

Das Tumorsuppressor-Protein APC: Strukturelle und biochemische Aspekte

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Lara Tickenbrock
aus Oelde
2002

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 1999 bis Oktober 2002 unter der Leitung von Herrn PD Dr. Oliver Müller am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund.

- | | |
|---------------|----------------------|
| 1. Gutachter: | PD Dr. Jörg Bartsch |
| 2. Gutachter: | PD Dr. Oliver Müller |

INHALTSVERZEICHNIS

<u>I. SUMMARY UND ZUSAMMENFASSUNG</u>	1
A. Summary	1
B. Zusammenfassung	2
<u>II. EINLEITUNG</u>	3
A. Das APC-Gen	3
B. Das APC-Protein	5
1. Die Oligomerisierungsdomäne	6
2. Das nukleäre Export Signal	6
3. Die Homologie-Domäne	6
4. Die Armadillo-homologe Domäne	7
5. Die β -Catenin- und Axin-Bindungsregion	7
6. Die Mutation Cluster Region	8
7. Das nukleäre Lokalisationssignal	8
8. Die Tubulin-Bindungsregion	9
9. Die EB1- und DLG-Bindungsregion	10
C. Der Wnt-Signalweg	10
1. Die Interaktion zwischen APC und β -Catenin	12
2. Mutationen im β -Catenin-Gen	13
D. APC im Zellkern	14
1. Crm1	14
2. Ran	15
E. Ziel der Arbeit	17
<u>III. MATERIAL UND METHODEN</u>	18
A. Material	18
1. Chemikalien	18
2. Puffer	19
3. Nährmedien	19
4. Bakterienstämme	20
5. Vektoren	20
6. Standards	21

7. Enzyme und Proteine	22
8. Antikörper	22
9. Kit-Systeme	23
10. Laborgeräte	23
B. Methoden	25
1. Molekulargenetische Methoden	25
1.1 Polymerasekettenreaktion	25
1.2 Restriktion	26
1.3 Ligation	26
1.4 Transformation	26
1.5 DNA-Sequenzierung	27
1.6 Gezielte <i>in vitro</i> -Mutagenese	29
2. Expression der Gene und Isolierung von Proteinen	31
2.1 Genexpression	31
2.2 Ultraschallaufschluss	32
2.3 Proteinreinigung	32
2.3.1 Reinigung von Proteinen mit Histidin-Tag	32
2.3.2 Reinigung von GST-Fusionsproteinen	33
2.3.3 PreScission TM -Spaltung von GST-Fusionsproteinen	33
2.3.4 Gelfiltration	34
3. Proteinchemische Methoden	35
3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	35
3.1.1 Bradford-Assay	35
3.1.2 Ehresmann-Methode	35
3.1.3 Direkte spektroskopische Konzentrationsbestimmung	36
3.2 Proteingelektrophorese	36
3.3 Western-Blot	37
3.4 Massenspektrometrie	38
3.4.1 ESI-MS	38
3.4.2 MALDI-TOF	39
3.5 Limitierte Proteolyse	40
3.6 <i>in vitro</i> Präzipitations-Experimente	40
3.7 Computergestützte Auswertungsprogramme	40
4. Biophysikalische Methoden	41

4.1 Fern-UV-Circulardichroismus	41
4.2 Differential Scanning Calorimetry (DSC)	41
4.3 Mikrokalorimetrie	42
5. Röntgenstrukturanalyse	43
5.1 Kristallisation	43
5.2 Kristallisation nach der <i>hanging drop</i> Methode	45
5.3 Kristallstrukturanalyse und Datensammlung	46
5.4 Kryokristallographie	46
5.5 Phasenbestimmung mittels SAD	47
5.6 Modellbau und Strukturverfeinerung	47
IV. ERGEBISSE	49
A. Oligomerisierung des APC-Proteins	49
1. Klonierung und Expression des vorderen APC-Genfragments	50
2. Biochemische Charakterisierung von APC2-250	51
2.1 Analyse des Oligomerisierungsverhaltens	51
2.2 Test der Sensitivität und Spezifität eines anti-APC2-250 Serums aus Kaninchen	53
2.3 Limitierte Proteolyse	54
2.4 Massenspektrometrische Analyse des tryptischen Fragments	56
3. Strukturelle Analyse von APC2-250	57
3.1 Sekundär-Strukturanalyse des APC2-250 durch CD-Spektroskopie	57
3.2 Kristallisationsversuche von APC2-250	58
4. Subklonierung, Expression und Reinigung des tryptischen Fragments APC129-250	59
5. Biochemische Analyse des APC129-250 Proteins	60
5.1 Analyse des Oligomerisierungsverhalten des APC129-250 Proteins	60
5.2 Antikörpertest	61
5.3 Stabilitätstest	61
6. Strukturelle Analyse des APC129-250 Proteins	62
6.1 Sekundär-Strukturanalyse des APC2-250 durch CD-Spektroskopie	62
6.2 Kristallisation	63
6.3 Herstellung von Kristallen einer L-Seleno-Methionin Mutante von APC129-250	64
6.4 Ermittlung von Kryobedingungen	65
6.5 Strukturaufklärung	66
7. Interaktionspartner von APC129-250	71

7.1 Expression, Reinigung und Nachweis von Crm1	72
7.2 Präzipitations-Experimente zum Nachweis der Interaktion zwischen Crm1 und APC129-250	72
B. Interaktion von APC mit b-Catenin	75
1. Reinigung von APC-Proteinfragmenten aus der APC- β -Catenin-Bindungsregion sowie der Armadillo-Region des β -Catenins	76
1.1 Quantitative Analyse der Interaktion zwischen den Proteinfragmenten des APC mit der Armadillo-Region des β -Catenins	78
1.2 Quantitative Analyse der Bedeutung der Phosphorylierung	80
2. Isolierung des β -Catenin-Wildtypproteins und der β -Catenin-Mutanten	81
2.1 Quantitative Analyse der Interaktion zwischen APC1449-1536 und β -Catenin-Wildtyp sowie den β -Catenin-Mutanten	82
V. DISKUSSION	85
A. Die N-terminale Domäne des APC-Proteins	85
1. Struktur der N-terminalen Domäne des APC Proteins	85
2. Das nukleäre Export Signal von APC129-250	88
3. Tumorrelevante Mutationen im APC129-250	92
B. Die Interaktion zwischen APC und b-Catenin	93
1. Die Bindung verschiedener APC-Proteinfragmente an β -Catenin	93
2. Der Einfluss N-terminaler β -Catenin Mutationen auf die APC-Interaktion	98
VI. LITERATURVERZEICHNIS	100
VII. ANHANG	115
Eigene Veröffentlichungen zum Thema dieser Arbeit	115
Abkürzungen	116
Danksagung	118
Erklärung	119

A. SUMMARY

The main topic of this thesis is the tumor suppressor protein APC (Adenomatous Polyposis Coli) and its many different functions. Only little is known about the structural architecture of the 2843 amino acids APC protein. A stable and trypsin-resistant domain close to the N-terminal end, termed APC129-250, could be identified. The crystal structure of APC129-250 could be solved. The domain is monomeric and consists of three α -helices forming two separate anti-parallel coiled coils. APC129-250 includes the nuclear export signal NES(165-174) at the C-terminal end of the first helix. Interestingly, the conserved hydrophobic amino acids of NES(165-174), which are necessary for the nuclear export activity, are buried in one of the coiled coils. Therefore these residues are not freely accessible for interaction partners. Nevertheless, APC129-250 is able to directly interact with the nuclear export factor Crm1. This interaction is even enhanced by the small GTPase Ran in its activated GTP-bound form and also by a double mutation in APC129-250, which deletes two amino acids forming two of the major hydrophobic interactions within the coiled coil. These results hint to a regulatory mechanism of the APC nuclear export activity by NES masking.

The most important interaction partner of the APC protein is the proto-oncoprotein β -Catenin. Together with other proteins of the Wnt-signaling pathway, APC regulates the intracellular concentration and localization of the β -Catenin protein. Several repetitive motifs within the APC sequence are necessary for this interaction, at least three homologous stretches of 15 amino acids and seven homologous stretches of 20 amino acids. Biophysical measurements show that the third recombinantly expressed non-phosphorylated 20-amino acid repeat of the APC protein is able to bind to β -Catenin *in vitro*. Surprisingly, phosphorylation is not necessary for the binding itself. Nevertheless, phosphorylation of conserved serines within the repetitive motifs, which was simulated by site-directed mutagenesis of serines to aspartates, increases the affinity of the APC protein to β -Catenin significantly. Though the functional interaction between APC and β -Catenin has been characterized on the cellular level in detail, the stoichiometric relation of this binding is still not known. Biochemical data of this study indicate a 1:1 binding stoichiometry between β -Catenin and the homologous motifs within the APC sequence. The 20-amino acid repeats have similar binding affinities and do not influence each other in their binding to β -Catenin.

Altogether this study answers several important questions around the APC protein and its interaction partners by biophysical and biochemical experiments.

B. ZUSAMMENFASSUNG

Der Verlust des Tumorsuppressor-Gens APC (Adenomatöse Polyposis Coli) ist ein entscheidendes Ereignis in der Entstehung und Progression eines Darmtumors. Liegt in Darmepithelzellen nur verkürztes APC-Protein vor, kann dieses Tumorsuppressor-Protein seine antiproliferative und tumorsuppressive Aufgabe nicht mehr erfüllen.

In dieser Arbeit konnte die Struktur einer funktionellen Domäne des APC-Proteins gelöst werden. Hierbei handelt sich um das stabile tryptische Proteinfragment APC129-250, in dem ein nukleäres Export Signal (NES) lokalisiert ist. Die APC129-250 Struktur besteht aus drei α -Helices, die wiederum in zwei Coiled coil Regionen angeordnet sind. Interessanterweise sind die hydrophoben konservierten Aminosäurereste der NES(165-174)-Sequenz, die notwendig für die Exportaktivität sind, in einer der Coiled coil Regionen vergraben. Mit Hilfe von *in vitro* Präzipitations-Experimenten wurde die direkte Interaktion von APC129-250 mit Crm1 nachgewiesen. Die Interaktion wird durch die Zugabe von aktivem RanGTP verstärkt. Die Interaktion wird außerdem durch den Austausch zweier Leucinreste, die verantwortlich für die hydrophoben Wechselwirkungen der Coiled coil sind, verstärkt. Dies weist für die Bindung von APC129-250 und Crm1 auf einen Demaskierungsmechanismus hin. So wird die Interaktion durch Auflösung der Coiled coil Struktur verbessert, wodurch die konservierten Reste des NES(165-174)-Motivs frei zugänglich werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Interaktion von APC mit dem Proto-Onkoprotein β -Catenin untersucht. Entscheidend für diese Bindung sind repetitive homologe Sequenzmotive in der APC-Sequenz: mindestens drei Motive von 15 Aminosäuren und sieben Motive von 20 Aminosäuren. Es wurde festgestellt, dass unphosphorylierte, rekombinant exprimierte 20-Aminosäure-Repetitionen des APC-Proteins an β -Catenin binden können. Außerdem konnte die lange unklare Frage der Stöchiometrie bezüglich dieser APC-Repetitionen und β -Catenin gelöst werden. Eine 20-Aminosäure-Repetition kann ein β -Catenin binden, während zwei Repetitionen zwei β -Catenine binden können. Desweiteren konnte die Bedeutung der Phosphorylierung für diese Bindung gezeigt werden. Dafür wurden die Phosphorylierungen durch Phospho-Serin-Simulierung in einem 20-Aminosäure-Bindungsmotiv des APC-Proteins auf die Bindung an β -Catenin untersucht. Dabei konnte eine 20fach stärkere Bindung der beiden Interaktionspartner beobachtet werden.

Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit zahlreiche wichtige Fragen rund um das APC-Protein und seinen Interaktionspartnern in biochemischen und biophysikalischen Experimenten gelöst werden.

II. EINLEITUNG

Krebs ist nach Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industriestaaten. Für die Entstehung dieser Krankheit sind biologische Vorgänge verantwortlich. In einem gesunden Organismus wird der Stoffwechsel, das Wachstum und die Teilung der Zelle durch äußere und innere Signalwege reguliert. Wenn es zu einer Störung innerhalb dieser Signalwege kommt, zum Beispiel durch Mutationen in beteiligten Genen, sind die Zellabläufe gestört und können zur Umwandlung der gesunden Zelle in eine Tumorzelle führen. Diese entarteten Zellen bilden durch ihr schnelles Wachstum den Tumor, der in benachbarte Gewebe hineinwachsen kann und in späteren Stadien Metastasen (Tochtergeschwulste) bildet.

In den europäischen Ländern gehört der Dickdarmkrebs nach Lungenkrebs zu den häufigsten Tumorformen. Das Risiko, im Laufe seines gesamten Lebens an Dickdarmkrebs zu erkranken, beträgt 4 bis 6 %. Jährlich sterben weltweit mehr als 200.000 Menschen an dieser Krankheit. Die zwei am besten charakterisierten erblichen Formen des Darmkarzinoms sind die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und die HNPCC (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer). Die erstgenannte Erkrankung wird durch eine genetische Veränderung im Tumorsuppressor-Gen Adenomatöse Polyposis Coli (APC) ausgelöst, während die zweitgenannte mit Defekten in den Reparatur-Mutator-Genen verbunden ist. FAP wird autosomal dominant weitervererbt, und die betroffenen Personen weisen eine hohe Anzahl von Dickdarmpolypen auf. Aufgrund dieser Prädisposition ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass mindestens einer dieser Polypen ein malignes Stadium erreicht. Eine rechtzeitige Entfernung dieser Polypen stellt somit eine einzige und wirksame Vorbeugung vor Dickdarmkrebs dar. Meistens (80 %) entsteht Dickdarmkrebs aber als sporadische Krebsform (Kinzler und Vogelstein, 1996).

A. Das APC-Gen

Das in vererbten und sporadischen Dickdarntumoren am häufigsten mutierte Gen ist das Tumorsuppressor-Gen APC. Beim Menschen konnte dieses Gen auf Chromosom 5 lokalisiert werden (5q21-22, Bodmer *et al.*, 1987; Leppert *et al.*, 1987). Das APC-Gen umfasst 15 Exon-Sequenzen, die sich über 100 kb genomischer DNA erstrecken. Es existieren für verschiedene Gewebe unterschiedliche Expressionsmuster (Horii *et al.*, 1993), wobei durch alternatives Spleißen der primären Transkripte verschiedene APC-Isoformen auftreten. Das Gen ist in

über 80 % aller Dickdarntumoren inaktiviert und seine Mutation initiiert die Entstehung des Dickdarntumors (Miyoshi *et al.*, 1992).

Für Dickdarmkrebs gibt es ein Modell, das es erlaubt, den Weg vom prämaligen über das fortgeschrittene Stadium bis hin zum invasiven (metastasierenden) Tumor zu verfolgen. Dabei ist die Entstehung eines Dickdarntumors aus genetischer Sicht ein Mehrschrittprozess und beinhaltet Mutationen sowohl in Proto-Onkogenen als auch in Tumorsuppressor-Genen (Abbildung 1, Übersicht bei Vogelstein und Kinzler, 1993). Der Prozess wird durch eine Mutation im APC-Gen initiiert, die den Übergang einer normalen in eine hyperproliferative Epithelzelle verursacht, die zunächst zu einem frühen Adenom auswächst. Diese genetische Veränderung ist meistens mit dem Verlust beider Allele verbunden oder führt zu einem verkürzten APC-Protein.

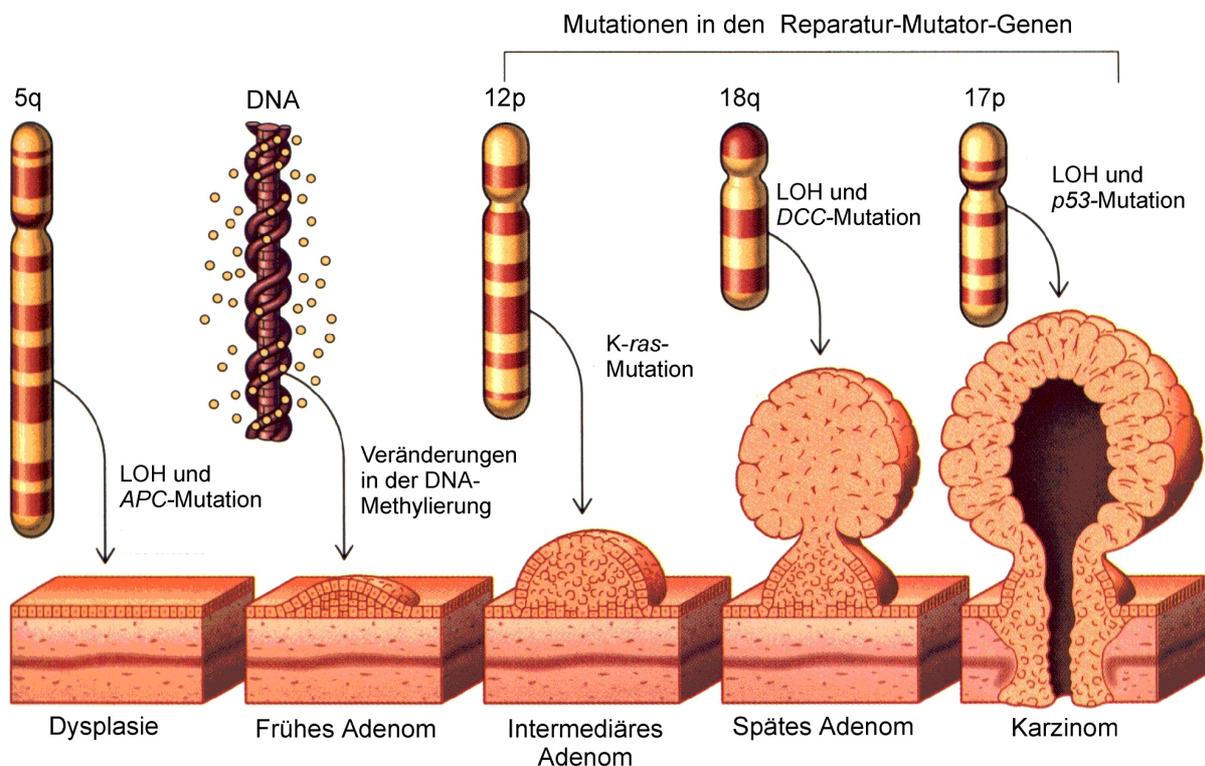


Abbildung 1: Das Modell der Mehrschrittkarzinogenese des kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach Vogelstein und Kinzler, 1993). In einer Abfolge von mindestens fünf genetischen Ereignissen – Mutation von APC, Veränderungen der DNA-Methylierung, K-ras, DCC- und p53-Mutationen – geht das normale Darmepithel über Adenomstadien in ein metastasierendes Karzinom über. Mutationen von Reparatur-Mutator-Genen erhöhen die genomische Instabilität durch steigende Mutationsrate. LOH: „Loss of heterozygosity“; DCC: Deleted in Colon Cancer.

Weiterführende Ereignisse in diesem Prozess sind epigenetische Veränderungen (Änderungen des DNA-Methylierungsmusters) oder Mutationen in Proto-Onkogenen (K-ras). Dadurch er-

langt die Zelle die Eigenschaft, benachbarte Zellen überwachen zu können, was zur Ausbildung eines größeren Adenoms führt. Die Inaktivierung weiterer Tumorsuppressor-Gene wie zum Beispiel des p53 führen zur Ausbildung eines Karzinoms, das im Endstadium Metastasen ausbilden kann. Kein Tumor trägt alle diese Mutationen. Vermutlich sind aber in allen Fällen Gene mutiert, die in den jeweiligen Signalwegen involviert sind und dadurch den gleichen physiologischen Effekt wie die genannten genetischen Veränderungen haben.

Fast alle bisher in sporadischen oder in der Keimbahn von FAP-Patienten identifizierten Veränderungen im APC-Gen sind Frameshift- oder Nonsense-Mutationen, die zu einem um ungefähr ein Drittel verkürzten Genprodukt führen (Beroud und Soussi, 1996). Als eine mögliche Erklärung hierfür wird vermutet, dass die Interaktion zwischen APC und Proteinen, die an das carboxyterminale Drittel des APC-Proteins binden, wichtig für dessen Tumorsuppressorfunktion sind.

B. Das APC-Protein

Das APC-Genprodukt ist mit 2843 Aminosäuren und mit einem ungefähren Molekulargewicht von 310 kDa ein sehr großes Protein. Auf der gesamten Länge der Aminosäuresequenz befinden sich zahlreiche funktionelle Domänen, die das APC-Protein zu einem entscheidenden Baustein des komplexen Wnt-Signaltransduktionsprozesses (Abbildung 3) macht.

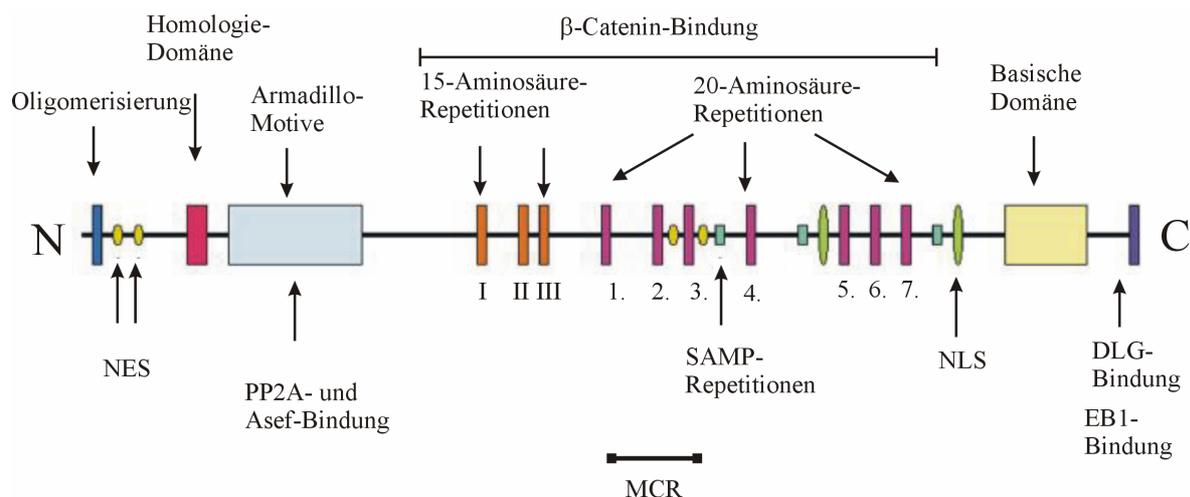


Abbildung 2: Die verschiedenen Motive des APC-Proteins und seine Interaktionspartner (modifiziert nach van Es *et al.*, 2001). Für genauere Erklärungen siehe Text.

1. Die Oligomerisierungsdomäne

Der N-terminale Bereich des Proteins vermittelt die Oligomerisierung des Proteins (Su *et al.*, 1993, Joslyn *et al.*, 1993). Verantwortlich hierfür sind die sich wiederholenden Motive aus sieben Aminosäuren (sogenannte Heptad repeats, Groden *et al.*, 1991), die Coiled coil Strukturen ausbilden und dadurch eine Oligomerisierung bewirken. Wie die Kristallstruktur zeigte, bilden die ersten 55 Aminosäuren wirklich eine Coiled coil Struktur aus und bewirken damit die Dimerisierung des APC-Proteins (Day und Alber 2000).

2. Das nukleäre Export Signal

Das APC-Protein enthält mehrere Leucin-reiche Sequenzen, welche als nukleäre Export Signale (NES) funktionieren könnten. Zwei funktional aktive NES-Motive sind dabei am N-Terminus lokalisiert, zwischen den Aminosäuren 68 und 77 sowie 165 und 174 (Henderson *et al.*, 2000; Neufeld *et al.*, 2000). Drei weitere NES-Motive stimmen sehr genau mit der dritten, vierten und siebten 20-Aminosäure-Repetitionen für die β -Catenin-Bindung überein (Rosin-Arbesfeld *et al.*, 2000). Durch diese hoch konservierten NES-Motive im APC-Protein wird vermutlich β -Catenin vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert, wenn β -Catenin an seine Bindungsregion im zentralen Bereich des APC-Proteins gebunden ist (Munemitsu *et al.*, 1995). Sind keine NES-Motive mehr vorhanden, akkumuliert β -Catenin im Zellkern und kann nicht im Zytoplasma abgebaut werden (siehe Abbildung 3). Interessanterweise liegen das 3'-Ende der somatischen MCR (Mutation Cluster Region, siehe 2.6.) und die NES-Sequenz zwischen den Aminosäuren 1506 bis 1511 übereinander. Der Verlust der Region C-terminal der MCR führt also auch zum Verlust dieser NES-Sequenz, so dass dort während der Tumorgenese ein starker selektiver Druck vorhanden ist.

3. Die Homologie-Domäne

Diese Domäne ist vom Mensch zur Fliege stark konserviert. Ihre Funktion ist allerdings noch nicht bekannt.

4. Die Armadillo-homologe Region

Die Armadillo-homologe Region ist zwischen den Aminosäuren 453 und 766 lokalisiert und besteht aus den sogenannten Armadillo-Motiven. Hierbei handelt es sich um Sequenzmotive aus 42 Aminosäuren, die eine Homologie zu dem Protein Armadillo aus *Drosophila Melanogaster* besitzen (Pfeifer *et al.*, 1994). Bei Armadillo handelt es sich um das *Drosophila*-Homolog des menschlichen Proteins β -Catenin. Während sich im Armadillo-Protein das Sequenzmotiv aus 42 Aminosäuren insgesamt dreizehnmal wiederholt, enthält das APC-Protein nur sieben Wiederholungen. Bisher kennt man nur zwei Proteine, die an die Armadillo-Region des APC-Protein binden, zum einen B56, die regulatorische Untereinheit der Protein Phosphatase 2A (PP2A), und zum anderen Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor).

PP2A ist eine Serin/Threonin Protein Phosphatase. Interessanterweise kann die katalytische Untereinheit dieser Phosphatase an Axin binden (Seeling *et al.*, 1999), welches ebenfalls an APC binden kann (Abbildung 3). APC und Axin sind beides Komponenten des Wnt-Signalwegs und die Verbindung mit PP2A könnte zur Dephosphorylierung weiterer wichtiger Komponenten dieser Signalkaskade führen.

Mit seiner Armadillo-Domäne bindet APC außerdem an das Rac-spezifische Asef (Kawasaki *et al.*, 2000). Ko-Lokalisationsstudien deuten darauf hin, dass der APC-Asef-Komplex das Aktin-Zytoskelett, die Zellmorphologie und die Migration regulieren könnte.

5. Die β -Catenin- und Axin-Bindungsregion

Das zentrale Drittel des APC-Proteins vermittelt die Interaktion mit β -Catenin und Axin. Für die β -Catenin-Bindung sind drei repetitive Motive aus 15 sowie sieben repetitive Motive aus 20 Aminosäuren verantwortlich, die zudem stark konserviert sind. Die 15-Aminosäure-Repetitionen liegen zwischen den Aminosäuren 1020 und 1169 (I bis III in Abbildung 2; Su *et al.*, 1993), die 20-Aminosäure-Repetitionen liegen weiter C-terminal zwischen den Aminosäuren 1210 und 2075 (1. bis 7. in der Abbildung 2; Groden *et al.*, 1991; Rubinfeld *et al.*, 1993). Dabei wird die Bindung an die 20-Aminosäure-Repetitionen (Konsensus-Sequenz TPxxxFSxxxSxSxL) durch Phosphorylierung durch die Serin/Threonin Kinase Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) moduliert (Rubinfeld *et al.*, 1996). Durch die Bindung von β -Catenin an die 20-Aminosäure-Repetitionen wird die zytoplasmatische β -Catenin-Konzentration verringert. Bei dem C-terminal verkürzten APC-Protein, wie es in fast allen

Darmkrebstumoren vorkommt, fehlen einige oder alle 20-Aminosäure-Repetitionen, so dass die Eigenschaft des APC-Proteins, effizient an β -Catenin zu binden, stark eingeschränkt ist. Innerhalb der 20-Aminosäure-Repetitionen zur Interaktion mit β -Catenin befinden sich weitere konservierte Sequenzen aus 20 Aminosäuren, die sogenannte SAMP-Repetitionen (SAMP steht für die Aminosäuren Serin-Alanin-Methionin-Prolin, Behrens *et al.*, 1998). Mit diesem Motiv wird die Bindung an Axin/Conductin vermittelt, indem APC an ihre N-terminale RGS-Sequenz (Regulator of G-Protein Signaling) bindet. Axin/Conductin spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle im Wnt-Signalweg (siehe Abbildung 3.). Der Verlust der SAMP-Motive könnte einen direkten Einfluss auf die intrazelluläre β -Catenin-Konzentration haben und kann damit zu einer Deregulation der Zellproliferation führen.

6. Die MCR (Mutation Cluster Region)

Bis heute sind sehr viele APC-Mutationen sowohl in Darmtumoren von FAP-Patienten als auch in somatischen Zellen von sporadischen Darmtumoren detektiert worden (Beroud und Soussi, 1996). Dabei verursachen etwa zwei Drittel dieser Mutationen eine Verschiebung des Leserahmens (sogenannte Frameshift-Mutationen), die zur Entstehung von Stopp-Kodons führen. Dadurch kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteintranslation und zur C-terminalen Verkürzung des APC-Proteins. Bei einem Drittel der Mutationen handelt es sich um Nonsense-Punktmutationen. Am häufigsten befinden sich die Mutationen in der Mitte des Gens, so dass die Translation in der Mitte des Proteins aufhört. Diese Region wird als „Mutation Cluster Region“ (MCR) bezeichnet und liegt zwischen den Aminosäuren 1284 und 1580 (Miyoshi *et al.*, 1992). Das APC-Protein in den meisten Darmtumoren hat daher nur etwa die Hälfte des Molekulargewichtes des APC-Wildtyp-Proteins (Smith *et al.*, 1993).

7. Das nukleäre Lokalisationssignal

Das APC-Protein enthält auch zwei potentielle nukleäre Lokalisationssignale (NLS) in den Aminosäuren 1767 bis 1772 und 2048 bis 2053 (Zhang *et al.*, 2000). Dabei wird der Import des APC-Proteins vom Zytoplasma in den Zellkern wahrscheinlich durch Phosphorylierung der NLS-Sequenzen reguliert. APC-Mutationen, die zu einem C-terminal verkürzten APC-Protein führen und damit zum Verlust der NLS, könnten die Translokation des APC-Proteins in den Zellkern verhindern.

Analog zur Funktion der NES-Sequenz wird vermutet, dass die NLS-Sequenz des APC-Proteins wahrscheinlich für den Transport von β -Catenin vom Zytoplasma in den Zellkern

verantwortlich sein könnte. Aufgrund der neuen Erkenntnisse über eine mögliche weitere Tumorsuppressorfunktion des APC-Proteins im Zellkern (siehe 4.), nämlich die intrazelluläre Verteilung des β -Catenins, könnte diese Zellkerntranslokation eine Bedeutung in der Tumorentstehung haben.

8. Die Tubulin-Bindungsregion

Dem zentralen Drittel des APC-Proteins folgt im Bereich der Aminosäuren 2200 bis 2400 eine Tubulin-bindende Domäne (Munemitsu *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1994; Deka *et al.*, 1998). Diese Region beinhaltet einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren wie Arginin und Lysin und trägt deswegen auch die Bezeichnung „Basische Domäne“ (Grodén *et al.*, 1991). Desweiteren ist diese Domäne reich an Prolin. Die Anhäufung dieser drei Aminosäuren ist für viele Mikrotubuli-assoziierte Proteine beschrieben worden (Lewis *et al.*, 1988), und die Domäne auf dem APC-Protein ist unter anderem dem Protein tau homolog (Deka *et al.*, 1998). Munemitsu *et al.* (1994) konnten zeigen, dass diese Region die Polymerisation von Tubulin *in vitro* katalysieren kann und *in vivo* an Mikrotubuli bindet, so dass dem APC-Protein in dieser Region durch seine Verbindung zum Zytoskelett eine Rolle in der Aktivierung der Zellwanderung zukommen könnte. Die Interaktion zwischen Tubulin und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen ist im übrigen elektrostatischer Natur (Maccioni *et al.*, 1988). C-terminal verkürztes APC-Protein bindet nicht an Tubulin, was ein Grund für den Verlust der Migrationsfähigkeit der Darmzelle sein könnte (Maccioni *et al.*, 1995; Näthke *et al.*, 1996).

Neue Ergebnisse von Kaplan *et al.* (2001) zeigen zudem, dass Zellen mit verkürzten APC-Protein eine defekte Chromosomen Segregation aufweisen. Während das APC-Protein aufgrund der Tubulin-Interaktion in Interphase-Zellen in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert ist, ist es während der Mitose am Ende der Mikrotubuli in den Kinetochoren eingelagert und komplexiert Kontrollproteine wie Bub1 und Bub3. *In vitro* ist APC zudem ein hochaffines Substrat für die Bub-Kinase. Das sind erste Hinweise, dass das APC-Protein in der Kinetochor-Mikrotubuli-Verbindung eine Rolle spielt und APC-Mutationen für die abnormale Chromosomenanzahl sowie für die Chromosomeninstabilität in Krebszellen mitverantwortlich sind (Fodde *et al.*, 2001).

9. Die EB1- und DLG-Bindungsregion

Es wird spekuliert, dass die C-terminale Region des APC-Proteins eine Rolle im Zellzyklus spielt. Zum einen könnte dafür die Bindung an EB1 verantwortlich sein (Su *et al.*, 1995). EB1 gehört zur Familie der Tubulin-bindenden Proteine und ist mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett der mitotischen Spindeln assoziiert. Daher wird angenommen, dass APC auf indirekte Weise die Spindelformation während des Zellzyklusses beeinflusst.

Zum anderen bindet die C-terminale S/TXV-Sequenz des APC-Proteins an die PDZ-Domäne des hDLGs (human Disc Large Gene, Matsumine *et al.*, 1996). hDLG ist ein Mitglied der Membran-assoziierten Guanylat Kinasen, welche seitlich von Zell-Zellkontakten zwischen epithelialen Zellen und an den Termini von präsynaptischen Nerven des zentralen Nervensystems lokalisiert sind. Der APC/hDLG-Komplex könnte demnach die Zellpolarität und die Zellproliferation beeinflussen.

C. Der Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg reguliert die Differenzierung in der Embryonalentwicklung durch die Vermittlung von Zell-Zell-Interaktionen in eukaryotischen Zellen (Cadigan und Nusse 1997). Er ist an Prozessen der Zellmigration, der Zellpolarität und der Zellproliferation beteiligt. Ereignisse, die mit Defekten in diesem Signalweg verbunden sind, führen zu Fehlern in der Entwicklung der Organismen. Dieser Signalweg spielt auch eine entscheidende Rolle in der Entstehung von humanen Krebsarten.

Die Mitglieder der Wnt-Familie sind Cystein-reiche Glykoproteine, die sekretiert werden. Wnt-1 (früher int-1) trägt seinen Namen aufgrund seiner Homologie zum *Drosophila*-Protein Wingless (Wg).

In der Anwesenheit eines Wnt-Signals beginnt der Signalweg mit der Bindung des Wnt-Faktors an den membranständigen Rezeptor Frizzled (Abbildung 3B, Bhanot *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Die Proteine der Frizzled-Familie sind Sieben-Transmembranrezeptoren und haben eine extrazelluläre Cystein-reiche Domäne am N-Terminus, über die der Wnt-Ligand gebunden wird. Durch diese Bindung wird das Protein Dishevelled (Dsh) durch Phosphorylierung aktiviert (Boutros *et al.*, 1999) und inhibiert die Serin/Threonin-Kinaseaktivität der GSK3 β (Siegfried *et al.*, 1992; Pfeifer *et al.*, 2000). Die aktive GSK3 β phosphoryliert Proteine mit dem Aminosäuresequenz-Motiv SxxS (x = beliebige Aminosäure), zum Beispiel APC, Axin und β -Catenin und andere Proteine. Aufgrund der reduzierten Kinaseaktivität der GSK3 β wird β -Catenin nicht phosphoryliert und nicht mehr von β TRCP (β -Transducin repeat

(β -Transducin repeat containing protein) erkennt, einer Komponente des Ubiquitin-Ligase Systems, das β -Catenin sonst mit dem kleinen Protein Ubiquitin kovalent verbindet und so zum Abbau durch das Proteasom führt (Kitagawa *et al.*, 1999). Es kommt zu einer Akkumulation des β -Catenins im Zytoplasma, welches schließlich in den Zellkern gelangt. β -Catenin kann dann aufgrund seiner Transaktivierungsdomäne im Komplex mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie („T-Cell Factor/Lymphoid-Enhancer Factor“; Behrens *et al.*, 1996) Ko-Repressoren wie Groucho (Cavallo *et al.*, 1998; Roose *et al.*, 1998) verdrängen und die Transkription bestimmter Zielgene wie *c-myc* aktivieren, wodurch wiederum die Zellproliferation stimuliert wird.

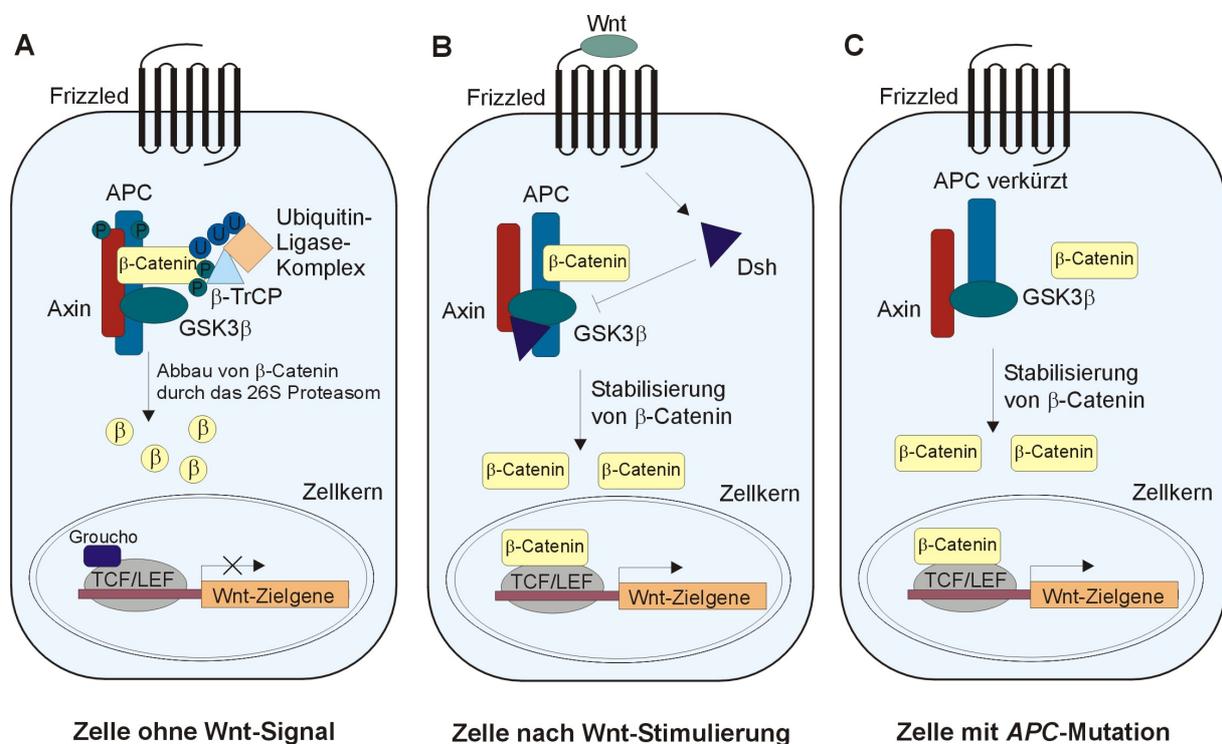


Abbildung 3: Der Wnt-Signalweg. Schematische Darstellung des Wnt-Signalwegs in einer nicht stimulierten Zelle (A), in einer Zelle nach Wnt-Stimulierung (B) und in einer Zelle mit APC-Mutationen (C). Im inaktiven Signalweg bildet sich der Zerstörungskomplex aus Axin, APC, GSK3 β und β -Catenin, wodurch β -Catenin über das Proteasom nach Ubiquitinylierung abgebaut wird. Die Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie sind im inaktiven Zustand an Ko-Repressoren wie Groucho gebunden. Der Signalweg wird durch Bindung von Wnt an Frizzled über Dsh aktiviert. Der Zerstörungskomplex löst sich auf und die Konzentration von β -Catenin steigt. β -Catenin wird in den Zellkern transportiert, wo es mit TCF/LEF interagiert und die Transkription von Wnt-Zielgenen induziert. (Abbildungen modifiziert nach Miller *et al.*, 1999).

In Abbildung 3A ist zu erkennen, dass in Abwesenheit eines Signals keine Transkriptionsaktivierung oder Zellteilung stattfindet, da die β -Catenin-Konzentration im Zytoplasma durch

einen großen Proteinkomplex bestehend aus β -Catenin, APC, Axin und GSK3 β reguliert wird.

In einer Tumorzelle mit einer Mutation im APC-Gen (Abbildung 3C), die zur Expression eines verkürzten Proteins führt, kann β -Catenin nicht mehr das APC-Protein binden. Dadurch kann die zytoplasmatische β -Catenin-Konzentration nicht mehr mit Hilfe des Zerstörungskomplexes verringert werden, und β -Catenin akkumuliert im Zytoplasma. β -Catenin wird in den Zellkern transportiert, wo es die Transkription seiner Zielgene aktivieren kann auch wenn kein Wnt-Signal mehr vorhanden ist. Diese Bedingungen resultieren in unkontrollierter Zellteilung und damit in der Entstehung eines Tumors (Pfeifer und Polakis, 2000; Polakis 2000).

1. Die Interaktion zwischen APC und β -Catenin

Die Proteine β -Catenin und *Drosophilas* Armadillo sind sehr homolog und besitzen duale Funktionen. β -Catenin wurde ursprünglich durch seine Interaktion mit Cadherin als Zelladhäsionsprotein identifiziert (McCrea *et al.*, 1991). Zusammen mit E-Cadherin vermittelt β -Catenin homophile Zell-Zell-Adhäsion, an der auch α -Catenin und γ -Catenin beteiligt sind. Durch die Interaktion wird eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett geknüpft (Yap *et al.*, 1997; Daniels *et al.*, 1995), während β -Catenin im Wnt-Signalweg eine bedeutende Rolle in der Regulation der Zellproliferation hat. Aufgrund der zellteilungsaktivierenden Funktion des β -Catenin/TCF-Komplexes in der Tumorentstehung wird β -Catenin auch als Proto-Onkogen bezeichnet (Rubinfeld *et al.*, 1997). Im Wnt-Signalweg ist die Voraussetzung für den Abbau des intrazellulären β -Catenins die Bindung an APC. Wird diese Interaktion auf Proteinebene durch Mutationen im APC-Gen verhindert, kann die β -Catenin-Konzentration nicht mehr verringert werden und es kommt zur Aktivierung der Zellteilung (siehe oben). Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, existieren mehrere β -Catenin-Bindungs-Repetitionen auf dem APC-Protein. Die 15-Aminosäure-Repetitionen sind für die negative Regulation von β -Catenins nicht entscheidend, während mindestens drei der 20-Aminosäure-Repetitionen vorhanden sein müssen, um die β -Catenin-Konzentration innerhalb der Zelle verringern zu können (Rubinfeld *et al.*, 1997; Polakis 1997). Im C-terminal verkürzten APC-Protein sind die meisten 20-Aminosäure-Repetitionen nicht mehr vorhanden, so dass diese Motive für die Tumorsuppressorfunktion des APC-Proteins essentiell sind.

2. Mutationen im b-Catenin Gen

Aufgrund der Primärstruktur kann β -Catenin in eine N-terminale, eine zentrale und eine C-terminale Domäne unterteilt werden (Abbildung 4). Im N-Terminus (Aminosäuren 1 bis 130) befindet sich eine GSK3 β -Konsensus-Phosphorylierungsstelle, in der konservierte Serin/Threonin-Reste phosphoryliert werden, damit β -Catenin für die Degradation des Ubiquitin-Proteasom Systems markiert wird (Orford *et al.*, 1997). Der zentrale Bereich (Aminosäuren 131 bis 680) ist hochkonserviert und besteht aus einer Aneinanderreihung von zwölf sich wiederholenden Armadillo-Motiven, die jeweils 42 Aminosäuren lang sind. In dieser Region befinden sich die Bindungsmotive für die Interaktionspartner APC, Axin, TCF/LEF und E-Cadherin. Die Kristallstruktur zeigte, dass die zwölf Motive eine Superhelix aus Helices bilden. Dadurch entsteht eine langgestreckte positiv geladene Grube, mit der bevorzugt negativ geladene Flächen der Interaktionspartner wechselwirken können (Huber *et al.*, 1997). Der C-Terminus (681 bis 781) beinhaltet eine transaktivierende Funktion, die für die Genaktivierung durch den β -Catenin/TCF-Komplex verantwortlich ist.

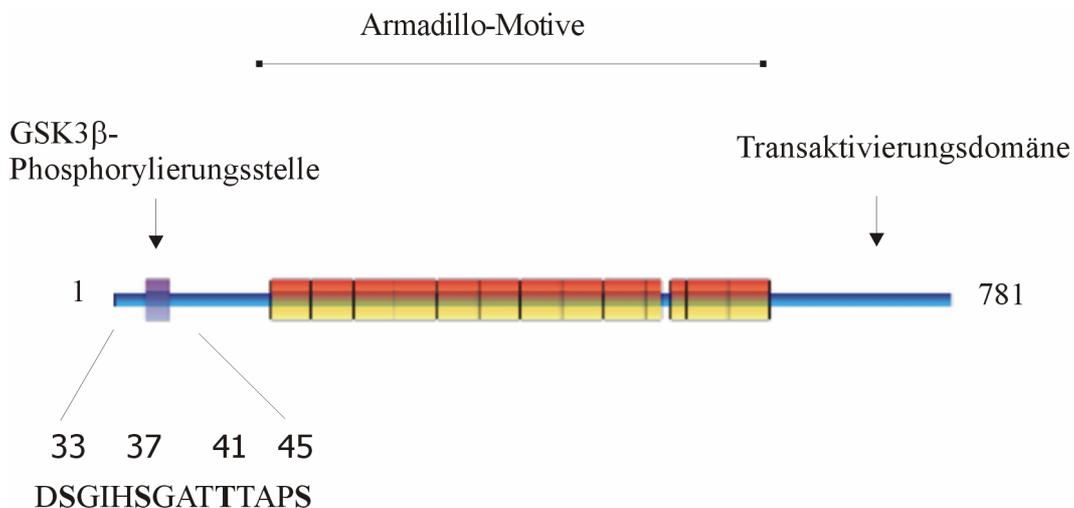


Abbildung 4: Die verschiedenen Motive des b-Catenin-Proteins und seine Interaktionspartner.

Sowohl Rubinfeld *et al.* als auch Morin *et al.* identifizierten 1997 spezifische β -Catenin-Mutationen in menschlichen Tumoren und Krebs-Zelllinien. Diese Mutationen verhindern die negative Regulation von β -Catenin durch APC und waren nur in den Zellen vorhanden, in denen Wildtyp APC-Protein anwesend war. Dabei befinden sich die Mutationen im N-

Terminus in den konservierten Serin/Threonin-Resten 33, 37, 41 oder 45. Ist eine dieser konservierten Aminosäuren deletiert oder durch eine andere Aminosäuren ausgetauscht, wird der Abbau von β -Catenin verhindert, da β -Catenin nicht mehr an diesen Resten phosphoryliert werden kann und so von β TRCP nicht mehr erkannt wird. Desweiteren kann β -Catenin nicht ubiquitinyliert werden und häuft sich im Zytoplasma an (Yost *et al.*, 1996; Aberle *et al.*, 1997). Die β -Catenin Mutationen sind im Gegensatz zu den APC-Mutationen dominant und tauchen in 10 % aller Dickdarntumoren auf.

Da APC an der Kontrolle der freien zytoplasmatischen β -Catenin-Konzentration durch Komplexbildung beteiligt ist, könnte man vermuten, dass die Bindung zwischen APC und β -Catenin ebenfalls durch die N-terminale Mutationen behindert wird.

D. APC im Zellkern

Bisher wurde das APC-Protein in mehreren unabhängigen Studien im Zellkern lokalisiert (Wong *et al.*, 1996; Neufeld und White, 1997). Mit der Existenz von Signalsequenzen (NES/NLS) für den Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma und der damit eventuell verbundenen Zellkerntranslokationsfunktion des APC-Proteins könnte dieser Funktion eine potentielle Bedeutung in der Tumorsuppression zukommen. Ein Schwerpunkt der APC-Untersuchung liegt daher in der Erforschung der Bedeutung der Funktion des APC-Proteins im Zellkern.

1. Crm1

Die Mechanismen des Protein-Transportes in und aus dem Zellkern sind in den letzten Jahren intensiv erforscht worden. Lösliche Rezeptoren erkennen sowohl für den Import als auch für den Export spezifische Signalsequenzen auf ihren Substraten. Diese Rezeptoren, auch Importine/Exportine oder Karyopherine genannt, interagieren direkt mit dem nukleären Porenkomplex (NPC) und wechseln zwischen Zytoplasma und Zellkern (Nigg, 1997; Mattaj *et al.*, 1998). Das klassische Import Signal (NLS) besteht aus basischen Aminosäuren, während das Export Signal (NES) Leucin-reich ist. Diese NES-Sequenz wird durch den Export-Rezeptor Crm1 (chromosome maintenance region) gebunden. Fornerod *et al.* (1997) konnten zeigen, dass Crm1 direkt an Nukleoporin bindet. Desweiteren bildet Crm1 einen festen ternären Komplex mit NES-haltigen Proteinen und der aktivierten Form des kleinen G-Proteins Ran (RanGTP, siehe Abbildung 5, Stade *et al.*, 1997). Crm1 kann selektiv durch Leptomycin B

(LMB) gehemmt werden, das kovalent an ein konserviertes Cystein in der zentralen Region von Crm1 bindet (Kudo *et al.*, 1999).

2. Ran

Ran gehört zu der Superfamilie der Ras GTP-bindenden Proteine (Bourne *et al.*, 1990) und wechselt zwischen der GTP-gebundenen („ON“) und der GDP-gebundenen („OFF“) Form. Der Nukleotid-gebundene Zustand von Ran wird durch zwei Protein-Familien reguliert. GEFs (Guanine Exchange Factor) katalysieren den Austausch des gebundenen GDP gegen GTP, was die weitere Interaktion mit Effektor-Molekülen stimuliert. GAPs (GTPase Activating Proteins) beschleunigen die intrinsische GTP-Hydrolyse, was das Protein wieder in den GDP-gebundenen Zustand überführt.

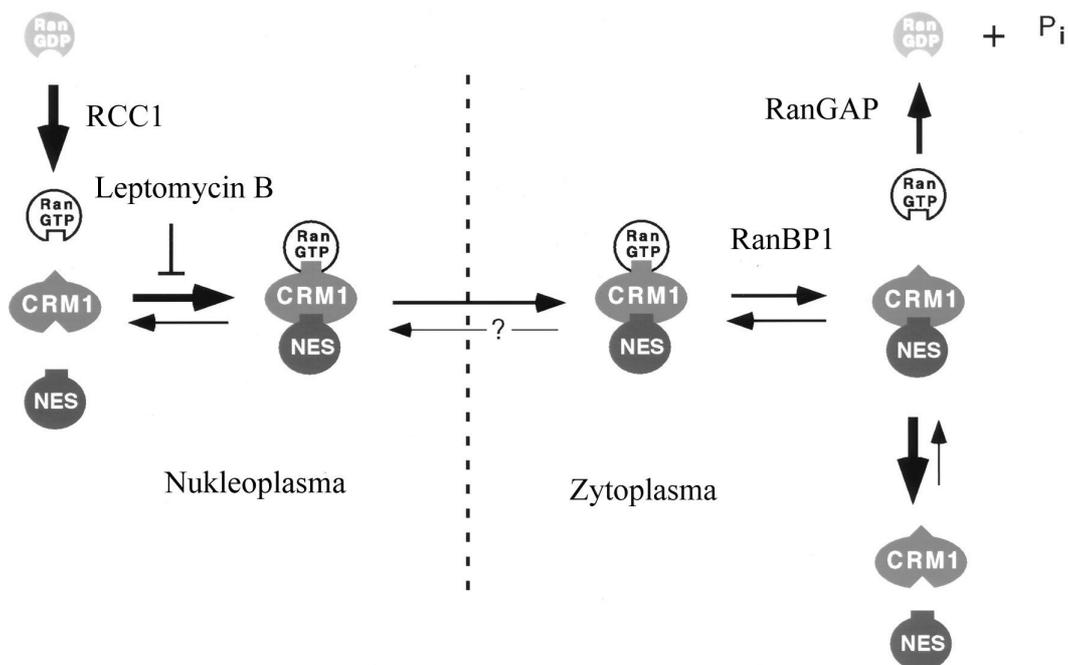


Abbildung 5: Modell des CRM1-abhängigen nukleären Exports. Im Zellkern bildet sich ein ternärer Komplex aus CRM1, NES-Protein und RanGTP, welches durch das Zytotoxin Leptomycin verhindert werden kann. Der ternäre Komplex gelangt vom Zellkern ins Zytoplasma, wo er durch RanBP1 destabilisiert wird, ein Vorgang, der durch die GTP Hydrolyse von Ran durch RanGAP irreversibel gemacht wird (Askjaer *et al.*, 1999).

Ran hat eine bedeutende Rolle als Kontrollelement in der nukleoplasmatischen Kommunikation. Als „molekularer Schalter“ reguliert es den Transport von RNA und Proteinen durch den nukleären Porenkomplex (NPC). Dafür ist ein Gradient von RanGTP zwischen dem Zellkern

(hohe Konzentration) und dem Zytoplasma (niedrige Konzentration) verantwortlich. Dabei wird die biologische Aktivität von Ran durch RCC1 (chromosome associated guanine exchange factor, ein Ran-GEF) im Zellkern und der zytoplasmatischen GTPase RanGAP reguliert. Durch die Verteilung dieser Regulatoren wird der Gradient von RanGTP über den NPC reguliert (Richards *et al.*, 1997; Goldfarb, 1997), so dass durch die hohe Konzentration von RanGTP im Zellkern der ternäre Komplex von NES/Crm1 und RanGTP entsteht, der durch den NPC in das Zytoplasma gelangt (Abbildung 5). Im Zytoplasma dissoziiert RanGTP von diesem Komplex und letztendlich wird das aktivierte RanGTP zum RanGDP und anorganischem Phosphat hydrolysiert. Der Crm1/NES Komplex dissoziiert.

Rosin-Arbesfeld *et al.* sowie Henderson *et al.* (2000) haben unabhängig voneinander die nukleäre Exportfunktion des APC-Proteins festgestellt. Inhibition von Crm1 durch Leptomycin B führten zur Akkumulation von APC sowie von β -Catenin im Zellkern. Analog dazu führten Mutationen in jeweils zwei der konservierten Leucine der NES(68-77)-Sequenz sowie der NES(165-174)-Sequenz eines APC-Peptides ebenfalls zu einer verminderten Exportfähigkeit des Indikatorproteins GFP (green fluorescence protein) *in vivo*.

Die intrazelluläre β -Catenin-Konzentration wird durch die Bildung des Zerstörungskomplexes im Wnt-Signalweg verringert, und bisherige Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch eine mögliche Import/Export-Funktion durch das APC-Protein vom Zytoplasma in den Zellkern oder umgekehrt von Bedeutung ist. Möglicherweise wird β -Catenin durch die Bindung an APC im Zellkern in das Zytoplasma transportiert, wo es anschließend durch das Proteasom abgebaut wird.

E. Ziel der Arbeit

Zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit war bezüglich der Struktur des APC-Proteins nur wenig bekannt. Die Frage war, wie man die Tumorsuppressorfunktion des APC-Proteins insbesondere auf struktureller, kombiniert mit funktioneller Ebene, erklären kann. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, die dreidimensionale Struktur einer APC-Domäne aufzuklären und so Hinweise zur genauen zellulären Funktion von APC sowie deren Bedeutung bei der Tumorentstehung zu liefern.

Zunächst sollte eine Domäne des APC-Proteins kristallisiert und die Struktur aufgeklärt werden. Hierbei bot sich insbesondere die N-terminale Region des APC-Proteins an, da dort laut einer vorher durchgeführten Sekundärstrukturvorhersage die häufigsten sekundäre Strukturelemente vorhanden sind. Desweiteren beinhaltet diese Region nukleäre Export Signale, so dass gleichzeitig die Frage geklärt werden sollte, wie weit der Transport vom Zellkern in das Zytoplasma von Crm1 oder von aktivem Ran abhängig ist.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Interaktion zwischen APC und β -Catenin näher untersucht werden. Dabei sollte zum einen durch *in vitro* Bindungsstudien analysiert werden, ob die N-terminalen β -Catenin Mutationen S45 Δ sowie die Phosphorylierung an derselben Position (β -Catenin S45D) im Vergleich zum Wildtyp einen Einfluss auf die Affinität zu APC haben. Zum anderen sollten die Affinitäten verschiedener 20-Aminosäure-Repetitionen des APC-Proteins zu β -Catenin gemessen werden und gleichzeitig die Frage der Stöchiometrie dieser Interaktion geklärt werden. Desweiteren sollte die Wirkung der Phosphorylierung einer 20-Aminosäure-Repetition des APC-Proteins analysiert werden, indem jeweils die Affinitäten verschiedener Konstrukte im nativen oder phosphorylierten Zustand verglichen wurden.

III. MATERIAL UND METHODEN

A. Material

1. Chemikalien

Agarose	Gibco BRL (Eggenstein)
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe)
ATP	Sigma (Deisenhofen)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
BSA	Sigma (Deisenhofen)
Coomassie Brilliant Blue R250/G 250	Serva (Heidelberg)
DTE	Sigma (Deisenhofen)
Essigsäure	Barker (Deventer, Holland)
Ethanol (p.a.)	Riedel-deHaen (Seelze)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen)
Guanidiniumhydrochlorid	Sigma (Deisenhofen)
IPTG	Gebro Biotechnik (Gaiberg)
L-Seleno-Methionin	Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden)
Orange G	Fluka (Neu-Ulm)
PMSF	Sigma (Deisenhofen)
Ponceau S	Sigma (Deisenhof)
Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics (Mannheim)
SDS	GERBU Biotechnik (Gaiberg)
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan	Fluka (Neu-Ulm)
TEMED	Sigma (Deisenhofen)

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht in den jeweiligen Methodenbeschreibungen angegeben, von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (Deisenhofen), Stratagene (Heidelberg), Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Merck (Darmstadt), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) und Gibco BRL (Eggenstein) bezogen.

2. Puffer

PBS-Puffer	80 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM NaH ₂ PO ₄ , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,2
TBE-Puffer:	90 mM Tris-HCl, 110 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,0
PBS-Puffer:	80 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM NaH ₂ PO ₄ , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
Ni ²⁺ -Bindungspuffer:	20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 2,5 mM Imidazol, pH 7,9
Ni ²⁺ -Waschpuffer:	20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,9
Ni ²⁺ -Elutionspuffer:	20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 200 mM Imidazol, pH 7,9
GST-Bindungspuffer:	PBS, 1 mM EDTA, 1 mM DTE
GST-Waschpuffer:	PBS, 1 mM DTE
GST-Elutionspuffer:	50 mM Tris-HCl, 20 mM Glutathion, 1 mM DTE, pH 8,0

Alle hier nicht aufgeführten Puffer und Lösungen sind in den entsprechenden Methodenbeschreibungen angegeben.

3. Nährmedien

LB-Medium:	1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, 0,25 % (v/v) 2 M NaOH Bei Festmedium zusätzlich 2 % Bacto-Agar.
LeMaster B Medium (500 ml):	50 g Glucose 1,25 g MgSO ₄ 21 mg FeSO ₄ 41,5 µl konzentrierte H ₂ SO ₄

Die Selektion plasmidtragender Bakterien erfolgte durch Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml), beziehungsweise Kanamycin (50 µg/ml).

4. Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme (Stratagene) verwendet:

Bakterienstamm zur Plasmidvervielfältigung:

Escherichia coli TG1: $\Delta lac-pro, thi-1, supE, hsdD5, [F' traD36, proAB^+, lacI^Q, lacZ\Delta M15]$

Bakterienstamm zur Proteinexpression:

Escherichia coli BL21: $F^-, ompT, (r_B^-, m_B^-)$

Escherichia coli DL41: L-Methionin auxotroph

5. Vektoren

5.1 pQE-60

Bei dem pQE-60-Vektor handelt es sich um einen 3431 bp großen Expressionsvektor, der zur Biosynthese rekombinanter Proteine mit einem C-terminalen Hexa-Histidin-Affinitäts-Tag ((His)₆-Tag) eingesetzt wird. Der Vektor besitzt einen starken, unter der Kontrolle einer doppelten *lac*-Operatorsequenz stehenden und durch Allolactose-Analogon Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbaren Phagen-T5-Promotor. Auf die Promotorsequenz folgt eine Sequenz, die auf der transkribierten mRNA als ribosomale Bindungsstelle dient. An diese Sequenz schließt ein Startkodon an und es folgt eine multiple Klonierungsstelle, auf deren 3'-Seite sich für alle drei möglichen Leserahmen ein Translationsstoppkodon befindet. Als Selektionsmarker besitzt der Vektor eine kodierende Region für die Ampicillin-Resistenz (β -Lactamasegen). Zur Reinigung der mit Hilfe dieses Vektors exprimierten Fusionsproteine wird die Wechselwirkung der Histidin-Imidazolgruppen im (His)₆-Tag mit einer Ni²⁺-NTA-Agarosematrix in einer Affinitätschromatographie ausgenutzt.

5.2 pGEX-6P-2

Der pGEX-6P-2-Vektor wurde von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Der Vektor besteht aus 4980 bp und dient zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen mit Glutathion S-Transferase (GST) am N-Terminus. Der GST-Anteil erleichtert die Reinigung durch Affinitätschromatographie mit Glutathion SepharoseTM 4B als Matrix. Der GST-Fusionsanteil kann durch eine enzymatische Spaltung mit PreScissionTM Protease entfernt werden. Die Spaltung erfolgt zwischen einem Glutamin und Glycin in der Erkennungssequenz. Die Kontrolle der Gen-Expression erfolgt über einen IPTG induzierbaren Tac-Promotor. Zudem trägt der Vektor ein lac I^q-Gen.

5.3 pGEX-5X-1

Bei diesem Vektor handelt es sich ebenfalls um einen 4980 bp großen Expresssionsvektor für die Herstellung von GST-Fusionsproteinen mit einem N-terminalen GST-Tag. Die Reinigung des GST-Fusionsproteins erfolgt wie beim pGEX-6P-2-Vektor über eine Glutathion SepharoseTM Affinitätschromatographie. Der GST-Fusionsanteil wird hier aber durch enzymatische Spaltung mit dem Faktor Xa durchgeführt, wobei die Spaltung in der Erkennungssequenz zwischen einem Arginin und Glycin liegt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde mit GST-Fusionsproteinen gearbeitet, wenn die Expresssion mit Hilfe des pGEX-5X-1-Vektors stattfand.

6. Standards

Proteinstandards

SDS-7; SDS-6; Color Marker Wide Range	Sigma (Deisenhofen)
SeeBlue TM Plus2 Pre-Stained Standard	Novex (Carlsbad, USA)

DNA-Standards

1 kb-Marker	Gibco (Eggenstein)
-------------	--------------------

7. Enzyme und Proteine

<i>PfuTurbo</i> -DNA-Plomerase (2,5 U/ μ l)	Stratagene (Heidelberg)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l)	Stratagene (Heidelberg)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	Qiagen (Hilden)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (MA, USA)
T4-DNA-Ligase (400 U/ μ l)	Roche Diagnostics (Mannheim)
SAP (Shrimp Alkylphosphatase) (1 U/ μ l)	USB (Bad Homburg)
DNaseI	Roche Diagnostics (Mannheim)
Trypsin, α -Chymotrypsin	Sigma (Deisenhofen)
Elastase, Proteinase K, Papain	Sigma (Deisenhofen)
PreScission TM -Protease	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

8. Antikörper

APC2-250 Antikörper

Hersteller:	Eurogentec (Herstal, Belgien)
Beschreibung:	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, welcher eigens für die Erkennung des N-terminalen Fragmentes APC(2-250) hergestellt wurde.

Histidin-Tag-Antikörper

Hersteller:	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
Beschreibung:	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen zur Detektion der Polyhistidin-Domäne aus dem pQE-Expressionsvektor.

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG

Hersteller: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
 Beschreibung: HRP-gekoppelt zur Detektion des Erstantikörpers im Western-Blot.

9. Kit-Systeme

QIAquick PCR-Purification-Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel-Extraction-Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Plasmid Miniprep-Kit	Qiagen (Hilden)
ECL-Plus W-Blot Detection-Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

10. Laborgeräte

Ultraschallgerät Sonifier 250/450	Branson (Schwäbisch Gmünd)
TRIO-Thermoblock	Biometra (Göttingen)
Thermostat 5320	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Eppendorf Zentrifuge 5415c	Eppendorf (Hamburg)
Horizontal-Flachbettgelkammer	Auftragsarbeit MPI Dortmund
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG (Zürich)
Wasserbad 1002	GFL (Burgwedel)
Proteinelektrophoresekammer	BioRad (München)
FPLC-Anlage, GradiFrac	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Gelfiltrationssäule S75 26/60	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Gelfiltrationssäule S200 36/99	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
GSH Affinitätschromatographie-Säule	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Ni ²⁺ -NTA Affinitätschromatographie-Säule	Qiagen (Hilden)
Spektralphotometer Uvikon 933 UVA/VIS	Kontron Instruments (Neufarn)
MALDI-TOF-Massenspektrometer Voyager	PerSeptive Biosystems (Santa Fe, USA)
JASCO® J-710-Spektropolarimeter	JASCO (Groß-Umstadt)
Isothermes Titrations-Kalorimeter	MicroCal. Inc. (Northampton, USA)

Gelscanner Bioprofil 5.0	Fröbel (Lindau)
Feinwaage METTLER PM 480 Delta Range	Mettler-Toledo-GmbH (Giessen)
Inkubationsschüttler Multitron	Infors (Bottmingen, CH)
Zentrifugen: Avanti J-30 I	Beckmann (Palo Alto, USA)
Sorvall RC3B Plus	Sorvall (Heidelberg)
Labfuge 400	Heraeus (Düsseldorf)

B. Methoden

1. Molekulargenetische Methoden

1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) ermöglicht die *in vitro*-Amplifikation einer spezifischen Nukleinsäuresequenz aus einem Nukleinsäuregemisch unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* sowie eines Sequenz-spezifischen Oligonukleotid-Primerpaares.

Eine Standard PCR-Reaktion wurde wie folgt ausgeführt. 50 ng DNA wurden mit jeweils 20 pmol der beiden Primer, 5 µl 10x *Taq*-Polymerase Puffer, 1 µl 10 mM Desoxyribonukleotidlösung (dNTPs), 0,5 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) und doppelt destilliertes Wasser in einem Volumen von 50 µl gemischt. Danach wurden die gewünschte DNA-Sequenz wie folgt amplifiziert:

1. Denaturierung	94°C, 40 s	 25 bis 35 Zyklen
2. Hybridisierung	50 bis 70°C, 30 s	
3. DNA-Synthese	72°C, 30 s – 2 min	

Die für die verschiedenen APC-Proteinfragmente kodierenden Genabschnitte des APC-Gens wurden mit Hilfe der PCR unter Einsatz der im folgenden aufgeführten Primer durch Amplifikation aus einer APC-cDNA gewonnen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Paul Polakis, Genentech, USA). Ein Aliquot jedes PCR-Ansatzes wurde auf einem Agarosegel analysiert. Die PCR-Produkte wurden anschließend für die weitergehende Klonierung mit dem PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation der APC-Fragmente. Die jeweiligen Restriktionsschnittstellen sind fettgedruckt.

APC 2-250 5'	GGCGGATCC GCTGCAGCTTCATATGATCAG
APC 2-250 3'	ACG CGT CGACTCAATGCTTGTCTGAGATGACCTC
APC129-250 5'	CGCGAATCC GAAAGTACTGGATATTTAGAAGAA
APC1340-1701 5'	CGCGGATCCT CTAGTTTATCTTTCCAGAATCA
APC1340-1701 3'	G CGGAATT CTTACTATTGAGCCTCATCTGTAC
APC1340-1536 3'	CCGCTCGAGT CATTGTCCAGGGCTATCTGGAAG

APC1449-1536 5'	GCGGGATCCAAGCGAGAAGTACCTAAAAATAA
APC1537-1701 5'	GCGGGATCCACAGAATCAGAGCAGCCTAAA
APC1537-1701 3'	CCGCTCGAGTCATTGAGCCTCATCTGTACTTCT
APC1340-1536 3'	CCGCTCGAGTCATTCATTCCTCCATTGTCATTTTCCT

Die für das jeweilige Primerpaar spezifische Hybridisierungstemperatur wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Hybridisierungstemperatur } [^{\circ}\text{C}] = 2 \times (\text{Anzahl aller A/T}) + 4 \times (\text{Anzahl aller G/C})$$

1.2 Restriktion

Die gereinigten PCR-Produkte wurden in den jeweiligen Restriktionspuffern (New England Biolabs, USA) 1 h bei der empfohlenen Temperatur (meistens 37°C) mit zwei Restriktionsendonukleasen inkubiert, deren Schnittstellen durch das entsprechende Primerpaar kodiert wurde. Parallel wurde der bakterielle Expressionsvektor mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Alle Restriktionsansätze wurden anschließend mit dem PCR-Purification-Kit gereinigt, gegebenenfalls einer Agarosegelelektrophorese unterzogen und die APC-Fragmente oder der Expressionsvektor mit dem QIAquick Gel-Extraction-Kit nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel extrahiert.

1.3 Ligation

Für die Ligation der Insert-DNA in den entsprechenden Expressionsvektor wurden jeweils 20 ng der zuvor hydrolysierten Vektor-DNA mit 5-fachen molaren Überschuss an Insert-DNA über Nacht bei 16°C (oder alternativ 2 h bei Raumtemperatur) mit T4-DNA-Ligase (1 U) sowie 1x T4-Ligase-Puffer (New England Biolabs, USA) inkubiert.

1.4 Transformation

Für die anschließende Transformation wurden die Ligationsansätze zuerst 30 min mit 100 µl kompetenten *E.coli* TG1-Zellen auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C, wobei die Bakterienzellwand teilweise porös wird und die Aufnahme der Fremd-DNA erleichtert. Der Ansatz wurde nach dem Hitzeschock eine Minute auf Eis inkubiert, mit

900 µl LB-Medium versetzt und dann 30 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Ansätze auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Klone wurden wiederum über Nacht bei 37°C in Antibiotika-haltigem LB-Medium kultiviert und die Vektor-DNA mit dem QIAprep Plasmid Miniprep-Kit isoliert. Durch eine Sequenzierung der Vektoren im Bereich der multiplen Klonierungsstelle wurde überprüft, ob die gewünschte Gensequenz im richtigen Leserahmen inseriert wurde und keine Mutationen aufweist. Korrekte Expressionsvektoren wurden in den *E.coli*-Expressionsstamm BL21 transformiert und die transformierten Bakterien ebenfalls wieder unter Selektionsdruck herangezogen. Anschließend wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden jeweils 500 µl der über Nacht bei 37°C herangezogenen Kulturen mit 500 µl Glycerin vermischt und bei -80°C gelagert. Diese Kulturen dienen zum Animpfen von Kulturen, die für die Expression der Vektor-kodierenden Proteine kultiviert wurden.

1.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte in einer PCR unter Einsatz fluoreszent markierter Didesoxynukleotide nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger *et al.* (1977). Die PCR-Ansätze umfassten stets ein Gesamtvolumen von 20 µl bei folgender Zusammensetzung:

Reagenzien	Volumen ml
0,3 bis 0,5 µg Plasmid-DNA	2 bis 5 µl
5'-oder 3'-Oligonukleotid-Primer (3,5 pM)	1 µl
Terminator-Mix	4 µl
H ₂ O	ad. 10 µl

Dabei beinhaltet der Terminator-Mix alle vier fluoreszent markierten Didesoxynukleotide für den Kettenabbruch, die vier Desoxynukleotide für die Kettenfortpflanzung sowie die thermo-stabile *AmpliTaq*-Polymerase. Die PCR zur Sequenzierung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	96	30
2	96	30
3	50	15
4	60	240
5	4	bis zur Probenentnahme

25 Zyklen

Zur Fällung der DNA wurden die Ansätze anschließend mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt und 1 µl Dextranblau-Lösung wurde hinzugefügt. Dann wurden sie mit 10 µl 3 M NaAc (pH 4,6 bis 4,8) und 250 µl 100%igem Ethanol gemischt. Es folgte eine 5-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Die DNA-Lösung wurde 30 min bei 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation bei 14.000 rpm für 5 min wurde der Alkohol vollständig abgenommen und die DNA bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Die Trennung in einem DNA-Polyacrylamidgel sowie die computergestützte Auswertung der Elektrophorese erfolgte in der zentralen Einheit „Sequenzierung und Synthese“ (ZeSuS) des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie. Dabei wurden die an die vier verschiedenen Didesoxynukleotide gekoppelten vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe durch Bestrahlung mit einem Laser angeregt. Das in vier verschiedenen Farben emittierte fluoreszente Licht wurde während der gelelektrophoretischen Trennung aufgenommen und zeigte die Basenabfolge der sequenzierten DNA an. Zur Detektion und Interpretation der Bandenmuster kam dabei das DNA-Sequencers Model 373A (Applied Biosystems) zum Einsatz.

Zusammensetzung des Terminator-Mixes:

1,58 µM A-DyeDesoxy; 94,74 µM T-Dye-Desoxy; 0,42 µM G-Dye-Desoxy; 47,37 µM C-Dye-Desoxy; 78,95 µM dGTP; 15,79 µM dATP; 15,79 µM dCTP; 15,79 µM dTTP; 168,42 mM Tris-HCl (pH 9,0); 4,21 mM (NH₄)₂SO₄; 42,1 mM MgCl₂; 0,42 U/µl *AmpliTaQFS*-DNA-Polymerase.

1.6 Gezielte *in vitro*-Mutagenese

Die verwendete Methode basiert auf dem “QuikChange™ Site-directed Mutagenesis Kit” (Stratagene). Die *in vitro*-Mutagenese dient zur gezielten Einführung von Mutationen in DNA-Fragmente, wobei die PCR-Mutagenese in dieser Arbeit zum Austausch von Basenpaaren in der kodierenden DNA-Sequenz eines Inserts eingesetzt wurde. Die Mutagenese erfolgte mit Hilfe von zwei Oligonukleotiden, die die gewünschte Mutation (ein oder zwei Basenpaare) enthielten und zueinander komplementär waren. In der PCR wurden die Primer durch die *TurboPfu*-Polymerase verlängert, wodurch ein mutiertes Plasmid entstand. Anschließend wurden die PCR-Ansätze 2 h mit 20 U DpnI bei 37°C inkubiert. Die DpnI-Endonuklease schneidet methylierte und hemimethylierte DNA, so dass nur die Template-Plasmid-DNA verdaut wurde. 10 µl der Ansätze wurden dann in TG1-Zellen transformiert und die Konstrukte durch Sequenzierung auf erfolgreiche Mutationen hin überprüft.

Die Primer sollten 25 bis 40 bp lang sein und deren Schmelztemperatur (T_M) gleich oder größer als 78°C sein. Desweiteren sollte die gewünschte Mutation sich etwa in der Mitte des Primers befinden und von 10 bis 15 Basen der korrekten Sequenz auf beiden Seiten flankiert sein. Die Primer sollten einen GC-Gehalt von mindestens 40 % haben und auf ein oder mehrere C- oder G-Basen enden.

$$T_m: 81,5 + 0,41(\% \text{ GC}) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

N = Primerlänge in Basenpaaren

Ansatz:

Reagenzien	Volumen ml
DNA-Template	5 – 50 ng
Primer 1 (125 ng/µl)	1
Primer 2 (125 ng/µl)	1
10 x Pfu-Puffer	5
100 % DMSO	5
dNTPs [2 mM]	5
<i>TurboPfu</i> -Polymerase [2,5 U/µl]	1
H ₂ O	ad. 50

PCR-Programm zur Einführung von 2- oder 3-Basen-Mutationen:

Temperatur [°C]	Zeit
95	30 s
95	30 s
55	1 min
68	2 min/kb
4	bis zur Probenentnahme



18

Verwendete Oligonukleotide: Das jeweilige Triplet mit der mutierten Sequenz ist fettgedruckt.

β-Catenin S45D 5'	GCCACTACCACAGCTCCT GAT CTGAGTGGTAAAGGC
β-Catenin S45D 3'	CGGTGATGGTGTCTGAGGACTAGACTCACCATTTCGG
APCRL189A/I196A 5'	CCAGAAGGCAAG CGG AATATGAAGCAAGGCAAG CCA GAGTTGCG
APCRL189A/I196A 3'	CGCAACTCT GGC TTGCCTTGCTTCATATT CCG CTTGCCT TCTGG
APCS1505D 5'	CCAGATGGATTTTCTTGTTTCATCC GAC CCTGAGTGCTCT GAGCC
APCS1505D 3'	GGCTCAGAGCACTCAG GTC GGATGAACAAGAAAATCC ATCTGG
APCS1507D 5'	CCAGATGGATTTTCTTGTTTCATCCAGCCT GGAT GCTCTG AGCC
APCS1507D 3'	GGCTCAGAGCA TCC AGGCTGGATGAACAAGAAAATCC ATCTGG

2. Expression der Gene und Isolierung von Proteinen

2.1 Genexpression

Die Synthese der APC-Proteinfragmente, der β -Catenin-Proteine sowie des Crm1-Proteins erfolgte unter Selektion in Kanamycin-haltigem oder Ampicillin-haltigem LB-Medium. Die Konzentrationen der Antibiotika betragen dabei 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin oder 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin. Für die Synthese und Reinigung größerer Proteinmengen wurden 1/10-Volumen der Hauptkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 130 rpm kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde die Vorkultur auf das gewünschte Hauptkultur-Volumen verdünnt und bis zu einer relativen Absorption (gemessen bei 600 nm) von 0,8 herangezogen. Um die Synthese der rekombinanten Proteine zu induzieren, wurde nun IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,05 bis 0,3 mM zugesetzt. Nach einer Synthesedauer von 4 bis 6 Stunden oder über Nacht bei 30°C und 130 rpm wurden die Bakterien 15 min bei 4°C und 5000 rpm geerntet. Das Bakterienpellet wurde mit Ni^{2+} -Bindungspuffer oder PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert oder sofort für die weitere Proteingewinnung eingesetzt.

Das Phasenproblem der Röntgenstrukturanalyse kann durch SAD (single wavelength anomalous diffraction) gelöst werden. Dies erfordert das Vorhandensein Seleno-Methionin-mutierter Proteine und Proteinkristalle. Für das Ersetzen der natürlichen Aminosäure L-Methionin durch das Schweratomderivat Seleno-Methionin wurde die Expression des Proteins in für Methionin auxotrophen *E.coli*-Bakterienstämmen, wie zum Beispiel DL 41, durchgeführt. Dabei wurden die transformierten Bakterien zunächst durch schrittweise Anpassung des L-Methionin/Seleno-Methionin-Verhältnisses bis auf 100 % Seleno-Methionin adaptiert. Eine Vorkultur aus 5 ml LeMaster Medium und 0,5 ml LeMaster B Medium wurde mit 10 μl einer L-Methionin-Lösung (50 mg/ml) versetzt und mit der entsprechenden Glycerinkultur angeimpft. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurde eine weitere Vorkultur mit 30 μl der Übernachtskultur übergeimpft. Der neuen Kultur wurden dabei 8 μl einer L-Methionin-Lösung (50 mg/ml) sowie 4 μl einer L-Seleno-Methionin-Lösung (25 mg/ml) hinzugefügt. Die Kultur wurde über Tag bei 37°C inkubiert. Am Abend wurde eine 100 % L-Seleno-Methionin Vorkultur aus 250 ml Le-Master Medium und 2,5 ml LeMaster B Medium sowie 1 ml einer L-Seleno-Methionin-Lösung (25 mg/ml) mit dieser Kultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Anschließend wurden die Bakterien wie in dem oben beschriebenen Protokoll geerntet.

Bei allen folgenden Präparationen des substituierten Proteins war der Zusatz von 20 mM DTE zu den entsprechenden Pufferlösungen erforderlich, um eine Oxidation des Seleno-Methionins in seine Selenoxid-Form zu verhindern.

2.2 Ultraschallaufschluss

Das Bakterienzellpellet einer 5 Liter-Expressionskultur wurde in dem entsprechenden eiskalten Affinitätschromatographie-Puffer (Ni^{2+} -Bindungspuffer oder GST-Bindungspuffer) suspendiert. Es erfolgte die Zugabe einer Protease-Inhibitorcocktail-Tablette (Roche Diagnostics) pro 50 ml Resuspension und PMSF in einer Endkonzentration von 0,1 mM. Desweiteren wurde zur Verbesserung der Konsistenz durch Fragmentierung der DNA eine Spatelspitze lyophilisierte DNaseI hinzugefügt. Nach vollständiger Resuspension wurden die Bakterienzellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurde ein Ultraschallgerät der Firma Branson, Modell 250/450 Sonifier (Branson, Schwäbisch Gmünd) verwendet. Die resuspendierten Bakterien wurden unter Eiskühlung insgesamt dreimal 2 min mit Ultraschall unter Berücksichtigung einer 2 minütigen Pause auf Eis behandelt. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (17000 rpm, 4°C, 20 min).

2.3 Proteinreinigung

2.3.1 Reinigung von Proteinen mit Histidin-Tag

Die Reinigung des Histidin-Tag-Fusionsproteins Crm1 erfolgte aus dem Überstand des Bakterienzellaufschlusses durch Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA-Agarose (10 ml). Die Affinitätschromatographie basiert auf der Bindung der Histidinreste an divalente Kationen, wie zum Beispiel Ni^{2+} -Ionen. In dem Expressionsvektor pQE60 ist der Gensequenz der verschiedenen klonierten Genen noch eine Sequenz nachgeschaltet, die für sechs aufeinanderfolgende Histidinreste kodiert. Diese Proteine werden mit einem N-terminalen Histidin-Tag exprimiert. Für die Affinitätssäule wurde eine Agarose-Matrix verwendet, auf der Ni^{2+} -Ionen durch Chelatisierung mittels Nitrilotriacetatgruppen gebunden werden. Der Überstand des Bakterienzellaufschlusses wurde über die vorher mit Ni^{2+} -Bindungspuffer (20 mM Tris-HCl, 0,6 M NaCl, 2,5 mM Imidazol, 10 % Glycerin, 3 mM beta-Mercaptoethanol, pH 7,9) äquilibrierte Säule geleitet, so dass die mit dem Histidin-Tag versehenen Proteine auf der Ni^{2+} -NTA-Agarose binden konnten. Die Bindung erfolgt, indem jeweils zwei der Histidinreste einen

Chelatkomplex mit einem Ni^{2+} -Ion ausbilden. Durch Zugabe von großen Mengen Imidazol kann dieser Chelatkomplex wieder kompetitiv gelöst werden. Proteine ohne Histidin-Tag bleiben ungebunden. Zur Abtrennung der ungebundenen Proteine wurde die Matrix mit 300 bis 500 ml Ni^{2+} -Waschpuffer (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol, 3 mM Mercaptoethanol, pH 7,9) gespült. Die Elution erfolgte durch Spülen mit Elutionspuffer (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 3 mM Mercaptoethanol, pH 7,9). Die Reinheit der proteinhaltigen Fraktionen wurde in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Anschließend wurden die Fraktionen vereinigt, die das jeweilige Protein als Hauptbestandteil enthielten. Die Proteine wurden in einem Viva-SpinTM mittels Ultrafiltration konzentriert und gegebenenfalls umgepuffert. Die jeweiligen Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.2 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine (APC-Proteine, β -Catenin-Proteine) wurden affinitätschromatographisch über eine Glutathion-Sepharose-Säule gereinigt (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Chromatographie beruht auf der Bindung von Glutathion-S-Transferase an das auf der Säulenmatrix immobilisierte Glutathion. Diese Bindung kann durch Konkurrenz mit Glutathion wieder gelöst werden. Zur Proteinreinigung wurde der Überstand des Ultraschallaufschlusses über eine zuvor mit GST-Waschpuffer (1x PBS, 1 mM DTE) äquilibrierte Glutathion-Sepharose-Säule geleitet. Die ungebundenen Proteine wurden durch Spülen mit GST-Waschpuffer von der Säule entfernt. Im Anschluss wurde das jeweilige GST-Fusionsprotein mit GST-Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, 20 mM Glutathion, pH 8,0, 1 mM DTE) von der Säule eluiert. Das Protein wurde entweder in einem Viva-SpinTM konzentriert und eingefroren oder einer PreScission-Spaltung unterzogen, um das gewünschte Proteinfragment vom GST-Fusionsanteil zu trennen.

2.3.3 PreScissionTM-Spaltung von GST-Fusionsproteinen

Die Abspaltung des GST-Fusionsanteils der gereinigten Fusionsproteine erfolgte enzymatisch mit Hilfe der PreScissionTM-Protease. Das Enzym spaltet sehr spezifisch zwischen einem Glutamin und einem Glycin in der Erkennungssequenz von fünf Aminosäuren (Leucin/Phenylalanin/Glutamin/Glycin/Prolin). Das GST-Fusionsprotein wurde zunächst im PreScissionTM-Spaltspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTE)

bei 4°C umgepuffert. Im Anschluss wurde die PreScissionTM-Protease zugesetzt (3 U PreScissionTM-Protease/5 mg GST-Fusionsprotein). Die enzymatische Spaltung erfolgte durch eine Inkubation für vier bis fünf Stunden oder über Nacht bei 4°C unter leichtem Rühren. Zur Abtrennung des abgespaltenen GST-Anteils wurde der PreScission-Ansatz erneut affinitätschromatographisch über eine Glutathion-Sepharose-Säule gereinigt. Der Ansatz wurde über die Säule geleitet und mit GST-Waschpuffer nachgespült. Der Durchfluss wurde direkt gesammelt. Anschließend erfolgte die Elution des GST-Anteils durch Spülen mit GST-Elutionspuffer. Proteinhaltige Fraktionen wurden in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert und die Fraktionen mit dem gewünschten Proteinfragment in einem Viva-SpinTM konzentriert. Bei entsprechender Reinheit des Proteins wurde es in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Wurde das Protein nach einer Affinitätschromatographie nicht in ausreichender Reinheit erhalten oder sollte das Protein kristallisiert werden, wurde das Protein durch eine anschließende Gelfiltration weiter gereinigt.

2.3.4 Gelfiltration

Bei der Gelfiltration handelt es sich um eine Methode, bei der die Proteine aufgrund ihrer Molekülgröße voneinander getrennt werden. Die Matrix der Gelfiltrationssäule besteht aus mikroskopisch kleinen, kugelförmigen Polymeren, die über viele mit Lösungsmittel gefüllten Poren unterschiedlicher Größe verfügen. Große Proteine, die den Durchmesser der Poren überschreiten, sind nicht in der Lage, in diese Poren zu diffundieren, und durchwandern das Säulenmaterial im Ausschlussvolumen. Kleine Proteine können in die Poren der Matrix eindringen, wobei sich die zu durchwandernde Strecke im Vergleich zu großen Proteinen verlängert. Sie eluieren bei einem größeren Durchflussvolumen von der Gelfiltrationssäule als größere Proteine, wodurch eine Trennung erfolgt. Die Gelfiltration wurde in dieser Arbeit sowohl für präparative Zwecke, als auch für qualitative Analysen eingesetzt.

Das konzentrierte Protein (maximale Volumen: 10 % des Säulenvolumens) wurde mit einer Spritze auf die vorher mit PBS äquilibrierte Säule injiziert. Dabei wurde je nach der molekularen Masse des zu reinigenden Proteins entweder eine Superdex S75 26/60-Säule (Amersham Pharmacia Biotech) oder eine Superdex S200 36/99-Säule (Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Die molekulare Masse des eluierten Proteins konnte durch Vergleich mit einer für die verwendete Gelfiltrationssäule erstellten Eichkurve ermittelt werden, die vorher durch Elution von Proteinen mit bekannter Masse erstellt wurde. Die proteinhaltigen Fraktio-

nen wurden in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt und die jeweiligen Fraktionen mittels Zentrifugation in einem Viva-Spin™ eingeeengt.

3. Proteinchemische Methoden

3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.1.1 Bradford-Assay

Zur Proteinquantifizierung wurde ein von Bradford (1976) entwickeltes kolorimetrisches Verfahren angewendet. Die Methode beruht auf der Bindung des im Bradford-Reagenz enthaltenen Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G 250 an Proteine. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von ursprünglich 465 nm auf 595 nm. In Anwesenheit von Proteinen verändert sich daher die Farbe des Bradford-Reagenz von hellrot nach blau. Die Intensität dieser Blaufärbung ist dabei direkt proportional zur Proteinkonzentration. Das Bradford-Reagenz wurde durch Mischen von einem Volumen Protein Assay-Farbstoffkonzentrat (BioRad, München) mit vier Volumina Wasser hergestellt. Zur Messung wurden 1 µl bis 10 µl der Proteinlösung zu 1 ml der Bradfordlösung gemischt. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm. Mit Hilfe einer zuvor erstellten Kalibrierungsgerade mit einer Standardlösung Rinderserumalbumin (BSA, 1 mg/ml) konnte die Proteinkonzentration der Probe ermittelt werden.

3.1.2 Ehresmann-Methode

Eine einfache aber nicht sehr genaue Bestimmung der Proteinkonzentration kann durch photometrische Bestimmung der Extinktion (E) bei 228,5 nm und 234,5 nm gemäß der Formel:

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = (E_{228,5} - E_{234,5}) \times \text{Verdünnung} \times 0,314$$

erfolgen (Bestimmung nach Ehresmann). Die Genauigkeit der so erhaltenen Werte beträgt ungefähr $\pm 0,3$ mg/ml, wobei die absoluten Extinktionswerte für die Berechnung unter 0,2 liegen sollten.

3.1.3 Direkte spektroskopische Konzentrationsbestimmung

Bei dieser Methode wird die Absorption bei 205 nm gemessen. Diese Messung beruht auf den Absorptionseigenschaften der Peptidbindung und ist somit nicht von der Aminosäure-Zusammensetzung des Proteins abhängig. Das Absorptionsmaximum der Peptidbindung liegt zwischen 191 und 194 nm. Bei diesen Wellenlängen können aufgrund der Absorption von Sauerstoff keine Messungen durchgeführt werden, so dass die Messung bei einer Wellenlänge von 205 nm erfolgt.

Die Proteinkonzentration wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Proteinkonzentration (mg/ml)} = 31 \times A(205)/d \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

31 = gemittelter Wert aus 10 gereinigten Proteinen

A = Absorption bei 205 nm

D = Schichtdicke der Küvette

3.2 Proteingelelektrophorese

Um Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht gelelektrophoretisch zu trennen, wurden diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamidgele verwendet (Laemmli, 1970). Es wurde das Mini-Gel-System der Firma BioRad (München) benutzt. Je nach Größe der zu trennenden Proteine betrug die Polyacrylamidkonzentration der Trenngele 5 bis 15 %.

Die Zusammensetzung der Gellösungen ist im folgenden angegeben:

Gelkonzentration	Trenngel		Sammelgel
	12,5 %	15 %	3 %
Acrylamid	5 ml	6,25 ml	1,3 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml	
Sammelgelpuffer			2,5 ml
Wasser	6,2 ml	4,95 ml	6,2 ml
10 % APS	200 µl	200 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Acrylamidlösung:	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)
Sammelgelpuffer:	65 mM Tris-HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8

Die Elektrophorese wurde in einem SDS-haltigen Laufpuffer (25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS) durchgeführt. Die zu trennenden Proteinproben wurde mit 1/5 Volumen 5x SDS-Probenpuffer (108 mM Tris-HCl, 17 % Glycerin, 3 % SDS, 8 % 2-Mercaptoethanol, 0,0015 % Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt und 5 min zur Denaturierung bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden in der Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 150 bis 200 V mit einem geeigneten Größenstandard aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 30 min in einer Färbelösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue R 250, 40 % Methanol, 10 % Essigsäure in Wasser) mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Durch Entfärben des Gels mit einer Entfärbelösung (20 % Methanol, 10 % Essigsäure in Wasser) wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit einem Gelscanner.

3.3 Western-Blot

Vor der spezifischen Identifizierung durch Antikörperhybridisierung müssen gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Membran transferiert werden. Diese Übertragung erfolgte durch Elektrotransfer in einer Fast-Blot-Apparatur der Firma Biometra (Göttingen). Das zuvor mit Transferpuffer (25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % Methanol) gewaschene Polyacrylamidgel wurde nach dem Lauf mit einer luftblasenfrei aufgelegten PVDF-Membran zwischen zwei ebenfalls in Transferpuffer getränkten Whatman-Papiere in dem Fast-Blot Gerät angebracht. Der Elektrotransfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte für 30 min bei einem Stromfluss von 5 mA/cm² unter Kühlung. Um unspezifische Bindungen abzusättigen wurde die Membran in 5%igen Magermilchpulver in PBS-T (1x PBS mit 0,1%igen Tween) ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min mit PBS-T bei Raumtemperatur gewaschen bevor sie mit dem Primärantikörper (1:200 bis 1:1000 in PBS-T) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Es folgten wiederum drei zehnmütige Waschschrirte in Waschpuffer. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgt durch die Anlagerung eines gegen den ersten Antikörper gerichteten Sekundärantikörpers, der mit der Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt ist. Die Markierung des Primärantikörpers wurde durch einstündige Inkubation mit einem HRP-gekoppelten polyklonalen Mausantikörper (1:10.000) in PBS-T bei Raumtempe-

ratur erreicht. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal 10 min mit PBS- T gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte nun durch chemische Lumineszenz mit dem ECL Western-Blot-Detektionskit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), da die Peroxidase mit dem Substrat reagiert, wobei Licht umgesetzt wird. Diese chemische Lumineszenz wird zur Belichtung eines Röntgenfilms genutzt. Der Film wird dabei nur an der Stelle belichtet, an denen das gesuchte Protein auf der Membran durch den Primärantikörper erkannt wurde.

Für eine N-terminale Sequenzierung wurde die Membran direkt nach dem Elektro-Transfer mit dem immobilisierten Proteins 10 min in einer Färbelösung (0,3 % Coomassie, 50 % Methanol, 50 % Wasser) inkubiert. Das Entfernen überschüssiger Färbelösung wurde über Nacht unter leichtem Schwenken in einer Entfärbelösung (50 % Methanol, 50 % Wasser) durchgeführt. Die so sichtbar gemachten immobilisierten Proteine wurden mit Hilfe des sogenannten Edmann-Abbaus in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Proteinanalytik (Prof. Meyer) der Ruhr-Universität-Bochum sequenziert.

3.4 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde eingesetzt, um die Masse eines zu charakterisierenden Proteins zu bestimmen. Darüber hinaus ist sie ein Hilfsmittel, um posttranslationale Modifikationen nachzuweisen oder die proteolytische Spaltung von Proteinen zu analysieren. Die Technik beinhaltet zum einen die Generierung von Ionen des zu untersuchenden Moleküls in der Gasphase und zum anderen die Analyse des Masse/Ladungs-Verhältnisses dieser Ionen durch ein geeignetes Detektor-System.

3.4.1 ESI-MS

Die Elektronenspray Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) basiert auf einer 1968 von Dole vorgeschlagenen Methode. Dabei wird eine entsalzte Lösung des zu analysierenden Proteins durch eine feine Kapillarnadel, die auf einem hohen elektrischen Potential (1 bis 4 kV) gehalten wird, gepumpt. Mit Hilfe einer Gegenelektrode kommt es zum Aufbau eines elektrischen Feldes zwischen der Kapillarnadel und der Oberfläche der Gegenelektrode und die erscheinende Oberfläche der Probenlösung wird aufgrund der wirkenden Coulomb-Kräfte in ein feines Spray aus geladenen Tröpfchen dispergiert. Die dabei entstehenden Tröpfchen enthalten Proteinmoleküle. Durch eine schnelle Verdunstung des Träger-Lösungsmittels erfolgt der Übergang protonierter Proteinmoleküle in die Gasphase. Die Proteine gehen in das Vakuum

des Massenspektrometers über, wo sie nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis getrennt und detektiert werden. Dabei wird die letzte Solvathülle, die das Protein noch umgibt, mit Hilfe eines Trocknungsgases vor dem Eintritt in das Vakuum entfernt.

3.4.2 MALDI-TOF

Bei der Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization time of flight (MALDI-TOF) Analyse können sehr komplexe Proteinmischungen eingesetzt werden (Beavis *et al.*, 1990). Salzkontaminationen oder glykosylierte Proteine (Ogonah *et al.*, 1995) behindern die Anwendung dieser Technik nicht. Die Probenvorbereitung erfolgt durch Mischung gleicher Anteile des Analyten (1 bis 10 μM) und einer wässrigen Lösung mit einem hohen Überschuss eines Matrix-Materials auf einer Stahlprobenplatte. Die sauren UV-absorbierenden Matrix-Moleküle übertragen Protonen auf die Proteine und laden sie positiv auf. Die Probenplatte wird in das Hochvakuum des Massenspektrometers gebracht und die Probe dort mit Laser-Pulsen (1 ns bis 10 ns) im UV Bereich beschossen. Durch ein hohes elektrisches Potential von 25 kV bis 30 kV, welches an einer Beschleunigungselektrode nahe der Probenplatte anliegt, erfolgt eine Beschleunigung der Proteinmolekül-Ionen. Diese Analysen-Methode basiert auf der physikalischen Grundlage, dass die Geschwindigkeit der Ionen im Flugrohr proportional zur Quadratwurzel des Masse/Ladungs-Verhältnisses ist.

$$t = \frac{L}{\sqrt{2K}} \cdot \sqrt{\frac{m}{z}}$$

t = Flugzeit des Ions

K = kinetische Energie des Ions

L = Länge des Flugrohres

m = Masse des Ions

z = Ladung des Ions

Als Matrices für die Analyse der APC-Proteinfragmente wurden 2,5-Dihydroxybenzoesäure (10 mg/ml DHB, 0,1 % TFA) oder α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (10 mg/ml HCCA, 1 Teil Acetonitril/ 0,3 % TFA, 1 Teil Wasser) verwendet. Alle Proteinlösungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 10 μM eingesetzt. Dabei wurde 1 μl der Proteinlösung mit 1 μl der Matrixlösung vermischt und anschließend mit einem elektrischen Fön getrocknet. Zur Verbesserung des Signals wurden ausgehend von einer Stammlösung mehrere Verdünnungen

in der zuvor beschriebenen Weise hergestellt und analysiert. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte durch einen Standard mit Proteinlösungen aus dem Molecular Weight Marker Kit (Sigma). Die erhaltenen Massenspektren wurden mit Hilfe der Voyager Auswertungssoftware bearbeitet und die experimentell ermittelten Massen mit denen der theoretisch erwarteten Massen verglichen.

3.5 Limitierte Proteolyse

Bei der limitierten Proteolyse wird das zu untersuchende Protein einer enzymatischen Spaltung durch eine Protease ausgesetzt. Es wurden die fünf Proteasen Trypsin, α -Chymotrypsin, Papain, Elastase und Proteinase K eingesetzt. Während der Inkubation der Reaktionsansätze wurden in verschiedenen Zeitabständen Proben entnommen und diese in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

3.6 *in vitro* Präzipitations-Experimente

Es wurden 2 bis 5 μg Histidin-Tag-Crm1 im Ni^{2+} -Bindungspuffer mit 30 μl Ni-NTA-Agarose (magnetic Agarose beads, Qiagen), die vorher dreimal mit Ni^{2+} -Bindungspuffer gewaschen wurden, für 30 bis 60 min bei 4°C auf einem Rollinkubator inkubiert. Anschließend wurden 2 bis 3 μg sauberes Protein der potentiellen Interaktionspartner (APC129-250; APCL189A/I196A; RanGTP; RanGDP) zugegeben und eine weitere Stunde unter denselben Bedingungen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze viermal mit Ni^{2+} -Waschpuffer gewaschen, bevor die verbleibenden Proteine in der Ni-NTA-Agarose in Ni^{2+} -Elutionspuffer aufgenommen wurden. Diese Proben wurden direkt in 1/5 Volumen 5x SDS-Probenpuffer aufgekocht und in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf eine Interaktion analysiert.

3.7 Computergestützte Auswertungsprogramme

Zur Ermittlung der theoretischen molekularen Masse von Proteinen oder zur Bestimmung der Molekularmasse proteolytischer Proteinfragmente kam das Online zur Verfügung stehende Programm ExPASy „Peptide Mass“ (www.expasy.ch) zum Einsatz. Dem Programm wurde dabei die Aminosäuresequenz des zu analysierenden Proteins zur Verfügung gestellt. Das Computerprogramm konnte die molare Masse sowie mögliche Spaltstellen einer gewählten

Protease, wie zum Beispiel Trypsin ermitteln. Desweiteren wurden Sekundärstrukturvorhersageprogramme für die strukturelle Analyse der APC-Fragmente verwendet (PhD-prediction program), die ebenfalls unter der Internetadresse www.expasy.ch zu finden sind. Für die Untersuchung von Aminosäuresequenzen auf die Fähigkeit zur Ausbildung von Coiled coil Strukturen kamen die Programme „coils“ nach der Lupas Methode, „Paircoil“ nach der Methode von Berger und „Multicoil“ zum Einsatz. Alle drei Programme sind wiederum unter www.expasy.ch verfügbar.

4. Biophysikalische Methoden

4.1 Fern-UV-Circulardichroismus

Mit der CD-Spektroskopie (Circulardichroismus) wird der Sekundärstrukturanteil von Proteinen in Lösung analysiert (Johnson *et al.*, 1988). Die Grundlage des Circulardichroismus ist die Wechselwirkung von linear polarisiertem Licht mit optisch aktiven Substanzen, wobei es zu Elektronenübergängen kommt. Im fernen UV-Bereich finden diese Elektronenübergänge in den Aminogruppen des Proteinrückgrats statt, so dass sich mit der Auswertung der Spektren Aussagen über die Konformation des Proteins machen lassen.

Die Spektren wurden mit einem Jasco J-710 Spektropolarimeter aufgenommen. Die Schichtdicke der Quarzküvette betrug 0,1 cm. Die aufgezeichneten Wellenlängen verliefen im Fern-UV-Bereich (250 nm bis 190 nm), wobei die CD-Spektren bei Temperaturen von 20°C bis 80°C in 10 K Schritten aufgenommen wurden. Die zu analysierende Proteinlösung wurde in möglichst großer Reinheit in Konzentrationen von 10 bis 30 μM in CD-Puffer (20 mM Kaliumphosphat, 5 mM MgCl_2 , pH 7,4) eingesetzt. Sekundärstrukturabschätzungen wurden mit der Jasco-Software zur Sekundärstrukturanalyse errechnet.

4.2 Differential Scanning Calorimetry

Die Differential Scanning Calorimetry (DSC) dient zur Analyse der thermodynamischen Stabilität von Proteinen. Während der DSC-Messung wird die Wärmekapazität eines Systems als Funktion der Temperatur aufgenommen. Wird der Gleichgewichtsprozess der Proteinfaltung bei einer bestimmten Temperatur durch eine Proteinentfaltung verschoben, so wird ein Teil der in der Zelle vorhandenen Wärme von der Probe absorbiert. Die zusätzliche elektrische Energie, um dieselbe Temperatur wie in der Referenz-Zelle wieder zu erreichen, wird gemes-

sen. Diese aufgewendete Energie ist proportional zur überschüssigen Wärmekapazität der Probe. Die mit dem Übergang assoziierte Enthalpie-Änderung ΔH ist proportional zur Fläche unter dem Peak der überschüssigen Wärmekapazität in der Temperaturkurve:

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_F} \Delta C_p \cdot dT$$

ΔC_p = mit der Entfaltung verbundene überschüssige Wärmekapazität

T_F und T_0 = obere und untere Temperaturgrenzen der Umwandlung

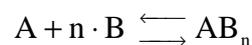
Das Kalorimeter besteht aus zwei Zellen. Eine der Zellen dient als Referenz-Zelle und enthält nur den DSC-Puffer (20 mM Hepes, pH 7,6, 150 mM NaCl). In der zweiten Kammer befindet sich luftblasenfrei das Protein (0,5 bis 1 mg/ml), das zuvor in den DSC-Puffer umgepuffert wurde. Die Messung erfolgte über einem Temperaturbereich von 20°C bis 80°C bei einer Heizrate von 1 K/min. Zur Untersuchung der Reversibilität erfolgte nach dem ersten Heizzyklus eine weitere Messung.

4.3 Mikrokolorimetrie

Während einer mikrokolorimetrischen Messung wird die freiwerdende beziehungsweise verbrauchte Wärmeenergie zweier assozierender Proteine gemessen. Zu diesem Zweck wird eines der Proteine in der Messzelle des Kalorimeters vorgelegt und der potentielle Interaktionspartner in zehnfach höherer Konzentration in konstanten Mengen und Zeitabständen zutitriert. Die durch die Reaktion der beiden Proteine verursachte Wärmeänderung wird durch den Vergleich mit einer Referenzzelle ermittelt. Dabei wird mit Hilfe eines Thermoelements die Temperatur des Gesamtsystems konstant gehalten, so dass die Methode auch als isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) bezeichnet wird. Bei Sättigung des vorgelegten Proteins ist bei weiterer Zugabe des Bindungspartners lediglich eine konstante Verdünnungswärme messbar.

Das Messprinzip erlaubt die simultane Bestimmung aller Bindungsparameter der Reaktion (K , ΔH^0 , ΔS^0 und n) in einem einzigen Experiment (Wiseman *et al.*, 1989).

Folgende Reaktion soll als vereinfachtes Modell dienen:



Die Dissoziationskonstante K einer Bindungsreaktion, die dabei umgesetzte Bindungswärme ΔH^0 und die Anzahl der Bindungsstellen n sind unabhängige Variablen, während die Entropie

ΔS^0 und die freie Energie ΔG^0 von der Bindung abhängige Variablen sind, die durch folgende Gleichung berechnet werden können:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0$$

Die mikrokalorimetrischen Messungen wurden mit einem ITC-Titrationskalorimeter der Firma MicroCal durchgeführt. Es wurden Pufferbedingungen gewählt, in denen sich die zu untersuchenden Proteine als stabil erwiesen. Die Auswertung der erhaltenen Messdaten wurden mit einem Computerprogramm des Geräteherstellers ausgewertet (MicroCal Origin 3.1). Es wurde zunächst die freigewordene Reaktionswärme in Kilokalorie pro Mol umgerechnet. Von diesen Werten wurde jeweils der konstante Beitrag der Verdünnungswärme abgezogen. Die Werte wurden gegen das molare Verhältnis beider Proteine aufgetragen. Das Computerprogramm passt den so prozessierten Daten nun eine Kurve an, aus deren Krümmung die Gleichgewichtskonstante K_D hervorgeht.

5. Röntgenstrukturanalyse

Die dreidimensionale Struktur von Proteinen kann mit röntgenkristallographischen Methoden in atomarer Auflösung bestimmt werden. Dabei erhält man ein Strukturmodell mit den Positionen der einzelnen Atome. Neben der Kenntnis über die Faltung einer Polypeptidkette ermöglicht die Untersuchung einer Proteinstruktur auch das Verständnis der Proteinfunktion auf molekularer Ebene, wie zum Beispiel spezifische Interaktionsmechanismen mit einem Interaktionspartner. Die röntgenkristallographischen Methoden wurden in Kooperation mit Ingrid Vetter (MPI Dortmund) durchgeführt.

5.1 Kristallisation

Die Kristallisation und anschließende Analyse der erhaltenen Proteinkristalle stellen eine führende Methode zur Strukturaufklärung von Proteinen dar. Bei der Proteinkristallisation gehen Proteinmoleküle aus einer übersättigten Lösung in einen festen Phasenzustand über. Zu diesem Zweck wird eine hochkonzentrierte Proteinlösung mit einem Fällungsmittel versetzt. Dabei wird mit zunehmender Fällungsmittelkonzentration das Löslichkeitslimit des Proteins überschritten, was zu einer Übersättigung des Systems führt (Abbildung 6). Dieser übersättigte Zustand beinhaltet eine metastabile und eine labile Region. In der metastabilen Region

können sich spontan keine Kristallisationskeime bilden, aber bereits vorhandene Keime können wachsen. In der labilen Region hingegen entstehen spontan stabile Keime, die entweder aggregieren und als Niederschlag ausfallen oder aber zu Kristallen weiterwachsen.

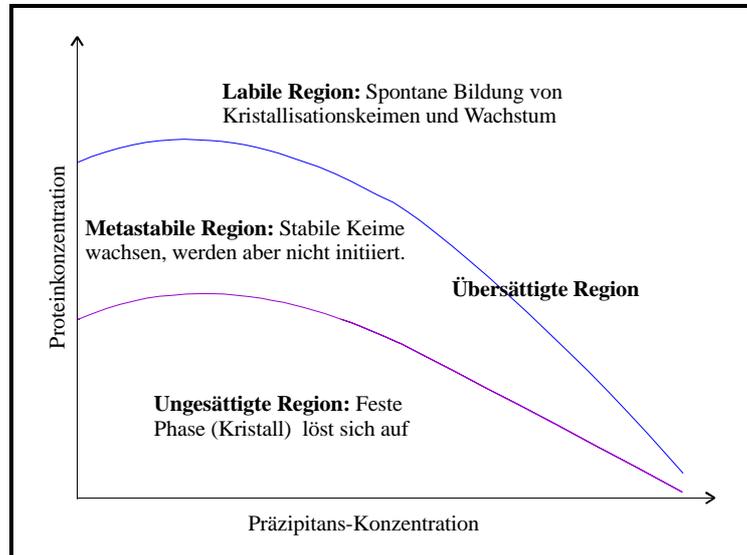


Abbildung 6: Phasendiagramm der Kristallisation nach McPherson, 1990.

Ideales Kristallwachstum beginnt mit Keimen, die gerade oberhalb der metastabilen Region in der labilen Phase gebildet werden. Das Kristallwachstum vollzieht sich langsam und die Proteinkonzentration nimmt ab, so dass das System in die metastabile Phase übergeht. Hier können die gebildeten Keime zu Kristallen heranwachsen, die für die Röntgenstrukturanalyse geeignet sind.

Als Fällungsmittel werden zum Beispiel Salze wie Ammoniumsulfat oder aber organische Verbindungen wie Polyethylenglycol (PEG) oder Alkohole (Ethanol) verwendet. Bei höheren Konzentrationen konkurrieren diese hydrophilen Verbindungen mit dem Protein um dessen Wasser in der Hydrathülle. Durch diesen Vorgang kommt es zu verstärkten Protein-Protein-Wechselwirkungen und im Idealfall zur Kristallbildung. Dabei muss der Prozess der Übersättigung sehr langsam erfolgen, um bei der Aggregation der Proteine geordnete dreidimensionale Kristalle zu erhalten und keinen amorphen Niederschlag. Desweiteren wird der Kristallisationsvorgang von Bedingungen wie Proteinkonzentration, Reinheitsgrad, Temperatur, pH-Wert und Art und Konzentration des Fällungsmittels beeinflusst (Ducruix und Giege, 1992).

5.2 Kristallisation nach der *hanging drop* Methode

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der *hanging drop* Methode kristallisiert. Mit der Anwendung der Methode des „hängenden Tropfens“ kann eine kontrollierte Konzentrierung von Protein und Fällungsmittel erreicht werden. Dazu wird ein kleines Volumen der konzentrierten Proteinlösung (1 bis 3 μ l) auf ein zuvor gesäubertes Deckglas pipettiert und das gleiche Volumen an Fällungsmittel hinzugefügt. Das Deckglas wird anschließend kopfüber auf eine Vertiefung gesetzt, die zuvor mit 500 bis 750 μ l des entsprechenden Fällungsmittels gefüllt wurde (Reservoirlösung). Man benutzt dabei für Zellkultur entwickelte Platten (Linbro-Platten) mit 24 Vertiefungen, um 24 Ansätze parallel durchzuführen. Um eine luftdicht verschlossene Kammer zu bilden, wird zwischen Deckglas und Kammerrand ein Silikonfettfilm aufgetragen. Das Volumen des Tropfens verringert sich durch Dampfdiffusion, da die Präzipitantskonzentration im Vergleich zum Reservoir nur halb so groß ist. Dadurch erhöht sich langsam die Konzentration im Tropfen, bis eine Übersättigung und im Idealfall eine Kristallisation des Proteins eintritt. Zur Auffindung von geeigneten Kristallisationsbedingungen wurden erworbene Screens (Hampton I und II Screen, Peg/ion Screen, Grid Screen PEG 6000, Grid Screen Ammonium Sulfate, sodium/potassium formulation, alle von Hampton Research) eingesetzt, die auf bekannten Kristallisationsbedingungen vieler Proteine beruhen. Zur Optimierung gefundener Anfangsbedingungen wurden sowohl der Additiv-Screen (Hampton Research) benutzt als auch weiterführende, selbst hergestellte Screens. Dabei wurden verschiedene Parameter wie Temperatur, pH und Proteinkonzentration getestet.

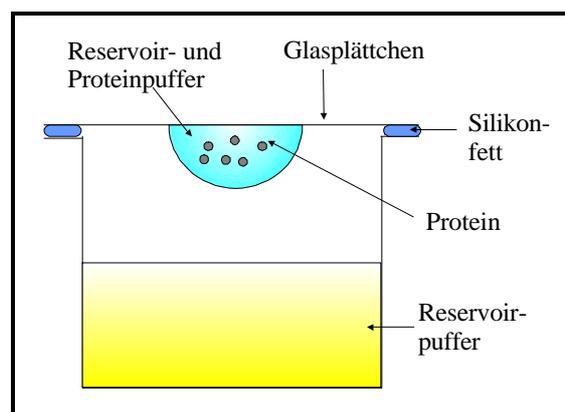


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Kristallisation nach der Methode des hängenden Tropfens.

5.3 Kristallstrukturanalyse und Datensammlung

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins kann mittels Röntgenkristallographie ermittelt werden (Drenth 1999). Proteinkristalle können von unterschiedlicher Größe und Form sein, wobei sie aus einer Vielzahl von Einheitszellen bestehen, die durch wiederholte Translation entlang der Achsen eines Kristalls das gesamte Kristallgitter aufbauen. Die molekulare Struktur und die Anordnung der Moleküle in der Einheitszelle bestimmen die Intensitäten der am Kristallgitter gebeugten Strahlen. Trifft ein Röntgenstrahl auf einen Kristall, so durchquert der größte Teil des Primärstrahls den Kristall unverändert, während ein Teil mit der Elektronenhülle der Atome im Kristall wechselwirkt. Dadurch wird das Elektron angeregt und gibt durch einen elastischen Streuprozess Röntgenstrahlung in alle Richtungen ab. Da sich die Atome in einer regelmäßigen, sich wiederholenden räumlichen Anordnung im Kristallgitter befinden, kommt es zur Interferenz der emittierten Röntgenstrahlung, welche entweder zur Auslöschung oder in bestimmten Richtungen zur Verstärkung führt. Die Richtung der gebeugten Röntgenstrahlen ist dabei vom kristallinen Gitter abhängig.

Die Kristalle werden zur Datensammlung auf einem Goniometerkopf im Schnittpunkt des Röntgenstrahls mit der Rotationsachse montiert. Um alle gewünschten Kristallebenen im Beugungswinkel zum Primärstrahl zu orientieren, wird der Kristall im Röntgenstrahl gedreht und es werden Beugungsbilder unter verschiedenen Winkeln aufgenommen. Die gebeugten Strahlen werden mit einem Flächendetektor im Abstand von 10 bis 20 cm vom Kristall aufgenommen und gespeichert.

Zur Indizierung und zur Bestimmung der Größe der Einheitszelle und der Symmetrie des Kristalls wurde das Programm XDS und zur Skalierung das Programm XSCALE (Kabsch, 1993) verwendet. Die Intensität und die entsprechenden Phasenwinkel der Gesamtheit aller beobachteten Reflexe ergibt durch Fourier-Transformation eine Elektronendichte, aus der die Struktur des Proteins ermittelt werden kann.

5.4 Kryo-Kristallographie

Beim Bestrahlen von Kristallen mit intensiver Röntgenstrahlung kann es zu Strahlenschäden kommen. Unter primären Strahlenschäden versteht man dabei die Spaltung von Bindungen am Protein oder den umgebenden Lösungsmittelmolekülen. Als sekundäre Strahlenschäden bezeichnet man die Entstehung von beweglichen Radikalen, die weitere Reaktionen an Protein- und Wassermolekülen auslösen können. Diese Strahlenschäden können durch Kühlung der Kristalle während der Messung stark vermindert werden. Dafür werden die Proteinkristalle in einem Strahl von verdampfendem Stickstoff mit einer Temperatur von 100 K (Kryo-

Kristallographie) gekühlt. Dies ermöglicht die Messung vollständiger Datensätze der Kristalle am Synchrotron. Ziel der Kryo-Kristallographie ist es zudem, Bedingungen zu finden, die die Bildung von Eiskristallen verhindern, welche durch ihre Beugungsfähigkeit die Genauigkeit der Messung verringern würden. Unter optimalen Bedingungen umgibt die Flüssigkeit den Kristall glasartig und erstarrt im Zustand einer unterkühlten Flüssigkeit. Es gibt eine Vielzahl von sogenannten Kryoschutzmitteln, wie zum Beispiel niedere Alkohole (Propanol, Ethanol, Glycerin), PEG 400/600, hochkonzentrierte Salzlösungen oder Saccharide. Kryoschutzlösungen enthalten zusätzlich zu den Bestandteilen der Mutterlösung das jeweilige Kryoschutzmittel, deren Art und die Menge für jeden Kristall und jede Mutterlösung experimentell ermittelt werden muss.

5.5 Phasenbestimmung mittels SAD

Die zur Berechnung der Elektronendichtekarte nötige Phaseninformation kann im allgemeinen nicht direkt anhand der Beugungsdaten bestimmt werden. Ein Grund hierfür ist, dass die Datenaufzeichnung nicht zeitempfindlich ist, so dass nur ein zeitlicher Mittelwert der am Detektor eintreffenden Intensitäten erfasst werden kann. Eine Methode zur Lösung des Phasenproblems von unbekanntem Proteinkristallstrukturen beruht auf der anomalen Streuung von Röntgenstrahlung. Normalerweise sind die Intensitäten der zwei Reflexe $I(h, k, l)$ und $I(-h, -k, -l)$, die als Friedel-Paar bezeichnet werden, identisch (Friedelsches Gesetz). Die Anwesenheit von Fremdatomen wie Selen oder Schwermetallen wie Quecksilber im Proteinkristall kann dazu führen, dass die Intensitäten der Friedel-Paare sich unterscheiden, was als anomale Dispersion bezeichnet wird. Bei einem SAD-Experiment (Single-wavelength Anomalous Diffraction) wird der Datensatz eines Proteinkristalls gemessen, wobei der Kristall zuvor zum Beispiel aus mit Seleno-Methionin rekombinanten Protein gewonnen wurde. Aus den auftretenden Intensitätsunterschieden zwischen den Friedel-Paaren lässt sich die Phaseninformation ableiten.

5.6 Modellbau und Strukturverfeinerung

Die aus den gemessenen Intensitäten und kalkulierten Phasen berechnete Elektronendichtekarte wurde an einer SGI Indigo2 oder O2 Workstation (Silicon Graphics, Mountain View, CA, USA) mit dem Programm O (Jones und Kjeldgard, 1997) interpretiert. Dabei wurde zunächst in die zusammenhängende Elektronendichtekarte ein Polyalanin-Rückgrat eingebaut,

welches danach zur Aminosäuresequenz von APC129-250 mutiert wurde. Alle Verfeinerungen der Struktur und Veränderungen der Elektronendichtekarte wurden mit dem CNS Programmpaket durchgeführt (Brünger *et al.*, 1998).

Die Umwandlung der Elektronenverteilung in ein dreidimensionales Modell der Proteinstruktur wird als Interpretation der Elektronendichtekarte bezeichnet. Die Verfeinerung ist der abschließende Schritt in der Strukturbestimmung. Hierbei werden die berechneten Strukturformfaktoren des Modells an die beobachteten angepasst. Bei diesem Prozess wird versucht, die Differenz zwischen den experimentell beobachteten Strukturamplituden (F_{obs}) und den von dem aktuellen Modell berechneten (F_{calc}) zu minimieren. Mit Hilfe von Computerprogrammen werden die Atomkoordinaten leicht variiert und das neue veränderte Modell mit den F_{obs} verglichen. Dieser Vorgang wird bis zum Erreichen der kleinsten möglichen Differenz zwischen F_{obs} und F_{calc} fortgesetzt.

Die Übereinstimmung zwischen F_{obs} und F_{calc} wird durch den kristallographischen R -Faktor beschrieben, der die Qualität des Angleichs beurteilt, während die Beweglichkeit der Atome im Kristallgitter durch die kristallographischen Temperaturfaktoren (B -Faktoren) ausgedrückt wird.

$$R = \frac{\sum_h \left| |F_{\text{obs}}(h)| - |F_{\text{calc}}(h)| \right|}{\sum_h |F_{\text{obs}}(h)|}$$

Bei einer genauen Übereinstimmung wäre der R -Faktor gleich Null, aber selbst für sehr gute und verfeinerte Proteinstrukturen liegt er zwischen 0,15 und 0,20. Diese Abweichungen kommen nicht nur durch Messfehler der Beugungsdaten zustande, sondern auch durch die nicht perfekte kristalline Ordnung oder durch kleinere Unterschiede zwischen den Strukturen der einzelnen Proteinmoleküle im Kristall. Das verfeinerte Strukturmodell stellt abschließend einen Mittelwert zwischen den minimal verschiedenen Konformationen und Orientierungen der Moleküle im Kristall dar.

IV. ERGEBNISSE

A. Oligomerisierung des APC-Proteins

Das APC-Protein besitzt am N-Terminus einen 250 Aminosäure großen Bereich, der für die Dimerisierung beziehungsweise Oligomerisierung von APC verantwortlich ist (Su *et al.*, 1993; Joslyn *et al.*, 1993). Der Bereich beinhaltet mehrere Heptad-Wiederholungen, die Coiled coil Strukturen ausbilden können und so die Oligomerisierung bewirken (Grodén *et al.*, 1991). Es handelt sich hier um eine funktionelle Domäne, die sich aufgrund des hohen Sekundärstrukturanteils (Abbildung 8, vorwiegend α -helikale Abschnitte) für biochemische und insbesondere strukturelle Untersuchungen eignet.

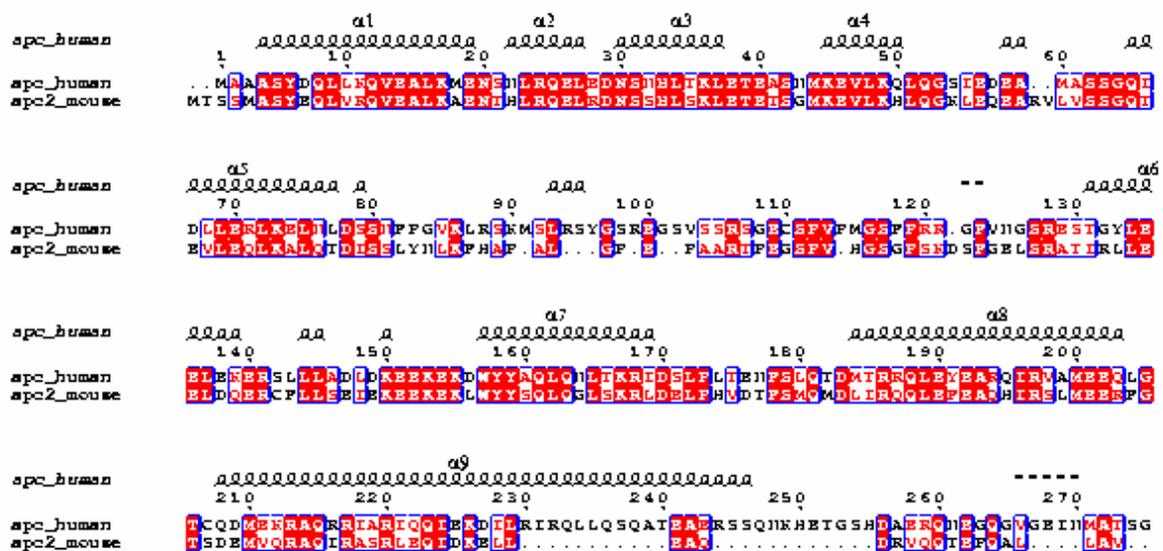


Abbildung 8: Ergebnis der Sekundärstrukturvorhersage. Auffällig sind die zahlreichen Sekundärstrukturelemente, bei denen es sich hauptsächlich um α -Helices handelt. Die Sequenz für APC2-250 beinhaltet die Aminosäuren 2 bis 250.

In dieser Region befindet sich, im Vergleich zum gesamten APC-Protein, das bis auf die Armadillo-Repetitionen wenige strukturelle Domänen aufweist, der höchste Anteil an Sekundärstrukturelementen. Daher wurde der Bereich des APC-Gens, der die Region der ersten 250 Aminosäuren kodiert, für weitere strukturelle und funktionelle Analysen kloniert.

1. Klonierung und Expression des vorderen APC-Genfragments

Der für das N-terminale APC-Fragment kodierende Genabschnitt umfasst die Basenpaare 4 bis 750 des APC-Gens und kodiert damit für die ersten 250 Aminosäuren des APC-Proteins. Das ausgewählte Fragment wurde durch PCR-Amplifikation des entsprechenden Genabschnitts hergestellt und in den pGEX-6P-2 Vektor ligiert. Nach einem positiven Ergebnis der DNA-Sequenzierung wurde der rekombinante Vektor in den *E.coli*-Expressionsstamm BL21 transformiert, und die Expression erfolgte durch Kultivierung in Ampicillin-haltigem LB-Medium. Die Bakterien wurden bei 37°C bis zu einer relativen Absorption bei 600 nm von 0,8 kultiviert. Die Expressionsbedingungen wurden in vorherigen Experimenten optimiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die rekombinante Synthese des APC2-250 Proteins bei 30°C durch Zugabe von 0,05 mM IPTG induziert und die Bakterien am nächsten Morgen durch Zentrifugation sedimentiert. Das Proteinfragment hat mit dem N-terminalen Glutathion-S-Transferase Fusionsanteil von 26 kDa ein Molekulargewicht von etwa 55 kDa.

Die Bakterienzellen wurden in GST-Bindungspuffer (1x PBS, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTE) suspendiert und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Die Zelltrümmer und unlöslichen Proteinbestandteile wurden bei 17.000 rpm bei 4°C sedimentiert und der Überstand mit dem GST-Fusionsprotein mit der Glutathion-Sepharose Affinitätssäule chromatographisch gereinigt. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch GST-Waschpuffer (1x PBS, 1 mM DTE) entfernt und das GSTAPC2-250 Fusionsprotein anschließend mit GST-Elutionspuffer (20 mM Glutathion, 50 mM Tris, 1 mM DTE, pH 8,0) von der Säule eluiert. Die Reinigung lieferte im Durchschnitt 25 mg je Liter Bakterienkultur des 55 kDa großen Fusionsproteins mit einer Reinheit von etwa 80 %.

Die enzymatische Abspaltung des GST-Fusionsanteils vom GSTAPC2-250 Fusionsprotein wurde bei einer Inkubationszeit von fünf bis sechs Stunden bei 4°C bei Einsatz von 3 U PreScissionTM-Protease pro 5 mg Protein durchgeführt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz erneut über die GSH-Sepharose-Säule geleitet und diesmal der Durchlauf mit dem GST-freien APC2-250 Anteil in Fraktionen gesammelt. Das Protein konnte in der SDS-Gelelektrophorese auf der Höhe der erwarteten molekularen Masse von 29 kDa nachgewiesen werden und erwies sich zu mehr als 95 % rein (Abbildung 9). Eine Schwierigkeit ergab sich durch die funktionelle Eigenschaft des APC2-250 zu oligomerisieren. Eine Oligomerisierung erfolgte dabei nicht nur zwischen den abgespaltenen APC2-250 Fragmenten, sondern auch zwischen APC2-250 Fragmenten und den ungespaltenen Fusionsproteinen GSTAPC2-250.

Die gereinigten Fraktionen enthielten somit immer einen kleinen Anteil GST, sowie eine geringe Menge des GST-Fusionsproteins. Eine 99 %ige Reinheit des Proteinfragments wurde durch eine anschließende Gelfiltration der konzentrierten APC2-250 haltigen Fraktionen auf einer S75 26/60 Gelfiltrationssäule in 1x PBS und 1 mM DTE erreicht. Dabei konnte eine vollständige Trennung von APC2-250 und GST beziehungsweise GSTAPC2-250 Fusionsprotein erreicht werden.

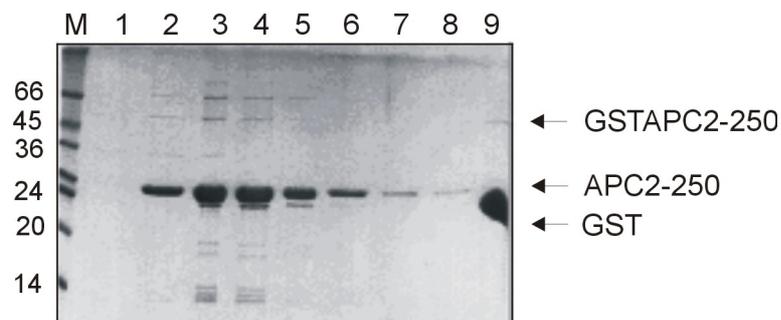


Abbildung 9: 15 %iges SDS-Gel der zweiten Affinitätschromatographie nach PreScission™-Protease-Spaltung. M: SDS-7 Proteinstandard; 1-8: verschiedene Fraktionen des Durchlaufs, die GST-freies APC2-250 enthalten; 9: Elutionsfraktion der PreScission™-Spaltung, in der überwiegend GST vorhanden ist. Auf der linken Seite sind die Größen ausgewählter Markerproteine in kDa angegeben.

Mit einem Elektronenspray-Massenspektrometer erfolgte die massenspektrometrische Untersuchung des gereinigten APC2-250 Fragments. Die Auswertung des Massenspektrums ergab eine Masse von 29047 Da. Mit Hilfe des Online-Programms ExPASy konnte die theoretische Masse des Fragments durch Eingabe der entsprechenden Aminosäuresequenz ermittelt werden. Diese betrug unter Einbeziehung der vier zusätzlichen Aminosäuren Glycin/Prolin/Leucin/Glycin, die bei der PreScission™-Spaltung am Fragment erhalten bleiben, 29046,6 Da. Bei dem gereinigten Protein handelt es sich damit aufgrund des Vergleichs der theoretisch ermittelten Masse mit der experimentell bestimmten Masse um das APC2-250 Proteinfragment.

2. Biochemische Charakterisierung von APC2-250

2.1 Analyse des Oligomerisierungsverhaltens

Zur Analyse der prognostizierten Oligomerisierung des APC-Proteins über seine N-terminale Region (Grodén *et al.* 1991, Kinzler *et al.* 1991) wurden mit dem N-terminalen APC-

Fragment APC2-250 analytische Gelfiltrationen mit der S200 36/99 Gelfiltrationssäule durchgeführt. Im Elutionsdiagramm waren mehrere Signale zu erkennen, die auf verschiedene Oligomerisierungszustände des APC2-250 schließen ließen. Die Auswertung der Elutionssignale anhand der vorliegenden Kalibriergeraden ergab folgende molekulare Massen:

Peak	Elutionsvolumen [ml]	Molekularmasse [kDa]	mögliche Zuordnung
1	587,86	102,3	APC2-250 Tetramer (116 kDa)
2	604	83,1	APC2-250 Trimer (87 kDa)
3	678,9	31,6	APC2-250 Monomer (29 kDa)
4	727,09	16,8	APC2-250 Abbauprodukt

Tabelle 1: Zuordnung der beobachteten Elutionssignale.

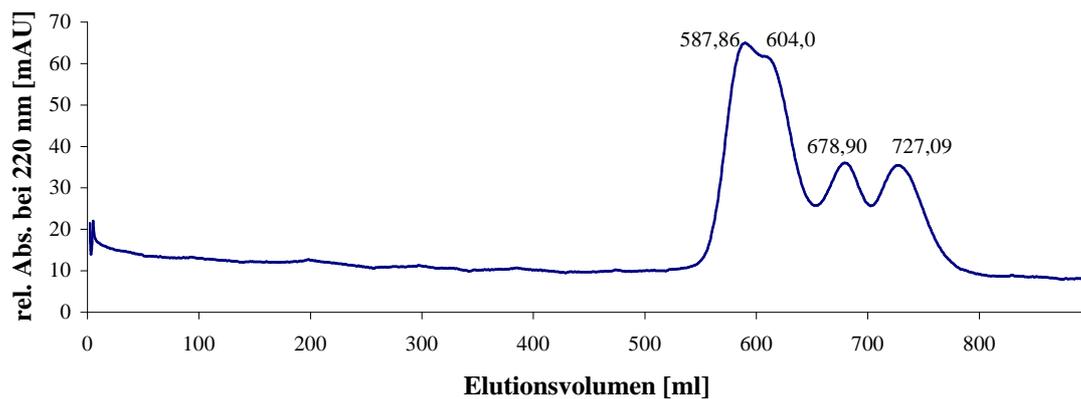


Abbildung 10: Analytische Gelfiltration des isolierten APC2-250 Tetramers. Es konnte eine neue Einstellung des Gleichgewichts zwischen den verschiedenen Oligomerzuständen beobachtet werden.

Die in Tabelle 1 angegebene Zuordnung soll die verschiedenen Oligomerisierungszustände verdeutlichen. Demnach liegt APC2-250 in dem Gelfiltrationspuffer (1x PBS und 1 mM DTE) in verschiedenen Zuständen vor, wobei Oligomere mit mehr als vier APC2-250 Molekülen nicht beobachtet wurden. Das theoretische Elutionsvolumen eines Dimers wurde mit 632 ml berechnet. Im Elutionsdiagramm wurde dieser Punkt von den nur schwach getrennten Signalen, die den Tetra- und Trimerzustand repräsentierten, überlagert. Es war also durchaus möglich, dass das APC2-250 Dimer vorhanden war, aber durch die Überlagerung der Signale nicht identifiziert werden konnte.

Zur Analyse des Gleichgewichtszustandes der verschiedenen Oligomerisierungszustände wurde das Protein des Elutionssignals, das den tetrameren Zustand repräsentierte, isoliert und eine erneute Gelfiltration unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Das Elutionsdiagramm der zweiten Gelfiltration zeigte wieder alle zuvor beobachteten Zustände in annähernd gleichen Verhältnissen, womit eine Gleichgewichtsreaktion zwischen den verschiedenen Oligomerzuständen angenommen werden konnte (Abbildung 10).

2.2 Test der Sensitivität und Spezifität eines anti-APC2-250 Serums aus Kaninchen

Gegen das Proteinfragment APC2-250 wurde in einer Auftragsarbeit ein polyklonaler Antikörper hergestellt (Eurogentec, Belgien). Dazu wurden zwei Kaninchen durch mehrere zeitlich versetzte subkutane Injektionen des Antigens APC2-250 immunisiert. Am Tag der Erstinjektion wurden von beiden Kaninchen sogenannte Pre-Immun-Seren gewonnen, die für die späteren Kontrollexperimente wichtig waren. 66 Tage nach der ersten Antigen-Injektion wurde eine größere Menge Blut entnommen und daraus das Serum gewonnen. Nach weiteren zwei Wochen erfolgte dann die letzte Blutabnahme.

Der Test des in dem Serum enthaltenen Antikörpers erfolgte mit Hilfe der Western-Blot Analyse. Die Analyse der Spezifität des gegen APC2-250 gerichteten Antikörpers wurde durch Vergleich des Pre-Immun-Serums mit dem nach 66 Tagen erhaltenen Serum durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte mit 1:200 verdünnten Seren. Mit dem Pre-Immun-Serum konnte eine unspezifische Hybridisierung durch Detektion aller Lysat-Banden im Western-Blot nachgewiesen werden, während das reine Antigen nicht erkannt wurde. Mit dem nach 66 Tagen erhaltenen Serum konnte eine spezifischere Detektion des Antigens im Lysat und als gereinigtes Antigen erfolgen, wobei jedoch noch eine unspezifische Erkennung von Lysat-Banden vorlag (nicht gezeigt).

Der Test des nach 80 Tagen gewonnenem Serums ergab eine deutliche Steigerung der Selektivität, die sich im Western-Blot durch eine vollständige Reduktion der unspezifischen Banden zeigte. Es konnten dabei neben dem Fusionsprotein sogar geringe Mengen an Zerfallsprodukten nachgewiesen werden (Abbildung 11).

Die beste Sensitivität des Antikörpers wurde nach Verbesserung der Bedingungen bei einer Inkubation über Nacht bei 4°C in fünfprozentigem Milchpulver (in 1x PBS mit 0,1 % Tween) bei einer Verdünnung des Antikörpers von 1:10.000 erreicht. Hierbei zeigte sich, dass eine Detektion des Antigens bis zu einer unteren Grenze von etwa 5 ng noch sehr gut möglich war.

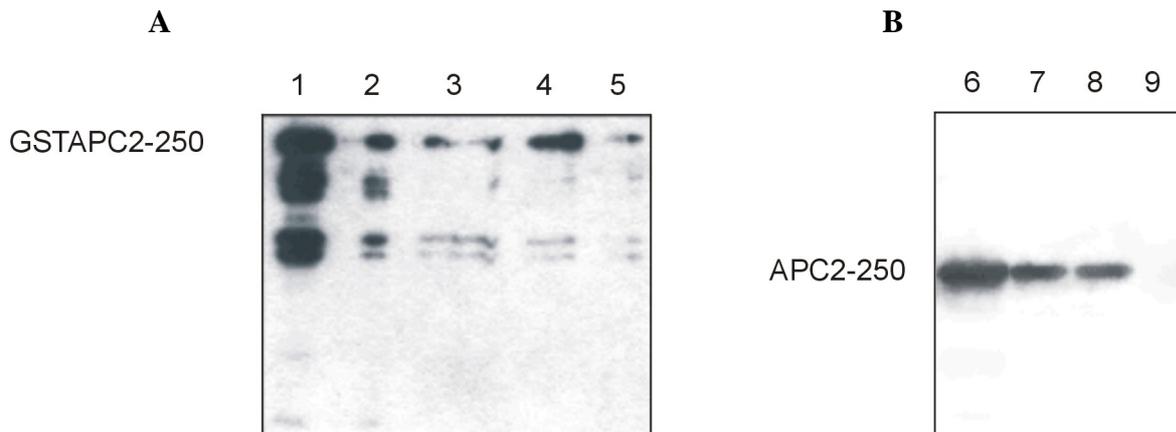


Abbildung 11: Test der Sensitivität und der Spezifität des Serums eines mit APC2-250 immunisierten Kaninchens im Western-Blot. Das Serum wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt. **A:** Bakterienlysat mit überexprimiertem GSTAPC2-250 in verschiedenen Konzentrationen. **1:** 2 μ l (1:10 Verdünnung). **2:** 1 μ l (1:10). **3:** 5 μ l (1:100). **4:** 2 μ l (1:100). **5:** 1 μ l (1:100). Erkennbar ist die hohe Sensitivität, mit der das Fusionsprotein und seine Zerfallsprodukte nachgewiesen werden können. **B:** Reines APC2-250 unmittelbar nach einer Gelfiltration. **6:** 100 ng APC2-250. **7:** 10 ng APC2-250. **8:** 5 ng APC2-250. **9:** 1 ng APC2-250. Mit dem Antikörper war es möglich, sauberes APC2-250 ab einer Menge von 5 ng zu detektieren.

2.3 Limitierte Proteolyse

Die Methode der limitierten Proteolyse wird für bevorstehende Kristallisationsversuche eingesetzt, um interessante stabile Strukturdomänen eines Proteinfragments zu finden. Proteasen sind in der Lage, ungeschützte Proteinanteile, wie Schleifen, freie N- und C-Termini sowie ungeordnete Anteile (random coils) in ihren individuellen Erkennungssequenzen zu spalten. Besonders hoch organisierte Strukturen sind vor der Spaltaktivität der Protease geschützt, da die zu spaltenden Erkennungssequenzen für das aktive Zentrum der Protease nicht zugänglich sind. Trypsin gilt als eine sehr radikale Serin-Protease, die im Pankreas aller Säugetiere vorkommt. Proteinfragmente, die in Gegenwart dieses Enzyms über längere Zeit bestehen bleiben, gelten als stabil. Da die Kristallisation eines der primären Ziele dieser Arbeit darstellte, sollte ein tryptisches Fragment identifiziert und genauer charakterisiert werden.

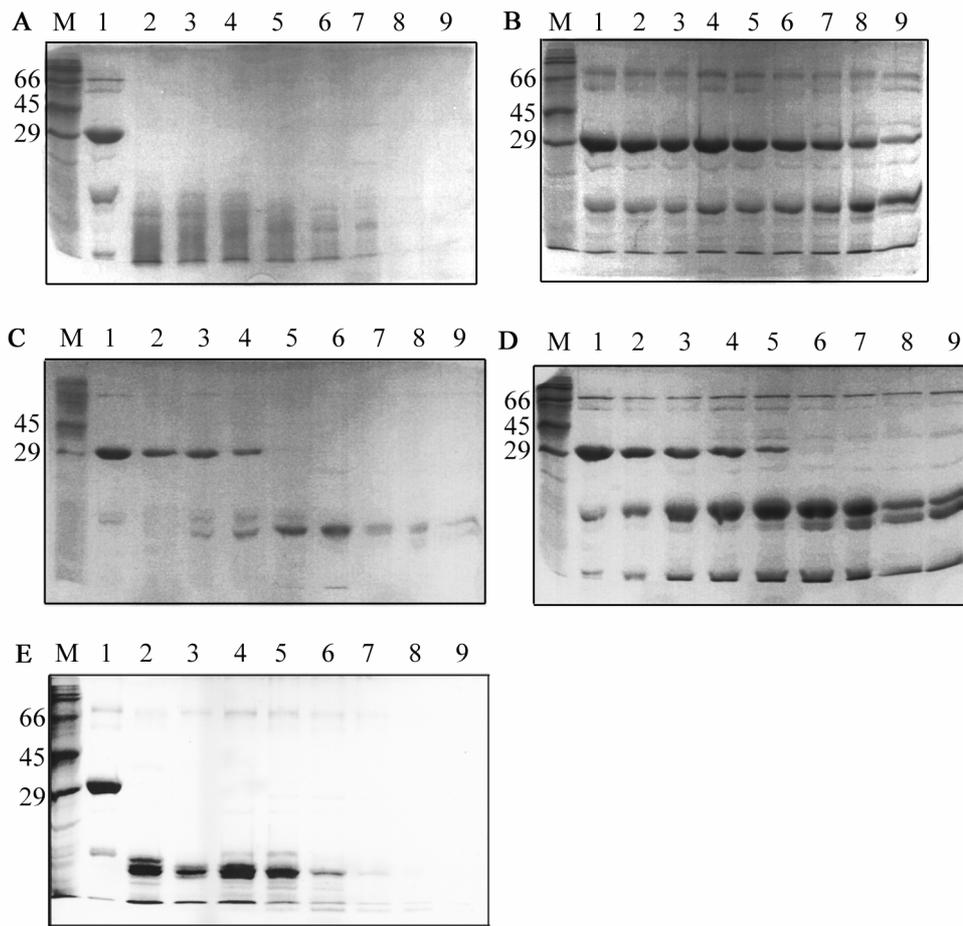


Abbildung 12: Proteolyse unter Einsatz verschiedener Enzyme in katalytischen Mengen. **A:** Proteinase K. **B:** Elastase. **C:** Papain. **D:** α -Chymotrypsin. **E:** Trypsin. Zu verschiedenen Zeitpunkten der proteolytischen Spaltung wurden Proben entnommen und diese in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. **M:** SDS-7 Marker. **1:** APC2-250 vor der Reaktion. **2:** 2 Minuten **3:** 5 Minuten **4:** 10 Minuten **5:** 30 Minuten **6:** 60 Minuten **7:** 120 Minuten **8:** 180 Minuten **9:** 240 Minuten nach Beginn der enzymatischen Reaktion. Auf der linken Seite jedes Gels sind die Größen ausgewählter Markerproteine in kDa angegeben.

Es wurden fünf Proteasen (Trypsin, Chymotrypsin, Papain, Elastase, Proteinase K) ausgewählt, die in einem Protease-Protein-Verhältnis von 1:1000 eingesetzt wurden. Bei der limitierten Proteolyse mit Trypsin konnte man innerhalb von zwei Minuten das Entstehen einer dominanten Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 14 kDa erkennen. Dieses Fragment konnte über einen Reaktionszeitraum von einer Stunden noch deutlich erkannt werden. Desweiteren konnte über die gesamte Reaktionsdauer auch das Auftreten sehr kleiner Proteinfragmente (< 10 kDa) beobachtet werden, die sich jedoch in der Regel als sehr kurzlebig erwiesen.

2.4 Massenspektrometrische Analyse des tryptischen Fragments

Zur Bestimmung der molekularen Masse des tryptischen Proteinfragments wurde die proteolytische Spaltung mit Trypsin wie beschrieben wiederholt. Nach 45 Minuten wurde die Reaktion durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. Es erfolgte die massenspektrometrische Analyse des Spaltansatzes unter Einsatz der MALDI-TOF-MS. Als Matrix kam hierbei α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (HCCA) zum Einsatz.

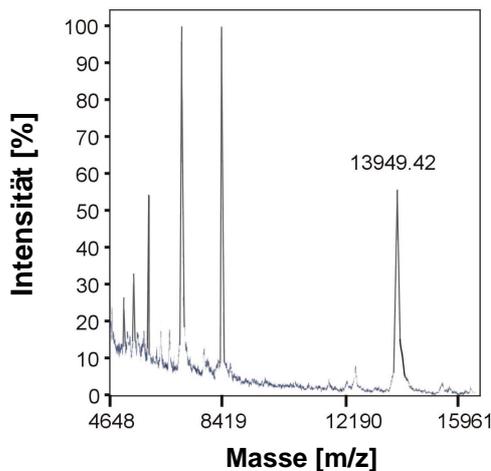


Abbildung 13: Massenspektrum des mit Trypsin in limitierter Proteolyse gespaltenen APC2-250. Nach einer Reaktionsdauer von 45 Minuten war das Ausgangsprotein APC2-250 (29 kDa) vollständig abgebaut. Ein dominantes Signal trat bei einem Masse/Ladungs-Verhältnis von 13949 Da auf.

Das Massenspektrum zeigte ein dominantes Signal bei 13949 Da. Dieses Signal stand in Übereinstimmung mit dem etwa 14 kDa großen Proteinfragment bei der limitierten Proteolyse. Auch die zahlreichen kleineren Proteinfragmente (< 10 kDa), die bei der limitierten Proteolyse mit Trypsin beobachtet werden konnten, konnten aufgrund des Auftretens der kleineren Signale beobachtet werden.

3. Strukturelle Analyse von APC2-250

3.1 Sekundär-Strukturanalyse des APC2-250 durch CD-Spektroskopie

Das APC2-250 Protein wurde durch die Aufnahme von Circular dichroismus(CD)-Spektren auf eine definierte Sekundärstruktur untersucht. CD-Spektren im fernen Ultraviolettbereich (170 bis 240 nm) sind empfindlich für die Konformation der Proteinhauptkette, da sich die Absorptionsbanden der peptidischen Amidgruppe vielfach überlappen. In der Regel stimmen Abschätzungen der α -helikalen Anteile von Proteinen aus CD-Spektren sehr gut mit Daten der Röntgenstrukturanalyse überein, was auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit bestätigt werden kann.

Für die Messung wurde eine 20 mikromolare APC2-250 Proteinlösung in CD-Puffer (20 mM Kaliumphosphat, 5 mM $MgCl_2$, pH 7,4) umgepuffert, auf 20°C temperiert, über einen Wellenlängen-Bereich von 190 bis 250 nm bei 10-facher Spektrenakkumulation gemessen und das zuvor aufgenommene Pufferspektrum subtrahiert.

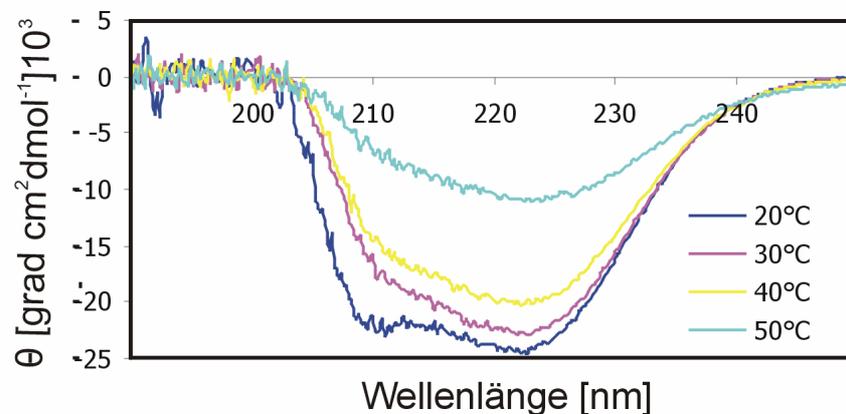


Abbildung 14: CD-Spektrum von APC2-250 bei verschiedenen Temperaturen. Die Proteinkonzentration betrug 20 μM . Der Entfaltungsprozess wurde durch die starke Abnahme des Signals bei 40°C widerspiegelt. Oberhalb von 50°C fällt das Protein aus.

Eine α -Helix hat ausgeprägte negative CD-Banden bei 208 und 222 nm und eine positive Bande bei 190 nm. Das Spektrum von APC2-250 entspricht dieser Vorgabe (Abbildung 14). Das erste ausgeprägte Minimum des Spektrums lag bei einer Wellenlänge von 223 nm, während das zweite Minimum als Schulter des ersten Minimums bei einer Wellenlänge von 210 nm auftauchte. In dem Bereich von 190 bis 203 nm kehrte das Signal auf die Basislinie

und etwas in den positiven Bereich zurück. Das Ergebnis dieser Sekundärstrukturanalyse stimmt mit dem aus der Sekundärstrukturvorhersage überein, wo ebenfalls keine β -Faltblattkonformationen identifiziert werden.

Für die Untersuchung, ob das APC2-250 Proteinfragment durch Hitzebehandlung eine Denaturierung erfährt, wurde die Proteinlösung in der Messküvette stufenweise um 10 K erwärmt und jeweils die CD-Spektren unter zehnfacher Akkumulation aufgenommen (Abbildung 14). Dabei kam es bei einer Temperatur von 50°C zu einer Präzipitation des Proteins. Jede Temperaturerhöhung zeigte eine sukzessive Abnahme des Signals. Bei einer Temperatur von 50°C konnte die stärkste Abnahme des Signals beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Protein bei zunehmender Temperatur an Struktur verliert und einen Denaturierungsprozess erfährt.

3.2 Kristallisationsversuche von APC2-250

Das nach der Gelfiltration sehr sauber vorliegende APC2-250 wurde für Kristallisationsversuche eingesetzt. Hierfür wurde ein breites Screening mit etwa 220 verschiedenen Puffern aus den Hampton-Puffersets bei 20°C, 12°C und 4°C durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde dabei variiert und lag zwischen 15 bis 30 mg/ml. Da sich nach den vielen getesteten kommerziellen Pufferbedingungen kein positives Ergebnis zeigte, wurden die Kristallisationsversuche an dieser Stelle beendet und in folgenden Experimenten versucht, das tryptische Fragment APC129-250 in hohen Mengen rekombinant zu gewinnen und hinsichtlich seines biochemischen Verhaltens und strukturellen Anteils zu analysieren.

4. Subklonierung, Expression und Reinigung des tryptischen Fragments APC129-250

Aufgrund der Ergebnisse der Massenspektrometrie und der N-terminalen Sequenzierung (ESTGYLEEL) konnte das tryptische Fragment von Aminosäure 129 bis 250 festgelegt werden und wird im folgenden als APC129-250 bezeichnet. Das Proteinfragment wurde wie APC2-250 in den Vektor pGEX-6P-2 kloniert und das Konstrukt nach einer positiven Sequenzierung in den bakteriellen Expressionsstamm *E.coli* BL21 transformiert. Das GSTAPC129-250 Fusionsprotein wurde unter denselben Bedingungen wie zuvor APC2-250 exprimiert und affinitätschromatographisch über eine GSH-Sepharose-Säule gereinigt. Es zeigte in der anschließenden SDS-Gelelektrophorese das zu erwartende Molekulargewicht von 40 kDa, als Summe des GST-Anteils (26 kDa) und APC129-250 (14 kDa). Nach der enzymatischen Abspaltung des GST-Fusionsanteils mit Hilfe der PreScissionTM-Protease bei 3 U Protease je 5 mg GSTAPC2-250 über einen Zeitraum von 5 Stunden bei 4°C wurde APC129-250 erneut affinitätschromatographisch von dem GST-Anteil über eine GSH-Sepharose-Säule getrennt. Für weitere Experimente wurde das APC129-250 Protein konzentriert und unter Verwendung einer S75 26/60 Gelfiltrationssäule weiter gereinigt. Danach lag das APC129-250 Proteinfragment in hohen Mengen bei einer Reinheit von 99 % vor (Abbildung 15, Spuren 7 bis 12).

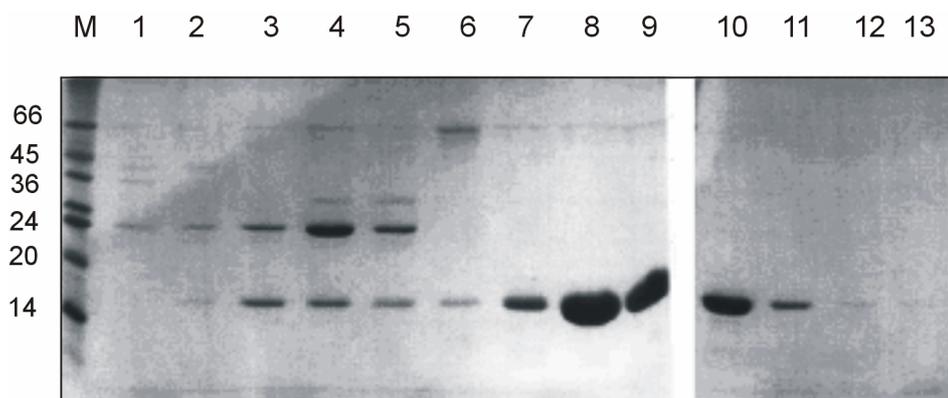


Abbildung 15: Präparative Gelfiltration des Proteinfragments APC129-250 über eine S75 26/60 Gelfiltrationssäule. M: SDS-7 Standard. Spuren 1 bis 13: verschiedene Fraktionen der Gelfiltration, die sowohl den GST-Anteil enthielten als auch APC129-250 Protein. In den Spuren 7 bis 12 lag das APC129-250 Protein sehr sauber vor, so dass diese Fraktionen für weitere Experimente verwendet wurden. Auf der linken Seite sind die Größen ausgewählter Markerproteine in kDa angegeben.

Die molekulare Masse des gereinigten Fragments APC129-250 wurde mittels MALDI-TOF-MS bestimmt. Die Auswertung des Massenspektrums erfolgte mit Hilfe der von PerSeptive Biosystems entwickelten Voyager-Auswertungssoftware und ergab eine molekulare Masse von 15056,45 Da. Die experimentelle Masse des Fragments betrug 15040,91 Da, und unter Einbezug des statistischen Gerätefehlers konnte von einer fehlerfreien Synthese des Proteins ausgegangen werden.

5. Biochemische Analyse des APC129-250 Proteins

5.1 Analyse des Oligomerisierungsverhaltens des APC129-250 Proteins

Den Angaben der Literatur zufolge (Grodén *et al.* 1991; Kinzler *et al.* 1991) sind die ersten 900 Aminosäuren für die Oligomerisierung des APC-Proteins erforderlich. Nachdem das Oligomerisierungsverhalten von APC2-250 mit Hilfe von analytischen Gelfiltrationen studiert wurde, sollte auch das APC129-250 Proteinfragment hinsichtlich seines Oligomerisierungsverhaltens untersucht werden. Hierzu wurde ebenfalls sauberes APC129-250 Protein über eine S200 36/99 Gelfiltrationssäule mit 1x PBS und 1 mM DTE als Laufpuffer geleitet. Das Elutionsdiagramm zeigte nur ein Signal bei einem Elutionsvolumen von 738,05 ml (Abbildung 16). Mit Hilfe der Säulenkalibrierung konnte diesem Volumen eine Molekularmasse von 14,8 kDa zugeordnet werden. Dies entspricht im Rahmen der Kalibrierengenauigkeit der molekularen Masse von APC129-250. Das APC-Proteinfragment APC129-250 lag also als Monomer vor.

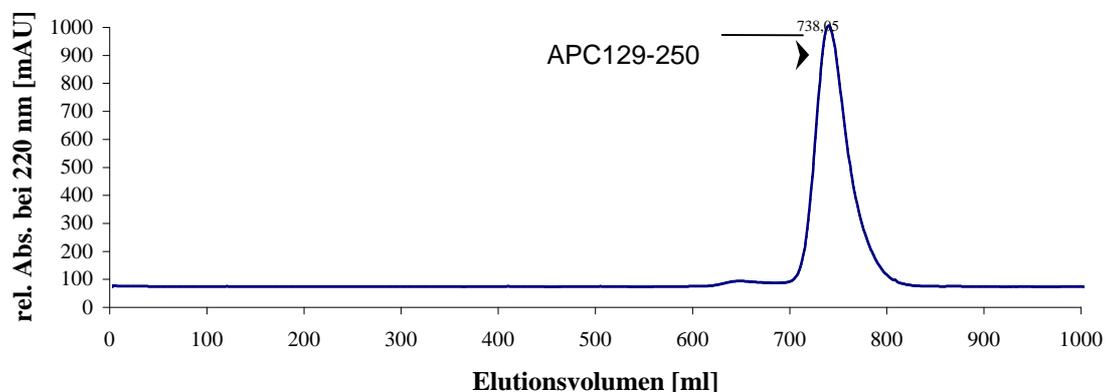


Abbildung 16: Elutionsdiagramm der Gelfiltration von APC129-250 zur Ermittlung des Oligomerisierungsverhaltens. Verwendet wurde eine S200 36/99 Gelfiltrationssäule. Es war nur ein Signal zu beobachten, das dem monomeren APC129-250 zugeordnet werden konnte.

5.2 Antikörpertest

Das tryptische Proteinfragment APC129-250 ist ein Teilfragment des ursprünglichen APC2-250 Proteins, so dass der gegen APC2-250 gerichtete Antikörper auch hinsichtlich seiner Sensitivität und Spezifität gegenüber APC129-250 getestet wurde. Der Test wurde dabei wie für APC2-250 beschrieben durchgeführt. Die Spezifität des Antikörpers war bei APC129-250 ebenfalls mit dem nach 80 Tagen gewonnenen Serum am deutlichsten und ergab das beste Resultat bei einer Serumverdünnung von 1:10.000 mit Inkubation bei 4°C über Nacht in fünfprozentigem Milchpulver in 1x PBS und 0,1 % Tween.

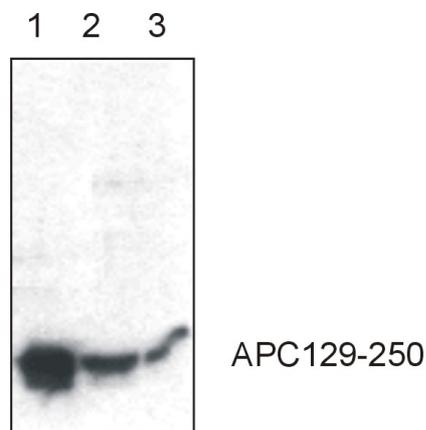


Abbildung 17: Test der Sensitivität des Serums eines mit APC2-250 immunisierten Kaninchens im Western-Blot. Die Verdünnung des Serums betrug 1:10.000. **1:** 100 ng reines APC129-250; **2:** 10 ng reines APC129-250; **3:** 5 ng reines APC129-250. Mit dem Antikörper war die Detektion von 5 ng APC129-250 noch gut möglich.

Die Sensitivität des Antikörpers wurde durch Einsatz verschiedener Konzentrationen APC129-250 getestet. Wie bei APC2-250 konnten noch 5 ng reines APC129-250 gut nachgewiesen werden. Der Antikörper konnte somit auch für den Nachweis von APC129-250 eingesetzt werden (siehe Interaktion mit Crm1) und hat dabei weder an Selektivität noch an Sensitivität verloren.

5.3 Stabilitätstest

Für das APC129-250 Proteinfragment wurde für weitere Kristallisationsversuche die Stabilität getestet. Der Stabilitätstest wurde mit sauberen APC129-250 Protein in 1x PBS mit 1 mM DTE bei 4°C und bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von zehn Tagen durchgeführt. APC129-250 war bei 4°C und bei Raumtemperatur über eine Zeitspanne von zwei Tagen stabil. Danach kam es zum allmählichen Abbau des Proteins bei Raumtemperatur, der sich in der Bildung eines kleineren Proteinfragments von etwa 12 kDa zeigte. Bei 4°C begann der Zerfall von APC129-250 zu diesem Fragment erst ab dem 13. Tag, während dieser

Abbau bei Raumtemperatur schon nach sechs Tagen vollständig war. Aufgrund der Beobachtung, dass das APC129-250 bei 4°C über einen längeren Zeitraum stabiler war als bei Raumtemperatur, wurden die folgenden Kristallisationsansätze bei 4°C durchgeführt.

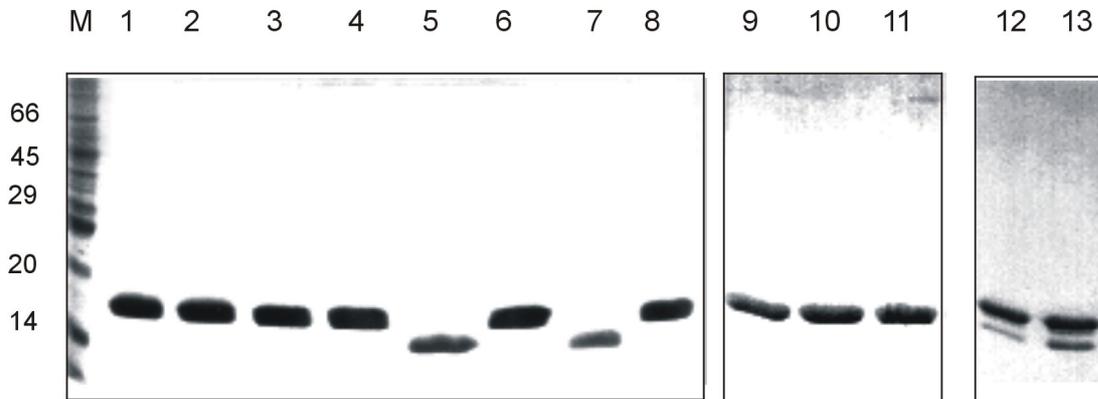


Abbildung 18: Stabilitätstest von APC129-250. M: SDS-7 Standard; 1: erster Tag Raumtemperatur 2: erster Tag 4°C 3: zweiter Tag Raumtemperatur 4: zweiter Tag 4°C 5: sechster Tag Raumtemperatur 6: sechster Tag 4°C 7: siebter Tag Raumtemperatur 8: siebter Tag 4°C 9 bis 11: achter, neunter und zehnter Tag 4°C 12: 13. Tag 4°C 13: 14. Tag 4°C. Auf der linken Seite sind die Größen ausgewählter Markerproteine in kDa angegeben.

6. Strukturelle Analyse des APC129-250 Proteins

6.1 Sekundär-Strukturanalyse von APC129-250 durch CD-Spektroskopie

Die Analyse der Sekundärstruktur erfolgte durch CD-Spektroskopie. Die Messung erfolgte mit einer 20 mikromolaren APC129-250 Proteinlösung in CD-Puffer bei 20°C über einen Wellenlängenbereich von 190 bis 250 nm bei zehnfacher Spektrenakkumulation. Die Analyse des Spektrums zeigte ein ausgeprägtes Doppelminimum bei 208 und 222 nm, das vorwiegend auf α -Helixstruktur hindeutet (Abbildung 19).

Die Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Faltungstabilität erfolgte durch schrittweise Erhöhung der Temperatur um 10 K bis zu einer Temperatur von 70°C. Bei höheren Temperaturen präzipitierte das Protein, so dass es zu einer deutlichen Signalverringerng kam.

Sowohl das APC2-250 als auch das APC129-250 Spektrum deuten auf einen hohen α -helikalen Anteil hin und stimmen im wesentlichen mit der Vorhersage des Sekundärstrukturprogramms überein. Interessanterweise ist das tryptische Fragment APC129-250 hitzestabiler als APC2-250. Das Spektrum von APC129-250 erfährt erst ab einer

Temperatur von 50°C bis 60°C eine drastische Signalabnahme. Damit denaturiert dieses Proteinfragment später als vergleichsweise das APC2-250 Proteinfragment bei 40°C.

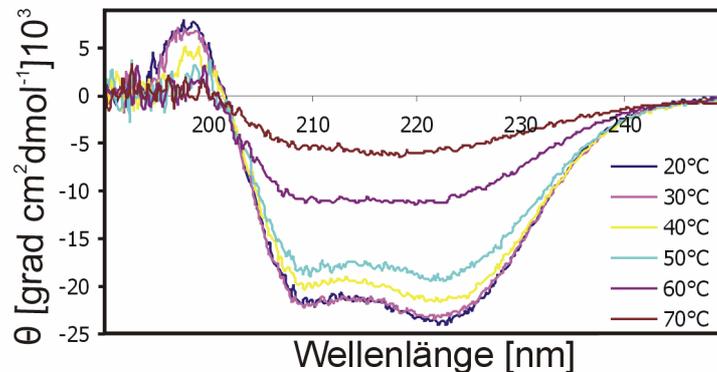


Abbildung 19: CD-Spektrum von APC129-250 bei verschiedenen Temperaturen. Die Proteinkonzentration betrug 20 μM . Die Denaturierung des APC129-250 Proteins setzte bei einer Temperatur zwischen 50°C und 60°C ein und wird durch einen starken Signalverlust im Spektrum deutlich. Das Protein präzipitierte bei 70°C.

6.2 Kristallisation

Das zu 99 % reine APC129-250 Protein wurde aufgrund seiner guten Stabilität bei 4°C für Kristallisationsversuche eingesetzt. Das breite Screening erfolgte unter Einsatz von „Crystal screen formulation“, „Crystal screen 2 formulation“, „Sodium/potassium formulation“ und „Peg/ion screen formulation“ (Hampton Research) bei 4°C, einer Proteinkonzentration von 20 mg/ml und einem Mischverhältnis von 1:1 (1 μl Protein/1 μl Puffer). Bei dieser Vielzahl von Puffern konnten im Puffer 11 (20 % PEG 3350, 200 mM KI) des „Peg/ion screen formulation“ nach drei Tagen Mikrokristalle beobachtet werden, deren Wachstum nach fünf Tagen abgeschlossen war. Durch die Verbesserung der Kristallisationsbedingungen (pH-Wert, Proteinkonzentration, PEG 3350-Konzentrationen, Salzkonzentrationen) sowie die Durchführung eines Additive Screens (Hampton Research) konnten größere Kristalle hergestellt werden. Die besten Wachstumsbedingungen ergaben sich bei 100 mM KI, 20 % PEG 3350, 10 mM SrCl_2 ohne pH-Einstellung und mit einer Proteinkonzentration von 20 mg/ml. Trotz der schlechteren Stabilität des Proteins bei höheren Temperaturen als 4°C wurden nun auch Ansätze bei 12°C und 20°C hergestellt, die zu deutlich besseren Ergebnissen führten. Bei 12°C konnten sehr regelmäßige, hexagonale Kristalle mit einer Größe von 250 μm x 50 μm x 50 μm unter den oben genannten Bedingungen mit einer

Proteinkonzentration von 30 mg/ml erhalten werden, die für die Röntgenstrukturanalyse geeignet waren.

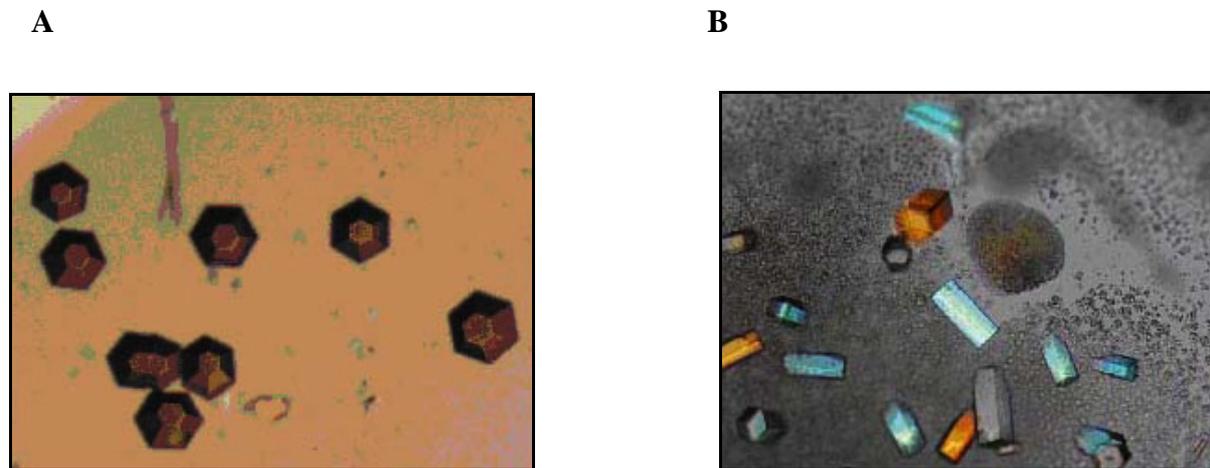


Abbildung 20: Kristalle von APC129-250. A: Hexagonale Kristalle mit einer Größe von $300\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$, die unter hohen Kaliumiodid-Konzentrationen (550 mM KI; 20 % PEG 3350; 10 mM SrCl_2) entstanden. Diese Kristalle zeigten keine gute Auflösung im Streuexperiment ($> 8\ \text{\AA}$). B: Hexagonale Proteinkristalle ($250\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$), die unter niedrigen KI-Konzentrationen (100 mM KI; 20 % PEG 3350; 10 mM SrCl_2) wuchsen. Diese Kristalle zeigten am Synchrotron ein Diffraktionsmuster mit etwa $2\ \text{\AA}$ Auflösung.

Bei höheren Kaliumiodid-Konzentrationen (550 mM) konnte das Wachstum sehr großer Kristalle ($300\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$) beobachtet werden (Abbildung 20A). Der Streustest zeigte jedoch nur eine Auflösung von etwa $8\ \text{\AA}$, was auf eine schlechtere Ordnung der Proteinmoleküle im Kristall hindeutete. Für weitere Messungen wurden daher die Kristalle eingesetzt, die mit niedrigeren Kaliumiodid-Konzentrationen wuchsen (Abbildung 20B). Diese Kristalle zeigten ein Diffraktionsmuster mit bis zu $2\ \text{\AA}$ Auflösung am Synchrotron.

6.3 Herstellung von Kristallen einer L-Seleno-Methionin substituierten Mutante von APC129-250

Zur Lösung des Phasenproblems wurde eine mit L-Seleno-Methionin substituierte Mutante von APC129-250 exprimiert. Innerhalb der Aminosäuresequenz von APC129-250 befinden sich drei Methionine, die im zentralen Teil des Proteinfragments lokalisiert sind. Das Derivat wurde nach dem Expressionsprotokoll für das native APC129-250 Protein in L-Methionin auxotrophen DL41 Bakterienzellen exprimiert, wobei zuvor sukzessiv eine Anpassung des Mediums von L-Methionin auf L-Selenono-Methionin erfolgte. Die anschließende affinitätschromatographische Reinigung ergab dieselben Ergebnisse wie bei der gewöhnlichen Präparation des nativen APC129-250. Das Protein zeigte zudem dasselbe Verhalten bei der

weiteren Reinigung mittels PreScissionTM-Protease und erneuter Affinitätschromatographischer Reinigung über die GSH-Sepharose-Säule. Nach der Gelfiltration lag das Seleno-Methionin-APC129-250 in gleicher Reinheit wie das native APC129-250 vor und wurde für Kristallisationsversuche verwendet. Zusätzlich wurde das Derivat auf den erfolgreichen Ersatz aller drei Methionine durch Seleno-Methionin mit MALDI-TOF-MS positiv überprüft. Ausgehend von den verbesserten Kristallisationsbedingungen für APC129-250 wurde für die Seleno-Methionin-Mutante unter denselben Bedingungen Kristallisationsansätze angesetzt. Nach zwei Tagen bildeten sich hexagonale Kristalle mit einer Länge von etwa 150 μm x 50 μm x 50 μm . Der Streutest dieser Kristalle erbrachte eine Auflösung von etwa 2,4 \AA mittels Synchrotronstrahlung. Weitere Versuche wurden bei 20°C durchgeführt. Unter den Bedingungen 100 mM KI, 14 % PEG 3350, 10 mM SrCl₂ ohne pH-Einstellung und mit einer Proteinkonzentration von 30 mg/ml wuchsen sehr regelmäßige, hexagonale Kristalle der Größe 300 μm x 200 μm x 200 μm .

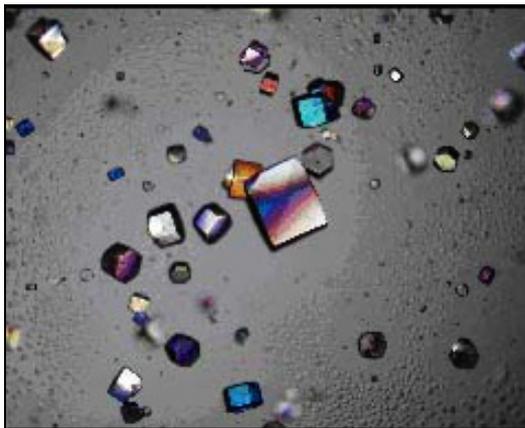


Abbildung 21: Kristalle von Seleno-Methionin substituiertem APC129-250 bei 1000facher Vergrößerung. Die regelmäßigen, hexagonalen Kristalle wurden bei 20°C in dem Puffer 100 mM KI, 14 % PEG 3350, 10 mM SrCl₂ erhalten. Die Kristalle waren bis zu 300 μm x 200 μm x 200 μm groß.

6.4 Ermittlung von Kryobedingungen

Kryobedingungen dienen zum Schutz des Kristalls bei einer längeren Bestrahlungszeit. Den optimierten Kristallisationspuffern wurde Glycerin, Ethylenglycol oder PEG 400 (10, 15, 20, 25 und 30 %) zugesetzt und die Eignung als Kryomittel durch Schockgefrierung in einem Stickstoffstrom (100 K) und anschließender Röntgenbestrahlung getestet. Bei diesen Kryomitteln kam es allerdings zu Kristallbrüchen und einer Verschlechterung der kristallinen Ordnung. Eine deutliche Verbesserung brachte der Zusatz von 10 % Xylitol und 5 % Sucrose sowie der Verzicht auf Salze. Ein sauberes Diffraktionsmuster mit einer Auflösung von 2,5 \AA (am Synchrotron) konnte in dem salzfreien Kryomittel aus 20 % PEG, 10 % Xylitol, sowie

5 % Sucrose gewonnen werden. Für die Messung mit Synchrotronstrahlung wurden sowohl native APC129-250-Kristalle als auch Seleno-Methionin substituierte APC129-250- Kristalle schockgefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

6.5 Strukturaufklärung

Die eingefrorenen Kristalle wurden zur Datensammlung zur European Synchrotron Radiation Facility (ESFR, Grenoble, Frankreich) geschickt. Sowohl der native als auch der derivatisierte Datensatz für APC129-250 wurden an der Beamline ID14-1 bei 100 K und einer Wellenlänge von 0,934 Å an einem MAR CCD Detektor bis zu einer Auflösung von 2.0 Å (nativ) beziehungsweise 2.5 Å (Seleno-Methionin, zwei Datensätze) aufgenommen. Zur Indizierung und zur Bestimmung der Größe der Einheitszelle sowie der Bestimmung der Symmetrie des Kristalls wurden XDS und zur Skalierung XSCALE verwendet (Kabsch, 1993). Die Kristalle gehören zur trigonalen Raumgruppe $P3_21$ mit den Zellabmessungen $a = b = 46,059$ Å; $c = 113,384$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$. In der asymmetrischen Einheit befindet sich ein Molekül APC129-250. Die Positionen der drei Seleno-Methionine wurden mit Hilfe von SOLVE (Terwilliger *et al.*, 1999) gefunden und die zur Berechnung der Elektronendichtekarte benötigte Phaseninformation mit Hilfe der SAD-Methode (Single-wavelength Anomalous Diffraction) und CNS (Brünger *et al.*, 1998) ermittelt. Die aus den kalkulierten Phasen berechnete Elektronendichtekarte wurde an einer SGI Indigo 2 (Silicon Graphics, Mountain View, CA, USA) mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1997) interpretiert. Dabei wurde zunächst ein Polyalanin-Helix-Rückgrat in die Elektronendichtekarte eingebaut, und anschließend die einzelnen Aminosäuren in die APC129-250 Aminosäuresequenz geändert. Die Daten zur kristallographischen Statistik sowie zur Verfeinerung sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Datensammlung von nativen und Seleno-Methionin Kristallen

	<i>native</i>	<i>Se-met</i>
Raumgruppe	P3 ₂ 21	P3 ₂ 21
Elementarzelle	a = b = 46.1 Å c = 113.3 Å α = β = 90° γ = 120°	a = b = 46.2 Å c = 112.3 Å α = β = 90° γ = 120°
Auflösung	40 - 2.0 Å	30 - 2.5 Å
Zahl der Reflexe	65629	56396
Zahl der unabhängigen Reflexe	9685	9218
Vollständigkeit	98.6 % (98.8 %)	96.1 % (71.5 %)
I/σ	18.8 (6.3)	27.9 (12.2)
R _{merge} †	6.7 %	5.5 %
Verfeinerung		Phasenstatistik
Auflösung (Å)	20.0 - 2.0	
		FOM nach SOLVE: 0.34
Reflexe	10548	(3 Selenatome, 2.5 Å Auflösung)
R _{crys} *	25.7 %	
R _{free}	30.9 %	Phasing power+ SAD:
		2.16 (zentrisch)
Model		1.93 (azentrisch)
Nicht-Wasserstoff-Atome:		
Anzahl der Proteinatome	885	FOM nach SAD mit CNS: 0.4
Anzahl der Wassermoleküle	56	
Standardabweichung von der idealen Geometrie:		FOM nach Dichtemodifikation mit CNS: 0.91
Bindungslänge (Å)	0.008	
Bindungswinkel (deg)	1.0	
B-Faktor-Mittelwert (Å ²)	42.8	

†R_{merge} = $\sum hkl(i |I_i - \langle I \rangle|) / \sum hkl(i \langle I \rangle)$, wobei I_i die Intensität für die i-te Messung eines äquivalenten Reflexes mit den Indices h, k, l darstellt.

*R_{crys} = $\sum hkl ||F_{obs}| - |F_{calc}| / \sum hkl ||F_{obs}|$, wobei F_{obs} die beobachtete Struktur-Amplitude darstellt und F_{calc} die aus dem Modell berechnete Strukturfaktor-Amplitude. 10 % der Reflexe werden für die Berechnung von R_{free} verwendet.

+FOM: Figure of merit, Phasing power: wie in CNS definiert

Zahlen in Klammern enthalten die entsprechenden Werte für die Schale mit der höchsten Auflösung, 2.1 - 2.0 Å für den nativen Datensatz und 2.5 - 2.4 Å für den Datensatz des Selen-Methionin Proteins.

Das endgültige Modell hat ausgezeichnete Geometrien mit $R_{\text{cryst}} = 25,7 \%$ oder $R_{\text{free}} = 30,9 \%$ und beinhaltet die Aminosäurereste 130 bis 173 und 179 bis 239. Da keine Anzeichen für eventuell vorhandene Pseudosymmetrie oder Probleme mit dem Kristallgitter auftauchten, ist der hohe R_{free} -Faktor höchstwahrscheinlich auf die ungeordneten Regionen zurückzuführen. Von den 122 Aminosäureresten sind 17 nicht zu sehen, was immerhin 14 % der Gesamtstruktur ausmacht. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Struktur richtig verfeinert wurde. Die sehr gute experimentelle Elektronendichte bestärkt diese Annahme.

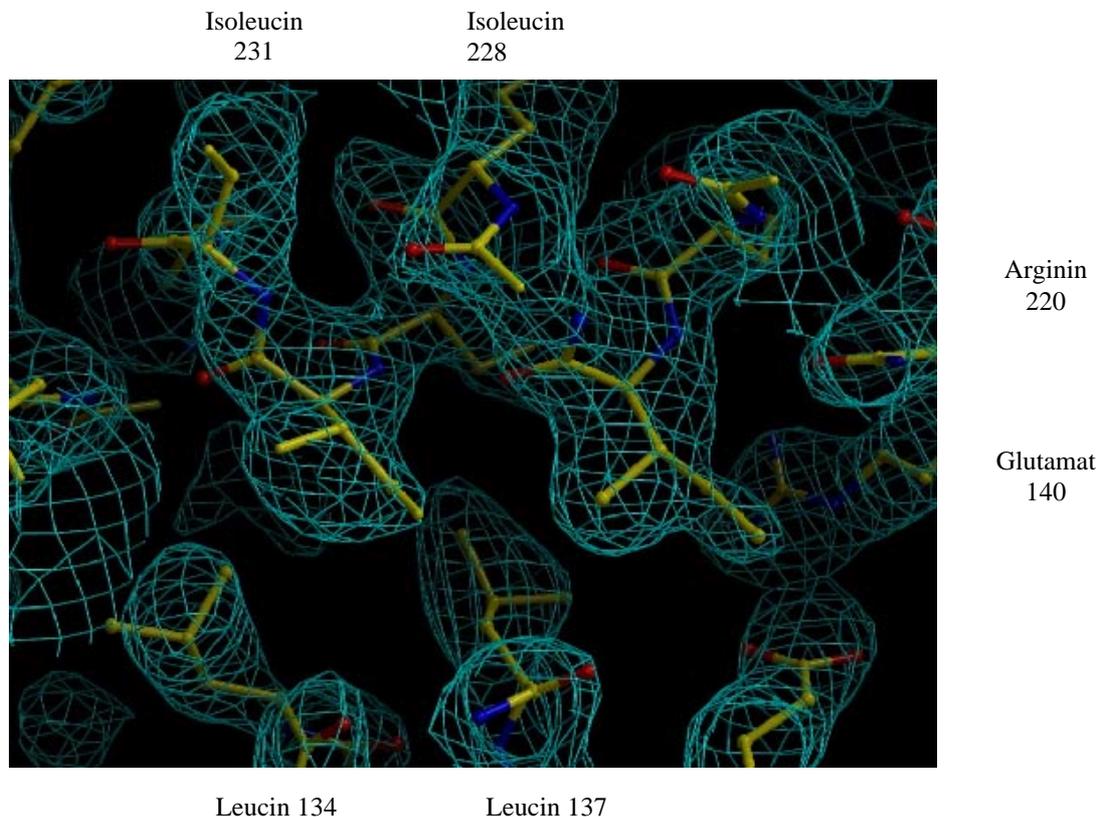


Abbildung 22: Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte. Dargestellt sind die Aminosäurereste Isoleucin 228, Isoleucin 231, Leucin 134 und Leucin 137. Arginin 220 verbindet eine Salzbrücke mit dem Glutamat 140.

In Abbildung 22 ist ein Ausschnitt der experimentellen Elektronendichtekarte des APC129-250 gezeigt, in der man die deutliche Dichte für das Rückgrat und die Seitenketten sieht. Die

Qualität der Daten und die gute Auflösung von 2.0 Å spiegeln sich in der experimentellen Elektronendichtekarte wider.

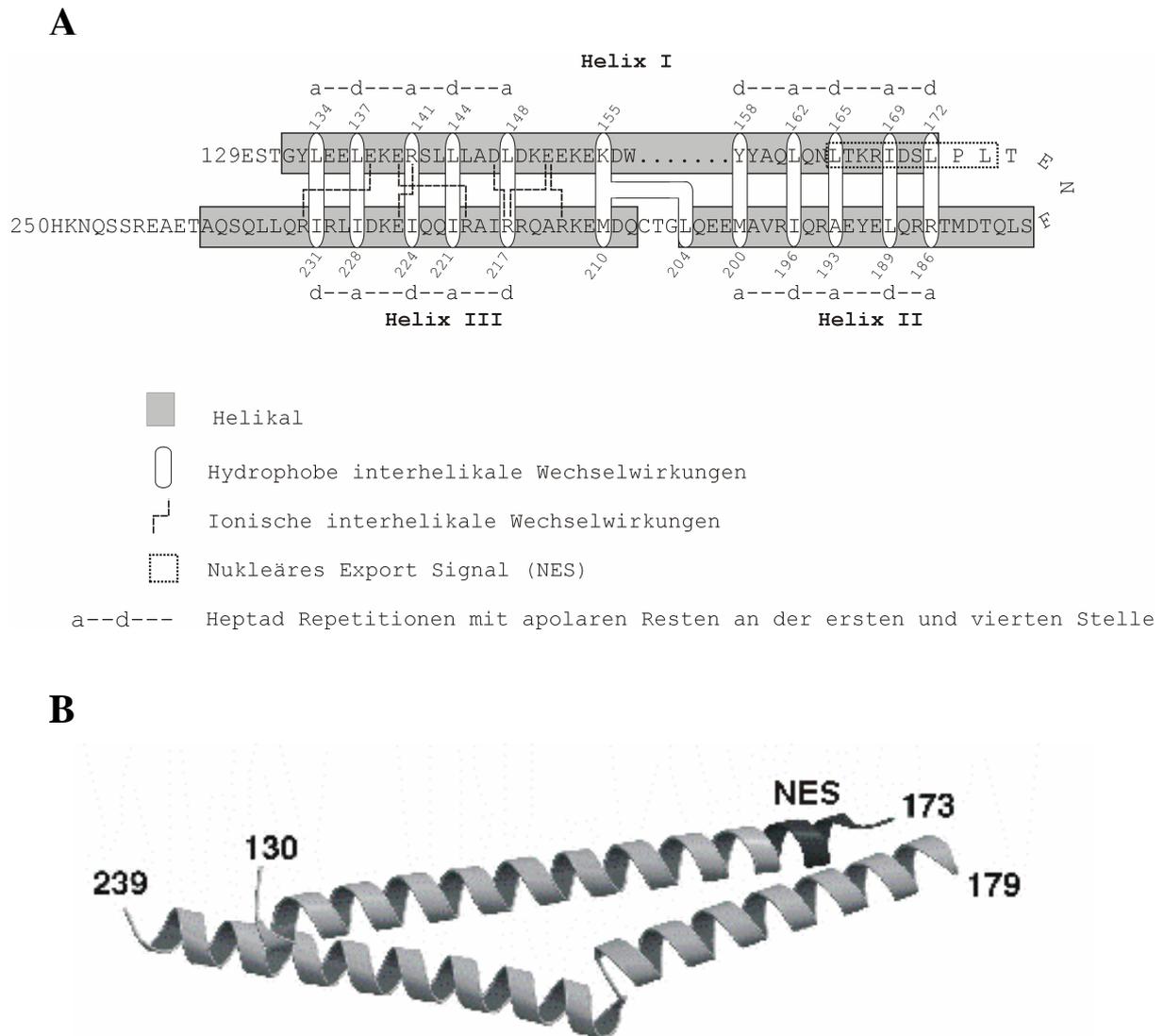


Abbildung 23A: Aminosäuresequenz, strukturelle Bereiche und interhelikale Wechselwirkungen des APC129-250. Die helikalen Bereiche sind grau dargestellt und von I bis III nummeriert. Helix I bildet antiparallele Coiled coils mit den Helices II und III. Die charakteristischen Heptad Repetitionen sind gezeigt. Die apolaren Reste an der ersten (a) und vierten (d) Position bilden die hydrophoben interhelikalen Interaktionen. Ausgewählte hydrophobe Interaktionen sind in offenen Ellipsen gezeigt. Gestrichelte Linien repräsentieren die ionischen Wechselwirkungen, wobei keine zwischen den Helices I und III vorhanden sind. Das NES-Motiv von den Aminosäuren 165 bis 174 ist durch ein gepunktetes Rechteck angedeutet. **B: Struktur der Aminosäuren 129 bis 250 des APC-Proteins als Ribbon-Diagramm.** Das NES(165-174) ist dunkelgrau dargestellt.

Neunundneunzig der 122 Aminosäuren des APC129-250 sind in drei α -Helices organisiert (Abbildung 23): Helix I von Aminosäure 132 bis 171, Helix II von Aminosäure 180 bis 204 und Helix III von Aminosäure 207 bis 238. Dabei formen die drei Helices zwei separate antiparallele Coiled coils. Die erste Coiled coil formiert sich durch die Aminosäuren 134 bis 148 der Helix I und den Aminosäuren 217 bis 231 der Helix III. Die zweite Coiled coil hingegen wird durch Aminosäure 158 bis 172 der Helix I und Aminosäure 186 bis 200 der Helix II gebildet. Die Helices interagieren miteinander durch apolare Reste an den Positionen a und d der Heptad-Repetitionen (abcdefg)_n, welche ein allgemeines Motiv innerhalb von Coiled coil Strukturen darstellen (Lupas *et al.*, 1996; Burkhard *et al.*, 2001). Zusätzlich zu den apolaren interhelikalen Interaktionen gibt es ionische interhelikale Wechselwirkungen zwischen geladenen Resten der Helix I und III. Interessanterweise sind keine ionische Wechselwirkungen innerhalb der zweiten Coiled coil Region vorhanden, was auf eine schwächere oder unspezifischere Interaktion der Helices I und II verglichen mit den Helices I und III deuten könnte. Desweiteren lässt der höhere B-Faktor in der zweiten Coiled coil Region, in der die NES165-174 lokalisiert ist, verglichen mit den B-Faktoren der restlichen Helices ebenfalls auf eine höhere Flexibilität dieser Region schließen. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Region um die NES zugänglicher für mögliche Interaktionspartner ist, so dass die Coiled Coil Struktur hier durch eine Bindung an das NES-Motiv gelockert wird.

Ein weiteres Charakteristikum der APC129-250 Struktur ist die Bildung eines hydrophilen Zentrums durch die Anordnung der drei Helices untereinander (Abbildung 24). Diese Region ist durch die Aminosäuren 147 bis 155 und den Aminosäuren 210 bis 217 eingegrenzt sowie durch die hydrophoben Wechselwirkungen der Reste Arginin 217/Leucin 148 und Lysin 155/Methionin 210. Das Zentrum ist mit einem Wassermolekül gefüllt, und die geladenen Seitenreste Glutamat 151, Lysin 155, Arginin 213 und Arginin 217 zeigen in diese Region hinein.

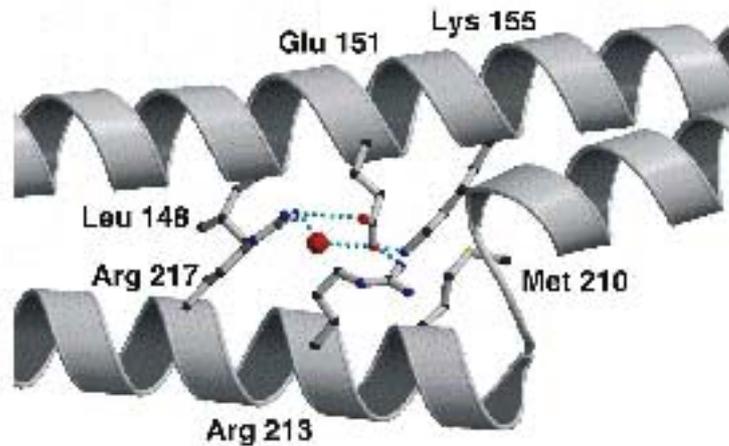


Abbildung 24: Die drei Helices bilden ein hydrophiles Zentrum. Repräsentative Aminosäuren und ihre Wechselwirkungen sind gezeigt. Die Position des Wassermoleküls ist als roter Ball dargestellt.

7. Interaktionspartner von APC129-250

Für das APC-Protein konnte sowohl die Lokalisation im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden (Neufeld *et al.*, 1997). Aufgrund seiner Lokalisation im Nukleus wird vermutet, dass APC für den Transport von β -Catenin zwischen Zellkern und Zytoplasma verantwortlich ist (Henderson 2000). Behandlung von Zellen mit dem Crm1-spezifischen Export-Inhibitor Leptomycin B führten zu einer nukleären Akkumulation des APC-Proteins und β -Catenin (Rosin-Arbesfeld *et al.*, 2000). Das APC-Protein enthält einige Leucin-reiche Motive, die als nukleäre Export Signale agieren und möglicherweise direkt mit Crm1 interagieren können (Neufeld *et al.*, 2000). Aminosäure-Sequenzanalysen des N-Terminus von APC ergaben zwei aktive nukleäre Export Signale (NES) mit einem Konsensus-Motiv LXXLXL/I/M/V in den Aminosäuren 68 bis 77 und 165 bis 174. In weiteren Experimenten wurden die Aminosäuresequenzen, die dem NES(68-77) und dem NES(165-174) des APC-Proteins entsprechen, auf Peptidebene an das Indikatorprotein GFP (green fluorescence protein) fusioniert und in transfizierten Zellen auf ihre nukleäre Transportfähigkeit getestet. Das NES(68-77) des APC-Proteins war aktiv, während das NES(165-174) eine schwache Aktivität aufwies, die wiederum mit der NES-Aktivität des p53-Proteins vergleichbar war (Neufeld *et al.*, 2000; Henderson *et al.*, 2000).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das in der Struktur von APC129-250 enthaltene NES(165-174) funktionell ist. Die Struktur von APC129-250 enthält in den Aminosäuren 165 bis 174 eine der beiden N-terminalen NES-Motive. Die oben beschriebenen Experimente bezüglich des Transportes von APC aus dem Zellkern wurden in Zellkulturversuchen unternommen. In dieser Arbeit soll daher die direkte Interaktion von APC129-250 mit dem Exportin Crm1 untersucht werden sowie der Einfluss der kleinen GTPase Ran, die in anderen Beispielen eine große Rolle bei der Interaktion von Crm1 mit NES-haltigen Proteinen spielte (Lee *et al.* 2001).

7.1 Expression, Reinigung und Nachweis von Crm1

Das Konstrukt Crm1pQE-60 wurde freundlicherweise von Ludwig Englmeier (ZMBH Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Mit der vektorkodierenden DNA wird dem exprimierten Protein eine Sequenz von sechs Histidinen am C-Terminus am Ende der Translations angefügt. Daher kann man das exprimierte Crm1-Protein affinitätschromatographisch über eine Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule reinigen. Nach Optimierung der Expressionsbedingungen wurde der mit dem Konstrukt Crm1pQE-60 transformierte Expressionsstamm BL21 bis zu einer relativen Absorption bei 600 nm von 0,8 kultiviert, um dann die Expression von Crm1 durch Zugabe von 0,05 mM IPTG über Nacht bei 30°C zu induzieren. Die Bakterien wurden sedimentiert und der Ultraschallaufschluss mit der in modifizierten Ni²⁺-Bindungspuffer (20 mM Tris, 0,6 M NaCl, 2,5 mM Imidazol, 10 % Glycerin, 3 mM beta-Mercaptoethanol, pH 7,9) suspendierten Zellen durchgeführt. Zelltrümmer und unlösliche Proteinbestandteile wurden bei 4°C und 17000 rpm sedimentiert und der Überstand mit den löslichen Proteinen über eine Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule geleitet. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit Ni²⁺-Waschpuffer (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol, 3 mM Mercaptoethanol, pH 7,9) entfernt. Anschließend wurde das Crm1-Protein mit Ni²⁺-Elutionspuffer (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 3 mM Mercaptoethanol, pH 7,9) in Fraktionen eluiert und in einer SDS-Gelelektrophorese die Anwesenheit des Crm1-Proteins mit einem erwarteten Molekulargewicht von etwa 120 kDa positiv überprüft.

7.2 Präzipitations-Experimente zum Nachweis der Interaktion zwischen Crm1 und APC129-250

Mit Hilfe von Präzipitations-Experimenten sollte die direkte Interaktion von APC129-250 und Crm1 untersucht werden. Zusätzlich sollte der Einfluss von RanGTP auf diese Interaktion

überprüft werden. Außerdem sollte analysiert werden, ob die Doppelmutante APCL189A/I196A ein anderes Bindungsverhalten zeigt. Das Protein RanGTP sowie die inaktive Form RanGDP wurde freundlicherweise von Michael Seewald zur Verfügung gestellt. Die Doppelmutante APCL189A/I196A wurde ausgehend von dem APC129-250 Konstrukt mit Hilfe der Quikchange PCR hergestellt und analog zum APC129-250 Protein in *E.coli* exprimiert und gereinigt. Hierfür wurde die gesamte Vektor DNA pGEX-6P-2/APC129-250 durch die *TurboPfu*-Polymerase amplifiziert, und durch die Anlagerung der mutationstragenden Primer der Basenaustausch insertiert (TTG → **GCG** für das Leucin an Position 189; ATC → **GCC** für das Isoleucin an Position 196). Die Herstellung der Doppelmutante diente der Untersuchung der Abhängigkeit von Konformationsänderungen des APC129-250 Proteins bezüglich der Bindung an Crm1. Die Aminosäurereste Leucin 189 und Isoleucin 196 befinden sich direkt gegenüber dem NES(165-174) (Abbildung 23A) und bilden hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Isoleucin 169 und Leucin 162 aus, was letztendlich die Coiled coil Struktur ausmacht. Durch den Austausch der hydrophoben Reste zu Alanin werden die Wechselwirkungen verhindert, so dass die Coiled coil Struktur gelockert oder eventuell ganz gelöst wird. Folglich sind die konservierten Leucinreste des NES(165-174) nicht mehr in der Coiled coil vergraben sondern freier zugänglich, was sich in einer besseren Bindung an Crm1 auswirken könnte.

Für die Präzipitations-Experimente wurden 2 µg His-markiertes Crm1 Protein eine Stunde bei 4°C im Ni²⁺- Lysepuffer mit magnetischer Ni²⁺-NTA-Agarose (20 mM Tris, 0,6 M NaCl, 2,5 mM Imidazol, 10 % Glycerin, 3 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,9) inkubiert. Anschließend wurden jeweils 3 µg APC129-250, APCL189A/I196A, RanGDP oder RanGTP für eine weitere Stunde hinzugegeben. Alle Ansätze wurden dann mehrmals mit Ni²⁺-Waschpuffer (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol, 3 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,9) gewaschen, bevor die magnetische Ni²⁺-NTA-Agarose in Ni²⁺- Elutionspuffer (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 3 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,9) aufgenommen und mit 5x SDS-Ladepuffer aufgekocht wurden. Alle Ansätze wurden gelelektrophoretisch getrennt und geblottet. Die Menge an ko-präzipitiertem APC-Protein wurde mit Hilfe des neuen polyklonalen APC2-250 Antikörpers bestimmt (Abbildung 25A). Die anderen Proteine wurden direkt auf der PVDF-Membran mit Ponceau-Rot detektiert. Zusätzlich wurden die Intensitäten der APC-Proteinbanden mit Hilfe des AIDA-Programms ausgewertet und die Ergebnisse als Säulendiagramm dargestellt (Abbildung 25B).

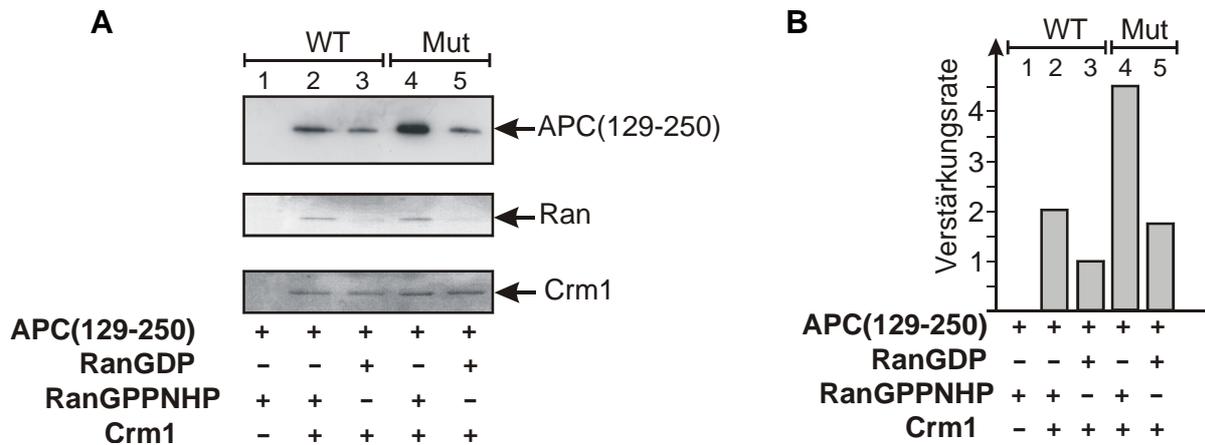


Abbildung 25: Die Interaktion zwischen APC129-250 und Crm1 wird durch aktives Ran sowie durch die APCL189A/I196A Doppelmutante, in der die Maskierung der NES(165-174) aufgehoben wird, verstärkt. **A:** Western-Blot von mit Crm1 ko-präzipitiertem APC-Protein (oberste Reihe). Entweder APC129-250 (Spuren eins bis drei) oder die Doppelmutante APCL189A/I196A (Spuren vier und fünf) wurden mit sauberem His-markiertem Crm1 inkubiert (Spuren zwei bis fünf), mit RanGDP (Spuren drei und fünf) oder mit konstitutiv aktivem RanGPPNHP (Spuren zwei und vier). Nach der Präzipitation mit magnetischer Ni²⁺-NTA-Agarose wurde das Pellet per Western-Blot mit dem polyklonalen anti APC2-250 detektiert. In Anwesenheit von aktivem Ran erhöht sich die Menge an ko-präzipitierten APC129-250 (Spur zwei) sowie an APCL189A/I196A (Spur vier). Diese Ergebnisse deuten auf eine Trennung der Coiled coil hin und auf eine mögliche Demaskierung der NES(165-174)-Sequenz durch die Bindung von Crm1 und aktivem Ran. Mittlere und untere Reihe: Die Anwesenheit von vergleichbaren Mengen von Crm1 und Ran wurde durch die Intensitäten der Ponceau-Rot gefärbten Banden auf der PVFD-Membran verglichen. Nur aktives Ran präzipitiert mit Crm1, daher ist RanGDP in den Spuren drei und fünf nicht sichtbar. **B:** Quantitatives Säulendiagramm, das die Ergebnisse von A darstellt. Die Menge an APC129-250 mit RanGDP wurde gleich eins gesetzt (Säule drei). Durch die Zugabe von aktivem Ran erhöht sich diese Menge um das zweifache (Säule zwei), und die Menge der Doppelmutante APCL189A/I196A wird sogar um das vierfache erhöht (Säule vier).

Die Ergebnisse der Präzipitations-Experimente zeigen, dass APC129-250 direkt mit Crm1 interagiert und ko-präzipitiert (Abbildung 25, Spur drei). Die Anwesenheit von inaktivem Ran hat wie erwartet keinen Einfluss. RanGDP ko-präzipitiert nicht mit Crm1, da es nicht effektiv an Crm1 bindet. Im Gegensatz dazu bindet das aktive Ran an Crm1 (Spuren zwei und vier) und verstärkt auch die Bindung von APC129-250 an Crm1 um etwa das Zweifache. Diese Beobachtung gilt auch für die Doppelmutante APCL189A/I196A (Spuren vier und fünf). Der Austausch der zwei hydrophoben Reste zu Alanin bewirkt offenbar eine bessere Bindung an Crm1, die ihrerseits nochmals durch die Zugabe von RanGTP verstärkt wird. Dies ist im Vergleich zu APC129-250 ohne RanGTP sogar eine vierfache Verstärkung.

B. Interaktion von APC mit β -Catenin

Ein wichtiger Bindungspartner des APC-Proteins ist das Protein β -Catenin (Su *et al.*, 1993; Rubinfeld *et al.*, 1993). Wie in der Einleitung beschrieben, ist β -Catenin sowohl ein strukturelles Protein in Zelladhäsionskomplexen (Ozawa *et al.*, 1989) als auch eine wichtige Komponente bei der Regulation des Wnt-Signalwegs mit APC als Bindungspartner (Rubinfeld *et al.*, 1996). Entscheidend hierfür sind die 20-Aminosäure-Repetitionen des APC-Proteins, da durch diese Bindung β -Catenin durch die GSK3 β phosphoryliert werden kann und anschließend in dem Proteasom abgebaut wird. Fehlen mehrere dieser 20-Aminosäure-Repetitionen durch Mutationen im APC-Gen, wird β -Catenin nicht oder nicht ausreichend gebunden. Dadurch akkumuliert β -Catenin im Zytoplasma, gelangt in den Zellkern und aktiviert dort Zielgene für die Zellproliferation. Die ausreichende Affinität von β -Catenin zu APC ist daher eine Voraussetzung für eine korrekte Regulation des Wnt-Signalwegs.

In der vorliegenden Arbeit wurde für einige der 20-Aminosäure-Repetitionen des APC-Proteins die Affinität zu β -Catenin untersucht (B.1). Es sollte festgestellt werden, ob eine 20-Aminosäure-Repetition des APC-Proteins *in vitro* für die β -Catenin-Bindung ausreichend ist und ob mehrere 20-Aminosäure-Repetitionen gleichzeitig mehrere β -Catenine binden können. Im Falle einer einzelnen 20-Aminosäure-Repetition sollte zudem untersucht werden, ob die Affinität zu β -Catenin durch Ersetzen eines konservierten Serins zu Aspartat (Phospho-Serin-Simulierung) verändert wird (Casanova *et al.*, 1990).

Durch N-terminale Mutationen in der konservierten Phosphorylierungssequenz für GSK3 β im β -Catenin kommt es ebenfalls zu einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalwegs (Pai *et al.*, 1997). Daher könnte man vermuten, dass die Bindung zwischen APC und β -Catenin auch durch N-terminale Mutationen seitens des β -Catenins beeinflusst wird. Zur Klärung dieser Frage wurde im zweiten Teil (B.2) die Bindung einer einzelnen 20-Aminosäure-Repetition an β -Catenin-Mutanten analysiert. Hierbei sollte geklärt werden, ob die Deletionsmutation des konservierten Serins (β -CateninS45 Δ) im Vergleich zum β -Catenin-Wildtyp eine Veränderung in der Affinität zum APC bewirkt. Da dieses Serin ebenfalls von der Serin/Threonin Kinase GSK3 β phosphoryliert werden kann, wurde dieses Serin zum Aspartat mutiert (β -CateninS45D), um weiterhin zu analysieren, ob die Phospho-Serin-Simulierung einen Einfluss auf die Bindungsaffinität zum APC-Protein hat.

1. Reinigung von APC-Proteinfragmenten aus der APC-b-Catenin-Bindungsregion sowie der Armadillo-Region des b-Catenins

Die für die jeweiligen APC-Fragmente kodierenden Genabschnitte des APC-Gens und die kodierte Aminosäuren sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die jeweiligen β -Catenin Bindungsmotive des APC-Proteins, deren Anzahl und Molekulargewicht sind ebenfalls angegeben.

Bezeichnung nach Codon	Anzahl der Repetitionen	Anzahl der Aminosäuren	Molekulargewicht in kDa
APC1340 –1429	2.	90	9,8
APC1340 – 1536	2. + 3.	197	21,3
APC1449 – 1536	3.	88	10
APC1537 – 1701	4.	165	18,5
APC1449 - 1701	3. + 4.	253	28
APCS1505D	3.	88	10
APCS1507D	3.	88	10

Tabelle 3: Übersicht der APC-Konstrukte mit b-Catenin Bindungsmotiven.

Alle Genfragmente wurden in den Vektor pGEX-6P-2 ligiert und die rekombinanten Vektoren in den *E.coli*-Expressionsstamm BL21 transformiert. Mittels *in vitro*-Mutagenese wurden zwei weitere Konstrukte ausgehend vom APC1449-1536 erstellt, die im dritten Bindungsmotiv aus 20 Aminosäuren jeweils einen konservierten Serin-Rest zu Aspartat mutiert enthielten. Es handelt sich hierbei um die Aminosäuren 1505 und 1507 (APCS1505D und APCS1507D). Für die Herstellung dieser Konstrukte wurde die gesamte Vektor-DNA des pGEX-6P-2/APC1449-1536 in der PCR durch die *TurboPfu*-Polymerase amplifiziert, und durch die Anlagerung der mutationstragenden Primer der Basenaustausch inseriert (**AGC** → **GAC** bei APCS1505D; **AGT** → **GAT** bei APCS1507D). Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz zwei Stunden mit dem DpnI-Enzym bei 37°C inkubiert, um somit die methylierte Wildtyp-DNA des Ausgangsvektors zu spalten. Die übrige Vektor DNA der pGEX-6P-2/APCS1505D und pGEX-6P-2/APCS1507D Konstrukte wurde in *E.coli* TG1-Zellen transformiert und die erhaltenen Klone durch Sequenzier-PCR auf das Vorhandensein der Mutationen untersucht.

Die rekombinante Synthese der APC-Konstrukte erfolgte nun durch Kultivierung des rekombinanten *E.coli*-Stammes BL21 im Ampicillin-haltigem LB-Medium. Die Bakterien wurden bei 37°C bis zu einer relativen Absorption bei 600 nm von 0,8 kultiviert, und die Synthese der APC-Proteinfragmente wurde durch Zugabe von IPTG (0,05 mM Endkonzentration) über Nacht induziert. Alle APC-Proteinfragmente trugen einen N-terminalen GST-Tag und wurden affinitätschromatographisch über eine Glutathion-Säule aus den mittels Ultraschall lysierten Bakterien gereinigt. In den ersten Reinigungen waren neben dem Fusionsprotein das Chaperon DnaK (70 kDa) vorhanden. Chaperone unterstützen die Faltung von Proteinen in Zellen. DnaK ist das Homolog aus *E.coli*-Bakterien zu Hsp70 (heat shock protein, 70 kDa) und enthält eine ATPase Funktion (Mayer *et al.*, 2000). Die Fusionsproteine konnten durch langsames Waschen der GSH-Säule mit ATP- und Mg²⁺-haltigen Puffer (1x PBS, 60 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTE) während der ersten Affinitätschromatographie von DnaK befreit werden.

Anschließend wurden die Fusionsproteine von ihrem GST-Anteil mittels PreScissionTM-Spaltung getrennt und durch eine zweite Affinitätschromatographie gereinigt. Die Proteinausbeute betrug jeweils 10 bis 34 mg aus einem Kulturvolumen von einem Liter und der Reinheitsgrad der Proteine betrug 95 % (Abbildung 26), wobei APC1340-1429 leider nicht exprimiert werden konnte. Das β -Catenin Konstrukt besteht aus den Aminosäuren 151 bis 666 und hat mit dem GST-Anteil ein Molekulargewicht von etwa 83 kDa. Es wurde als GST-Fusionsprotein affinitätschromatographisch gereinigt und direkt für die ITC-Messungen eingesetzt.

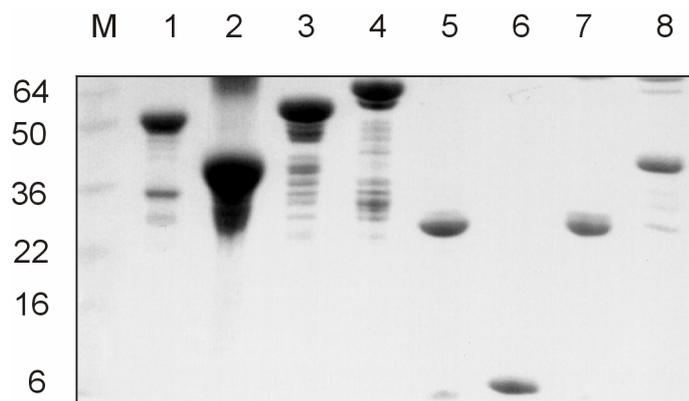


Abbildung 26: Übersicht der exprimierten APC-Konstrukte. Die jeweiligen Fusionsproteine sowie die gereinigten Proteine ohne GST-Anteil wurden mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert. M: Prestained-Marker 1: GSTAPC1340-1536; 2: GSTAPC1449-1536; 3: GSTAPC1537-1701; 4: GSTAPC1449-1701; 5: APC1340-1536; 6: APC1449-1536; 7: APC1537-1701; 8: APC1449-1701. Auf der linken Seite sind die Größen ausgewählter Markerproteine in kDa angegeben.

Die APC-Fragmente APC1537-1701 und APC1449-1701 zeigten sowohl als Fusionsprotein (Spuren 3 und 4) als auch als GST-freie Proteine (Spuren 7 und 8) ein abweichendes Laufverhalten in der gelelektrophoretischen Analyse. Im Vergleich mit den Markerbanden ließen die Proteine auf ein höheres Molekulargewicht schließen als durch Ermitteln der theoretischen Molekulargewichte (zum Beispiel APC1449-1701 theoretisch: 28 kDa, im Gel 40 kDa). Da die Molekulargewichte der Proteine grundsätzlich durch Massenspektrometrie auf ihre Richtigkeit hin überprüft wurden, lässt sich dieser Effekt durch die überdurchschnittlich hohe Anzahl an sauren Resten in der Aminosäuresequenz der Proteinfragmente erklären. Die beiden APC-Konstrukte enthalten viele Aspartat- und Glutamatreste, deren negative Ladung die Anlagerung der SDS-Moleküle im Ladepuffer erschwert, so dass die Proteine nicht nur aufgrund ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld wandern.

1.1 Quantitative Analyse der Interaktion zwischen den Proteinfragmenten des APC mit der Armadillo-Region des β -Catenins

Durch Messung einer signifikanten Wärmeänderung, die bei der Bindung von zwei Interaktionspartnern aneinander frei wird, kann die Affinität der beiden Reaktanden zueinander bestimmt werden. Alle gereinigten APC-Konstrukte wurden auf ihre Interaktion mit der Armadillo-Region von β -Catenin untersucht. Die Messungen wurden bei 20°C und im entgasten GST-Elutionspuffer (50 mM Tris, 20 mM Glutathion, 1 mM DTE, pH 7,5) durchgeführt. Desweiteren befanden sich die APC-Konstrukte in der Spritze in einer ungefähr zehnfach höheren Konzentration relativ zum β -Catenin in der Messzelle. Zu 30 bis 90 μ M gereinigtem β -Catenin-Protein wurden jeweils 200 bis 600 μ M APC-Protein im Abstand von 4 Minuten und einem Injektionsvolumen von 4 μ l in die Messzelle titriert. Es handelt sich bei den Titrationen um exotherme Reaktionen, da jeweils Reaktionswärme freigesetzt wird. Gegen Ende der Reaktion näherte sich die Wärmemeänderung einer konstanten Verdünnungswärme. Im unteren Teil der Diagramme wurde die freiwerdende Reaktionswärme in kcal/Mol der hinzutitrierten APC-Proteinfragmente umgerechnet und gegen das molare Verhältnis beider Proteine aufgetragen. Die Kurve wurde mit Hilfe des Computers an die Messpunkte angepasst, und aus deren Steigungsverlauf konnte die Gleichgewichtskonstante K_D berechnet werden. Als weiterer Versuchsansatz wurde ein synthetisiertes Peptid (BioTrend, Köln), das nur aus den 20 konservierten Aminosäuren der dritten Repetition bestand, auf seine Fähigkeit β -Catenin zu binden getestet. Hierbei wurden

495 μM des Peptids in der Spritze und 55 μM β -Catenin-Fusionsprotein in der Messzelle eingesetzt, und die Messungen wurden sowohl bei 20°C als auch bei 30°C durchgeführt. Zur Überprüfung der positiven Ergebnisse wurden Kontrollmessungen durchgeführt, in denen sowohl reines GST-Protein zum GST- β -Catenin-Fusionsprotein als auch die konzentrierten Proteine in den reinen Puffer titriert wurden. Bei diesen Messungen konnte keine Änderung der Wärmemenge detektiert werden.

Mit Hilfe der Mikrokalorimetrie kann eindeutig die Aussage getroffen werden, dass ein einzelnes rekombinant exprimiertes β -Catenin-Bindungsmotiv des APC-Proteins ausreichend ist, um an β -Catenin zu binden (APC1449-1536 K_D : 16,7 μM ; APC1537-1701 K_D : 34 μM). Daher ist eine Phosphorylierung des Motivs nicht nötig (Rubinfeld *et al.*, 1996), da davon ausgegangen werden kann, dass die in *E.coli* exprimierten Proteine nicht posttranslational modifiziert vorliegen. Es ist allerdings zu vermuten, dass mehr Aminosäuren als die 20 Aminosäuren der konservierten Repetitionen vorliegen müssen, da das synthetische Peptid keine Bindung an β -Catenin zeigt (Tabelle 4). Bei dem Vergleich der einzelnen APC-Repetitionen untereinander fällt auf, dass sich die Affinitäten nicht signifikant voneinander unterscheiden (K_D : 16,7 μM der dritten 20-Aminosäure-Repetition und K_D : 34 μM der vierten 20-Aminosäure-Repetition). In der folgenden Tabelle sind die ermittelten Werte für die Bindung der APC-Proteinkonstrukte an die Armadillo-Region des β -Catenins angegeben.

Tabelle 4: Bindungsaffinitäten von verschiedenen APC-Konstrukten und der Armadillo-Region des β -Catenins.

APC-Proteinfragment	Affinität zur Armadillo-Region des β -Catenins (K_D)
APC1340-1536	12,9/12,5 μM
APC1449-1536	16,7 μM
APC1537-1701	34 μM
APC1449-1701	8,4/10,4 μM
APCS1505D	0,74 μM
APCS1507D	0,9 μM
ESTPDGFGSCSSLSALSLEP	-

Desweiteren deuten die Resultate der APC-Proteinfragmente, die zwei konservierte 20-Aminosäure-Repetitionen enthalten, darauf hin, dass die verschiedenen β -Catenin

Bindungsmotive alle eine ähnliche Bindungsaffinität aufweisen (APC1340-1536 K_D : 12,9 und 12,5 μM , APC1449-1701 K_D : 8,4 und 10,4 μM). Diese Beobachtung schließt einen kooperativen Bindungsmechanismus der Repetitionen untereinander aus. Die Tatsache, dass die ITC-Messungen der Konstrukte mit zwei Repetitionen einen N-Wert oder Stöchiometrie Wert von zwei aufweisen und auch mit der Annahme von zwei Bindungsstellen auswertbar waren, lässt zudem die Aussage zu, dass zwei Repetitionen auch zwei β -Catenine kompensieren können. Dies wurde durch eine analytische Gelfiltration mit einer S200 36/99 Säule und den beiden Proteinen GST- β -Catenin-Fusionsprotein und APC1340-1536 bestätigt. Der Komplex der beiden Proteine eluierte bei dem erwarteten Molekulargewicht von 187 kDa, und bestand aus zwei Molekülen β -Catenin und einem APC1340-1536 (nicht gezeigt).

1.2 Quantitative Analyse der Bedeutung der Phosphorylierung

Die β -Catenin Bindungsmotive aus 20 Aminosäuren im APC-Protein besitzen eine Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch GSK3 β (Rubinfeld *et al.*, 1996). Neue Veröffentlichungen konnten zudem zeigen, dass auch die Casein Kinase-1 ϵ eine wichtige Rolle in der Phosphorylierung der APC-Repetitionen spielt (Rubinfeld *et al.*, 2001; Easwaran *et al.*, 1999). Obwohl beide Kinasen unabhängig voneinander phosphorylieren, werden sie beide durch Axin aktiviert, einer weiteren wichtigen regulatorischen Komponente des Wnt-Signalwegs. Dies weist auf eine mögliche Tumorsuppressorfunktion von Axin hin. Inaktivierende Mutationen im Axin-Gen sind mittlerweile identifiziert worden (Sato *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 2000). Für eine Charakterisierung des Einflusses von Phosphorylierungen an einem konservierten Serin innerhalb der 20-Aminosäure-Repetition tauchte die Schwierigkeit auf, dass durch eine *in vitro* Phosphorylierung nicht genügend Proteinmengen für eine ITC-Messung gewonnen werden konnten. Daher wurde die Methode der „Phospho-Serin-Simulierung“ angewendet, in der die negative Ladung einer Phosphatgruppe durch ein Aspartat simuliert wird (Casanova *et al.*, 1990). Abbildung 27 zeigt exemplarische ITC-Messungen des Versuchsansatzes.

Bei dem Vergleich der Bindungsaffinitäten des APC1449-1536 mit den mutierten APCS1505D und APCS1507D ist eine signifikante Erhöhung in der Affinität zu β -Catenin zu beobachten (18fach und 22fach). Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle der Serinphosphorylierung innerhalb der APC- β -Catenin-Interaktion hin.

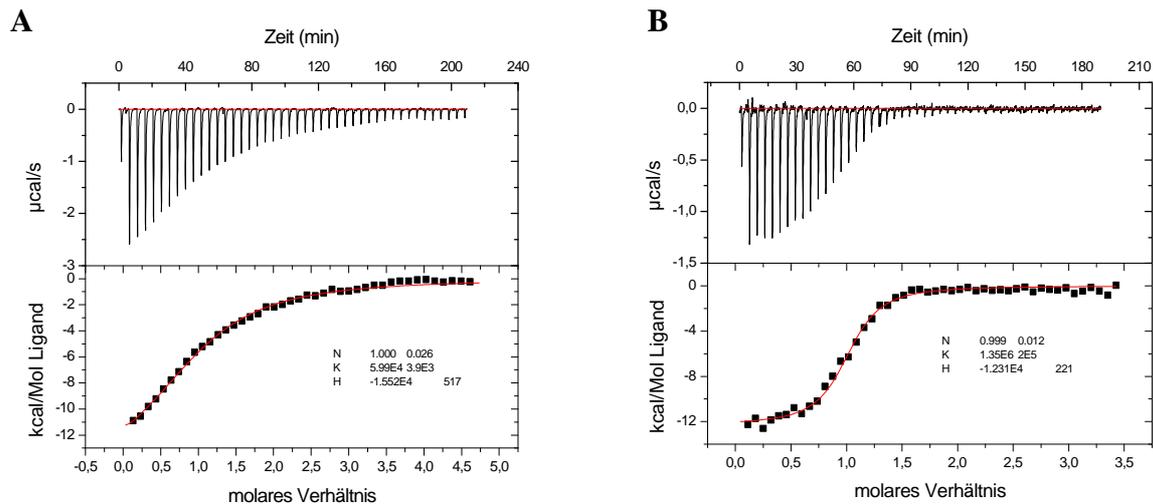


Abbildung 27: ITC-Messungen des APC1449-1536 (A) und des zu Aspartat mutierten APCS1505D Proteinfragments (B) mit der Armadillo-Region des β -Catenins als Fusionsprotein. Die Messungen wurden unter Annahme einer Bindungsstelle ausgewertet, so dass der stöchiometrische Faktor N einen Wert von eins annimmt. Die Dissoziationskonstante der APC1449-1536-Interaktion mit β -Catenin-Fusionsprotein betrug $16,7 \mu\text{M}$, die der APCS1505D betrug $0,7 \mu\text{M}$.

2. Isolierung des β -Catenin-Wildtypproteins und der β -Catenin-Mutanten

Morin *et al.* zeigten 1997, dass Mutationen im N-Terminus des β -Catenin Gens zur Stabilisierung des Proteins beitragen. Durch die höhere Stabilität kommt es zu einer höheren β -Catenin-Konzentration in der Zelle. Bei den N-terminalen Mutationen handelt es sich um fünf verschiedene Mutationen: vier Punktmutationen (S45F, T41A, S33Y und S37F) und eine Deletionsmutation (S45 Δ ; Rubinfeld *et al.*, 1997). Auffallend ist, dass es sich bei allen Mutationen um die konservierten Serin/Threonin-Reste handelt, deren Motiv von der GSK3 β erkannt und phosphoryliert werden. Um den Phosphorylierungseffekt zu zeigen, wurde das Serin an der Position 45 zu einem Aspartat mutiert, dessen negative Ladung die eines Phosphats simuliert.

In der Arbeit wurde mit den β -Catenin-Konstrukten des Wildtyps sowie den beiden Mutanten S45 Δ und S45D gearbeitet. Bakterielle Expressionsvektoren des pGEX-5X-1 mit dem vollständigen β -Catenin-Wildtyp und der β -Catenin Mutante S45 Δ lagen bereits vor. Die Gensequenz der β -Catenin Mutante S45D wurde durch die Mutagenese-PCR mit Hilfe des β -Catenin-Wildtyp-Vektors pGEX-5X-1 hergestellt. Dabei erfolgte die Einführung des zweifachen Basenpaaraustausches unter Verwendung von Primern, die die entsprechende Mutation enthielten (TCT \rightarrow GAT). Nach der erfolgreichen Quikchange-Mutagenese-PCR

und Überprüfung des Konstrukts mittels Sequenzier-PCR wurde der neue Expressionsvektor als pGEX-5X-1/ β -CateninS45D bezeichnet.

Zur Expression aller drei β -Catenin-Konstrukte wurden die rekombinanten Expressionsvektoren in den *E.coli*-Bakterienstamm BL21 transformiert und die Bakterien bei 37°C im LB-Medium mit Ampicillin kultiviert. Die Proteinexpression wurde bei einer relativen Absorption bei 600 nm von 0,6 mit 0,05 mM IPTG induziert. Die Expression wurde bei 30°C über Nacht durchgeführt. Alle drei β -Catenin-Konstrukte trugen einen N-terminale GST-Tag und wurden dementsprechend affinitätschromatographisch über eine Glutathion-Säule aus den mittels Ultraschall lysierten Bakterien gereinigt. Die Proteinausbeute betrug jeweils 10 mg aus einem Kulturvolumen von einem Liter. Das Molekulargewicht betrug für alle Proteinkonstrukte etwa 118 kDa, und da die Proteine einen Reinheitsgrad von 95 % hatten, konnten sie direkt für die Analyse der Interaktion eingesetzt werden.

2.1 Quantitative Analyse der Interaktion zwischen APC1449-1536 und dem β -Catenin-Wildtypprotein sowie den β -Catenin-Mutanten

Die Untersuchung der Interaktion zwischen dem gereinigten Proteinfragment aus der β -Catenin-Bindungsregion des APC-Proteins (APC1449-1536) mit den β -Catenin-Konstrukten erfolgte durch Mikrokolorimetrie. Ziel der Untersuchung war es, mögliche qualitative Unterschiede im Bindungsverhalten des APC-Fragments an die β -Catenin-Mutanten im Vergleich zum β -Catenin-Wildtyp zu zeigen. Aus diesem Grund wurde das Konstrukt APC1449-1536 mit der dritten 20-Aminosäure-Repetition gewählt, da eine Stöchiometrie von eins vorausgesetzt werden konnte, und die Parameter für eine Auswertung der Bindung damit niedrig gehalten werden konnten.

Die β -Catenin Proteine (Wildtyp, S45 Δ , S45D) wurden jeweils als GST-Fusionsproteine in die Messzelle des Kalorimeters vorgelegt. Das APC-Fragment wurde in zehnfach höherer Konzentration in die Spritze aufgezogen und in 4 μ l Injektionen bei regelmäßigen Zeitabständen hinzutitriert. Dabei wurde bei jedem Titrationsschritt die aus der Proteininteraktion resultierende Wärmeänderung gemessen. In einer Kontrolltitration wurde APC1449-1536 in eine GST-Lösung titriert, um zu gewährleisten, dass der GST-Anteil der β -Catenin-Fusionsproteine keine unspezifische Bindung an APC1449-1536 aufweist. Hier konnte aber keine Bindungswärme gemessen werden (nicht gezeigt).

Für alle Mikrokolorimetrie-Experimente wurde als optimale Temperatur 20°C ermittelt. Alle Proteine wurden in entgasten GST-Elutionspuffer (20 mM Glutathion, 50 mM Tris, pH 7.9)

umgepuffert. Die kalorimetrischen Titrations der eingesetzten β -Catenin Proteine Wildtyp und S45 Δ mit APC1449-1536 sind in Abbildung 28 dargestellt. APC1449-1536 wurde im Abstand von vier Minuten jeweils in Injektionsvolumen von 4 μ l in die Messzelle injiziert. Die Messungen der β -Catenin Mutante S45D sind leider nicht auswertbar, da die beiden Proteine während der Messung in der Zelle ausfallen. Es ist daher nicht möglich, für diese Reaktion eine Bindungsaffinität zu bestimmen. Die ermittelten K_D -Werte sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

β -Catenin-Protein	Affinität zu APC1449-1536 (K_D)
Wildtyp	4,6 μ M
S45 Δ	4,9 μ M
S45D	nicht auswertbar

Tabelle 5: Bindungsaffinitäten von β -Catenin-Wildtypprotein und β -Catenin-Mutanten zum APC-Fragment APC1449-1536.

Sowohl das β -Catenin-Wildtypprotein als auch die Mutante S45 Δ binden an APC1449-1536. Dabei zeigen sie ähnliche Bindungsaffinität. Unglücklicherweise fallen die Proteine während der Messung mit der β -Catenin-Mutante S45D aus, so dass keine Bindungsaffinität bestimmt werden kann. Dadurch kann man keine Aussage über die Relevanz einer negativen Ladung und über die Anwesenheit eines Phosphats machen. Zumindest kann aber ein anderes biochemisches Verhalten für die β -Catenin-Mutante S45D angenommen werden, da der Austausch nur einer Aminosäure im N-Terminus zu einer drastischen Veränderung der Löslichkeit des β -Catenin-Proteins während der Messung führt. Demgegenüber sind die hier gemessenen Affinitäten mit denen der Amadillo-Region des β -Catenins vergleichbar, wobei ein Faktor von 3,6 und 3,4 als nicht signifikant angesehen werden kann (Tabelle 4).

Die Ähnlichkeiten der Bindungsaffinitäten der verschiedenen β -Catenin-Konstrukte im Vergleich zur dritten APC-Repetition (APC1449-1536) deuten darauf hin, dass der N-Terminus des β -Catenin Proteins sowie dessen Mutationen im unphosphorylierten Zustand keinen Einfluss auf die direkte APC- β -Catenin-Interaktion haben. Da im Rahmen dieser Arbeit nur unphosphoryliertes β -Catenin getestet wurde könnte es dennoch sein, dass sich der Serin-Verlust im β -Catenin-Protein erst in Gegenwart von Kinasen auswirkt. Eine andere Vermutung wäre, dass die β -Catenin-Mutationen in Krebszellen einen Einfluss auf einen anderen Interaktionspartner haben, wie zum Beispiel E-Cadherin oder β TRCP.

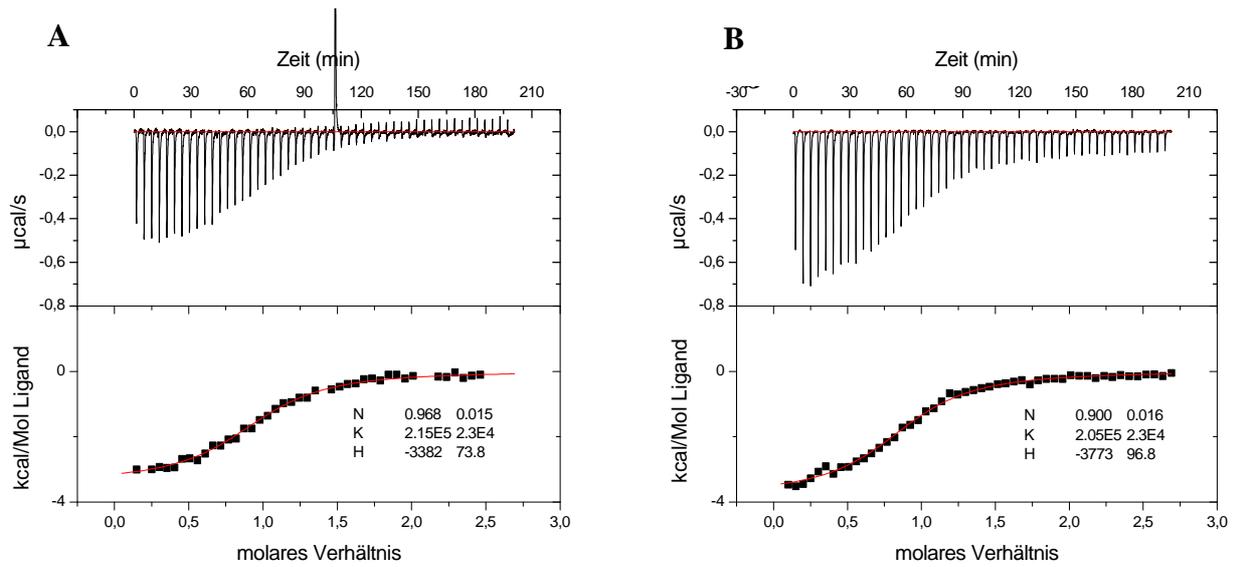


Abbildung 28: Mikrokalorimetrische Titration von β -Catenin-Wildtyp (A) und β -Catenin-S45D (B). Die Messungen wurden unter Annahme einer Bindungsstelle ausgewertet, so dass der stöchiometrische Faktor N einen Wert von ungefähr eins annimmt. Die Dissoziationskonstante der β -Catenin-Wildtyp-Messung betrug $4,6 \mu\text{M}$, die der β -Catenin-Mutante S45 Δ -Messung betrug $4,9 \mu\text{M}$.

V. DISKUSSION

A. Die N-terminale Domäne des APC-Proteins

1. Struktur der N-terminalen Domäne des APC-Proteins

In dieser Arbeit konnte ein Beitrag zur Aufklärung der Funktion des N-terminalen Bereichs des APC-Proteins bezüglich seiner Tumorsuppressorfunktion durch Lösung der dreidimensionalen Struktur der Aminosäuren 129-250 des APC geleistet werden. Das gesamte APC-Protein gleicht einer langen Kette mit einer Aneinanderreihung von funktionellen Domänen als einem globulär gefalteten Protein. Das ist ein Grund für die schwierige Strukturanalyse des APC-Proteins. Die Analyse der Sequenz mittels Strukturvorhersageprogrammen zeigt, dass nur wenige Sekundärstrukturelemente vorhanden sind. Aufgrund der vielfältigen biologischen Funktionen des APC-Proteins und seiner vielen Interaktionspartner bietet die Flexibilität der Struktur eine Möglichkeit der spezifischen Regulation einzelner Interaktionen.

Das in der Arbeit zunächst exprimierte und gereinigte Proteinfragment umfasste die Aminosäuren 2 bis 250. Durch eine hochauflösende Gelfiltration konnte die Oligomerisierung des APC2-250 gezeigt werden. Die ersten 55 Aminosäuren des APC-Proteins wurden hinsichtlich seines Oligomerisierungsverhaltens durch Joslyn *et al.* (1993) untersucht. Bei diesen Analysen wurden ebenfalls Ausschlusschromatographien durchgeführt. Diese ergaben den Hinweis auf das Vorhandensein eines parallelen Homodimers, während Monomere oder höhere Oligomere Zustände nicht nachgewiesen werden konnten.

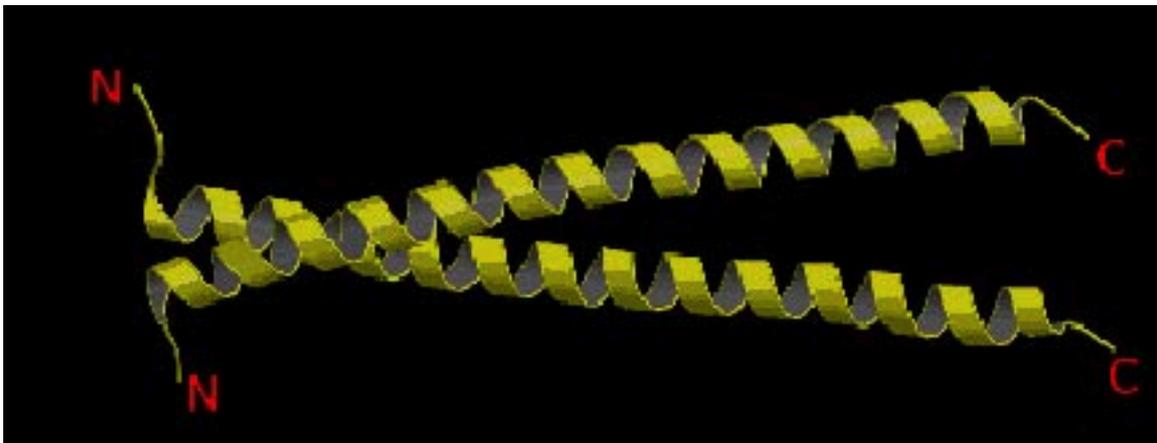


Abbildung 29: Kristallstruktur der N-terminalen Coiled coil Domäne aus den ersten 55 Aminosäuren des APC-Proteins (Day und Alber 2000).

Die Tertiärstrukturauflösung der ersten 55 Aminosäuren des APC-Proteins durch Day und Alber (2000) zeigen dann auch dieses Dimer (Abbildung 29), was die Vorhersage von Joslyn *et al.* bestätigte.

Das in dieser Arbeit untersuchte APC2-250 enthält sowohl diese ersten 55 Aminosäuren, die für die Dimerisierung verantwortlich sind, als auch die folgenden 195 Aminosäuren. Die analytische Gelfiltration des APC2-250 zeigte, dass mehr als nur ein Oligomerisierungszustand vorlag. Darüber hinaus konnte durch eine weitere Ausschlusschromatographie nach Zusammenführen des tetrameren Zustands des APC2-250 ein dynamisches Gleichgewicht zwischen diesen Zuständen beobachtet werden. Wie in der Publikation von Joslyn *et al.* (1993) bereits festgestellt wurde, besitzen die oligomerisierten Proteinfragmente aufgrund ihrer ausgestreckten Gestalt ein schnelleres Laufverhalten als globuläre Proteine mit gleicher Molekularmasse, die zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule als Standards eingesetzt wurden. Dies erschwert die Interpretation des von APC2-250 erhaltenen Elutionsdiagramms. Bei dem als APC2-250-Tetramer identifizierten Elutionssignal könnte es sich auch um ein Trimer handeln, das aufgrund seiner Gestalt eine schnelleres Elutionsverhalten besitzt. Dasselbe gilt für den zugeordneten trimeren Zustand, welcher auch den dimeren Zustand repräsentieren könnte. Dies würde auch das unerwartete Fehlen eines Signals, welches dem dimeren Zustand zugeordnet werden kann, erklären. Aufgrund der Kalibrierungsschwierigkeit bezüglich des exakten Molekulargewichts kann in dieser Arbeit nicht auf den genauen Grad der Oligomerisierung geschlossen werden. Mit Sicherheit konnte aber die Anwesenheit von mehreren Oligomerisierungszuständen gezeigt werden.

APC2-250 zeigte zudem einen hohen α -helikalen Sekundärstrukturanteil in der CD-Spektroskopie, was die Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersage bestätigt. Für weitere strukturelle Experimente eignete sich dieses Proteinfragment leider nicht, da zu erwarten war, dass verschiedene Zustände genauso wie die Bildung von Aggregaten die Proteinkristallisation erschweren (Franceschi, 1997). Tatsächlich konnten keine Kristalle erhalten werden. Aufgrund des Gleichgewichts zwischen den verschiedenen Zuständen konnte keine getrennte Kristallisation der APC2-250 Oligomere vorgenommen werden. Mit Hilfe einer limitierten Proteolyse und anschließendem Einsatz von N-terminaler Sequenzierung und Massenspektrometrie konnte das tryptische Fragment APC129-250 identifiziert werden. Nach erfolgreicher Subklonierung, Expression und Reinigung ergab eine Analyse der Proteinstruktur durch CD-Spektroskopie ebenfalls einen sehr hohen α -helikalen Anteil. Dieser Sachverhalt bestätigt zum einen die Ergebnisse der CD-Spektroskopie des ursprünglichen APC2-250 Proteinfragments, und zum anderen die Vorhersagen der Sekundärstruktur. Desweiteren

konnte eine größere Hitzestabilität des APC129-250 im Vergleich zu APC2-250 beobachtet werden. APC2-250 denaturiert bereits bei Temperaturen um 40°C, während APC129-250 erst zwischen 50°C und 60°C denaturiert. Eine hochauflösende Gelfiltration mit APC129-250 zeigte, dass dieses Proteinfragment ausschließlich im monomeren Zustand vorliegt.

Mit der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des tryptischen APC129-250 konnte der α -helikale Anteil weitgehend bestätigt werden. Zudem ist es mit dieser Struktur gelungen, die bisher größte Domäne des APC-Proteins strukturell aufzuklären. Vermutungen, dass in den Aminosäuren 125 bis 156 des APC-Proteins eine weitere Dimerisierungsregion liegt, die zudem tumoraktivierend sein könnte (Day und Alber, 2000), konnte für das APC129-250 widerlegt werden. APC129-250 ist eindeutig ein Monomer. Seine Struktur besteht aus drei α -Helices (Abbildung 23), die wiederum zwei antiparallele Coiled coil Strukturen ausbilden. Diese Coiled coils sind um ein hydrophiles Zentrum angeordnet. Dabei enthält die Aminosäuresequenz die charakteristischen Heptad-Repetitionen (Lupas 1996) mit hydrophoben Interaktionen an den Positionen a und d (Abbildung 23A), die die Innenseite der Helix bilden. Die Aminosäurereste b, c, e, f und g sind hydrophil und richten sich zum Lösungsmittel aus (Burkhard *et al.*, 2001). Interessanterweise sind nur in einer der beiden Coiled coil Strukturen ionische Wechselwirkungen vorhanden, und zwar zwischen den α -Helices I und III. In der Coiled coil Struktur, die die NES enthält (Helices I und II), sind dagegen keine ionischen Wechselwirkungen zu sehen. Dieses Ergebnis sowie der höhere B-Faktor in der NES-Region deuten auf eine höhere Flexibilität dieses Bereichs hin. Desweiteren werden die beiden Coiled coil Regionen durch einen ungewöhnlichen Knick zwischen den Helices II und III separiert. Eine DALI Suche (Holm *et al.*, 1998) ergab, dass es bisher keine weitere Coiled coil Struktur gibt, die eine vergleichbare Struktur enthält. Dieser Sachverhalt könnte auf eine besondere Relevanz dieser Domäne deuten, wenn man bedenkt, dass die Coiled coil Region mit dem NES für oder während der Bindung des Interaktionspartners gelockert werden muss (siehe V.A.2). Das NES des APC129-250 Proteins liegt am Ende einer Helix, die über eine Schleife mit der nächsten Helix verbunden ist. In der APC129-250-Struktur ist die Schleife in den Aminosäuren 175 bis 178 nicht zu sehen. Das ist zum Teil die Erklärung für den relativ hohen freien R-Faktor (30,9 %). Siebzehn Aminosäuren von insgesamt 122 Aminosäuren der APC129-250-Struktur sind in der Elektronendichtekarte nicht zu sehen, das heißt 14 % der kristallinen Struktur ist ungeordnet.

2. Das nukleäre Export Signal von APC129-250

Leucin-reiche Motive, die den nukleären Transport ermöglichen, sind in vielen verschiedenen Proteinen beschrieben worden. Auffallend ist die Ähnlichkeit der NES-Struktur des APC129-250 mit anderen gelösten Strukturen, die ein NES enthalten (Abbildung 30; Stommel *et al.*, 1999, Begitt *et al.* 2000, Mowen *et al.*, 2000). In den meisten Fällen wurde die NES-Aktivität durch die Fusion des kurzen Motivs an ein Indikatorprotein gezeigt, wie auch im Fall der NES(165-174)-Sequenz des APC-Proteins. Es gibt allerdings nur wenige Fälle, in denen die NES-Aktivität auch für das jeweilige ganze Protein bewiesen und zudem auch strukturell untersucht wurde. Dass man sehr vorsichtig mit der Zuweisung eines funktionellen NES-Motivs sein muss, zeigte zum Beispiel die NES-Struktur von 14-3-3(217-227), welche Ähnlichkeiten zu den Strukturen der NES(340-350)-Sequenz in p53 und der NES(165-174)-Sequenz in APC hat. Neue Veröffentlichungen konnten belegen, dass das NES-Motiv von 14-3-3 keine Zellkernttransportaktivität im Gesamtprotein hat (Brunet *et al.*, 2002, Rittinger *et al.*, 1999). Eine bekannte NES-Struktur, die mit Sicherheit eine Zellkernttransportfunktion besitzt, ist die NES(340-350)-Sequenz in p53. Im Fall der NES in STAT-1 (Signal Transducers and Activators of Transcription) ist bis jetzt eine Zellkernttransportaktivität noch nicht widerlegt, wie im Fall von 14-3-3. Aus diesem Grund wurde auch das NES von STAT-1 in der Überlagerung gezeigt (Abbildung 30).

Die NES(165-174)-Sequenz des APC129-250 Proteins stimmt mit der optimalen NES-Sequenz überein und erfüllt auch die optimalen Abstände zwischen den konservierten Leucinen (Bogerd *et al.*, 1999). Demnach ist die optimale Sequenz Lxxx(L/I)xxLxL, und für das APC129-250 lautet sie LTKRIDS~~L~~PL. Abbildung 30 zeigt eine Überlagerung der NES-Aminosäuresequenz des APC129-250 und der ebenfalls NES enthaltenden Proteine p53 und STAT-1. Es fällt auf, dass die ersten beiden konservierten hydrophoben Aminosäurereste, entsprechend Leucin 165 und Isoleucin 169 im APC, bei allen drei Strukturen in dieselbe Richtung zeigen. Das dritte konservierte Leucin 172 hingegen ist bezüglich seiner Richtung verglichen mit p53 nicht mehr einheitlich. Dieser Aminosäurerest ist nicht hochkonserviert, da die Position zum Beispiel in der STAT-1-verwandten NES-Sequenz nicht vorkommt. Die letzte Position ist in der APC129-250 Struktur nicht mehr zu sehen, eine schwache Elektrodichte deutet jedoch auf eine gegenüber den ersten zwei Resten unterschiedliche Richtung hin.

			A	B	C	D	
A	APC	163	QNLTKR	IDS.	LPL		174
	p53	339	EMFREL	NEALEL			350
	STAT-1	306	FSLFQQL	IQSSF	VVE		320
					D'		

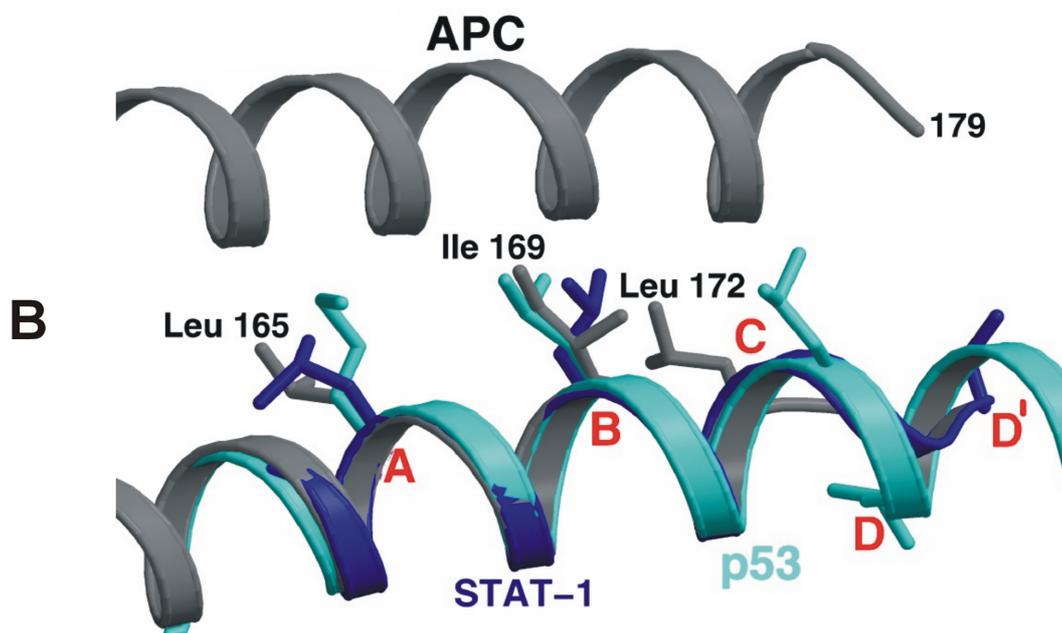


Abbildung 30: Das NES(165-174) in APC verglichen mit dem NES(340-350) des p53 und dem NES(308-318) von STAT-1, deren Strukturen bekannt sind und deren Aktivität bezüglich des gesamten Proteins gezeigt wurden. A: Sequenzvergleich der NES(165-174)-Sequenz des APC mit den NES-Motiven von p53 und STAT-1. Die konservierten Aminosäuren wurden mit A bis D bezeichnet und als D' in STAT-1 aufgrund der unterschiedlichen Position. B: Überlagerung der NES-Motive mit bekannter Struktur und bewiesener Kerntransportaktivität: das NES(165-174) des APC (grau), NES(340-350) des p53 (grün) und NES(308-318) des STAT-1 (blau). Die Positionen der konservierten Aminosäurereste A und B sind in allen drei Proteinen identisch. Die räumliche Anordnung von C ist in APC etwas anders als in p53, beide Reste zeigen aber noch in dieselbe Richtung, während diese Position in STAT-1 nicht vorhanden ist. Die Position von D ist in p53 und STAT-1 verschieden und konnte für APC nicht bestimmt werden. Für p53 und STAT-1 sind jeweils nur die NES-Motive gezeigt.

Interessanterweise sind alle Aminosäurereste der NES(165-174)-Sequenz des APC-Proteins im interhelikalen Raum der Coiled coil vergraben. Das Phänomen, dass ein aktives NES-Motiv maskiert sein kann, ist auch für andere Proteine beschrieben worden (Craig *et al.*, 2002). Das NES(340-350) in p53 ist in der tetrameren Form des Proteins maskiert, während das NES(308-318) in STAT-1 ähnlich dem NES(165-174) in APC in einer Coiled coil Struktur vergraben ist. Eine Phosphorylierung eines Tyrosin-Rests in STAT-1 führt zu einer Aktivierung des Zellkerntransports, und es wurde spekuliert, dass dies durch eine Demaskierung der NES-Sequenz stattfinden könnte (Mowen *et al.*, 2000). Eine Konformationsänderung, die das NES-Motiv zugänglicher für eine Crm1-Bindung macht, könnte auch durch einen dritten Interaktionspartner unterstützt werden. Im Fall der N-terminalen NES-Sequenz von I κ B α wird die Bindung von Crm1 durch aktives RanGTP verstärkt (Lee *et al.*, 2001). Dieselbe Beobachtung konnte in dieser Arbeit bezüglich der NES(165-174)-Sequenz des APC-Proteins gemacht werden. *In vitro* Präzipitations-Experimente des APC129-250 mit Crm1 bestätigen bisherige Veröffentlichungen (Rosin-Arbesfeld *et al.*, 2000; Henderson *et al.*, 2000), dass der Zellkerntransport durch das NES des APC-Proteins *in vitro* vom Exportin Crm1 abhängig ist. Die Auswertung der Präzipitations-Ergebnisse deutet darauf hin, dass APC129-250 direkt an Crm1 binden kann. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die gesamte Aminosäuresequenz des APC129-250 sehr Leucin-reich ist, so dass man auch eine NES-unabhängige Bindung nicht ausschließen kann. Auf der anderen Seite spielt das NES eine Rolle, das in der nativen Struktur von APC129-250 innerhalb der Coiled coil maskiert ist. Derselbe Sachverhalt wurde schon für das Rev-Protein der HIV-1 beschrieben, wo Rev mit Crm1 zu einem über das NES-Motiv und zum anderen NES-unabhängig binden kann (Askjar *et al.*, 1998). Desweiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Veränderung der Seitenketten, die verantwortlich für die Maskierung sind, ebenfalls zu einer verstärkten Bindung führen. Werden die hydrophoben Wechselwirkungen der Coiled coil zerstört, wie im Fall der APCL189A/I196A Doppelmutante, ist das NES(165-174) freier zugänglich. Crm1 kann besser binden, was die größeren Mengen an ko-präzipitierten APCL189A/I196A zeigen. Diese Ergebnisse machen einen Demaskierungsmechanismus wahrscheinlich, wobei dieser Mechanismus noch durch *in vivo* Experimente bestätigt werden muss. Die beobachtete Verstärkung des APC129-250 Detektionssignals in dem Präzipitat in Anwesenheit von RanGTP (Abbildung 25) lässt auf die Bildung eines ternären Komplexes schließen. Aktives Ran spielt eine bedeutende Rolle, da hier die Interaktion von Crm1 und APC129-250 sowie von Crm1 und APCL189A/I196A jeweils erhöht wird.

Aufgrund zweier Eigenschaften der dreidimensionalen Struktur kann man eine mögliche Maskierung des NES-Motivs erklären, die auf eine höhere Flexibilität der NES-tragenden Coiled coil hindeutet. Erstens enthält das NES-Motiv in der Coiled coil zwischen den Helices I und II keine ionischen Interaktionen, und zweitens ist der B-Faktor hier höher, was auf eine höhere Beweglichkeit der Aminosäuren in diesem Bereich schließen lässt. Die ungewöhnliche Schleife zwischen den Helices II und III würde es zudem ermöglichen, dass sich Helix II bewegt und das NES-Motiv für eine Bindung an Crm1 zugänglicher gemacht wird.

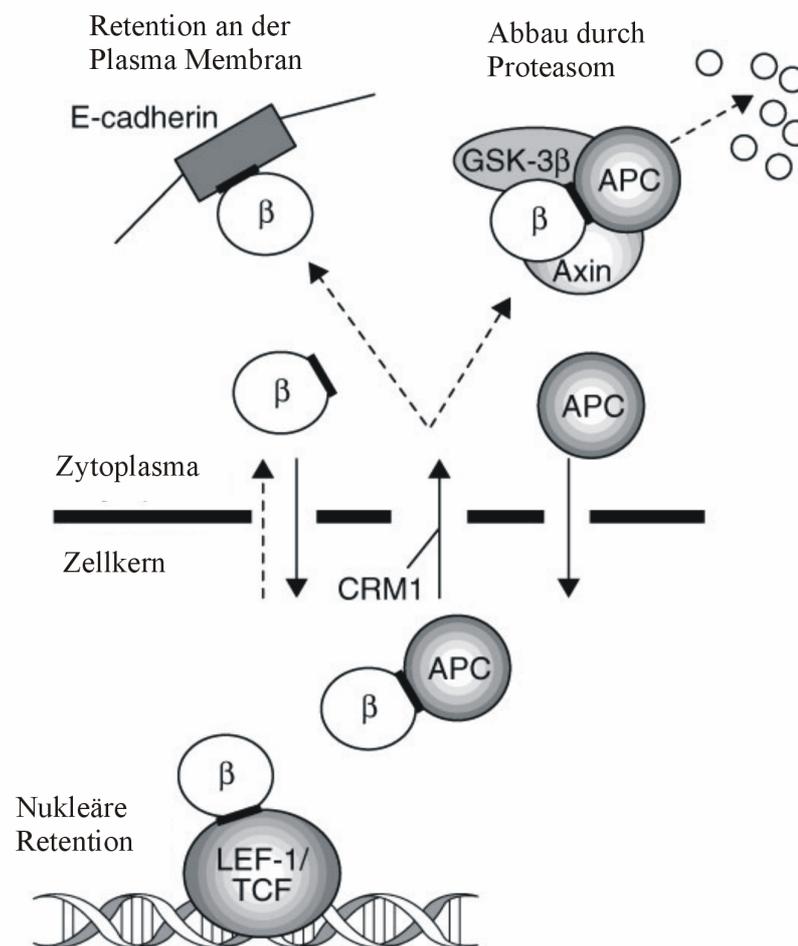


Abbildung 31: Modell für den APC-abhängigen nukleären Export von β-Catenin (“b”; nach Henderson 2000). In normalen Zellen verhindert APC die Akkumulation von β-Catenin im Zellkern sowie die Aktivierung LEF-1/TCF- abhängiger Transkription, die zur Tumorigenese führt. Wir nehmen an, dass APC nukleäres β-Catenin ins Zytoplasma transportiert, wo es entweder abgebaut wird oder mit der Plasmamembran interagiert.

Da gerade die nukleäre Retention des β-Catenins die Transkription aktiviert und damit auch zur verstärkten Proliferation der Zelle führt, könnte man vermuten, dass der Transport des β-

Catenins vom Zellkern in das Zytoplasma ebenfalls eine Tumorsuppressorfunktion des APC-Proteins ist, oder zumindest Teil seiner starken Tumorsuppressorfunktion ist (Abbildung 31). Nach diesem Modell wird die Konzentration des β -Catenins und damit auch die Bindung an TCF durch die Bindung von β -Catenin an APC reguliert. Die beiden Proteine werden durch Crm1 in das Zytoplasma geschleust, wo β -Catenin entweder in dem Degradationskomplex gebunden wird und anschließend im Proteasom abgebaut wird, oder aber seiner Funktion in der Zelladhäsion nachkommt.

3. Tumorrelevante Mutationen im APC129-250

In der APC-Mutations-Datenbank (<http://p53.curie.fr>) sind mehr als 5 % aller bisher identifizierten APC-Mutationen in der APC129-250 Region lokalisiert. Fast alle dieser Mutationen sind Stopp-Mutationen, die in der Keimbahn von FAP-Patienten entdeckt wurden. Nur zwei dieser Mutationen führen zu einem Aminosäureaustausch, was darauf hindeutet, dass diese Aminosäuren eine wichtige Rolle in der Tumorsuppressoraktivität des APC-Proteins spielen. Bei der ersten Punktmutation ist an der Position 157 ein Tryptophan (Trp157) zu einem Leucin ausgetauscht, das in der Struktur des APC129-250-Fragments in der Mitte der Helix I lokalisiert ist (Walton *et al.*, 1997). Trp157 macht einen hydrophoben „Buckel“ in Richtung des Serins 171. Man könnte annehmen, dass die Wechselwirkung der Helix I mit anderen Domänen des APC-Proteins wichtig für dessen Tumorsuppressoraktivität ist und durch den Verlust des Trp157 gestört wird. Bei der zweiten Mutation ist Serin 171, das in dem NES(165-174) lokalisiert ist, zu einem Isoleucin mutiert (van der Luijt *et al.*, 1997). Neuere Ergebnisse zeigten, dass die Phosphorylierung eines Serinrestes der NES(14-25)-Sequenz des p53-Proteins wichtig für die Regulation seiner Kerntransportaktivität ist (Zhang *et al.*, 2001). Wenn man spekuliert, dass das NES(165-174) wichtig für die Tumorsuppressoraktivität des APC-Proteins ist und ebenfalls durch Phosphorylierung reguliert wird, kann man annehmen, dass die Mutation des Serins zum Isoleucin an Position 171 zu einem Verlust der Tumorsuppressoraktivität führt. Die Tatsache, dass das Programm NetPhos (Blom *et al.*, 1999) den Serinrest 171 als mögliche Phosphorylierungsstelle identifiziert, bestärken diese Annahme.

B. Die Interaktion zwischen APC und β -Catenin

In dieser Arbeit sollten genauere Einblicke in die Interaktion von APC und β -Catenin gewonnen werden. Sie spielt eine wichtige Rolle im Wnt-Signalweg, da durch die Wechselwirkung der beiden Proteine die intrazelluläre Konzentration des β -Catenins reguliert wird (Sakana *et al.*, 1998; Rubinfeld *et al.*, 1996). Fast alle somatischen APC-Genmutationen führen zu dem Verlust der 20-Aminosäure-Repetitionen des APC-Proteins und somit auch zum Verlust der Fähigkeit, die β -Catenin-Konzentration zu regulieren, indem APC das freie zytoplasmatische β -Catenin dem proteolytischen Abbau zuführt (Rubinfeld *et al.*, 1997). Wird diese Funktion nicht mehr erfüllt, gelangt β -Catenin in den Zellkern, wo es die Transkription von Zielgenen in Komplex mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie aktiviert (Behrens *et al.*, 1996). Die β -Catenin-Bindung ist folglich eine wichtige Tumorsuppressorfunktion des APC-Proteins (Shih *et al.* 2000). Es existieren viele Veröffentlichungen, die über die biologische Konsequenz der Interaktion zwischen APC und β -Catenin berichten. Zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeit gab es wenig biochemische oder biophysikalische Daten über diese wichtige Interaktion. Ein Grund hierfür ist sicherlich die Schwierigkeit, hohe Mengen an APC-Protein rekombinant zu exprimieren, die stabil genug für analytische Versuche sind. Diese Schwierigkeit ist wohl damit zu begründen, dass das APC-Protein nur sehr wenige und kurze strukturelle Domänen besitzt. Das führt zu der Annahme, dass das Protein eher einer langen flexiblen Kette von kurzen Domänen gleicht, als einem globulären Protein. Generell enthalten die Bindungsmotive der verschiedenen Proteine, die an die Armadillo-Region des β -Catenins binden, keine oder sehr wenig Sekundärstrukturelemente in Abwesenheit des Bindungspartners. Dies konnte zum Beispiel für E-Cadherin (Huber *et al.*, 2001) und für TCF (Knapp *et al.*, 2001) gezeigt werden. Desweiteren liegt ein 15-Aminosäure-Bindungsmotiv des APC-Proteins ebenfalls in Abwesenheit von β -Catenin im ungeordneten Zustand vor (Spink *et al.*, 2001). Dieselbe Beobachtung konnte im Rahmen dieser Arbeit durch DSC-Experimente (Differential Scanning Calorimetry) für die β -Catenin-Bindungsregion des APC-Proteins gemacht werden (nicht gezeigt).

1. Die Bindung verschiedener APC-Proteinfragmente an β -Catenin

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob eine 20-Aminosäure-Repetition des APC-Proteins ausreichend ist, um *in vitro* an β -Catenin zu binden. Zusätzlich sollte die Frage der

Stöchiometrie geklärt werden, das heißt ob zwei Repetitionen auch zwei β -Catenine binden können.

Für die Untersuchung, ob ein β -Catenin-Bindungsmotiv aus 20 Aminosäuren des APC-Proteins ausreicht, um an β -Catenin zu binden, wurde von der Firma BioTrend ein Peptid entsprechend der dritten Repetition synthetisiert. Desweiteren konnten die dritte und die vierte 20-Aminosäure-Repetitionen mit weiteren benachbarten Aminosäuren (APC1449-1536; APC1537-1701) erfolgreich rekombinant synthetisiert und gereinigt werden. Durch die Analyse der Bindung der Armadillo-Region des β -Catenins und Bestimmung der Affinitäten mittels Mikrokalorimetrie konnte interessanterweise festgestellt werden, dass das synthetische Peptid keine Bindung aufweist. Im Gegensatz dazu konnte eine ähnliche Affinität der zwei rekombinant exprimierten APC-Proteinfragmente zu β -Catenin festgestellt werden (K_D : 16,7 μ M und K_D : 34 μ M). Diese Ergebnisse widerlegen auch die Annahme, dass die 20-Aminosäure-Repetitionen notwendigerweise phosphoryliert sein müssen, um überhaupt an β -Catenin binden zu können (Fearnhead *et al.*, 2001). Desweiteren konnten APC-Fragmente in hohen Mengen rekombinant gewonnen werden, die zu einem das zweite und dritte oder das dritte und vierte Bindungsmotiv enthielten (APC1340-1536 und APC1449-1701). Beim Betrachten der Bindungsaffinitäten ist auffallend, dass die Affinitäten untereinander fast identisch sind und mit den Affinitäten der einzelnen Repetitionen vergleichbar sind. Diese Tatsache schließt eine kooperative Bindung zwischen den einzelnen Repetitionen aus. Außerdem kann eindeutig die Aussage getroffen werden, dass ein APC-Proteinfragment, das zwei 20-Aminosäure-Repetitionen enthält, auch zwei β -Catenine bindet. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Rubinfeld (1996) überein, die *in vivo* zeigen konnten, dass APC-Konstrukte mit mehreren Repetitionen höhere Mengen an β -Catenin ko-präzipitieren können. Das Resultat, dass das synthetische Peptid nicht an β -Catenin bindet, lässt vermuten, dass dem 20-Aminosäure-Bindungsmotiv N- und C-terminal seiner Sequenz noch Aminosäuren angefügt werden müssen. Dies wird durch die messbare Affinität des rekombinant exprimierten APC1449-1536 gezeigt, das zusätzlich zu den 20 Aminosäuren des dritten Bindungsmotivs noch weitere Aminosäuren des APC-Proteins in dieser Region enthält. Man könnte vermuten, dass vielleicht weitere Aminosäuren notwendig sind, um dem Bindungsmotiv die passende Flexibilität zu geben, damit es an β -Catenin binden kann. Das synthetische Peptid war zudem nicht phosphoryliert, und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Einbringen von Phosphatgruppen eine nicht messbare Affinität zwischen den beiden Interaktionspartnern erhöht hätte.

Da innerhalb des Wnt-Signalwegs, wie in anderen Signalwegen auch, die Phosphorylierung verschiedener Aminosäurereste wie Serine oder Threonine eine bedeutende regulatorische Rolle spielt, sollte dieser Einfluss ebenfalls untersucht werden. Hierfür wurden ausgehend von APC1449-1536 zwei Mutanten hergestellt, die jeweils ein konserviertes Serin zu einem Aspartat mutiert tragen (APCS1505D und APCS1507D). Dass die konservierten Serinreste eine große Rolle innerhalb der 20-Aminosäure-Repetitionen des APC-Proteins spielen, zeigten auch Untersuchungen von Rubinfeld 1997. In der Studie wurden die Serine 1385, 1387 und 1391 des zweiten 20-Aminosäure-Bindungsmotivs zu Alanin mutiert. Das Proteinkonstrukt enthielt zusätzlich noch die nativen dritten bis siebten 20-Aminosäure-Bindungsmotive, war aber trotzdem nicht mehr in der Lage, *in vivo* die β -Catenin-Konzentration zu regulieren. Diese Serine liegen innerhalb der GSK3 β -Phosphorylierungssequenz und werden innerhalb der Signalkaskade phosphoryliert.

In der Literatur wird die Methode der Phospho-Serin-Simulierung durch Aspartat beschrieben. Jabbur (2001) konnte zum Beispiel die Bedeutung des Serins an Position 20 in p53 zeigen: Durch das Einbringen des Aspartats hatte p53 einen stärkeren Einfluss auf die p21-Regulation und eine verminderte Affinität zum mdm2-Protein. Die Quantifizierung für unterschiedliche APC-Konstrukte mittels Mikrokalorimetrie brachte unterschiedliche Bindungsaffinitäten. Während mikrokolorimetrische Titration der β -Catenin-Armadillo-Region des unphosphorylierten APC1449-1536 eine Bindungsaffinität im mikromolaren Bereich ergab (16,7 μ M), zeigten die beiden Proteinkonstrukte mit substituierten Aspartatresten (APCS1505D und APCS1507D) eine ungefähr 18- bis 22fach höhere Affinität im nanomolaren Bereich (740 nM und 900 nM). Dieser Unterschied kann eindeutig auf die Anwesenheit einer negativen Ladung durch Aspartat anstelle des konservierten Serins zurückgeführt werden.

Die Sequenzmotive verschiedener Bindungspartner des β -Catenins sind hoch konserviert (Abbildung 32). Vergleicht man die Aminosäuresequenz des APC1449-1536 mit der des E-Cadherins, fällt auf, dass die Positionen der mutierten Serine der Konstrukte APCS1505D und APCS1507D denen der Serine des E-Cadherins homolog sind, die phosphoryliert werden. Desweiteren zeigte Rubinfeld (1996) in qualitativen *in vivo* Experimenten, dass Phosphorylierungen innerhalb der APC-Bindungsregion zu einer verstärkten Bindungsaffinität führen.

E-Cadherin	673			Y	D	S	L	L	V	F	D	Y	E	G	pS	G	pS	E	A	A	S	L	pS	S	L	
xTCF3	15			N	D	E	L	I	R	F	K	D	D	E	G	E	Q	E								
hAPC-A	1019	G	E	L	D	T	P	I	N	Y	S	L	K	Y	S	D	E	Q	L	N	S	G	R	Q	S	
hAPC-B	1135	Y	E	D	D	K	P	T	N	Y	S	E	R	Y	S	E	E	E	Q	H	E	E	E	E	R	
hAPC-C	1154	E	E	E	E	R	P	T	N	Y	S	I	K	Y	N	E	E	K	R	H	V	D	Q	P	I	
hAPC-D	1171	R	H	V	D	Q	P	I	D	Y	S	L	K	Y	A	T	D	L	P	S	S	Q	K	Q	S	
dAPC-A	756	A	T	E	E	Q	P	I	D	Y	S	V	K	Y	S	E	N	A	T	K	T	S	T	Y	Q	
dAPC-B	781	T	D	L	D	Q	P	T	D	F	S	L	R	Y	A	E	N	Q	I	E	S	D	L	D	I	
eAPC-A	496	P	T	E	E	Q	P	I	D	Y	S	M	K	Y	M	E	H	K	P	N	S	S	K	T	F	
eAPC-B	521	I	D	L	D	Q	P	T	D	F	S	A	R	Y	K	E	R	R	S	A	Q	T	A	Q	P	
hAPC-1	1263	C	V	E	D	T	P	I	C	F	S	R	C	S	S	L	S	S	L	S	S	A	E	D	E	
hAPC-2	1377	Y	V	Q	E	T	P	L	M	F	S	R	C	T	S	V	S	S	L	D	S	F	E	S	R	
hAPC-3	1493	A	T	E	S	T	P	D	G	F	S	C	S	S	S	L	S	A	L	S	L	E	E	P	F	
hAPC-4	1644	C	V	E	G	T	P	I	N	F	S	T	A	T	S	L	S	D	L	T	I	E	E	P	P	
hAPC-5	1849	P	I	E	G	T	P	Y	C	F	S	R	N	D	S	L	S	S	L	D	F	D	D	D	D	
hAPC-6	1956	A	I	E	N	T	P	V	C	F	S	H	N	S	S	L	S	S	L	S	D	I	D	Q	E	
hAPC-7	2014	H	V	E	D	T	P	V	C	F	S	R	N	S	S	L	S	S	L	S	I	D	S	E	D	

Abbildung 32: Sequenzvergleich der Bindungsmotive der Armadillo-Domäne von β -Catenin. Neben den einzelnen Bindungsmotiven des APC-Proteins sind die Sequenzen von XTCF3 und E-Cadherin angegeben. Die konservierten Reste der APC-Bindungsmotive sind grün-blau unterlegt, wobei die Reste, die nur in den 15-Aminosäure-Repetitionen konserviert vorkommen, blau unterlegt sind. Für die 20-Aminosäure-Repetitionen sind diese entsprechend in gelb wiedergegeben. Dies beinhaltet das SLSSL-Motiv, das auch in E-Cadherin gelb unterlegt wurde. Die Box beinhaltet die Sequenzen, die in den jeweiligen Strukturen die gleiche Ausrichtung des C α -Rückgrates haben. Übernommen aus Spink *et al.*, 2001.

Negative Ladungen beeinflussen anscheinend viele Wechselwirkungen des β -Catenins, vor allem, wenn man als weitere Betrachtungsebene noch die Struktur des β -Catenins hinzuzieht (Abbildung 33). Das in der Arbeit verwendete β -Catenin-Armadillo-Konstrukt enthält die Aminosäuren 151 bis 666, die auch in der dreidimensionalen Kristallstruktur sichtbar sind (Huber *et al.*, 1997). Die Struktur zeigt, dass die einzelnen Sequenzmotive aus jeweils 42 Aminosäuren miteinander interagieren. Die gesamte Region ist so gefaltet, dass eine Domäne mit einem hydrophoben Inneren gebildet wird.

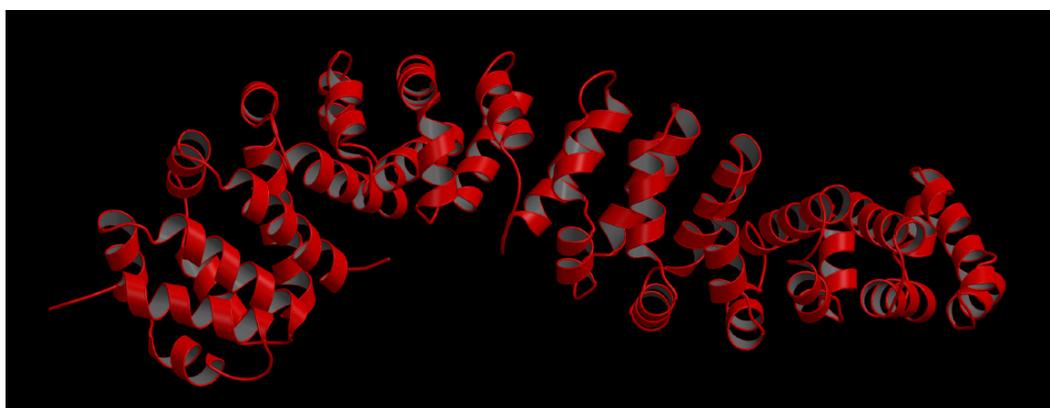


Abbildung 33: Struktur der Armadillo-Region von β -Catenin. Die Domäne besteht ausschließlich aus α -Helices, die sich zu einer rechtshändigen Superhelix zusammenlagern (aus Huber *et al.*, 1997).

Abbildung 34 zeigt einen Vergleich der unterschiedlichen Strukturen der β -Catenin-Interaktionspartner XTCF3, E-Cadherin und einer 15-Aminosäure-Repetition des APC-Proteins.

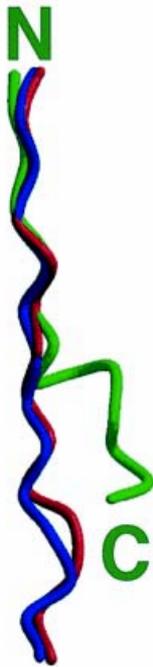


Abbildung 34: Vergleich der Positionen der C_{α} -Rückgrat-Atome der jeweiligen Liganden aus den Strukturen mit APC-E-Cadherin und XTCF3. APC (Aminosäuren 1021 bis 1034) ist in grün dargestellt, E-Cadherin (Aminosäuren 673 bis 686) in blau und XTCF3 (Aminosäuren 15 bis 28) in rot. Die N-terminalen Positionen sind in allen Liganden ähnlich, wohingegen die C-terminale Sequenz von APC abweicht. Übernommen aus Spink *et al.*, 2001.

Der N-terminale Bereich dieser Proteine bindet fast identisch, während es im Fall der 15-Aminosäure-Repetition ab der achten Aminosäure zu Veränderungen kommt. Der C-terminale Bereich ragt hier heraus und weicht von der Struktur der anderen beiden Interaktionspartner ab. Es fällt auf, dass das letzte Glutamat der 15-Aminosäure-Repetition wieder zum β -Catenin hinweist. Weis (2001) vermutete, dass es für die 20-Aminosäuresequenz des APC-Proteins, von denen es bisher noch keine Struktur gibt, möglicherweise zwei Konformationen geben könnte. Es wird angenommen, dass sich durch die Phosphatgruppen eine Änderung der Konformation im Vergleich zum unphosphorylierten Protein ergibt. Diese Vermutung lässt sich gut mit den unterschiedlichen Affinitäten der Konstrukte der dritten 20-Aminosäure-Repetition (APCS1505D und APCS1507D) aufgrund ihres simulierten Phosphats unterstützen. Die 20-Aminosäure-Bindungsmotive des APC-Proteins zeigen im phosphorylierten und unphosphorylierten Zustand unterschiedliche Konformationen, was die biochemischen Daten dieser Arbeit belegen. Betrachtet man die homologe Sequenz des E-Cadherins mit der dritten 20-Aminosäure-Repetition, könnte

man sich vorstellen, dass die 20-Aminosäuresequenz des APC-Proteins im nativen Zustand ähnlich an β -Catenin bindet, wie E-Cadherin. Aufgrund der homologen Aminosäuresequenz sind es zudem genau die konservierten Serinreste, die in den Konstrukten APCS1505D und APCS1507D durch ein Aspartat ersetzt sind, die an der entsprechenden Stelle im E-Cadherin phosphoryliert sind. Daher könnte man wiederum spekulieren, dass eine 20-Aminosäure-Repetition des APC-Proteins strukturell gesehen ähnlich an β -Catenin binden würde, wie auch E-Cadherin im phosphorylierten Zustand. Eine eindeutige Klärung dieser Frage ist aber nur mit der Strukturaufklärung des Komplexes mit einem phosphorylierten 20-Aminosäure-Bindungsmotiv mit dem β -Catenin möglich. Dennoch zeigen diese Ergebnisse die potentielle erhebliche biologische Relevanz des Phosphorylierungsmusters der unterschiedlichen Interaktionspartner und dessen Einfluss auf die Wnt-Signaltransduktionskaskade.

2. Der Einfluss N-terminaler β -Catenin Mutationen auf die APC-Interaktion

Verschiedene β -Catenin-Mutanten können dem APC-vermittelten Abbau entgehen (Morin *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde mit drei verschiedenen β -Catenin-Konstrukten gearbeitet, um den Einfluss der N-terminalen Mutationen genauer zu untersuchen. Die Proteine konnten in großen Mengen aus *E.coli* rekombinant gewonnen werden. Mit Hilfe von Bindungsstudien sollte untersucht werden, ob die β -Catenin-Mutanten S45 Δ und S45D eine gegenüber dem β -Catenin Wildtypprotein oder der β -Catenin Armadillo-Region veränderte Affinität zu einem APC-Bindungsmotiv haben. Eine quantitative Bestimmung mittels Mikrokalorimetrie sollte Aufschluss über mögliche Bindungsunterschiede geben. Die Analyse wurde exemplarisch für die drei β -Catenin Konstrukte Wildtyp, S45 Δ und S45D sowie die Interaktion mit dem APC1449-1536 Protein, welches die dritte 20-Aminosäure-Repetition enthält, durchgeführt.

Bei dem Vergleich der Bindungsaffinitäten fällt auf, dass sich die Dissoziationskonstanten des β -Catenin-Wildtyps und die der S45 Δ Mutante nicht voneinander unterscheiden (K_D : 4,6 μ M und K_D : 4,9 μ M). Leider war es nicht möglich, eine Dissoziationskonstante für die S45D Mutante zu bestimmen, da das Protein während der Messung präzipitierte. Diese Beobachtung kann man durch ein stark verändertes biochemisches Verhalten des β -Catenin S45D-Proteins interpretieren, da der Austausch nur einer Aminosäure, nämlich das Serin an Position 45 zu einem Aspartat, zu dieser drastischen Änderung im Verhalten während der ITC-Messung führt. Die Tatsache, dass das Bindungsverhalten zu APC1449-1536 der anderen beiden β -Catenin-Konstrukte im Vergleich identisch ist, lässt den Schluss zu, dass der N-

Terminus des β -Catenins wahrscheinlich keinen Einfluss auf die direkte APC- β -Catenin-Interaktion hat. Eine weitere Bestätigung dieser Aussage liegt auch in der Affinität des APC1449-1536 Proteins zur Armadillo-Region des β -Catenins (K_D : 16,7 μ M). Die Bindungsaffinität ist ebenfalls vergleichbar mit der für den β -Catenin-Wildtyp und der β -Catenin-Mutante S45 Δ , da man einen Faktor von 3,6 oder 3,4 als nicht signifikant betrachtet. Diese Variationen lassen sich durch verschiedene Proteinpräparationen oder auf kleine Unterschiede in den Proteinkonzentrationsbestimmungen begründen. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit der Struktur des β -Catenin-Komplexes mit der 15-Aminosäure-Repetition des APC-Proteins von Spink (2001) erklären, in der die Bindungsstelle der APC-Repetition ausschließlich in der Armadillo-Region des β -Catenins lokalisiert ist. Diese Region liegt in den in dieser Arbeit verwendeten β -Catenin-Konstrukten unverändert vor. Diese Erklärung trifft allerdings nicht für alle β -Catenin-Interaktionspartner zu. Eine neue Veröffentlichung von Chan (2002) zeigte, dass die β -Catenin-E-Cadherin-Interaktion durch N-terminale β -Catenin-Mutationen beeinflusst wird, obwohl die direkte Interaktionsdomäne von E-Cadherin bisher ebenfalls in der Armadillo-Region des β -Catenins lokalisiert wurde, was auch durch die Struktur des β -Catenin/E-Cadherin-Komplexes bestätigt wurde.

Die Beantwortung der Frage, welche Wechselwirkung direkt mit den N-terminalen Mutationen des β -Catenins beeinflusst wird, lässt sich wohl eher durch die Tatsache erhellen, dass die GSK3 β -Phosphorylierungssequenz des N-Terminus ein sechs Aminosäure-Ubiquitinylierungsmotiv enthält (Morin *et al.*, 1997). Dieses Motiv wurde als erstes in I κ B α beschrieben (Chen *et al.*, 1995). Es wird angenommen, dass markierte Proteine im phosphorylierten Zustand im Ubiquitin-Proteasom Signalweg abgebaut werden. Ergebnisse von Aberle (1997) und Orford (1997) bestätigen diese Annahme. Sie konnten zeigen, dass der Proteasom-Inhibitor ALLN zu einer Akkumulation von ubiquitinyliertem β -Catenin führte. Außerdem spielt β TRCP hier ebenfalls eine bedeutende Rolle, da Studien belegen konnten, dass dieses Protein an phosphoryliertes β -Catenin binden kann und es dem Ubiquitin-Ligase Komplex zuführt (Hart *et al.* 1999, Winston *et al.*, 1999).

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Aberle H., Bauer A., Stappert J., Kispert A. und Kemler R. (1997): beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16: 3797-804

Askjaer P., Jensen T. H., Nilsson J., Englmeier L. und Kjems J. (1998): The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem.* 273: 33414-22

Askjaer P., Bachi A., Wilm M., Bischoff F. R., Weeks D. L., Ogniewski V., Ohno M., Niehrs C., Kjems J., Mattaj I. W. und Fornerod M. (1999): RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase. *Mol. Cell Biol.* 19: 6276-85

Beavis R. C. und Chait B.T. (1990): Rapid, sensitive analysis of protein mixtures by mass spectrometrie. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 68-73

Begitt A., Meyer T., van Rossum M. und Vinkemeier U. (2000): Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10418-23

Behrens J., von Kries J. P., Kühl M., Bruhn L., Wedlich D., Grosschedl R. und Birchmeier W. (1996): Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382: 638-642

Behrens J., Jerchow B. A., Wurtele M., Grimm J., Asbrand C., Wirtz R., Kuhl M., Wedlich D. und Birchmeier W. (1998): Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC and GSK3beta. *Science* 280: 596-599

Berger B., Wilson D. B., Wolf E., Tonchev T., Milla M. und Kim P. S. (1995): Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8259-63

Beroud C. und Soussi T. (1996): APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acid Res.* 24: 121-124

Bhanot P., Brink M., Samos C. H., Hseih J. C., Wang W., Andrew D., Nathans J. und Nusse R. (1996): A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a wingless receptor. *Nature* 282: 225-230

Blom N., Gammeltoft S. und Brunak S. (1999): Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol.* 1999 294: 1351-62

Bodmer W., Bailey C., Bodmer J., Bussey H., Ellis A., Gorman P., Lucibello F., Murday V., Rider S. und Scambler P. (1987): Localisation of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328: 614-616

Bogerd H. P., Benson R. E., Truant R., Herold A., Phingbodhipakkiya M. und Cullen B. R. (1999): Definition of a consensus transportin-specific nucleocytoplasmic transport signal. *J Biol Chem.* 274 : 9771-7

Bourne H. R., Sanders D. A. und McCormick F. (1990): The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348: 125-32 *Review*

Boutros M. und Mlodzik M. (1999): Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mech Dev.* 83: 27-37 *Review*

Bradford M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 249-254

Brunet A., Kanai F., Stehn J., Xu J., Sarbassova D., Frangioni J. V., Dalal S. N., DeCaprio J. A., Greenberg M. E. und Yaffe M. B. (2002): 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol.* 156: 817-28

Brünger A. T., Adams P. D., Clore G. M., De Lano W. L., Gros P., Grosse-Kunstleve R. W., Jiang J. S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N. S., Read R. J., Rice L. M., Simonson T und Warren G. L. (1998): *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 54: 905-921

Burkhard P., Stetefeld J. und Strelkov S. V. (2001): Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* 11: 82-8

Cadigan, K. M. und Nusse R. (1997): Wnt signaling a common theme in animal development. *Genes & Development* 11: 3286-3305

Casanova J. E., Breitfeld P. P., Ross S. A. und Mostov K. E. (1990): Phosphorylation of the polymeric immunoglobulin receptor required for its efficient transcytosis. *Science* 48: 742-5

Cavallo R. A., Cox R. T., Moline M. M., Roose J., Polevoy G. A., Clevers H., Peifer M. und Bejsovec A. (1998): Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395: 604-8

Chan T. A., Wang Z., Dang L. H., Vogelstein B. und Kinzler K. W. (2002): Targeted inactivation of CTNNB1 reveals unexpected effects of beta-catenin mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8265-70

Chen Z., Hagler, J., Palombella V. J., Melandri F., Scherer, D., Ballard, D. und Maniatis Z. (1995): Signal induced site specific phosphorylation targets I κ B α to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes & Development* 9: 1586-1597

Cobianchi F., Karpel R. L., Williams K. R. Notario V. und Wilson S.H. (1988): Mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex protein A1. *J Biol. Chem.* 263: 1063-1071

Craig E., Zhang Z. K., Davies K. P. und Kalpana G. V. (2002): A masked NES in INI1/hSNF5 mediates hCRM1-dependent nuclear export: implications for tumorigenesis. *EMBO J.* 21: 31-42

Daniel J. M. und Reynolds A. B. (1995): The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin. *Mol. Cell Biol.* 15: 4819-24

Day C. L. und Alber T. (2000): Crystal Structure of the Amino-terminal Coiled-coil Domain of the APC Tumor Suppressor. *J Mol Biol.* 301: 147-156

Deka J., Kuhlmann J. und Müller O. (1998): A domain within the tumor suppressor protein APC shows very similar biochemical properties as the microtubule associated protein tau. *Eur. J. Biochem.* 253: 591-597

Dole, M. (1968): *J. Chem. Phys.* 49: 2240-2249

Drenth J. (1999): Principles of protein x-ray crystallography. 2. Auflage, Springer Verlag, New York

Ducruix A. und Giege R. (1992): Crystallisation of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach. *The Practical Approach Serie*, D. Rickwood B. D. James (Hrsg.), Oxford University Press, Oxford

Easwaran V., Song V., Polakis P. und Byers S. (1999): The ubiquitin-proteasome pathway and serine kinase activity modulate adenomatous polyposis coli protein-mediated regulation of beta-catenin-lymphocyte enhancer-binding factor signaling. *J Biol Chem.* 274: 16641-5

Fearnhead N. S., Britton M. P. und Bodmer W. F. (2001): The ABC of APC. *Human Molecular Genetics* 10: 721-733

Fodde R., Kuipers J., Rosenberg C., Smits R., Kielman M., Gaspar C., van Es JH., Breukel C., Wiegant J., Giles R. H. und Clevers H. (2001): Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol.* 3: 433-8

Fornerod M., Ohno M., Yoshida M. und Mattaj I. W. (1997): CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90: 1051-60

Fornerod M., van Baal S., Valentine V., Shapiro D. N. und Grosveld G. (1997): Chromosomal localization of genes encoding CAN/Nup214-interacting proteins--human CRM1 localizes to 2p16, whereas Nup88 localizes to 17p13 and is physically linked to SF2p32. *Genomics* 42: 538-40

Fornerod M., van Deursen J., van Baal S., Reynolds A., Davis D., Murti K. G., Fransen J. und Grosveld G. (1997): The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic

subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J.* 16: 807-16

Franceschi F. (1997): Crystallization of Biological Macromolecules (Chapter 2). Protein Structure Analysis, Preparation, Characterization and Microsequencing. *Springer Lab Manual*

Goldfarb D. S. (1997): Whose finger is on the switch? *Science* 276: 1814-6

Graham T. A., Weaver C., Mao F., Kimelman D. und Xu W. (2000): Crystall Structure of a β -Catenin/Tcf Complex. *Cell* 103: 885-896

Groden J., Thiveris A., Samowitz W., Carlson M., Gelbert L., Albertsen H., Joslyn G., Stevens J., Spirio L., Robertson M., Sargeant L., Krapcho K., Wolff E., Burt R., Hughes J. P., Warrington J., McPherson J., Wasmuth J., Le Paslier M. und White R. (1991): Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66 : 589-600

Hart M., Concordet J. P., Lassot I., Albert I., del los Santos R., Durand H., Perret C., Rubinfeld B., Margottin F., Benarous R. und Polakis P. (1999): The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* 9: 207-10

Henderson B. R. (2000): Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localisation and turnover. *Nature Cell Biol.* 2: 653-660

Henderson B. R. und Eleftheriou A. (2000): A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Exp Cell Res.* 256: 213-24

Holm L. und Sander C. (1998): Dictionary of recurrent domains in protein structures. *Proteins* 33: 88-96

Horii M., Nakatsuru S., Ichii S., Nagase H. und Nakamura Y. (1993): Multiple forms of the APC gene transcripts and their tissue specific expression. *Human Molecular Genetics* 2: 283-287

Huber A. H., Nelson J. W. und Weis W. I. (1997): Three-Dimensional Structure of the Armadillo Repeat Region of β -Catenin *Cell* 80: 871-882

Hülsken J., Birchmeier W. und Behrens J. (1994): E-Cadherin and APC compete for the interaction with β -catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 127: 2061-2069

Jabbur J. R., Huang P. und Zhang W. (2000): DNA damage-induced phosphorylation of p53 at serine 20 correlates with p21 and Mdm-2 induction *in vivo*. *Oncogene* 19: 6203-8

Johnson W. C. Jr. (1988): Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 26: 915-9160

Jones T. A. und Kjeldgaard M (1997): *Methods in Enzymology* 277: 173-208

Joslyn G., Carlson M., Thliveris A., Albertsen H., Gelbert L., Samowitz W., Groden J., Stevens J., Spirio L. und Robertson M. (1991): Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis coli gene. *Cell* 66: 601-613

Joslyn G., Richardson D. S., White R. und Alber T. (1993): Dimer formation by an N-terminal coiled coil in the APC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11109-11113

Kabsch W. (1993): *Journal of applied Crystallography* 25: 795-800

Kaplan K. B., Burds A. A., Swedlow J. R., Bekir S. S., Sorger P. K. und Näthke I. S. (2001). A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nature Cell Biol.* 3: 429-32

Kawasaki Y., Senda T., Ishida T., Koyama R., Morishita T., Iwayama Y., Higuchi O. und Akiyama T. (2000). Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signalling. *Science* 289: 1194-1197

Kinzler K., Nilbert M., Su L.-K., Vogelstein B., Bryan T., Levy D., Smith K., Preisinger A., Hedge P., McKechnie D., Finnear R., Markham A., Groffen J., Boguski M., Altschul S., Horii A., Ando H., Miyoshi Y., Miki Y., Nishisho I. und Nakamura Y. (1991): Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253: 661-665

Kinzler K. und Vogelstein B. (1996): Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* 87, 159-170

Kitagawa M., Hatakeyama S., Shirane M., Matsumoto M., Ishida N., Hattori K., Nakamichi I., Kikuchi A., Nakayama K. und Nakayama K. (1999): An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *EMBO J.* 18: 2401-10

Knapp S., Zamai M., Volpi D., Nardese V., Avanzi N., Breton J., Plyte S., Flocco M., Marconi M., Isacchi A. und Caiolfa V. R. (2001): Thermodynamics of the high-affinity interaction of TCF4 with beta-catenin. *J Mol Biol.* 306: 1179-89

Kohler M., Haller H. und Hartmann E. (1999): Nuclear protein transport pathways. *Exp Nephrol.* 7: 290-4

Kudo N., Matsumori N., Taoka H., Fujiwara D., Schreiner E. P., Wolff B., Yoshida M. und Horinouchi S. (1999): Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9112-7

Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-682

Lee S. H. und Hannink M. (2001): The N-terminal nuclear export sequence of IkappaBalpha is required for RanGTP-dependent binding to CRM1. *J Biol Chem.* 276: 23599-606

Leppert M., Dobbs M., Scrambler P., O'Connell P., Nakamura Y., Stauffer D., Woodward S., Burt R., Huges J. und Gardner E. (1987): The gene for adenomatous poliposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* 238: 1411-1413

- Lewis S. A., Wang D. und Cowan N. J. (1988):** Microtubule-Associated Protein MAP2 shares a Microtubule Binding Motif with the Tau Protein. *Science* 242: 936-939
- Lupas A. (1996):** Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci.* 21: 375-382
- Maccioni R. B., Rivas C. I. und Vera J. C. (1988):** Differential interaction of synthetic peptides from the carboxyl-terminal regulatory domain of tubulin with microtubule-associated proteins. *EMBO J.* 7: 1957-63
- Maccioni R. B. und Cambiazo V. (1995):** Role of Microtubule-Associated Proteins in the Control of Microtubule Assembly. *Physiol. Rev.* 75: 835-864
- Mattaj I. W. und Englmeier L. (1998):** Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem.* 67: 265-306 *Review*
- Matsumine A., Ogai A., Senda T., Okumura N., Satoh K., Baeg G.-H., Kawahara T., Kobayashi S., Okada M., Toyoshima K. und Akiyama T. (1996):** Binding of APC to the Human Homolog of the Drosophila Disk Large Tumor Suppressor Protein *Science* 272: 1020-1023
- Mayer M. P., Rudiger S. und Bukau B. (2000):** Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates. *Biol Chem.* 381: 877-85 *Review*
- McCrea P. D., Turck C. W. und Gumbiner B. (1991):** A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plankoglobin) associated with E-Cadherin. *Science* 254: 1359
- McKay R. M., Peters J. M. und Graff J. M. (2001):** The casein kinase I family in Wnt signaling. *Dev Biol.* 235: 88-96
- McPherson A. (1990):** Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.* 189: 1-23 *Review*

Miller J. R., Hocking A. M., Brown J. D. und Moon R. T. (1999): Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* 18: 7860-72 Review

Miyoshi Y., Nagase H., Ando H., Ichii S., Nakatsura S., Aoki T., Miki Y., Mori T. und Nakamura Y. (1992): Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Human Molecular Genetics* 1: 229-223

Morin P. J., Sparks A. B., Korinek V., Barker N., Clevers H., Vogelstein B. und Kinzler K. W. (1997): Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275: 1787-1790

Mowen K. und David M. (2000): Regulation of STAT1 nuclear export by Jak1. *Mol. Cell Biol.* 20: 7273-81

Munemitsu S., Souza B., Müller O., Albert I., Rubinfeld B. und Polakis P. (1994): The APC Gene Product Associates with Microtubules *in Vivo* and Promotes their Assembly *in Vitro*. *Cancer Res.* 54: 3676-3681

Munemitsu S., Albert I., Souza B., Rubinfeld B. und Polakis P. (1995): Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3046-50

Näthke I. S., Adams C. L., Polakis P., Sellin J. H. und Nelson W. J. (1996): The adenomatous polyposis coli tumorsuppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J. Cell Biol.* 134: 165-179

Neufeld K. L. und White R. L. (1997): Nuclear and cytoplasmatic localization of the adenomatous polyposis coli protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3034-3039

Neufeld K. L., Zhang F., Cullen B. R. und White R.L. (2000): APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. *EMBO Rep.* 6: 519-23

Neufeld K. L., Nix D. A., Bogerd H., Kang Y., Beckerle M. C., Cullen B. R. und White R. L. (2000): Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12085-90

Nigg E. A. (1997): Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*. 386: 779-87 *Review*

Ogonah O. W., Freedman R. B., Jenkins N. und Rooney R. C. (1995): Analysis of human interferon-gamma glycoforms produced in baculovirus infected insect cells by matrix assisted laser desorption spectrometry. *Biochem. Soc. Trans.* 23: 100

Orford K., Crockett C., Jensen J. P., Weissman A.M. und Byers S. W. (1997): Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem.* 272: 24735-8

Ozawa M., Baribault H. und Kemler R. (1989): The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* 8: 1711-7

Pai L. M., Orsulic S., Bejsovec A. und Peifer M. (1997): Negative regulation of Armadillo, a Wingless effector in Drosophila. *Development* 124: 2255-66

Peifer M., Berg S. und Reynolds A. B. (1994): A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* 76: 789-791

Peifer M. and Polakis P. (2000): Wnt Signaling in Oncogenesis and Embryogenesis – a Look Outside the Nucleus. *Science* 287: 1606-1609

Polakis P. (1997): The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta.* 1332: F127-47 *Review*

Polakis P. (2000): Wnt signaling and cancer. *Genes & Development* 14: 1837-1851

Richards S. A., Carey K. L. und Macara I. G. (1997): Requirement of guanosine triphosphate-bound ran for signal-mediated nuclear protein export. *Science* 276: 1842-4

Rittinger K., Budman J., Xu J., Volinia S., Cantley L. C., Smerdon S. J., Gamblin S. J. und Yaffe M. B. (1999): Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell.* 4: 153-66

Roose J., Molenaar M., Peterson J., Hurenkamp J., Brantjes H., Moerer P., van de Wetering M., Destree O. und Clevers H. (1998): The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395: 608-12

Rosin-Arbesfeld R., Townsley F. und Bienz M. (2000): The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature* 31: 406(6799): 1009-12

Rubinfeld B., Souza B., Albert I., Muller O., Chamberlain S. H., Masiarz F. R., Munemitsu S. und Polakis P. (1993): Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262: 1731-4

Rubinfeld B., Albert I., Portfiri E., Fiol C., Munemitsu S. und Polakis P. (1996): Binding of GSK3 β to the APC- β -Catenin Complex and Regulation of Complex Assembly. *Science* 272: 1023-1026

Rubinfeld B., Robins P., El-Gamil M., Albert I., Portfiri E. und Polakis P. (1997): Stabilization of β -catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275: 1790-1792

Rubinfeld B., Albert I., Porfiri E., Munemitsu S. und Polakis P. (1997): Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res.* 57: 4624-30

Rubinfeld B., Tice D. A. und Polakis P. (2001): Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase 1epsilon. *J Biol Chem.* 276: 39037-45

Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. und Ehrlich H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491

Sakana C., Weiss J. B. und Williams L. T. (1998): Bridging of beta-catenin and Glycogen synthase kinase-3beta by axin and inhibition of beta-catenin-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3020-3023

Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467

Satoh S., Daigo Y., Furukawa Y., Kato T., Miwa N., Nishiwaki T., Kawasoe T., Ishiguro H., Fujita M., Tokino T., Sasaki Y., Imaoka S., Murata M., Shimano T., Yamaoka Y. und Nakamura Y. (2000): AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet.* 24: 245-50

Seeling J.M., Miller J.R., Gil R., Moon T., White, T.R. und Virshup D.M. (1999): Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science* 283: 2089-2091

Shih I. M., Yu J., He T. C., Vogelstein B. und Kinzler K. W. (2000): The beta-catenin binding domain of adenomatous polyposis coli is sufficient for tumor suppression. *Cancer Res.* 60: 1671-6

Siegfried E., Chou T. B. und Perrimon N. (1992): wingless signaling acts through zeste-white 3, the Drosophila homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate. *Cell* 71: 1167-79

Smith K. J., Johnson K. A., Bryan T. M., Hill D. E., Markowitz S., Willson J. K. V., Paraskeva C., Petersen G. M., Hamilton S. R., Vogelstein B. und Kinzler K. W. (1993): The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2846-2850

Smith K. J., Levy D. B., Maupin P., Pollard T. D., Vogelstein B. und Kinzler K. W. (1994): Wild-type but not mutant APC associates with the microtubule cytoskeleton. *Cancer Res.* 54: 3672-3675

Spink K. E., Fridman S. G. und Weis W. I. (2001): Molecular mechanisms of beta-Catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC-beta-Catenin complex. *EMBO J.* 20: 6203-6212

Stade K., Ford C. S., Guthrie C. und Weis K. (1997): Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90: 1041-50

Stommel J. M., Marchenko N. D., Jimenez G. S., Moll U. M., Hope T. J. und Wahl G. M. (1999): A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* 18: 1660-72

Su L. K., Vogelstein B. und Kinzler K. W. (1993): Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262: 1734-1737

Su L. K., Johnson K. A., Smith K. J., Hill D. E., Vogelstein B. und Kinzler K. W. (1993): Association between Wild Type and Mutant APC Gene Products. *Cancer Res.* 53: 2718-2731

Su. L. K., Burrell M., Hill D. E., Gyuris J., Brent R., Wiltshire R., Trent J., Vogelstein B. und Kinzler K. W. (1995): APC binds to the Novel Protein EB1. *Cancer Res.* 55: 972-977

Szabo, A., Stolz, L. und Granzow, R. (1995): Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *J Mol Biol.* 207: 61-84

Terwilliger T. C. und Berendzen J. (1999): Evaluation of macromolecular electron-density map quality using the correlation of local r.m.s. density. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 55: 1872-7

van der Luijt R. B., Khan P. M., Vasen H. F., Tops C. M., van Leeuwen-Cornelisse I. S., Wijnen J. T., van der Klift H. M., Plug R. J., Griffioen G. und Fodde R. (1997): Molecular analysis of the APC gene in 105 Dutch kindreds with familial adenomatous

polyposis: 67 germline mutations identified by DGGE, PTT, and southern analysis. *Hum Mutat.* 9: 7-16

van Es J. H., Giles R. H. und Clevers H. C. (2001): The many faces of the tumor suppressor gene APC. *Exp Cell Research* 264: 126-34 Review

Vogelstein B. und Kinzler K. W. (1993): The multistep nature of Cancer. *Trends Genet.* 9: 138

Walon C., Kartheuser A., Michils G., Smaers M., Lannoy N., Ngounou P., Mertens G. und Verellen-Dumoulin C. (1997): Novel germline mutations in the APC gene and their phenotypic spectrum in familial adenomatous polyposis kindreds. *Hum Genet.* 100: 601-5

Webster M. T., Rozycka M., Sara E., Davis E., Smalley M., Young N., Dale TC. und Wooster R. (2000): Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. *Genes Chromosomes Cancer.* 28: 443-53

Winston J. T., Strack P., Beer-Romero P., Chu C. Y., Elledge S. J. und Harper J. W. (1999): The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination *in vitro*. *Genes & Development* 13: 270-83

Wiseman T., Williston S., Brandts J. F. und Lin L. (1989): Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter. *Analyt. Biochem.* 179: 131-137

Wong M. H., Hermiston M. L., Syder A. J. und Gordon J. I. (1996): Forced expression of the tumor suppressor adenomatous polyposis coli protein induces disordered cell migration in the intestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9588-9593

Yang-Snyder J., Miller J. R., Brown J. D., Lai C. J. und Moon R. T. (1996): A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol.* 6: 1302-1306

Yap A. S., Briehner W. M., Pruschy M. und Gumbiner B. M. (1997): Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr Biol.* 7: 308-15

Yost C., Torres M., Miller J. R., Huang E., Kimelman D. und Moon R. T. (1996): The axis-inducing activity, stability and subcellular distribution of β -catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes & Development* 10: 1443-1454

Zhang Y. und Xiong Y. (2001): A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 292: 1910-5

Zhang F., White R. L. und Neufeld K. L. (2000): Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12577-12582

Eigene Veröffentlichungen zum Thema dieser Arbeit:

Leroy K., Duyckaerts C., Bovekamp L., Müller O., Anderton B. H. und Brion J. P. (2001): Increase of adenomatous polyposis coli immunoreactivity is a marker of reactive astrocytes in Alzheimer's disease and in other pathological conditions. *Acta Neuropathol (Berl)*. 102: 1-10

Tickenbrock L., Cramer J., Vetter I. R. und Müller O. (2002): The coiled coil region 129-250 of the tumor suppressor protein APC: its structure and its interaction with crm-1. *J Biol Chem*. (in Druck)

Tickenbrock L., Cramer J., Vetter I. R. und Müller O. (2002): Structure of the aminoterminal nuclear export domain of the APC tumor suppressor protein. *Annals New York Academy of Science* (in Druck)

Tickenbrock L., Kößmeier K., Rehmann H., Herrmann C. und Müller O. (2002): The non-phosphorylated APC interacts with beta-catenin. (eingereicht)

Abkürzungen

A	Ampere
Amp	Ampicillin
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CD	Circulardichroismus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTE	1,4-Dithioerythriol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetic Acid
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie
FAP	Familiäre adenomatöse polyposis
GDP, GTP	Guanosin-5'-diphosphat, Guanosin-5'-triphosphat
GppNHP	Guansosin 5'-(β , γ -imido)triphosphat
GSH	Glutathion
GSK-3 β	Glycogensynthase-Kinase 3 β
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaar
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
LB	Luria Bertani (Medium)
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization time of flight
MCR	mutation cluster region
Met	L-Methionin
NES	Nukleäres Export Signal
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NTA	Nitrilotriacetat

OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Rotationen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SeMet	L-Seleno-Methionin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Alfred Wittinghofer für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung sowie für die stetige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Oliver Müller für die interessanten Forschungsthemen, die hervorragende Betreuung, viele lehrreiche Diskussionen und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Bei Dr. Ingrid Vetter möchte ich mich ganz herzlich für die Einführung in die Kristallographie bedanken, sowie für ihre geduldigen Erklärungen bezüglich kristallographischer Fragen. Ihre ständige Gesprächsbereitschaft war für das Gelingen dieser Arbeit sehr wichtig.

Prof. Dr. Jockusch und PD Dr. Bartsch danke ich vielmals für die bereitwillige Übernahme des Gutachtens.

Slava Chtarbova, Ingrid Hoffmann, Nadine Krutzner, Anette Langerak, Christian Lanckohr, Melanie Wagner, Alex Berndt und vor allem Janina Cramer und Katja Kößmeier möchte ich für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor danken sowie für die vielfältige Unterstützung und Hilfe während dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch Ingo, meinen Eltern und meiner Oma für Ihre dauerhafte Unterstützung und Ihr stetiges Verständnis.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Strukturelle Biologie des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie in Dortmund für das außergewöhnlich gute Arbeitsklima danken. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht.

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt habe.

Dortmund, 23.08.02

Die Arbeit ist auf alterungsbeständigem Papier gedruckt ISO 9706.

Ich versichere an Eides statt, dass die Drucklegung der Arbeit vom Promotionsausschuss genehmigt ist und die gedruckten Exemplare und die abgelieferte elektronische Version mit der Originalfassung vollständig übereinstimmen.