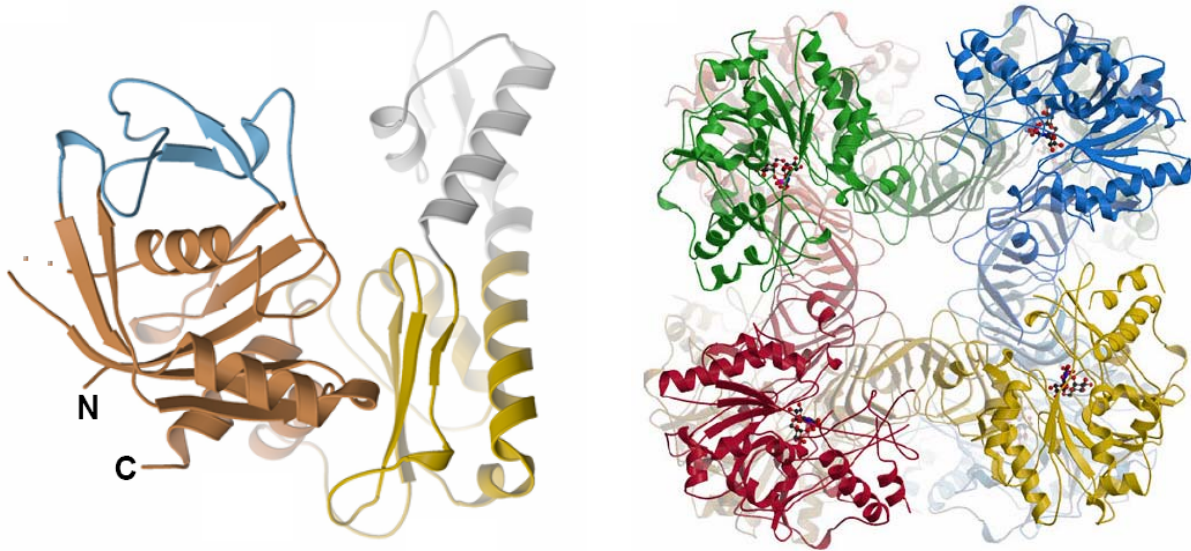


Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Röntgenstrukturanalyse eines Aktin-Homologen Ta0583 aus  
*Thermoplasma acidophilum* und der UDP-Glukose Pyrophosphorylase  
aus *Saccharomyces cerevisiae*.



Annette Röben  
aus  
Hamburg

2007

***Erklärung***

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. F.-Ulrich Hartl betreut.

***Ehrenwörtliche Versicherung***

Diese Dissertation wurde von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 02.03.2007

Annette Röben

***Dissertation eingereicht am:*** 08.03.2007

**1. Berichterstatter:** Prof. Dr. F.-U. Hartl

**2. Berichterstatter:** Prof. Dr. P. Cramer

***Tag der mündlichen Prüfung:*** 13.07.2007

## ***Danksagung***

An erster Stelle sei Herrn Professor F.-U. Hartl herzlichst gedankt für die Übernahme und Betreuung meiner thematischen Fragestellung.

Herrn Dr. Andreas Bracher danke ich für die intensive Betreuung und für die freundliche, kreative und stimulierende wissenschaftliche Atmosphäre.

Ein großes Dankeschön auch für die Geduld und Unterstützung meines ehemaligen Kollegen Herrn Dr. Yasuhito Shomura, ohne dessen Hilfe ich viele Probleme der Strukturlösung nicht hätte lösen können.

Besonderen Dank auch an Christine Kofler für viele Stunden der Elektronenmikroskopie, Istvan Nagy, Stephan Nickell, Jürgen Plitzko und Roman Körner für die nette Zusammenarbeit.

Für die kreativen Diskussionen, fachlichen Hinweise und die allgemeine und sehr freundliche Unterstützung während der gesamten Dauer der Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Manajit Hayer-Hartl.

Herrn Professor Dr. P. Cramer danke ich recht herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Herrn Reiner Mentele, Frau Lissy Weyher, Herrn Dr. Frank Siedler und Mitarbeitern und Herrn Snezan Marinkovich sei für die Massenspektroskopie und die zuverlässigen Sequenzierungsarbeiten gedankt.

Ebenso sei allen Mitarbeitern der Abteilung Zelluläre Biochemie, des Max-Planck-Instituts für Biochemie und all denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

***Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:***

A. Roeben, C. Kofler, I. Nagy, S. Nickell, F.U. Hartl, and A. Bracher (2006). Crystal Structure of an Archaeal Actin Homolog. ***J. Mol. Biol.***, 358, 145-156

A. Roeben, J. Plitzko, R. Koerner, U. Boettcher, K. Siegers, M. Hayer-Hartl, and A. Bracher (2006). Structural Basis for Subunit Assembly in UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. ***J. Mol. Biol.***, 364, 551-560

## ***Inhaltsverzeichnis***

Danksagung .....	3
Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in: .....	4
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>9</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>10</b>
<b>Teil 1: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Aktin-Homologen Ta0583 aus Thermoplasma acidophilum .....</b>	<b>11</b>
<b>Einleitung Teil 1 .....</b>	<b>12</b>
Das eukaryotische Zytoskelett .....	12
Intermediärfilamente .....	13
Aktin-Mikrofilamente .....	13
Bakterielle Tubulin Homologe .....	16
Crescentin, ein Intermediärfilament Protein Homolog .....	18
Die bakteriellen Aktin Homologen MreB und ParM .....	19
Thermoplasma acidophilum als Modellorganismus .....	23
<b>Ergebnisse Teil 1 .....</b>	<b>26</b>
Herstellung und Aufreinigung des Proteins Ta0583 .....	26
Bestimmung des Ta0583 Expressionsniveaus .....	28
Bestimmung der ATPase Aktivität .....	29
Substratspezifität .....	31
Einfluss des MreB-Inhibitors A22 auf die ATPase Aktivität von Ta0583 .....	31
Kristallisation von Ta0583 .....	34
Raumgruppen und Datenreduktion .....	35
Lösung der Kristallstruktur von Ta0583 .....	35
Kristallstruktur von Ta0583 .....	42
Kristallpackung von SeMet Ta0583 .....	45
Sequenzkonservierung innerhalb der Ordnung Thermoplasmatales .....	46
Der ADP-Komplex von Ta0583 .....	49

<b>Diskussion Teil 1 .....</b>	<b>53</b>
Ta0583 ist ein Aktin homolog .....	53
Die Nukleotidbindungsstelle.....	54
Angenommene Ta0583-Protofilamentstruktur.....	56
Vergleich der Struktur von Ta0583 mit Aktin, MreB und ParM.....	57
Mögliche Funktion von Ta0583.....	60
<b>Teil 2: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der UDP-Glukose</b>	
<b>Pyrophosphorylase aus <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>Einleitung Teil 2 .....</b>	<b>64</b>
Rolle von UDP-Glukose im Zuckerstoffwechsel .....	64
Synthese von UDP-Glukose und Reaktionsmechanismus .....	66
UGPasen.....	67
Regulation der Enzymaktivität .....	69
<b>Ergebnisse Teil 2 .....</b>	<b>71</b>
Herstellung und Aufreinigung von Ugp1p.....	71
Bestimmung des oligomeren Zustandes von Ugp1p.....	72
Enzymaktivität von Ugp1p .....	73
Kristallisation von Ugp1p .....	77
Strukturlösung von Ugp1p .....	79
Monomer-Struktur von Ugp1p .....	81
Protomer- und Oktamerstruktur von Ugp1p .....	82
Bedeutung der N-terminalen Region für die Regulation der Enzymaktivität.....	86
Effekt der Deletion von reg1 auf die UDP-Glucose Pyrophosphorylase Aktivität ..	87
<b>Diskussion Teil 2 .....</b>	<b>90</b>
Charakterisierung von Ugp1p .....	90
Symmetrie des Ugp1p-Partikels .....	91
Vergleich der Struktur von Ugp1p mit anderen SGC-Domänen Proteinen .....	91
Das aktive Zentrum.....	93
Grundlage der Oligomerstruktur von Ugp1p.....	95
Regulation der Enzymaktivität .....	98

<b>Material und Methoden .....</b>	<b>102</b>
Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	102
Gerätschaften.....	103
Bakterienstämme, Plasmide, Oligonukleotide, Enzyme, Antikörper .....	105
Enzyme, Antikörper .....	105
Plasmide.....	105
Bakterienstämme .....	105
Hefestämme .....	105
Oligonucleotide.....	105
Medien und Standardpuffer .....	106
Molekularbiologische Methoden .....	110
Herstellung kompetenter Zellen nach der RbCl <sub>2</sub> Methode (Commerce) .....	110
Hitzeschock Transformation.....	111
Plasmidisolierung aus E. coli (Miniprep) .....	111
Bestimmung der DNA Konzentration .....	111
Agarose-Gelelektrophorese .....	112
Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	112
Restriktionsverdau.....	112
Site-directed mutagenesis.....	113
Kristallographische Methoden .....	113
Kristallisation .....	113
Selenomethionin Derivatisierung (Van Duyne et al., 1993).....	114
Mikroseeding .....	114
Ernte der Kristalle für die Kryokristallographie.....	114
Datensammlung .....	114
Biochemische Methoden.....	115
Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) .....	115
Proteinbestimmung mit dem molaren Extinktionskoeffizienten .....	115
SDS-PAGE Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).....	116
Coomassie Färbung von Proteingelen.....	116
Silverfärbung von Proteingelen .....	116
Western Blot.....	116
Expression in E. coli .....	117

Aufschluss E. coli .....	117
Aufschluss S. cerevisiae .....	117
Aufreinigung Ta0583 .....	118
Aufreinigung Ugp1p.....	118
Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper .....	118
Koppeln von Antikörpern an Protein-A Sepharose .....	119
Co-Immunpräzipitierung .....	120
Bestimmung des zellulären Proteinlevels von Ta0583 .....	120
ATPase Assay Ta0583.....	120
Aktivitätsassay Pyrophosphorolyse Ugp1p .....	121
Aktivitätsassay UDP-Glukose Synthese Ugp1p.....	121
ProteinaseK-Verdau .....	121
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>123</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>130</b>



## Abkürzungen

ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
MR	molekularer Ersatz
ADP(AIF <sub>3</sub> )	ADP-Aluminiumfluorid
GFP	Green Fluorescent Protein
G6PDH	Glukose-6 phosphate dehydrogenase
PGM	Phosphoglucomutase
UDPG	UDP-Glukose
G-1-P	Glukose-1-Phosphat
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
NCS	nicht-kristallographische Symmetrie
Hsp	Hitzeschockprotein
ProtK	Proteinase K
TRiC	TCP-1 ring complex
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IF	Intermediärfilamente
MT	Mikrotubuli
SRF	<i>serum response factor</i>
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i> , Peroxidase

## Zusammenfassung

Die Existenz eines Zytoskeletts galt lange als charakteristisches Merkmal eukaryotischer Zellen. Obwohl sich mit der Entdeckung der eubakteriellen Zytoskelettproteine MreB, ParM, FtsZ und CreS ein Paradigmenwechsel vollzog, lagen bislang keine Erkenntnisse über das Vorkommen von Zytoskelettproteinen in Archaeae vor. Der erste Teil der Arbeit beschreibt die strukturelle und biochemische Charakterisierung des Aktin homologen Ta0583 aus dem Archaeon *Thermoplasma acidophilum*. Die Kristallstruktur von Ta0583 wurde mit der Methode der SAD-Phasierung bei einer Auflösung von 2,1 Å gelöst. Ta0583 gehört zur Aktin/Hsp70 Superfamilie und besteht aus zwei Domänen, die jeweils das Aktin/Hsp70 Kernelement enthalten. Obwohl Aktin und das archaeale Ta0583 kaum Sequenzidentität aufweisen, besteht eine deutliche strukturelle Homologie. Die Struktur von Ta0583 kombiniert strukturelle Eigenheiten sowohl von Aktin, als auch von den eubakteriellen Aktin homologen MreB und ParM. So konnte beispielsweise die strukturelle Ähnlichkeit der Nukleotidbindungsstellen von Ta0583 und MreB *in vitro* durch den Effekt des MreB-Inhibitors S-(3,4-Dichlorobenzyl)-isothioharnstoff (A22) nachgewiesen werden, der die ATPase Aktivität von Ta0583 kompetitiv hemmt. Im Kristallgitter sind die Ta0583 Monomere in Filament-ähnlichen Reihen angeordnet, in denen ähnliche longitudinale Gitterabstände wie in den Protofilamenten von MreB, Aktin und ParM vorliegen. *In vitro* bildet Ta0583 kristalline Schichten, die ähnliche Gitterabstände wie die quasi-Filamente im Kristall aufweisen. Die Bereitwilligkeit von Ta0583 zur Kristallisation und zur Bildung kristalliner Schichten könnte eine intrinsische Neigung des Proteins zur Bildung von filamentartigen Strukturen andeuten. Das Vorkommen eines Aktin-Homologen im Archaeon *T. acidophilum* gibt erste Hinweise auf das Vorkommen möglicher Zytoskelettstrukturen neben Eukaryoten und Eubakterien auch in der dritten Domäne des Lebens, den Archaeae.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der strukturellen und biochemischen Charakterisierung des in *S. cerevisiae* essentiellen Stoffwechsellenzym Ugp1p, der UDP-Glukose Pyrophosphorylase (UGPase). Die UGPase katalysiert die Synthese von UDP-Glukose, einem zentralen Glykosyldonor im Stoffwechsel aller Organismen. In *S. cerevisiae* ist die UGPase ein Oktamer aus identischen Untereinheiten. Obwohl oktamere UGPasen schon in den 1960iger Jahren erstmals charakterisiert wurden, blieb die strukturelle Basis für die Assoziation der Monomere im Komplex bis heute unaufgeklärt. In dieser Arbeit wurde die Struktur von Ugp1p durch Molecular Replacement mit der Struktur einer monomeren UGPase aus *A. thaliana* bei einer Auflösung von 3,1 Å gelöst. Das Ugp1p Monomer besteht aus drei Domänen, einer N-terminalen Domäne, einer katalytischen SGC-Kerndomäne und einer C-terminalen Oligomerisierungsdomäne mit  $\beta$ -Helix Motiv. Anhand der Struktur von Ugp1p konnten mehrere Aminosäurereste identifiziert werden, die die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten im Oktamer vermitteln. Diese vorwiegend hydrophoben Reste sind in den UGPasen von Tieren und Pilzen konserviert, in den UGPasen der Pflanzen jedoch durch polare und geladene Reste ersetzt. Aufgrund der Konservierung der Reste im Bereich der Oligomerisierungs-Schnittstelle ist davon auszugehen, dass alle UGPasen aus Metazoen und Pilzen Ugp1p-ähnliche Oktamere bilden, pflanzliche UGPasen dagegen anders aufgebaut sind. Während die Aktivität pflanzlicher UGPasen über Assoziation und Dissoziation reguliert zu sein scheint (Martz et al., 2002), sind UGPasen aus Metazoen und Pilzen nicht über Oligomerisierung reguliert. So bildet Ugp1p ausschliesslich stabile Oktamere. In Ugp1p scheint vielmehr das flexible N-terminale Segment, das auch an Ser11 phosphoryliert gefunden wurde (Rutter et al., 2002), die Regulation der Enzymaktivität zu vermitteln. Die Struktur von Ugp1p bildet die Grundlage für gezielte Mutagenesestudien an allen UGPasen aus Metazoen und Pilzen.

**Teil 1: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Aktin-Homologen  
Ta0583 aus *Thermoplasma acidophilum***

## **Einleitung Teil 1**

Das Zytoskelett ist ein intrazelluläres Netzwerk aus faserartigen Proteinstrukturen, die das Zellinnere durchziehen. Das Zytoskelett umfasst neben stabilen Strukturen, die die Zellform bestimmen und der Aufrechterhaltung der mechanischen Stabilität dienen, auch äusserst dynamische Strukturen, die sich als Antwort auf zelluläre Signale umordnen und reorganisieren, um transiente Funktionen während der Zellteilung und dem Transport von Makromolekülen, Vesikeln und Organellen zu erfüllen. Zytoskelettstrukturen vermitteln die Cilien- und Flagellenbewegung. Das eukaryotische Zytoskelett besteht aus drei Hauptklassen von Zytoskelettstrukturen, den Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und Aktin-Mikrofilamenten.

### ***Das eukaryotische Zytoskelett***

#### ***Mikrotubuli***

Mikrotubuli (MT) sind aus Protofilamenten von  $\alpha/\beta$  Tubulindimer-Einheiten aufgebaute, flexible Hohlzylinder mit einem Durchmesser von 24 nm. Eine besondere Eigenschaft der Mikrotubuli ist deren Polarität und die sogenannte dynamische Instabilität, ein selbstorganisierter Auf- und Abbau, der von der Temperatur und der Konzentration freier Tubulindimere, sowie von regulatorischen Proteinen gesteuert wird. In der mitotischen Kernspindel sind Mikrotubuli durch gerichtete Polymerisierung und Depolymerisierung für Chromosomensegregation verantwortlich. Im Zytosol dienen Mikrotubulistränge als Gerüst für Transportvorgänge von Proteinen, Vesikeln, Organellen und Granula. Zahlreiche Mikrotubuli-assoziierte Proteine sind bekannt, darunter die verbreiteten Motorproteine der Kinesin- und Dyneinfamilien. Eine unter dem weitläufigem Sammelbegriff MAP's (Mikrotubuli-assoziierte Proteine) zusammengefasste Gruppe von Mikrotubuli-bindenden Proteinen erfüllen regulatorische Funktionen oder vermitteln als Adapterproteine die Quervernetzung der verschiedenen Zytoskelettnetzwerke.

### **Intermediärfilamente**

Intermediärfilamente (IF) sind aus Homotetramer-Einheiten von IF-Proteinen aufgebaute Filamente mit einem Durchmesser von 10 nm. Die bekanntesten Vertreter der IF-Proteine sind Keratine, Vimentine, und die Lamine der Kernmembran. Beim Menschen werden die IF-Proteine von einer Genfamilie mit 70 Mitgliedern kodiert. Die gewebespezifische Expression von IF-Proteinen im Laufe der Entwicklung und bei der Differenzierung spezifisch reguliert (Fuchs and Karakesisoglou, 2001). Die stabilen Intermediärfilamente sind über Adapterproteine mit der Plasmamembran und mit den anderen Zytoskelettklassen assoziiert und dienen offenbar hauptsächlich zur Erhöhung der mechanischen Stabilität der Zelle.

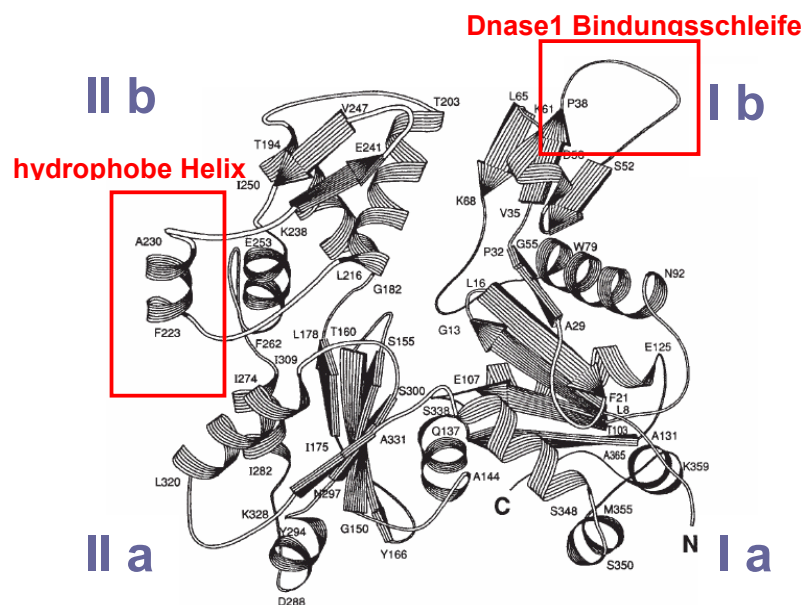
### **Aktin-Mikrofilamente**

Das verzweigte Netzwerk der Aktin-Mikrofilamente stellt einen wesentlichen Anteil der Proteinmasse im eukaryotischen Zytosol dar. Aktin-Mikrofilamente (F-Aktin) haben einen Durchmesser von 7 nm und bestehen aus zwei einsträngigen Aktin-Protofilamenten, die helikal ineinander verdrillt sind. Die F-Aktin Helix hat eine Ganghöhe von 360 Å und wird von 13 Monomeren pro 6 Umdrehungen gebildet. Jedes Monomer ist um 166° relativ zum nächsten Monomer gedreht (Egelman, 1985).

Wie auch die Mikrotubuli-Netzwerke können sich die dynamischen Aktin-Mikrofilamente signalgesteuert reorganisieren. Die Polymerisation an den beiden Enden der Aktinfilamente findet mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten statt, so dass Aktinfilamente Polarität aufweisen. Am sogenannten *barbed end* findet schnelle Polymerisierung statt. Die wohl am Besten charakterisierte Funktion von F-Aktin ist die Muskelkontraktion durch Interaktion mit Myosin. Darüberhinaus sind F-Aktin Netzwerke an zahlreichen intrazellulären Transportprozessen beteiligt und ermöglichen die gerichtete Wanderung von Zellen durch Pseudopodien und Lamellipodien, z. B. bei der Chemotaxis (Mitchison and Cramer, 1996). Auch im Nukleus scheint Aktin an Prozessen der Reorganisation des Chromatins (Olave et al., 2002), an der Transkription und am RNA Export (Bettinger et al., 2004) beteiligt zu sein.

Die Dynamik der Aktin-Mikrofilamente ist spezifisch reguliert. Aktin interagiert mit einer Vielzahl zellulärer Proteine, die unter dem Begriff ABP's (*actin binding proteins*)

und Arp's (*actin related proteins*) zusammengefasst sind. Einige Interaktionspartner sind die Polymerisierungs- und Depolymerisierungsfaktoren Profilin und Cofilin (Pollard and Borisy, 2003), der Nukleationskomplex Arp2/3, Formin und *formin homology domain* (FH-) Proteine, aber auch der SRF-Coaktivator MAL (Miralles et al., 2003) und DNase1 (Podolski and Steck, 1988). Obwohl die hochaffine Interaktion von DNase1 und globulärem Aktin (G-Aktin) schon seit 1988 bekannt ist, ist die physiologische Bedeutung dieser Interaktion bislang nicht geklärt. Die Bindung von G-Aktin inhibiert die DNA-Hydrolyse Aktivität der DNase1 und unterdrückt die Polymerisierung von G-Aktin. Die durch die hochaffine Interaktion unterdrückte Polymerisierung von G-Aktin auch bei hohen Proteinkonzentrationen ermöglichte die Kristallisation und Lösung der ersten Kristallstruktur des Aktin Monomers im Komplex mit DNase1 (Kabsch et al., 1990).



**Abb.1: Kristallstruktur des Aktin-Monomers (Kabsch et al., 1990).** Die Kristallstruktur von Aktin aus Kaninchenmuskel wurde im Komplex mit ATP und DNase1 gelöst (ATP und Dnase1 nicht gezeigt). Aktin interagiert spezifisch mit DNase1 über den DNase1-Bindungsschleife in der Subdomäne 1 b zwischen den Resten P38 und S52.

Aktin, aber auch die funktionell unverwandten Proteine Hexokinase und die ATPase Domäne von Hsp70 besitzen den gleichen Fold und gehören zur Aktin/Hsp70 Superfamilie. Innerhalb der Aktin/Hsp70 Superfamilie besteht nur eine geringe

Sequenzähnlichkeit und die Homologie besteht eher auf struktureller Ebene. Die Mitglieder der Aktin-Superfamilie zeichnen sich durch das Vorkommen von zwei durch ein basales Gelenk verknüpften  $\alpha/\beta$  Domänen aus, die das charakteristische Aktin/Hsp70 Kernelement enthalten. Zwischen den beiden Domänen befindet sich die Nukleotidbindungsspalte. Das Aktin/Hsp70 Kernelement besteht aus einem viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt, welches von drei  $\alpha$ -Helices flankiert ist (Abb. 1) (Kabsch and Holmes, 1995). Aktin interagiert mit seinen Bindungspartnern über spezifische, strukturelle Erkennungsmotive. Etwa wird die Bindung der DNase1 an Aktin über ein spezifisches Strukturmotiv in der Subdomäne 1 b vermittelt, die sogenannte DNase1 Bindungsschleife (Abb. 1). Mit der Veröffentlichung der Kristallstruktur von G-Aktin wurde von den gleichen Autoren ein atomares Modell des Aktinfilaments erstellt, das auf der Kombination der Kristallstruktur von G-Aktin mit niedrig aufgelösten Strukturdaten von geordneten F-Aktin-Gelen basiert (Holmes et al., 1990). Es wurde vorgeschlagen, dass eine kurze, hydrophobe Helix in der Subdomäne 2 b für die lateralen Kontakte der Monomere im doppelsträngigen Filament benötigt wird (Abb. 1). Die Anordnung der Monomere im Aktin Protofilament wurde später durch die Kristallstruktur eines in der longitudinalen Achse chemisch verknüpften Aktin-Dimers in den Grundzügen bestätigt und um Details weiter ergänzt (Kudryashov et al., 2005). Darüberhinaus wurde ein Aktinfilamentmodell vorgeschlagen, bei dem die Flexibilität des Aktinfilaments durch variable Interaktionen der Monomere erklärt wurde (Galkin et al., 2002). Die molekularen Details der Interaktion der Monomere innerhalb des Aktinfilaments sind noch nicht abschliessend aufgeklärt.

Die Netzwerke der Mikrotubuli, Intermediärfilamente und der Aktin-Mikrofilamente sind über Adapterproteine vernetzt und erfüllen zum Teil gemeinsame Funktionen. Mikrotubuli und Aktinfilamente kooperieren bei zahlreichen zellulären Prozessen, beispielsweise beim Transport von Pigmentgranula in den spezialisierten Melanophoren, bei der Spindelrotation in *C. elegans* und bei der Kernmigration in knospenden *S. cerevisiae* (Goode et al., 2000; Jacob et al., 2003). Vimentin-Intermediärfilamente stehen in direkter Verbindung zu Aktin-Mikrofilamenten (Owaribe et al., 1986) und auch in der Kernspindel sind Aktin-Mikrofilamenten an der Chromosomenkongression beteiligt (Lenart et al., 2005). Lange Zeit wurde angenommen, dass sich das Zytoskelett spät im Laufe der Evolution entwickelt hat und ein wesentliches Merkmal der eukaryotischen Zelle darstellt. Mit der Entdeckung des bakteriellen Tubulin-ähnlichen Proteins FtsZ, das filamentöse Ringe während der

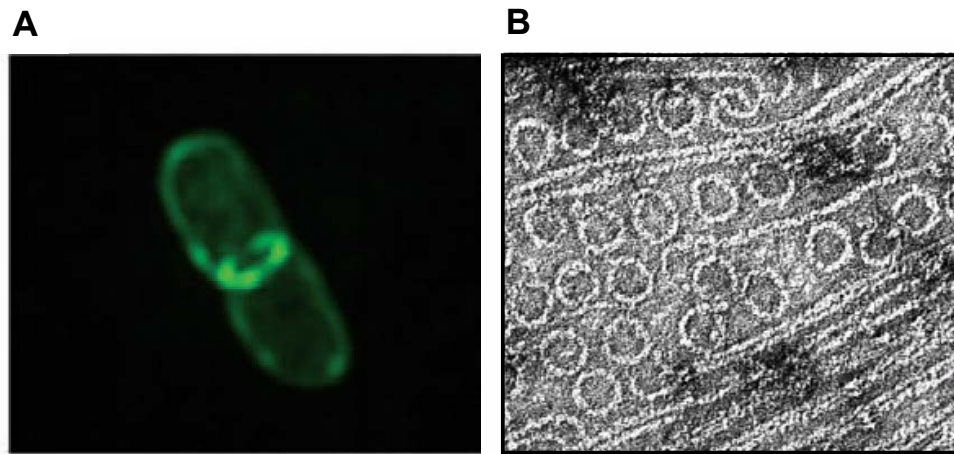
Zellteilung in *E. coli* ausbildet (Bi and Lutkenhaus, 1991) und eines Aktin-Homologen in *Bacillus subtilis*, das zu ausgedehnten Spiralen unter der Zellmembran polymerisiert (Jones et al., 2001), entwickelte sich die Idee eines bakteriellen Vorläufers des Zytoskeletts. Offensichtliche Gemeinsamkeiten der in Prokaryoten entdeckten Strukturen mit den eukaryotischen Zytoskelettstrukturen sind deren polymere, filamentöse Struktur und die weiträumige Erstreckung der Polymere innerhalb der Zelle. Unter diesem Gesichtspunkt wurden bakterielle Zytoskelettstrukturen definiert als filamentöse, polymere Strukturen, die hauptsächlich aus einer Art von Proteinuntereinheiten bestehen, sich weiträumig innerhalb der Zelle erstrecken und deren Filamente sich *in vitro* rekonstituieren lassen (Shih and Rothfield, 2006). Inzwischen wurden innerhalb weniger Jahre mehrere bakterielle Homologe von allen drei Klassen des eukaryotischen Zytoskeletts identifiziert, die dieser Definition eines bakteriellen Zytoskeletts entsprechen und die Zytoskelett-spezifische Funktionen wahrnehmen.

### ***Bakterielle Tubulin Homologe***

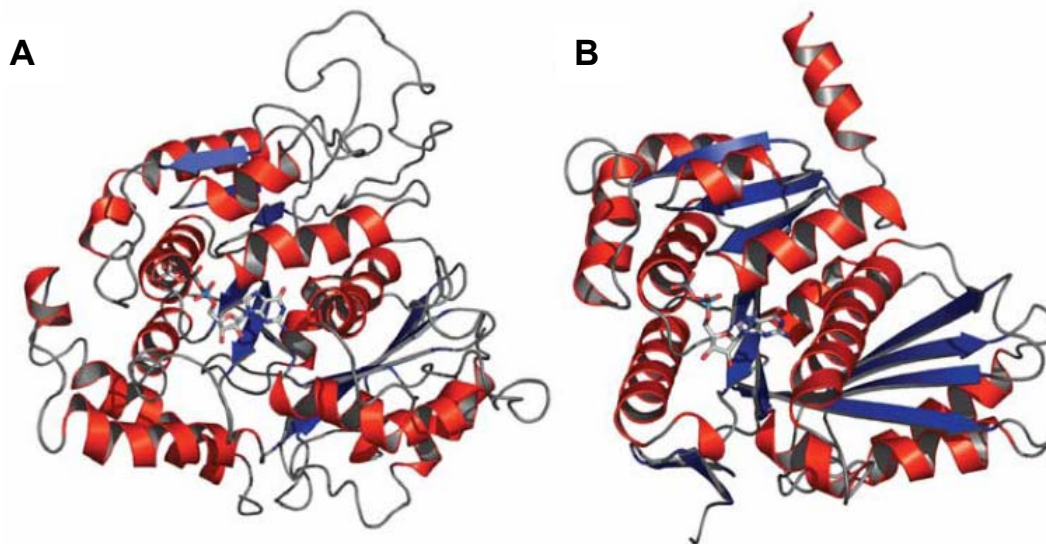
Das essentielle Protein FtsZ kommt ubiquitär in allen Bakterien und Archaeen vor. Als erstes prokaryotisches Homolog eines Zytoskelettproteins wurde FtsZ 1991 aufgrund des Vorkommens eines Tubulin-Signaturmotivs in der Primärsequenz entdeckt (Bi and Lutkenhaus, 1991). Während der bakteriellen Zellteilung bildet FtsZ in der Mitte der Zelle eine transiente Ringstruktur aus, den sogenannten Z-Ring (Abb. 2a). *In vitro* polymerisiert FtsZ mit GTP zu geraden, gestreckten Filamenten. Mit GDP bildet FtsZ ringförmige Filamente (Abb. 2b). FtsZ-Ringe kommen auch während der Teilung der endosymbiontischen Plastiden und Mitochondrien in Eukaryoten vor (Miyagishima et al., 2003). Die Sequenzidentität von FtsZ und Tubulin beträgt nur etwa 17%. Die Kristallstruktur von FtsZ und der Vergleich mit der Tubulinstruktur enthüllte die signifikante strukturelle Ähnlichkeit der beiden Proteine (Nogales et al., 1998). Die Tubulin-Homologe BtubA und BtubB kommen nur in *Prostheco bacter* vor. BtubA/B besitzen etwa 35% Sequenzidentität zu Tubulin und weisen eine deutlich höhere Ähnlichkeit zu Tubulin auf, als zu FtsZ. Es wurde angenommen, das BtubA/B durch horizontalen Gentransfer in das Genom von *Prostheco bacter de jonegii* gelangt



sind (Schlieper et al., 2005). BtubA/B bilden GTP-abhängig Heterodimere, die sich zu Tubulin-ähnlichen Protofilamenten arrangieren.



**Abb.2: Filamente von FtsZ.** (A) Der septale Ring als fluoreszenzmikroskopische Abbildung von GFP-FtsZ während der Zytokinese in *E. coli*. (B) Elektronenmikrograph von *in vitro* rekonstituierten FtsZ Filamenten. In Abhängigkeit des gebundenen Nukleotids bildet FtsZ gerade (GTP) oder ringförmige Filamente (GDP). Abbildungen aus (Hempel, 2005; Weiss, 2004).

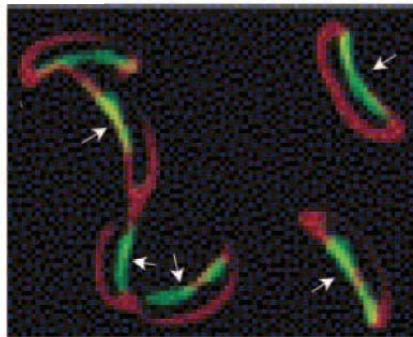


**Abb.3: Kristallstrukturen von Tubulin und FtsZ.** (A) Struktur von Tubulin. (B) FtsZ ist ein Tubulin Homolog. Der Vergleich der Kristallstrukturen von Tubulin und FtsZ enthüllt eine strukturelle Homologie. Tubulin und FtsZ bilden eine eigene Klasse von GTPasen, deren zwei Domänen durch eine zentrale Helix verbunden sind. Abbildung entnommen aus Biospektrum, Hempel et al. (Hempel, 2005)

Die Faltung von BtubA/B *in vitro* verläuft spontan (Schlieper et al., 2005). Aufgrund des Vorkommens dieser sehr nahen Tubulin-Verwandten im prokaryotischen System stellen BtubA/B ein interessantes Forschungsobjekt im Faltungs- und Tubulinfeld dar. Tubulin, FtsZ und BtubA/B bilden eine eigene Klasse von GTPasen, deren zwei Domänen durch eine zentrale Helix verbunden sind (Nogales et al., 1998). Die Nukleotidbindungsstelle befindet sich zwischen den beiden Domänen und ist durch ein konserviertes, Glyzin-reiches Signaturmotiv gekennzeichnet. Als weitere Tubulin-Homologe wären MinD und Soj zu nennen.

### ***Crescentin, ein Intermediärfilament Protein Homolog***

Crescentin (CreS) ist das einzige bisher identifizierte Homolog eines Intermediärfilament Proteins. CreS ist für die Erhaltung der sichelförmigen Form von *Caulobacter crescentus* Zellen verantwortlich. CreS bildet ausgedehnte, filamentöse Strukturen an der konkaven Seite der gekrümmten *Caulobacter crescentus* Bakterien (Abb. 4). Der Verlust des Strukturgens von CreS führt zu einem Verlust der normalerweise gekrümmten Zellform von *Caulobacter* und der Ausbildung von stäbchenförmigen Zellen.



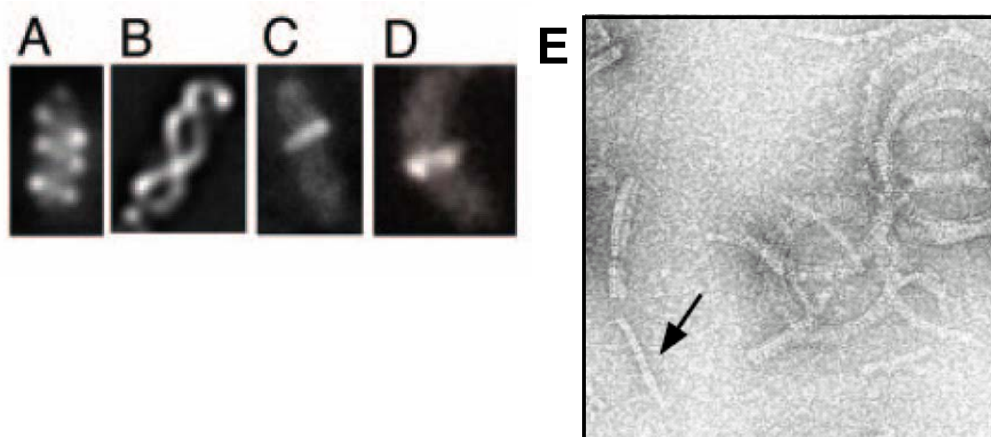
**Abb.4: GFP-markierte CreS-Filamente in *Caulobacter crescentus*.** CreS lokalisiert zu der konkaven Seite der gekrümmten Bakterien. Der Verlust von CreS führt zu stäbchenförmigen Zellen. Abbildung entnommen aus (Shih and Rothfield, 2006).

Zwischen CreS und eukaryotischen IF-Proteinen besteht etwa 25% Sequenzidentität und 40% Sequenzähnlichkeit (Shih and Rothfield, 2006). Die Homologie zu IF-Proteinen wurde aufgrund einer aus der Primärsequenz vorhergesagten

Domänenorganisation entdeckt, die für IF-Proteine charakteristisch ist (Herrmann and Aebi, 2004).

### **Die bakteriellen Aktin Homologen MreB und ParM**

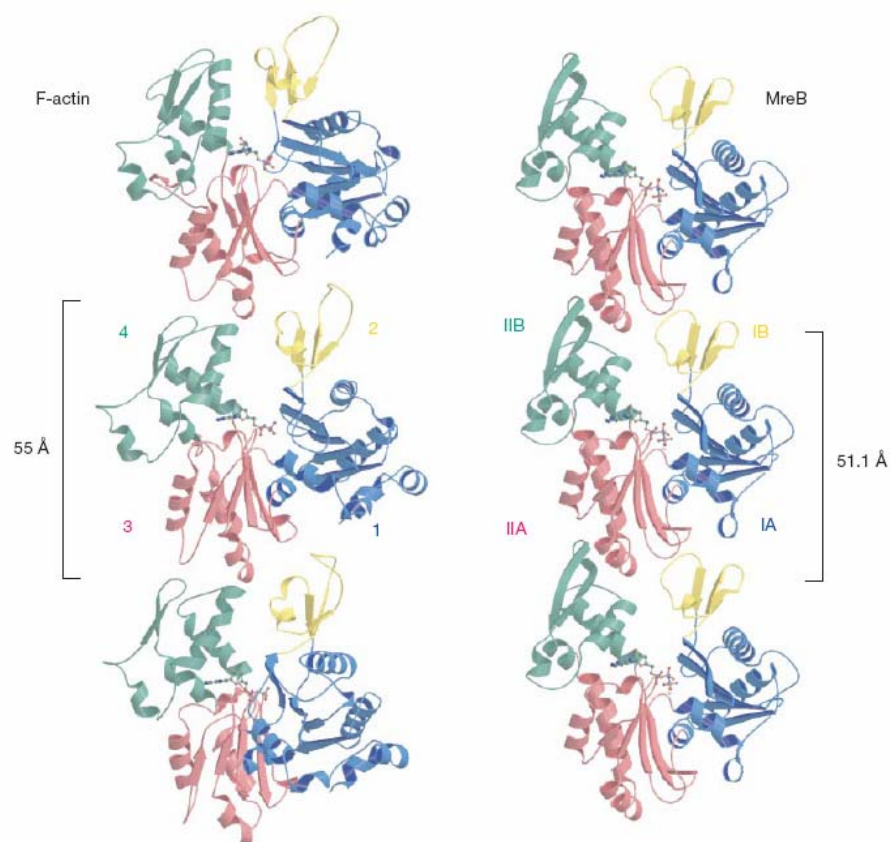
In *E. coli* wurden die Proteine MreB und MreB Homologe bereits 1987 als die stäbchenförmige Zellform bestimmend identifiziert. MreB polymerisiert zu ausgedehnten filamentösen Strukturen in der Zelle. Der Verlust der MreB Funktion führt zur Bildung runder Zellen und zu erhöhter Sensitivität gegenüber dem  $\beta$ -Lactam Antibiotikum Mecillinam (Wachi et al., 1987). MreB ist ein abundantes Protein und kommt in 30.000 Kopien (*E. coli*) und in 8.000 Kopien (*Bacillus subtilis*) pro Zelle vor (Jones et al., 2001; Kurner et al., 2005). Im Fluoreszenzmikroskop erscheinen GFP-markierte MreB Filamente als ausgedehnte helikale Spiralen unter der Zellmembran (Abb. 5). Neben der strukturgebenden Funktion von MreB wurden auch spezifische Transportfunktionen der MreB Filamente, beispielsweise bei der Segregation von DNA, beobachtet (Gitai et al., 2005).



**Abb.5: MreB-Filamente.** (A-D) GFP-markierte MreB Filamente in *Caulobacter crescentus*. MreB polymerisiert zu helikalen Strukturen unter der Zellmembran in *E. coli*. Der Verlust von MreB führt zur Bildung runder Zellen. (D) In *Caulobacter* bildet MreB eine band-ähnliche Struktur in der Zellmitte vor der Zellteilung. (E) Elektronenmikrograph von *in vitro* erzeugten MreB Filamenten. In Anwesenheit von ATP bildet MreB gerade und ringförmige Filamente. Abbildungen entnommen aus (van den Ent et al., 2001b).

Zwischen Aktin und MreB besteht auf der Ebene der Primärsequenz nur eine geringe Homogie (etwa 10% Sequenzidentität). Aufgrund eines Vergleiches der Strukturen

von Aktin, Hexokinase und Hsp70 (ATPase Domäne) trafen Bork et. al 1992 die Vorhersage, dass mehrere bakterielle Proteine, darunter DnaK, FtsA, ParM und MreB einen ähnlichen Fold wie Aktin besitzen müssten (Bork et al., 1992). Die Kristallstruktur von MreB aus *Thermotoga maritima* im Komplex mit dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogon AMPPNP wurde im Jahr 2001 gelöst (van den Ent et al., 2001b). MreB ist ein Mitglied der Aktin/Hsp70 Superfamilie und zeigt trotz geringer Sequenzähnlichkeit eine bemerkenswerte strukturelle Homologie zu Aktin. Neben einer ähnlichen Domänenorganisation weisen MreB und Aktin auch eine gemeinsame Topologie der Sekundärstrukturelemente auf.



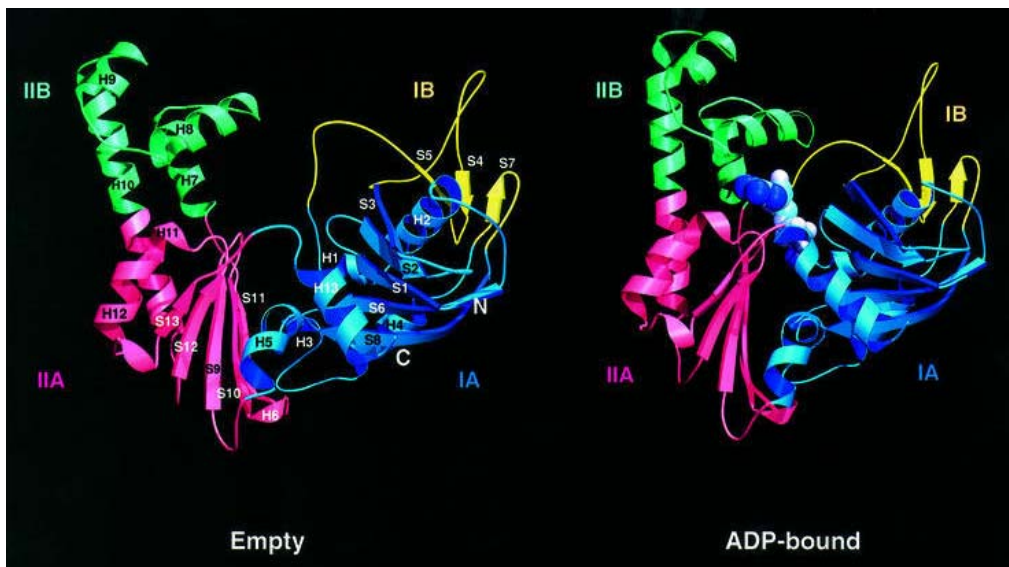
**Abb.6: Vergleich der Protofilamente von F-Aktin und MreB.** Die Kristalle von MreB enthalten einsträngige MreB Protofilamente (rechts), die Ähnlichkeit zum Modell von F-Aktin (links) aufweisen. Die Protofilamente von F-Aktin und MreB zeigen einen ähnlichen longitudinalen Abstand der wiederkehrenden Einheit. Abbildung entnommen aus (van den Ent et al., 2001b).

*In vitro* polymerisiert MreB sowohl in Gegenwart von ATP, als auch mit GTP und bildet gerade oder kreisrunde, jedoch unverdrillte doppelsträngige Filamente (van den Ent et al., 2001b). Dies steht im Gegensatz zu F-Aktin, bei dem runde Filamente

nicht auftreten und dessen Polymerisierung in jedem Falle vom Adenin-Nukleotid abhängig ist. Die Analyse der Reflexe im Beugungsbild der *in vitro* erzeugten MreB Filamente (Powerspektrum) ergaben einen wiederkehrenden längslaufenden Abstand der Monomere von 51 Å (van den Ent et al., 2001b). In den dreidimensionalen Kristallen von MreB fanden van den Ent et. al ebenfalls einen längslaufenden Abstand von 51 Å und es wurde angenommen, dass MreB im Kristall als einsträngiges Protofilament vorliegt (Abb. 6). Im F-Aktin Filament ist der longitudinale Abstand ähnlich und beträgt 55 Å (Holmes et al., 1990). Aufgrund der ähnlichen angenommenen Protofilamentkontakte zwischen den Subdomänen in den Protofilamenten von MreB und F-Aktin wurde geschlossen, dass Aktin und MreB aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind (van den Ent et al., 2001b).

ParM ist ein plasmid-kodiertes bakterielles Aktin Homolog, das ebenfalls F-Aktin-ähnliche Filamente bildet (Moller-Jensen et al., 2002). Bei der bakteriellen Zellteilung wird in manchen Systemen die Einhaltung einer konstanten Anzahl von Plasmiden, die in niedriger Kopienzahl in der Zelle vorliegen, durch die Funktion von ParM vermittelt. ParM ist ein abundantes Protein, das in *E. coli* in Kopienzahlen von etwa 18.000 Molekülen pro Zelle vorkommt (Moller-Jensen et al., 2003). In *E. coli* ist ParM Teil eines Plasmidsegregationssystems für das Plasmid R1, das aus ParM, einer Centromer-ähnlichen Region *parC* auf dem Plasmid und dem Nukleationsfaktor ParR besteht (Jensen and Gerdes, 1999). In Zellen, die replizierte Plasmide enthalten, bildet ParM unter bestimmten Bedingungen ausgedehnte Filamente, die das Zellinnere bis zu den Polen durchspannen (Moller-Jensen et al., 2002). Die replizierten Plasmide werden wahrscheinlich durch das Wachstum der Filamente in der Nähe der beiden *parC* Seiten zu den entgegengesetzten Polen geschoben und getrennt (Moller-Jensen et al., 2002). *In vitro* erzeugte Filamente von ParM zeigen dynamische Instabilität, stabile Filamente können *in vitro* nur mit nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga erhalten werden (Garner et al., 2004). *In vivo* benötigt ParM für die Bildung stabiler Filamente die Beteiligung von ParR, das als Adapterprotein die *parC* Region mit dem ParM Filament verknüpft und als Nukleationsfaktor für die Rekrutierung von ATP-gebundenen ParM Monomeren in das Filament dient (Moller-Jensen et al., 2002). Der ParM Filamentkörper wird aus ADP-(+P<sub>i</sub>) gebundenen ParM Monomeren gebildet. In Ähnlichkeit zum F-Aktin Filament besteht das ParM Filament aus zwei in sich verdillten Protofilamenten (van

den Ent et al., 2002). Die Kristallstruktur von ParM zeigt, dass ParM ein typisches Mitglied der Aktin/Hsp70 Superfamilie ist. Die Struktur von ParM wurde sowohl in der nukleotidfreien, als auch im Komplex mit ADP gelöst. In der nukleotidfreien Form sind die Domänen weit geöffnet und die Nukleotidbindungsspalte ist zugänglich (van den Ent et al., 2002). Eine durch die Nukleotidbindung induzierte Domänenrotation von etwa 25° bringt die kleineren Subdomänen 2 b und 1 b in Kontakt und schliesst die Nukleotidbindungsspalte (Abb. 7) (van den Ent et al., 2002).



**Abb.7: Kristallstruktur von nukleotidfreiem ParM und ParM im Komplex mit ADP.** ParM ist ein Aktin/Hsp70 Superfamilie. Die Nukleotidbindung induziert eine Domänenrotation von etwa 25°. Abbildung entnommen aus (van den Ent et al., 2002)

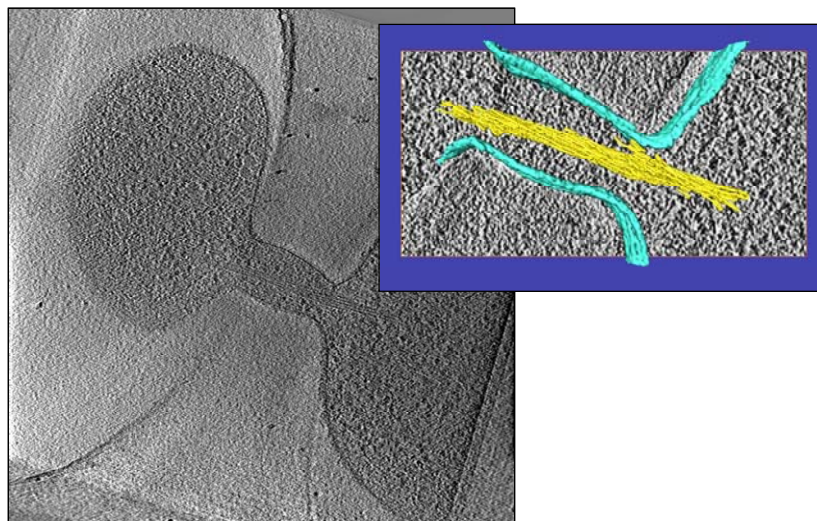
Ein atomares ParM Filamentmodell wurde aus einer Kombination der Kristallstruktur des ParM Monomers mit niedrigaufgelösten EM-Daten des Filaments abgeleitet. Im Filamentmodell von ParM vermittelt eine hydrophobe Schleife in der Subdomäne 1 b wichtige Protofilamentkontakte (van den Ent et al., 2002).

Auch im Reich der Archaeen wurde das Vorkommen von Zytoskelettproteinen aufgrund von Sequenzanalysen vorhergesagt, keines jedoch bislang strukturell oder biochemisch charakterisiert. In Extrakten von *Thermoplasma acidophilum* wurde nach Inkubation mit ATP eine signifikante Zunahme der Viskosität beobachtet und als Zeichen für das Vorkommen eines Zytoskeletts gewertet. In

elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieses viskosen Extraktes wurde tatsächlich ein Zytoskelett-artiges, maschenartiges Gerüst mit einem Durchmesser von 10 nm nachgewiesen (Hixon and Searcy, 1993). Yasuda et. al beschrieben 1995 kristalline Strukturen, die im Zytoplasma von *T. acidophilum* auftreten und berichteten von faserartigen Strukturen auf der Oberfläche von *T. acidophilum* Zellen (Yasuda et al., 1995).

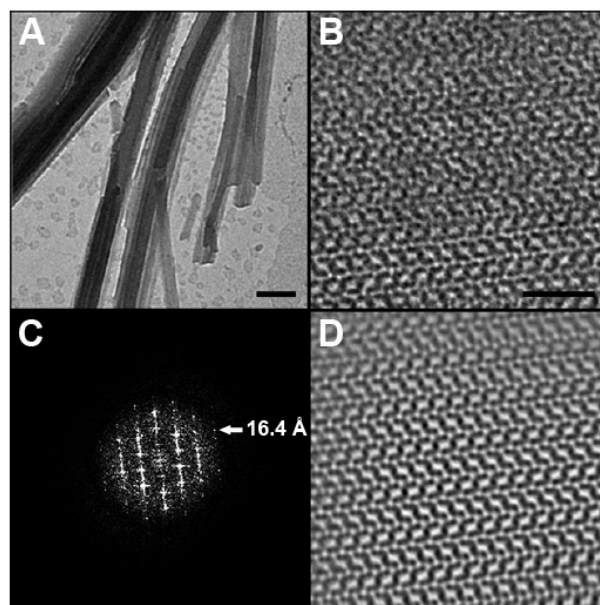
### ***Thermoplasma acidophilum* als Modellorganismus**

Das Archaeon *Thermoplasma acidophilum* ist ein thermophiler und acidophiler Organismus, der bei Temperaturen um 50° C in saurer Umgebung lebt. Eine Zellwand fehlt *T. acidophilum*. Aus wildlebenden *T. acidophilum* Stämmen, die in heißen Quellen in Japan gesammelt wurden, konnten Plasmide isoliert werden (Yasuda, 1995). *T. acidophilum* eignet sich als Modellorganismus zur Charakterisierung möglicher archaealer Zytoskelettproteine, da die vollständige Genomsequenz seit dem Jahr 2000 bekannt ist (Ruepp et al., 2000).



**Abb. 8: Kryoelektronenmikroskopie von *T. acidophilum* Zellen.** Projektion (49.3 nm dick) durch ein Kryo-Elektronentomogramm von *T. acidophilum*. Zwei Zellen sind durch eine Plasmabrücke verbunden, durch die ein Bündel von Filamenten verläuft, im Einsatz als 3D-Oberflächendarstellung dargestellt sind. Die Filamente sind gelb, die Plasmamembran in türkis dargestellt. In dieser Darstellung ist zu erkennen, dass die Filamente leicht gegeneinander verdreht sind. Die Abbildung wurde von Christine Kofler erstellt.

In Schnitten von *T. acidophilum* Zellen wurden von Christine Kofler Zytoskelett-artige Filamente eines unbekanntes Proteins gesichtet (Abb. 8). Aufgrund von Sequenzhomologien zu bereits bekannten Proteinen des Zytoskeletts wurden fünf potentielle Zytoskelettproteine im Genom *T. acidophilum* vorhergesagt. Eines dieser Proteine, Ta0583, wurde kloniert und rekombinant aufgereinigt. Die Zugabe von 5% Glycerol zu aufgereinigtem Ta0583 führte zur Bildung eines milchigen Präzipitats (Christine Kofler, pers. Mitteilung). Negativ kontrastierte Elektronenmikrographen dieses Präzipitats (aufgenommen von Christine Kofler, Abt. Baumeister) zeigten bei niedriger Vergrößerung, dass das Präzipitat die Form faserartiger, kristalliner Blätter annahm (Abb. 9).



**Abb. 9: TEM-Aufnahmen kristalliner Ta0583-Blätter.** Die Aufnahmen zeigen Uranyl-acetat negativ kontrastierte Blätter von Ta0583 nach der Präzipitatbildung. **(A)** Abbildung der kristallinen Blätter bei niedriger Vergrößerung (7.800-fach), der Balken entspricht 2000 Å. **(B)** Ausschnitt eines kristallinen Bereiches bei 85.000-facher Vergrößerung. Der Balken entspricht 200 Å. **(C)** Beugungsbild von (A). Die sich wiederholende Einheit besitzt Einheitszelldimensionen von 51 Å und 122 Å. **(D)** Fourier-geschnittenes rauschfreies Bild von (B) zeigt ausschliesslich periodische Bildinformationen.

Bei hoher Vergrößerung offenbarte sich eine regelmässige, antiparallele Anordnung von Strukturen, die Ähnlichkeit zu den Aggregaten aus den Proben der MreB Polymerisierungsassays aufweisen (van den Ent et al., 2001b). Die kristallinen

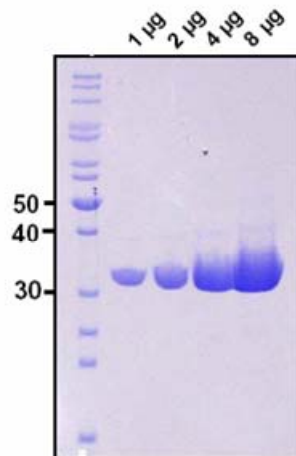


Blätter beugten bis zu einer Auflösung von 16,4 Å. Die Reflexe im Beugungsbild (Powerspektrum) ergaben eine sich wiederholende Einheit in einem Gitter mit Einheitszelldimensionen von 51 Å und 122 Å. Die kürzere Gitterkonstante in den kristallinen Blättern ähnelt dem longitudinalen Abstand der Monomere in den Protofilamenten von MreB und ParM und könnte Protofilamente des im Tomogramm gesichteten Proteins darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde Ta0583 biochemisch und strukturell charakterisiert.

## Ergebnisse Teil 1

### **Herstellung und Aufreinigung des Proteins Ta0583**

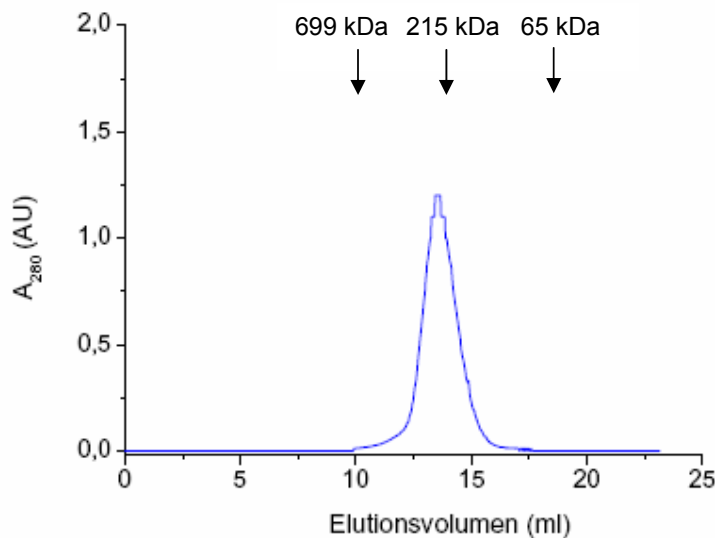
Der offene Leserahmen von Ta0583 codiert für ein Protein unbekannter Funktion, das Homologie zu Aktin aufweist. Ta0583 besteht aus 326 Aminosäuren und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 34,88 kDa. Ein pET28b-Expressionsvektor zur rekombinanten Expression von N-terminal His<sub>6</sub>-getaggttem Ta0583 wurde von Dr. Istvan Nagy (Abt. Baumeister) kloniert und zur Verfügung gestellt. Auf diesem Vektor basierend wurden zwei weitere Konstrukte zur Expression von unmodifiziertem (ohne His<sub>6</sub>-Tag) und von C-terminal His<sub>6</sub>-markiertem Ta0583 im pET28-System hergestellt. Alle Konstrukte von Ta0583 wurden problemlos als lösliche Proteine in *E. coli* überexprimiert. Die biochemischen Charakterisierungen von Ta0583 wurden mit dem unmodifiziertem Protein durchgeführt.



**Abb.10: Ergebnis der Aufreinigung von unmodifiziertem Ta0583.** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel (12%) mit einer Verdünnungsreihe von unmodifiziertem Ta0583. Der geschätzte Reinheitsgrad dieser Präparation beträgt 99%.

Abb. 1 zeigt das Ergebnis der Aufreinigung von unmodifiziertem Ta0583. Die Ausbeute aus 2 L Kulturvolumen betrug etwa 20 mg Protein mit einem Reinheitsgrad von 99%. Im SDS-Gel lief Ta0583 erwartungsgemäss als Bande von

etwa 35 kDa (Abb. 10). Im Elutionsprofil der Gelfiltration erscheint rekombinant Ta0583 als scharfer und symmetrischer Peak. Ta0583 eluiert jedoch bei einem höheren apparenten Molekulargewicht, als für sein Monomer erwartet (Abb. 11). Daher wurde vermutet, dass Ta0583 in Lösung als Dimer oder als Tetramer vorliegen würde.

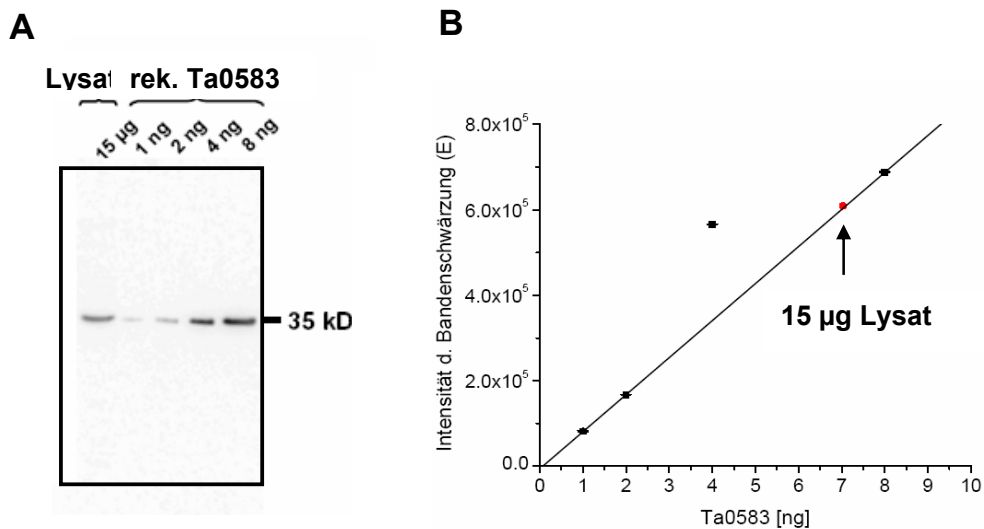


**Abb.11: Gelfiltration mit gereinigtem Ta0583.** Dargestellt ist das Elutionsprofil von Ta0583 (unmodifiziert) auf einer Superose 6 Säule. Ta0583 eluiert als scharfer, symmetrischer Peak.

Zur Bestimmung des oligomeren Zustandes in Lösung wurde das Molekulargewicht von Ta0583 anhand statischer Lichtstreuung ermittelt. Das Experiment wurde von Frau Dr. Manajit Hayer-Hartl durchgeführt. Das durch statische Lichtstreuung ermittelte Molekulargewicht in Lösung betrug  $34,04 \text{ kDa} \pm 1,02 \text{ kDa}$  und stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht des Monomers von  $34,88 \text{ kDa}$  überein. Das im Elutionsprofil der Gelfiltration scheinbar höher Molekulargewicht könnte auf ein geändertes Laufverhalten aufgrund von Interaktion des Proteins mit dem Säulenmaterial zurückzuführen sein. Entsprechend den vorliegenden Ergebnissen liegt Ta0583 bei annähernd physiologischem pH (Searcy, 1976) als homogene Population von Monomeren in Lösung vor.

## Bestimmung des Ta0583 Expressionsniveaus

Ta0583 konnte im Lysat von log-Phase *T. acidophilum* Zellen mit einem polyklonalen Antiserum gegen Ta0583 detektiert werden, es handelt sich also tatsächlich um ein translatiertes Protein (Abb. 12a). Die Lysate wurden von Christine Kofler hergestellt; das ungereinigte, polyklonale Antiserum wurde von Dr. Istvan Nagy zur Verfügung gestellt. Zur Reduzierung des Hintergrundes bei der Bestimmung des Expressionsniveaus durch den Western Blot wurde das polyklonale Antiserum zunächst mit rekombinatem Ta0583 affinitäts gereinigt. Der über das SDS-Gel geschätzte Reinheitsgrad des gereinigten Antikörpers betrug 99,9% (nicht gezeigt). Mit dem affinitäts gereinigten Antikörper lassen sich bei geringem Hintergrund bereits Mengen von 1 ng Ta0583 detektieren (Abb. 12a). Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen aus *E. coli* oder *T. acidophilum* waren nicht nachweisbar.

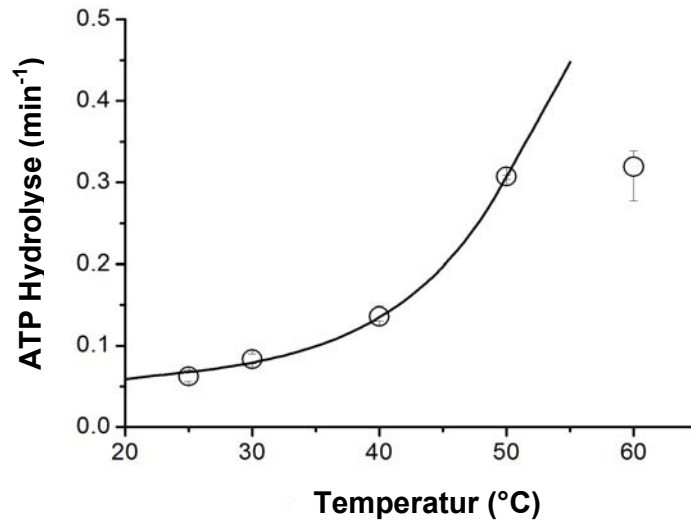


**Abb.12: Bestimmung des Ta0583-Anteils am Gesamtprotein im Zelllysate von *T. acidophilum*.** (A)  $\alpha$ -Ta0583 Western-Blot mit 15 µg Lysat und einem Eichstandard mit rekombinatem Protein. Aufgetragene Mengen sind angegeben. (B) Eichgerade. Die Intensität der Bandenschwärzung des Western Blot Signals von 15 µg Lysat sind als roter Punkt eingetragen. Ta0583 stellt nur etwa 0,04% des Gesamtprotein der löslichen Fraktion im Zelllysate von *T. acidophilum* dar. In der unlöslichen Fraktion konnte Ta0583 nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

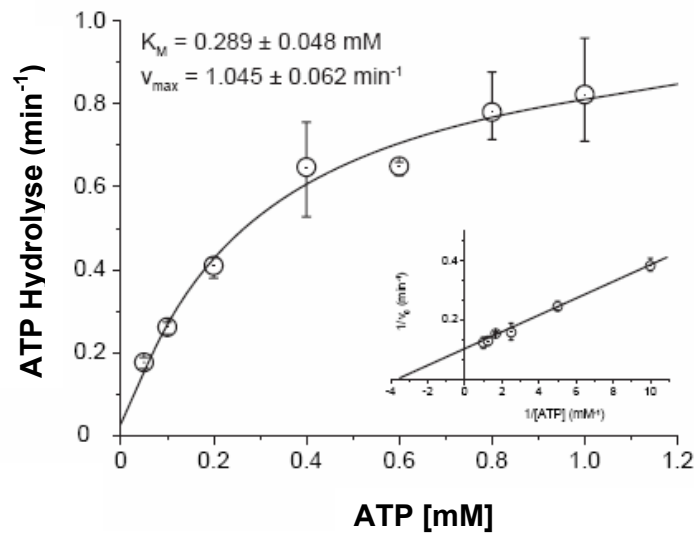
Das Expressionsniveau von Ta0583 wurde durch die Bestimmung des Anteils von endogenem Ta0583 am Gesamtprotein in der löslichen Fraktion des Lysates ermittelt. Hierzu wurde die Bandenschwärzung des Western Blot Signals quantifiziert und die entsprechende Proteinmenge anhand eines Eichstandards berechnet (Abb. 12b). In der unlöslichen Fraktion, die auch Membranbestandteile enthält, konnte Ta0583 nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Mit einem Anteil von nur 0,0426%  $\pm$  0,0006% am Gesamtprotein in der löslichen Fraktion ist das Expressionsniveau von Ta0583 für ein potentielles Strukturprotein überraschend gering. Der Aktin-Gehalt im einzelligen Eukaryoten *Dictyostelium discoideum* ist etwa 200-fach höher und beträgt etwa 8% am Gesamtprotein (Eichinger et al., 1999).

### **Bestimmung der ATPase Aktivität**

Proteine der Aktin-Familie sind ATPasen mit geringer Aktivität. Auch Ta0583 besitzt, wie hier gezeigt werden konnte,  $Mg^{2+}$ -abhängige ATPase Aktivität. *Thermoplasma acidophilum* ist ein thermophiler Organismus, der bei Temperaturen um 55 °C lebt. Abb. 13 zeigt die Temperaturabhängigkeit der ATP-Hydrolyse von Ta0583 bei Temperaturen zwischen 25 °C und 60 °C. Die maximale Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse von Ta0583 wurde bei Temperaturen von 50 °C und 60 °C beobachtet. Die ATPase-Aktivität von Ta0583 folgt der Michaelis-Menten Kinetik (Abb. 14). Der  $K_M$ -Wert für ATP beträgt bei 50 °C 289  $\mu$ M  $\pm$  48  $\mu$ M. Eine physiologische Konzentration von verfügbarem ATP wird als 1 bis 5 mM angenommen (Teramoto, 2006). Unter normalen zellulären Bedingungen sollte Ta0583 ATP mit annähernd maximaler Reaktionsgeschwindigkeit hydrolysieren. Die maximale Geschwindigkeit der ATP Hydrolyse  $V_{max}$  des Ta0583 Monomers beträgt 1,045  $\pm$  0,062 nmol/min/nmol und ist damit etwa eine Größenordnung höher als  $V_{max}$  von MreB-Filamenten aus *Thermotoga maritima* (0,1 nmol/min/nmol  $\pm$  0,01, (Esue et al., 2005), (Esue et al., 2006)) und  $V_{max}$  von F-Aktin aus Kaninchenmuskel (0,07 bis 0,3 nmol/min/nmol, (Pollard and Weeds, 1984), (Blanchoin and Pollard, 2002)). Beim Vergleich der Werte ist allerdings zu beachten, dass Ta0583 unter Assaybedingungen als Monomer vorliegt und die ATP Hydrolyse in den Filamenten von MreB und Aktin im Vergleich zum Monomer deutlich verlangsamt sein könnte.



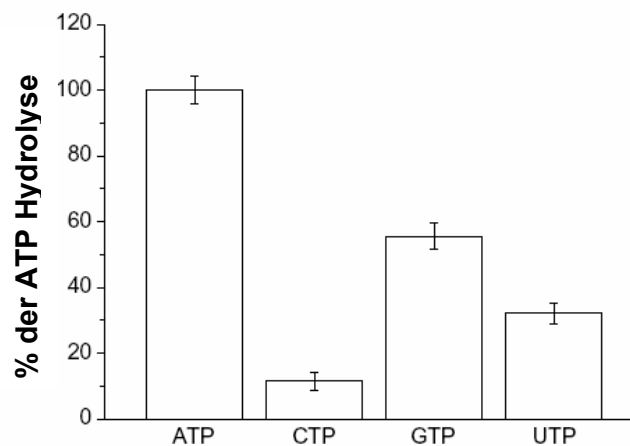
**Abb. 13: Temperaturabhängigkeit der ATP-Hydrolyse von Ta0583.** Das Temperaturoptimum liegt bei etwa 50 °C. Die Konzentrationen von Ta0583 und ATP betragen 10  $\mu$ M und 500 $\mu$ M.



**Abb. 14: Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_M$  und  $V_{max}$ .** Die Daten sind als Michaelis-Menten Diagramm und in Lineweaver-Burke Auftragung dargestellt (Einsatz). Die Konzentration von Ta0583 betrug 10  $\mu$ M, die Aktivität wurde bei 50 °C gemessen.

## Substratspezifität

Der Vergleich der Aktivitäten der NTP-Hydrolyse von Ta0583 zeigt, dass die Aktivität von Ta0583 eine deutliche Präferenz für die Purinnukleotide ATP und GTP aufweist (Abb. 15). ATP wird gegenüber GTP bevorzugt. GTP wird von Ta0583 mit etwas mehr als 50% der Geschwindigkeit von ATP umgesetzt. Die ATPase von Ta0583 zeigt nur eine schwache Aktivität in der Umsetzung der Pyrimidinnukleotide UTP und CTP. UTP wird mit etwa 25% der ATPase Geschwindigkeit hydrolysiert, CTP wird nur noch mit etwas mehr als 10% der Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse umgesetzt. ATP wird mit maximaler Effektivität umgesetzt und ist vermutlich das natürliche Substrat von Ta0583. Für MreB aus *Thermotoga maritima* wurden annähernd identische Hydrolysegeschwindigkeiten für die Purine ATP und GTP und damit keine Selektivität beobachtet (Esue et al., 2006).

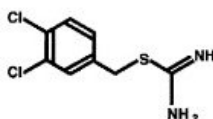


**Abb. 15: NTP-Hydrolysegeschwindigkeiten von Ta0583.** ATP ist das natürliche Substrat von Ta0583 und wird effektiv umgesetzt. Die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse wurde als 100% gesetzt. Die Aktivität von Ta0583 zeigt eine klare Präferenz für Purinnukleotide.

## Einfluss des MreB-Inhibitors A22 auf die ATPase Aktivität von Ta0583

Die S-Benzylisothioharnstoff Verbindung A22 wurde im Jahre 2002 als Inhibitor von MreB und Mbls (*MreB-like proteins*) in *E. coli* charakterisiert (Iwai et al., 2002). Geringe Mengen von A22 induzierten im stäbchenförmigen Bakterium *E. coli* die

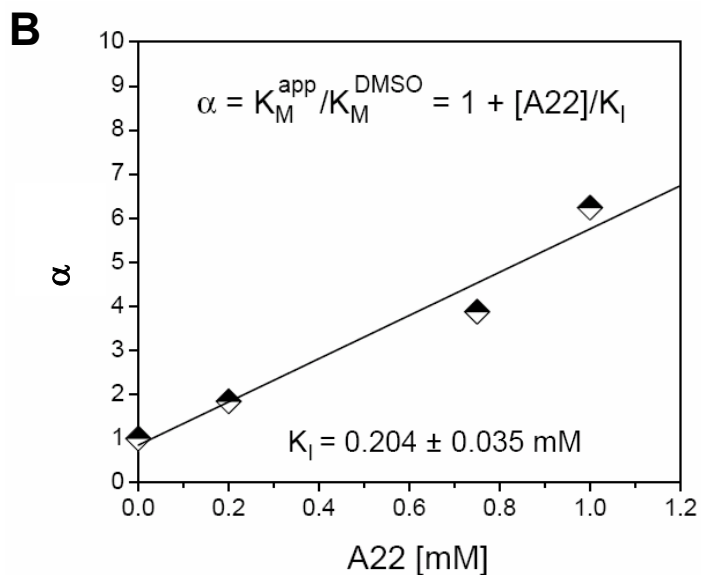
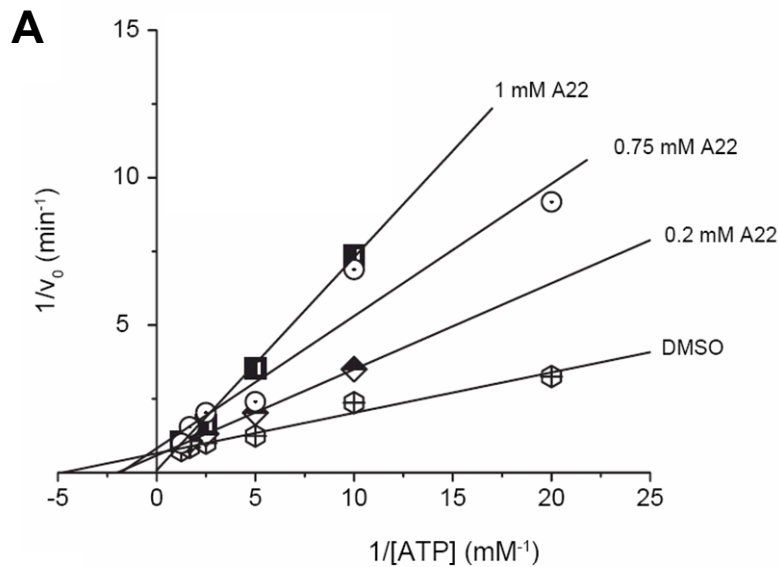
Bildung runder Zellen und führten zu abnormalem Wachstum. In weiterführenden Studien von Gitai et al. konnte MreB als ein Zielprotein von A22 identifiziert werden. Gitai et al. zeigten 2005, dass GFP-markierte MreB-Filamente in *Caulobacter crescentus*, die im Fluoreszenzmikroskop als sichtbare Spiralen unter der Zellmembran erscheinen, durch A22 Behandlung komplett delokalisieren (Gitai et al., 2005). Der Mechanismus der Wirkungsweise von A22 auf die MreB-Funktion wurde darüberhinaus jedoch nicht weiter im Detail untersucht. Mutationen in MreB, welche *in vivo* eine Resistenz gegenüber A22 bewirkten, befinden sich an der Nukleotidbindungsstelle des Proteins (Gitai et al., 2005). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Nukleotidbindungsstellen innerhalb der bekannten Aktin homologen wurde vermutet, dass A22 ebenfalls einen Effekt auf die Funktion von Ta0583 ausüben könnte.



**Abb. 16: Strukturformel der S-Benzylisothioharnstoff Verbindung A22.** A22 (S-(3,4-Dichlorobenzyl)-isothioharnstoff) ist ein Inhibitor der MreB-Funktion (Gitai et al., 2005).

Zunächst wurde ein möglicher Effekt von A22 auf die ATPase Aktivität von Ta0583 *in vitro* getestet. In der Tat ist die ATPase Geschwindigkeit von Ta0583 in Anwesenheit der Verbindung A22 deutlich verlangsamt. Abb. 8a zeigt die Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_M$  und  $V_{max}$  von Ta0583 bei unterschiedlichen Konzentrationen von A22 in Lineweaver-Burke-Auftragung. Der apparente  $K_M$  steigt bei steigender Konzentration von A22 an, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bleibt etwa unverändert (Abb. 17a). Die Veränderung der kinetischen Parameter in Abhängigkeit der Verbindung A22 zeigt das typische Muster einer kompetitiven Inhibierung. Die ermittelte Inhibitionskonstante  $K_i$  beträgt  $204 \pm 35 \mu\text{M}$  und ist in Abb. 17b abgebildet. Der  $K_i$  liegt damit in der gleichen Größenordnung wie der  $K_M$  für ATP; Substrat und Inhibitor binden in diesem Fall also mit ähnlicher Affinität an die Nukleotidbindungsstelle von Ta0583.

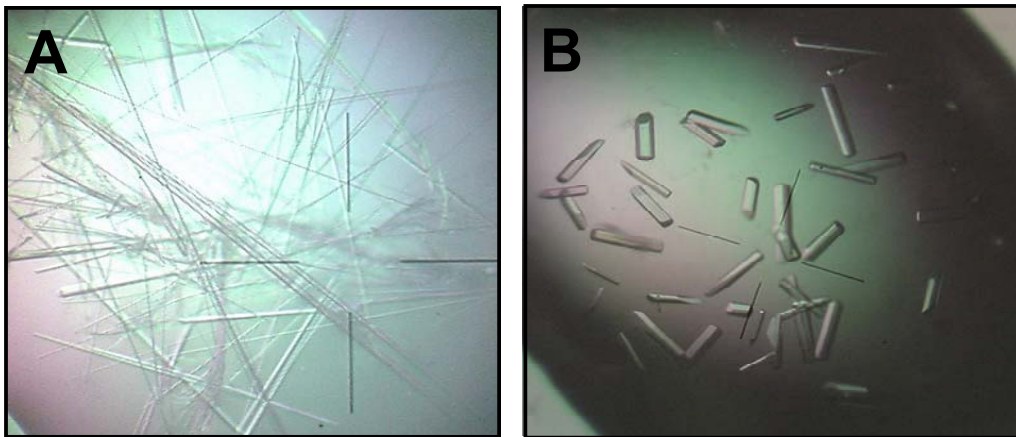




**Abb. 17: Effekt der Verbindung A22 auf die ATP Hydrolyse von Ta0583. (A)** ATP-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen A22-Konzentrationen in Lineweaver-Burke-Auftragung. Die  $K_M$ -Werte sind mit steigender A22 Konzentration scheinbar erhöht,  $V_{\text{max}}$  bleibt unverändert. A22 wirkt als kompetitiver Inhibitor. **(B)** Bestimmung der Inhibitionskonstanten  $K_I$  für den Inhibitor. Die Formel zur Berechnung von  $K_I$  ist angegeben.  $K_I$  liegt in der gleichen Größenordnung wie der  $K_M$  für das Substrat.

### **Kristallisation von Ta0583**

Ta0583 wurde mit der Dampfdiffusionsmethode kristallisiert. Ta0583 kristallisierte über Nacht in 44 von 96 Bedingungen des kommerziell erhältlichen Index-Screens (Hampton). Für Diffraktionsexperimente optimierte Kristalle von N-terminal His<sub>6</sub>-getagtem Ta0583 wurden durch Mischen von 1 µl des Proteins mit gleichem Volumen Präzipitanslösung (100 mM Bis-Tris pH 6,5, 9 – 17% PEG2000mme, 21 – 22% Ethylenglykol) und Äquilibration gegen 1000 µl Präzipitanslösung bei 20 °C erhalten. Nadelförmige Kristalle entstanden über Nacht und hatten einen Durchmesser von 10 –20 µm (Abb. 18a). Die Nadeln erreichten ihre maximale Grösse nach zwei Tagen.



**Abb. 18: Ta0583 Kristalle.** (A) Nadelförmige Kristalle von nukleotidfreiem Ta0583. Die orthorhombischen Kristalle beugten bis zu einer Auflösung von 1,9 Å. (B) Kristallisation von SeMet-Ta0583 mit 10 mM ADP erzeugt grössere monokline Kristalle. Die ADP-Kristalle beugten bis zu einer Auflösung von 2,9 Å.

Voluminöse Kristalle von Ta0583 (SeMet) wurden durch Kristallisation mit 10 mM ADP in 100 mM Bis-Tris pH 6,5, 15 – 17% PEG2000mme, 14 – 16 % Ethylenglykol nach der gleichen Methode erhalten (Abb. 18b). Die ADP-Kristalle erreichten ihre maximale Grösse nach drei bis vier Tagen. Für Kryo-Diffraktionsexperimente wurden die Kristalle in Reservoirlösung, welche mit 20% Glycerol versetzt war, transferiert, kurz äquilibriert und anschliessend in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

## **Raumgruppen und Datenreduktion**

### **Natives His<sub>6</sub>-Ta0583**

Natives, nukleotidfreies Ta0583 kristallisierte in der orthorhombischen Raumgruppe  $P2_12_12_1$  mit Zelldimensionen von  $a=51,27 \text{ \AA}$ ,  $b=50,76 \text{ \AA}$ ,  $c=123,39 \text{ \AA}$  und  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ . Die Schraubenachsen konnten durch die Analyse der systematischen Auslöschungen in den  $h00$ ,  $0k0$ , und  $00l$ -Achsen identifiziert werden. Die dünnen Nadeln streuten bis zu einer Auflösung von  $1,9 \text{ \AA}$ . Der Lösungsmittelanteil der Kristalle wurde durch Analyse der Matthews-Koeffizienten ermittelt (Matthews, 1968). Die asymmetrische Einheit enthält ein Monomer. Eine Zusammenfassung der kristallographischen Daten ist in Tabelle 1 dargestellt.

### **SeMet His<sub>6</sub>-Ta0583**

Selenomethionin-derivatisiertes His<sub>6</sub>-Ta0583 kristallisierte in der monoklinen Raumgruppe  $P2_1$  mit Zelldimensionen von  $a=53,48 \text{ \AA}$ ,  $b=104,32 \text{ \AA}$ ,  $c=62,55 \text{ \AA}$  und den Winkeln  $\alpha=90^\circ$ ,  $\beta=96,15^\circ$ ,  $\gamma=90^\circ$ . Die Kristalle streuten bis zu einer Auflösung von  $2,1 \text{ \AA}$ . Die asymmetrische Einheit der monoklinen Kristallform enthält zwei Monomere bei einem Lösungsmittelanteil von  $47,1\%$ .

### **His<sub>6</sub>-Ta0583:ADP**

Ta0583:ADP kristallisierte in der monoklinen Kristallform, Raumgruppe  $P2_1$  mit den Zelldimensionen  $a=51,70 \text{ \AA}$ ,  $b=92,84 \text{ \AA}$ ,  $c=73,66 \text{ \AA}$  und  $\alpha=90^\circ$ ,  $\beta=89,94^\circ$ ,  $\gamma=90^\circ$ . Der Winkel  $\beta$  liegt mit  $89,94^\circ$  nahe an  $90^\circ$  und damit nahe an einer der Bedingungen des orthorhombischen Kristallsystems. Obwohl auch eine Skalierung in  $P2_12_12_1$  möglich war, wurden die Daten in  $P2_1$  integriert und skaliert, da die resultierende Elektronendichte besser interpretierbar war. Die ADP Kristalle beugten bis zu einer Auflösung von  $2,9 \text{ \AA}$ . Die asymmetrische Einheit enthielt zwei Monomere bei einem Solventgehalt von  $50,9\%$ .

## **Lösung der Kristallstruktur von Ta0583**

Die Kristallstrukturen der prokaryotischen Aktin-Homologen MreB und ParM waren bereits bekannt (van den Ent et al., 2001b) (van den Ent et al., 2002). Es wurde daher

Tabelle 1: Statistik der kristallographischen Daten (Ta0583).

<b>Datensatz</b>	<b>Nativ</b>	<b>SeMet</b>	<b>Semet-ADP</b>
Messstation	SLS, PX-II	SLS, PX-I	SLS, PX-II
Raumgruppe	$P2_12_12_1$	$P2_1$	$P2_1$
a, b, c (Å); $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	51,27, 50,76, 123,39; 90, 90, 90	53,48, 104,32, 62,55; 90, 96,15, 90	51,70, 92,84, 73,66; 90, 89,94, 90.00
Auflösungsgrenze (Å)	62 - 1.9 (2,0- 1,9)	62 - 2,1 (2,21 - 2,1)	92,9 - 2,9 (3,06 - 2,9)
$R_{\text{merge}}$ *	0,078 (0,292)	0,082 (0,334)	0,045 (0,414)
$I/\sigma$	11,6 (3,5)	10,8 (3,3)	17,3 (3,4)
Redundanz	3,7 (2,6)	3,7 (3,7)	3,8 (3,8)
Vollständigkeit	99,7 (99,7)	100 (100)	99,8 (99,8)
Monomere /A.E.	1	2	2
Wilson B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	21,20	26,28	-
<b>SAD-Phasierung</b>			
Positionen der Selenatome	-	11 (12)	4 (12)
mittlere "FoM"	-	0,19 (0,07)	-
<b>Verfeinerung</b>			
Auflösungsbereich	62 - 1,9	62 - 2,1	20 - 2,9
Reflexe (Testsatz)	24713 (1327)	37762 (1997)	14678 (771)
$R_{\text{work}}$	0,196	0,174	0,283
$R_{\text{free}}$	0,242	0,225	0,359
Anzahl der Atome	2590	5173	4311
„r.m.s.d.“ Bindungslängen (Å)	0,019	0,018	0,018
„r.m.s.d.“ Bindungswinkel (°)	1,600	1,594	1,869
<b>Ramachandran Diagramm (%) **</b>			
„most favored region“	90,8	90,5	77,2
„additionally allowed“	8,8	9,1	21,6

\* Ausgabe des Programms Scala (CCP4i)

\*\* Ausgabe des Programms Procheck (Laskowski et al., 1996)

zunächst versucht, die Struktur von Ta0583 mit der Methode des molekularen Ersatzes (Molecular Replacement, MR) zu lösen. Für den molekularen Ersatz wurden die mit unterschiedlichen Algorithmen arbeitenden Programme Molrep (Vagin and Teplyakov, 1997) und Phaser (Read, 2001) benutzt. Als Suchmodelle wurden die Koordinatensätze 1JCE, 1MWK und 1MWM verwendet. Mit der Methode des molekularen Ersatzes wurde jedoch keine brauchbare Lösung gefunden. Auch die Vereinfachung der Suchmodelle durch die Erstellung von poly-Alanin-, poly-Glyzin und poly-Serinmodellen von MreB und ParM mit Moleman2 (Kleywegt, 2000) und die Entfernung von möglicherweise divergenten Teilen in den Strukturen der Suchmodelle führte zu keiner Lösung.

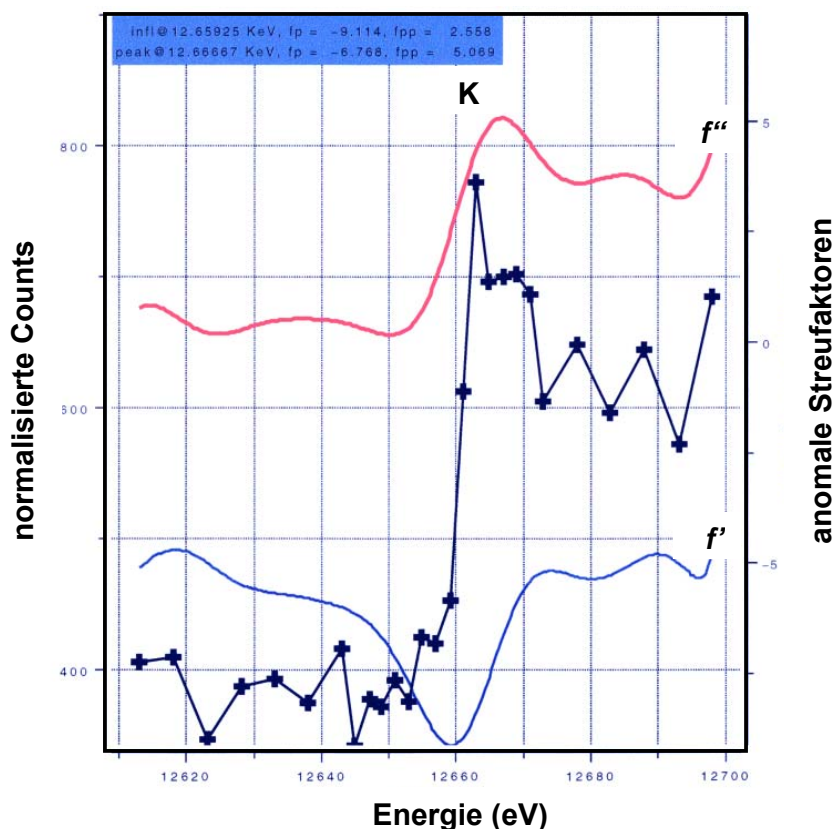
### **SeMet Ta0583**

Das Phasenproblem wurde durch Anwendung der SAD-Methode (*single wavelength anomalous dispersion*) gelöst. Bei dieser Methode benutzt man die durch anomale Streuung eines schweren Elements entstehenden Intensitätsdifferenzen zwischen Reflexen, die sich nur im Vorzeichen der dazugehörigen Miller-Indizes unterscheiden (Friedel-Paare) zur Berechnung der Phasenwinkel. Die anomale Streuung tritt bei einem inneren Elektronenübergang eines schweren Elements auf, der bei einer charakteristischen und für das schwere Element spezifischen Energie der Röntgenstrahlung ausgelöst wird. Als schweres Element wurde hier Selen eingesetzt, das durch Inkorporierung der Aminosäure Selenomethionin im Protein enthalten ist<sup>1</sup>. Zur Ermittlung der geeigneten Wellenlänge für die Datensammlung wurde zunächst ein Röntgenfluoreszenzspektrum des inkorporierten Selens aufgenommen (Abb. 19). Das Fluoreszenzmaximum der Probe lag bei 12,667 keV. Aus dem Röntgenfluoreszenzspektrum wurden Werte von  $f' = -6,578$  und  $f'' = 5,214$  für die anomalen Streufaktoren berechnet. Für die Datensammlung von Reflexen mit maximal anomaler Komponente an der K-Röntgenabsorptionskante des Selens wurde die Wellenlänge auf  $\lambda_{peak} = 0,9788 \text{ \AA}$  eingestellt. Um einen vollständigen und ausreichend redundanten Datensatz aufzuzeichnen, wurden die Reflexdaten über einen Bereich von  $180^\circ$  gesammelt. Nach der Skalierung des anomalen Datensatzes mit Scala (Blessing, 1995) und der Berechnung der Strukturfaktoramplituden mit

---

<sup>1</sup> 100% Inkorporierung von Selenomethionin wurden durch die Bestimmung der Gesamtmasse des Proteins verifiziert. Die Masse wurde freundlicherweise von dem MS-Service der Abt. Moroder bestimmt.

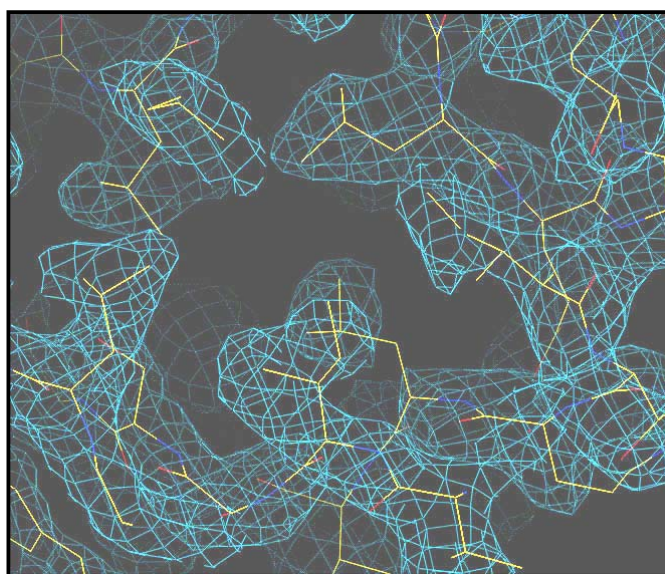
Truncate (French, 1978) wurden mithilfe des Programms SOLVE (Terwilliger and Berendzen, 1999) anhand von anomalen Differenzpatterson-Funktionen die Lagen



**Abb. 19: Röntgenfluoreszenzspektrum der Selenomethionin-Kristalle.** Die K-Röntgenabsorptionskante des Selen liegt bei einer Energie von 12666 eV. Aus den Peaks der anomalen Streufaktoren wurden die Werte für  $f'$  und  $f''$  berechnet.

der Schweratome bestimmt (Standardeinstellungen). Elf Positionen von insgesamt zwölf vorhandenen Selenatome wurden in der asymmetrischen Einheit gefunden. Mit den Positionen der Schweratome wurden die Phasen der Strukturfaktoramplituden berechnet. Die mittlere *figure of merit* (FoM) der Lösung betrug 0,19. Die experimentelle Elektronendichte zeigt bereits detaillierte Eigenschaften der Struktur. Die Phasen wurden mit RESOLVE (Terwilliger, 2004) durch Optimierung der Schweratomlagen unter Berücksichtigung der nicht-kristallographischen Symmetrie (NCS) in Kombination mit einer Glättung der Lösungsmittelbereiche (*Solvent Flattening*) verfeinert. Ein Ausschnitt aus einer  $2F_o - F_c$  Elektronendichtekarte, die mit

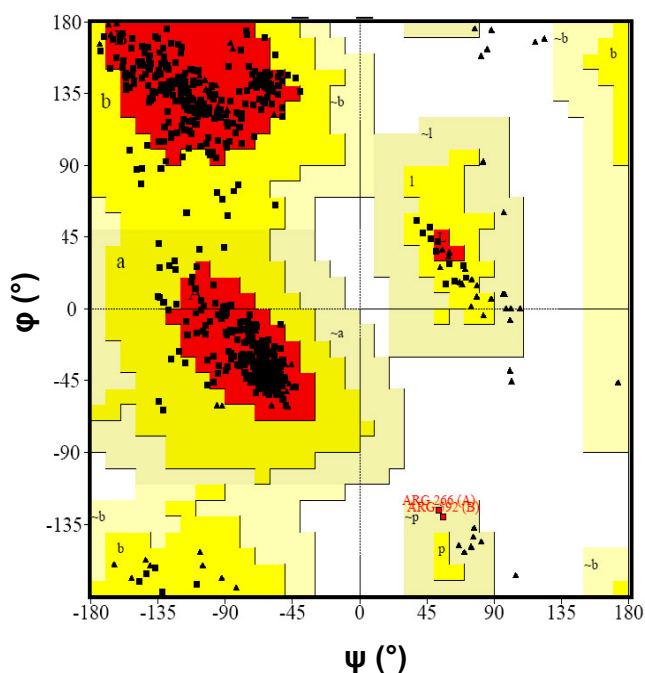
den experimentell bestimmten Phasen aus RESOLVE berechnet wurde, ist in Abb. 20 dargestellt. Mit RESOLVE wurde automatisch ein partielles poly-Alaninmodell erstellt. Wesentliche Teile des Modells konnten aufgrund der hohen Auflösung mit Arp/wArp (Morris et al., 2003) automatisch gebaut werden. Fehlende Fragmente wurden von NCS-verwandten Fragmenten in der asymmetrischen Einheit interaktiv ergänzt (Lsqkab, (Kabsch et al., 1976)) und das Modell in O (Jones et al., 1991) anhand der Elektronendichte vervollständigt. Zunächst wurde bei niedriger Auflösung in einem *Rigid Body Refinement* grob orientiert (Refmac5, (Murshudov et al., 1997)).



**Abb. 20: Experimentelle Elektronendichte, kontouriert bei  $2\sigma$ .** Ausschnitt aus der Elektronendichte aus den experimentell bestimmten Phasen aus RESOLVE bei 2,1 Å mit dem partiellen Modell aus Arp/wArp. Die sehr gut bestimmte experimentelle Dichte zeigt bereits detaillierte Eigenschaften der Struktur.

Anschliessend wurde das Modell bei hoher Auflösung in mehreren Zyklen mit Refmac5 verfeinert. In jedem Zyklus wurde das im vorherigen Zyklus unter Zuhilfenahme von 2  $F_o-F_c$  Elektronendichtekarten und  $F_o-F_c$  Differenzdichtekarten manuell korrigierte Modell durch Angleichung der Strukturfaktoramplituden des Modells ( $F_{calc}$ ) an die experimentell bestimmten Strukturfaktoramplituden ( $F_{obs}$ ) verfeinert (Refmac5). Während der Verfeinerung wurden die geometrischen und stereochemischen Standardwerte von Engh und Huber als Beschränkung

vorgegeben (Engh, 1991) und die atomaren Besetzungszahlen auf nicht kleiner als eins beschränkt. Lösungsmittel-exponierte Seitenketten, denen keine Elektronendichte zugeordnet werden konnte, wurden gelöscht. 397 geordnete Wasseratome wurden als periphere Peaks in Differenzdichtekarten identifiziert. In der Ramachandran Auftragung der  $\psi/\phi$  Winkelverteilung in der Hauptkette liegen 476 und damit 90% der Diederwinkel in den energetisch günstigsten Kernregionen der Sekundärstrukturelemente  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und der linksgängigen  $\alpha$ -Helix (Abb. 21, most favored regions, rot unterlegt).



**Abb. 21: Ramachandran-Diagramm der  $\psi/\phi$  Winkelverteilung in der Hauptkette des SeMet-Modells.** Bis auf die Reste Arg266 (Molekül A) und Arg292 (Molekül B) liegen alle Diederwinkel in den energetisch begünstigten Regionen.

51 Diederwinkel (9,6%) liegen in zusätzlich erlaubten Regionen (*additionally allowed regions*, gelb unterlegt). Nur zwei Diederwinkel (0,4%) von Arg292 (B) und Arg266 (A) liegen als Ausreisser in den grosszügig erlaubten Regionen (*generously allowed regions*, apricot unterlegt), verbotene Winkelkonformationen kommen nicht vor.



### **Natives Ta0583**

Die Struktur von nativem Ta0583 in der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  wurde durch molekularen Ersatz mit der SeMet-Ta0583 Struktur als Suchmodell gelöst (Molrep). Bei gegebener Qualität und Auflösung des Datensatzes von 1,9 Å wurde das Modell fast vollständig automatisch von Arp/wArp gebaut. Die Interpretation der Elektronendichte durch Arp/wArp basiert einem sogenannten *Hybrid-Modell*, einer Kombination aus einem konventionellen Proteinmodell und einem Modell, bei dem der Elektronendichte freie Atome eines einheitlichen Typus zugeordnet werden. Innerhalb der freien Atome werden Proteinmuster erkannt, ein Peptid-Modell erstellt und automatisch nach den stereochemischen und geometrischen Vorgaben eines konventionellen Proteinmodells in die Elektronendichte platziert und verfeinert. Durch diese Anwendung konnte der durch den molekularen Ersatz immer auftretende systematische Modellfehler (*model bias*) reduziert werden. Fehlende Teile der Struktur wurden bei interpretierbarer Elektronendichte mit dem Molecular Modelling Programm O (Jones et al., 1991) interaktiv manuell ergänzt. Das Modell wurde wie das bereits beschriebene SeMet-Modell in mehreren Zyklen mit Refmac5 verfeinert. Das finale Modell enthält 255 geordnete Wassermoleküle und ein Glycerinmolekül, welches wahrscheinlich aufgrund der niedrigeren Auflösung des SeMet Datensatzes nicht eindeutig interpretierbar als geordnetes Glycerinmolekül in der Differenzdichte der SeMet-Struktur erschien.

### **SeMet ADP Struktur**

Bei einer Auflösung von 2,9 Å konnten nur vier der zwölf Schweratomlagen eindeutig in der asymmetrischen Einheit lokalisiert werden. Aufgrund der niedrigen Auflösung und der schlecht definierten Schweratompositionen war die mit den experimentell bestimmten Phasen berechnete Elektronendichte für die Strukturlösung nicht ausreichend. Nach molekularem Ersatz (MR) mit der SeMet-Ta0583 apo-Struktur als Suchmodell in Molrep wurde eine Lösung mit klar abgegrenztem Korrelationskoeffizienten gefunden. Die R-Faktoren der Lösung waren jedoch sehr hoch ( $R_{\text{work}}=0,459$  und  $R_{\text{free}}=0,487$ ). In der  $F_o-F_c$ -Differenzdichtekarte war die Elektronendichte des gebundenen ADP-Moleküls nach dem molekularem Ersatz deutlich erkennbar. Durch Kombination der MR-Phasen mit den experimentell bestimmten Phasen aus den Schweratomlagen und anschließende Gewichtung nach dem Sigma-A Kriterium konnte die Elektronendichte leicht verbessert werden.

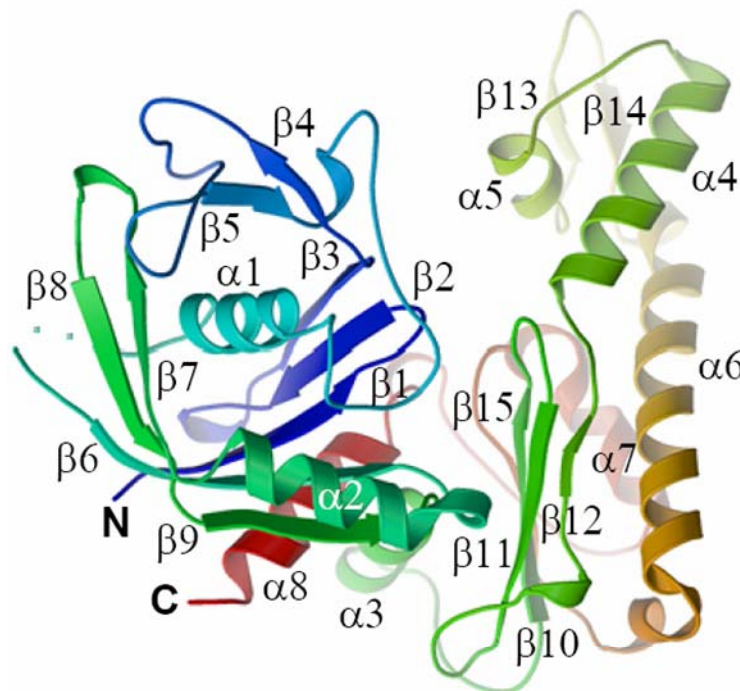
In mehreren Zyklen von Starrkörper („*Rigid Body*“)-Verfeinerungen mit anschliessend manuellem Modellbau wurden die R-Faktoren gesenkt (Refmac, O). Der systematische Modellfehler (*Model Bias*) wurde durch wiederholte Energieminimierung des Modells, kombiniert mit Verfeinerungen mit dem Algorithmus des „*simulated annealing*“ in CNS (Brunger et al., 1998) reduziert. Dieser Algorithmus zielt auf das Erreichen eines globalen Energieminimums ab. Dabei wird das Proteinmodell in freie Atome zerlegt, die durch Simulation einer Erhitzung auf 5000 K thermische Beweglichkeit innerhalb der Elektronendichte erhalten. Während der anschliessenden sehr langsamen Abkühlung mit zyklischen Energieminimierungen ordnen sich die freien Atome so an, dass sie einen Zustand möglichst niedriger Energie einnehmen (thermisches Gleichgewicht). Das Modell wurde nach der Dichtemodifizierung und dem Berechnen mehrerer „*omit maps*“ (CNS), bei denen jeweils bis zu 10% des Modells im Bereich der Subdomänen entfernt wurden, in Kombination mit „*simulated annealing*“ (*annealed omit maps*), interaktiv weiter verbessert. Die Differenzelektronendichte passt zur Konformation des ADP-Moleküls in der Komplexstruktur von ParM und ADP überein (van den Ent et al., 2002). Daher wurde das ADP-Molekül in der Konformation des ParM-gebundenen Nukleotids in den Koordinatensatz übernommen, energieminiert und verfeinert. Die finalen R-Faktoren der ADP Struktur betragen  $R_{\text{work}}=0,283$  und  $R_{\text{free}}=0,359$ .

### **Kristallstruktur von Ta0583**

Im Molekül B der SeMet-Struktur ist das gesamte Peptidrückgrat mit der Ausnahme der Reste Nr. 95 und 96 geordnet. In Molekül A sind die Reste 94 – 98 fehlgeordnet. Das Modell der nativen Struktur beinhaltet die Reste 1 – 37, 42 – 95 und 99 – 326. Selenomethionin-derivatisiertes Ta0583 und unmarkiertes Ta0583 liegen im Kristall in nahezu identischen Konformationen vor; die Quadratwurzelabweichung (r.m.s.d.) der  $C_{\alpha}$ -Atome in den Kristallstrukturen liegen zwischen 0,51 Å und 0,95 Å. Da sich die Strukturen nur unwesentlich unterscheiden, wird im Folgenden die Se-Met Struktur vollständigstes Modell vorgestellt.

Ta0583 ist ein globuläres, fast herzförmiges  $\alpha/\beta$  Protein mit molekularen Dimensionen von etwa 60 Å x 55 Å x 30 Å (Abb. 22). Die Sekundärstrukturelemente umfassen acht  $\alpha$ -Helices und fünfzehn  $\beta$ -Stränge. Ta0583 besteht aus zwei

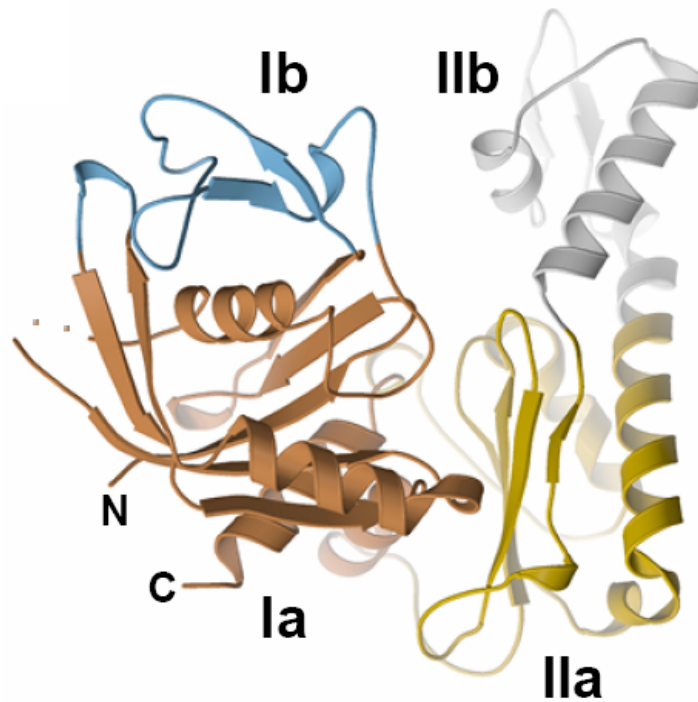
strukturell homologen, aktin-artigen Domänen und gehört der Aktin/Hsp70 Protein Superfamilie an, die durch die Aktin/Hsp70 Kernstruktur mit jeweils einem viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt, welches von drei  $\alpha$ -Helices flankiert ist, charakterisiert ist. Die beiden Domänen I und II lassen sich nach der Konvention für Aktin in jeweils zwei Subdomänen a und b unterteilen (Abb. 23). Die Subdomäne I b ist in den Aktinhomologen nach dem äusseren  $\beta$ -Strang  $\beta 3$  der Aktin/Hsp70 Kernstruktur eingefügt und wird andererseits von Helix  $\alpha 1$  begrenzt. Die Subdomäne I b umfasst in Ta0583 zwei antiparallele  $\beta$ -Stränge  $\beta 4$  und  $\beta 5$  als Sekundärstrukturelemente.



**Abb. 22: Kristallstruktur von Ta0583.** Der Verlauf der  $C_{\alpha}$ -Kette ist in Ribbons und in Regenbogenfärbung von blau (N-Terminus) nach rot (C-Terminus) dargestellt. Ta0583 ist ein globuläres  $\alpha/\beta$  Protein mit Dimensionen von etwa 60 Å x 55 Å x 30 Å.

In ähnlicher Anordnung ist in der Subdomäne I a eine  $\beta$ -Haarnadelschleife mit den Sekundärstrukturelementen  $\beta 7$  und  $\beta 8$  zwischen Helix  $\alpha 2$  und  $\beta 9$  eingesetzt. Die beiden  $\beta$ -Haarnadelschleifen aus Subdomänen I a und I b umfassen gemeinsam mit dem basalen  $\beta$ -Faltblatt des Aktin/Hsp70 Kernelements die Helix  $\alpha 1$ , welche als zentrales Element der Domäne I innerhalb einer irregulären  $\beta$ -Fass Struktur liegt. Subdomäne II b liegt der Subdomäne I b gegenüber. Analog zu Subdomäne I b

befindet sich die kleinere Subdomäne II b zwischen dem dritten äusseren  $\beta$ -Strang  $\beta_{12}$  der Kernstruktur und  $\alpha_6$ .



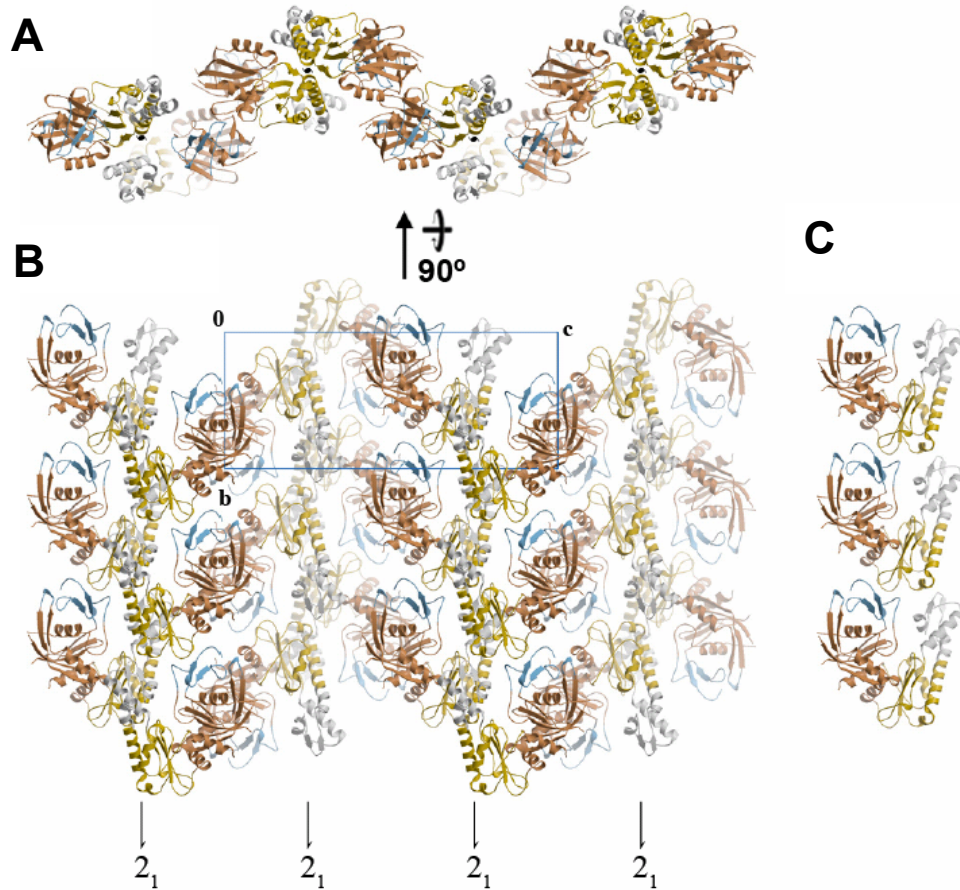
**Abb. 23: Domänenstruktur von Ta0583.** Ta0583 besteht aus zwei aktin-artigen Domänen und ist Mitglied der Aktin/Hsp70 Protein Superfamilie. Die vier Subdomänen sind in braun, gelb, blau und grau dargestellt. Die Subdomäneneinteilung wurde nach der Aktin-Nomenklatur vorgenommen.

Die klar abgegrenzte, globuläre Struktur der Subdomäne II b (grau) steht im Gegensatz zur weniger abgegrenzten Subdomäne I b (blau), die als Teil des irregulären  $\beta$ -Barrels der Domäne I eher ein integrales Strukturelement der Domäne I als eine eigene Subdomäne darstellt. Die Subdomäne II b wird von einer kompakten, durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisierten Anordnung von drei  $\alpha$ -Helices und einer flankierenden  $\beta$ -Haarnadelschleife gebildet. Die Helix  $\alpha_6$  ist Teil beider Subdomänen a und b in der Domäne II und erstreckt sich fast über die gesamte Länge des Monomers. Helix  $\alpha_6$  bildet den Anschluss der Subdomäne II b an die  $\beta$ -Faltblatt Aktin/Hsp70 Kernstruktur der Domäne II. Die Nukleotidbindungsstelle befindet sich am Boden der Spalte zwischen den beiden Domänen und wird von

Aminosäureresten beider Domänen gebildet. N- und C-Terminus sind benachbart und beide Teil der Subdomäne I a.

### ***Kristallpackung von SeMet Ta0583***

In den  $P2_12_12_1$  Kristallen sind die Ta0583-Monomere entlang der kristallographischen b-Achse in Reihen orientiert. Die b-Achse ist auch die bevorzugte Wachstumsrichtung der Nadelkristalle. Abb. 24 b zeigt eine Seitenansicht der linearen Anordnung der Monomere in der b/c-Ebene der Einheitszelle. Die lineare Anordnung der Monomere parallel zur kristallographischen b-Achse könnte eine Protofilament-Struktur darstellen. Jeweils zwei einander zugewandte, einsträngige Protofilamente bilden ein zweisträngiges Filament, das entlang der zweizähligen Schraubenachse läuft (Abb. 24a, Abb. 24b). Abb. 18c zeigt ein aus der b/c-Ebene extrahiertes, einsträngiges Protofilament. In dieser Orientierung kontaktieren Aminosäurereste der unteren Subdomänen I a und II a des einen Monomers die Seitenketten der im nächsten Monomer oberen Subdomänen I b und II b. Eine protofilament-ähnliche Anordnung von Monomeren existiert auch in den  $P2_1$  Kristallen der SeMet-Form. Das einsträngige Protofilament wird durch 47 der insgesamt 112 zwischen asymmetrischen Einheiten bestehenden atomaren Kristallkontakte stabilisiert. Die Kontaktflächen der Monomere im möglichen Protofilament betragen 967 Å von insgesamt 3214 Å der durch Kristallkontakte verborgenen Oberfläche. Das zweisträngige Protofilament wird durch laterale Kontakte der Monomere in zwei einander gleichseitig zugewandten, parallel verlaufende Protofilamenten gebildet.

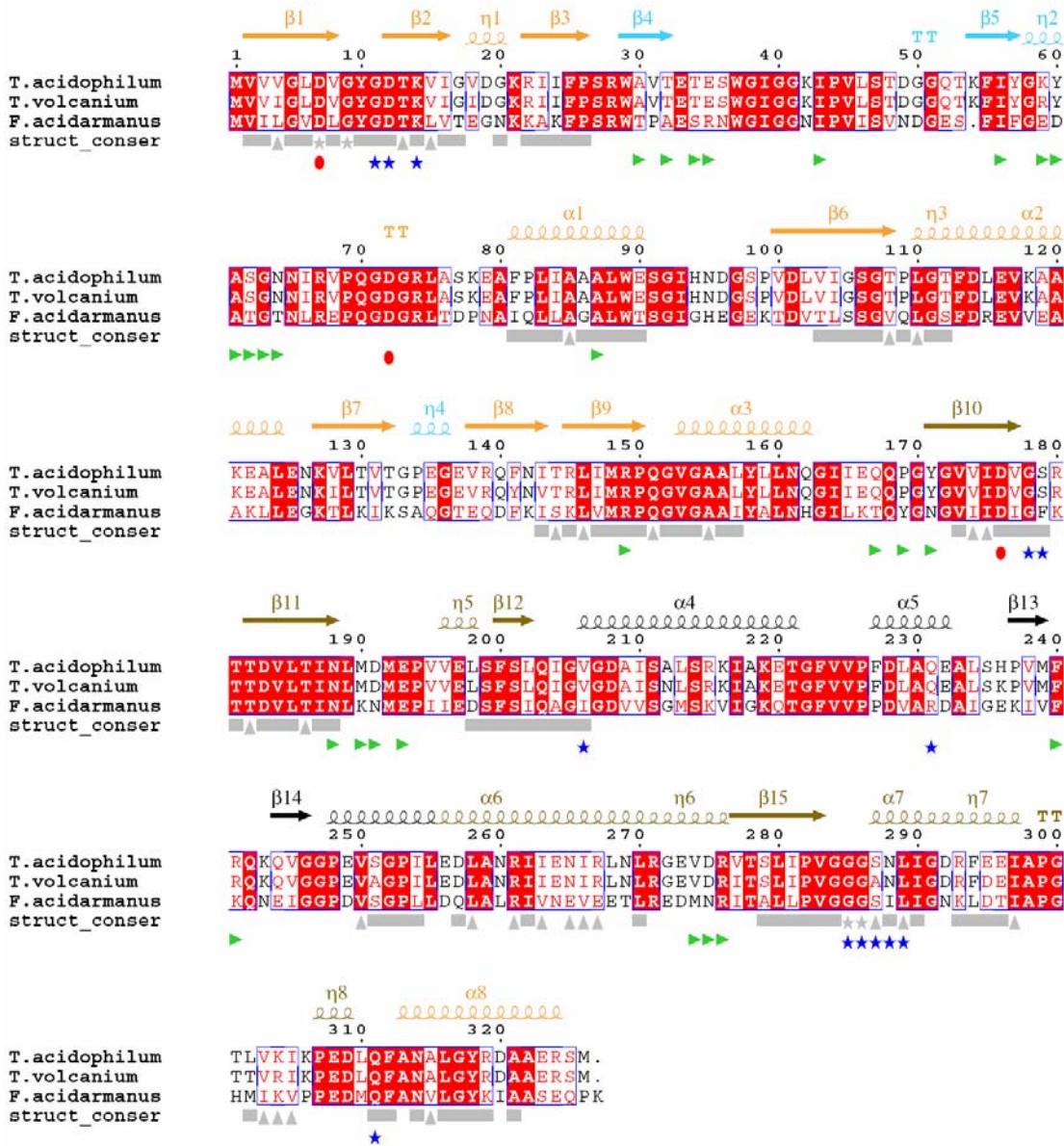


**Abb. 24: Kristallpackung und Protofilamentanordnung in den  $P2_12_12_1$  Kristallen.** Die Einheitszelle und die Schraubenachsen sind markiert. (A) Die Aufsicht ist eine Darstellung der Kristallpackung in der  $a/c$ -Ebene. (B) Seitenansicht der  $b/c$ -Ebene. Ein potentielles Protofilament erstreckt sich entlang der kristallographischen  $b$ -Achse. Jeweils zwei einander zugewandte Protofilamente bilden ein zweisträngiges Filament, das parallel der zweizähligen Schraubenachse läuft. (C) Extraktion eines einsträngigen Ta0583-Protofilaments aus der  $b/c$ -Ebene.

### **Sequenzkonservierung innerhalb der Ordnung Thermoplasmatales**

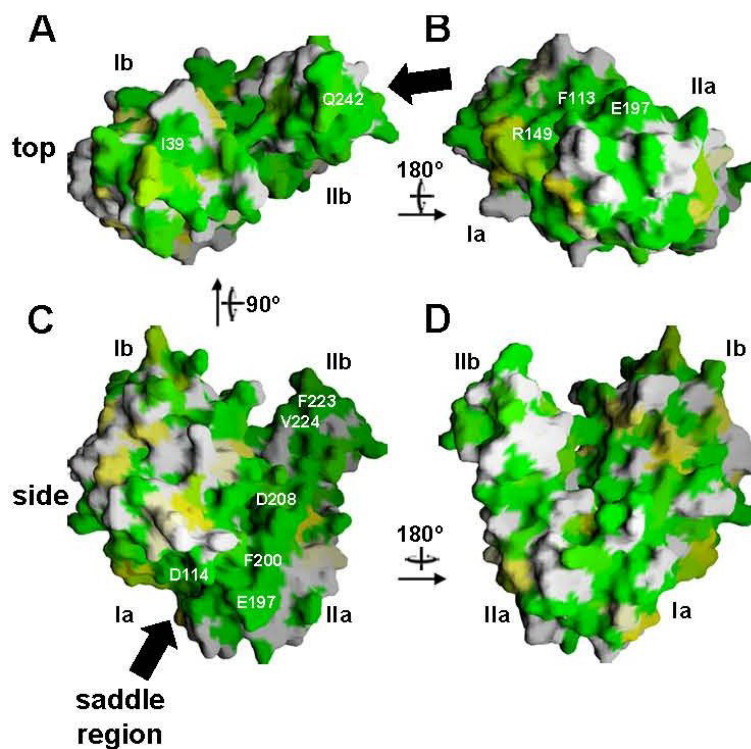
Zwischen Aktin (*Homo sapiens*), MreB (*E. coli*), ParM (*E. coli*) und dem in dieser Arbeit charakterisierten Ta0583 (*T. acidophilum*) besteht nur etwa 12% Sequenzidentität in binären Sequenzalignments. Innerhalb der genomischen Sequenzen aus der Ordnung Thermoplasmatales mit Ausnahme der Spezies *Picrophilus torridus*, der ein Ta0583-Homolog gänzlich fehlt, ist Ta0583 mit einer Sequenzidentität von etwa 50% und Sequenzähnlichkeit von etwa 85% jedoch hochkonserviert. Die Ausnahme bildet die Spezies *Picrophilus torridus* DSM 9790, deren Genomsequenz (Futterer et al., 2004) keinen codierenden Leserahmen für ein Ta0583 Homolog enthält. Abb. 25 zeigt den Sequenzvergleich von Ta0583 aus

*Thermoplasma acidophilum* mit seinen Homologen in *Thermoplasma volcanicum* und *Ferroplasma acidarmanus*. Im Bereich der Sekundärstrukturelemente sind die Sequenzen weitgehend konserviert.



**Abb. 25: Sequenzkonservierung von Ta0583.** Innerhalb der Ordnung der Thermoplasmatales ist die Sequenz von Ta0583 mit etwa 50% Sequenzidentität und etwa 85% Sequenzähnlichkeit konserviert. Reste, die im Kristall an Protofilamentkontakten beteiligt sind, sind mit grünen Pfeilen markiert. An der Mg<sup>2+</sup>-Koordinierung und an der Nukleotid-Bindung beteiligte Reste sind mit einem roten Punkt (Mg<sup>2+</sup>), bzw. einem blauen Stern (ADP) markiert und grösstenteils konserviert. Die grauen Balken markieren strukturell ähnliche Bereiche innerhalb Aktin und der Aktin homologen Ta0583, MreB und ParM. Die Region zwischen Resten 33 - 48 ist innerhalb der Thermoplasmatales hochkonserviert und ist möglicherweise von funktioneller Bedeutung.

Das viersträngige  $\beta$ -Faltblatt der Aktin/Hsp70 Kernstruktur ist mit  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  und  $\beta 6$  in der Domäne I und  $\beta 10$ ,  $\beta 11$ ,  $\beta 12$ ,  $\beta 15$  in der Domäne II innerhalb der Thermoplasmatales konserviert. Ein hochkonservierter Bereiche ohne Sekundärstruktur in Ta0583 befindet sich in der Schleifenregion zwischen Helix  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  in Subdomäne II b. Dort bilden die konservierten, hydrophoben Reste Phe223, Val224 und Val225 eine hydrophobe Tasche, welche durch Interaktion mit der  $\beta$ -Haarnadel der Subdomäne II b offenbar für die strukturelle Integrität der Subdomäne II b erforderlich ist (siehe auch Abb. 26). Ein weiteres hochkonserviertes Element mit strukturstabilisierender Funktion ist die zentrale Helix  $\alpha 1$ , welche als ein die Domäne I stabilisierendes Strukturelement in allen Aktinhomologen vorhanden ist. Die Reste 94 – 96, welche eine exponierte Schleife zwischen Helix  $\alpha 1$  und der  $\beta$ -Haarnadelschleife der Subdomäne I a bilden, sind innerhalb der Ta0583-Homologen der Thermoplasmatales nicht konserviert.



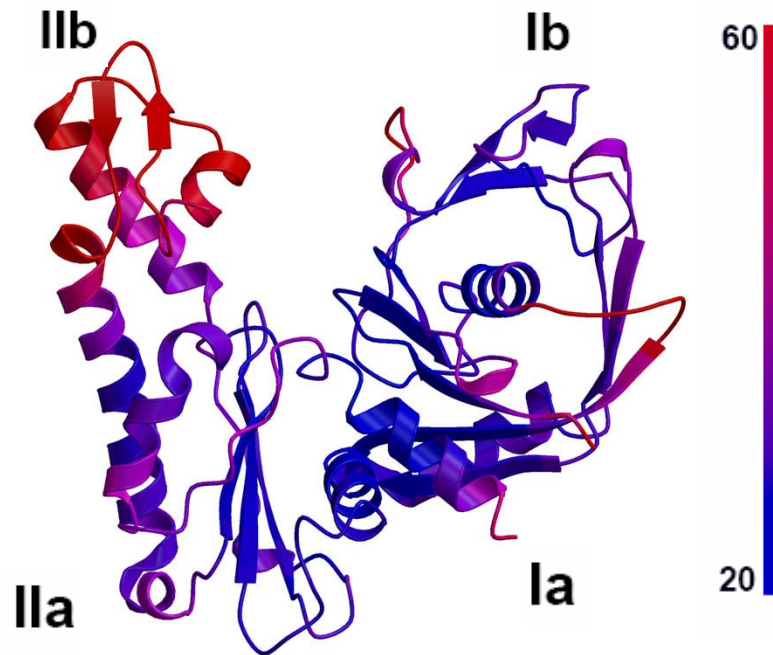
**Abb. 26: Oberflächenkonservierung von Ta0583-Homologen der Thermoplasmatales.** Die Konservierung ist in einer Farbskalierung von grün (identisch) nach weiss (nicht konserviert) dargestellt. Gelb colorierte Reste sind zu 50% konserviert. Hochkonservierte Bereiche befinden sich in Subdomäne I b, II b und in der Sattelregion zwischen Subdomäne I a und II a (Pfeil) und stellen potentielle Protein-Protein Interaktionsseiten dar.



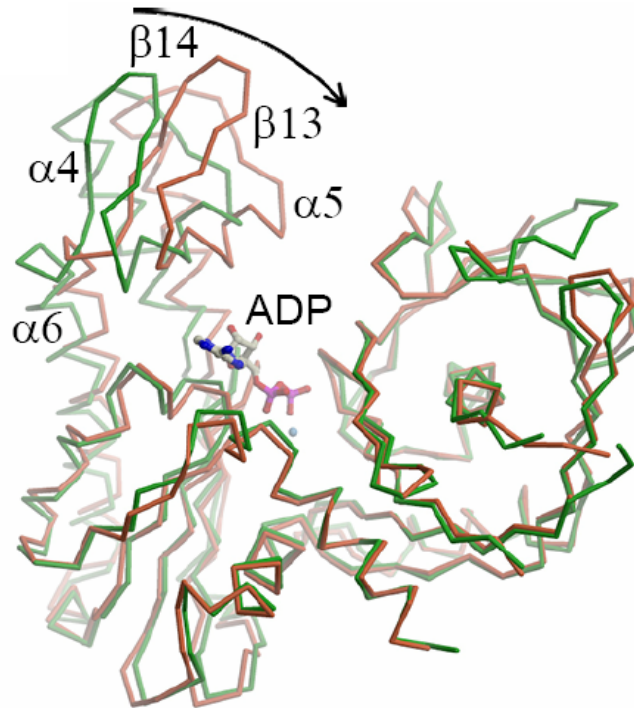
Dieser Bereich war in allen Kristallformen mehr oder weniger stark fehlgeordnet. Die nicht konservierte und wenig strukturierte Schleife dient offenbar nur als Verbindungselement und spielt funktionell und strukturell eine untergeordnete Rolle. Innerhalb der Familie der Thermoplasmatales, aber auch in Aktin, MreB und ParM sind die an der  $Mg^{2+}$ - und an der Nukleotidbindung beteiligten Reste konserviert. Aminosäurereste, die an potentiellen Protofilamentkontakten im Kristall beteiligt sind, sind innerhalb der Thermoplasmatales nicht, oder nur teilweise konserviert. Ein hochkonservierter Bereich ohne Sekundärstruktur ist möglicherweise von funktioneller Bedeutung und befindet sich zwischen den Resten 33 – 48. Dieser Bereich ist Teil einer  $\beta$ -Haarnadel in der Subdomäne I a und befindet sich zwischen den Sekundärstrukturelementen  $\beta_4$  und  $\beta_5$ . Die Analyse der Protofilamentkontakte im Kristall zeigt, dass sich immerhin sechs der 25 Aminosäurereste, die an Protofilamentkontakten im Kristall beteiligt sein könnten, in der Nähe dieser Region in  $\beta_4$  und  $\beta_5$  befinden. Abb. 26 zeigt die Oberflächenkonservierung von Ta0583 innerhalb der Ta0583-Homologen der Thermoplasmatales. Zur Darstellung wurde der Ähnlichkeitskennziffer (*similarity score*) aus dem Alignment in Abb. 25 auf die van-der-Waals Oberfläche geplottet. Hochkonservierte Oberflächenbereiche stellen potentielle Protein-Protein-Interaktionsseiten dar und befinden sich in Subdomäne I b, II b und in der Sattelregion zwischen den Subdomänen I a und II a.

### ***Der ADP-Komplex von Ta0583***

Der kristallographische B-Faktor modelliert die thermische Bewegung von Atomen in einer Kristallstruktur und kann als Maß für die Flexibilität einer Region des Strukturmodells angesehen werden. Der B-Faktor ist umso niedriger, je stärker das Atom fixiert ist. Zusammenhängende Bereiche in einer Struktur mit gleichbleibend hohen B-Faktoren können flexible Bereiche anzeigen, die keine stabile Konformation bilden oder kaum Kontakte zur Umgebung im Kristall aufweisen. Abb. 27 zeigt die  $C_\alpha$ -Hauptkette von nukleotidfreiem Ta0583 in Bänderdarstellung mit einer B-Faktor Farbkodierung von  $20 \text{ \AA}^3$  bis  $60 \text{ \AA}^3$ . Im Strukturmodell der nukleotidfreien Form von Ta0583 zeigt Subdomäne II b auffallend hohe B-Faktoren um  $50 \text{ \AA}^3$ . Dagegen weisen Domäne I und Subdomäne II a mittlere B-Faktoren um  $25 \text{ \AA}^3$  auf.

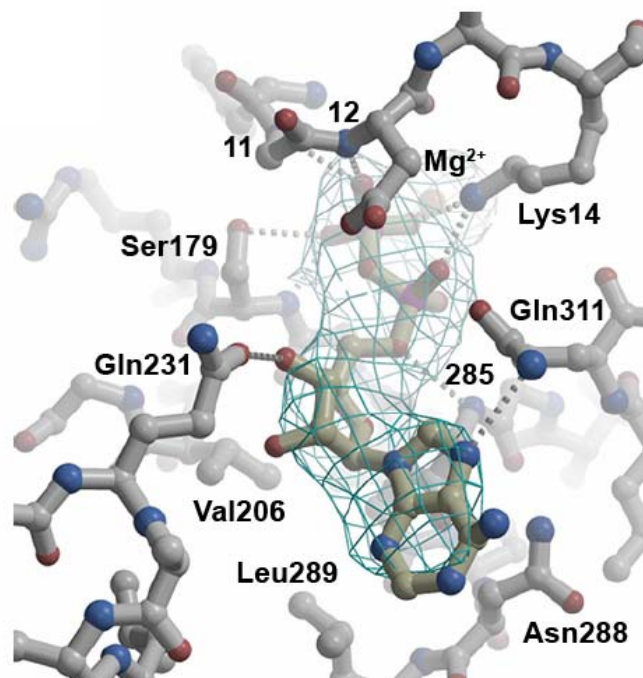


**Abb. 27: Struktur von nukleotidfreiem Ta0583 in B-Faktor Farbkodierung.** Die Subdomäne II b weist auffallend hohe B-Faktoren um  $50 \text{ \AA}^3$  auf. Der restliche Teil der Struktur besitzt mittlere B-Faktoren um  $25 \text{ \AA}^3$ . Die Farbkodierung wurde von von blau ( $20 \text{ \AA}^3$ ) nach rot ( $60 \text{ \AA}^3$ ) gewählt.



**Abb. 28: Konformationsänderungen im  $\text{Mg}^{2+}$ -ADP Komplex.** Die Abbildung zeigt eine Überlagerung der  $\text{C}_\alpha$ -Ketten der nukleotidfreien- (grün) und der ADP-gebundenen Form von Ta0583 (rot). Die ADP-Bindung induziert eine allgemeine Kompaktierung des Moleküls, bei der die Domäne II eine Starrkörperrotation von  $\sim 8^\circ$  erfährt und Helix  $\alpha 5$  an das ADP-Molekül annähert.

Es wurde angenommen, dass durch Nukleotidbindungs- oder hydrolyse induzierte Konformationsänderungen in Ta0583 unter anderem die Regionen mit hohen B-Faktoren betreffen. In der Tat zeigt die Überlagerung der Kristallstrukturen von nukleotidfreiem Ta0583 und dem ADP-Komplex, dass die Subdomäne II b eine Region in der Struktur ist, in der die durch die ADP-Bindung induzierten Konformationsänderungen die grösste Auswirkung haben (Abb. 28). Die Bindung von ADP führt zu einer allgemeinen Kompaktierung des Moleküls, bei der gesamte Domäne II eine Starrkörperrotation von etwa  $8^\circ$  einwärts vollzieht (Abb. 28). In der Struktur von ParM erfolgt eine Domänenrotation von etwa  $25^\circ$  (van den Ent et al., 2002). Die Spitze der  $\beta$ -Haarnadelschleife in der Subdomäne II b zwischen  $\beta 13$  und  $\beta 14$  bewegt sich mit einer Verschiebung von  $\sim 8$  Å am stärksten. Die Domänenrotation ermöglicht den Kontakt der Subdomäne II b mit dem Nukleotid unter Ausbildung einer Wasserstoffbrücke von Gln231 in Helix  $\alpha 5$  mit der 3'-Hydroxylgruppe der Riboseeinheit. Die Helix  $\alpha 5$  vollzieht dabei eine Bewegung von  $\sim 4$  Å. Die 5'-Diphosphoriboseeinheit von ADP wird von den Hauptkettenamiden der Reste 11, 12, 179, 285 und 286 erkannt.



**Abb. 29: Nukleotidbindungsseite des ADP Komplex.** Das ADP-Molekül und das  $Mg^{2+}$ -Ion sind in Ball-and-stick Darstellung gezeigt. Die  $F_o - F_c$  Differenzdichte des ADP-Moleküls ist bei  $2\sigma$  kontouriert. Das  $\beta$ -Phosphat wird durch drei Kontakte gehalten. Wichtige Kontakte sind angedeutet.

Die Reste Gly178 und Ser179 liegen die in der Schleife zwischen  $\beta$ 10 und  $\beta$ 11 des Aktin/Hsp70 Kernelements und stehen in Kontakt mit dem  $\beta$ -Phosphat des Nukleotids (Abb. 29). Das  $\beta$ -Phosphat der ADP-Moleküls wird von insgesamt drei starken Kontakten gehalten und könnte eine hohe Affinität für das Produkt erklären. Das für die Aktivität essentielle  $Mg^{2+}$ -Ion wird von den konservierten Resten Asp7, Asp72 und Asp176 koordiniert. Das Pyrophosphat wird von Lys14 und dem  $Mg^{2+}$ -Ion kontaktiert. Der Amidstickstoff des konservierten Gln311 bildet eine Wasserstoffbrücke zu dem N7-Stickstoff der Purinbase, die wiederum selbst in einer  $\pi$ -Stacking Interaktion mit der Amidgruppe von Asn288 ist. Die Interaktion von Gln311 und Asn288 mit der Purinbase erklärt die Selektivität von Ta0583 für Purin- über Pyrimidinnukleotide<sup>2</sup>. Als sterische Barriere ist Leu289 dem C2-Kohlenstoff der Pyrimidinringes benachbart und bedingt die Selektivität der NTPase für ATP über GTP.

---

<sup>2</sup> In *F. acidarmanus* ist Asn288 durch ein Isoleucin ersetzt.

## Diskussion Teil 1

### ***Ta0583 ist ein Aktinhomolog***

Zu den bekannten Vertretern der Aktin-Superfamilie gehören neben Aktin und den prokaryotischen Aktinhomologen MreB, ParM und FtsA auch funktionell nicht verwandte Proteine, wie etwa die Glycerolkinase und Hsp70. Mitglieder der Aktin-Superfamilie zeichnen sich durch das Vorkommen von zwei durch ein basales Gelenk verknüpften  $\alpha/\beta$  Domänen aus, die das charakteristische Aktin/Hsp70-Kernelement enthalten. Das Aktin/Hsp70-Kernelement besteht aus einem viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt, welches von drei  $\alpha$ -Helices flankiert ist (Kabsch and Holmes, 1995). Das in dieser Arbeit charakterisierte Protein Ta0583 ist ein herzförmiges  $\alpha/\beta$ -Protein, das aus zwei Domänen mit einer Topologie homolog zum Aktin/Hsp70-Kernelement besteht. Das Aktin/Hsp70-Kernelement bildet den Kern der Subdomänen 1 a und 2 a. Innerhalb des Aktin/Hsp70-Kernelements kann die  $C_{\alpha}$ -Hauptkette von Ta0583 über einen äquivalenten Bereich von etwa 210 Aminosäureresten mit Aktin, MreB und ParM überlagert werden. Die Standardabweichung für die  $C_{\alpha}$ -Positionen der Überlagerung beträgt  $\sim 1,8$  Å. Vergleichsweise können die  $C_{\alpha}$ -Ketten der ATPase Domäne von Hsc70 mit Aktin innerhalb von 241 äquivalenten Resten mit einer Standardabweichung für die  $C_{\alpha}$ -Positionen von  $\sim 2,3$  Å und die Hauptketten der Glycerolkinase mit Aktin innerhalb von 191 äquivalenten Resten noch mit einer Standardabweichung von  $\sim 2,8$  Å für die  $C_{\alpha}$ -Positionen zur Deckung gebracht werden (Kabsch and Holmes, 1995). Neben der strukturellen Ähnlichkeit zu Aktin besitzt Ta0583 auch ähnliche biochemische Eigenschaften. *In vitro* zeigt Ta0583  $Mg^{2+}$ -abhängige ATPase Aktivität und ATP ist wahrscheinlich das natürliche Substrat von Ta0583. ATP wird von Ta0583 mit ähnlichen maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten hydrolysiert, wie von MreB und Aktin (siehe Abschnitt 2). Die maximale Geschwindigkeit der ATP Hydrolyse  $V_{max}$  des Ta0583 Monomers beträgt  $1,045 \pm 0,062$  nmol/min/nmol und ist damit etwa eine Größenordnung höher als  $V_{max}$  von MreB-Filamenten aus *Thermotoga maritima* ( $0,1$  nmol/min/nmol  $\pm 0,01$ , (Esue et al., 2005), (Esue et al., 2006)) und  $V_{max}$  von F-Aktin aus Kaninchenmuskel ( $0,07$  bis  $0,3$  nmol/min/nmol, (Pollard and Weeds, 1984),

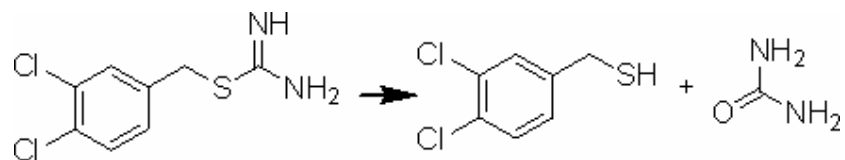
(Blanchoin and Pollard, 2002)). Beim Vergleich der Werte ist allerdings zu beachten, dass Ta0583 unter Assaybedingungen als Monomer vorliegt und die ATP Hydrolyse in den Filamenten von MreB und Aktin im Vergleich zum Monomer deutlich verlangsamt sein könnte. Im Gegensatz zu MreB (Esue et al., 2005) und Aktin (Pollard and Weeds, 1984) ist die ATPase Aktivität von Ta0583 offenbar nicht an die Bildung von Filamenten gekoppelt, da Ta0583 unter den getesteten Bedingungen als Monomer vorliegt. Ta0583-Filamente konnten *in vitro* nicht erzeugt werden. Die Polymerisierung von Ta0583 wurde bei verschiedenen Temperaturen und in Gegenwart der Nukleotide ATP, GTP und deren Diphosphaten, sowie mit den ATP- und GTP-Analoga ATP $\gamma$ S, AMPPNP, GMPCPP, ADP-AIF $_3$  getestet. Ta0583 benötigt möglicherweise einen ParR-ähnlichen Adapter- oder Nukleationsfaktor zur Bildung von Filamenten. Ein spezifisches Ta0583-bindendes Protein konnte jedoch in Ko-Immunitäzpräzipitationsexperimenten mit Zellextrakten von *T. acidophilum* nicht identifiziert werden. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass ein möglicher ParM-Nukleationsfaktor im Extrakt nur in einem sehr geringen Verhältnis zu Ta0583 steht, das zu dessen Identifizierung unter den experimentellen Bedingungen nicht ausreichend war.

### **Die Nukleotidbindungsstelle**

Die Nukleotidbindungsstelle der Mitglieder der Aktin/Hsp70-Superfamilie befindet sich in der Spalte zwischen den beiden Domänen und wird von Aminosäureresten beider Domänen gebildet. Obwohl innerhalb der Aktin homologen im Allgemeinen eine sehr geringe Sequenzidentität von nur etwa 12% besteht, sind einige an der Nukleotidbindung beteiligte Reste auf der Sequenzebene konserviert. Die strukturelle Ähnlichkeit der Nukleotidbindungsstellen im Besonderen von MreB und Ta0583 wurde *in vitro* durch den Effekt der S-Benzylisothioharnstoff Verbindung A22 nachgewiesen, die als MreB-spezifischer Inhibitor gilt. Die durch Mutationsstudien *in vivo* als MreB-spezifischer Inhibitor charakterisierte Verbindung (Gitai et al., 2005) zeigte *in vitro* einen signifikanten Effekt auf die ATPase-Aktivität von Ta0583. Die Abhängigkeit der ATPase-Geschwindigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors A22 ergab das Muster einer kompetitiven Inhibierung.

Der Inhibitor A22 bindet offenbar mit ähnlicher Affinität wie das natürliche Substrat an die Nukleotidbindungsstelle von Ta0583, da der  $K_M$ -Wert für ATP und die Inhibitionskonstante  $K_I$  für A22 ähnliche Werte aufweisen ( $K_M$  (ATP)  $289 \mu\text{M} \pm 48 \mu\text{M}$  und  $K_I$  (A22)  $204 \pm 35 \mu\text{M}$ ). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Nukleotidbindungsstellen innerhalb der Aktin/homologen und der Aktin/Hsp70-Superfamilie und dem nachgewiesenen *in vitro*-Effekt von A22 auf Ta0583 ist anzunehmen, dass A22 auch andere Proteine der Aktin/Hsp70-Superfamilie, beispielsweise Hsp70, inhibieren könnte. Möglicherweise sind aus diesem Grund nicht alle von Gitai et. al. beobachteten *in vivo*-Effekte von A22 ausschliesslich auf eine beeinträchtigte MreB-Funktion zurückzuführen. In anderer Weise könnte sich A22 als ein spezifischer, kompetitiver Inhibitor von Hsp70-Typ ATPasen als nützliches Werkzeug für die Analyse insbesondere der Hsp70-Interaktionen erweisen.

Ein *in vivo*-Effekt von A22 auf das Wachstum von *Thermoplasma acidophilum* Zellen konnte nicht beobachtet werden (Christine Kofler, Abt. Baumeister, pers. Mitteilung). Obwohl *Thermoplasma acidophilum* eine Zellwand fehlt und der Inhibitor daher die Zellmembran problemlos passieren können sollte, könnte die Löslichkeit von A22 im sauren Milieu des Mediums von etwa pH 2 stark reduziert und der Inhibitor möglicherweise schon im Medium ausgefallen sein. Darüberhinaus dürfte die Verbindung am Schwefelatom einer Hydrolyse ausgesetzt sein.

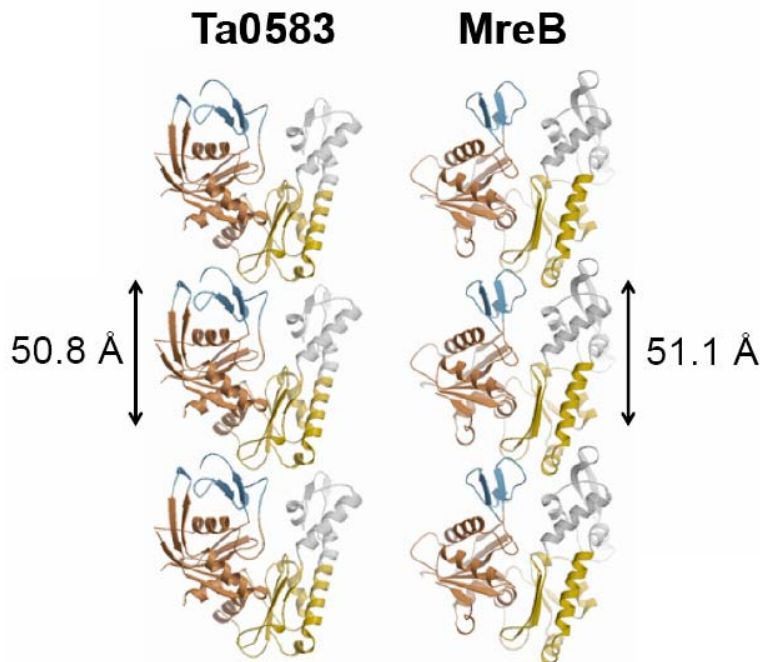


**Abb. 30: Hydrolyse von A22.** Im sauren Milieu des Kulturmediums könnte der Inhibitor schnell zu den unwirksamen Produkten 2,3-(Dichlorophenyl)-Methanethiol und Harnstoff hydrolysieren.

Das äusserst geringe Expressionsniveau von nur etwa 0,04% am Gesamtprotein aus in Exponentialphase wachsenden *T. acidophilum* Zellen deutet auf eine spezialisierte Funktion für Ta0583. Es ist möglich, dass Ta0583 nur unter speziellen Wachstums- oder Umweltbedingungen exprimiert wird, die unter den etablierten Kulturbedingungen nicht gegeben waren.

### **Angenommene Ta0583-Protofilamentstruktur**

In der monoklinen und in der orthorhombischen Kristallform von Ta0583 bilden lange Reihen von Monomeren entlang der kristallographischen b-Achse Filamente, die den in den Kristallen von MreB gefundenen Filamenten ähnlich sind. Die b-Achse ist auch die bevorzugte Wachstumsrichtung der nadelförmigen Kristalle. Abb. 31 zeigt ein aus der Kristallpackung entlang der b-Achse extrahiertes einsträngiges Ta0583-Protofilament im Vergleich mit einem MreB-Protofilament.



**Abb. 31: Mögliche eindimensionale Protofilamente von Ta0583 im Vergleich mit MreB-Filamenten im Kristall.** Die Subdomänenkontakte und der longitudinale Abstand in den Ta0583- und MreB-Filamenten ist ähnlich. Ta0583 liegt in der nukleotidfreien Form vor, das im MreB-Filament gebundene AMPPNP-Molekül ist nicht gezeigt.

In den Protofilamenten von Ta0583 beträgt der längslaufende Abstand der Monomere 50,8 Å. Die MreB Protofilamente im Kristall haben einen ähnlichen longitudinalen Abstand von 51,1 Å. Der gleiche longitudinale Abstand wurde aber auch in den *in vitro* erzeugten, doppelsträngigen MreB Filamenten gefunden wurde (van den Ent et al., 2001b). Es ist daher denkbar, dass die filamentähnliche Anordnung der Ta0583 Monomere im Kristall ebenfalls einer Protofilamentstruktur



entspricht. Im Vergleich beträgt der longitudinale Abstand der Monomere im Modell von F-Aktin 55 Å (Holmes et al., 1990) und im Filamentmodell von ParM von 49 Å (van den Ent et al., 2002). Allerdings bestimmen primär die ohnehin ähnlichen molekularen Dimensionen der Aktinhomologen den längslaufenden Abstand im Protofilament. Das einsträngige Ta0583 Protofilament wird durch 47 der insgesamt 112 in der asymmetrischen Einheit bestehenden atomaren Kristallkontakte stabilisiert. Die Kontaktflächen der Monomere im möglichen Protofilament betragen 967 Å aus insgesamt 3214 Å der durch Kristallkontakte verborgenen Oberfläche. In den Protofilamenten von MreB beträgt die Kontaktfläche der Monomere 1709 Å und ist damit etwa doppelt so gross wie in den Protofilamenten von Ta0583 (van den Ent et al., 2001b). Aminosäurereste, die an den Kontakten in den Protofilamenten von MreB und Ta0583 beteiligt sind, sind überraschenderweise weder in den Sequenzen von MreB, noch in Ta0583 konserviert (van den Ent et al., 2001b).

Die Ta0583 Protofilamente bilden der b/c Richtung im Kristall entlang der Schraubenachse ein aus zwei parallel verlaufenden Protofilamenten bestehendes, zweisträngiges Filament. Eine zweite Schraubenachse generiert dazu antiparallele Doppelfilamente. Das antiparallele Ta0583 Doppelfilament wird durch 40 Kontakte stabilisiert, während das parallele Doppelfilament durch 30 Kontakte stabilisiert wird. Im Gegensatz zu den doppelsträngigen Filamenten von F-Aktin und ParM, die helikal um die eigene Achse verdrillt sind, sind die Filamente von MreB und die angenommenen Ta0583-Filamente gerade und unverdrillt. Eine Windung eines ParM-Filaments wird von 12,5 Monomere gebildet. Das helikale Filament hat eine Ganghöhe von 300 Å (van den Ent et al., 2002). Im Filamentmodell von F-Aktin ist die Ganghöhe der helikalen F-Aktin Filamente variabel, im Durchschnitt bilden dreizehn Monomere eine Windung in den F-Aktin Filamenten mit einer Ganghöhe von 360 Å (Galkin et al., 2002)<sup>3</sup>.

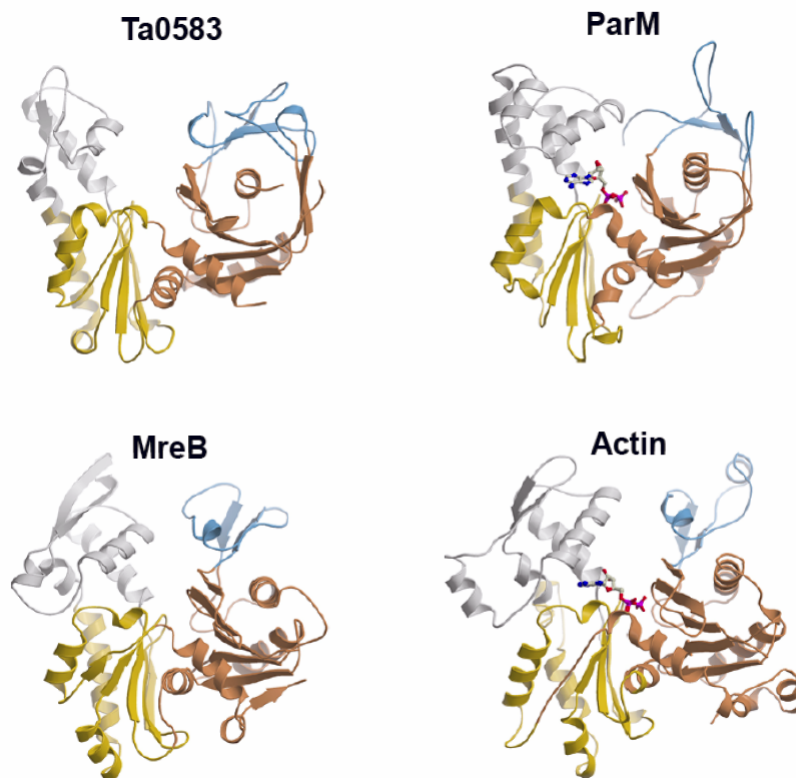
### ***Vergleich der Struktur von Ta0583 mit Aktin, MreB und ParM***

Aktin und die Aktinhomologen MreB, ParM und Ta0583 weisen ähnliche molekulare Dimensionen und eine gemeinsame Kernarchitektur auf. Die Domänenstruktur von

---

<sup>3</sup> Die Angaben entsprechen dem Mittelwert aus unkomplexiertem Muskel-Aktin und Aktin aus *S. cerevisiae*

Ta0583, Aktin und den bekannten Aktinhomologen MreB und ParM ist in Abb. 32 dargestellt. In allen Strukturen bildet das charakteristische Aktin/Hsp70-Kernelement den Kern der grösseren Subdomänen 1 a und 2 a. Strukturelle Unterschiede zwischen den Aktinhomologen bestehen hauptsächlich in den kleineren Subdomänen 1 b und 2 b. Die Struktur von Ta0583 ist eine Kombination struktureller Eigenschaften von Aktin, MreB und ParM. Im Allgemeinen lässt sich jedoch sagen, dass Ta0583 auf struktureller Ebene eine leicht grössere Ähnlichkeit zum Plasmidsegregationsprotein ParM aufweist. Das Nukleotid wird von beiden Proteinen in ähnlicher Konformation gebunden, die sich von der Aktin-gebundenen Konformation unterscheidet. Die Domäne 1 ist in den Strukturen von ParM und in Ta0583 insgesamt von kompakter und globulärer Gestalt, in Aktin und MreB hingegen offen.



**Abb. 32: Vergleich der Strukturen von Ta0583, Aktin, MreB und ParM.** Die Struktur von Ta0583 kombiniert strukturelle Eigenschaften von Aktin, MreB und ParM. Die Domäne 1 ist in ParM und Ta0583 von globulärer Gestalt. Ta0583 ist strukturell leicht ähnlicher zu ParM, als zu MreB und Aktin.

Das in ParM und Ta0583 die zentrale Helix  $\alpha 1$  umgebende irreguläre  $\beta$ -Fass fehlt in den Strukturen von MreB und Aktin und etwa auch in der Struktur der ATPase Domäne von Hsc70 (Sondermann et al., 2001). Die kompakte Gestalt der Domäne 1 ist daher offenbar eine exklusive Gemeinsamkeit von ParM und Ta0583 und könnte eine funktionelle Verwandtschaft andeuten. Die DNase1-Bindungsschleife in der Aktin Subdomäne 1 b, die nicht nur die Interaktion von Aktin mit DNase1, sondern auch F-Aktin Filamentkontakte vermittelt, fehlt in allen drei Aktin homologen. Die Subdomäne 1 b in der Struktur von ParM enthält eine exponierte hydrophobe Schleife, die an Protofilamentkontakten beteiligt ist (van den Ent et al., 2002). Dieser Bereich liegt in der Sequenz von Ta0583 innerhalb eines hochkonservierten Bereiches (siehe auch Abschnitt 2). In der Kristallstruktur des ADP-gebundenen Form von Ta0583 ist diese Schleife jedoch ungeordnet. In ParM liegt die hydrophobe Schleife in den Kristallen der nukleotidfreien- und in der ADP-gebundenen Form von ParM aber in fast identischer Konformation vor und scheint während der ATP Hydrolyse keine Konformationsänderungen zu erfahren (van den Ent et al., 2002). In der gleichen Arbeit wurde anhand von Mutationsstudien *in vitro* aber auch gezeigt, dass die ParM-Filamentbildung von der ATP-Hydrolyse unabhängig ist. In dieser Arbeit wurden Protofilamentanordnungen von Ta0583 sowohl in den Kristallen der nukleotidfreien-, als auch in der ADP-gebundenen Form gefunden.

In der Subdomäne 2 b kommt in Aktin, MreB und Ta0583 eine gemeinsame  $\beta$ -Haarnadelschleife vor, die in den Kristallen von MreB und ebenfalls im Filamentmodell von F-Aktin an Protofilamentkontakten beteiligt ist (van den Ent et al., 2002). In ParM ist die  $\beta$ -Haarnadelschleife in Subdomäne 2 b durch eine kurze  $\alpha$ -Helix ersetzt. Es ist unklar, ob die kurze  $\alpha$ -Helix ebenfalls an Protofilamentkontakten in ParM beteiligt ist. In der Struktur von Aktin ist in der Subdomäne 2 b eine kurze, hydrophobe  $\alpha$ -Helix zwischen A230 und F223 zwischen die das Nukleotid kontaktierende Helix an die  $\beta$ -Haarnadel eingesetzt. Es wurde anhand des Aktinfilamentmodells vorgeschlagen, dass diese hydrophobe  $\alpha$ -Helix an lateralen Kontakten innerhalb der helikalen, doppelsträngigen F-Aktinfilamente beteiligt sein soll (Holmes et al., 1990). In allen anderen bisher strukturell charakterisierten Aktin homologen und insbesondere auch in ParM, das ebenfalls doppelsträngige, helikal verdrillte Filamente bildet (van den Ent et al., 2002), fehlt dieses Element. Möglicherweise begründet diese hydrophobe Helix, die ausschliesslich in der

Struktur von Aktin vorkommt, die strikt obligate Chaperonin-Abhängigkeit der Aktin-Faltung. Die obligat TRiC-abhängige Faltung von Aktin bildet innerhalb der Aktinohomologen eine Ausnahme, da die Faltung der Aktinohomologen MreB, ParM und Ta0583 spontan verläuft<sup>4</sup>. Die Domänenarchitektur von Aktin und der Fold des Aktin/Hsp70 Kernelements ist für eine spontane Faltung offenbar nicht problematisch. Die Chaperonin-Abhängigkeit der Aktin-Faltung könnte im Vorkommen von Faltungszwischenstufen aufgrund einer für die spontane Faltung ungünstigen Primärsequenz begründet sein, die sich aufgrund der Notwendigkeit der Konservierung spezifischer Bindungsmotive für die Interaktion von Aktin mit seinen zahlreichen Interaktionspartnern beibehalten wurde.

Auch der allgemeine Fold des zweiten wichtigen obligaten TRiC-Substrats Tubulin scheint nicht ausschlaggebend für die obligate Chaperonin-Abhängigkeit der Tubulin Faltung zu sein. Für die nahen prokaryotischen Tubulin-Homologen BtubA/BtubB wurde eine spontan verlaufende Faltung mit 16% Ausbeute gefunden (Schlieper et al., 2005)<sup>5</sup>.

### **Mögliche Funktion von Ta0583**

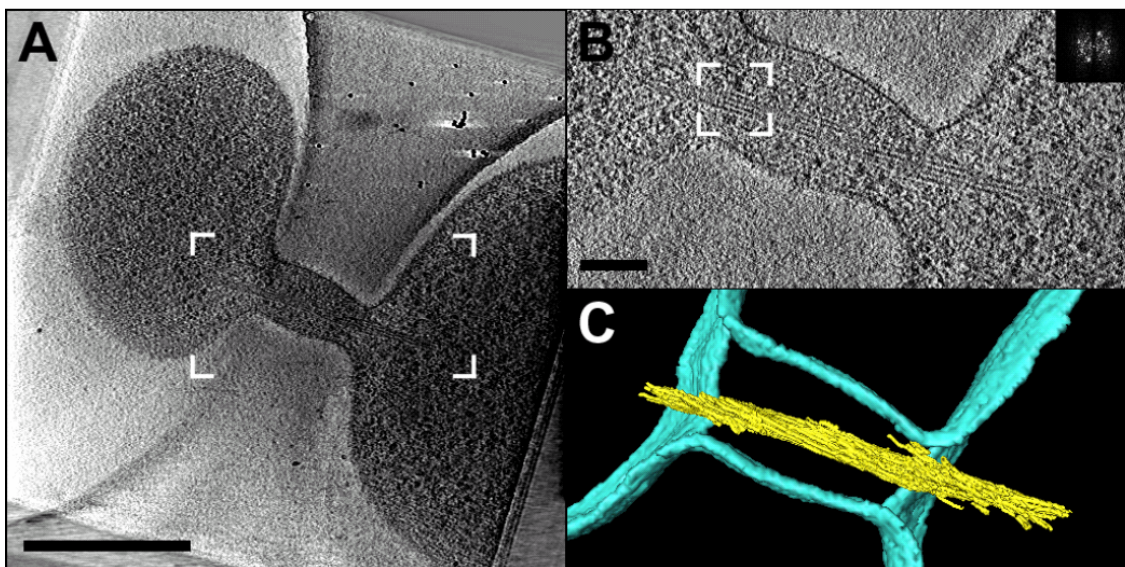
Strukturelle Unterschiede zwischen den Aktinohomologen befinden sich hauptsächlich in den kleineren Subdomänen 1 b und 2 b. Aktin funktionell nicht verwandte Proteine der Aktin/Hsp70-Superfamilie verfügen zusätzlich zur ATPase Domäne über weitere Domänen, die spezialisierte zelluläre Funktionen vermitteln. Während in den Strukturen der Hexokinase und Hsp70 der ATPase-Motor über einen N- bzw. einen C-terminalen Linker an eine Extradomäne verknüpft ist, besteht Ta0583 als reines Aktinohomolog nur aus der Minimalstruktur mit der ATPase Domäne. Eine über eine filamentbildende Funktion hinausgehende, spezialisierte Funktion erscheint für Ta0583 daher unwahrscheinlich. Das sehr geringe Ta0583 Expressionsniveau von nur etwa 0,04% schliesst jedoch eine permanente strukturgebende Funktion als klassisches Zytoskelettprotein in *Thermoplasma acidophilum* Flüssigkultur Zellen nahezu aus. Der Aktin-Gehalt im einzelligen Eukaryoten *Dictyostelium discoideum* ist vergleichsweise etwa 200-fach höher und beträgt um etwa 8% am Gesamtprotein

---

<sup>4</sup> MreB, ParM und Ta0583 können heterolog exprimiert und aufgereinigt werden.

<sup>5</sup> Es wurde angenommen, dass BtubA/B, die 35% Sequenzidentität zu Tubulin aufweisen, durch horizontalen Gentransfer aus einem eukaryotischen Genom stammen .

(Eichinger et al., 1999). Auch MreB und ParM liegen in deutlich höheren Kopienzahlen in der Zelle vor (Jones et al., 2001; Kurner et al., 2005). Searcy et al. beobachteten schon 1981, dass *T. acidophilum* temperaturabhängig die Morphologie von amoeboiden zu runden Zellen verändern kann und werteten dies als Beweis für das Vorkommen eines Zytoskeletts (Searcy, 1981). Das entsprechende Zytoskelett Protein wurde jedoch nicht identifiziert. In Flüssigkultur ist das Expressionsniveau von Ta0583 sehr gering und hier bildet *T. acidophilum* ausschliesslich runde Zellen. Unter natürlichen Lebensbedingungen haftet *Thermoplasma acidophilum* in amoeboider Form auf dem Untergrund. Unter diesen Bedingungen könnte ein deutlich gesteigertes Expressionsniveau von Ta0583 und eine formbildende- oder auch Fortbewegungsfunktion von Ta0583 ermöglichen, die unter den Kulturbedingungen in Flüssigkultur nicht nachgewiesen werden konnte. Als Plasmidsegregationsprotein erfüllt ParM eine spezialisierte Funktion in der Verteilung replizierter Plasmide auf die Tochterzellen. Auch in einigen Archaeen wurden Plasmide identifiziert, in *Sulfolobus acidocaldarius* existiert etwa ein 15,6 kb grosses Plasmid in freier oder in integrierter Form (Schnabel et al., 1984). In Stämmen von *T. acidophilum* wurde 1995 das Plasmid pTA1 identifiziert (Yasuda, 1995).



**Abb. 33: Kryoelektronenmikroskopie von *T. acidophilum* Zellen.** (A) Projektion (49.3 nm dick) durch ein Kryo-Elektronentomogramm von *T. acidophilum*. Zwei Zellen sind durch eine Plasmabrücke verbunden. Im Inneren der Plasmabrücke verläuft ein Bündel von Filamenten. Der Balken entspricht 500 nm. (B) Vergrößerte Darstellung von (A) Der Balken entspricht 100 nm (C) 3D Oberflächendarstellung von (B). Die manuell segmentierten Filamente sind in gelb und die Plasmamembran in türkis eingefärbt. In dieser Darstellung ist zu erkennen, dass die Filamente leicht gegeneinander verdreht sind. Die Abbildung wurde von Christine Kofler erstellt und zur Verfügung gestellt.

Neue Studien identifizierten 18 pTA1 plasmid-kodierte offene Leserahmen, von denen jedoch keiner Homologie zu Ta0583 aufwies (Yamashiro et al., 2006). Abb. 32 zeigt eine kryoelektronenmikroskopische Aufnahme von zwei *T. acidophilum* Zellen, die über eine Plasmabrücke konjugiert sind oder sich in einer späten Phase der Zellteilung befinden. Innerhalb der Plasmabrücke verlaufen Bündel von Filamenten. Eine Transportfunktion von Ta0583 während einer Konjugation oder bei der Segregation von pTA1 Plasmiden in *T. acidophilum* ist durchaus denkbar.

*In vitro* konnten Ta0583-Filamente nicht erzeugt werden. Auch das bakterielle Zellteilungsprotein FtsA liess sich *in vitro* nicht polymerisieren, obwohl eine filamentbildende Funktion *in vivo* nachgewiesen wurde (van den Ent et al., 2001a). Die Filamente von ParM zeigen dynamische Instabilität und sind *in vivo* erst in Anwesenheit des Nukleationsfaktors ParR und der *parC* Region auf dem Plasmid stabil (Garner et al., 2004; van den Ent et al., 2002). In ähnlicher Weise könnte die Bildung von Ta0583-Filamenten die Anwesenheit eines oder mehrerer unbekannter Nukleationsfaktoren erfordern, die im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden konnten.

**Teil 2: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der UDP-Glukose  
Pyrophosphorylase aus *S. cerevisiae***

## **Einleitung Teil 2**

UDP-Glukose ist der zentrale Glykosyldonor im Stoffwechsel aller Organismen und dient als hochenergetische Vorstufe für zahlreiche Glykosylierungsreaktionen. In Hefen dient UDP-Glukose als Vorstufe für die Synthese der  $\beta$ -Glucane der Zellwand, die mehr als 60% der Zellwandkohlenhydrate darstellen (Daran et al., 1995). UDP-Glukose Einheiten sind etwa die monomeren Bausteine für den Aufbau des Speicherpolysaccharids Glykogen in tierischen Zellen und für die Synthese der Transport-Disaccharide Sukrose und Trehalose in Pflanzen und Pilzen. In der Verstoffwechslung von Laktose und bei der Galaktose-Verwertung spielt UDP-Glukose ebenfalls eine zentrale Rolle. UDP-Glukose wird auch als Komponente bei der Biosynthese der  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  Kern-Oligosaccharide, die zur *N*-Proteinglykosylierung verwendet werden, benötigt.

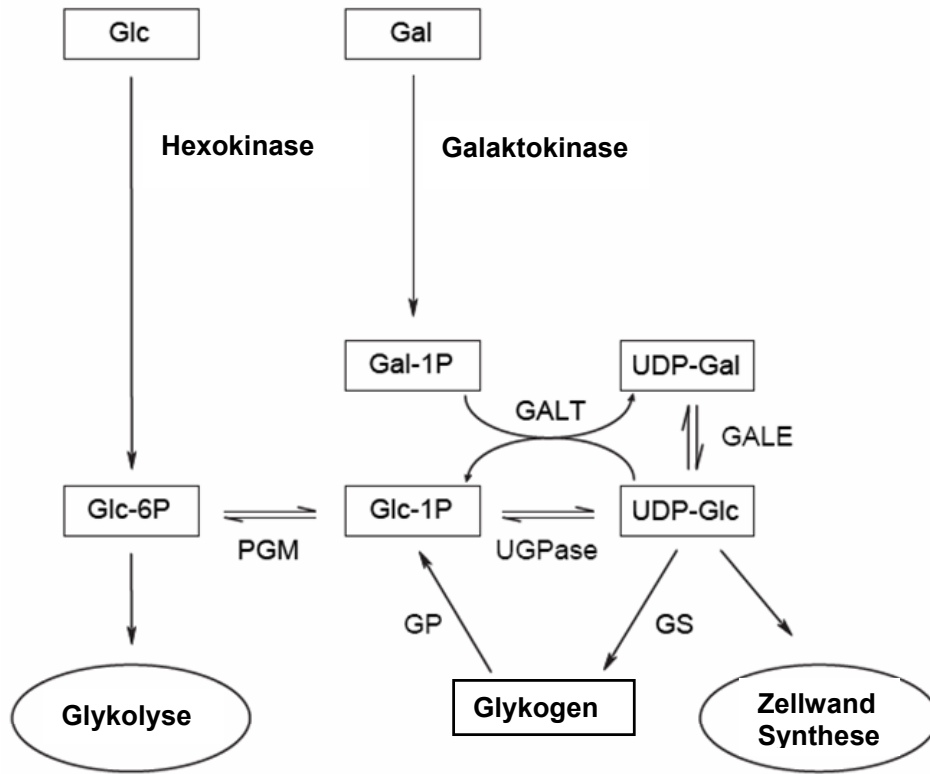
### ***Rolle von UDP-Glukose im Zuckerstoffwechsel***

Glykogen liegt im Zytoplasma in Form von Granula mit einem Durchmesser von 10 bis 40 nm vor. Der Glykogenaufbau erfolgt aus UDP-Glukose Einheiten und erfordert die Aktivität einer UGPase, die UDP-Glukose aus Glukose-1-Phosphat und UTP synthetisiert, und einer Glykogen Synthase (GS), die die UDP-Glukose Einheiten auf einen bestehenden Glykogenzweig überträgt. Die Glykogenverwertung umgeht die Aktivität der UGPase durch die direkte Phosphorylierung von Glukose-Einheiten des Glykogenzweigs unter Abspaltung von Glukose-1-Phosphat. Die Glykogenverwertung erfolgt durch die Glykogen Phosphorylase (GS). Das bereitgestellte Glukose-1-Phosphat kann dann von der Phosphoglukomutase (PGM) in Glukose-6-Phosphat umgesetzt werden, um etwa in die Glykolyse einzutreten.

Die Stärkesynthese in Pflanzen erfolgt im Gegensatz zum Glykogenaufbau aus ADP-Glukose Einheiten (Recondo and Leloir, 1961). ADP-Glukose wird für die Stärkesynthese von der ADP-Glukose Pyrophosphorylase (AGPase) in bestimmten Kompartimenten, den Amyloplasten, aus Glukose-1-Phosphat und ADP in einer Reaktion analog zur UGPase bereitgestellt. Die Struktur der tetrameren ADP-Glukose Pyrophosphorylase wurde 2005 gelöst (Jin et al., 2005).



Galaktose und Glukose sind Epimere und unterscheiden sich nur in der Konfiguration an C4. Um Galaktose glykolytisch verwerten zu können, muss Galaktose erst zu Glukose epimerisiert werden. Die Epimerisierung zu Glukose-1-Phosphat findet jedoch nicht direkt, sondern über Galaktose-1-Phosphat unter Verbrauch eines Moleküls UDP-Glukose statt und erfordert die Aktivität dreier Enzyme im sogenannten *Leloir-Stoffwechselweg* (Frey, 1996).



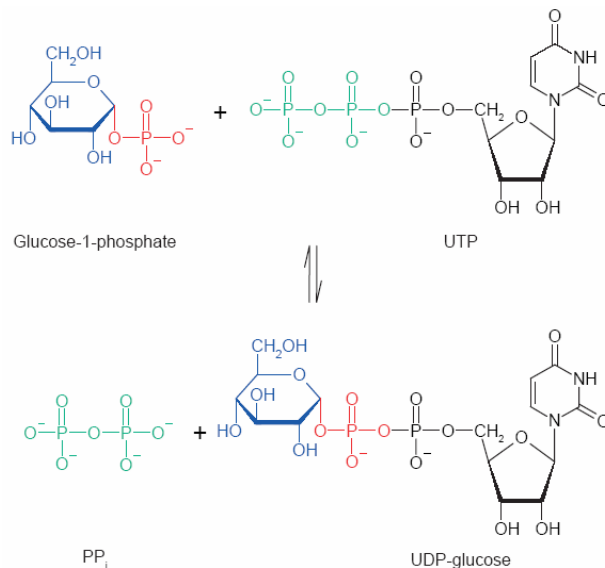
**Abb. 34: Rolle der UGPase im Glykogenstoffwechsel und in der Galaktoseverwertung.** Die UGPase ist durch die Synthese UDP-Glukose an zahlreichen essentiellen Glykosylierungsreaktionen beteiligt und spielt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel.

Die Phosphorylierung der Galaktose wird von der Galaktokinase katalysiert (Abb. 34). Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase (GALT) überträgt dann die Uridylgruppe eines UDP-Glukose-Moleküls unter Spaltung der Phosphorylbindung auf Galaktose-1-Phosphat. Dabei entstehen Glukose-1-Phosphat und UDP-Galaktose. Glukose-1-Phosphat kann direkt glykolytisch verwertet werden, UDP-Galaktose wird durch die

UDP-Galaktose Epimerase (GALE) zu UDP-Glukose epimerisiert. Störungen im Galaktosestoffwechsel, etwa der Aktivität der Galaktokinase, führen zur Anhäufung von Galaktitol u.a. in den Augenlinsen, was zu Linsentrübungen (Katarakt) führen kann. Defekte im *Leloir-Stoffwechselweg*, die meistens die Aktivität der Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase (GALT) betreffen, begründen etwa die Erbkrankheit der Galaktosämie. Störungen in der GALT-Aktivität verursachen schwere Schädigungen der Leber, der Nieren (tubuläre Funktionsstörung) und des Gehirns. Die UGPase kann Funktionen der Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase GALT zumindest teilweise übernehmen. In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass die Überexpression der humanen UGPase das Wachstum von GALT-defizienten Hefen auf Galaktosemedium ermöglicht (Lai and Elsas, 2000).

### **Synthese von UDP-Glukose und Reaktionsmechanismus**

Die enzymatische Synthese von UDP-Glukose wird von der UDP-Glukose Pyrophosphorylase (UGPase, UTP: $\alpha$ -D-Glukose-1-Phosphat Uridyl-Transferase [E.C. 2.7.7.9]) katalysiert (Turnquist, 1973). In der enzymatischen Reaktion der UGPase werden Glukose-1-Phosphat und UTP zu UDP-Glukose und Pyrophosphat ( $PP_i$ ) umgesetzt.



**Abb.35: Reaktion der UDP-Glukose Pyrophosphorylase.** Die UGPase katalysiert in einer bidirektionalen Reaktion die Synthese oder den Abbau von UDP-Glukose.

Das Reaktionsschema ist in Abb. 35 dargestellt. Die Reaktion verläuft prinzipiell bidirektional. Der katalytische Reaktionsmechanismus der UGPasen aus Kalbsleber und aus *Leishmania major* ist ein sequentieller bi-bi Mechanismus, in dem die Katalyse in einem ternären Komplex aus dem Enzym und beiden Substraten erfolgt (Gillett et al., 1971; Lamerz et al., 2006). Die Substrate binden in einer sequentiellen Reihenfolge, in dem das Nukleosid vor PP<sub>i</sub> oder Glukose-1-Phosphat bindet. Dagegen wurde für die AGPase aus Pflanzen ein *double displacement* (sogenannter Ping-Pong)-Mechanismus gefunden, der ein kovalentes Uridyl-Enzym Zwischenprodukt einschliesst (McCoy et al., 2006). Auch die Katalyse der Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase (GALT) folgt dem Ping-Pong Mechanismus (Wong et al., 1977). Obwohl diese Enzyme ähnliche Reaktionen wie die UGPase katalysieren, erfolgt die Umsetzung zum Teil nach völlig anderen katalytische Mechanismen.

### **UGPasen**

UGPasen sind ubiquitär vorkommende und vorwiegend zytosolische Proteine, die aus etwa 500 Aminosäuren bestehen. Das Molekulargewicht der UGPasen liegt zwischen 40 – 60 kDa. Die in Kalbsleber-Gewebe reichlich vorkommende UGPase wurde schon in den 1960er Jahren aus Kalbsleber extrahiert und biochemisch charakterisiert (Albrecht et al., 1966). Die UGPase nimmt einen Anteil zwischen 0,2% - 0,3% am Gesamtprotein in Kalbsleber ein und kann sogar bis zu 1% am Gesamtprotein in Schleimpilzen, wo aktive Polysaccharidsynthese stattfindet, ausmachen (Albrecht et al., 1966; Newell and Sussman, 1970). Für die UGPase aus Kalbsleber wurde 1966 ein Molekulargewicht von 400 kDa gefunden, dieser Wert entspricht dem Molekulargewicht eines Oktamers.

In Pflanzen kommen neben den zytosolischen Enzymen auch UGPasen in den Stärkekörnern (Amyloplasten) und Chloroplasten vor (Turnquist, 1973). Die pflanzliche UGPase liegt in aktiver Form als Monomer vor, kann aber auch Dimere und höhere Oligomere bilden (Martz et al., 2002). Die bakterielle UGPase aus *E. coli* wurde erst 1994 charakterisiert. GalU liegt in aktiver Form als Tetramer vor (Weissborn et al., 1994). Die UGPase des einzelligen Protisten *Leishmania major* bildet dagegen Monomere (Lamerz et al., 2006). Die UGPase aus *S. cerevisiae*, Ugp1p, wurde 1995 identifiziert und charakterisiert. Das Gen für die UGPase, *UGP1*,

kann in *E. coli* den  $\Delta galU$  Phänotyp komplementieren und ist für *S. cerevisiae* essentiell (Daran et al., 1995). Daran et. al zeigten, dass die Überexpression von Ugp1p bei Wachstum der Hefen auf Glukose-Medium zwar zu einer 40-fach erhöhten UGPase-Aktivität, jedoch nur zu einem 2-fach gesteigerten zellulären Gehalt an Glykogen und UDP-Glukose führte. Bei Wachstum der Hefen auf Galaktose-Medium führte die gesteigerte UGPase-Aktivität allerdings zu deutlich verlangsamten Wachstum und zu einer 3 - 5-fachen Erhöhung der UDP-Glukose-, UDP-Galaktose- und Galaktose-1-Phosphat-Spiegel. Im Genom von *S. cerevisiae* kommt eine zweite Isoform der UGPase, UGPA2, vor (Johnston et al., 1994). Ein NCBI *Blast*-Sequenzvergleich (Altschul et al., 1997) der Proteinsequenzen beider Isoformen zeigt, dass A1 und A2 untereinander nur 41% Sequenzidentität aufweisen. Die A2-Isoform wurde bislang nicht charakterisiert. Die Primärsequenzen der UGPasen verschiedener Spezies sind zu etwa 50% konserviert. Etwa weist die *S. cerevisiae* Ugp1p 53% Sequenzidentität zu dem pflanzlichen Enzym aus der Kartoffelknolle auf (Daran et al., 1995). Zwischen der UGPase aus humanem Lebergewebe und Ugp1p besteht 55% Sequenzidentität (Peng and Chang, 1993).

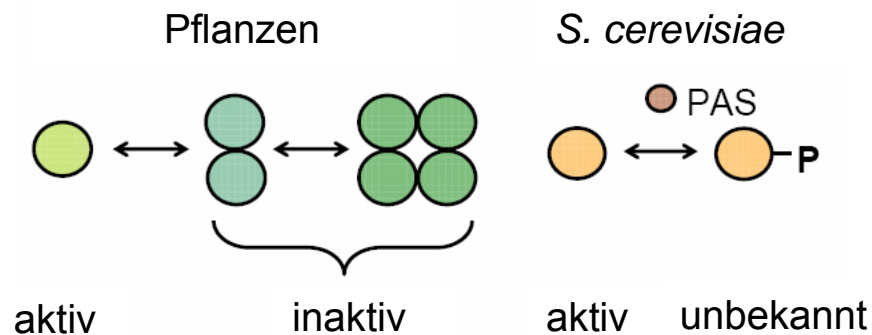
Die Pyrophosphorylasen und im Allgemeinen Glykosyltransferasen gehören zur sogenannten SGC-Domänen Proteinfamilie, die im Jahr 2000 erstmalig beschrieben wurde (Unligil et al., 2000). Die Bezeichnung „SGC“ ist von der gemeinsamen Kerndomäne der *Bacillus Subtilis* Glykosyltransferase SpsA und der *N*-Acetylglukosaminyl Transferase I aus Kaninchen (GnT I) abgeleitet (SpsA-GnT-I „core“, SGC). Die SGC-Domäne ist durch ein achtsträngiges  $\beta$ -Faltblatt charakterisiert, das seitlich von  $\alpha$ -Helices flankiert ist. Pyrophosphorylasen zeichnen sich darüberhinaus durch das charakteristische Signaturmotif LxxGxGTxxxxxxPK im aktiven Zentrum aus (Unligil et al., 2000).

Im Rahmen eines *Structural Genomics* Projektes (CESG) an der University of Wisconsin-Madison wurde die erste Struktur einer hypothetischen UGPase mit dem pflanzlichen Enzym aus *A. thaliana* gelöst und unlängst in der Datenbank frei zugänglich gemacht (PDB 1Z90). Die UGPase aus *A. thaliana* weist neben einer SGC-Domäne eine kleinere N-terminale Domäne und eine charakteristische C-terminale  $\beta$ -Helix Domäne auf. Das Strukturmotiv der  $\beta$ -Helix wurde erstmalig 1993 für das Enzym Pektat-Lyase beschrieben (Yoder et al., 1993).

## Regulation der Enzymaktivität

Unter normalen Stoffwechselbedingungen mit niedrigem Pyrophosphatspiegel verläuft die Reaktion der UGPase wahrscheinlich preferentiell in die Richtung der UDP-Glukose Synthese aus Glukose-1-Phosphat und UTP. Die Verfügbarkeit an Glukose-1-Phosphat wird durch die Aktivität der Phosphoglukomutase reguliert. Die metabolische Entscheidung zwischen Glykogenaufbau und -abbau wird durch die Regulation der Aktivität der tetrameren Glykogen Synthase und der Phosphoglukomutase getroffen, beide Enzyme sind durch Phosphorylierung und durch allosterische Effektoren hochreguliert (Gururaj et al., 2004). Die Glykogen Synthase wird gleich an mehreren Seiten und von mehreren Kinasen phosphoryliert; als Antwort auf hormonale Signale etwa durch die cAMP-abhängige PKA, durch die Protein Kinase C (PKC), Casein Kinase I und II, die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), durch die Synthase-Phosphorylase Kinase und durch die PAS-Kinase (Wilson et al., 2005). Die Phosphorylierung der Glykogen Synthase senkt die Affinität für UDP-Glukose und deaktiviert die Glykogensynthese (Roach et al., 1976).

In *S. cerevisiae* phosphoryliert die PAS Kinase neben der Glykogen Synthase auch Ugp1p (Rutter et al., 2002). Die PAS Phosphorylierungsseite in Ugp1p wurde an Position Ser11 identifiziert (Rutter et al., 2002). Hier wurde gezeigt, dass Hefen mit PAS Nullmutationen erhöhte Glykogenspiegel aufweisen. Die Autoren schlossen daraus, dass Phosphorylierung durch die PAS Kinase Ugp1p und die Glykogen Synthase negativ reguliert. Ein direkter Effekt der Phosphorylierung von Ugp1p auf die Enzymaktivität konnte jedoch für Ugp1p nicht gezeigt werden (Rutter, pers. Mitteilung).



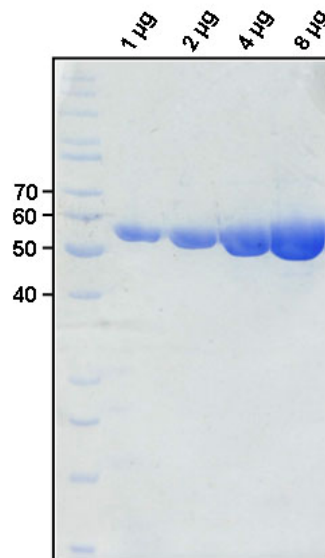
**Abb.36: Reagulationsmechanismen der UDP-Glukose Pyrophosphorylase.** Die pflanzliche UGPase ist wahrscheinlich durch Änderungen im oligomeren Zustand reguliert (Martz et al., 2002). Für Ugp1p aus Bäckerhefe wurde eine Regulation der Enzymaktivität über Phosphorylierung vorgeschlagen (Rutter et al., 2002).

Für die pflanzliche UGPase wurde eine Regulation über den oligomeren Zustand des Enzyms vorgeschlagen (Martz et al., 2002). Rekombinant aufgereinigte pflanzliche UGPase wurden in unterschiedlichen oligomeren Zuständen gefunden. Martz et al. konnten ausschliesslich für das Monomer Aktivität nachweisen, Dimere und höhere Oligomere zeigten keine Aktivität. Der Mechanismus der Oligomerisierung und Deoligomerisierung ist unbekannt. Für die bakterielle UGPase GalU, die im Zytosol als Tetramer vorliegt, wurde vorgeschlagen, dass das GalU-ähnliche GalF-Protein als nicht-katalytische Untereinheit die Aktivität des GalU-Oligomers regulieren kann (Marolda and Valvano, 1996).

## Ergebnisse Teil 2

### *Herstellung und Aufreinigung von Ugp1p*

Der offene Leserahmen von Ugp1p codiert für ein Protein aus 499 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 56 kDa. Ugp1p wurde aus genomischer DNA von *S. cerevisiae* amplifiziert und zur rekombinanten Expression in den pET28b-Vektor kloniert. Im pET28-System wurden Expressionskonstrukte von unmodifiziertem Ugp1p (ohne Affinitäts-Tag) und von diversen Punkt- und Trunkationsmutanten hergestellt. Unter milden Expressionsbedingungen war das rekombinante Ugp1p Protein grösstenteils löslich. Ugp1p weist Affinität zu Nickelionen auf und konnte über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie, gefolgt von Ionenaustausch-, Heparin-Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographie bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Rekombinantes Protein konnte in Mengen von bis zu 147 mg aus 3 L Kulturvolumen bei einem geschätzten Reinheitsgrad von 99% gewonnen werden. Zur Kristallisation und für die biochemischen Charakterisierungen wurde endogenes Ugp1p erstmalig aus *S. cerevisiae* (UBY49  $\Delta$ reg1) und später auch aus kommerziell erhältlichen *S. cerevisiae* aufgereinigt.

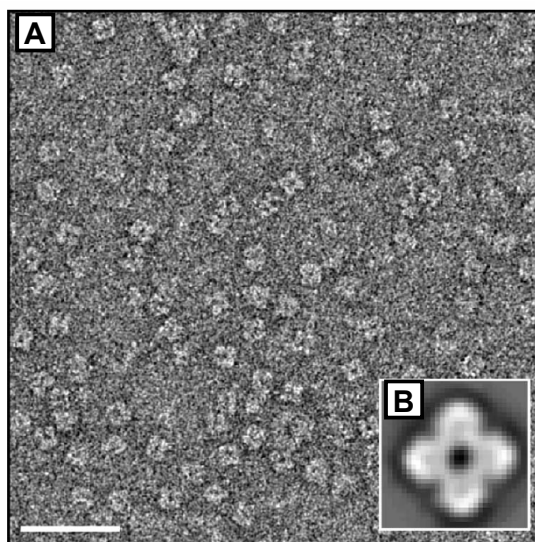


**Abb.37: Ergebnis der Aufreinigung von Ugp1p.** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel (10% Acrylamid) mit einer Verdünnungsreihe von unmodifiziertem Volllänge-Ugp1p. Der geschätzte Reinheitsgrad dieser Präparation beträgt 99%.

Die Hefen wurden von Dr. Ulrike Böttcher kultiviert und als tiefgefrorene Pellets zur Verfügung gestellt. Endogenes Ugp1p konnte aufgrund der nur geringen zellulären Mengen nur partiell bis zu einem Reinheitsgrad von etwa 85% aufgereinigt werden. So wurde eine typische Ausbeute von 1 - 2 mg Ugp1p aus 300 g *S. cerevisiae* Pellets erhalten.

### ***Bestimmung des oligomeren Zustandes von Ugp1p***

Im Elutionsprofil der Gelfiltration auf einer Superose6 erscheint Ugp1p als symmetrischer Peak bei einem apparenten Molekulargewicht von ~400 kDa. Zur genauen Bestimmung des oligomeren Zustandes wurde das Molekulargewicht in Lösung anhand statischer Lichtstreuung ermittelt (Dr. Manajit Hayer-Hartl). Das durch statische Lichtstreuung ermittelte Molekulargewicht betrug  $449 \pm 1.3$  kDa. Das Ergebnis ist in sehr guter Übereinstimmung mit dem theoretisch erwarteten Molekulargewicht von 448 kDa für ein Oktamers aus identischen Untereinheiten. In mit Uranyl-Acetat negativ kontrastierten Elektronenmikrographen (TEM-Aufnahmen) erscheint endogenes Ugp1p weitgehend als homogene Population von Partikeln mit einem Durchmesser von etwa 150 Å (Abb. 38).



**Abb. 38: Elektronenmikrograph von endogenem Ugp1p. (A)** Negativ kontrastiertes Partikelfeld. Der Balken entspricht 50 nm. **(B)** Gemitteltes Partikel nach der Korrespondenzanalyse von 839 Partikeln. Das Partikel hat eine echte 4-fache Symmetrie. Die Elektronenmikrographen wurden von Dr. Jürgen Plitzko aufgenommen.

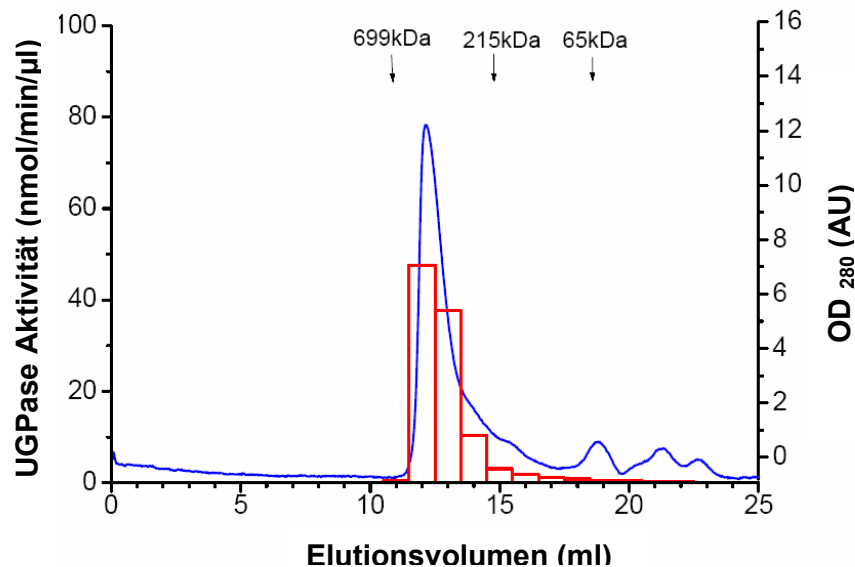


Die Partikel haben meist etwa die Form eines vierblättrigen Kleeblatts und scheinen diese bevorzugte Orientierung, die als Aufsicht auf dem Kohlefilm erscheint, einzunehmen (Abb. 38). Die Elektronenmikroskopie und die Partikelanalysen wurden von Dr. Jürgen Plitzko, Abt. Baumeister, durchgeführt. Die Korrespondenzanalyse von 839 Einzelpartikeln mit anschließender Mittelung der Klasseninhalte ergibt ein Partikel mit echter vierzähliger Symmetrie (Abb. 38b). Eine zentrale Kavität hat einen Durchmesser von etwa 30 Å. Die Elektronenmikrographen von Ugp1p zeigen Ähnlichkeit zu den EM-Aufnahmen des aus Kälberleber aufgereinigten Enzyms auf, von dem angenommen wird, dass es ebenfalls Oktamere bildet (Turnquist et al., 1974). Der oktamere Zustand der rekombinant exprimierten Ugp1p-Konstrukte wurde durch analytische Gelfiltration, statische Lichtstreuung oder Elektronenmikroskopie nachgewiesen.

### ***Enzymaktivität von Ugp1p***

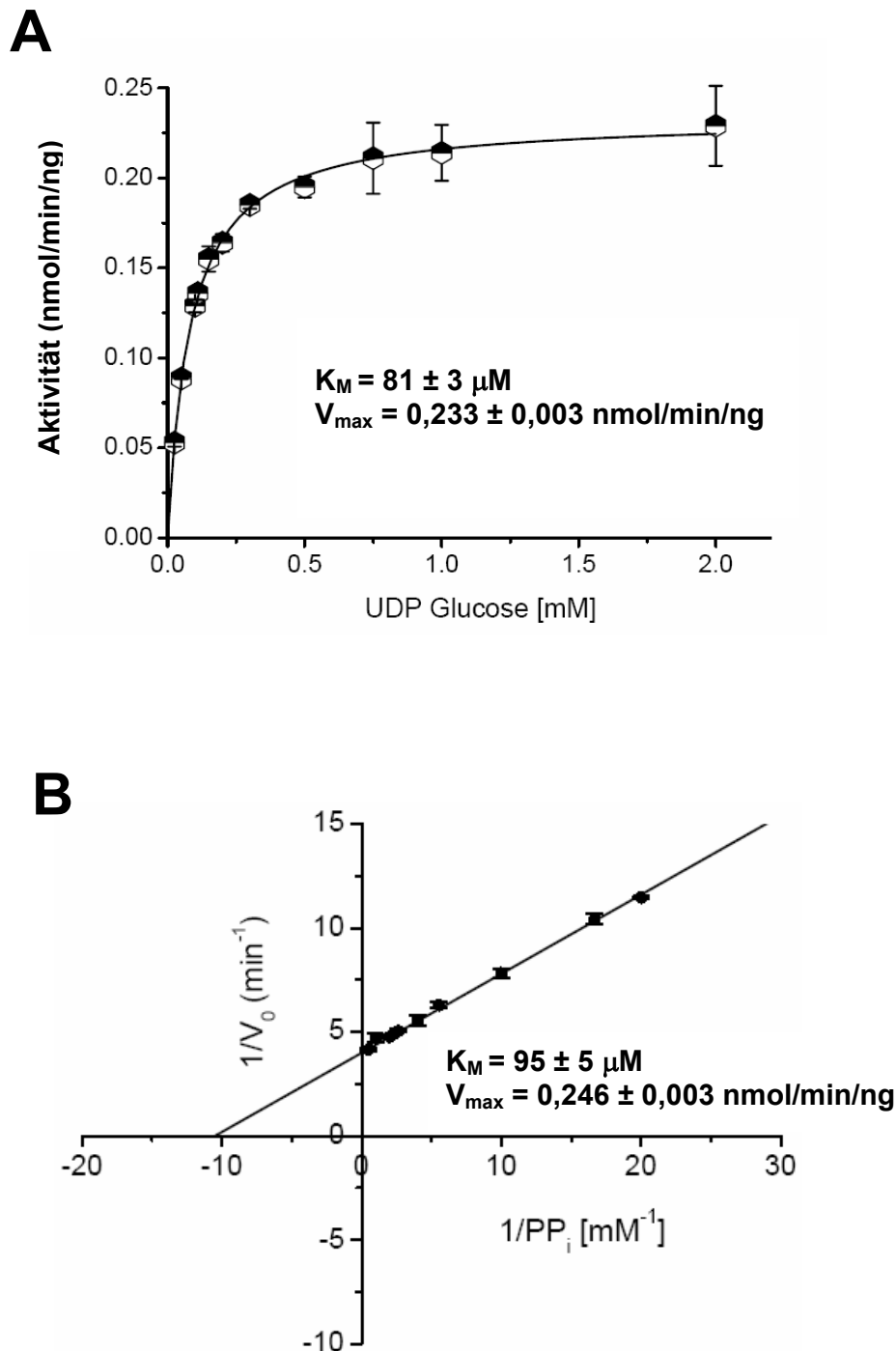
Ugp1p katalysiert in einer Zwei-Substrat-Reaktion die Synthese von UDP-Glukose unter Bildung von Pyrophosphat ( $PP_i$ ). Die Reaktion verläuft reversibel nahe dem Gleichgewicht. In der Pyrophosphorolyse (Rückwärts-) Richtung wird UDP-Glukose in Anwesenheit von  $PP_i$  zu Glukose-1-Phosphat (Glc-1-P) und UTP gespalten. Die Enzymaktivität in der Richtung der Spaltung von UDP-Glukose (Pyrophosphorolyse) wurde in einem gekoppelten Enzymassay nach Daran et. al (Daran et al., 1995) bestimmt. In diesem Assay wird das durch die Aktivität von Ugp1p aus UDP-Glukose gebildete Glukose-1-Phosphat zunächst durch das Enzym Phosphoglucomutase in Glukose-6-Phosphat epimerisiert. Glukose-6-Phosphat wird dann von der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton oxidiert, wobei pro Molekül Glukose-6-Phosphat zwei Moleküle  $NAD^+$  zu NADH reduziert werden (Turnquist, 1973), die spektrophotometrisch bei 340 nm nachgewiesen werden können. Die Synthese von UDP-Glukose wurde ebenfalls spektrophotometrisch als Bildung von NADH bei der Oxidation von UDP-Glukose zu UDP-D-Glucuronsäure durch das Enzym UDP-Glukose Dehydrogenase nachgewiesen. Alternativ wurde die Bildung von UDP-Glukose auch als freigesetztes Phosphat nach der Spaltung von  $PP_i$  durch die anorganische Pyrophosphatase im Malachitgrün Assay nachgewiesen. Bei diesem Enzymassay

konnte die Reaktion durch den  $Mg^{2+}$ -Chelator CDTA effektiv gestoppt werden. Die Enzymaktivität von Ugp1p ist also  $Mg^{2+}$ -abhängig. In einer analytischen Gelfiltration des partiell aufgereinigten, endogenen Enzyms korreliert eine UDP-Glukose Pyrophosphorylase Aktivität in den gesammelten Fraktionen mit der Elution des Ugp1p Oktamers (Abb. 39). Enzymatisch aktive Monomere wurden nicht gefunden. Offenbar liegt die aktive Form von Ugp1p in *S. cerevisiae* als Oktamer vor.



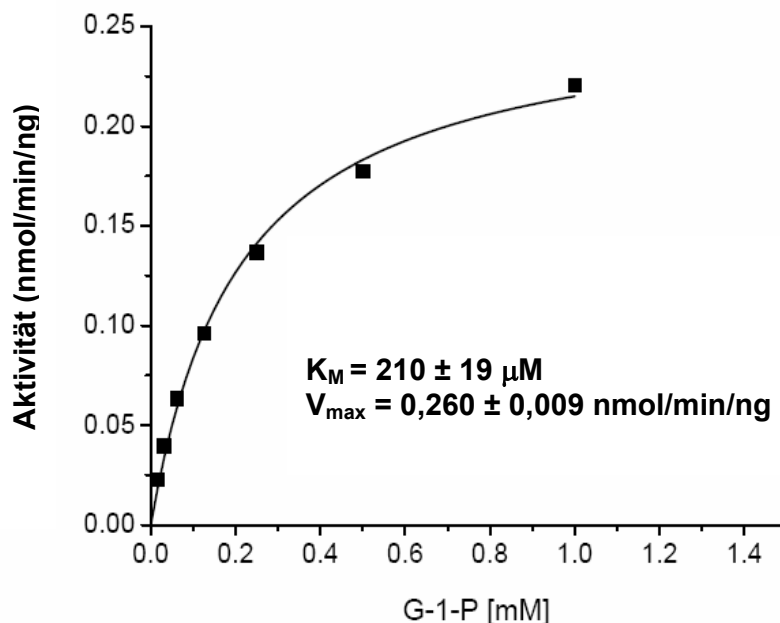
**Abb. 39: Analytische Gelfiltration mit partiell aufgereinigtem Ugp1p (endogen).** Die  $OD_{280}$  ist als blaue Linie, die Enzym-Aktivität in den korrespondierenden Fraktionen als rote Balken dargestellt. Ugp1p läuft als Oktamer mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 400 kDa.

Das Oktamer weist eine hohe spezifische Pyrophosphorylase Aktivität von 240 U/mg auf. Für die oktameren Enzyme von *Bos taurus* und *Homo sapiens* (Leber) wurden ähnliche spezifische Aktivitäten von jeweils 200 U/mg gefunden (Turnquist et al., 1974). Rekombinant exprimiertes Ugp1p und aus *S. cerevisiae* aufgereinigtes endogenes Ugp1p zeigen keine Unterschiede im oligomeren Zustand und weisen praktisch identische spezifische Aktivitäten und kinetische Parameter auf. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Mengen an endogenem Ugp1p wurde die enzymatische Charakterisierung mit dem rekombinanten Enzym durchgeführt. Der oligomere Zustand aller im Folgenden charakterisierten rekombinanten Ugp1p Proteine und Mutanten wurde durch analytische Gelfiltration bestätigt.



**Abb. 40: Aktivität von Ugp1p in der Pyrophosphorolyse Richtung.** Die Pyrophosphorolyse-Aktivität von Ugp1p folgt der Michaelis-Menten Kinetik und zeigt keine Kooperativität. **(A)** Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_M$  und  $V_{max}$  für UDP-Glukose. Die Daten sind als Michaelis-Menten Diagramm dargestellt. **(B)** Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_M$  und  $V_{max}$  für PP<sub>i</sub>. Die Daten sind in Lineweaver-Burke Auftragung dargestellt. Die Konzentration von PP<sub>i</sub>(A), bzw. UDP-Glukose (B) beträgt 1 mM.

Die Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_M$  und  $V_{max}$  für die Substrate UDP-Glukose und  $PP_i$  von Ugp1p in der Pyrophosphorolyse Richtung sind in Abb. 36 dargestellt. Die Enzym-Aktivität von Ugp1p folgt einfacher Michaelis-Menten-Kinetik und zeigt keine Kooperativität innerhalb des Oktamers. Das Ugp1p Oktamer ist sowohl in der Pyrophosphorolyse, als auch in der UDP-Glukose Synthese Richtung hochaktiv. Die Reaktion verläuft in beide Reaktionsrichtungen nicht-kooperativ (Abb. 40, Abb. 41). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Pyrophosphorolyse Aktivität vom Ugp1p wurde mit beiden Substraten als jeweils  $V_{max (UDP-Glukose)} = 0,233 \pm 0,003$  nmol/min/ng und  $V_{max (PP_i)} = 0,245 \pm 0,002$  nmol/min/ng ermittelt. In der Richtung der UDP-Glukose Synthese wurde als maximale Reaktionsgeschwindigkeit ein ähnlicher Wert für  $V_{max (Glc-1-P)} = 0,26 \pm 0,009$  nmol/min/ng gefunden. Die von Ugp1p katalysierte Reaktion verläuft unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen in beide Richtungen mit ähnlicher maximaler Geschwindigkeit. Die  $K_M$ -Werte für UDP-Glukose und Pyrophosphat sind mit  $K_M (UDP-Glukose) = 81 \pm 3$   $\mu$ M und  $K_M (PP_i) = 95 \pm 5$   $\mu$ M für beide Substrate ähnlich. Unter Substrat-Sättigungsbedingungen weist Ugp1p offenbar ähnliche Affinitäten für UDP-Glukose und  $PP_i$  auf.



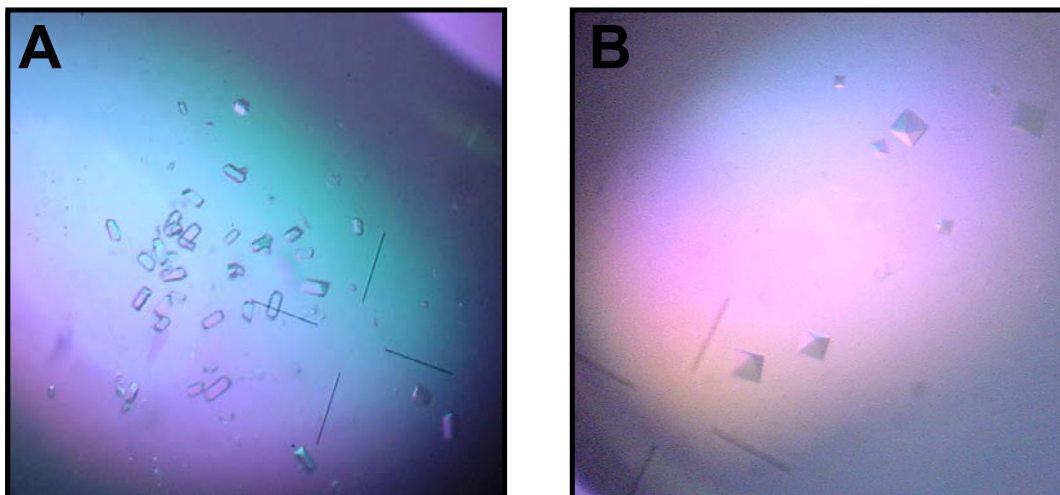
**Abb. 41: Aktivität von Ugp1p in der Richtung der UDP-Glukose Synthese.** Die Abbildung zeigt die Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_M$  und  $V_{max}$  und Glukose-1-Phosphat in Michaelis-Menten Auftragung. Die UDP-Glukose Synthese Aktivität von Ugp1p ist nicht kooperativ und folgt der Michaelis-Menten Kinetik. Die Konzentration von UTP beträgt 1 mM.

Die  $K_M$ -Werte der monomeren UGPase aus *Leishmania major* liegen in der selben Grössenordnung und wurden als  $K_M$  (UDP-Glukose) = 104  $\mu$ M und  $K_M$  (PP<sub>i</sub>) = 200  $\mu$ M ermittelt (Lamerz et al., 2006). Für *S. cerevisiae* Ugp1p wurde in der Richtung der UDP-Glukose Synthese für Glukose-1-Phosphat ein  $K_M$ -Wert von 210  $\pm$  19  $\mu$ M bestimmt. Im Vergleich wurde der  $K_M$  für Glukose-1-Phosphat der UGPase aus *Leishmania major* als 192  $\mu$ M ermittelt (Lamerz et al., 2006). Eine Übersicht über die kinetischen Parameter ist in Tabelle 3 dargestellt. Die ähnlichen Affinitäten von Ugp1p für UDP-Glukose und PP<sub>i</sub> sind ein Hinweis auf die Bildung eines ternären Komplexes aus dem Enzym und den beiden Substraten. Für die pflanzliche UGPase aus der Kartoffelknolle wurde ein sequentieller bi-bi Mechanismus gefunden, der einen ternären Komplex involviert (Katsube et al., 1991). Für das monomere UGPase aus *Leishmania major* wurde anhand NMR Studien ein geordneter sequentieller Mechanismus gefunden, bei dem UTP zuerst bindet (Lamerz et al., 2006). Auch die Reaktion des oktameren Enzyms aus Kaninchen verläuft nach einem geordneten sequentiellen bi-bi Mechanismus, bei dem UDP-Glukose vor PP<sub>i</sub> an die aktive Seite bindet (Turnquist et al., 1974).

### **Kristallisation von Ugp1p**

Ugp1p wurde mit der Dampfdiffusionsmethode kristallisiert. Ugp1p Kristalle wurden durch Mischen von 1  $\mu$ l der Proteinlösung (4,2 mg/ml Ugp1p) mit gleichem Volumen Präzipitanlösung (6% PEG4000, 15% Glyzerol, 150 mM Mg-Format) und Äquilibrierung gegen 1000  $\mu$ l Präzipitanlösung bei 20 °C erhalten. Die Kristalle entstanden über Nacht und hatten einen Durchmesser von 50  $\mu$ m bis zu 150  $\mu$ m. Eine maximale Grösse von bis zu 600  $\mu$ m erreichten die Kristalle nach vier bis sechs Tagen. Ugp1p kristallisierte in einer orthorhombischen und in einer vermutlich tetragonalen Kristallform. Mitunter kamen beide Kristallformen nebeneinander im Tropfen vor. Das endogene Ugp1p kristallisierte vorzugsweise in der orthorhombischen Kristallform, aber auch gelegentlich in der tetragonalen Kristallform (z.B. in Ko-Kristallisationsansätzen mit UDP-Glukose). Obwohl Ugp1p als aktives Oktamer rekombinant gewonnen werden kann, wurden für Diffraktionsexperimente brauchbare Kristalle nur mit dem endogen aufgereinigtem Protein erhalten. Grosse Kristalle und sämtliche Kristalle, die mit rekombinantem

Protein erhalten wurden, besaßen schlechte Beugungseigenschaften. Das Vorliegen der A1-Isoform von Ugp1p in den Kristallen aus endogenem Protein wurde durch massenspektrometrische Analyse bestätigt (Dr. Roman Körner, Abt. Nigg).



**Abb. 42: Kristalle von Ugp1p.** (A) Orthorhombische Kristalle von endogenem Ugp1p. Kleine, durch Mikroseeding erhaltene Kristalle von nicht mehr als 100  $\mu\text{m}$  beugten bis zu einer Auflösung von 3,1  $\text{\AA}$ . (B) Tetragonale Kristalle von rekombinantem Selenomethionin-substituiertem Ugp1p. Kristalle, die mit rekombinantem Protein erhalten wurden beugten bis zu einer Auflösung von 8 bis 10  $\text{\AA}$ .

Im 10%-igen SDS-Gel eines in Wasser aufgelösten Kristalls, der gute Beugungseigenschaften besaß, lief Ugp1p als Bande mit einem leicht niedrigeren Molekulargewicht als für das Volllänge Protein erwartet. N-terminale Sequenzierung derselben Probe bestätigte eine N-terminale Verkürzung um 11 Aminosäureresten. Die Beugungseigenschaften von Kristallen, die mit rekombinantem  $\Delta 1-11$ Ugp1p Protein gezüchtet wurden, waren jedoch nicht verbessert. Die Qualität von Kristallen, die in Gegenwart von 10 mM UDP-Glukose, UTP oder Glukose-1-Phosphat gezüchtet wurden, war für Diffraktionsexperimente nicht ausreichend. Brauchbare Kristalle hatten eine Grösse von nicht mehr als 100  $\mu\text{m}$  und wurden mit endogenem Ugp1p in Mikroseeding-Ansätzen gezüchtet. Die durch Mikroseeding erhaltenen kleinen Kristalle erreichten ihre maximale Grösse über Nacht, beugten aber bis zu einer Auflösung von 3,1  $\text{\AA}$ . Die Kristalle wurden ohne Zugabe eines zusätzlichen Gefrierschutzes direkt aus der Mutterlösung im Stickstoffstrahl der Messstation am Synchrotron geforen, da der Transfer und das Tränken der Kristalle in diversen Frostschutzlösungen die Beugungseigenschaften zu beeinträchtigen schienen.

## **Strukturlösung von Ugp1p**

### **Raumgruppe**

Die Strukturlösung gelang mit den Beugungsdaten eines Kristalls der innenzentrierten Raumgruppe  $I222$  mit Gitterparametern von  $a=110,19 \text{ \AA}$ ,  $b=147,44 \text{ \AA}$ ,  $c=167,74 \text{ \AA}$  und  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ . Die Auflösungsgrenze lag bei  $3,1 \text{ \AA}$ . Von dem Kristall wurde ein zu 98,9% vollständiger, vierfach-redundanter Datensatz gesammelt. Die asymmetrische Einheit enthält zwei Monomere. Eine Zusammenfassung der kristallographischen Daten ist in Tabelle 2 dargestellt.

### **Phasierung, Verfeinerung und Modellbau**

Aufgrund der schlechten Diffraktionseigenschaften der mit rekombinantem Protein gewonnenen Kristalle konnte die Methode der SAD- oder MAD Phasierung mit Selenomethionin-substituierten Kristallen nicht angewendet werden<sup>6</sup>. Die Struktur von Ugp1p wurde mit der Methode des Molekularen Ersatzes (Molecular Replacement) gelöst. Als Suchmodell wurde der Koordinatensatz einer vermuteten UGPase von *Arabidopsis thaliana* 1Z90 verwendet. Zwischen der UGPase aus *A. thaliana* und der *S. cerevisiae* UGPase besteht 52% Sequenzidentität. Der molekulare Ersatz mit dem MR-Programm Molrep durchgeführt (Vagin and Teplyakov, 1997). Das Modell der ersten Lösung wurde in mehreren Zyklen mit Refmac5 und O verfeinert. Aufgrund der relativ niedrigen Auflösung und der resultierenden wenig detaillierten Elektronendichte wurden der geometrische Term bei der Verfeinerung hoch gewichtet. Reste mit Lösungsmittel-exponierten Seitenketten, denen keine Elektronendichte zuordenbar war, wurden als Alanine verfeinert. Die R-Faktoren des finalen Modells betragen  $R_{\text{free}} = 0,291$  und  $R_{\text{work}} = 0,226$ . 10 geordnete Wasseratome wurden als periphere Peaks in Differenzdichtekarten identifiziert. Differenzdichte für mögliche gebundene Substrat- oder Effektormoleküle war nicht zuordnenbar. In der Ramachandran Auftragung der  $\psi/\phi$  Winkelverteilung in der Hauptkette liegen 81% der Diederwinkel in den energetisch günstigsten Kernregionen der Sekundärstrukturelemente  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und der linksgängigen  $\alpha$ -Helix. 18,1% der Diederwinkel liegen in zusätzlich erlaubten (*additionally allowed*) Regionen.

---

<sup>6</sup> Se-Met Kristalle wurden mit verschiedenen Konstrukten von Ugp1p gezüchtet und auf ihre Diffraktionseigenschaften getestet.

**Tabelle 2: Statistik der kristallographischen Daten (Ugp1p)**

<b>Datensatz</b>	<b>nativ, endogen</b>
Messstation	ESRF, ID23-1
Raumgruppe	<i>I</i> 222
Einheitszelldimensionen, a, b, c (Å); $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	110,19, 147,44, 167,75; 90,00, 90,00, 90,00
Auflösungsgrenze (Å)*	111 – 3,1 (3,27 – 3,1)
R <sub>merge</sub> **	0,102 (0,286)
I/ $\sigma$	9,7 (3,3)
Redundanz	4,2 (4,1)
Vollständigkeit	98,9 (100)
Monomere /A.E.	2
<b>Verfeinerung</b>	
Auflösungsbereich (Å)	20 – 3,1
Reflexe (Testsatz)	23356 (1261)
R <sub>work</sub>	0,226
R <sub>free</sub>	0,291
Anzahl der Atome	6617
„r.m.s.d.“ Bindungslängen (Å)	0,014
„r.m.s.d.“ Bindungswinkel (°)	1,444
<b>Ramachandran Diagramm (%) ***</b>	
“most favored region”	81,0
“additionally allowed”	18,7

\* Die Werte in Klammern beziehen sich auf die äussere Auflösungsschale

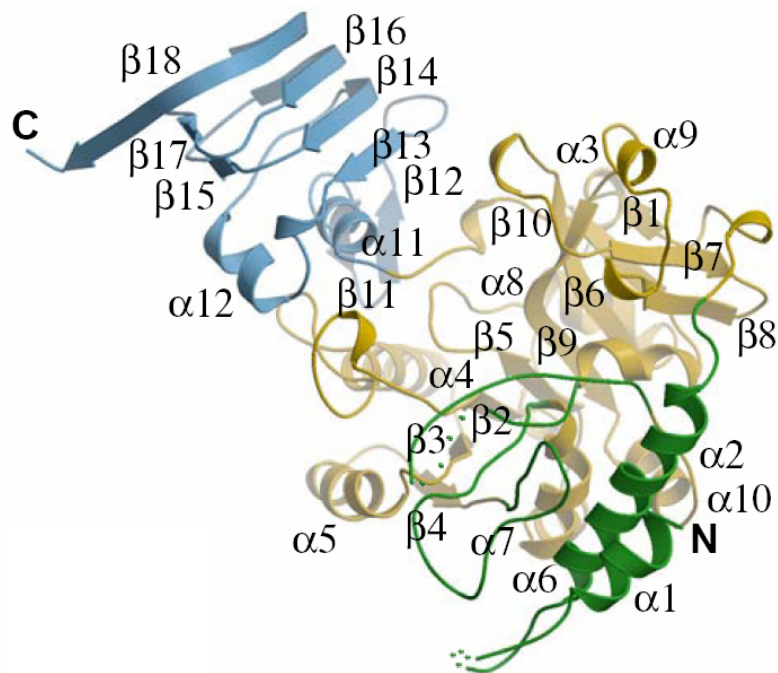
\*\* Ausgabe des Programms Scala (CCP4i)

\*\*\* Ausgabe des Programms Procheck (Laskowski et al., 1996)



### Monomer-Struktur von Ugp1p

Ugp1p ist ein aus drei Domänen aufgebautes  $\alpha/\beta$  Protein (Abb. 43). Die drei Domänen sind in linearer Abfolge angeordnet, so dass N- und C-Terminus an gegenüberliegenden Enden des Moleküls liegen. Der N-Terminus von Ugp1p ist grösstenteils fehlgeordnet. Die Hauptkette konnte in Molekül A von Rest 42 bis zum C-Terminus (Rest 399) mit der Ausnahme einer fehlgeordneten Schleife zwischen den Resten 350 – 356 (Molekül A), bzw. 348 – 356 (Molekül B) durchgehend zugeordnet werden.



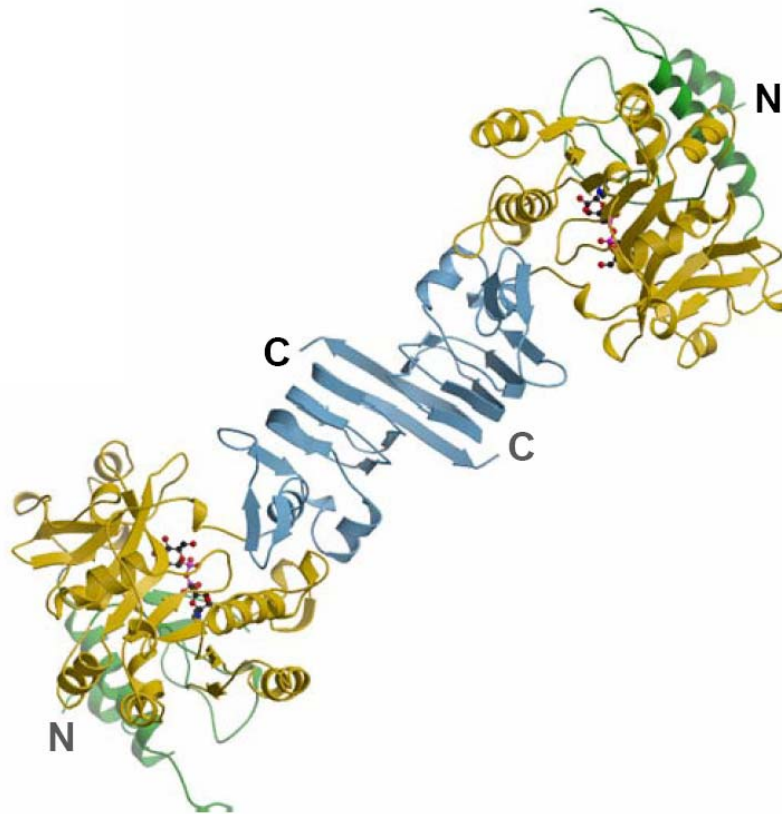
**Abb. 43: Kristallstruktur von Ugp1p bei 3,1 Å.** Ugp1p ist ein  $\alpha/\beta$ -Protein, das aus drei Domänen besteht. Ugp1p besteht aus einer N-terminalen Domäne (grün), einer mittleren Kerndomäne mit dem SGC-Motiv (gelb) und einer C-terminalen  $\beta$ -Helix Domäne (blau).

Ein Stück isolierter Elektronendichte am N-Terminus wurde als  $\alpha$ -Helix unter der Annahme interpretiert, dass hydrophobe Seitenketten in Richtung der Proteinmasse orientiert sind. In Molekül A wurden dieser Helix  $\alpha 1$  die Reste 22 – 35, in Molekül B die Reste 20 – 34 zugeordnet. Die relativ kleine N-terminale Domäne besteht aus einem Bündel zweier  $\alpha$ -Helices (Reste 20 – 69) und zwei langen Schleifen ohne

Sekundärstruktur (Reste 187-215 und 339-363). Die Schleifen erstrecken sich von der mittleren Domäne und bilden mit den beiden  $\alpha$ -Helices den "globulären" Teil der N-terminalen Domäne. Ugp1p gehört zu den SGC-Domänen Proteinen, die durch ein achtsträngiges  $\beta$ -Faltblatt charakterisiert sind, das seitlich von  $\alpha$ -Helices flankiert ist. Die zentrale SGC-Domäne bildet den Kern des Moleküls. Das charakteristische achtsträngigen  $\beta$ -Faltblatt ist von mehreren  $\alpha$ -Helices und von den  $\beta$ -Strängen  $\beta 7$  und  $\beta 8$  flankiert. Die C-terminale Domäne zeichnet sich durch das Strukturmotiv einer parallelen  $\beta$ -Helix aus. Das Strukturmotiv der parallelen  $\beta$ -Helix wurde erstmalig 1993 mit der Struktur der Pektat-Lyase C beschrieben (Yoder et al., 1993), in der eine rechtsgängige  $\beta$ -Helix vorkommt. Die linksgängige  $\beta$ -Helix wurde in Moleküldynamik-Simulationen strukturell stabiler als eine rechtsgängige  $\beta$ -Helix berechnet (Langedijk et al., 2006). Weitere, bislang strukturell charakterisierte Proteine mit dem Strukturmotiv einer  $\beta$ -Helix sind etwa die Galacturonase (Shimizu et al., 2002) und die Pektin Methylesterase (Jenkins et al., 2001). Die C-terminale Domäne beginnt bei Rest 389 mit einer kurzen  $\alpha$ -Helix  $\alpha 11$ , gefolgt von einer  $\beta$ -Haarnadel  $\beta 11$  und  $\beta 12$ , die in eine linksgängige  $\beta$ -Helix mündet. In der  $\beta$ -Helix liegt die Polypeptidkette in der Form von  $\beta$ -Strängen vor, die durch senkrecht zur Helixachse stehende Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den  $\beta$ -Strängen eine parallele Helix bilden. Hydrophobe Seitenketten sind zum Inneren der Helix orientiert. In der  $\beta$ -Helix von Ugp1p sind eine kurze  $\alpha$ -Helix  $\alpha 12$  mit den Resten 425 - 442 und eine kurze Schleife zwischen den Resten 472 - 475 seitlich in die  $\beta$ -Helix eingesetzt. Den Abschluss der  $\beta$ -Helix und den C-Terminus bildet der verlängerte  $\beta$ -Strang  $\beta 18$ .

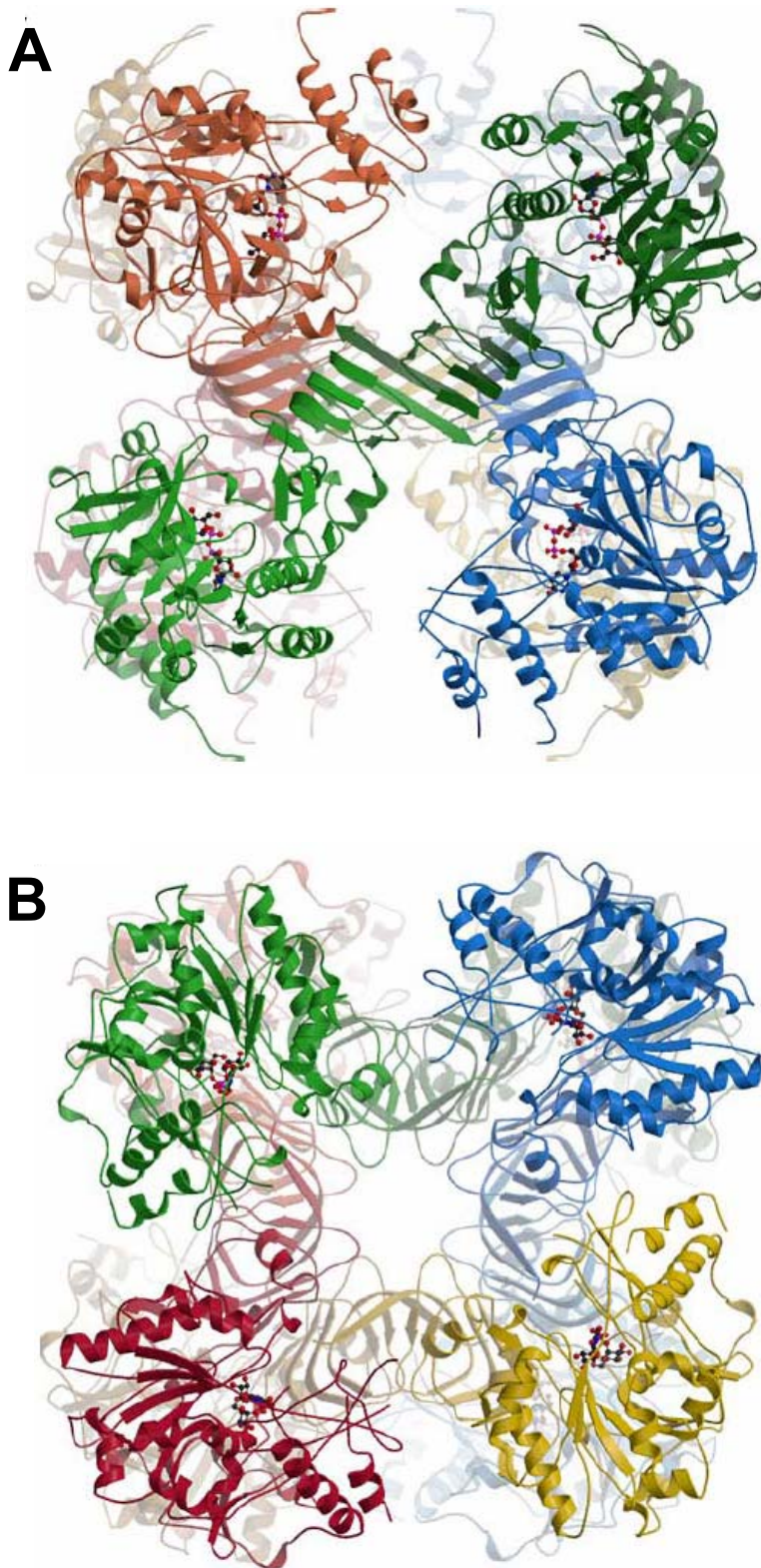
### ***Protomer- und Oktamerstruktur von Ugp1p***

Die beiden Monomere in der asymmetrischen Einheit liegen in nahezu identischer Konformation vor. Die  $C_{\alpha}$ -Hauptketten der Monomere können mit einer Standardabweichung von nur 0,813 Å überlagert werden. In der asymmetrischen Einheit sind die Monomere über die C-terminalen  $\beta$ -Helix Domänen assoziiert und bilden ein dimeres Protomer. Die Protomer-Kontakte bestehen hauptsächlich zwischen den verlängerten  $\beta$ -Strängen am C-Terminus, wo der verlängerte  $\beta$ -Strang  $\beta 18$  in engem Kontakt mit dem  $\beta 18$  des zweiten Monomers steht (Abb. 44).



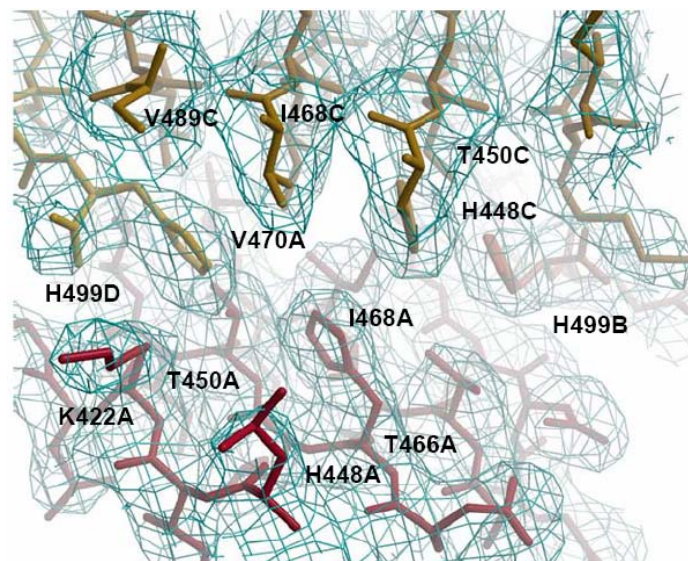
**Abb. 44: Ugp1p-Protomer.** Die beiden Monomere in der asymmetrischen Einheit sind über die  $\beta$ -Helix Domänen assoziiert und bilden das Ugp1p Protomer. Das Protomer wird über starke hydrophobe Kontakte der verlängerten  $\beta$ -Stränge am C-Terminus stabilisiert. UDP-Glukose ist in das aktive Zentrum modelliert. Die Domänen sind nach in Abb. 39 farbig dargestellt.

Die Interaktion der  $\beta$ -Stränge wird durch starke hydrophobe Kontakte der beteiligten Reste Val489, Val490, Leu494, Ile496 und Leu497 stabilisiert. Die an den Protomerkontakten beteiligten hydrophoben Reste sind in Pilzen und vielzelligen Tieren konserviert. In jedem Protomer sind  $1118 \text{ \AA}^2$  der für eine Wassersonde zugänglichen molekularen Oberfläche verborgen. Das Oktamer wird im Kristall durch die kristallographische 222-Symmetrie aus den Protomeren in der asymmetrischen Einheit gebildet. Entlang der x-Achse stehen die gegenüberliegenden Protomere über eine zweizählige Symmetrieachse in Bezug. Benachbarte Protomere sind jeweils über zwei diagonal verlaufende, zweizählige Symmetrieachsen bezogen. Das Oktamer hat molekulare Dimensionen von  $112 \times 112 \times 110 \text{ \AA}$  (Abb. 45).



**Abb. 45: Ugp1p-Oktamer.** Das Substrat UDP-Glukose ist in das aktive Zentrum modelliert. Die Protomere sind gelb, rot, grün und blau dargestellt. (A) Seitenansicht des Oktamers. (B) Aufsicht. Die zentrale Kavität hat einen Durchmesser von etwa 30 Å.

Basierend auf der Komplexstruktur der humanen UDP-*N*-Acetylglucosamin Pyrophosphorylase AGX1 mit UDP-GlcNAc (Peneff et al., 2001) wurde UDP-Glukose in das aktive Zentrum von Ugp1p modelliert und ist zur Orientierung in den Abbildungen in *ball-and-stick* Darstellung im aktiven Zentrum dargestellt. Der Kern des Oktamers wird von den dicht gepackten  $\beta$ -Helix-Domänen gebildet. Die Protomere bilden etwa an der zweizähligen kristallographischen Symmetrieachse laterale Flächenkontakte den benachbarten Protomeren aus. Auf diese Weise sind die vier Protomere nach der Art eines Korbgeflechts die zentrale Kavität umgebend arrangiert. Die Interaktion erfolgt lateral über die aus grösstenteils ungeladenen oder hydrophoben Resten bestehende Aussenfläche der  $\beta$ -Helices. Im Oligomerisierungs-Interface sind die Reste His448, Thr450, Ile469, Val470, Val489, and Thr491 von gegenüberliegenden Monomeren miteinander in einer starken hydrophoben Interaktion verschränkt (Abb. 46).



**Abb. 46: Oligomerisierungs-Schnittstelle im Detail.** Bei der hydrophoben Interaktion sind die an der Oligomerisierung beteiligten Reste ineinander verschränkt. Mit der Beteiligung der C-terminalen His499 sind jeweils vier Monomere an der Interaktion beteiligt. Die negative Ladung der Carboxylgruppe des C-Terminus wird durch Lys422 neutralisiert.

Die jeweiligen Protomerpartner der interagierenden Monomere ergänzen das Oligomerisierungs-Interface über die Beteiligung ihres konservierten C-terminalen Restes His499. Das Oligomerisierungs-Interface wird von vier miteinander

interagierenden Monomeren gebildet. In Pilzen und vielzelligen Tieren wird die negative Ladung der Carboxylatgruppe des C-Terminus der Polypeptidkette innerhalb der hydrophoben Umgebung des Oligomerisierungs-Interface durch Lys422 kompensiert. Das Oligomerisierungs-Interface verbirgt 787 Å<sup>2</sup> der für eine Wassersonde zugänglichen molekularen Oberfläche. Die N-terminalen Domänen und die SGC-Domänen bilden innerhalb des Oktamers keine Kontakte zueinander aus. Die Ausnahme bildet der Rest Arg311, der eine Schleife in der C-terminalen Domäne eines benachbarten Monomers kontaktiert. Arg311 ist jedoch nicht konserviert, so dass eine mögliche regulatorische Bedeutung dieser Interaktion fraglich ist.

### ***Bedeutung der N-terminalen Region für die Regulation der Enzymaktivität***

Durch die Identifizierung einer Phosphorylierungsstelle an Ser11 wurde bereits auf eine mögliche Regulation der Enzymaktivität von Ugp1p durch das N-terminale Segment hingewiesen (Rutter et al., 2002). Um den Einfluss einer Phosphorylierung an Ser11 auf die Enzymaktivität von Ugp1p zu untersuchen, wurde versucht, die Phosphorylierung an der Position 11 durch Punktmutation mit der Einführung einer negativen Ladung zu imitieren. Die Aminosäuresubstitutionen S/D und S/E können unter Umständen eine konstitutive Phosphorylierung imitieren (Leger et al., 1997; Phillips et al., 2006). Ugp1p Mutanten mit den Punktmutationen S11D und S11E wurden durch zielgerichtete Mutagenese hergestellt und bis zur Homogenität aufgereinigt. Eine S11A Mutante wurde als Kontrolle verwendet (nicht gezeigt). Die kinetischen Parameter der S11D und S11E Mutanten wurden für beide Substrate UDP-Glukose und PP<sub>i</sub> in der Pyrophosphorylase Richtung bestimmt. In der Richtung der UDP-Glukose Synthese wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen nur stichpunktartig bestimmt. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten für UDP-Glukose sind mit  $V_{\max (S11D)} = 0,209 \pm 0,007$  nmol/min/ng und  $V_{\max (S11E)} = 0,198 \pm 0,009$  nmol/min/ng im Vergleich zum Wildtyp Protein praktisch identisch ( $V_{\max (Ugp1p)} = 0,233 \pm 0,003$  nmol/min/ng). Die  $K_M$ -Werte der S11D und S11E Mutanten betragen für UDP-Glukose  $K_M (S11D) = 64 \pm 11$  µM und  $K_M (S11E) = 66 \pm 14$  µM. Die Werte sind leicht, aber nicht signifikant gegenüber den  $K_M$ -Werten für UDP-Glukose des Wildtyp-Proteins erniedrigt ( $K_M (Ugp1p) = 81 \pm 3$  µM). Die S11A Mutante zeigte ebenfalls keine signifikante Veränderung in der

Pyrophosphorylase Aktivität im Vergleich zu den Punktmutanten und zum Wildtyp Protein. In der Richtung der UDP-Glukose Synthese konnte ebenfalls keine signifikante Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeiten in den S11D und S11E Mutanten nachgewiesen werden (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Kinetische Parameter von Ugp1p und -Mutanten**

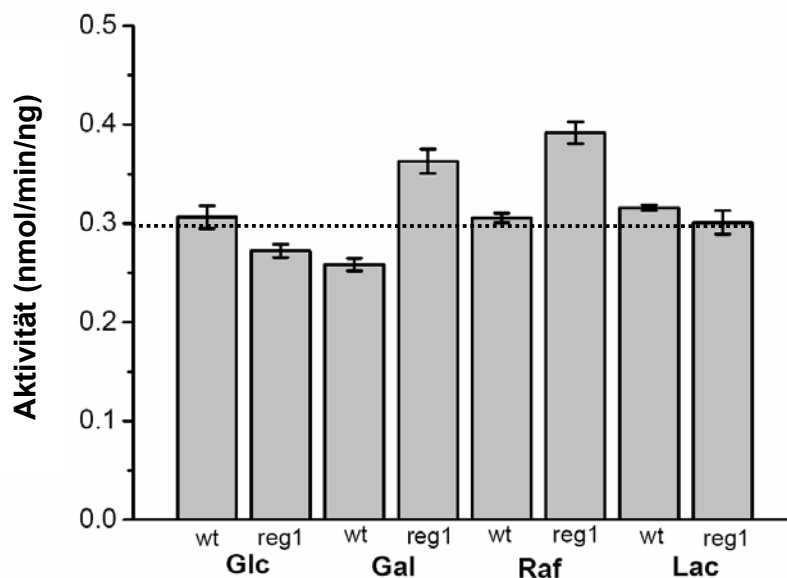
	$K_M$ (UDP-Glukose) ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (nmol/min/ng)
<b>Ugp1p (endogen)</b>	82 +/-4	0,213 +/- 0,0033
<b>Ugp1p (rekombinant)</b>	81 +/- 3	0,233 +/-0,0030
<b>Ugp1p S11D</b>	64 +/-11	0,208 +/- 0,0072
<b>Ugp1p S11E</b>	75 +/- 14	0,198 +/- 0,0086

Die Mutation von Serin zu sauren Aminosäuren, die möglicherweise den Effekt einer Phosphorylierung an Ser11 imitieren können, zeigte *in vitro* keinen Effekt auf die Enzymaktivität von Ugp1p. Diese Beobachtung ist konsistent mit der persönlichen Mitteilung von J. Rutter, der keinen Effekt der Phosphorylierung durch die PAS-Kinase auf die Enzymaktivität von Ugp1p *in vitro* nachweisen konnte. *In vivo* könnte eine Phosphorylierung an Ser11 die Enzymaktivität von Ugp1p beispielweise durch die Öffnung einer Bindungstasche für niedermolekulare Effektormoleküle regulieren. Als mögliche allosterische Effektoren für Ugp1p wurde die Wirkung einiger wichtiger Metaboliten auf die Aktivität von Ugp1p, Ugp1p(S11D) und Ugp1p (S11E) kurz untersucht. Als Effektoren wurden Fruktose-1,6-Bisphosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat, 3-Phosphoglyzerat, sowie ATP, AMP, Galaktose-1-Phosphat und Galaktose-6-Phosphat untersucht. Es wurde allerdings für keine der getesteten Verbindungen ein modifizierender Effekt auf die Enzymaktivität gefunden.

***Effekt der Deletion von reg1 auf die UDP-Glucose Pyrophosphorylase Aktivität***

Glukose ist die bevorzugte Kohlenstoffquelle von *S. cerevisiae*. Andere Kohlenhydrate werden nur verwertet, sofern keine Glukose zur Verfügung steht. Die Expression von Genen, die für die Verwertung anderer Kohlenhydrate benötigt

werden, ist in Gegenwart von Glukose reprimiert (Glukoserepression). Anfangs wurde Ugp1p aus einem Hefestamm, in dem das Gen *reg1* deletiert war, aufgereinigt. In *S. cerevisiae* ist das *reg1*-Protein eine regulatorische Untereinheit des Protein Phosphatase Komplexes Glc7p (Alms et al., 1999). Glc7p wirkt antagonistisch zur Protein Kinase SNF1 und ist an der Regulation von Glukose-reprimierten Genen beteiligt (Huang et al., 1996). Zur Umgehung der Glukose-Repression bei der rekombinanten Expression der Galaktose-Promotor-regulierten TRiC-Gene wurde von Dr. Ulrike Böttcher ein Hefestamm mit  $\Delta$ *reg1*-Genotyp verwendet. Als Typ1-Protein Phosphatase ist Glc7p an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt, darunter Zellzyklusprogression, Translation, Sporulation und an der Glykogenakkumulation (Tu and Carlson, 1995).



**Abb. 50: Bestimmung der UGPase Aktivitäten von Wildtyp- und  $\Delta$ *reg1*-Hefen bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.** Die *reg1*-Deletion scheint unter den getesteten Wachstumsbedingungen keine signifikante Veränderung der Gesamt-Pyrophosphorylase Aktivität zu verursachen.

Um einen möglichen Einfluss des  $\Delta$ *reg1*-Genotyps auf die UGPase-Aktivität in Hefelysaten untersuchen, wurde die UDP-Glukose Pyrophosphorylase-Aktivität des Gesamtproteins aus Zelllysaten von  $\Delta$ *reg1*-Hefen mit Lysaten einem sonst isogenen Stamm verglichen. Hier wurde der Einfluss der Kohlenstoffquellen Glukose,



Galaktose, Raffinose und enzymatisch gespaltener Laktose auf die Pyrophosphorylase Aktivität getestet. Ein Glukosemedium entspricht etwa den Bedingungen, unter denen kommerziell erhältliche Hefe kultiviert wird (industriell wird Melasse oder Zuckersirup verwendet). Die Expression von Plasmiden mit Galaktose-Promotor wurde von Dr. Ulrike Böttcher mit enzymatisch gespaltener Laktose, einer Mischung aus Galaktose, Glukose und Laktose, induziert. Der Vergleich der UDP-Glukose Pyrophosphorylase Aktivitäten im Gesamtprotein der getesteten Extrakte zeigt jedoch nur leichte Schwankungen (Abb. 50). Signifikante Unterschiede in der UDP-Glukose Pyrophosphorylase Aktivität zwischen Wildtyp- und  $\Delta$ reg1 *S. cerevisiae* konnten unter verschiedenen Wachstumsbedingungen nicht nachgewiesen werden, d.h. eine Modulation der UDP-Glukose Pyrophosphorylase Aktivität durch das reg1-Protein tritt nicht auf.

## Diskussion Teil 2

### **Charakterisierung von Ugp1p**

Die vorliegende Arbeit beschreibt die strukturelle und biochemische Charakterisierung von Ugp1p, der UDP-Glukose Pyrophosphorylase (UGPase) aus *S. cerevisiae*. Im Gegensatz zur pflanzlichen UGPase, die als Monomer in aktiver Form vorliegt (Martz et al., 2002), ist in *S. cerevisiae* offenbar ein Oktamer die aktive Form der UGPase. Diese Tatsache wurde durch die Ergebnisse verschiedener Methoden bewiesen. Zunächst erscheint endogenes Ugp1p im Elektronenmikroskop als überwiegend homogene Population von recht grossen Partikeln mit einem Durchmesser von etwa 150 Å, die vierzählige Symmetrie aufweisen. Das anhand statischer Lichtstreuung ermittelte Molekulargewicht von Ugp1p entspricht mit  $449 \pm 1.3$  kDa dem theoretischen Molekulargewicht eines Oktamers aus identischen Untereinheiten. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis aus der statischen Lichtstreuung läuft Ugp1p in der analytischen Gelfiltration als Makromolekül mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ~400 kDa. Die UDP-Glukose Pyrophosphorylase Aktivität konnte auch nur in Fraktionen, die auch das Oktamer enthalten sollten, nachgewiesen werden. Nachdem freie Untereinheiten mit beiden Methoden nicht nachgewiesen werden konnten, scheinen Monomere nicht vorzukommen, d.h. Ugp1p bildet offenbar ausschliesslich stabile Oktamere. Wie bereits für die Pyrophosphorylasen aus anderen Spezies gezeigt werden konnte (Turnquist et al., 1974), ist auch die Enzymaktivität von Ugp1p von divalenten Kationen ( $Mg^{2+}$ ) abhängig, was als charakteristisches Kriterium für alle Pyrophosphorylasen gilt. Die spezifische Aktivität des Ugp1p Oktamers beträgt 240 U/mg. Ähnlich hohe spezifische Aktivitäten von jeweils 200 U/mg wurden für die ebenfalls oktameren Enzyme aus *Bos taurus* und *Homo sapiens* (Lebergewebe) bestimmt (Turnquist et al., 1974). Die Enzymaktivität von Ugp1p folgt der Michaelis-Menten-Kinetik und verläuft daher nicht kooperativ. Dies ist in Übereinstimmung mit der einfachen Michaelis-Menten Kinetik, die auch für andere oktamer UGPasen gefunden wurde (Chang et al., 1996; Turnquist et al., 1974). Die von Ugp1p katalysierte Reaktion verläuft in beide Reaktionsrichtungen mit ähnlichen maximalen Geschwindigkeiten und die  $K_M$ -Werte und damit wahrscheinlich auch die Affinitäten sind für alle Substrate ähnlich. Unter normalen zellulären Bedingungen sollte also

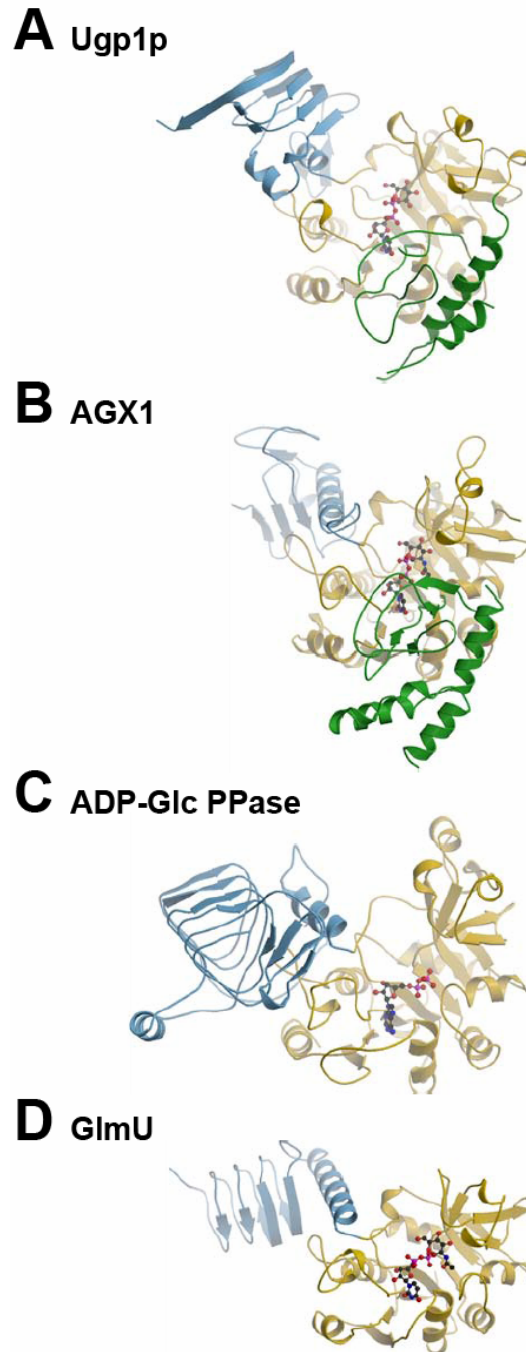
sowohl die Reaktionsrichtung, als auch die Reaktionsgeschwindigkeit allein durch die Michaeliskonstanten (Affinitäten) und die Konzentrationen der Substrate bestimmt sein.

### ***Symmetrie des Ugp1p-Partikels***

Das Oktamer wird im Kristall durch die kristallographische 222-Symmetrie aus der asymmetrischen Einheit gebildet. Im Kristall weicht das Oktamer also von einer echten vierzähligen 422-Symmetrie ab und erscheint in der Aufsicht leicht diagonal verzerrt. Dort betragen die Diagonalen des Oktamers 167 Å und 148 Å. Die Analyse der Elektronenmikrographen von Ugp1p durch die Korrespondenzanalyse von 839 Partikeln identifizierte jedoch ein Partikel mit echter vierzähliger Symmetrie. Die Abweichung von der 422-Symmetrie im Kristall ist also wahrscheinlich nur auf Kristallpackungseffekte zurückzuführen. In Lösung zeigt das Ugp1p-Partikel wahrscheinlich eine echte 422-Symmetrie.

### ***Vergleich der Struktur von Ugp1p mit anderen SGC-Domänen Proteinen***

Der SGC-Fold wurde als gemeinsames strukturelles Kernelement in den Strukturen der Glykosyltransferase 2 SpsA und der *N*-Acetylglukosaminyltransferase GnT1 identifiziert (Unligil et al., 2000). Die Bezeichnung SGC ist von **SpsA GnT1 core** abgeleitet (Unligil et al., 2000). Die SGC-Domäne beinhaltet das aktive Zentrum vieler Glykosyltransferasen und Pyrophosphorylasen und bildet die Nukleotidzucker- und Pyrophosphat-Bindungstasche. Der Rossmann-ähnliche SGC-Fold ist charakterisiert durch ein achtsträngiges  $\beta$ -Faltblatt, das seitlich von  $\alpha$ -Helices flankiert ist. Mehrere SGC-Domänen Proteine wurden bereits strukturell charakterisiert, so kommt der SGC-Fold ausser in SpsA (Charnock and Davies, 1999) und GnT1 (Unligil et al., 2000) auch in komplexeren Strukturen, wie etwa der  $\beta$ 4-Galaktosyltransferase T1 (Gastinel et al., 1999), GlmU (Brown et al., 1999), den Spleiss-Isoformen der eukaryotischen UDP-*N*-Acetylglukosamin Pyrophosphorylase AGX1/AGX2 (Peneff et al., 2001) und der ADP-Glukose Pyrophosphorylase (McCoy et al., 2006) vor. Abb. 51 zeigt einen Vergleich von Ugp1p mit den funktionell und strukturell am nächsten verwandten SGC-Domänen Proteinen AGX1, GlmU und der ADP-Glukose Pyrophosphorylase.



**Abb. 51 : Vergleich der Struktur von Ugp1p mit anderen SGC-Domänen Proteinen.** Die SGC-Domänen Proteine weisen die charakteristische SGC-Kerndomäne auf (gelb), charakterisiert durch ein achtsträngiges  $\beta$ -Faltblatt, das seitlich von  $\alpha$ -Helices flankiert ist. Das jeweilige Substrat ist im aktiven Zentrum dargestellt. Agx1 und Ugp1p haben eine N-terminale Domäne (grün) mit ähnlicher Topologie, die in den Strukturen von GImU und ADP-Glc Pyrophosphorylase fehlt. Die linksgängige  $\beta$ -Helix kommt auch in der C-terminalen Domäne (blau) von GImU und ADP-Glc Pyrophosphorylase vor und vermittelt die Oligomerisierung.

Die SGC-Domäne bildet die katalytische Kerndomäne dieser Strukturen. Die modulare Domänenorganisation ist in den gezeigten SGC-Domänen Proteinen einheitlich. Unterschiede zwischen den gezeigten Strukturen bestehen hauptsächlich in den N- und C-terminalen Domänen. In der C-terminalen Domäne von Ugp1p findet sich das Faltungsmotiv der linksgängigen  $\beta$ -Helix. Das  $\beta$ -Helix Motiv wurde auch in den Strukturen von GlmU und der ADP-Glukose Pyrophosphorylase gefunden (Brown et al., 1999; Jin et al., 2005), in der Struktur von AGX1 fehlt jedoch dieses Element. Obwohl in der C-terminalen Domäne der eukaryotischen UDP-N-Acetylglukosamin Pyrophosphorylase AGX1 keine  $\beta$ -Helix vorkommt, weist Ugp1p die grösste strukturelle Ähnlichkeit zu AGX1 unter den gezeigten SGC-Domänen Proteinen auf. So können Ugp1p und AGX1 im Bereich der SGC-Domäne mit einer Standardabweichung von 1,624 Å über 296 C $_{\alpha}$ -Atome überlagert werden. Darüberhinaus weisen Ugp1p und AGX1 eine N-terminale Domäne mit ähnlicher Topologie auf: in AGX1 wird die N-terminale Domäne aus vier  $\alpha$ -Helices gebildet, die mit zwei  $\beta$ -Haarnadel Strukturen aus der Kerndomäne eine globuläre Domäne mit Ähnlichkeit zur N-terminalen Domäne von Ugp1p bilden. In den Strukturen von GlmU und der ADP-Glukose Pyrophosphorylase fehlt dagegen eine N-terminale Domäne.

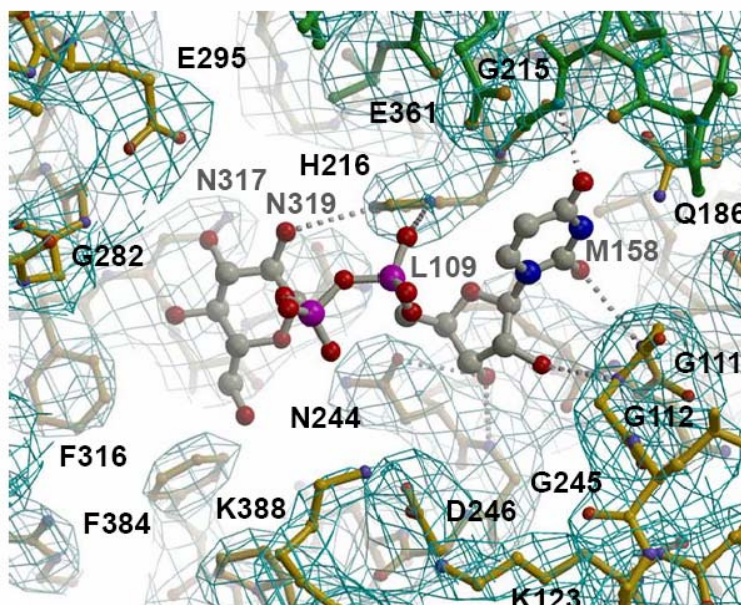
### ***Das aktive Zentrum***

Die Nukleotidzucker-Bindungstasche der SGC-Domäne wurde bereits gut charakterisiert und mehrfach detailliert beschrieben (Brown et al., 1999; Jin et al., 2005; Peneff et al., 2001). Wichtige, an der Substrat- und Metallbindung beteiligte Reste des aktiven Zentrums sind in den SGC-Domänen Proteinen konserviert. So wurde ein Signaturmotiv, das im aktiven Zentrum mehrerer Pyrophosphorylasen vorkommt, 1998 beschrieben (Mio et al., 1998). Aufgrund einer fehlenden Enzym-Substrat Komplexstruktur wurde das aktive Zentrum von Ugp1p durch Überlagerung mit den Enzym-Substrat Komplexstrukturen von GlmU, Agx1/Agx2 und der ADP-Glukose Pyrophosphorylase lokalisiert und identifiziert<sup>7</sup>. Im aktiven Zentrum von Ugp1p findet sich das Signaturmotiv LX<sub>2</sub>GXGTX<sub>6</sub>PK und mehrere konservierte Reste, die in den Komplexstrukturen von GlmU, Agx1/Agx2 und der ADP-Glukose Pyrophosphorylase an der Substratbindung beteiligt sind. Aufgrund der strukturellen

---

<sup>7</sup> Ugp1p kann mit Agx1 im Bereich der SGC-Domäne über 296 C $_{\alpha}$ -Atome mit einer Standardabweichung von 1,62 Å überlagert werden.

Ähnlichkeit der Substratbindungstaschen von Ugp1p und Agx1 konnte das Substrat UDP-Glukose durch Überlagerung von Ugp1p mit der Agx1:UDP-GlcNAc Komplexstruktur in das aktive Zentrum modelliert werden (Abb. 52). UDP-Glukose wurde dabei in der Konformation von UDP-GlcNAc übernommen. In dem Modell kontaktiert das Nukleotid die Hauptkettenreste 109<sub>(Ugp1p)</sub>-Leu-Asn-Gly-Gly-112<sub>(Ugp1p)</sub>, die Teil des SGC-Signaturmotivs sind. Das Nukleosid steht in van-der-Waals Kontakten mit Leu109 and Met158. Die Uridylbase bildet Wasserstoffbrücken zu den Hauptkettenamiden von Gly215 und Gly111. Gly215 ist in Ugp1p Teil der N-terminalen Domäne und könnte allosterische Regulation durch das N-terminale Segment vermitteln.



**Abb. 52: Modell des aktiven Zentrums von Ugp1p.** UDP-Glukose ist in das aktive Zentrum modelliert. Die Uridylbase wird von Gly111 und Gly112 kontaktiert, die Teil des SGC-Signaturmotivs sind. His216 ist wahrscheinlich essentiell für die katalytische Aktivität und könnte die Selektivität für UDP-Glukose über UDP-GlcNAc bedingen. Aminosäurereste, die zur N-terminalen Domäne gehören, sind in grün dargestellt.

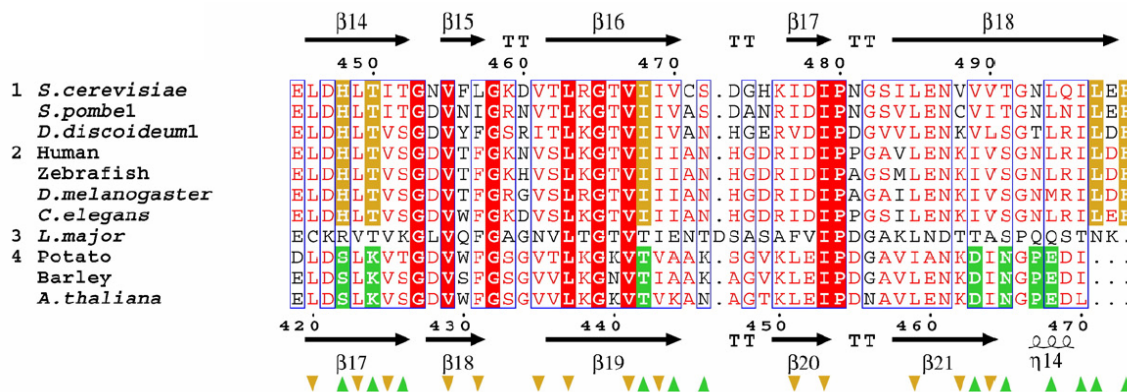
Die Riboseeinheit steht in Kontakt zu den Amidstickstoffen der Hauptkette von Gly112 und Gly245, sowie dem Carbonylsauerstoff der Seitenkette von Asn244. Das exponierte His216 kontaktiert im Modell das  $\alpha$ -Phosphat des Nukleotids und die 2'-OH-Gruppe des Glukoserings und ist wahrscheinlich für die katalytische Aktivität

essentiell. Die Seitenkette von His216 könnte in Ugp1p die Selektivität von UDP-Glukose gegenüber UDP-GlcNAc bestimmen, da His216 sterisch mit der sperrigen 2-Acetylaminogruppe von UDP-GlcNAc interferieren würde. Entsprechend ist das Histidin in der Struktur von Agx1 gegen ein Asparagin ersetzt. Lys388 ist in allen SGC-Domänen Proteinen konserviert und wurde anhand von Mutationsstudien an der UGPase aus der Kartoffelknolle als essentiell für die katalytische Aktivität identifiziert (Katsube et al., 1991). Im Komplex von Agx1 mit UDP-GlcNAc steht der Glukosering durch Wasserstoffbrücken mit Gly290, Glu303 und Asn327 in Kontakt (Peneff et al., 2001). Im aktiven Zentrum von Ugp1p würden die konservierten Reste Gly282, Glu295 und Asn317 die Glukoseeinheit kontaktieren. Allerdings sind diese Reste im vorliegenden Modell nicht in ausreichender Entfernung zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit den Hydroxylgruppen des Glukoseringes. Es ist anzunehmen, dass die Substratbindung eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum von Ugp1p induziert, die die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum Glukosering ermöglicht. In Übereinstimmung mit der vorgeschlagenen Konformationsänderung wurde für die UGPasen aus Kalbsleber und aus *Leishmania major* ein sequentieller bi-bi Mechanismus der Katalyse gefunden, bei dem das Nukleosid oder UTP vor Glukose-1-Phosphat an das aktive Zentrum binden muss. Auch in den Studien zum Reaktionsmechanismus von Gillet *et al.* und Lamerz *et al.* konnte Glukose-1-Phosphat in Abwesenheit von UTP nicht im aktiven Zentrum nachgewiesen werden (Gillett et al., 1971; Lamerz et al., 2006). Eine neue, unlängst veröffentlichte Komplexstruktur der *A. thaliana* UGPase mit gebundener UDP-Glukose (PDB code 1ICY) beweist die Gültigkeit des Modells. UDP-Glukose liegt in der Komplexstruktur der *A. thaliana* UGPase und in dem Modell von Ugp1p in nahezu identischer Konformation vor. Viele Substratkontakte, die anhand des Modells identifiziert wurden, finden sich auch in der Komplexstruktur der *A. thaliana* UGPase als an der Substratbindung beteiligt.

### **Grundlage der Oligomerstruktur von Ugp1p**

*S. cerevisiae* Ugp1p und die UGPasen aus Kalbs- und Kaninchenlebergewebe sind als Oktamer aktiv (Turnquist, 1973). Es wurde zwar auch für die pflanzliche UGPase gezeigt, dass verschiedenartige Oligomere vorkommen, jedoch ist in Pflanzen offenbar das Monomer die aktive Form der UGPase (Martz et al., 2002). Obwohl die

Aminosäuresequenz der UGPasen zwischen Pflanzen und Tieren/Pilzen insgesamt hochgradig konserviert ist, finden sich markante Unterschiede in den Sequenzen in der C-terminalen Region, die in Ugp1p die Oligomerisierung vermittelt. Anhand eines Sequenzalignments ausgewählter UGPasen aus Pilzen, Pflanzen, Metazoen und des Protozoen *Leishmania major* (Abb. 53) wird deutlich, dass die hydrophoben Reste in den Protomer- und Oligomerisierungs-Schnittstellen in den Sequenzen der Pilze und Metazoen hochgradig konserviert sind. In den Sequenzen der Pflanzen finden sich dort dagegen mehrere polare und geladene Reste, etwa S434, K450, T468, D489, N491, P493 und E494. Wichtige Reste, die in der Struktur von Ugp1p die hydrophobe Interaktion innerhalb der Oligomerisierungs-Schnittstelle vermitteln (siehe auch Abb. 46), sind in Pflanzen durch His448Ser, Thr450Lys, Ile468Thr, Val/Ile470Ala/Lys und Val489Asp ersetzt. Diese polaren und geladenen Reste würden die hydrophobe Oligomerisierung erheblich stören. In den Sequenzen der Pflanzen sind die polaren und geladenen Reste darüberhinaus in auffälliger Weise konserviert (Abb. 53).

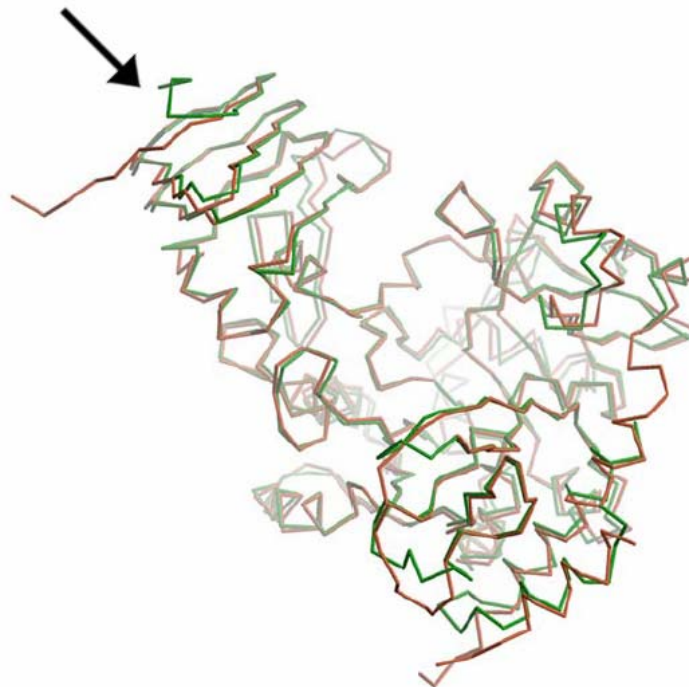


**Abb. 53: Konservierungsmuster im Bereich der C-terminalen Oligomerisierungs-Schnittstelle ausgewählter UGPase-Sequenzen aus Pilzen, Pflanzen, Metazoa und *L. major*.** Für die Oligomerisierung wichtige, hydrophobe Reste sind in den Sequenzen der Pilze und Metazoen konserviert. In Pflanzen kommen im Bereich der Oligomerisierungs-Schnittstelle dagegen polare und geladene Reste vor, die eine hydrophobe Interaktion erheblich stören würden. Die nur entfernt verwante monomere UGPase von *Leishmania major* hat im Bereich der Oligomerisierungs-Schnittstelle hydrophile Reste.

In der Aminosäuresequenz der nur noch entfernt verwandten, monomeren UGPase aus *Leishmania major* hat der C-Terminus überwiegend hydrophilen Charakter. Es ist daher unwahrscheinlich, dass pflanzliche UGPasen und auch die UGPase aus



*Leishmania major* ähnlich aufgebaute Oktamere wie Ugp1p bilden. Der am C-Terminus gelegene verlängerte  $\beta$ -Strang  $\beta$ 18 vermittelt die Protomerisierung von Ugp1p und ist mit dem C-terminalen Tripeptid LE/DH auch an der Oligomerisierung beteiligt. Das C-terminale Tripeptid L(E/D)H mit dem Rest His499, der in allen Pilzen und Metazoen konserviert ist, fehlt in den Sequenzen der Pflanzen. Eine Überlagerung der Struktur von Ugp1p mit der UGPase aus *A. thaliana* zeigt darüberhinaus, dass sich die Strukturen im Bereich der SGC-Domäne und der  $\beta$ -Helix kaum unterscheiden<sup>8</sup>, jedoch das C-terminale Segment in der Struktur von *A. thaliana* nicht als verlängerter  $\beta$ -Strang, sondern in Form einer kurzen  $3_{10}$ -Helix vorliegt (Abb. 54). In der Struktur von *A. thaliana* wird die Ausbildung des verlängerten  $\beta$ -Stranges und damit die Protomerisierung offenbar durch den Austausch von Asn493 durch das konservierte Pro467 verhindert, das die Bildung einer kurzen  $3_{10}$ -Helix am C-Terminus initiiert.



**Abb. 54: Überlagerung der C $_{\alpha}$ -Ketten der UGPasen aus *S. cerevisiae* (rot) und *A. thaliana* (grün).** Der für die Protomerisierung wichtige verlängerte  $\beta$ -Strang am C-Terminus liegt in der Pflanzenstruktur als kurze  $3_{10}$ -Helix vor (Pfeil). Aufgrund des Fehlens der Protomerisierungs- und Oligomerisierungs-Schnittstellen dürften pflanzliche UGPasen anders aufgebaute Oligomere bilden.

<sup>8</sup> Die beiden Strukturen können mit einer Standardabweichung von 0,966 Å über 437 C $_{\alpha}$ -Atome überlagert werden.

Der molekulare Aufbau pflanzlicher Oligomere und der Mechanismus der Regulation pflanzlicher UGPasen bleibt indessen unbekannt. Es lässt sich jedoch sagen, dass Ugp1p und pflanzliche oligomere UGPasen sich im Aufbau des Oligomers grundlegend unterscheiden dürften, während wahrscheinlich alle UGPasen aus Metazoen und Pilzen Ugp1p-ähnliche Oktamere bilden.

### ***Regulation der Enzymaktivität***

Während die Aktivität pflanzlicher UGPasen über Assoziation und Dissoziation, d.h. über die Bildung inaktiver Oligomere bzw. aktiver Monomere reguliert zu sein scheint (Martz et al., 2002), wird die Enzymaktivität von *S. cerevisiae* Ugp1p offenbar nicht über Oligomerisierung reguliert. So wurden ausschliesslich stabile Ugp1p Oktamere gefunden, eine Dissoziation des Oktamers konnte unter den experimentellen Bedingungen nicht nachgewiesen werden. In Ugp1p wird die Oligomerisierung über die C-terminalen Domänen vermittelt; die katalytischen SGC-Domänen und die N-terminalen Domänen sind nicht an der Oligomerisierung beteiligt (Abb. 41, Abb. 42). Eine Regulation von Ugp1p über Änderungen im oligomeren Zustand würde erfordern, dass allosterische Effekte von der Oligomerisierungs-Schnittstelle in der C-terminalen Domäne an das aktive Zentrum in der SGC-Domäne vermittelt werden. Die relativ starren  $\beta$ -Helices verfügen aber wahrscheinlich nicht über die notwendige Flexibilität, um solche Effekte zu vermitteln. Darüberhinaus kommt es in der Struktur von Ugp1p auch nicht zur Ausbildung von Kontakten zwischen den katalytischen und N-terminalen Domänen der Monomere, die Hinweise auf eine koordinierte Enzymaktivität innerhalb des Oligomers geben könnten<sup>9</sup>. Die fehlenden Kontakte der Monomere erklären, weshalb keine Kooperativität der Enzymaktivität von Ugp1p gefunden wurde. Aufgrund der Ähnlichkeit der UGPasen aus Metazoen und Pilzen lässt sich sagen, dass eine durch Assoziation und Dissoziation vermittelte Regulation in allen oktameren UGPasen der Metazoen und Pilzen wahrscheinlich nicht vorkommt. Die Regulation der pflanzlichen UGPase stellt also offenbar einen Sonderfall dar. Viele Stoffwechselreaktionen, so auch die Stärkesynthese, sind in Pflanzen lichtabhängig und durch Redox-Modifikation reguliert. In der Struktur der UGPase

---

<sup>9</sup> Die Ausnahme bildet der Rest Arg311, dieser einzelne Rest ist jedoch nicht konserviert und eine mögliche regulatorische Bedeutung dieser Interaktion ist daher fraglich.

von *A. thaliana* gibt es keine zur Ausbildung von Disulfidbrücken geeigneten Cysteinpaare, die auf eine mögliche Redox-Modifikation des Enzyms hinweisen könnten. Vielleicht erfolgt die Synthese des Speicherpolysaccharids Stärke (Amylose) deshalb in Pflanzen über einen Stoffwechselweg, der die Aktivität der UGPase umgeht. Im Gegensatz zur Glykogensynthese in Tieren und Pilzen, die im Zytosol abläuft, findet die Stärkesynthese in Pflanzen in speziellen Kompartimenten, den Amyloplasten statt (Entwistle and Rees, 1988). Darüberhinaus wird Stärke aus ADP-Glukose-Einheiten durch die Aktivität der Redox-regulierten ADP-Glukose Pyrophosphorylase synthetisiert (Ballicora et al., 2000; Sowokinos, 1976). Die Speicherpolysaccharidsynthese ist der Hauptkonsument von UDP-Glukose im Zytosol von Tieren und Pilzen. Im Zytosol der Pflanzen könnte die lokal gebündelte Aktivität eines hochaktiven UGPase-Oligomers aufgrund des Verbrauches von Glukose-1-Phosphat metabolisch ungünstig sein.

Die Regulation der *S. cerevisiae* UGPase Ugp1p wird offenbar durch die N-terminale Domäne vermittelt. Rutter et al. fanden, dass der N-Terminus von Ugp1p in *S. cerevisiae* durch die PAS-Kinase phosphoryliert wird und schlugen eine durch Phosphorylierung vermittelte Regulation der Enzymaktivität vor (Rutter et al., 2002). Rutter et al. zeigten, dass die PAS-Kinase für die Lebensfähigkeit von Hefezellen essentiell ist, wenn diesen Galaktose als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung gestellt wird. Ugp1p ist im sogenannten Leloir-Stoffwechselweg durch die Bereitstellung von UDP-Glukose an der Verwertung von Galaktose beteiligt (Frey, 1996). Die Autoren schlossen, dass die PAS-Kinase die Enzymaktivität von Ugp1p negativ regulieren müsse, da Hefen, welche eine enzymatisch inaktive Ugp1p Mutante überexprimieren, auf Galaktose-haltigem Medium wachsen können. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten die Autoren zeigen, dass die Überexpression einer nicht-phosphorylierbaren Ugp1p-Mutante (S11A) zum Absterben der Hefezellen bei Wachstum auf Galaktose führt. In dieser Arbeit wurde versucht, die negative Ladung des Phosphatesters am Serin-Rest durch die Einführung von S11D- und S11E-Punktmutationen nachzuahmen, jedoch zeigten die S11D/S11E Mutanten in biochemischen Analysen unveränderte Wildtyp-Aktivität. Diese Beobachtung steht in Einklang mit dem Befund, dass die Phosphorylierung von Ser11 durch die PAS-Kinase keinen Einfluss auf die Enzymaktivität von Ugp1p *in vitro* hat (J. Rutter, pers. Mitteilung). Die Konsequenz der Phosphorylierung von Ugp1p bleibt also unklar. Einerseits könnte die

Phosphorylierung von Ugp1p die intrazelluläre Lokalisierung des oktameren Enzymkomplexes regulieren. In der tetrameren Sucrose Synthase aus *Zea mays* induziert eine Phosphorylierung an Ser15 beispielsweise Konformationsänderungen eines flexiblen N-terminalen Segments, die die Membranassoziiierung des Enzyms beeinflussen (Hardin et al., 2004). UGPasen gelten zwar als überwiegend zytosolisch (Turnquist, 1973), jedoch wurden auch Populationen der UGPase gefunden, die mit den Membranen des Golgi-Apparates oder der Plasmamembran assoziiert sind (Becker et al., 1995; Persat et al., 1983). Eine partielle Membranlokalisierung der UGPase erscheint durchaus sinnvoll. Die Aktivität der UGPase würde an Orten erhöhten Verbrauches von UDP-Glukose, etwa der Membran des Golgi-Apparates und der Plasmamembran, UDP-Glukose Einheiten für die Synthese der Kernoligosaccharide der N-Glykosylierung und die Synthese der Zellwandbestandteile, wie etwa  $\beta$ -Glukane und Zellulose, bereitstellen können. Im Hinblick auf die offenbar kritische Funktion der Phosphorylierung von Ugp1p bei der Galaktoseverwertung erscheint die Notwendigkeit einer bestimmten Lokalisierung des Enzymkomplexes nicht offensichtlich. Die Phosphorylierung an Ser11 könnte die Enzymaktivität von Ugp1p vielmehr durch die Änderung von Affinitäten oder durch die Öffnung von Bindungstaschen für allosterische Effektormoleküle modulieren; ein Mechanismus, der auch für die Regulation anderer oligomerer Enzyme des Zuckerstoffwechsels gefunden wurde. Die Glykogen Phosphorylase existiert beispielsweise in einer unphosphorylierten *a*-Form, deren Aktivität durch die Bindung von allosterischen Effektoren moduliert werden kann und in einer aktiveren *b*-Form, die am N-Terminus (Ser14) phosphoryliert ist (Busby and Radda, 1976). In phosphorylierter Form könnte Ugp1p empfindlich für allosterische Regulation durch Metabolite des Leloir-Stoffwechselweges sein, was die kritische Funktion der PAS-Kinase bei Wachstum von Hefen auf Galaktosemedium erklären könnte.

Obwohl der Effekt der Phosphorylierung an Ser11 auf die Enzymaktivität nicht geklärt werden konnte, gibt es Hinweise für eine regulatorische Funktion der N-terminalen Domäne von Ugp1p. Das an der Peripherie gelegene N-terminale Segment von Ugp1p ist offenbar flexibel und weist eine gewisse Mobilität auf. So konnte Ugp1p *in vitro* proteolytisch um ein N-terminales Segment von bis zu 21 Resten verkürzt werden. Darüberhinaus war das N-terminale Segment im Kristall offenbar stark fehlgeordnet und den Resten 1-19 konnte keine Elektronendichte

zugeordnet werden. In einer gestreckten Konformation dürfte ein N-terminales Segment von 21 Resten mit 70 Å im Prinzip über eine ausreichende Länge verfügen, um das aktive Zentrum, oder auch um benachbarte Monomere zu erreichen.

Die Struktur von Ugp1p ist die erste bekannte Struktur einer oligomeren UGPase und bildet die Grundlage für gezielte Mutagenesestudien an allen UGPasen aus Metazoen und Pilzen. Die UGPasen aus Pflanzen unterscheiden sich gegenüber den UGPasen aus Metazoen/Pilzen in grundlegenden Eigenschaften des oligomeren Zustandes und der Regulation. Die molekularen Mechanismen der Regulation sind jedoch noch nicht erforscht. Das Ziel zukünftiger Forschung wird die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Regulation monomerer und oktamerer UGPasen anhand molekularbiologischer und biochemischer Ansätze sein.

## **Material und Methoden**

### ***Verbrauchsmaterialien und Chemikalien***

Abgen (Hamburg, BRD):

PCR Reaktionsgefäße 0,2 ml

Amersham Bioscience (Buckinghamshire, UK):

ECL (Blot-Entwicklungskit), Hyperfilm ECL, Proteinmarker für Gelfiltrationen

BioMol (Hamburg, BRD):

IPTG, HEPES

Bio-Rad Laboratories (Herkules, USA):

Ethidiumbromid, Affigel 15 Säulen, Protein Assay, Dye Reagent Concentrate

BMA (Rockland, USA):

LE Agarose

Difco (Detroit, USA):

Baktotrypton, Baktoyeast Extrakt, Bactoagar

Eppendorf (Hamburg, BRD):

Reaktionsgefäße

Fluka (Deisenhofen, BRD):

DMSO

Greiner (Finkenhausen, BRD):

Petrischalen, 24-well Platten

Invitrogen (Groningen, CH):

Vektoren

Merck (Darmstadt, BRD):

Benzonase, PEI-Zellulose F Dünnschichtchromatographiemembranen, EDTA, CDTA, NaCl, KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_3$ , NaOH, KOH, Tris, SDS,  $\beta$ -

Mercaptoethanol, APS, DTT, HCl, Methanol, NaCl, NaOH

New England Biolabs (Beverly, USA):

*E. coli* Zellen DH5 $\alpha$ F', Restriktionsenzyme und -Puffer, T4-DNA-Ligase und – Puffer, Deep Vent DNA Polymerase und Thmol Puffer, T7-DNA-Polymerase

Promega (Mannheim, BRD):

Pfu-DNA-Polymerase

Quiagen (Hilden, BRD):

Plasmid Mini und Midi Kits, QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAexII Gelextraktions Kit, PCR Purification Kit

Roche (Basel, CH):

ADP, ATP, Complete Protease Inhibitor Cocktail (ohne EDTA), DTT, DNA Standardmarker, Ampicillin, Proteinase K

Roth (Karlsruhe, BRD):

Polyacrylamid/0,8% Bisacrylamid (40%), SDS

Saliter (Obergünzburg, BRD)

Magermilchpulver

Schleicher & Schuell (Daßel, BRD):

Protran Nitrozellulose Transfer Membran

Serva (Heidelberg, BRD):

Aceton, Coomassie-Brilliant-Blau G-250

Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA):

Kanamycin, Proteinstandardmarker, Lysozym, Ethanol, Glukose,

Magnesiumacetat, PMSF

USB (Cleveland, USA):

Bovin Serum Albumin (BSA), HEPES, Tris,

Triton X-100, Tween-20

Weitere, eventuell hier nicht aufgelistete Chemikalien wurden standardmässig bei Sigma und Merck bezogen.

### **Gerätschaften**

Amersham/Pharmacia (Freiburg, BRD):

Äkta System, FPLC-System, SMART-System, vorgepackte Chromatographiesäulen (divers)

Amicon (Beverly, USA):

Vakuumfiltrationseinheit (0,2 mm), Konzentrationskammern zur Zentrifugation (Centriprep, Centricon)

Beckman (München, BRD):

DU640 Spektrophotometer, GS-6R Zentrifuge mit GH-3.8 Ausschwingrotor,

Avanti J-25 Zentrifuge, J6 MI Zentrifuge mit SS30 Rotor, Optima LE-80K

Ultrazentrifuge mit 70 Ti und 45 Ti Rotoren  
Bender & Hobein (Zürich, Schweiz):  
Vortex  
Bio-Rad (München, BRD):  
Elektrophoresekammer MiniProtean II  
Branson (Heusenstamm, BRD):  
Ultraschallbad R103H  
Eppendorf (Hamburg, BRD):  
Zentrifugen 5415C und 5417R  
Fujifilm (Japan):  
LAS3000 Bioimaging  
Glen Mills Inc. (Clifton, USA):  
BeadBeater  
Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA)  
Westernblot Apparatur Semi-Phor  
Life Science (Freiburg, BRD):  
Geltrockner SGD2000, Lyophilisator  
Kodak (Stuttgart, BRD):  
Filmentwickler X-Omat  
Max-Planck-Institut, Zentralwerkstatt (München, BRD):  
Agarosegel-Elektrophoresekammer, Kämme  
Mettler-Waagen (Gießen, BRD):  
Elektronische Feinwaage AE160, Laborwaage Toledo PB602  
Millipore (Eschborn, BRD):  
Deionisierungsanlage MilliQPlus PF, Sterilfilter 0,45 mm Millex-HA  
Misonix (Rockland, USA):  
Ultraschallstab Ultrasonic Converter CL4, Ultrasonic Processor XL  
Perkin Elmer (Weiterstadt, BRD):  
GenAmp2400 und Cyclor480 Thermocycler  
Savant (Holbrook, USA):  
Geltrockner SGD300



## **Bakterienstämme, Plasmide, Oligonukleotide, Enzyme, Antikörper**

### **Enzyme, Antikörper**

Die zum Restriktionsverdau und zur Ligation eingesetzten Enzyme und Puffer wurden von der Firma NEB hergestellt. Benzonase<sup>®</sup> Nuclease wurde bei Novagen, Pfu DNA Polymerase und Herculase<sup>®</sup> von der Firma Stratagene bezogen. Phosphoglucomutase, Glukose-6-Phosphat dehydrogenase, sowie UDP-Glukose dehydrogenase wurden von der Firma Sigma bezogen. Der HRP-konjugierte sekundäre Antikörper  $\alpha$ -Kaninchen IgG wurde von Sigma bezogen (A9169).

### **Plasmide**

pET28a (Novagen)  
pET28b (Novagen)  
pProEx HTa (Invitrogen)

### **Bakterienstämme**

BL21 (DE3): *B F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal (DE3)* (Novagene)  
DH5aF': *F'/endA1 hsdR17(r<sub>K</sub>-m<sub>K</sub>+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Na<sup>1</sup>r) relA1 D(lacZYA-argF)<sub>U169</sub>(m80lacZDM15)* (Novagene)

### **Hefestämme**

KSY355: *MATa ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1 $\Delta$ 63 his3 $\Delta$ 200 leu2 $\Delta$ 1  $\Delta$ reg1::loxP* (Katja Siegers)

### **Oligonucleotide**

Alle verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Metabion GmbH, Martinsried, synthetisiert.

DNA-Sequenzierungen wurde von Herrn Snezan Marinkovich, DNA Sequenzierungsservice (MPI core facility), durchgeführt.

Ugp1p f: 5' TCGTACATGTCCACTAAGAAGCACACCAAACACATTCC

Ugp1p r: 5' GTGCTCGAGTCAATGTTCCAAGATTTGCAAATTACCAGTAAC

Ugp1p  $\Delta$ 1-11 f: 5' TCGTACATGTCCACTTATGCATTCGAGAGCAACACAAAC

Ugp1p S11E f: 5' GAAGCACACCAAAACACATGAGACTTATGCATTTCGAGAGCAAC  
 Ugp1p S11E r: 5' GTTGCTCTCGAATGCATAAGTCTCATGTGTTTTGGTGTGCTTC  
 Ugp1p S11D f: 5' GAAGCACACCAAAACACATGACACTTATGCATTTCGAGAGC  
 Ugp1p S11D r: 5' GCTCTCGAATGCATAAGTGTGCATGTGTTTTGGTGTGCTTC  
 Ugp1p S11A f: 5' AGCACACCAAAACACATGCCACTTATGCATTTCGAG  
 Ugp1p S11A r: 5' CTCGAATGCATAAGTGGCATGTGTTTTGGTGTGCT

### ***Medien und Standardpuffer***

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die Zusammensetzungen aller Medien und Standardpuffer dem Laborhandbuch „Molecular Cloning“ (Maniatis, 1989) entnommen.

**LB-Medium**                    10 g/l Bacto-Trypton  
                                       5 g/l Bacto-Hefeextrakt  
                                       10 g/l NaCl  
                                       (für Platten wurde 15 g/l Agar zugegeben)

**5x M9 Salze**                    64 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O  
                                       15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                       2,5 g NaCl  
                                       5 g NH<sub>4</sub>Cl

**M9 Medium**                    200 ml 5x M9 Salze  
                                       2 ml 1M MgSO<sub>4</sub> (steril)  
                                       20 ml 20% Glukose (steril)  
                                       0,1 ml CaCl<sub>2</sub> (steril)

**Psi broth**                        5 g/l Bacto-Hefe Extrakt  
                                       20 g/l Bacto-Trypton  
                                       5 g/l MgSO<sub>4</sub>  
                                       (mit KOH auf pH 7,6 eingestellt)

**YPD-Medium**                    10 g/l Bacto-Hefe Extrakt

20 g/l Bacto-Pepton  
20 g/l Glukose  
(für Platten wurde 15 g/l Agar zugegeben)

**SC-Medium** 6,7 g/l Hefe Nitrogen Base  
20 g/l Glukose  
2 g/l Drop-out Mix  
(für Platten wurde 15 g/l Agar zugegeben)

**Drop-out-Mix** 0,5 g Adenine  
2 g *para*-Aminobenzoesäure (PABA)  
4 g Leucine  
je 2 g Alanin, Arginine, Asparagin, Aspartat, Cystein,  
Glutamin, Glutamat, Glycin, Histidin, Myo-Inositol,  
Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin,  
Threonin, Tryptophan, Tyrosin, Uracil, Valin

**Zucker-Stocklösungen** 20% Glukose  
20% Raffinose  
20% Galactose  
40% Lactose ( $\beta$ -Galactosidase)  
(steril filtriert)

### **Standardpuffer und –Reagenzien**

100 mg/ml Ampizillin  
25 mg/ml Kanamycin  
1 M IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid )  
1 M DTT (Dithiothreitol)  
14.3 M  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,5 M EDTA pH 8 (Ethylendiamintetraacetat)  
0,5 M CDTA pH 8 (*trans*-1,2-cyclohexandiamintetraacetat)  
1 M Hepes-KOH pH 7,4  
1 M Tris-HCl pH 6,5

1 M Tris-HCl pH 8,8  
1 M Tris-HCl pH 6,8  
1 M Tris-HCl pH 8,6  
2 M Imidazol pH 7,6  
5 M NaCl  
1 M MgCl<sub>2</sub>  
2 M KCl  
50% Glycerol  
10% APS (Ammoniumpersulfat)  
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin)  
10% SDS (Natriumlaurylsulfat)  
Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)  
Tween-20 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat)  
DMSO (Dimethylsulfoxid)  
20% Ethanol  
100 mM PMSF in Isoprop. (Phenylmethylysulphonylfluorid)  
6x DNA-Probenpuffer (MPI Fermentas)  
4x Laemmli Probenpuffer (Laemmli, 1970)  
10x SDS-Laufpuffer  
50x TAE  
10x TBS (Tris-buffered saline)  
TBS-Tween: 1xTBS + 0,05% Tween-20  
PBS (phosphate-buffered saline)

**Tfb1 (Commerce)** 30 mM KC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
100 mM RbCl<sub>2</sub>  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
15% Glycerol  
(steril filtriert)

**Tfb2 (Commerce)** 10 mM MOPS pH 6,5  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM RbCl<sub>2</sub>

15% Glycerol  
(steril filtriert)

**Western Blot Puffer A1** 0,3 M Tris pH 10,4  
20% Methanol

**Western Blot Puffer A2** 25 mM Tris pH 10,4  
20% Methanol

**Western Blot Puffer K** 25 mM Tris pH 7,6  
40 mM Norleucine ( $\alpha$ -aminocapronic acid)  
20% Methanol

**Western Blot Blockpuffer** 5% Magermilchpulver in TBS-Tween

**Coomassie Färbelösung** 40% Ethanol  
10% Eisessig  
1% Coomassie Brilliant Blau R250

**Coomassie Entfärber** 10% Ethanol  
10% Essigsäure

**Ponceau S stain** 0,2 % Ponceau S  
3% TCA (Trichloressigsäure)

**ECL1** 100 mM Tris-HCl pH 8,5  
2,5 mM Luminol (3-aminophtalhydrazid)  
400  $\mu$ M p-Coumaric acid

**ECL2** 100 mM Tris-HCl pH 8,5  
5,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Malachite-Grün Farbreagenz (Lanzetta et al., 1979)**  
0,34 g Malachite Grün

10,5 g Ammonium Molybdat in 1M HCl

### **Gängige Lösungen zur Kristallisation**

Crystal Screen™ (Hampton)  
Crystal Screen 2™ (Hampton)  
Crystal Screen Cryo™ (Hampton)  
Crystal Screen Lite™ (Hampton)  
Index™ (Hampton)  
Natrix™ (Hampton)  
PEG/Ion™ (Hampton)  
50% PEG500  
50% PEG1500  
50% PEG3350  
50% PEG4000  
50% PEG6000  
100% MPD  
100% Jeffamine  
100% Tacsimate  
1 M MgFormate

### ***Molekularbiologische Methoden***

Sofern nicht ausdrücklich erwähnt, wurden alle experimentellen Techniken dem Laborhandbuch „Molecular Cloning“ (Maniatis, 1989) entnommen. Sämtliche Puffer wurden mit Millipore gefiltertem Wasser hergestellt und durch einen Steritop™ Filter (Millipore) filtriert.

### **Herstellung kompetenter Zellen nach der RbCl<sub>2</sub> Methode (Commerce)**

Von einer Übernachtskultur des jeweiligen *E. coli* Stammes wurden 1 ml abgenommen und die Bakterienzellen einige Minuten in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5414 D) bei 2.000 g pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml Psi broth resuspendiert und in 100 ml Psi broth bei 37° C bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,48

hochgezogen. Die Kultur 15 Minuten auf Eis gekühlt und anschliessend in Falcon Tubes in einer Beckmann GS-6R bei 3.400 rpm und 0° C für 10 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 40 ml vorgekühltem Tfb1 resuspendiert und anschliessend 15 Minuten auf Eis gestellt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 3.400 g und 0° C wurde das Pellet in 4 ml vorgekühltem Tfb2 aufgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### **Hitzeschock Transformation**

Ein Aliquot von 50 µl RbCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen wurden mit 2 bis 10 µl Plasmid-DNA, bzw. Ligationsansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dem 45-Sekunden Hitzeschock bei 42° C im Thermomixer (Eppendorf Thermomixer comfort) folgte eine 10 minütige Inkubation auf Eis. Anschliessend wurde der Transformationsansatz mit 0,5 ml frischem LB Medium versetzt und die Zellen eine Stunde bei 37° C inkubiert. Die Bakterienzellen wurden einige Minuten in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415 D) bei 2.000 g pelletiert und anschliessend auf mit dem geeigneten Antibiotikum versetzten LB-Agarplatten (25 µg/ml Kanamycin für die benützten pET Vektoren, 100 µg/ml Ampicillin bei den pProEx Vektoren) ausgestrichen. Die Platten wurden übernacht bei 37° C im Brutschrank (Heraeus Function Line B12) inkubiert.

### **Plasmidisolierung aus *E. coli* (Miniprep)**

Jeweils eine Kolonie eines auf einer LB Agarplatte ausgestrichenen Transformationsansatzes wurde mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 5 ml mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten LB-Medium übernacht bei 37° C hochgezogen. Die Bakterienzellen aus 3 bis 5 ml der Übernachtskultur wurden etwa fünf Minuten bei 10.000 g pelletiert und die Plasmid-DNA mit dem QIAPrep Spin Miniprep Kit 250 (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

### **Bestimmung der DNA Konzentration**

Die DNA Konzentration wurde in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Beckmann DU-800 Spektrophotometer bestimmt. Ein Absorptionwert von  $A_{260}=1$  entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger, bzw. 31 µg/ml einzelsträngiger DNA.

### **Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Herstellung von 100 ml eines Agarosegels wurde 1 bis 2 % Agarose (SeaKem) in 1x TAE Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf Handwärme mit 3 µl Ethidiumbromid versetzt. Das flüssige Gel wurde in der Gelkammer bis zur Aushärtung stehengelassen. Zum Laden des Gels wurden die DNA Proben mit 6x Probenpuffer versetzt. Die Trennung wurde 20 Minuten bei 80V in 1xTAE Puffer durchgeführt. Das Ergebnis wurde mit dem Gel-Dokumentationssystem von BioRad dokumentiert. Nach präparativer Gelelektrophorese wurde die gewünschten Banden unter UV Durchlicht ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAQuick Spin Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers isoliert.

### **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten wurde durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erreicht. Es wurden jeweils 0,25 mM Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ca. 50 ng Matrizen-DNA, 2,5 U Pfu-DNA Polymerase oder Vent-DNA Polymerase, 15 pmol Primer und die vom Hersteller angegebenen Pufferlösungen verwendet. Zunächst wurde die Matrizen-DNA 2 min bei 96 °C denaturiert, um anschließend das gewünschte DNA-Segment in einem 20-30mal sich wiederholenden Zyklus zu amplifizieren.

#### *PCR-Protokoll:*

Denaturierung: 30 sec bei 96°C

Primer-Anlagerung: 45-60 sec bei ca. 55°C

Verlängerung: 2 min bei 68°C pro 1000 Basenpaare zu amplifizierender DNA.

Die Reaktionslösung wurde nach der Amplifizierungszyklen bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gehalten.

### **Restriktionsverdau**

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden mit den mitgelieferten Reaktionspuffern und in der Konzentration nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Präparative Reaktionsansätze (50 µl) wurden mit den entsprechenden 10x Reaktionspuffern und 2 µl Enzym versetzt und 1 - 3 h inkubiert. Die Reaktionen wurden anschliessend durch Zugabe von 6x DNA-Probenpuffer gestoppt und elektrophoretisch aufgetrennt.



### **Site-directed mutagenesis**

Punktmutationen wurde das QuickChange™ System (Stratagene) verwendet. Dabei wurde der Vektor mit dem zu mutierenden Gen unter Verwendung von zueinander komplementären Primern mit der entsprechend einzuführenden Mutation durch PCR amplifiziert. Anschliessend wurde der methylierte Vektor im Reaktionsansatz durch Zugabe von 1,5 µl DpnI (20.000U/ml) für 1,5 bis 2 h bei 37°C verdaut. 10 µl des Ansatzes wurden in kompetente *E. coli* DH5α transformiert. Erfolgreich mutagenisierte Klone wurden durch DNA-Sequenzierung (DNA Sequenzierungsservice, MPI core facility) identifiziert.

### ***Kristallographische Methoden***

#### **Kristallisation**

Die Experimente zur Kristallisation wurden mit der Methode der Dampfdiffusion standardmässig im hängenden, seltener auch im sitzenden Tropfen (initiale Kristallisationen von Ugp1p) durchgeführt. Die Testtropfen wurden zunächst in einem 1:1-Verhältnis Proteinlösung zu Kristallisationslösung gemischt, bei Optimierungsansätzen wurden auch andere Verhältnisse im Tropfen eingesetzt. Die Tropfen wurden in einem abgeschlossenen System durch die Platzierung auf einem Stempel (sitzender Tropfen) oder unter dem Deckelglas (hängender Tropfen) von der Reservoirlösung räumlich getrennt. Die Cryschem Platten wurden mit einem lösungsmittelbeständigen Klebeband (Crystal Clear) abgedichtet. Zur Kristallisation im hängenden Tropfen wurden vorgefettete 24-Well Platten (VDX greased plates, Hampton) oder Cryschem Platten des selben Herstellers verwendet (sitzender Tropfen). Für die Initialexperimente wurden die kommerziell erhältlichen Screens der Firma Hampton Research (Crystal Screen™ und Crystal Screen 2™, Crystal Screen Lite™, Crystal Screen Cryo™, Index™, Natrix™, PEG/Ion™) verwendet. Das Reservoirvolumen betrug 500 µl bei den kommerziell erhältlichen Screens und 1000 µl bei den selbst hergestellten Screens. Die Qualität der Ugp1p Kristalle wurde durch Microseeding optimiert. Die Platten wurden bei 4 °C oder bei 20 °C aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen mit Hilfe eines Olympus SZH10 Stereo Mikroskops kontrolliert. Kristalle wurden mit einer Canon Digital Ixus Digitalkamera dokumentiert.

### **Selenomethionin Derivatisierung (Van Duyne et al., 1993)**

1 ml einer LB-Kan Übernachtskultur von Ta0583 wurden bei 4.000 g einige Minuten abzentrifugiert und in 1 ml M9 Minimalmedium mit 20 µg/ml Thiamin resuspendiert und in einen Liter M9 Medium angeimpft. Bei  $OD_{600} = 0,6$  wurden die Aminosäuren Lysin, Phenylalalin, Threonin in Mengen von jeweils 100 mg/L, Isoleucin, Leucin und Valin bei jeweils 50 mg/L und L-Selenomethionin bei 60 mg/L zugegeben. 15 Minuten nach der Zugabe der Aminosäuren wurde mit 1 mM IPTG für 5 h induziert. Die Zellen wurden abschliessend bei 4.000 rpm pelletiert, aufgeschlossen und in Gegenwart von 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol in allen Puffern aufgereinigt.

### **Mikroseeding**

Für Mikroseeding-Ansätze wurden Kristallisationsplatten standardmässig ausplattiert und 2 bis 14 Stunden bei 20° C voräquiliert. Das *Seeding* erfolgte durch das Verteilen einer Lösung feiner Kristallsplitter verschiedener Konzentrationen in den voräquilierten Tropfen. Die Kristallsplitterlösung wurde mit einer aus einer Pasteurpipette ausgezogenen feinen Glaskapillare zügig durch die Tropfen gezogen.

### **Ernte der Kristalle für die Kryokristallographie**

Die Kristalle wurden mit magnetischen Cryoloops (Hampton) aus der Mutterlösung gefischt, in Cryoprotectant überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Native, Selenomethionin- und ADP-Kristalle von Ta0583 wurden kurz in Mutterlösung enthaltend 20% Glycerol transferiert und anschliessend schockgefroren. Für die Datensammlung von Ugp1p wurden frische Kristalle auf Platten mitgenommen und die Kristalle aus der Mutterlösung direkt im Cryostream gefroren.

### **Datensammlung**

Zur Minimierung von Strahlenschäden am Kristall während der Datensammlung wurden die Diffraktionsmessungen an in flüssigem Stickstoff vorgefrorenen und im Cryostream auf 100K gekühlten Kristallen durchgeführt. Vor dem Einfrieren wurden die Ta0583 Kristalle kurz in Reservoirlösung enthaltend 20% Glycerol als Frostschutz transferiert, um die Bildung von Eiskristallen während der Datensammlung zu vermeiden. Reflexdaten wurden an der European Synchrotron Radiation Facility

(ESRF) in Grenoble (Frankreich), Beamlines BM-14 und BM-21 und an der Swiss Synchrotron Light Source (SLS) in Villigen (Schweiz) an den Beamlines X06SA-PX-I und X10SA-PX-II gesammelt. Die Aufzeichnung der Beugungsbilder erfolgte auf CCD Detektoren der Firma Mar Research. Für eine optimierte Datensammlung wurden zunächst kurze Bilderserien von zehn Einzelbildern aufgenommen und Raumgruppe und die Einheitszell-Parameter in Mosflm (Leslie, 1992) bestimmt. Anschliessend wurde Mosflm's Strategy Option ausgeführt, um Start Phi und die aufgrund der Symmetrieverhältnisse für einen kompletten Datensatz notwendige Anzahl der Bilder (Rotation) zu bestimmen. SAD Daten wurden am SLS, Villigen (Schweiz) aufgenommen. Für SAD-Datensätze wurde das Maximum des anomalen Streufaktors von Selen an der K-Kante per Fluoreszenz-Scan ermittelt und die Wellenlänge auf 0,9788 nm bei 12,667 keV eingestellt. Die Integration und Skalierung der Daten erfolgte mit Mosflm v6.2.2 und dem Programmpaket CCP4i.

### ***Biochemische Methoden***

#### **Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)**

Die Proteinkonzentration wurde standardmässig mit dem BioRad Proteinassay Reagenz (BioRad) bestimmt. 1 µl unverdünnte oder 1 µl einer 1:10 verdünnten Proteinprobe wurden zu 999 µl von dem 1:5 vorverdünnter BioRad Reagenz gegeben, 5 min bei Raumtemperatur entwickelt und die Absorption photometrisch (Beckman DU-800) bei 595 nm ausgelesen. Die Proteinkonzentration in mg/ml wurde als  $A_{595} \times 25$  berechnet.

#### **Proteinbestimmung mit dem molaren Extinktionskoeffizienten**

In einem Beckman DU-800 Spektrophotometer wurde ein Absorptionsspektrum der in der Regel 1:50 oder 1:100 verdünnten Proteinprobe bei Wellenlängen von 260 – 320 nm gemessen und die  $A_{280}$  gegen den Leerwert bei  $A_{315}$  korrigiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem theoretischen molaren Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Proteins (Quelle: ProtParam, <http://www.expasy.org>) gemäss dem Lambert-Beer'schen Gesetz errechnet.

### **SDS-PAGE Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)**

Acrylamidgele für PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) wurden im BioRad Gelstand nach Zusammensetzungen aus dem Laborhandbuch von Maniatis (Maniatis, 1989) hergestellt. 15 µl Proteinprobe wurden 5 µl 4x Laemmli-Probenpuffer versetzt, einige Minuten bei 95° C denaturiert und 7 bis 8 µl der Probe in die Geltaschen geladen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in 1x SDS Laufpuffer in der BioRad separation chamber bei 220 V bis kurz vor Auslaufen des Farbfront.

### **Coomassie Färbung von Proteingelen**

Acrylamid Gele wurden in reichlich Coomassie-Färbelösung kurz in der Mikrowelle erwärmt und für mindestens 15 min unter leichtem Schütteln gefärbt. Nach der Färbung wurde das Proteingel in Entfärbelösung überführt, erwärmt und bis zum gewünschten Entfärbungsgrad geschüttelt.

### **Silverfärbung von Proteingelen**

Die Acrylamidgele wurden jeweils in 250 ml 50% Methanol 10 min geschüttelt, 10 min in 5% Methanol und schliesslich 10 min in H<sub>2</sub>O mit 32 mM DTT geschüttelt. Anschliessend folgten 10 min Inkubation in 250 ml 0,2% AgNO<sub>3</sub> Färbelösung. Anschliessend wurde das Gel wurde kurz 3 x 10 sec in H<sub>2</sub>O gewaschen und im kleinen Volumen Entwickler (7,5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 250 ml H<sub>2</sub>O, 100 µl 37% Formaldehyd) geschwenkt. Es folte ein kurzer Wasch von 10 sec mit H<sub>2</sub>O, dann wurden 220 ml Entwickler zugegeben. Das Gel wurde bis zur gewünschten Bandenfärbung entwickelt. Die Färbereaktion wurde mit 0,5% Aceton gestoppt und einige Male mit Wasser gewaschen.

### **Western Blot**

Die Immunodetektion von Proteinen wurden nach der Western Blot-Methode (Towbin et al., 1979) durchgeführt. Die Proteine wurden zunächst auf einem Ployacrylamidgel getrennt. Der Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher&Schuell) der Porengröße 0,45 µm erfolgte im Transferpuffer (A1, A2, K)) in einer Westernblot-Apparatur (Hoefler Scientific Instruments) bei einer Stromstärke von 150 mA für 45 min. Die Nitrozellulose-Membran wurde 45 min in Western Blot Blockpuffer bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem polyklonalen Antikörper in TBST Puffer (5.000-fachen Verdünnung) bei

Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie bis zu dreimal für 10 min in TBST Puffer gewaschen und anschliessend 40 min mit dem sekundären HRP-konjugierten (engl.: *horse-radishperoxidase*)  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper (Sigma) in 5000-facher Verdünnung in TBST Puffer inkubiert. Es folgten zwei bis drei Waschschrte. Die immunologische Detektion wurde mit dem *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-System nach Angaben des Herstellers und die Dokumentation in einem Fujifilm LAS-3000 durchgeführt.

### **Expression in *E. coli***

BL21(DE3) pLysS Bakterienkulturen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,6 bei 37° C geschüttelt. Die Expression von Ta0583 Konstrukten in pET28 System wurden mit 1 mM IPTG induziert und 4 h bei 37° C exprimiert. Ugp1p Konstrukte wurden vor der Induktion auf Eis abgekühlt und mit 0,4 mM IPTG fünf Stunden bei 18° C induziert. Anschliessend wurden die Bakterienkulturen in einer Beckman MI-J6 Zentrifuge 20 min bei 4.000 rpm pelletiert und zur Weiterverarbeitung bei –80° C eingefroren.

### **Aufschluss *E. coli***

Die Zellpellets wurden in etwa 15 ml Lysepuffer/L Kulturvolumen resuspendiert und 4 x 50s sonifiziert (Branson Sonifier B15). Anschliessend wurde das Lysat 35 – 45 min bei 40.000 rpm in einem Ti70 Rotor in einer Beckmann Optima LE-80K Ultrazentrifuge geklärt. Der Überstand wurde abgenommen, steril filtriert (0,25  $\mu$ m oder 0,45  $\mu$ m Sartorius Minisart Aufsatzfilter) und anschliessend für die Affinitäts- oder Ionenaustauschchromatographie verwendet.

### **Aufschluss *S. cerevisiae***

300g gefrorene  $\Delta$ reg1-Hefepellets oder sechs Würfel Wienerger Frischbackhefe wurden zweimal mit jeweils 500 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O gewaschen (4.000 rpm, Beckman JLA 10.500). Das Pellet wurde in vorgekühltem Lyse Puffer (50 mM Hepes-KOH pH 7,4, 200 mM NaCl, 10% Glycerol, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM KCl, 20 mM Imidazol pH 7,6, 1 mM PMSF, complete EDTA-frei) resuspendiert und in drei mit jeweils 300 g Glas beads (Sigma) befüllte Beadbeater (GlennMills) Container gegeben. Die Lyse erfolgte für 50 min bei Wiederholungen von jeweils 30 sec Operation und 90 sec Pause. Das Lysat wurde im Beckmann JLA 10.500 10 min bei 4.000 rpm und 20 min

bei 10.000 rpm geklärt und vor der Affinitätschromatographie gefiltert (Schleicher-Schuell Faltenfilter).

### **Aufreinigung Ta0583**

His<sub>6</sub>-getaggtetes Ta0583 wurde über Ni-NTA Agarose beads (Qiagen) nach den Empfehlungen des Herstellers aufgereinigt. Das Eluat wurde in MWCO 10.000 Da konzentriert (Amicon). Es folgte Sephacryl S-100 (Amersham) Gelfiltrationschromatographie in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 20 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>. Das Protein wurde auf 12 mg/ml konzentriert und in Aliquots bei -80° C aufbewahrt. Unmodifiziertes Ta0583 wurde über SourceQ (Amersham Pharmacia) und MonoQ (Amersham) Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt und in Puffer 50 mM Tris-HCl pH 7, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM KCl, 2 mM β-Mercaptoethanol von 0 bis 1 M NaCl eluiert. Als letzter Schritt diente eine Sephacryl S-100 (Amersham) Gelfiltration in Puffer 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 2 mM β-Mercaptoethanol.

### **Aufreinigung Ugp1p**

Das Lysat (in 50 mM Hepes pH 7,5, 10% Glycerol, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM KCl, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF, 20 mM Imidazol complete EDTA-frei) wurde auf eine mit Nickel beladene Chelating Sepharose Chromatographiesäule geladen und mit 250 mM Imidazol eluiert. Anschliessend folgten MonoQ-Anionenaustauschchromatographie oder Heparin Sepharose Affinitätschromatographie in den Puffern 20 mM Hepes pH 7,5, 10% Glycerol, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM KCl, 0 - 1000 mM NaCl. Als abschliessender Reinigungsschritt wurde eine Superose6 Gelfiltration in 20 mM HEPES pH 7.4, 10 % Glycerol, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 50 mM NaCl and 2 mM β-Mercaptoethanol gefahren. Das Protein wurde auf 4 – 15 mg/ml konzentriert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### **Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper**

Das aus Kaninchen gewonnene α-Ta0583 Antiserum wurde von Dr. Istvan Nagy, Abt. Baumeister, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden 2,5 mg (SeMet)-Ta0583 in 20 mM Hepes pH 7,4, 20 mM NaCl umgepuffert, mit einer Spritze und Luer Adaptern (Amersham Pharmacia) appliziert und bei Raumtemperatur 45

Minuten an eine kommerziell erhältliche 1 ml HiTrap NHS-aktivierte HP Säule (Amersham Pharmacia) gebunden. Die Säule wurde abwechselnd mit 6 ml Puffer A (0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl pH 8,3), 3 ml Puffer B (0,1 M Natriumacetat pH 4, 50 mM NaCl) und 6 ml Puffer A gewaschen. Freie Gruppen wurden 45 Minuten bei Raumtemperatur mit Puffer A blockiert. Es folgten drei Waschschriffe mit 6 ml Puffer B, 6 ml Puffer A und wiederum 6 ml Puffer B. Anschliessend wurde die Säule mit 10 ml TBS gewaschen. 10 ml Serum wurden mit TBS auf 30 ml verdünnt, gefiltert (0,45 µm Satorius Minisart) und übernacht bei 0,5 ml/min zirkulierend mit einer peristaltischen Pumpe (Pharmacia P-1) auf die Säule geladen. Es wurde mit 5 ml TBS, 3ml Waschpuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,2% TX-100), 3 ml TBS gewaschen. Vor der Elution mit 0,2 M Glycin pH 2,3, 150 mM NaCl wurden 65 µl 1 M Tris-HCl pH 8,8 in die Eppendorfreaktionsgefässe vorgelegt und 500 µl Fraktionen gesammelt. Der pH in den gesammelten Fraktionen betrug 7,5. Die Fraktionen wurden per Dotblot und Ponceau Stain analysiert und proteinenthaltende Fraktionen vereinigt. Der aufgereinigte Antikörper wurde gegen PBS pH 7,2 dialysiert, aliquotiert und bei -80° C (+10% Glycerol) und -20° C (+50% Glycerol) aufbewahrt.

### **Koppeln von Antikörpern an Protein-A Sepharose**

100 µl Protein A beads CL-4B (Pharmacia LKB) wurden bei 2.500 rpm in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf 5417R) 5 min mit PBS gewaschen. 350 µg affinitätsgereinigter Antikörper wurde in 1 ml PBS aufgenommen und übernacht bei 4° C an die Protein A beads gebunden. Anschliessend wurden die beads eine Minute bei 2.500 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Protein A beads wurden 2x mit jeweils 1 ml 0,2 M Borsäure pH 9 gewaschen. Anschliessend wurden die Antikörper 60 min bei Raumtemperatur auf dem Nutator mit 1 ml 20 mM DMP in 0.2 M Borsäure pH 9 kovalent an die Protein A beads gebunden. Freie Bindungsstellen wurden durch Waschen und anschliessende 2,5 h Inkubation bei Raumtemperatur mit 1 ml 0,2 M Ethanolamin pH 8 blockiert. Die Protein A beads wurden 2x mit PBS gewaschen und bei 4° aufbewahrt.

### **Co-Immunpräzipitation**

Die Lysate von *Thermoplasma acidophilum* wurden von Herrn Dr. Istvan Nagy, Abt. Baumeister, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

4 ml Lysat wurden mit complete Protease Inhibitor und 1mM PMSF versetzt. Zur Eliminierung von Hintergrund wurden 100 µl freie Protein A beads mit 1 ml PBS gewaschen und mit 4 ml des Lysates 1,5 h zunächst bei 4° C mit den Protein A° beads vorkubiert. Anschliessend wurde das Lysat mit 80 µl α-Ta0583 gekoppelte Protein A beads übernacht im Kühlraum inkubiert. Die beads wurden mit jeweils 4 ml Waschpuffer 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 50 mM NaCl (Waschschritt 1), 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% TX-100 (Waschschritt 2) und 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 500 mM NaCl, 1% TX-100 (Waschschritt 3) gewaschen. Abschliessend wurden die beads in 50 µl nichtreduzierendem 4x Laemmli SDS Probenpuffer aufgenommen, 10 min bei 65° C erhitzt und 2x 10 min bei 15.000 g pelletiert. Von den erhaltenen 50 µl Probe wurden 3 µl und 10 µl auf ein 12% Acrylamidgel aufgetragen und die Banden massenspektrometrisch (MS Service, Frank Siedler) analysiert.

### **Bestimmung des zellulären Proteinlevels von Ta0583**

Zur Quantifizierung des Proteinlevels von Ta0583 wurden 10 µg und 15 µg *Thermoplasma* Lysat und ein Standard von 1, 2, 4 und 8 µg aufgereinigtem Ta0583 nach der Western Blot Standardmethode auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit dem affinitätsgereinigten Antikörper detektiert. Das Bild wurde digitalisiert, die Bandenstärken mit der Software AIDA 3.2. quantifiziert zur Erstellung der Eichgerade und grafisch gegen die Proteinmenge aufgetragen. Die Menge an Ta0583 im Lysat wurde anhand der Steigung des Eichstandards und mit der Menge an Gesamtprotein errechnet.

### **ATPase Assay Ta0583**

Das bei der Nukleotid-Hydrolyse freigesetzte anorganische Phosphat wurde nach der Methode von Lanzetta (Lanzetta et al., 1979) bestimmt. Die Hydrolyse-Aktivität von 10 µM Ta0583 wurde in 20 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaCl bei 20°, 25°, 39°, 40°, 50° und 60° C bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µM ATP gestartet. Im Abstand von fünf Minuten wurden jeweils 10 µl Probe abgenommen und die Reaktion durch Zugabe von 0,25 M CDTA gestoppt. Die



Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Malachite-Grün Farbreagenz gestartet, 20 Minuten bei Raumtemperatur entwickelt und schliesslich bei 637 nm im Mikro-Platereader (Wallac) ausgelesen. Zur Quantifizierung wurde parallel ein Eichstandard von 10 – 90 nmol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mitgemessen. Die Menge an freigesetztem Phosphat wurde per Regressionsanalyse bestimmt.

### **Aktivitätsassay Pyrophosphorolyse Ugp1p**

Der Aktivitätsassay in die Pyrophosphorolyse Richtung wurde in Anlehnung an Daran et. al durchgeführt (Daran et al., 1995). Die Spaltung von UDP-Glukose in Anwesenheit von Pyrophosphat wurde bei 25 °C in einem gekoppelten Enzymassay verfolgt. Das entstehende Glukose-1-Phosphat wurde enzymatisch zu 6-Phosphogluconate umgesetzt (Phosphoglucomutase und Glukose-6-Phosphate Dehydrogenase (Sigma)). Das durch die Aktivität der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase entstehende  $\text{NADH}/\text{H}^+$  wurde photometrisch bei 340 nm nachgewiesen und die Konzentration von NADH mit dem Absorptionskoeffizienten für NADH  $6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bestimmt. Der Assaypuffer enthält 50 mM Tris-HCl pH 8.6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM KCl, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol und 1 mM  $\text{NAD}^+$ .

### **Aktivitätsassay UDP-Glukose Synthese Ugp1p**

Der Aktivitätsassay in die UDP-Glukose Synthese Richtung wurde bei 25 °C in einem gekoppelten Enzymassay verfolgt. Die aus Glukose-1-Phosphat und UTP entstehende UDP-Glukose wurde enzymatisch zu UDP-Glucoronat umgesetzt (UDP-Glukose Dehydrogenase (Sigma)). Das durch die Aktivität der UDP-Glukose Dehydrogenase entstehende  $\text{NADH}/\text{H}^+$  wurde photometrisch bei 340 nm nachgewiesen und die Konzentration von NADH mit dem Absorptionskoeffizienten für NADH  $6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bestimmt. Der Assaypuffer enthält 50 mM Tris-HCl pH 8.6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM KCl, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol und 1 mM  $\text{NAD}^+$ .

### **ProteinaseK-Verdau**

Für den präparativen ProteinaseK-Verdau wurden 4 mg Protein in einem Volumen von 5 ml in 50 mM Hepes pH 7,4, 10% Glyzerol, 100 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , 20 mM  $\text{MgCl}_2$  für 45 min bei 37° C mit 1,25 µg ProteinaseK inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM PMSF

gestoppt. Der Verdau wurde anschliessend über eine Superose6-Gelfiltration gereinigt.

## Literaturverzeichnis

- Albrecht, G. J., Bass, S. T., Seifert, L. L., and Hansen, R. G. (1966). Crystallization and properties of uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase from liver. *J Biol Chem* 241, 2968-2975.
- Alms, G. R., Sanz, P., Carlson, M., and Haystead, T. A. (1999). Reg1p targets protein phosphatase 1 to dephosphorylate hexokinase II in *Saccharomyces cerevisiae*: characterizing the effects of a phosphatase subunit on the yeast proteome. *Embo J* 18, 4157-4168.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Ballicora, M. A., Frueauf, J. B., Fu, Y., Schurmann, P., and Preiss, J. (2000). Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *J Biol Chem* 275, 1315-1320.
- Becker, M., Vincent, C., and Reid, J. S. (1995). Biosynthesis of (1,3)(1,4)-beta-glucan and (1,3)-beta-glucan in barley (*Hordeum vulgare* L.). Properties of the membrane-bound glucan synthases. *Planta* 195, 331-338.
- Bettinger, B. T., Gilbert, D. M., and Amberg, D. C. (2004). Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 410-415.
- Bi, E. F., and Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* 354, 161-164.
- Blanchoin, L., and Pollard, T. D. (2002). Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry* 41, 597-602.
- Blessing, R. H. (1995). An empirical correction for absorption anisotropy. *Acta Crystallogr A* 51 ( Pt 1), 33-38.
- Bork, P., Sander, C., and Valencia, A. (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7290-7294.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brown, K., Pompeo, F., Dixon, S., Mengin-Lecreux, D., Cambillau, C., and Bourne, Y. (1999). Crystal structure of the bifunctional N-acetylglucosamine 1-phosphate uridyltransferase from *Escherichia coli*: a paradigm for the related pyrophosphorylase superfamily. *Embo J* 18, 4096-4107.
- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., *et al.* (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54, 905-921.
- Busby, S. J., and Radda, G. K. (1976). Regulation of the glycogen phosphorylase system--from physical measurements to biological speculations. *Curr Top Cell Regul* 10, 89-160.
- Chang, H. Y., Peng, H. L., Chao, Y. C., and Duggleby, R. G. (1996). The importance of conserved residues in human liver UDPglucose pyrophosphorylase. *Eur J Biochem* 236, 723-728.

Charnock, S. J., and Davies, G. J. (1999). Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms. *Biochemistry* 38, 6380-6385.

Commerce, U. S. D. o. *Molecular Biology Protocols*.

Daran, J. M., Dallies, N., Thines-Sempoux, D., Paquet, V., and Francois, J. (1995). Genetic and biochemical characterization of the UGP1 gene encoding the UDP-glucose pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 233, 520-530.

Egelman, E. H. (1985). The structure of F-actin. *J Muscle Res Cell Motil* 6, 129-151.

Eichinger, L., Lee, S. S., and Schleicher, M. (1999). Dictyostelium as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech* 47, 124-134.

Engh, R. H. a. H. R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallogr A* 47, 392-400.

Entwistle, G., and Rees, T. A. (1988). Enzymic capacities of amyloplasts from wheat (*Triticum aestivum*) endosperm. *Biochem J* 255, 391-396.

Esue, O., Cordero, M., Wirtz, D., and Tseng, Y. (2005). The assembly of MreB, a prokaryotic homolog of actin. *J Biol Chem* 280, 2628-2635.

Esue, O., Wirtz, D., and Tseng, Y. (2006). GTPase activity, structure, and mechanical properties of filaments assembled from bacterial cytoskeleton protein MreB. *J Bacteriol* 188, 968-976.

French, S. a. W. K. S. (1978). On the treatment of negative intensity observations. *Acta Cryst*, 517-525.

Frey, P. A. (1996). The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *Faseb J* 10, 461-470.

Fuchs, E., and Karakesisoglou, I. (2001). Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Dev* 15, 1-14.

Futterer, O., Angelov, A., Liesegang, H., Gottschalk, G., Schleper, C., Schepers, B., Dock, C., Antranikian, G., and Liebl, W. (2004). Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9091-9096.

Galkin, V. E., VanLoock, M. S., Orlova, A., and Egelman, E. H. (2002). A new internal mode in F-actin helps explain the remarkable evolutionary conservation of actin's sequence and structure. *Curr Biol* 12, 570-575.

Garner, E. C., Campbell, C. S., and Mullins, R. D. (2004). Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science* 306, 1021-1025.

Gastinel, L. N., Cambillau, C., and Bourne, Y. (1999). Crystal structures of the bovine beta4galactosyltransferase catalytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose. *Embo J* 18, 3546-3557.

Gillett, T. A., Levine, S., and Hansen, R. G. (1971). Uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase. 3. Catalytic mechanism. *J Biol Chem* 246, 2551-2554.

Gitai, Z., Dye, N. A., Reisenauer, A., Wachi, M., and Shapiro, L. (2005). MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell* 120, 329-341.

Goode, B. L., Drubin, D. G., and Barnes, G. (2000). Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol* 12, 63-71.

Gururaj, A., Barnes, C. J., Vadlamudi, R. K., and Kumar, R. (2004). Regulation of phosphoglucomutase 1 phosphorylation and activity by a signaling kinase. *Oncogene* 23, 8118-8127.

Hardin, S. C., Winter, H., and Huber, S. C. (2004). Phosphorylation of the amino terminus of maize sucrose synthase in relation to membrane association and enzyme activity. *Plant Physiol* 134, 1427-1438.

Hempel, R., Schwienhorst, A. (2005). Elemente des bakteriellen Zytoskeletts. *Biospektrum* 11, 729-731.

Herrmann, H., and Aebi, U. (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem* 73, 749-789.

Hixon, W. G., and Searcy, D. G. (1993). Cytoskeleton in the archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*? Viscosity increase in soluble extracts. *Biosystems* 29, 151-160.

Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* 347, 44-49.

Huang, D., Farkas, I., and Roach, P. J. (1996). Pho85p, a cyclin-dependent protein kinase, and the Snf1p protein kinase act antagonistically to control glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 4357-4365.

Iwai, N., Nagai, K., and Wachi, M. (2002). Novel S-benzylisothiourea compound that induces spherical cells in *Escherichia coli* probably by acting on a rod-shape-determining protein(s) other than penicillin-binding protein 2. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 2658-2662.

Jacob, R., Heine, M., Alfalah, M., and Naim, H. Y. (2003). Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells. *Curr Biol* 13, 607-612.

Jenkins, J., Mayans, O., Smith, D., Worboys, K., and Pickersgill, R. W. (2001). Three-dimensional structure of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase reveals a novel esterase active site. *J Mol Biol* 305, 951-960.

Jensen, R. B., and Gerdes, K. (1999). Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: ParM partitioning protein of plasmid R1 co-localizes with its replicon during the cell cycle. *Embo J* 18, 4076-4084.

Jin, X., Ballicora, M. A., Preiss, J., and Geiger, J. H. (2005). Crystal structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *Embo J* 24, 694-704.

Johnston, M., Andrews, S., Brinkman, R., Cooper, J., Ding, H., Dover, J., Du, Z., Favello, A., Fulton, L., Gattung, S., and et al. (1994). Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VIII. *Science* 265, 2077-2082.

Jones, L. J., Carballido-Lopez, R., and Errington, J. (2001). Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104, 913-922.

Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A* 47 ( Pt 2), 110-119.

Kabsch, W., and Holmes, K. C. (1995). The actin fold. *Faseb J* 9, 167-174.

Kabsch, W., Kabsch, H., and Eisenberg, D. (1976). Packing in a new crystalline form of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 100, 283-291.

Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., and Holmes, K. C. (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347, 37-44.

Katsube, T., Kazuta, Y., Tanizawa, K., and Fukui, T. (1991). Expression in *Escherichia coli* of UDP-glucose pyrophosphorylase cDNA from potato tuber and functional assessment of the five lysyl residues located at the substrate-binding site. *Biochemistry* 30, 8546-8551.

Kleywegt, G. J. (2000). Validation of protein crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56, 249-265.

Kudryashov, D. S., Sawaya, M. R., Adisetiyo, H., Norcross, T., Hegyi, G., Reisler, E., and Yeates, T. O. (2005). The crystal structure of a cross-linked actin dimer suggests a detailed molecular interface in F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 13105-13110.

Kurner, J., Frangakis, A. S., and Baumeister, W. (2005). Cryo-electron tomography reveals the cytoskeletal structure of *Spiroplasma melliferum*. *Science* *307*, 436-438.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.

Lai, K., and Elsas, L. J. (2000). Overexpression of human UDP-glucose pyrophosphorylase rescues galactose-1-phosphate uridylyltransferase-deficient yeast. *Biochem Biophys Res Commun* *271*, 392-400.

Lamerz, A. C., Haselhorst, T., Bergfeld, A. K., von Itzstein, M., and Gerardy-Schahn, R. (2006). Molecular cloning of the *Leishmania major* UDP-glucose pyrophosphorylase, functional characterization, and ligand binding analyses using NMR spectroscopy. *J Biol Chem* *281*, 16314-16322.

Langedijk, J. P., Fuentes, G., Boshuizen, R., and Bonvin, A. M. (2006). Two-rung model of a left-handed beta-helix for prions explains species barrier and strain variation in transmissible spongiform encephalopathies. *J Mol Biol* *360*, 907-920.

Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S., and Candia, O. A. (1979). An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* *100*, 95-97.

Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* *8*, 477-486.

Leger, J., Kempf, M., Lee, G., and Brandt, R. (1997). Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau. *J Biol Chem* *272*, 8441-8446.

Lenart, P., Bacher, C. P., Daigle, N., Hand, A. R., Eils, R., Terasaki, M., and Ellenberg, J. (2005). A contractile nuclear actin network drives chromosome congression in oocytes. *Nature* *436*, 812-818.

Leslie, A. G. W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. In *Joint CCP4 ESF-EACBM Newsletter* (Daresbury Laboratory, Warrington UK).

Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning*, 2nd edition edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.).

Marolda, C. L., and Valvano, M. A. (1996). The GalF protein of *Escherichia coli* is not a UDP-glucose pyrophosphorylase but interacts with the GalU protein possibly to regulate cellular levels of UDP-glucose. *Mol Microbiol* *22*, 827-840.

Martz, F., Wilczynska, M., and Kleczkowski, L. A. (2002). Oligomerization status, with the monomer as active species, defines catalytic efficiency of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Biochem J* *367*, 295-300.

Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* *33*, 491-497.

McCoy, J. G., Arabshahi, A., Bitto, E., Bingman, C. A., Ruzicka, F. J., Frey, P. A., and Phillips, G. N., Jr. (2006). Structure and mechanism of an ADP-glucose phosphorylase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* *45*, 3154-3162.

Mio, T., Yabe, T., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H. (1998). The eukaryotic UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases. Gene cloning, protein expression, and catalytic mechanism. *J Biol Chem* *273*, 14392-14397.

Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A. I., and Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* *113*, 329-342.

Mitchison, T. J., and Cramer, L. P. (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84, 371-379.

Miyagishima, S. Y., Nishida, K., and Kuroiwa, T. (2003). An evolutionary puzzle: chloroplast and mitochondrial division rings. *Trends Plant Sci* 8, 432-438.

Moller-Jensen, J., Borch, J., Dam, M., Jensen, R. B., Roepstorff, P., and Gerdes, K. (2003). Bacterial mitosis: ParM of plasmid R1 moves plasmid DNA by an actin-like insertional polymerization mechanism. *Mol Cell* 12, 1477-1487.

Moller-Jensen, J., Jensen, R. B., Lowe, J., and Gerdes, K. (2002). Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *Embo J* 21, 3119-3127.

Morris, R. J., Perrakis, A., and Lamzin, V. S. (2003). ARP/wARP and automatic interpretation of protein electron density maps. *Methods Enzymol* 374, 229-244.

Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 240-255.

Newell, P. C., and Sussman, M. (1970). Regulation of enzyme synthesis by slime mold cell assemblies embarked upon alternative developmental programs. *J Mol Biol* 49, 627-637.

Nogales, E., Downing, K. H., Amos, L. A., and Lowe, J. (1998). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol* 5, 451-458.

Olave, I. A., Reck-Peterson, S. L., and Crabtree, G. R. (2002). Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu Rev Biochem* 71, 755-781.

Owaribe, K., Sugino, H., and Masuda, H. (1986). Characterization of intermediate filaments and their structural organization during epithelium formation in pigmented epithelial cells of the retina in vitro. *Cell Tissue Res* 244, 87-93.

Peneff, C., Ferrari, P., Charrier, V., Taburet, Y., Monnier, C., Zamboni, V., Winter, J., Harnois, M., Fassy, F., and Bourne, Y. (2001). Crystal structures of two human pyrophosphorylase isoforms in complexes with UDPGlc(Gal)NAc: role of the alternatively spliced insert in the enzyme oligomeric assembly and active site architecture. *Embo J* 20, 6191-6202.

Peng, H. L., and Chang, H. Y. (1993). Cloning of a human liver UDP-glucose pyrophosphorylase cDNA by complementation of the bacterial galU mutation. *FEBS Lett* 329, 153-158.

Persat, F., Azzar, G., Martel, M. B., and Got, R. (1983). Properties of uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase from Golgi apparatus of liver. *Biochim Biophys Acta* 749, 329-332.

Phillips, J. E., Gersbach, C. A., Wojtowicz, A. M., and Garcia, A. J. (2006). Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. *J Cell Sci* 119, 581-591.

Podolski, J. L., and Steck, T. L. (1988). Association of deoxyribonuclease I with the pointed ends of actin filaments in human red blood cell membrane skeletons. *J Biol Chem* 263, 638-645.

Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.

Pollard, T. D., and Weeds, A. G. (1984). The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin. *FEBS Lett* 170, 94-98.

Read, R. J. (2001). Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57, 1373-1382.

Recondo, E., and Leloir, L. F. (1961). Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 6, 85-88.

Roach, P. J., Takeda, Y., and Larner, J. (1976). Rabbit skeletal muscle glycogen synthase. I. Relationship between phosphorylation state and kinetic properties. *J Biol Chem* *251*, 1913-1919.

Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M. L., Koretke, K. K., Volker, C., Mewes, H. W., Frishman, D., Stocker, S., Lupas, A. N., and Baumeister, W. (2000). The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* *407*, 508-513.

Rutter, J., Probst, B. L., and McKnight, S. L. (2002). Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase. *Cell* *111*, 17-28.

Schlieper, D., Oliva, M. A., Andreu, J. M., and Lowe, J. (2005). Structure of bacterial tubulin BtubA/B: evidence for horizontal gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 9170-9175.

Schnabel, H., Schnabel, R., Yeats, S., Tu, J., Gierl, A., Neumann, H., and Zillig, W. (1984). Genome organization and transcription in archaeobacteria. *Folia Biol (Praha)* *30 Spec No*, 2-6.

Searcy, D. G. (1976). *Thermoplasma acidophilum*: intracellular pH and potassium concentration. *Biochim Biophys Acta* *451*, 278-286.

Searcy, D. G., Stein, D. B., Searcy, K. B. (1981). A mycoplasma-like archaeobacterium possibly related to the nucleus and cytoplasm of eukaryotic cells. *Ann N Y Acad Sci* *361*, 312-324.

Shih, Y. L., and Rothfield, L. (2006). The bacterial cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev* *70*, 729-754.

Shimizu, T., Nakatsu, T., Miyairi, K., Okuno, T., and Kato, H. (2002). Active-site architecture of endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum* revealed by crystal structures in native and ligand-bound forms at atomic resolution. *Biochemistry* *41*, 6651-6659.

Sondermann, H., Scheufler, C., Schneider, C., Hohfeld, J., Hartl, F. U., and Moarefi, I. (2001). Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science* *291*, 1553-1557.

Sowokinos, J. R. (1976). Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*: I. Changes in ADP-Glucose and UDP-Glucose Pyrophosphorylase Activities Associated with Starch Biosynthesis during Tuberization, Maturation, and Storage of Potatoes. *Plant Physiol* *57*, 63-68.

Teramoto, N. (2006). Physiological Roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> Channels in Smooth Muscle. *J Physiol*.

Terwilliger, T. (2004). SOLVE and RESOLVE: automated structure solution, density modification and model building. *J Synchrotron Radiat* *11*, 49-52.

Terwilliger, T. C., and Berendzen, J. (1999). Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *55*, 849-861.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 4350-4354.

Tu, J., and Carlson, M. (1995). REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* *14*, 5939-5946.

Turnquist, R. L., Gillett, T. A., and Hansen, R. G. (1974). Uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase. Crystallization and properties of the enzyme from rabbit liver and species comparisons. *J Biol Chem* *249*, 7695-7700.

Turnquist, R. L. a. H., R. G. (1973). Uridine diphosphoryl glucose pyrophosphorylase, Vol 8).



Unligil, U. M., Zhou, S., Yuwaraj, S., Sarkar, M., Schachter, H., and Rini, J. M. (2000). X-ray crystal structure of rabbit N-acetylglucosaminyltransferase I: catalytic mechanism and a new protein superfamily. *Embo J* 19, 5269-5280.

Vagin, A., and Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement  
doi:10.1107/S0021889897006766. *Journal of Applied Crystallography* 30, 1022-1025.

van den Ent, F., Amos, L., and Lowe, J. (2001a). Bacterial ancestry of actin and tubulin. *Curr Opin Microbiol* 4, 634-638.

van den Ent, F., Amos, L. A., and Lowe, J. (2001b). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 413, 39-44.

van den Ent, F., Moller-Jensen, J., Amos, L. A., Gerdes, K., and Lowe, J. (2002). F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *Embo J* 21, 6935-6943.

Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L., and Clardy, J. (1993). Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J Mol Biol* 229, 105-124.

Wachi, M., Doi, M., Tamaki, S., Park, W., Nakajima-Iijima, S., and Matsushashi, M. (1987). Mutant isolation and molecular cloning of mre genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169, 4935-4940.

Weiss, D. S. (2004). Bacterial cell division and the septal ring. *Mol Microbiol* 54, 588-597.

Weissborn, A. C., Liu, Q., Rumley, M. K., and Kennedy, E. P. (1994). UTP: alpha-D-glucose-1-phosphate uridylyltransferase of *Escherichia coli*: isolation and DNA sequence of the galU gene and purification of the enzyme. *J Bacteriol* 176, 2611-2618.

Wilson, W. A., Skurat, A. V., Probst, B., de Paoli-Roach, A., Roach, P. J., and Rutter, J. (2005). Control of mammalian glycogen synthase by PAS kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16596-16601.

Wong, L. J., Sheu, K. F., Lee, S. L., and Frey, P. A. (1977). Galactose-1-phosphate uridylyltransferase: isolation and properties of a uridylyl-enzyme intermediate. *Biochemistry* 16, 1010-1016.

Yamashiro, K., Yokobori, S., Oshima, T., and Yamagishi, A. (2006). Structural analysis of the plasmid pTA1 isolated from the thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *Extremophiles* 10, 327-335.

Yasuda, M., Oyaizu, H., Yamagishi, A., and Oshima, T. (1995). Morphological variation of new *Thermoplasma acidophilum* isolates from Japanese hot springs. *Appl Environ Microbiol* 61, 3482-3485.

Yasuda, M., Yamagashi, A., Oshima, T. (1995). The plasmids found in isolates of the acidothermophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *FEMS Microbiology letters* 128, 157-162.

Yoder, M. D., Keen, N. T., and Jurnak, F. (1993). New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science* 260, 1503-1507.

## Lebenslauf

Name: Annette Roeben  
Geburtsdatum: 25.01.1976  
Geburtsort: Hamburg  
1982-1986 Grundschule Alsterredder in Hamburg-Poppenbüttel  
1986-1993 Gymnasium Oberalster in Hamburg-Poppenbüttel  
1993-1995 Carl-von-Ossietzky Gymnasium in Hamburg-Poppenbüttel  
1995-2002 Studium der Biologie an der Universität Hamburg  
2001-2002 Anfertigung der Diplomarbeit unter der Betreuung von Dr. M. Hayer-Hartl am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried mit dem Thema: „Untersuchungen zum Mechanismus der GroEL-assistierten Proteinfaltung am Beispiel von Maltose-binding Protein“  
2003-2006 Anfertigung der Dissertation unter der Betreuung von Prof. F. U. Hartl am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried mit dem Thema: „Röntgenstrukturanalyse eines Aktin-Homologen Ta0583 aus *Thermoplasma acidophilum* und der UDP-Glukose Pyrophosphorylase aus *Saccharomyces cerevisiae*.“