus thermophilus	Q72K29

PDB ID	Quartärstruktur	Cap	Hinterlegte Bezeichnung	Spezies	Protein-kennung (UniProt)
4QJB	Monomer	C2b	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	Plasmodium falciparum	Q8IJ74



## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Antje Gohla, die mir die Arbeit an diesem interessanten Thema in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht hat und die mich mit großer Kompetenz und Menschlichkeit bei allen Fragen unterstützte.

Ich möchte mich auch ausdrücklich bei Dr. Gunnar Knobloch bedanken, ohne dessen Hilfe, Rat, Geduld und Hingabe ich viele der Versuche nicht hätte durchführen können und dessen Strukturlösung und strukturbiochemische Kompetenz einen bedeutenden Anteil an dieser Arbeit hat. Vielen Dank an dieser Stelle auch für die Überlassung von pETM-11 mCIN.

Dr. Elisabeth Jeanclos gilt mein besonderer Dank für die nette Betreuung, kompetente Einarbeitung in so viele verschiedene Methoden und den fachlichen Rat. Merci beaucoup!

Herzlichen Dank möchte ich auch an Dr. Ingrid Tessmer, die mir die Untersuchungen mittels Rasterkraftmikroskopie und Analytischer Ultrazentrifugation ermöglicht hat, und an Prof. Hermann Schindelin für die Hilfe bei der Proteinkristallisation und Strukturlösung richten.

Ebenso möchte ich Dr. Annegrit Seifried, Dr. Gabriela Segerer und Dr. Markus Schulze für die zahllosen Hilfen im Laboralltag sowie Anna-Karina Lamprecht für die Überlassung von pcDNA3 mCIN, die Hilfe bei den Pulldown-Experimenten und ihr genauso wie Beate Vogt, Kerstin Hadamek und Angelika Keller für die technische Unterstützung danken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester Lisa bedanken, deren Unterstützung und Halt mich während meines Studiums und dieser Arbeit getragen haben, sowie bei Christine Riedhammer für die unermüdliche Unterstützung, kritische Durchsicht dieser Arbeit und liebevolle Geduld.

