

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

Röntgenstrukturanalyse von Molybdän-haltigen Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen

Holger Dobbek

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der
Technischen Universität München zur Erlangung
des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huber
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
3. Univ.-Prof. Dr. H. Schmidbauer

Die Dissertation wurde am 24.10.2000 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 11.12.2000 angenommen.

meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 1997 bis Oktober 2000 in der Abteilung Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Robert Huber für die Überlassung dieses interessanten Themas, seine Unterstützung, die gewährte Freiheit und das mit diesem verbundene Vertrauen. Sein anhaltendes Interesse und Wohlwollen waren eine große Hilfe.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Mitstreitern Herrn Lothar Gremer, Frau Dr. Petra Hänzelmann und Herrn Prof. Dr. Ortwin Meyer, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Bayreuth für die vertrauensvolle, freundschaftliche und außerordentlich gute Zusammenarbeit. Ihrem Engagement und ihrem Können verdankt diese Arbeit ihr Zustandekommen.

Herrn Dr. Reiner Kiefersauer möchte ich danken für die freundschaftliche, ausdauernde und erfolgreiche Zusammenarbeit an der Transformation der CO-Dehydrogenase Kristalle.

Für die angenehme Zusammenarbeit und die ständige Einsatzbereitschaft danke ich ebenfalls Herrn Gleb Bourenkov und Herrn Dr. Hans Bartunik, MPG-ASMB Hamburg. Sie haben mit ihrer hervorragend betreuten *beamline* BW6, am DESY einen großen Teil der Arbeit erst ermöglicht.

Für die gewährte Hilfe zur Bewältigung technischer und bürokratischer Probleme bedanke ich mich herzlich bei Herrn Werner Dersch und Herrn Ottmar Paul, sowie Frau Renate Rüller und Frau Gina Beckmann. Ihre unverdrossene Bereitschaft den Stein immer wieder bergauf zu rollen ist für mich ein leuchtendes Beispiel preußischer Tugenden in Oberbayern.

Allen heutigen und ehemaligen Mitgliedern der Abt. Strukturforschung, insbesondere aber Gerd Bader, Dr. Markus Deibert, Dr. Lars Ditzel, Stefan Ehlert, Dr. Oliver Einsle, Dr. Erich Fritsche, Stefan Gerhardt, Jens Kaiser, Dr. Jörg Knäblein, Rupert Lang, Dr. Ulrich Rester, Dr. Sandra Ribeiro, Dr. Stefan Steinbacher und Michael Worbs gilt mein Dank für die freundschaftliche Atmosphäre und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Ein liebevoller Dank an Berta Maria Dias Pereira Martins für die gekonnte Entgegensetzung romanischen Temperaments in Zeiten von nordisch-slavischer Trübsinnigkeit.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Schwestern, danke ich für die fortwährende Unterstützung, die bewiesene Geduld und ihr Vertrauen.

LISTE DER ABKÜRZUNGEN	3
ZUSAMMENFASSUNG	5
SUMMARY	8
EINLEITUNG	10
MOLYBDOENZYME	10
DIE „EINKERNIGEN“ MOLYBDOENZYME	11
STRUKTUR DES MOLYBDOPTERIN-KOFAKTORS	12
MOLYBDÄN-HYDROXYLASEN	13
DIE ENZYME DER XANTHIN-OXIDASE/-DEHYDROGENASE FAMILIE	13
KUPFERPROTEINE	14
KUPFER IN DER NATUR	14
KUPFER IN KATALYSE UND ELEKTRONENTRANSPORT	15
MEHRKERNIGE ZENTREN	15
KOHLENMONOXID (CO)-DEHYDROGENASEN	20
NICKEL-HALTIGE CO-DEHYDROGENASEN	20
MOLYBDÄN-HALTIGE CO-DEHYDROGENASEN	21
ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
MATERIAL UND METHODEN	24
THEORETISCHER HINTERGRUND DER PROTEINKRISTALLOGRAPHIE	24
CRYOKRISTALLOGRAPHIE	24
KRISTALLTRANSFORMATION UND DERIVATISIERUNG	25
DATENSAMMLUNG UND –AUSWERTUNG	25
PATTERSON-SUCHTECHNIKEN	26
MAD	26
DICHTEMODIFIKATION	26
MODELLBAU UND VERFEINERUNG	27
STRUKTURANALYSE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG	27
EXPERIMENTELLER TEIL UND ERGEBNISSE	28
VERMESSUNG DER KRISTALLE	28
KRISTALLTRANSFORMATION UND DERIVATISIERUNG	28
KRISTALLTRANSFORMATION UNTER ANOXISCHEN BEDINGUNGEN	31
SELBSTROTATIONSFUNKTION	31
PATTERSON-SUCHE UND ANOMALE DISPERSION	32
STRUKTURLÖSUNG DER CO-DEHYDROGENASE VON O. CARBOXIDOVORANS	32
STRUKTURLÖSUNG DER CO-DEHYDROGENASE VON H. PSEUDOFLAVA	34
DICHTEMODIFIKATION UND PHASIERUNG	34
MODELLBAU UND VERFEINERUNG	35
INTERPRETATION DES AKTIVEN ZENTRUMS	36

ERSTE UNTERSUCHUNGEN ZUM AUFBAU DES AKTIVEN ZENTRUMS	36
WEITERE UNTERSUCHUNGEN DES AKTIVEN ZENTRUMS DER HOCHAKTIVEN CO-DEHYDROGENASE SPEZIES	37
STRUKTURBESCHREIBUNG DER CO-DEHYDROGENASE	40
DIE DIMERSTRUKTUR	40
DIE STRUKTUR DES MONOMERS	41
AUFBAU DER UNTEREINHEITEN	42
MOLYBDÄN UND KUPFER IM AKTIVEN ZENTRUM	49
DIE CO-DEHYDROGENASE VON HYDROGENOPHAGA PSEUDOFILAVA	50
KRISTALLOGRAPHISCHE STUDIEN ZUM REAKTIONSMECHANISMUS	55
INAKTIVE FORMEN DER CO-DEHYDROGENASE	61
STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG DES WEITEREN ELEKTRONENTRANSFERWEGES	63
STABILISIERUNG UND ZUGÄNGLICHKEIT DES ISOALLOXAZINRINGS, SOWIE KONFORMATIONELLE ÄNDERUNGEN IN UNTERSCHIEDLICHEN OXIDATIONSZUSTÄNDEN	65
DISKUSSION	68
METHODISCHE WEITERENTWICKLUNGEN	68
ZUORDNUNG DES ELEMENTTYPUS	68
OPTIMIERUNG DER DIFFRAKTIONSQUALITÄT VON PROTEINKRISTALLEN	69
GENAUIGKEIT DER VERFEINERTEN KOORDINATEN: SYSTEMATISCHE UND STATISTISCHE FEHLER	70
IST DIE CO-DEHYDROGENASE EIN SELENOPROTEIN ?	75
STRUKTURVERGLEICH DER CO-DEHYDROGENASEN MIT DER ALDEHYD-OXIDOREDUKTASE AUS DESULFOVIBRIO GIGAS	76
VERGLEICH DER FALTUNG VON M MIT ANDEREN FLAVOPROTEINEN	80
CO-DEHYDROGENASE ALS PROTOTYP FÜR DIE MOLYBDÄN-HYDROXYLASEN	82
KOORDINATIONSGEOMETRIE BEI MO-HALTIGEN PROTEINEN: EINHEIT STATT VIELFALT ? EINE VERZERRT TETRAEDRISCHE KOORDINATIONSGEOMETRIE BESCHREIBT ALLE MO-HALTIGEN ZENTREN	84
DIE KOMPONENTEN DES AKTIVEN ZENTRUMS	88
DER KATALYTISCHE MECHANISMUS	90
CO-OXIDATION	90
H ₂ -OXIDATION	93
[CuMo]-HALTIGE CO-DEHYDROGENASE ALS DIE SPÄTE BIOLOGISCHE ALTERNATIVE	95
6 LITERATURVERZEICHNIS	96
ANHANG	106
A. KRISTALLOGRAPHISCHE DATENTABELLE	106
B. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	106

Liste der Abkürzungen

Å	Angström
Abb.	Abbildung
5'-AMP	Adenosin-5'-monophosphat
5'-ADP	Adenosin-5'-diphosphat
5'-ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>β-barrel</i>	Tertiärstrukturelement von Proteinstrukturen
c	Konzentration
5'-CDP	Cytidin-5'-diphosphat
5'-CMP	Cytidin-5'-monophosphat
<i>cluster</i>	definierte Anordnung von Atomen
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
CO-Dehydrogenase	Kohlenmonoxid-Dehydrogenase
Cu	Kupfer
Cys	Cystein
cyt	Cytochrom
Da	Dalton
DCPIP	2,6-Dichlor-phenolindophenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
E _o '	Standardredoxpotential
EPR	Elektronenspinresonanz (<i>electron spin resonance</i>)
EXAFS	<i>extended X-ray absorption fine structure</i>
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
Fe	Eisen
FMN	Flavin-mononukleotid
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde
H ₂	molekularer Wasserstoff
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante

<i>loop</i>	Peptidkette ohne definierte Sekundärstruktur
M	molar
MAD	<i>multiple-wavelength-anomalous-dispersion</i>
MCD	Molybdopterin-cytosin-dinukleotid
MGD	Molybdopterin-guanin-dinukleotid
min	Minute
Mo	Molybdän
Moco	Molybdopterin-Molybdän-Kofaktor
MPT	Molybdopterin
NAD(P)	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-(2'-monophosphat)
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-(2'-monophosphat), reduzierte Form
Ni	Nickel
NMR	Magnetische Kernresonanz (nuclear magnetic resonance)
O	Sauerstoff
S	Schwefel
SDS	Natriumdodecylsulfat
Se	Selen
Ser	Serin
Tab.	Tabelle
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
v/v	Volumenprozent pro Volumeneinheit (volume per volume)
w/v	Gewichtsprozent pro Volumeneinheit (weight per volume)

Zusammenfassung

- CO-Dehydrogenasen katalysieren die Oxidation von CO mit H_2O zu CO_2 , $2H^+$ und $2e^-$. Es sind Mo- und Ni-haltige Formen bekannt, die keinerlei Ähnlichkeit auf der Ebene der Primärstruktur, sowie in der Zusammensetzung ihrer Kofaktoren besitzen.
- Mo-haltige CO-Dehydrogenase wird in die Enzym-Familie der Molybdän-Hydroxylasen eingeordnet und teilt neben einer ausgeprägten Homologie auf Primärstruktur-Ebene auch die Zusammensetzung der Kofaktoren mit den meisten Enzymen dieser Familie. Zu den Molybdän-Hydroxylasen gehören eukaryontische und bakterielle Enzyme wie Xanthin-Oxidase/-Dehydrogenase und Aldehyd-Oxidase.
- Mo-haltige CO-Dehydrogenase ist als ein Molybdo-Eisen-Schwefel-Flavoprotein bekannt.
- Die Kristallstruktur der CO-Dehydrogenase ist sowohl die erste Struktur einer CO-Dehydrogenase, wie auch das erste Molybdo-Eisen-Schwefel-Flavoprotein, dessen Struktur kristallographisch bestimmt wurde. Die Strukturbestimmung geschah unter Verwendung von Pattersonsuch- und MAD-Techniken. Die Charakterisierung der atomar/nahe atomar aufgelösten Strukturen verwendete die Kristalltransformation auf dem *free-mounting system* zur Optimierung der Diffraktionsqualität der Kristalle.
- Die Kristallstruktur der Mo-haltigen CO-Dehydrogenase von *Oligotropha carboxidovorans* wurde zu einer Auflösung von 1.09 Å für das 277 kDa Protein bestimmt und besteht aus einem Dimer aus Heterotrimeren (LMS)₂. Dabei trägt jede Untereinheit eine Art von Kofaktor. Die L-Untereinheit ist das Molybdoprotein und beherbergt das aktive Zentrum. Die M-Untereinheit ist ein Flavoprotein, welches ein nichtkovalent gebundenes FAD-Molekül trägt. Die S-Untereinheit ist das Eisen-Schwefel-Protein und trägt zwei spektroskopisch unterscheidbare [2Fe-2S]-Zentren.
- Das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase besteht aus einem neuartigen Cu(I)- und Mo(+VI/+IV)-haltigen zweikernigen Cluster, welcher über einen μ -Sulfido-Liganden verbrückt ist. Mo ist dabei verzerrt tetraedrisch von fünf Liganden umgeben, wobei die Dithiolen-Gruppe über einem Scheitelpunkt des Tetraeders sitzt. Neben den beiden Dithiolen-Schwefeln ist Mo von einem Oxo-, einem Hydroxo- und einem Sulfido-Liganden umgeben. Cu(I) ist vom μ -Sulfido-Liganden und S γ von Cys 388 verzerrt linear koordiniert. Dieser mit MAD-Methoden entdeckte Cluster ist der erste bekannte Mo- und Cu-haltige Cluster in einem Enzym und widerspricht der Bezeichnung der Molybdopterin-haltigen Enzyme als *mononuclear molybdenum enzymes*, welche zur Abgrenzung gegen die mehrkernigen Mo-haltigen Nitrogenasen gewählt wurde (Hille 1996).

- Kristallographische Studien zum Reaktionsmechanismus dieses Clusters beinhalten die Charakterisierung der oxidierten, der anoxisch CO-, H₂- und Dithionit-reduzierten, der CN⁻-inaktivierten und der n-Butylisonitril-(nBIC)-gebundenen Formen des Enzyms bei Auflösungen im atomaren und nahe atomaren Bereich.
- Ein auf der Basis dieser Ergebnisse entwickelter Reaktionsmechanismus basiert außerdem auf der Analogie des nBIC-gebundenen Zustandes mit einem möglichen Intermediat der CO Oxidation, sowie der bekannten Chemie von Cu(I)-Komplexen. Dabei findet die Bindung und Aktivierung des Substrats CO am substitutionslabilen Cu(I)-Komplex statt, und führt zur Öffnung des Clusters. Diese Öffnung resultiert in einer Destabilisierung des oxidierten Mo(+VI) mit folgender Reduktion des Mo und der Ausbildung einer „spectator-oxo“-Dreifachbindung am Mo.
- Der entworfenene Reaktionsmechanismus kann ebenfalls die Aktivierung und Oxidation von H₂ am [CuMo]-Cluster erklären.
- Aufgrund der hohen Konservierung der direkten Mo-Umgebung erscheint es wahrscheinlich, daß auch andere Mitglieder der Molybdän-Hydroxylase-Familie die Destabilisierung, sowie die Ausbildung eines „spectator oxo“-Liganden zur Stabilisierung des Übergangszustandes nutzen werden.
- Neben der Struktur der CO-Dehydrogenase von *O. carboxidovorans* wurde ebenfalls die Struktur des Enzyms aus *Hydrogenophaga pseudoflava* bestimmt. Die unter Mo-Mangel im Wachstumsmedium von *H. pseudoflava* synthetisierte inaktive CO-Dehydrogenase beinhaltet statt des Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid Kofaktors (MCD) nur Cytosin-Diphosphat. Aktive und inaktive Struktur wurden kristallographisch zu Auflösungen von 2.25-2.35 Å bestimmt. Die Mo-enhaltenden Formen der CO-Dehydrogenase-Strukturen aus beiden Organismen sind sich sehr ähnlich.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht bzw. sind zur Veröffentlichung vorbereitet:

Dobbek, H., L. Gremer, O. Meyer, R. Huber (1999). “Crystal structure and mechanism of CO-Dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selanylcycteine.” Proc. Nat. Acad. Sc. USA **96**(16): 8884-9.

Dobbek, H., L. Gremer, O. Meyer, R. Huber (1999).“ Crystal structure of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selanylcycteine.“ J. Inorg. Biochem. **74**: 116.

Dobbek, H. L. Gremer, R. Kiefersauer, O. Meyer, R. Huber. “Functional architecture of the novel binuclear [CuMo]-cluster in CO Dehydrogenase at 1.1 Å resolution” in preparation.

Dobbek, H., L. Gremer, O. Meyer, R. Huber. “Carbon Monoxide Dehydrogenase” Handbook of Metalloproteins, ed. K. Wieghardt, R. Huber, T.L. Poulos & A. Messerschmidt. John Wiley & Sons, in press.

Gremer, L., S. Kellner, H. Dobbek, R. Huber, O. Meyer (1999). A new type of flavin adenine dinucleotide-binding resolved in the molybdo iron-sulfur-flavoprotein Carbon Monoxide Dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans*. Flavins und Flavoproteins 1999: Proceedings of the thirteenth international symposium Konstanz, Germany. S. Ghisla, P. Kroneck, P. Macheroux und H. Sund. Berlin, Agency for scientific publications : 759-766.

Gremer, L., S. Kellner, H. Dobbek, R. Huber, O. Meyer (2000). "Binding of Flavin Adenine Dinucleotide to Molybdenum-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans*." J. Biol. Chem. **275**(3): 1864-1872.

Hänzelmann, P., H. Dobbek, L. Gremer, R. Huber, O. Meyer (2000). "The Effect of Intracellular Molybdenum in *Hydrogenophaga pseudoflava* on the Crystallographic Structure of the Seleno-Molybdo-Iron-Sulfur Flavoenzyme Carbon Monoxide Dehydrogenase ." J. Mol. Biol. **301**(5): 1221-1235.

Kiefersauer, R., M. E. Than, H. Dobbek, L. Gremer, M. Melero, S. Strobl, J. M. Dias, T. Soulimane, R. Huber (2000). "A novel free-mounting system for protein crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes." J. of Appl. Crystal. **33**: 1223-1230.

Summary

- CO-dehydrogenase catalyzes the oxidation of CO with H₂O yielding CO₂, 2H⁺ und 2 e⁻. Mo- und Ni-containing species are known und show no resemblance in their amino acid sequences or cofactor composition.
- Mo-containing CO-dehydrogenase has been grouped in the enzyme family of molybdenum hydroxylases und exhibits in addition to a marked sequence homology, also a common cofactor composition with most of these enzymes. The family of molybdenum hydroxylases comprises eu- und prokaryotic enzymes like xanthine oxidases/dehydrogenases und aldehyde oxidase.
- Mo-containing CO-dehydrogenases are known as molybdo-iron-sulfur-flavoproteins
- The determined crystal structure of the Mo-containing CO-dehydrogenase is the first structure of a CO-dehydrogenase as well as the first structure of a molybdo-iron-sulfur-flavoprotein. The structure has been determined employing Patterson-search techniques und MAD techniques. The characterization of the atomical/near atomical resolved structures has been enabled through crystal transformation on the free-mounting system for the optimization of diffraction quality.
- The crystal structure of the Mo-containing CO-dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans* has been determined to a resolution of 1.09 Å for the 277 kDa enzyme und is built up by a dimer of heterotrimers (LMS)₂. Each subunit carries one type of cofactor. The L subunit is the molybdoprotein und harbours the active site. The M subunit is the flavoprotein, carrying a non-covalently bound FAD molecule. The S subunit is the iron-sulfur protein und carries two spectroscopically distinguishable [2Fe-2S]-Clusters.
- The active site of CO-dehydrogenase consists of a novel Cu(I)- und Mo(+VI/+IV)-containing binuclear cluster, bridged by a μ-sulfido ligand. The five ligands around Mo form a distorted tetrahedral geometry with the dithiolene sulfurs straddling over one vertex of the tetrahedron. In addition to the two dithiolene sulfurs, Mo is ligated by one oxo-, one hydroxo- und one sulfido-ligand. Cu(I) is coordinated by two ligands in a distorted linear geometry, the μ-sulfido ligand und Sγ of Cys 388. The cluster has been discovered by MAD methods und is the first Mo- und Cu-containing cluster found in an enzyme. Its existence contradicts a central dogma of molybdopterin containing enzymes, reflected in their name *mononuclear molybdenum enzymes* in contrast to the polynuclear Mo-containing nitrogenases (Hille 1996).

- Crystallographic studies on the reaction mechanism of CO oxidation comprises the characterization of the oxidized, anoxigenically CO-, H₂- und dithionite reduced, CN⁻-inactivated und an n-butylisonitril (nBIC) bound state of the enzyme at resolutions in the atomic/near atomic range.
- A reaction mechanism developed on the basis of these results is based on the analogy between the nBIC bound state und a possible intermediate of CO oxidation, as well as on the known chemistry of Cu(I) complexes. Binding und activation of the substrate occurs at the substitution-labile Cu(I) complex, leading to the opening of the cluster. This opening results in the destabilization of oxidized Mo(+VI) with the subsequent reduction of Mo und the formation of a „spectator oxo“-triple bond at Mo.
- This reaction mechanism can also explain the activation und oxidation of H₂ at the [CuMo] cluster.
- Because of the remarkable conservation of the direct Mo environment it appears likely, that the destabilization of oxidized Mo together with the formation of a „spectator oxo“ triple bond for the stabilization of the reaction intermediate is also used by other members of the molybdenum hydroxylase family.
- In cases of Mo-shortage or -depletion in the growth media *Hydrogenophaga pseudoflava* synthesizes an inactive CO-dehydrogenase containing cytosin diphosphat instead of the molybdopterin-cytosin dinucleotid cofactor, which has been determined by X-ray crystallography together with the active form. The Mo-containing structures of the two carboxidotrophic bacteria are highly similar.

Einleitung

Molybdoenzyme

Molybdän ist das einzige Element der zweiten (4d)-Übergangsreihe des Periodensystems mit bekannter biologischer Funktion. Dies erklärt sich aus seiner guten Bioverfügbarkeit, sowie aus seiner Eignung zur Zweielektronen-Reduktion. Obwohl in der Erdkruste selten anzutreffen, ist Mo in seiner stabilsten, sechswertigen Form als Molybdat(+VI) bei pH 7 in Wasser gut löslich (Kaim und Schwederski 1995). Die Oxometallate des schwereren Homologen Wolfram, wie auch die Oxide der links vom Molybdän im Periodensystem stehenden Niob, Tantal, Zirconium und Hafnium sind dagegen bei pH 7 kaum löslich. Der Tendenz von Molybdän, bei niedrigeren Oxidationsstufen als +VI in wässrigen Lösungen Cluster zu bilden, können die Proteine als vielzählige Chelatsysteme entgegenwirken und damit die biochemisch gut nutzbaren Redoxpotentiale zwischen Mo(+VI)/(+V)/(+IV) von etwa -300 mV verwerten.

Verbreitet sind Molybdoproteine zumeist in Organismen aus mesophilem und thermophilem Habitat. Vergleichbare Enzyme aus Organismen hyperthermophiler Lebensbereiche nutzen statt Molybdän meist Wolfram als Bestandteil des aktiven Zentrums, was sich durch die bessere Löslichkeit der Sulfidowolframate, sowie das negativere Redoxpotential der Übergänge zwischen sechs-, fünf- und vierwertiger Form erklären läßt (Kaim und Schwederski 1995).

Molybdoproteine besitzen häufig weitere redoxaktive Kofaktoren, neben Molybdän werden Eisen-Schwefel-Zentren, Häm-Gruppen und Flavinadenindinukleotid (FAD) gefunden, mit denen zusammen es die kontrollierten Zweielektronenübergänge und Sauerstofftransfers vom Substrat zu räumlich getrennten Einelektronüberträgern, wie Cytochromen oder Ferredoxinen katalysieren kann. Gegenüber einigen anderen Elementen scheint sich die Verfügbarkeit von Molybdän antagonistisch zu verhalten, dies gilt u.a. für Kupfer in Gegenwart von Sulfid-Ionen (O'Dell Boyd 1997), sowie in einigen Fällen auch für Wolfram.

Man findet Molybdän in Enzymen in zwei Grundformen: a.) als Bestandteil des mehrkernigen aktiven Zentrums von Nitrogenasen, sowie b.) in den einkernigen Zentren von Oxomolybdänenzymen, die deshalb auch einkernige Molybdänenzyme genannt werden (Hille 1996). Von diesen Oxomolybdänenzymen sind inzwischen mehr als 30 verschiedene Arten bekannt, deren katalysierte Reaktionen im globalen Schwefel-, Stickstoff- und Kohlenstoffzyklus wichtige Rollen spielen (Hille 1996).

Die „einkernigen“ Molybdoenzyme

Die einkernigen Oxomolybdänenzyme werden aufgrund der katalysierten Reaktionen, der Sequenzhomologien, des Vergleichs der Untereinheiten- bzw. Domänen-Strukturen, der Kristall-Strukturen sowie EPR- und EXAFS-spektroskopischen Eigenschaften in Hydroxylasen und Oxotransferasen unterteilt (Hille 1996). Während als Hydroxylasen eine relativ homogene Gruppe von Enzymen bezeichnet werden, die neben ihrer Kofaktorzusammensetzung auch eine ähnliche Aminosäuresequenz auszeichnet, werden die Oxotransferasen weiter in die DMSO-Reduktase und die Sulfit-Oxidase Familie untergliedert. Die DMSO-Reduktase Familie umfaßt bakterielle Enzyme wie die dissimilatorische Nitrat- sowie die DMSO-Reduktase, während die Sulfit-Oxidase Familie eukaryontische Enzyme wie die Sulfit-Oxidase und die assimilatorische Nitrat-Reduktase umfaßt. Die echten Oxotransferasen, wie die Enzyme der DMSO-Reduktase Familie und der Sulfit-Oxidase Familie auch genannt werden, katalysieren den Transfer eines Sauerstoffatoms von bzw. zu einem verfügbaren Elektronenpaar des Substrats.

Im Laufe der letzten fünf Jahre wurden zahlreiche einkernige Molybdänenzyme kristallographisch aufgeklärt (Abb.1).

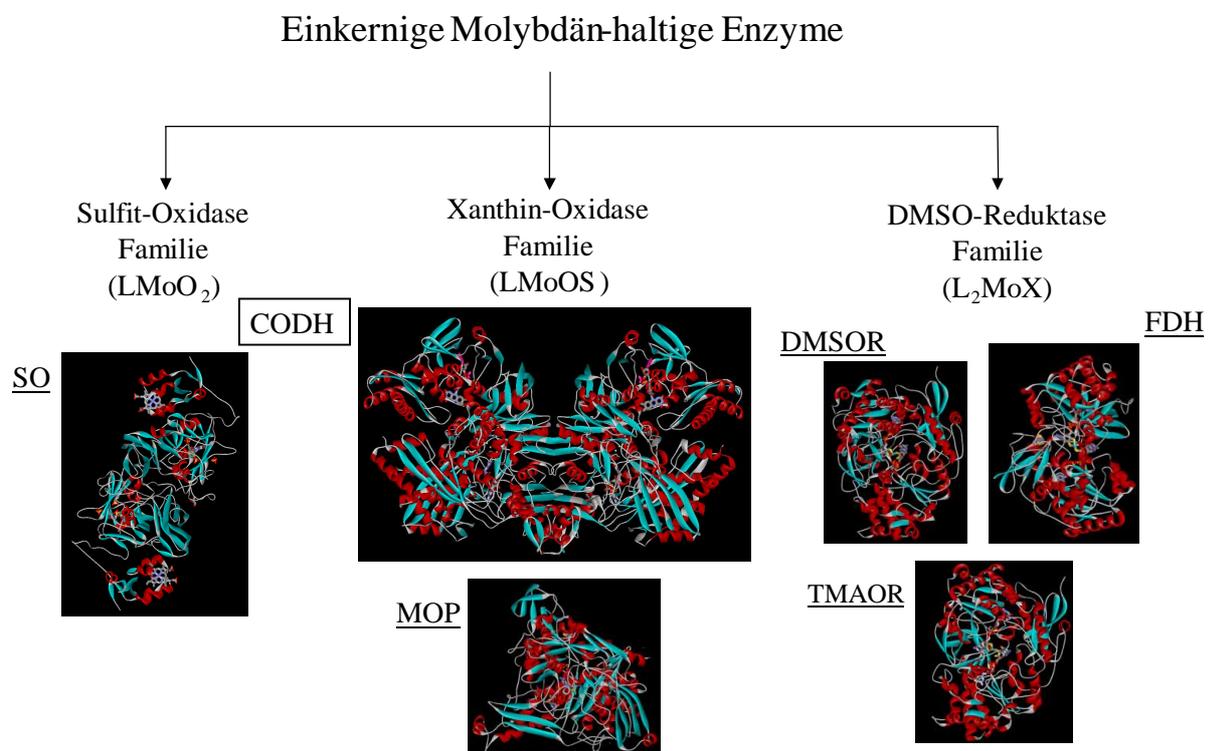


Abbildung 1: Molybdoenzyme. Von links nach rechts: Sulfit-Oxidase (SO) (Kisker, Schindelin et al. 1997), CO-Dehydrogenase (CODH) (Dobbek, Gremer et al. 1999), Aldehyd-Oxidoreduktase (MOP) (Romao, Archer et al. 1995), DMSO-Reduktase (DMSOR) (Schindelin, Kisker et al. 1996), Formiat-Dehydrogenase (FDH) (Boyington, Gladyshev et al. 1997), TMAO-Reduktase (Dos Santos, Iobbi-Nivol et al. 1998).

Es wird erwartet, daß die Mitglieder der einzelnen Familien ähnliche Kofaktoren bzw. aktive Zentren (Abb.2) besitzen.

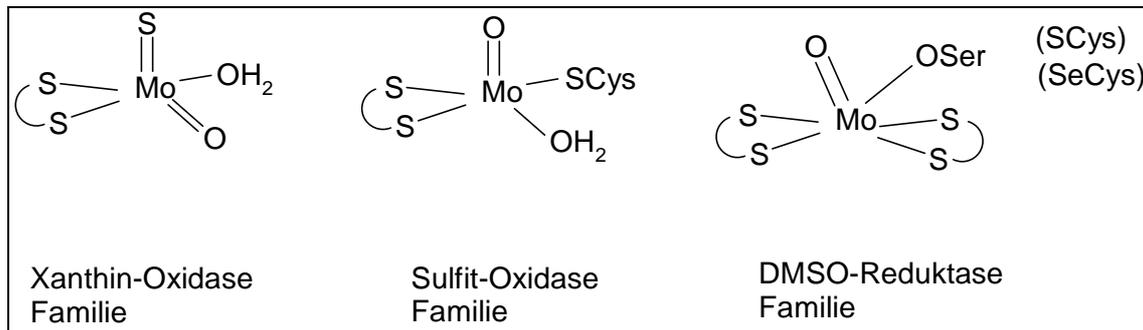


Abbildung 2: Die drei Hauptfamilien der einkernigen Molybdoproteine (n. (Hille 1996)). Die drei Familien der einkernigen Molybdoproteine werden nach den von ihnen katalysierten Reaktionen, Sequenzhomologien und vermuteten Mo-Liganden eingeteilt.

Struktur des Molybdopterin-Kofaktors

Die dreidimensionale Struktur des Mo-Molybdopterin Kofaktors (Abb.3) konnte 1995 mit der Struktur der Aldehyd-Oxidoreduktase von *Desulfovibrio gigas* (Romao, Archer et al. 1995) zum erstenmal gezeigt werden. Die trizyklische Ringstruktur wurde zuvor schon in der Struktur eines Wolfram-haltigen Enzyms, der Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Pyrococcus furiosus* entdeckt (Chan, Mukund et al. 1995). In allen nun bekannten Enzymen hat der Molybdän-Kofaktor die gleiche Struktur, bestehend aus einem Organometallo-Komplex aus Molybdän und einem Pterin-Derivat. Beide liegen in der Molybdän-Hydroxylase und Sulfit-Oxidase Familie in einer 1:1 Stöchiometrie vor. Das Pterin ist ein 2-Amino-4-Hydroxy-Pteridin mit einer C₄-Alkyl-Seitenkette an der Position 6. Der Pyran-Ring wird dabei formal durch die Kondensation der 3'-OH-Gruppe der C₄-Seitenkette des Pterin-Rings mit dem C7-Atom des Pterin-Nukleus gebildet. Die Position C1' und C2' des Pyran-Rings sind sp²-hybridisiert und tragen in cis-Konfiguration je einen Schwefel-Liganden. Die Schwefel dieser Dithiolenfunktion komplexieren das Molybdän-Ion. Die C4'-Phosphat-Gruppe bildet mit der 5'-Phosphat-Gruppe des 5'-CMP im Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid (MCD) Kofaktor eine Pyrophosphat-Brücke aus (Romao, Archer et al. 1995) (Huber, Hof et al. 1996).

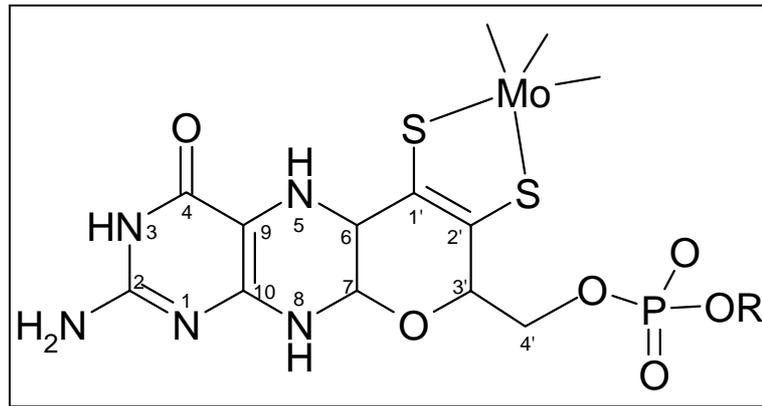


Abbildung 3: Struktur des Mo-gebundenen Molybdopterin-Kofaktors. Zusätzlich zur Pterin-Grundstruktur findet man den Pyranring, der die Mo-koordinierende Dithiolen-Gruppierung trägt. Die Bezeichnung Molybdopterin-Kofaktor bezieht sich nur auf die organische Komponente des aktiven Zentrums.

Der an die Phosphat-Gruppe des Molybdopterins gebundene Rest unterscheidet sich in den Familien, wie auch in den Enzymen, abhängig vom Organismus aus dem sie isoliert wurden. Während Enzyme aus eukaryontischen Systemen den Kofaktor in der oben dargestellten Form besitzen (R=H) (Abb.3), kann man in prokaryontischen Systemen auch die Dinukleotide von Guanin, Cytosin, Adenin oder Hypoxanthin finden.

Der Trizyklus ist deutlich nicht planar, sowohl im zentralen Pyrazinring als auch im Pyranring. Der Pyranring befindet sich in einer *half-chair* Konformation, die deutlich von der Ebene des Pterinsystems abweicht und ist gegenüber der Ebene des Pterinsystems um $\sim 30-60^\circ$ geneigt.

Obwohl die biochemische Bedeutung des Kofaktors nicht vollständig verstanden ist, stabilisiert er offensichtlich die Proteinkonformation und kann an der Weitergabe von Elektronen an andere Kofaktoren beteiligt sein. Die konformationelle Flexibilität des Kofaktors erlaubt zudem die Modulation des Redoxpotentials des Molybdänions durch die relative Lage der Dithiolen-Liganden zum Molybdän.

Molybdän-Hydroxylasen

Die Enzyme der Xanthin-Oxidase/-Dehydrogenase Familie

Die Xanthin-Oxidase Familie beinhaltet Enzyme wie CO-Dehydrogenase, Xanthin-Oxidase/-Dehydrogenase, Aldehyd-Oxidoreduktase, Nikotinat-Dehydrogenase, 6-Hydroxy-nikotinat-Dehydrogenase, Nikotin-Dehydrogenase, Chinolin-2-Oxidoreduktase, Isochinolin-1-Oxidoreduktase, Chinolin-4-carboxylat-2-Oxidoreduktase, Chinaldin-4-Oxidoreduktase, Chinaldinsäure-4-Oxidoreduktase, Picolinat-Dehydrogenasen und (2R)-Hydroxy-carboxylat-Oxidoreduktase. Diese Enzyme katalysieren im allgemeinen Hydroxylierungen gemäß der Reaktion ($R-H + H_2O \rightarrow R-OH + 2 H^+ + 2 e^-$), wobei sie, anders als z.B. Mono- und Dioxygenasen, Wasser als Sauerstoffquelle nutzen (Hille 1996). Die Reoxidation des reduzierten

Enzyms kann durch O_2 als Oxidationsmittel erfolgen, wobei Peroxid oder Superoxid produziert werden.

Die katalytische Reaktion kann aus der Perspektive des Enzyms in zwei Halbzyklen unterschieden werden. In der reduktiven Halbreaktion nimmt Mo zwei Elektronen auf, während das Substrat hydroxyliert wird. Die anschließende oxidative Halbreaktion besteht aus dem Transfer der Elektronen über die weiteren Kofaktoren zu einem externen Redoxpartner und führt zur Wiederherstellung des aktiven Zentrums.

Die Molybdänhydroxylasen besitzen als prosthetische Gruppen typischerweise neben dem Molybdopterin-Kofaktor, zwei spektroskopisch unterscheidbare [2Fe-2S]-Cluster sowie FAD. Einigen Enzyme wie z.B. der Aldehyd-Oxidoreduktase von *D. gigas* (Romao, Archer et al. 1995) fehlt die Flavindomäne, bzw. Flavin-Untereinheit, die Xanthin-Dehydrogenase aus *Veilonella atypica* besitzt dagegen nur einen [2Fe-2S]-Cluster (Gremer und Meyer 1996). Während eukaryontische Mo-Hydroxylasen aus einem Polypeptid-Strang pro Monomer bestehen, besitzen viele der prokaryontischen Hydroxylasen, bei ähnlicher Gesamtgröße, eine Untereinheiten-Struktur, die maximal drei Untereinheiten pro Monomer umfassen (Hille 1996).

Die Zuordnung von Molybdoenzymen zur Xanthin-Oxidase Familie wird meist aufgrund von Sequenzhomologien, oder wo diese fehlen, nach ihrer Reaktivität gegenüber Cyaniden durchgeführt. Die Inaktivierung durch Cyanid-Ionen wird auf die Bildung von Thiocyanat-Anionen zurückgeführt (Bray 1975; Coughlan, Johnson et al. 1980), die aus der Reaktion von Cyanid mit einem Sulfido-Liganden des Molybdäns entstehen. Dementsprechend gilt das Vorhandensein dieses Sulfido-Liganden als Merkmal der Xanthin-Oxidase Familie und seine Präsenz als essentiell für die Katalyse.

Kupferproteine

Kupfer in der Natur

Kupfer wird in zahlreichen biologischen Systemen gefunden, wo es sowohl von struktureller wie katalytischer Bedeutung sein kann und als Cu(I/II) auftritt.

Kupfer tritt in allen biologischen Reichen (Archäen, Bakterien und Eukaryonten) auf. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften, wie auch dem Vorkommen des Elements, kann man schließen, daß Kupfer erst spät, nach der Oxygenierung der Atmosphäre seine heute bekannte biologische Bedeutung erlangte (da Silva und Williams 1994).

Kupfer in Katalyse und Elektronentransport

Kupfer wird in vielfältigen Enzymen gefunden, die, nach bisherigem Wissen, ausschließlich auf Reaktionen mit molekularem Sauerstoff oder Stickoxiden als Substrat oder Elektronenakzeptor beschränkt sind (Messerschmidt 1998).

Für die Koordination von Kupfer werden unterschiedliche Geometrien gefunden, wobei die Anzahl, wie auch die Natur der Liganden von der Oxidationsstufe des Metalls abhängt. Nach dem HSAB-Konzept von Pearson sollte dabei das weichere Cu^+ weiche Liganden wie Schwefel-Ionen oder die Aminosäuren Cys, bzw. Cys^- und Met bevorzugen. Das härtere Cu^{2+} wird dagegen bevorzugt von Sauerstoff- oder Stickstoff-Atomen oder -Ionen koordiniert. Im Falle geringer sterischer Hinderung ist die bevorzugte Koordination von Cu^+ eine tetraedrische Anordnung, trigonal planare und lineare Koordinationen sind möglich, aber selten. Liganden um Cu^{2+} bevorzugen dagegen eine quadratisch-planare Anordnung, wobei aber auch verzerrt tetraedrische, quadratisch pyramidale und verzerrt oktaedrische Geometrien gefunden werden (Messerschmidt 1998).

Kupfer kommt in homometallischen, wie heterometallischen Zentren vor. Klassische Homometallzentren sind dabei:

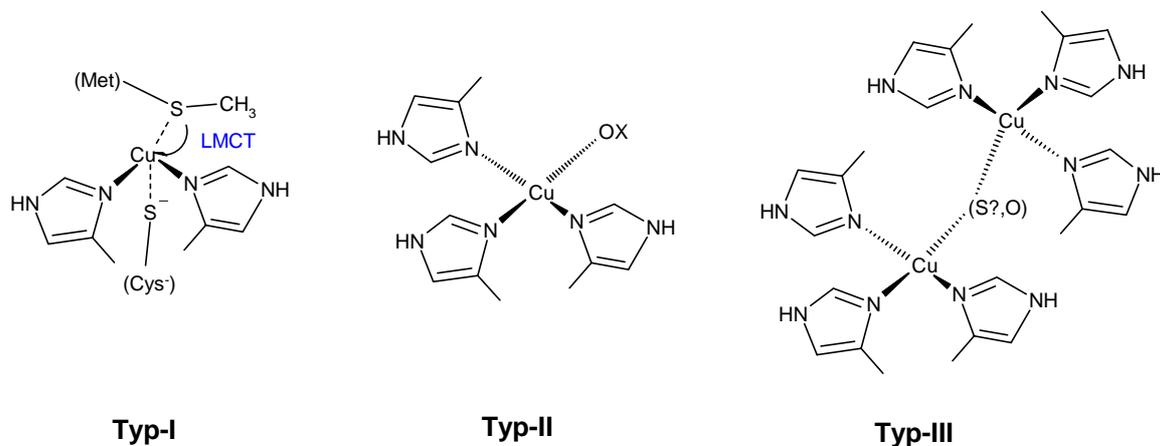


Abbildung 4: Klassische Kupferzentren (nach (Kaim und Schwederski 1995)). Neben den drei häufig vorkommenden, klassischen Kupferzentren gibt es weitere mehrkernige Zentren.

Mehrkernige Zentren

Mehrkernige Metallzentren findet man sowohl in den aktiven Zentren von Enzymen als auch zur Strukturgebung und im Elektronentransport von Proteinen. Während ihre Rolle im Elektronentransport als teilweise verstanden gelten kann, ist ihre Bedeutung in der Katalyse in den meisten Fällen unklar. Auffallend ist das Vorkommen von mehrkernigen Übergangsmetall-Zentren wo es um die Aktivierung und redoxkatalytische Umsetzung kleiner Moleküle wie molekularem Stickstoff (N_2) in Dinitrogenasen (Kim, Woo et al. 1993), molekularem Wassertoff

(H₂) in Hydrogenasen (Volbeda, Charon et al. 1995) (Peters, Lanzilotta et al. 1998), molekularem Sauerstoff (O₂) in Cytochrome c Oxidasen (Tsukihara, Aoyama et al. 1996) und Kohlenmonoxid (CO) in Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen (CO-Dehydrogenasen) geht.

Kupfer-haltige Zentren

Kupfer-haltige Proteine enthalten neben einkernigen Typ-1 und Typ-2 Zentren (Abb.4) auch mehrkernige Cu-Zentren, bei denen die homonuklearen Zusammensetzungen dominieren. Bekannte mehrkernige Zentren sind z.B. das Typ-3 Cu-Zentrum mit zwei Cu(II)-Ionen, die antiferromagnetisch gekoppelt sind, sowie das violette Cu_A-Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase und N₂O-Reduktase mit delokalisiertem, gemischtvalentem Cu(1.5)/Cu(1.5) System (ebenfalls antiferromagnetisch gekoppelt). Diese Zentren werden durch Atome naher Aminosäuren wie dem Sγ von Cystein Resten verbrückt.

Ein bekanntes heteronukleares Cu-haltiges Metallzentrum, das Cu_B-Fe_{häm3} Paar im aktiven Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase besteht aus einem antiferromagnetisch gekoppelten Cu in 4.5 Å Distanz von Fe₃. Die Zuordnung eines Brückenliganden in diesem Zentrum ist nicht eindeutig, doch ein unterschiedlich stark protoniertes, teilweise ungeordnetes Oxid-Ion wird als Bestandteil der meisten hochaufgelösten Zentren beschrieben. Ein heteronukleares Zentrum besitzt ebenfalls die Cu-, Zn-haltige Superoxid-Dismutase, in der die beiden Metallzentren über einen Hist-Rest verbrückt sind. Kürzlich wurde die Existenz eines weiteren heterometallischen Mo- und Cu-haltigen Clusters auf der Basis spektroskopischer Untersuchungen (EXAFS) vorgeschlagen (George, Pickering et al. 2000), dessen Funktion allerdings unklar ist. Eine Beteiligung am Elektronentransport erscheint wahrscheinlich.

Eisen-Schwefel-haltige Zentren

Eisen-Schwefel-Proteine werden zumeist für Einelektronen-Übertragungen bei negativem Redoxpotential genutzt, können aber auch eine redox- oder nichtredoxkatalytische Funktion haben. Die Sulfid- und Eisen-Ionen sind aus Ferredoxinen reversibel extrahierbar und das verbliebene Apoenzym kann mit externem S²⁻ und Fe^{2+/3+} rekonstituiert werden.

Ihr Vorkommen in hyperthermophilen und anaeroben Organismen sowie ihr niedriges Redoxpotential lassen auf eine wichtige Rolle von Fe/S-Clustern in der frühen Evolution schließen, in Reaktionen, die am Beginn des chemolithoautotrophen Stoffwechsels gestanden haben könnten.

Fe liegt in einer verzerrt tetraedrischen Koordination mit vier Schwefelatomen vor. Die Fe-Atome haben dabei aufgrund der um die Hälfte

verringerten Ligandenfeld-Aufspaltung in der Tetraedersymmetrie gegenüber derjenigen in der Oktaedersymmetrie durchgängig high-spin Konfiguration.

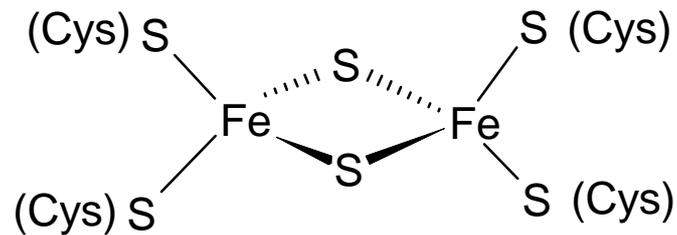


Abbildung 5: [2Fe-2S]-Zentrum. Jedes der beiden Fe-Ionen ist verzerrt tetraedrisch von vier Schwefel-Liganden umgeben.

Der einfachste Fe-haltige Cluster ist der [2Fe-2S]-Cluster (Abb.5) mit verbrückenden μ_2 -Sulfid-Ionen, die auch als anorganischer oder säurelabiler Schwefel bezeichnet werden.

Aufgrund der elektrostatischen und strukturellen Asymmetrie sind die beiden Fe-Atome nicht äquivalent. Die Reduktion des Clusters führt von einem Fe(III)/Fe(III)-System zu einem Fe(III)/Fe(II)-System mit lokalisierten Ladungen. Mössbauer-, NMR- und ESR-spektroskopische Untersuchungen legen eine Beschreibung mit lokalisierten Valenzen nahe (Dugad, La Mar et al. 1990; Achim, Golinelli et al. 1996).

Der häufigste und stabilste Typus der mehrkernigen FeS Zentren ist der [4Fe-4S]-Typ. Er bildet in erster Näherung einen Tetraeder mit den μ_3 -Sulfidionen auf den Tetraederflächen und dient meist der Elektronenübertragung bei negativem Redoxpotential (bis -0.7 V).

Der Ladung des oxidierten Clusters liegt bei -2 mit zwei Paaren von Eisendimeren etwa gleicher Isomerieverschiebung (Mössbauer-Spektroskopie) entsprechend einer Oxidationsstufe von $+2.5$ für Fe, d.h. es liegen gemischtvalente Fe(II)/Fe(III) Paare mit weitgehender Elektronendelokalisation bei effektiver Spinpaarung vor. Der Grund für die Delokalisation (Resonanz) bei [4Fe-4S]-Zentren im Gegensatz zur lokalisierten Ladung von [2Fe-2S]-Zentren liegt wahrscheinlich in einer strukturell bedingten Orthogonalität der Metallorbitale, die über supraaustauschende Sulfid-Brücken wechselwirken. Ein begünstigender Effekt für schnellen Elektronentransfer sind die geringen Geometrieänderungen des Zentrums bei Reduktion/Oxidation.

Die Zahl hydrophober Reste, sowie die verminderte Zugänglichkeit von Wasser scheinen Stabilität und Redoxpotential der Cluster zu bestimmen (Stephens, Jollie et al. 1996).

[3Fe-4S]-Systeme findet man außer bei mikrobiellen Ferredoxinen auch in der Aconitase (Aconitat-Hydratase/-Isomerase), wo sie in einer Nichtredox-Reaktion die Einstellung des Gleichgewichts im Citrat-Zyklus bewirken. [3Fe-4S]-Systeme treten im Austausch neben labilen [4Fe-4S]-Clustern auf (Bian und Cowan 1999).

Komplexere [xFe-yS]-Cluster findet man im P-Cluster der Nitrogenasen und dem H-Cluster der Hydrogenasen, der aus einem sulfid-verbrückten [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Cluster besteht, sowie im Prisman-Protein, welches einen 4Fe-Cluster enthält, der μ_2 -Sulfido und μ_2 -Oxo Brücken enthält und durch drei Cys-Reste, ein Cys-Persulfid, zwei Glu-Reste und ein His-Rest gebunden ist (Aktuelle Reviews: (Sticht und Roesch 1998), (Johnson 1998), (Beinert 2000)).

Mo-haltige Zentren

Das einzige bislang bekannte mehrkernige enzymatische Mo-haltige Zentrum wird in Nitrogenasen gefunden. Dieses Enzym wird aus stickstofffixierenden Bakterien isoliert und enthält Mo als Teil eines mehrkernigen Clusters aus Eisen, Schwefel und Molybdän. Die Nitrogenase setzt sich aus einem FeMo-Protein (Kim, Woo et al. 1993) und einem Fe-Protein (Georgiadis, Komiya et al. 1992) zusammen. Das homodimere Dinitrogenase-Reduktase Protein besitzt einen [4Fe-4S]-Kuban Cluster, während das $\alpha_2\beta_2$ Tetramer der Dinitrogenase ein FeMo-Protein mit zwei verschiedenen Clustern beinhaltet. Der P-Cluster besteht aus zwei über Thiolgruppen verbrückten [4Fe-4S]-Clustern. Der FeMo-Kofaktor besteht aus einem [4Fe-3S]-Cluster, der über drei Schwefelatome mit einem [Mo-3Fe-3S]-Cluster verbunden ist (Abb.6).

Neben den Mo-haltigen Nitrogenasen sind auch alternative Nitrogenasen bekannt, die statt des Mo-Ions ein Vanadium-Ion (FeV-Kofaktor) oder ein Eisen-Ion (FeFe-Kofaktor) enthalten. Man findet diese alternative Nitrogenasen neben den Mo-haltigen Formen z.B. in *Azotobacter vinelandii* sowie teilweise auch in photosynthetischen Bakterien wie *Rhodobacter capsulatus*.

Biochemische Untersuchungen zeigen, daß für die Übertragung eines Elektrons zwischen Fe-Protein und FeMo-Protein zwei ATP Moleküle hydrolysiert werden (Burgess und Lowe 1996). Die kristallographische Untersuchung der Komplexstruktur mit gebundenem ADP*AlF₄ (Schindelin, Kisker et al. 1997) zeigte, daß die zwei dockenden dimeren Fe-Proteine größere konformationelle Änderungen durchlaufen, in deren Verlauf der [4Fe-4S] Cluster auf etwa 14 Å an den P-Cluster des FeMo Proteins heranrückt. Die Rolle der ATP-Bindung könnte folglich die Stabilisierung des geschlossenen Grenzflächen-Bereiches sein. Die folgende Hydrolyse des Trinukleotides erlaubt dann die Dissoziation des Fe-Proteins vom MoFe-Protein, woraufhin das Fe-Protein konformationelle Änderungen zur Abgabe von ADP + P durchläuft.

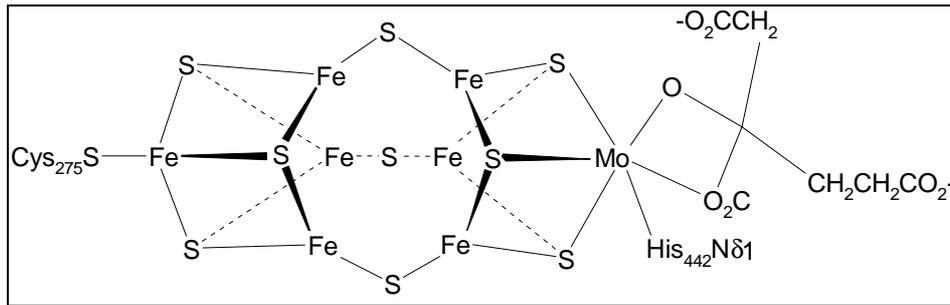


Abbildung 6: Der Eisen-Molybdän-Kofaktor der Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii* (Kim, Woo et al. 1993).

Die Position an der N_2 an dem Kofaktor bindet ist unklar und es werden sowohl eine $\mu\text{-}\eta^1\text{:}\eta^1$ *end-on* Bindung des Moleküls zwischen zwei Fe-Atomen sowie eine *side-on* bzw. *end-on* η^1 -Bindung an Mo diskutiert (Burgess und Lowe 1996).

Ni- und Fe-haltige Enzyme

Nickel wird in einer wachsenden Zahl von Enzymen gefunden (Ermler, Grabarse et al. 1998). Dabei tritt das Element in einkernigen Zentren (Methyl-CoM-Reduktase (Ermler, Grabarse et al. 1997)), homonuklearen zweikernigen Zentren (Urease (Jabri, Carr et al. 1995)), sowie in heteronuklearen Zentren der CO-Dehydrogenase, Acetyl-CoA-Synthase und Hydrogenase auf.

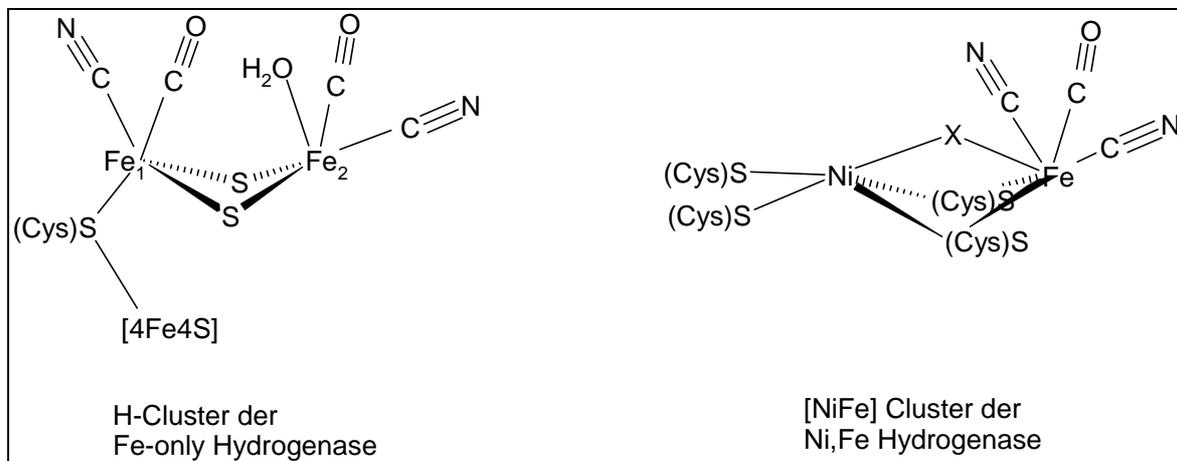


Abbildung 7: Die aktiven Zentren der bekannten metallhaltigen Hydrogenasen (nach (Peters 1999)). *Fe-only* Hydrogenasen tragen den 6 Fe-haltigen H-Cluster in ihrem aktiven Zentrum. Die Zuordnung des Liganden X für die [NiFe]-Hydrogenasen ist nicht eindeutig. Während der Brückenligand in der oxidierten *D. gigas* Struktur als O^{2-} interpretiert wurde, zeigte die *D. vulgaris* Struktur in der oxidierten Form einen Sulfido-Liganden, der nach Reduktion des Zentrums mit H_2 fehlt (Higuchi, Ogata et al. 1999). [NiFeSe]-Hydrogenasen besitzen ein ähnliches Zentrum, wie [NiFe]-Hydrogenasen, wobei einer der Ni-bindenden Cystein-Reste durch Selenocysteine ersetzt ist (Garcin, Venede et al. 1999).

Alle bekannten metallhaltigen Hydrogenase Systeme basieren im aktiven Zentrum entweder auf einem zweikernigen [NiFe]-Zentrum oder dem Fe-haltigen H-Zentrum (Abb.7). Die Entfernung eines S- oder O-haltigen Brückenliganden zwischen Ni und Fe durch Reduktion des Enzyms

sowie auch spektroskopische Befunde sprechen für ein verbrückendes Hydrid-Ion in der reduzierten Form der [NiFe]-Hydrogenase.

Kohlenmonoxid (CO)-Dehydrogenasen

CO ist ein geruch- und farbloses giftiges Gas, dessen Giftigkeit auf seiner hohen Affinität zu Hämoglobin und terminalen Cytochrom Oxidasen beruht.

Die enzymatische Aktivierung von CO zur Bildung von CO₂ spielt eine entscheidende Rolle im globalen Kohlenstoff-Kreislauf. Es ist die zentrale Stoffwechselreaktion einer mannigfaltigen Gruppe von aeroben und anaeroben Bakterien und Archaeen (Ferry 1995), die aufgrund ihrer Habitate und CO-Verwendungen unterschieden werden können. Etwa 115-230 Tg CO pro Jahr werden durch Bodenmikroorganismen umgesetzt (Sanhueza, Dong et al. 1998), die damit zum Gleichgewicht zwischen der Entstehung und der Umsetzung von CO beitragen (Moxley und Smith 1998). Die Umsetzung von CO durch Mikroben vollzieht sich im wesentlichen in den oberen Bodenschichten unter aeroben Bedingungen, der Hauptsenke von atmosphärischem CO.

Enzyme, die die Oxidation von CO bzw. die Reduktion von CO₂ katalysieren heißen CO-Dehydrogenasen. Während phototrophe Anaerobier Ni/Fe-haltige Enzyme nutzen (Ragsdale und Kumar 1996), findet man bei aeroben Mikroorganismen Mo-haltige Enzyme (Moersdorf, Frunzke et al. 1992). Beide Enzymtypen verwenden einzigartige Heterometall-Kofaktoren zur Aktivierung von CO wie H₂.

Nickel-haltige CO-Dehydrogenasen

Nickel-haltige CO-Dehydrogenasen sind die Schlüsselenzyme vieler Bakterien und müssen unterschieden werden in die monofunktionellen CO-Dehydrogenasen und die bifunktionellen CO-Dehydrogenasen/Acetyl-CoA-Synthasen (Review: (Ragsdale und Kumar 1996)).

Die Nickel-haltigen CO-Dehydrogenasen der phototrophen Purpur-Bakterien (*Rhodospirillum rubrum*, *Rhodocyclus gelatinosus*) und *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* dienen der katabolen Nutzung von CO (Bonam und Ludden 1987).

Das Schlüsselenzym der CO-Oxidation bei *R. rubrum* ist eine nickel-haltige monofunktionelle CO-Dehydrogenase (Bonam und Ludden 1987), die unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln in Anwesenheit von CO induziert wird und wie die Mo-haltigen CO-Dehydrogenasen eine hohe Affinität für CO besitzt. Ein CO-Dehydrogenase Monomer besteht aus einer 62-kDa Untereinheit mit zwei Metallzentren, einem Nickel-Eisen-Schwefel-Zentrum (Cluster-C) und einem [4Fe-4S]-Zentrum (Cluster-B). Spektroskopische Untersuchungen lassen vermuten, daß CO am Cluster-C gebunden und umgesetzt wird.

Die nickel-haltigen bifunktionellen CO-Dehydrogenasen/Acetyl-CoA-Synthasen der anaeroben acetogenen und sulfatreduzierenden Bakterien und der methanogenen Archaeen haben anabole Funktion und katalysieren die Reduktion von CO_2 zu enzymgebundenem CO, das zur Acetyl-CoA-Synthese weiterverwendet wird. Die Enzyme besitzen offensichtlich getrennte aktive Zentren für beide Aktivitäten, die wahrscheinlich an den beiden unterschiedlichen Nickel-Eisen-Schwefel-Zentren (Cluster-A und -C) lokalisiert sind.

Molybdän-haltige CO-Dehydrogenasen

Carboxidotrophe Bakterien

Carboxidotrophe Bakterien zeichnen sich durch die aerobe, respiratorische, chemolithoautotrophe Nutzung von CO als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle aus (Meyer und Schlegel 1978) (Meyer und Schlegel 1979) (Meyer und Schlegel 1983) (Meyer, Frunzke et al. 1989) (Meyer, Frunzke et al. 1993).

Die ubiquitär verbreiteten carboxidotrophen Bakterien bilden eine stoffwechselphysiologische Gruppe, dessen bestuntersuchter Vertreter *Oligotropha carboxidovorans* OM5 ist. Taxonomisch gliedert man dieses Proteobakterium in die α -Subklasse.

Die aus der CO-Oxidation freiwerdenden Elektronen werden zum Aufbau eines Protonen- und Ladungsgradienten über die cytoplasmatische Membran genutzt, der die anschließende Energiegewinnung mittels oxidativer Phosphorylierung ermöglicht (Cypionka und Meyer 1983). Die Assimilation von CO_2 erfolgt durch die Enzyme des Calvin-Zyklus (Santiago, Schübel et al. 1999). Neben dem CO-autotrophen Wachstum kann *O. carboxidovorans* auch mit H_2 als Energiequelle und CO_2 als C-Quelle wachsen. Hierbei übernimmt eine membrangebundene Aufnahme-Hydrogenase die Oxidation von H_2 (Santiago und Meyer 1997).

Die CO-Dehydrogenase von *O. carboxidovorans* liegt in der logarithmischen Wachstumsphase zu etwa 87% membranassoziiert vor, dissoziiert jedoch beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase von der Innenseite der Cytoplasmamembran ab und liegt dann nur noch zu etwa 50% membranassoziiert vor (Rohde, Mayer et al. 1984). Die generierten Elektronen der CO-Oxidation ($\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2 \text{H}^+ + 2\text{e}^-$) fließen über den physiologischen Elektronenakzeptor, das membrangebundene Cytochrom b_{561} in die CO-insensitive Elektronentransportkette. Ein physiologischer Komplex der beiden Proteine wurde isoliert und wies eine 2:1 Stöchiometrie zwischen Cytochrom und CO-Dehydrogenase Dimer auf. Der weitere Elektronenfluß geht auf ein neuartiges CO-insensitives *b*-Typ Cytochrom, das als terminale Oxidase dient. Der resultierende elektrochemische Gradient wird zur Regeneration von ATP genutzt (Cypionka und Meyer 1983).

CO-Dehydrogenase findet in dem carboxidotrophen Bakterium *Streptomyces thermoautotrophicus* eine weitere Verwendung als Teil eines CO-getriebenen Nitrogenase-Systems (Ribbe, Gadkari et al. 1997). Die zur Reduktion des N_2 benötigten Elektronen werden durch die CO-Dehydrogenase abhängige CO-Oxidation bereitgestellt und auf O_2 unter Bildung von Superoxidation-Radikalen (O_2^*) übertragen. Eine Mn-haltige Superoxid-Oxidoreduktase oxidiert das gebildete O_2^* zu O_2 zurück und ist der primäre Elektronendonator der Dinitrogenase (Ribbe, Gadkari et al. 1997).

Katalytische Eigenschaften der CO-Dehydrogenase

CO-Dehydrogenase kann *in vitro* eine Reihe artefizieller Elektronenakzeptoren nutzen, die in Ermangelung des physiologischen Elektronenakzeptors in kinetischen Untersuchungen verwendet werden. Die sich ergebende Michaelis-Menten-Konstante der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* für CO wurde bei 30°C zu 53 μ M (Meyer, Frunzke et al. 1993) bestimmt. Die katalytische Kompetenz der CO-Dehydrogenase zur H_2 -Oxidation beträgt nur etwa 10-16% der CO-oxidierenden Aktivität. Die Fähigkeit zur O_2 -Reduktion unter *turnover* Bedingungen führt zur Bildung von Superoxidation-Radikalen (O_2^*) (etwa 25% der Elektronen), sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (58.8% der Elektronen). Die Bildung dieser reaktiven Disauerstoff-Spezies führt zur schnellen Inaktivierung des Enzyms.

Chemische und physikalische Eigenschaften von CO-Dehydrogenase

CO-Dehydrogenasen der aeroben carboxidotrophen Bakterien sind Molybdo-Eisen-Schwefel-Flavoproteine (Meyer, Frunzke et al. 1993) und gehören zur Gruppe der Molybdän-Hydroxylasen (Xanthin-Oxidase Familie). Obwohl CO-Dehydrogenase nicht die Umsetzung eines R-H Substrates katalysiert, zeigt die Reaktion klare Parallelen zu den katalysierten Reaktionen anderer Molybdän-Hydroxylasen. Das Enzym besteht aus einem $(LMS)_2$ strukturierten Heterohexamer, untergliedert in die L-Untereinheiten (CoxL, 88,735 kDa), die M-Untereinheiten (CoxM, 30,239 kDa) und S-Untereinheiten (CoxS, 17,792 kDa) mit einer Gesamtmasse für das Holoenzym von 277.436 kDa. Der isoelektrische Punkt pI nativer CO-Dehydrogenase liegt bei 4.7 (Meyer, Frunzke et al. 1993).

Als prosthetische Gruppen wurden zwei Moleküle des Molybdän-Kofaktors, Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid (MCD), zwei Moleküle Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und je zwei EPR-spektroskopisch unterscheidbare $[2Fe2S]$ -Zentren vom Typ-I und Typ-II gefunden (Meyer 1982) (Bray, George et al. 1983).

CO-Dehydrogenase läßt sich durch Inkubation mit Na-Selenit (Na_2SeO_3) stabil aktivieren (Meyer und Rajagopalan 1984). Radioaktiv markiertes ^{75}Se -Selenit zeigte dabei, daß die Aktivierung durch den Einbau von 1.54 bis 1.8 mol ^{75}Se in das Enzym verursacht wird, welches kovalent gebunden

im Enzym vorliegt. Die Ergebnisse wurden auf das Vorhandensein eines Heterotrisulfids (R-S-⁷⁵Se-S-R) hin interpretiert (Meyer und Rajagopalan 1984).

*Molekularbiologische Aspekte der CO-Dehydrogenase von *O. carboxidovorans**

Die drei Untereinheiten der CO-Dehydrogenase werden von drei Strukturgenen *coxL*, *coxM* und *coxS* kodiert. In *O. carboxidovorans* sind diese Strukturgene auf dem 128 kb großen Megaplasmid pHCG3 in der transkriptionalen Reihenfolge 5'-*coxM*->*coxS*->*coxL*-3' angeordnet (Kraut, Hugendieck et al. 1989) (Schübel, Kraut et al. 1995).

Ein Vergleich der Sequenzen der drei Gene mit anderen Molybdän-Hydroxylasen zeigt die hohe Homologie zu diesen Enzymen.

Die Strukturgene bilden zusammen mit neun weiteren akzessorischen Genen (*coxBCDEFGHIK*) das *cox*-Gencluster (Santiago, Schubel et al. 1999). Neben dem strukturellen Gensubcluster *coxMSL* liegt ein weiterer Subcluster der akzessorischen Gene *coxDEFG* vor.

Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Strukturen der CO-Dehydrogenasen von *O. carboxidovorans* und *H. pseudoflava* kristallographisch aufzuklären. Im weiteren Verlauf sollte ein detailliertes Bild des aktiven Zentrums bei höchster Auflösung gewonnen werden, das zusammen mit der Charakterisierung verschiedener katalytischer Zustände, zur Entwicklung einer Theorie zum Reaktionsmechanismus der CO- und H₂-Oxidation führen könnte.

Material und Methoden

Theoretischer Hintergrund der Proteinkristallographie

Die Grundprinzipien der Kristallographie werden, teilweise unter besonderer Würdigung der Probleme und Methoden der Proteinanalyse u.a. in folgenden Lehrbüchern beschrieben und erläutert: (Blundell und Johnson 1976), (Buerger 1977), (Drenth 1994), (Giacovazzo, Monaco et al. 1992), (Glusker, Lewis et al. 1994), (Massa 1996), (Stout und Jensen 1989).

Auf den theoretischen Hintergrund der Kristallographie und der ihr eigenen Probleme wird verwiesen, wo es zur Interpretation der Ergebnisse, bzw. zum Verständnis der Vorgehensweise notwendig erscheint.

Cryokristallographie

Das Einfrieren von Kristallen unter Beibehaltung ihrer kristallinen Integrität kann zu einem notwendigen, die Datensammlung vorbereitenden Schritt werden, wenn intensive Röntgenstrahlung den Kristall schädigt. Da dieser Dosis-abhängige Prozess durch tiefe Temperaturen verlangsamt wird, werden Kristalle am Synchrotron häufig bei 100 K vermessen. Bei *multiple-wavelength-anomalous-dispersion*-(MAD)-Messungen, die zum Erhalt der Isomorphie die Sammlung mehrerer Datensätze von einem Kristall voraussetzen, ist das Kühlen der Kristalle von entscheidender Bedeutung (Aktuelle Reviews: (Rodgers 1994; Garman und Schneider 1997; Garman 1999)).

Ein weiterer Aspekt des Kühlens ist die Möglichkeit instabile Zustände im gefrorenen Zustand weitgehend zu konservieren. So können z.B. sauerstoffempfindliche Zustände im gefrorenen Zustand unter geringem Aufwand anoxygen gehalten werden, ebenso können reaktive Zwischenzustände der Enzymkatalyse charakterisiert werden (*freeze trapping*), indem die Weiterreaktion durch die niedrige Temperatur verlangsamt wird.

Da die Eiskristallbildung, die sich im Diffraktionsbild zeigt und zudem den Proteinkristall schädigen kann, meist von einem Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche des Kristalls (<http://www-structure.llnl.gov/Xray/cryo-notes/Cryonotes.html>) ausgeht, können zur Vermeidung dieses Vorgangs zwei verschiedene Techniken angewandt werden:

a.) die konventionelle Methode besteht darin, zum Kristallisationspuffer eine Cryoprotektanzlösung beizumischen, die die Eiskristallbildung verhindert. Nachteil dieser invasiven Technik ist die oft auftretende Schädigung des Kristalls (Mitchell und Garman 1994).

b.) eine nicht-invasive Methode besteht darin, die Kristall-umgebende Lösung vollständig zu entfernen und durch ein glasartig erstarrendes Öl zu ersetzen. Nachteil dieser selten eingesetzten Technik ist die häufig auftretende Erhöhung der Mosaizität des Kristalls.

CO-Dehydrogenase Kristalle wurden nach beiden Techniken gefroren. Dabei fanden 2R,3R-Butandiol und Glycerin in der invasiven Methode und polyfluoriertes Polyethylenöl (PFPE-Öl) sowie eine 9:2 Mischung von dickflüssigem Paraffin/n-Heptan in der nicht-invasiven Methode im Zusammenspiel mit der Kristalltransformation Anwendung.

Kristalle, die nach dem Einfrieren Eisringe zeigten, bzw. Schädigungen während des Einfriervorganges erlitten hatten, wurden durch *annealing* des Kristalls verbessert (Harp, Hanson et al. 1999).

Kristalltransformation und Derivatisierung

Die Transformation der Kristalle wurde auf dem *free-mounting* System (Kiefersauer, Than et al. 2000) ausgeführt. Für die Datenmessung bei R.T. wurde eine Trägerkapillare verwendet, an deren Spitze der Kristall montiert wurde. Für die Messung am Synchrotron wurden Kristalle in einem *cryo-loop* unter Öl transformiert und anschliessend auf die Temperatur von fl. N₂ gekühlt.

Reduzierte CO-Dehydrogenase Kristalle wurden unter anoxischen Bedingungen vermessen, wobei ihre gasförmigen Substrate als Teile des Trägergases eingesetzt wurden. Als Trägergase wurden Stickstoff, bzw. Stickstoffmischungen hoher Reinheit (Firma Linde; Reinheit: 3.5-5.0) verwendet.

Datensammlung und -auswertung

Zur Messung von Diffraktionsdaten bei R.T. wurden Kristalle in silanisierten Quarzkapillaren mit einem Innendurchmesser von 0.75-1 mm montiert. Die Kristalle wurden mit einer Pipette in die Kapillare gesaugt und mit Filterpapierstreifen vom Lösungsmittel befreit. Beide Enden der Kapillare wurden mit einem Tropfen des Erntepuffers versehen und mit Harvard-Dentalwachs verschlossen.

Die atomar und nahe-atomar aufgelösten Datensätze, wie auch die Datensätze zur MAD Phasierung der CO-Dehydrogenase Struktur wurden an der Wiggler Beamline BW6 (DESY, HASYLAB, Hamburg) aufgenommen. Alle Kristalle am Synchrotron wurden im gefrorenen Zustand vermessen (100 K) und die Diffraktionsbilder mit Mar Research *Charge-Coupled-Device*-Detektoren (MarCCD) aufgenommen.

Datensätze von transformierten Kristallen bei 15-22° C wurden auf *Image Plate* Systemen (MarIP) aufgenommen, die die gebeugten Strahlen eines Drehanoden-Röntgengenerator detektierten. Die Datensätze für CO-Dehydrogenase von *H. pseudoflava* wurden ebenfalls an einem Drehanoden-Röntgengenerator vermessen.

Zur Bestimmung der Kristallorientierung, Raumgruppe, Elementarzellparameter sowie zur Integration der Reflexintensitäten wurden die Programme MOSFLM6XX (Leslie 1991) und DENZO (Otwinowski und Minor 1996) eingesetzt. Die Datenreduktion wurde mit den Programmen SCALA (Collaborative Computational Project No. 4 1994), TRUNCATE (Collaborative Computational Project No. 4 1994) und SCALEPACK (Otwinowski und Minor 1996) durchgeführt (Aktuelle Reviews: (Dauter 1999) (Leslie 1999; Rossmann und van Beek 1999)).

Patterson-Suchtechniken

Selbstrotationsfunktionen wurden mit dem Programm GLRF (Tong und Rossmann 1990) berechnet und dargestellt.

Patterson-Suchen mit Struktursuchmodellen wurden mit den Programmen AMORE (Navaza 1994), MOLREP (Collaborative Computational Project No. 4 1994) und CNS (DeLano und Brünger 1995) (Brünger, Adams et al. 1998) ausgeführt (Aktueller Review: (Turkenberg und Dodson 1996)).

MAD

Erreicht die Energie der verwendeten Röntgenstrahlung die Anregungsenergie einer Atomsorte der untersuchten Struktur kann es z.B. zur Entfernung eines Elektrons aus der K-Schale des betreffenden Atoms kommen. Aufgrund der Wechselwirkung der Strahlung mit den inneren Elektronen erfährt der restliche gestreute Anteil der Röntgenstrahlung eine kleine Änderung in Amplitude und Phase, was man als anomale Streuung, bzw. aufgrund der Abhängigkeit von der Wellenlänge als anomale Dispersion bezeichnet. Diese Differenzen können zur Lokalisierung der anomalen Streuer, wie zur folgenden Phasierung der gemessenen Daten verwendet werden.

Datensätze zur MAD-Phasierung (Smith 1997), wie zur Detektion anomaler Streuer im fertigen Modell wurden an der Beamline BW6 (DESY, HASYLAB, Hamburg) gemessen.

Bestimmungen der K-Absorptionskanten der untersuchten anomalen Streuer beruhen auf Fluoreszenz-Scans, die ebenfalls an der BW6 ausgeführt wurden. Auswertung und Phasierung mit den berechneten anomalen und dispersiven Differenzen bei verschiedenen Wellenlängen, die sich aus den intrinsischen anomalen Streuern des Multimetalloproteins CO-Dehydrogenase ergaben, wurden mit Programmen des CCP4-Paketes (FFT, MLPHARE, RSPS) (Collaborative Computational Project No. 4 1994) (Helliwell 1997) und SHARP (La Fortelle, Irwin et al. 1997) durchgeführt (Aktueller Review: (Abrahams und De Graaff 1998)).

Dichtemodifikation

Die Modifikationen der errechneten Fouriersynthesen beruhen auf: a.) dem Festsetzen eines konstanten Wertes für den Solvensbereich (*solvent flattening*) (Cowtan und Main 1996) ; b.)

Mittelung der Fouriersynthesen nicht-kristallographisch verwandter Bereiche (*real-space averaging*) (Chapman und Blanc 1997) (Aktuelle Reviews: (Rossmann 1995; Kleywegt und Read 1997)), sowie c.) der Abschätzung der Frequenzverteilung der korrekten Fouriersynthesen im Proteinbereich (*histogram matching*). Die Umsetzung dieser Methoden wurde in den Programmen DM (Collaborative Computational Project No. 4 1994) (Cowtan und Main 1998), RAVE (Kleywegt 1996) und MAIN (Turk 1992) genutzt.

Modellbau und Verfeinerung

Atomare Proteinmodelle wurden auf Silicon Graphics Computern, sowie einem unter Linux betriebenen PC mit den Programmen MAIN (Turk 1992) und XTALVIEW (McRee 1993) in $2F_0-F_c$ - und F_0-F_c -Fouriersynthesen eingepaßt. Initiale Wasser-Moleküle wurden mit ARP in Differenz-Fouriersynthesen lokalisiert (Lamzin und Wilson 1997).

Proteinstrukturen mit individuellen isotropen Temperatur-Faktoren wurden mit den Programmen XPLOR (Brünger 1992) und CNS (Brünger, Adams et al. 1998) verfeinert. Die Verfeinerung individueller anisotroper Temperaturfaktoren (Merritt 1999) erfolgte mit den Programmen SHELXH (Sheldrick und Schneider 1997) und REFMAC (Murshudov, Lebedev et al. 1999).

Alle Verfeinerungen wurden durch die Auszeichnung eines Testsets, der nicht für Verfeinerungen verwendet wurde, kontrolliert (Brünger 1992) (Brünger 1993).

Strukturanalyse und Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Bindungswinkel und -längen der Proteinstruktur erfolgte mit den Programmen XPLOR (Brünger 1992), CNS (Brünger, Adams et al. 1998), REFMAC (Murshudov, Lebedev et al. 1999) und PROCHECK (Laskowski, MacArthur et al. 1993). Die Sekundärstruktur-Zuweisung erfolgte mit DSSP (Kabsch und Sander 1983) (Aktueller Review: (Luscombe, Laskowski et al. 1998)).

Experimenteller Teil und Ergebnisse

Vermessung der Kristalle

Kristalle der CO-Dehydrogenase von *O. carboxidovorans* streuen bei Raumtemperatur bis 3.0 Å und zeigen einen schnellen Abbau ihrer Streuqualität bei anhaltender Bestrahlung an einem konventionellen Röntgengenerator mit rotierender Anode. Ihre Raumgruppe ist orthorhombisch $P 2_1 2_1 2_1$ mit Zellkonstanten von $a=129.1$ Å, $b=142.4$ Å und $c=167.8$ Å. Dies entspricht einem Matthews-Koeffizienten (Matthews 1968) von 2.7 Å³/Da für ein 277 kDa CO-Dehydrogenase Dimer pro asymmetrischer Einheit.

Zur Vermeidung des schnellen Abbaus der Streueigenschaften wurden verschiedene Kühlzusätze (MPD, Glucose, Saccharose, 2R,3R- Butandiol, PEG 200/400, Kaliumphosphat) ausprobiert, die allerdings zur Zerstörung der kristallinen Integrität führten. Das Kühlen der Kristalle wurde möglich durch eine Veränderung der Kristallisationsbedingungen durch Zusatz von Glycerin. Die veränderten Kristallisationsbedingungen (15% (w/v) Glycerin, 2% MPD, 0.74 M NaH₂PO₄/NaOH, 0.74 M KH₂PO₄/KOH, 0.1 M HEPES/NaOH, pH 7.2) erlaubten die schrittweise Erhöhung der Glycerin-Konzentration auf 25 %, so daß Kristalle unter weitgehendem Erhalt ihrer Streueigenschaften eingefroren werden konnten. Die so behandelten Kristalle konnten für Messungen am Synchrotron eingesetzt werden.

Kristalltransformation und Derivatisierung

Zur Optimierung der Streueigenschaften der Kristalle wurden verschiedene Methoden getestet. Da die bereits übersättigte Ka/NaHPO₄-Lösung des Kristallisationspuffers eine Transformation/Dehydratation durch Erhöhung des Präzipitanzmittels (Samygina, Antonyuk et al. 2000) nicht erlaubte, wurde die Verwendung verschiedener Öle zur Transformation und Schockfrierung der Kristalle ausprobiert. Erste Versuche wurden dabei mit Pflanzenöl, n-Heptan, Petroleumbenzin, dickflüssigem Paraffinöl, dünnflüssigem Paraffinöl und Silikonöl durchgeführt. Die Verwendung einer 9:2 (v/v) Mischung von dickflüssigem Paraffin mit n-Heptan zeigte dabei eine geeignete Viskosität, bei geringer Absorption des Röntgenstrahls. Kristalle wurden vorbereitet, indem sie in 5 µl Kristallisationspuffer vorgelegt und mit der Ölmischung überschichtet wurden. Nach der Entfernung des verbliebenen Kristallisationspuffers vom Kristall wurden die Kristalle mit einem *cryo-loop* isoliert und auf die Temperatur von fl. N₂ gekühlt. Kristalle, die so behandelt wurden, streuten bis 2.0 Å und zeigten deutlich reduzierte

Zellkonstanten, besaßen aber eine erhöhte Mosaizität von mehr als 1° mit überlappenden Reflexen.

Da die Verbesserung der Streuleistung vom Schrumpfen der Zellkonstanten begleitet war, wurde die von Dr. R. Kiefersauer entwickelte Methode zur Transformation von Kristallen im Gasstrom kontrollierter Feuchtigkeit angewendet und zusammen mit Dr. R. Kiefersauer weiterentwickelt (Kiefersauer, Than et al. 2000).

In einem ersten Experiment wurde dazu ein Kristall auf der Spitze des kapillarfreien Halterungssystems fixiert und die Feuchtigkeit so eingestellt, daß das Kristallvolumen konstant blieb. Der Kristall streute bis 3.0 \AA mit den oben aufgeführten Zellkonstanten. Im nächsten Schritt wurde die Feuchtigkeit um 6% auf 89% ($1\% \cdot \text{min}^{-1}$) reduziert, wonach der Kristall bis 2.2 \AA bei unveränderter Mosaizität ($\sim 0.2^\circ$) streute. Die Zellkonstanten waren deutlich reduziert auf $a=123.4 \text{ \AA}$, $b=133.8 \text{ \AA}$ und $c=167.1 \text{ \AA}$. Eine weitere Verringerung der Feuchtigkeit führte zur Erhöhung der Mosaizität.

In einem zweiten Experiment wurde ein verändertes Feuchtigkeitsprotokoll verwendet. Ausgehend vom nativen Zustand, wurde die Feuchtigkeit mit einem Gradienten von $1\% \cdot \text{min}^{-1}$ um 11% auf 84% reduziert. Eine ausgeprägte Verbesserung der Streukraft wurde begleitet von einer deutlichen Erhöhung der Mosaizität (Abb.8). Die Elementarzelle schrumpfte dabei um 17% im Volumen, mit Zellkonstanten von $a=119 \text{ \AA}$, $b=132 \text{ \AA}$ und $c=162 \text{ \AA}$. Die weitere Verringerung der Feuchtigkeit um 3% führte zur Zerstörung der kristallinen Ordnung. Überraschenderweise kehrte nach einem Feuchtigkeitssprung auf 90% die kristalline Ordnung wieder und die Kristalle zeigten eine Mosaizität von 0.2° bei einer Auflösung von 1.8 \AA (Abb.8). Obwohl die Feuchtigkeit um 9 % erhöht wurde, blieben die Zellkonstanten nahezu unverändert.

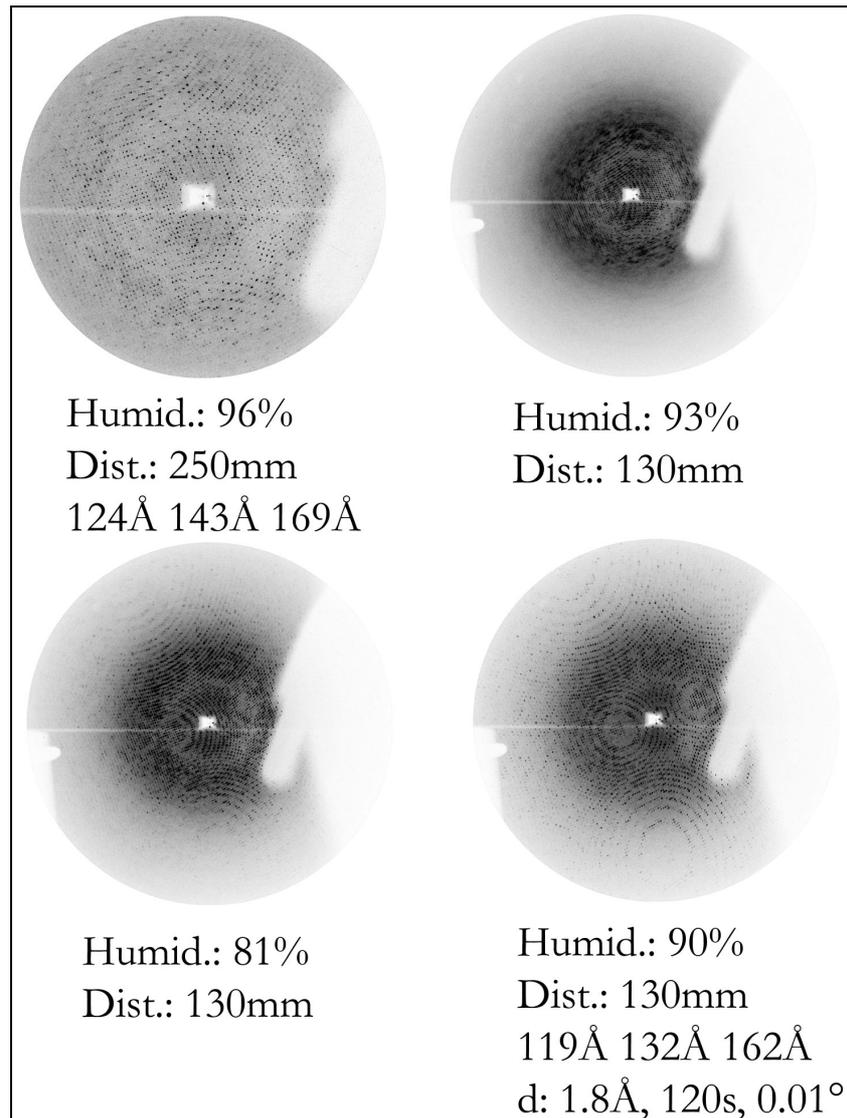


Abbildung 8: Verlauf der Kristalltransformation. Deutlich ist die Ab- und Zunahme der Streuqualität des Kristalls im Verlauf der Transformation erkennbar. Bei einer Distanz von 250 mm zwischen Kristall und Detektor (oben links) entspricht der Plattenrand des Detektors einer Auflösung von 2.89 Å. Bei 130 mm einer Auflösung von 1.85 Å.

Ein ähnliches Protokoll konnte auch für die Transformation von Öl (Perfluoriniertes Polyethylen(PFPE)-Öl) umhüllten Kristallen im Cryo-Loop verwendet werden. Der Erfolg der Transformation hing dabei von der Geschwindigkeit des Wasserentzugs ab, wobei sich eine Transformationsdauer unter einer Stunde als günstig erwies. Das Schockgefrieren der Kristalle resultierte abermals in einer Verringerung der Zellkonstanten auf $a=119.3\text{ \AA}$, $b=132.4\text{ \AA}$ und $c=160.6\text{ \AA}$. Die gefrorenen Kristalle zeigten eine leicht erhöhte Streukraft, aber auch einen geringen Anstieg der Mosaizität von 0.2° auf $0.35\text{-}0.4^\circ$. Mit diesen Kristallen konnten Datensätze am Synchrotron bis zu einer Auflösung von 1.09 \AA für das 277 kDa Protein gemessen werden.

Kristalltransformation unter anoxischen Bedingungen

Zur Charakterisierung reduzierter Formen der CO-Dehydrogenase war die Vermessung unter anoxischen Bedingungen notwendig. Um eine Oxidation des Kristalls zu verhindern wurde N_2 hoher Reinheit als Trägergas verwendet. Hierzu wurde die Maschine mit allen verwendeten Schläuchen für einen Tag mit dem anoxischen Trägergas vorgespült, bevor ein Kristall wie zuvor beschrieben im *cryo-loop* vorbereitet wurde. Der montierte Kristall wurde anschließend transformiert und nach erfolgreicher Durchführung durch einen Wechsel des Trägergases reduziert.

Eine H_2/N_2 -Mischung (95 % N_2 /5 % H_2) wurde zur Vermessung der H_2 -reduzierten Spezies verwendet und eine CO/N_2 -Mischung (90 % N_2 /10 % CO) zur Vermessung der CO -reduzierten Form.

Die Reduktion des Kristalls wurde dabei anhand seines Farbwechsels unter dem Mikroskop verfolgt. Das Austreten von giftigem CO in den Messraum wurde durch ein nahe am Messort angebrachtes Abzugsrohr (Abb.9) verhindert und die Dichtigkeit des Systems mit drei CO Sensoren im Messraum während der gesamten Messdauer überprüft.

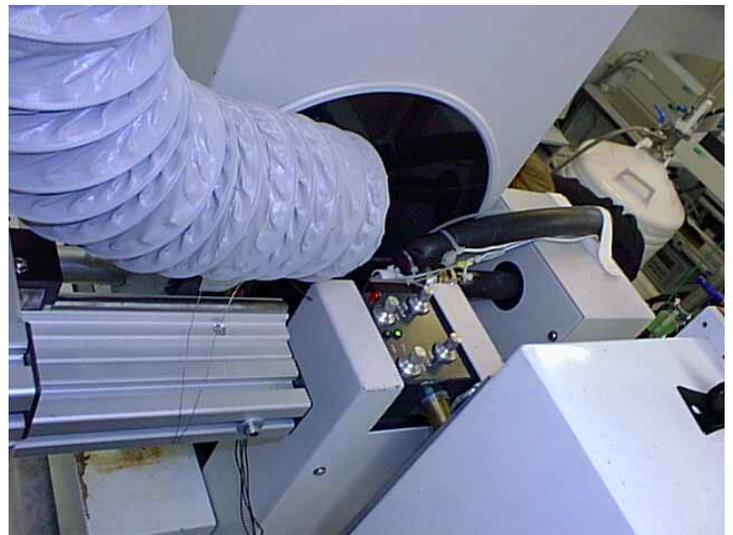


Abbildung 9: Absaug- und Messeinrichtung. Das Ausströmen von giftigem CO wurde durch ein am Messort befestigter Abzugsschlauch entfernt.

Dithionit-reduzierte Kristalle wurden durch einstündiges Einlegen in 10mM NaS_2O_4 -Lösung in anoxischem Kristallisationspuffer hergestellt und anschließend im N_2 -Strom transformiert.

Selbstrotationsfunktion

Vor der Durchführung der Patterson-Suche wurde eine Selbstrotationsfunktion bis 3.5 Å berechnet.

Diese zeigt eine nichtkristallographische zweizählige Achse, der die Anwesenheit zweier Monomere in einer asymmetrischen Einheit der Elementarzelle entsprach (Abb. 10).

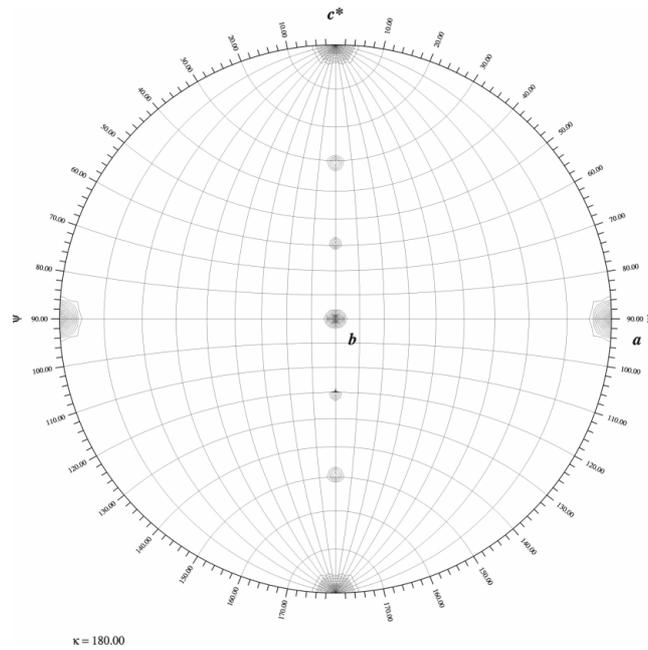


Abbildung 10: Plot der Selbstrotationsfunktion von *O. carboxidovorans* CO-Dehydrogenase.

Patterson-Suche und Anomale Dispersion

Strukturlösung der CO-Dehydrogenase von *O. carboxidovorans*

Nach der Aufnahme eines ersten Datensatzes aus mehreren Kristallen mit einer Auflösung von 3,5 Å wurde eine Patterson-Suche durchgeführt. Hierzu wurde ein Suchmodell aus konservierten Bereichen der monomeren Aldehyd-Oxidoreduktase (Mop) von *D. gigas* (Romao, Archer et al. 1995) konstruiert (Abb.11).

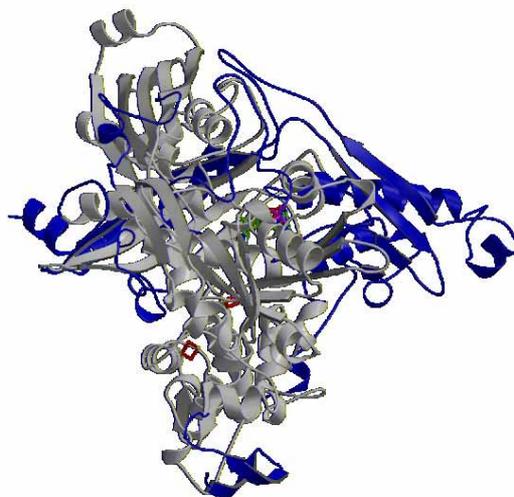


Abbildung 11: Suchmodell für die Pattersonsuche. Der weiß eingefärbte Bereich der Mop-Struktur (Romao, Archer et al. 1995) wurde zur Patterson-Suche eingesetzt, während die blauen Bereiche zur erfolgreichen Patterson-

Suche nicht berücksichtigt wurden. Rechnungen, in denen die Metall-Kofaktoren nicht zum Suchmodell gehörten, blieben ohne Ergebnis.

Obwohl dieses Model weniger als 10% der Streumasse der asymmetrischen Einheit ausmachte konnte mit dem Programm AMORE (Navaza 1994) eine Lösung gefunden werden. Um die richtige Lösung zu erhalten, war die Verwendung der Eisen-Schwefel-Zentren wie des Mo-Ions im Suchmodell notwendig, was andeutet, daß die korrekte Überlagerung der Patterson-Synthesen durch die starken interatomaren Vektoren zwischen den Metallen deutlich beeinflußt wird. Die relative Masse des Suchmodells liegt an der unteren Grenze des momentan korrekt Orientierbaren bei Nichtidentität zwischen Suchmodell und dem entsprechenden Bereich der zulösenden Struktur (Oh 1995) (Bernstein und Hol 1997). Die richtige Lösung zeichnete sich durch einen R-Faktor von 50.8% mit einem Korrelations-Koeffizienten (cc) von 0.294 nach der Translations-Suche für das zweite Monomer aus. Die nächst höchste Lösung zeigte einen R-Faktor von 52.1% bei einem cc von 0.24 in einem Auflösungsbereich von 14.0-5.0 Å.

Obwohl die Berechnungen von *Omit*-Fouriersynthesen für die Eisen-Schwefel-Zentren und das Molybdän-Ion die Richtigkeit der Patterson-Lösung bestätigten, war es nicht möglich, die hiermit berechneten $2F_o - F_c$ Fouriersynthesen, auch nach zweifacher zyklischer Mittelung, zu interpretieren. Aus diesem Grunde wurden MAD-Datensammlungen an zwei verschiedenen Wellenlängen an der *Wiggler Beamline* BW6, Synchrotron-DESY, Hamburg durchgeführt. Hierbei wurden die anomalen Streueigenschaften von Eisen an zwei Wellenlängen (remote: 0.9761 Å, f'' : 1.7316 Å) ausgenutzt. Die Datensätze wurden auf MAR-Research CCD-Detektoren gesammelt und mit DENZO und SCALEPACK ausgewertet (Otwinowski und Minor 1996).

Obwohl die Position der [2Fe-2S]-Zentren nicht deutlich in anomalen Differenz-Patterson Berechnungen erkennbar war, lieferten anomale Differenzfouriersynthesen (Bijvoet-Fouriersynthesen), die unter Verwendung der Phasen des lokalisierten Teilmodells ($\phi_{\text{Prot.}} - 90^\circ$) berechnet wurden, die Position der vier [2Fe-2S]-Zentren in der asymmetrischen Einheit. Dies zeigte auch, daß der anomale Streubeitrag trotz einer mittleren theoretischen Intensität von

weniger als 2% der Gesamtintensität (mittlere theoretische Bijvoet Differenz: 1.68 %; mittlere theoretische dispersive Differenz: 1.17 %) sinnvolle zusätzliche Information liefern konnte.

Strukturlösung der CO-Dehydrogenase von *H. pseudoflava*

Die Struktur der CO-Dehydrogenase von *H. pseudoflava* wurde mit Patterson-Suchmethoden unter Verwendung der Programme AMORE (Navaza 1994) und CNS (Brünger, Adams et al. 1998) gelöst. Ein Monomer der CO-Dehydrogenase von *O. carboxidovorans* diente dabei als Suchmodell, wobei nicht-identische Aminosäuren durch Alanine ersetzt wurden. Eine eindeutige Lösung konnte gefunden werden und zeichnete sich nach *Rigid-Body* Verfeinerung der beiden Monomere durch eine Korrelation von 62.1 % und einen R-Faktor von 36.8 % im Auflösungsbereich von 15.0-3.5 Å aus. Die aus der Lösung gewonnenen Phasen erlaubten die Berechnung von interpretierbaren $2F_o-F_c$ Fouriersynthesen.

Dichtemodifikation und Phasierung

Die Positionen der 10 lokalisierten anomalen Streuer (8 Fe und 2 Mo pro asymm. Einheit) wurden als Eingabe für die Programme SHARP (La Fortelle, Irwin et al. 1997) und MLPHARE (Collaborative Computational Project No. 4 1994) verwendet, die die Berechnung der experimentellen Phasen durchführten. Mit Hilfe dieser Phasen war es nach *solvent-flattening* möglich, in F_o -Fouriersynthesen die Molekülgrenzen zu erkennen, die zur Erstellung einer Maske für die zyklische Mittelung entscheidend waren. Zur Berechnung der zu interpretierenden Fouriersynthese wurden verschiedene Protokolle ausprobiert. Die besten Fouriersynthesen konnten nach folgendem Protokoll errechnet werden:

- 1.) Gewichtung und Kombination der unmodifizierten experimentellen Phasen mit den Modellphasen mit SIGMAA (Collaborative Computational Project No. 4 1994) .
- 2.) Phasenmodifikation mit DM (Collaborative Computational Project No. 4 1994) (*solvent-flattening*) der kombinierten Phasen.

- 3.) Weitere Phasenexpansion/-modifikation durch zyklische Mittelung mit AVE (Kleywegt und Jones 1992) in 20 Zyklen.

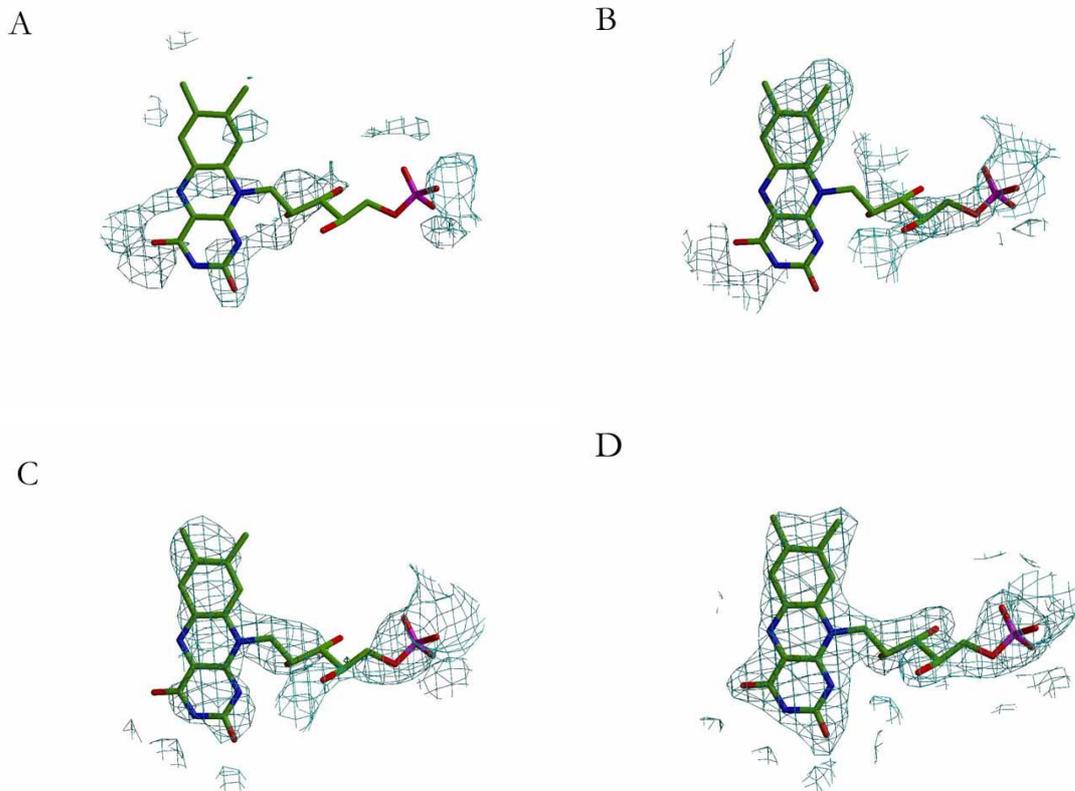


Abbildung 12: Verwendung und Verbesserung der erhaltenen Phasensätze widergespiegelt an berechneten Fouriersynthesen in der Umgebung des FMN-Anteils des FAD.

- A.) $2Fo-wFc$ Fouriersynthese bei 1σ konturiert. Die Phasen des platzierten Suchmodells wurden durch zweifache zyklische Mittelung modifiziert.
- B.) mFo Fouriersynthese bei 1σ konturiert. Verwendung des Phasensatzes erhalten aus dem MAD-Experiment, nach Modifikation mit DM.
- C.) $2Fo-wFc$ Fouriersynthese bei 1σ konturiert. Die Phasen des platzierten Suchmodells wurden mit den MAD-Phasen kombiniert, *solvent flattened* und zweifach zyklisch gemittelt.
- D.) Finale $2Fo-wFc$ Fouriersynthese bei 2.2 Å Auflösung (1σ konturiert).

Modellbau und Verfeinerung

Modifizierte Phasensätze, wie oben beschrieben, erlaubten die sukzessive Interpretation der mit ihnen berechneten Fouriersynthesen im Modellbau mit MAIN (Turk 1992). Die erhaltenen Koordinaten wurden verfeinert mit *Positional*-Verfeinerungen, wie implementiert in CNS (Brünger, Adams et al. 1998). Für die Verfeinerung der Kofaktoren wurden aus den jeweils höchst aufgelösten Strukturen der PDB Parametersätze berechnet, die als *Restraints* in den Verfeinerungen verwendet wurden. Für die finalen Verfeinerungen der CO-Dehydrogenase von *H. pseudoflava* wurden Parametersätze aus den atomar aufgelösten ohne *Restraints* verfeinerten

Strukturen von *O. carboxidovorans* gewonnen, die die zur Zeit exaktesten Koordinaten für alle Kofaktoren darstellen. Im Laufe der Verfeinerungen wurden die *Restraints* für die anorganischen Strukturbereiche (direkte Mo-Umgebung und Eisen-Schwefel-Zentren) langsam verringert.

Die nahe atomar/atomar aufgelösten Strukturen (d: 1.09-1.48 Å) wurden mit SHELX (Sheldrick und Schneider 1997) und REFMAC (Murshudov, Lebedev et al. 1999) verfeinert. Diese Programme erlauben die Berechnung anisotroper Temperaturfaktoren für einzelne Atome und können ungeordnete Regionen mit mehreren Konformationen verfeinern. Während die Peptidstruktur mit den klassischen Parametersätzen (Engh und Huber 1991) *restrained* wurde, wurden die Kofaktoren ohne geometrische Vorgaben verfeinert. Der Modellbau wurde für diese Strukturen mit XTALVIEW (McRee 1993) durchgeführt, das die Modellierung alternativer Konformationen erlaubt und die anisotropen Temperaturfaktoren individueller Atome darstellen kann.

Interpretation des aktiven Zentrums

Erste Untersuchungen zum Aufbau des aktiven Zentrums

Zusätzliche Elektronendichte im aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase wurde auf der Basis der anomalen Streueigenschaften bei zwei Wellenlängen, sowie der nachgewiesenen Präsenz von Se in aktiver CO-Dehydrogenase interpretiert. Die Tatsache, daß es sich bei dem anomalen Streuer um ein terminal an ein S γ -Atom gebundenes Atom handelt, sprach zudem für ein nichtmetallisches Atom.

Obwohl die *2F θ -Fc*-Fouriersynthese mit einer Interpretation des Atoms als Schwefel erklärbar war, zeigten die anomalen Differenzfouriersynthesen, daß es sich um einen Streuer handeln muß, der eine Absorptionskante zwischen 0.9761 und 1.7316 Å hat (Abb.13). Der mittels Neutronen-Aktivierung nachgewiesene Se-Gehalt von 0.43 mol_(Se)*mol⁻¹_(CO-Dehydrogenase), sowie das Fehlen von erkennbaren anomalen Streuern außerhalb der [2Fe-2S]-Cluster und des aktiven Zentrums, d.h. dem Fehlen von anderen möglichen Positionen an denen das nachgewiesene Se vorliegen könnte, wurden als Interpretationsbasis des anomalen Streuers als ein Se-Atom verwendet. Dies passte ebenfalls zu der bekannten Aktivierung von CO-Dehydrogenase mit Na-Selenit, welche zu einem kovalenten Einbau von Se führt (Meyer und Rajagopalan 1984). Zum Zeitpunkt der Interpretation als Se sprachen alle experimentellen Befunde für eine Beteiligung von Se an der Katalyse der CO-Dehydrogenase.

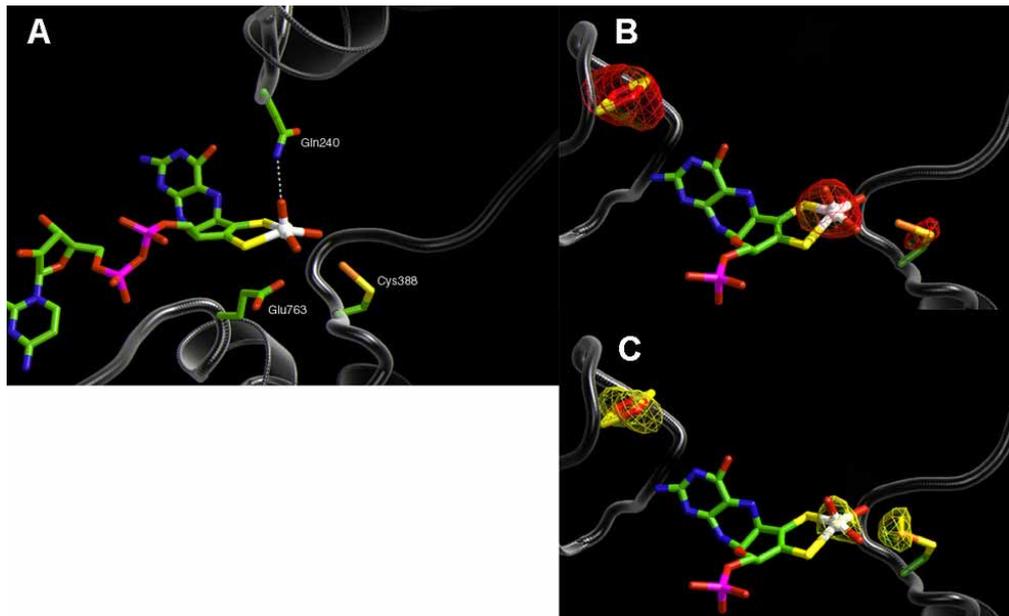


Abbildung 13: Die Molybdän-Lage der L-Untereinheit. (A) Die Liganden um das Mo-Ion wurden als ein Hydroxo- und zwei Oxo-Liganden interpretiert. Das Zentralatom ist an das MCD über die Dithiolen-Gruppe gebunden. Die zweite Koordinationssphäre des Mo-Ion wird aufgebaut aus den Resten Gln^{240L}, Glu^{763L} und Cys^{388L}. Ein unbekanntes Atom gebunden an den Cys-Rest wurde anhand der anomalen Streueigenschaften bei den beiden gemessenen Wellenlängen, wie seiner Bindung an Sy-Cys^{388L} als Se charakterisiert. (B) und (C) zeigen das aktive Zentrum zusammen mit dem nahen [2Fe-2S]-Zentrum. Differenz-Fouriersynthesen wurden berechnet mit den Phasen des fertigen Modells, die 90° gedreht wurden, und mit den Amplituden der Bijvoet-Differenzen bei den Wellenlängen $\lambda_1 = 1,7316 \text{ \AA}$ (B) in rot und mit Daten gemessen bei der Wellenlänge $\lambda_2 = 0,9761 \text{ \AA}$ in gelb. Die Fouriersynthesen sind bei 3σ konturiert. f'' -Werte mit dem Programm ABSORB für ausgewählte Atome berechnet: Fe: $\lambda_1, 3,9 e^-$ und $\lambda_2, 1,5 e^-$; Se: $\lambda_1, 1,41 e^-$ und $\lambda_2, 3,84 e^-$; S: $\lambda_1, 0,69 e^-$ und $\lambda_2, 0,23 e^-$; Mo: $\lambda_1, 3,36 e^-$ und $\lambda_2, 1,23 e^-$.

Weitere Untersuchungen des aktiven Zentrums der hochaktiven CO-Dehydrogenase Spezies

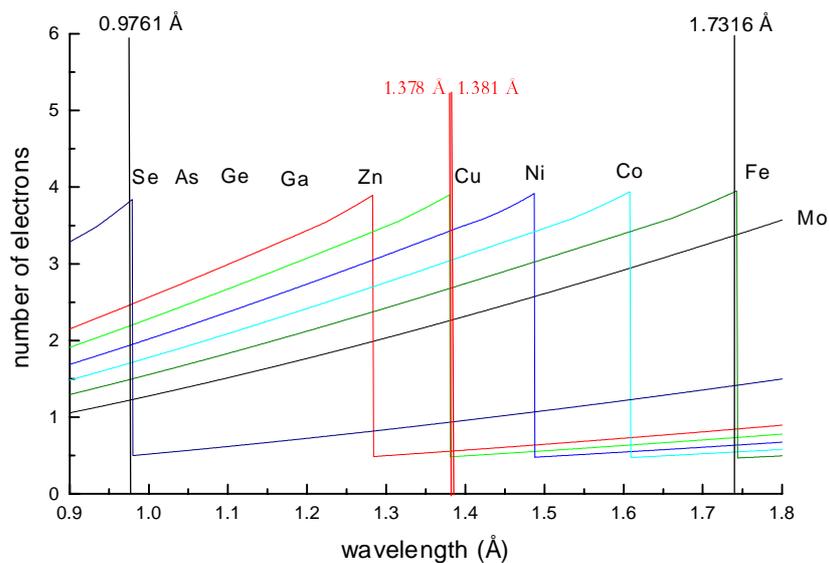


Abbildung 14: Berechnete K-Absorptionskanten und f'' -Werte (Ordinate) für die anomale Streuer der CO-Dehydrogenase (Mo, Fe, Se, Cu) in Abhängigkeit von der Wellenlänge (Abszisse). Während die beiden

Wellenlängen, die für die MAD-Phasierung gemessen wurden, nur zeigen können, daß ein anomaler Streuer mit einer Absorptionskante zwischen 0.9761 und 1.7316 Å vorliegen muß (die energetische Lage der Strahlung, die zur Datensammlung verwendet wurde als schwarze Linien dargestellt), konnte mit den Messungen bei 1.378 und 1.381 Å nachgewiesen werden, daß es sich bei diesem Streuer um Cu handeln muß, da sie eine Absorptionskante zwischen den beiden Wellenlängen aufzeigten.

Aufgrund von widersprüchlichen Ergebnissen, die in später aufgenommenen Datensätzen das Atom an der Position des Se als anomalen Streuer bei 1.05 Å auswiesen, d.h. bei einer Energie, die nicht zur Abspaltung eines Elektrons aus der K-Schale von Se ausreicht (Abb.15), wurde ein Fluoreszenz-Scan im Bereich von 0.8-4.0 Å bei einer Einstrahlwellenlänge von 0.9 Å an den Kristallen vorgenommen.

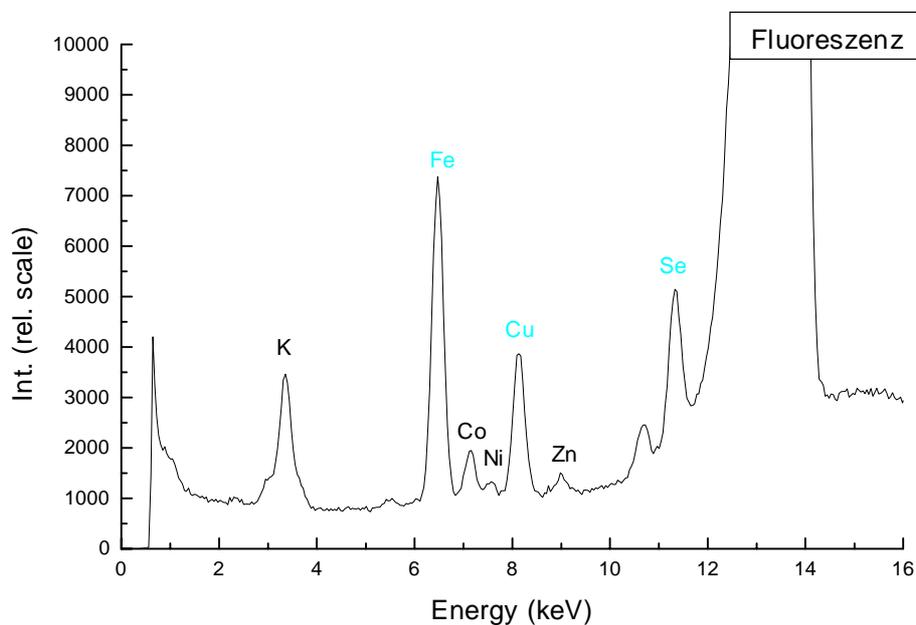


Abbildung 15: Fluoreszenz-Scan (0.8-4.0 Å) an einem gefrorenen CO-Dehydrogenase Kristall. Deutliche Fluoreszenz-Maxima sind für Kalium, Eisen, Kupfer und Selen erkennbar. Maxima für Co, Ni und Zn treten als Verunreinigungen der Probe, wie der Messapparatur häufig auf. Vergleicht man die Flächen der Fe-Fluoreszenz mit der Cu-Fluoreszenz, so ergibt sich näherungsweise ein 3:1 Verhältnis. Die intensive Strahlung bei ~13 keV entspricht der Anregungswellenlänge von 0.9 Å.

Dieser Scan zeigt deutlich die Anwesenheit von K, Fe, Cu und Se in dem CO-Dehydrogenase Kristall. Da die Präsenz von Fe durch die Eisen-Schwefel-Zentren erklärbar ist und Kalium einen Teil des Kristallisationspuffers bildet, wurden Datensätze bei Wellenlängen aufgenommen, die jeweils auf der höherenergetischen und der niederenergetischen Seite der K-Absorptionskanten von Cu und Se liegen. Dazu wurde zuvor die Lage der Absorptionskante von Cu zu 1.3795 Å bestimmt.

Zur Datensammlung wurden die Wellenlängen 1.381 Å, für den Datensatz auf der niederenergetischen Seite und 1.378 Å, für den Datensatz an der höherenergetischen Seite der Cu K-Absorptionskante, ausgewählt. Für Se wurde kein Scan durchgeführt und die theoretisch bestimmte K-Kante von 0.9795 Å verwendet. Datensätze wurden bei den Wellenlängen 0.9800 und 0.9770 Å gemessen.

Zur Lokalisierung der anomalen Streuer bei den betreffenden Wellenlängen wurden anomale Differenz-Fouriersynthesen für alle vermessen Datensätze berechnet (Abb.16 und 17).

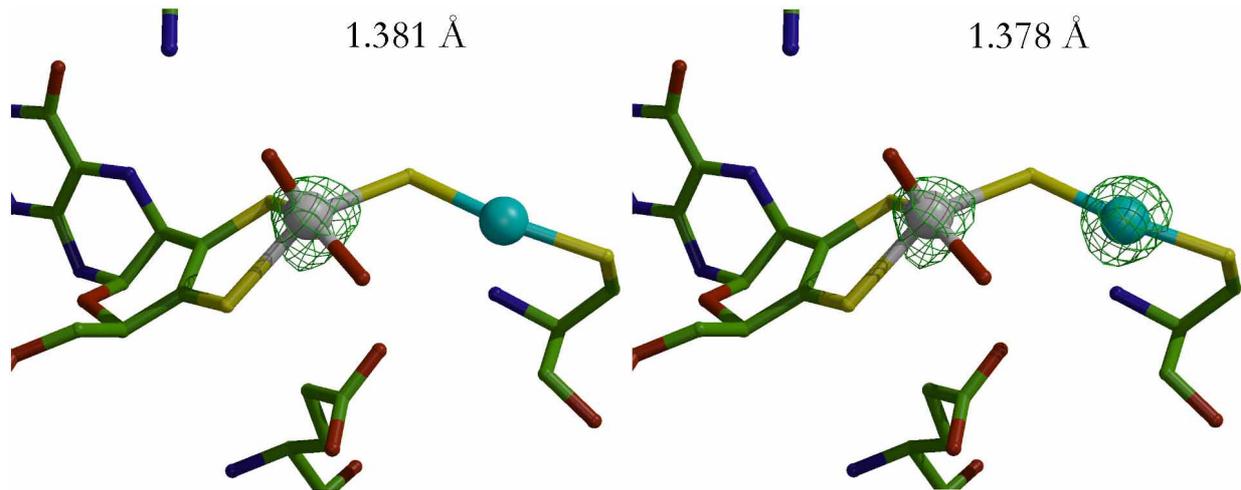


Abbildung 16: Anomale Differenz-Fouriersynthesen am aktiven Zentrum (Cu-Kante). Anomale Differenzfourier-Synthesen wurden für einen Datensatz bei einer Wellenlänge von λ_1 :1.381 Å (auf der niederenergetischen Seite der Cu K-Kante) und λ_2 :1.378 Å (auf der höherenergetischen Seite der Cu K-Kante) berechnet. Die Signale der anomalen Differenz-Fouriersynthese bei 9σ konturiert zeigen, daß das Mo-nahe Atom seine Absorptionskante zwischen 1.378 und 1.381 Å haben muß. Dies entspricht dem theoretisch erwarteten Bereich für die Absorptionskante von Kupfer und stimmt mit der zuvor gemessenen Absorptionskante von Cu bei 1.379(5) Å im CO-Dehydrogenase Kristall überein.

Die Identifizierung einer Absorptionskante für Strahlung zwischen 1.378 und 1.381 Å für das Mo-nahe Atom läßt die Identität des Streuers eindeutig feststellen (Abb.16). Aufgrund der Elementspezifität der Absorptionskanten ist die Festlegung der Absorptionskante gleichbedeutend mit einer eindeutigen Identifizierung des Atoms als Cu.

Die für Cu vorgenommenen Berechnungen der anomalen Beiträge auf der höherenergetischen und niederenergetische Seite der Absorptionskante wurden analog auch für Se durchgeführt. Während der anomale Streubeitrag von Mo und Cu bei beiden Wellenlängen (0.9800 und 0.9770 Å) klar erkennbar war, konnte keine Veränderung des anomalen Signals zwischen den beiden Wellenlängen nahe des aktiven Zentrums festgestellt werden (Abb.17).

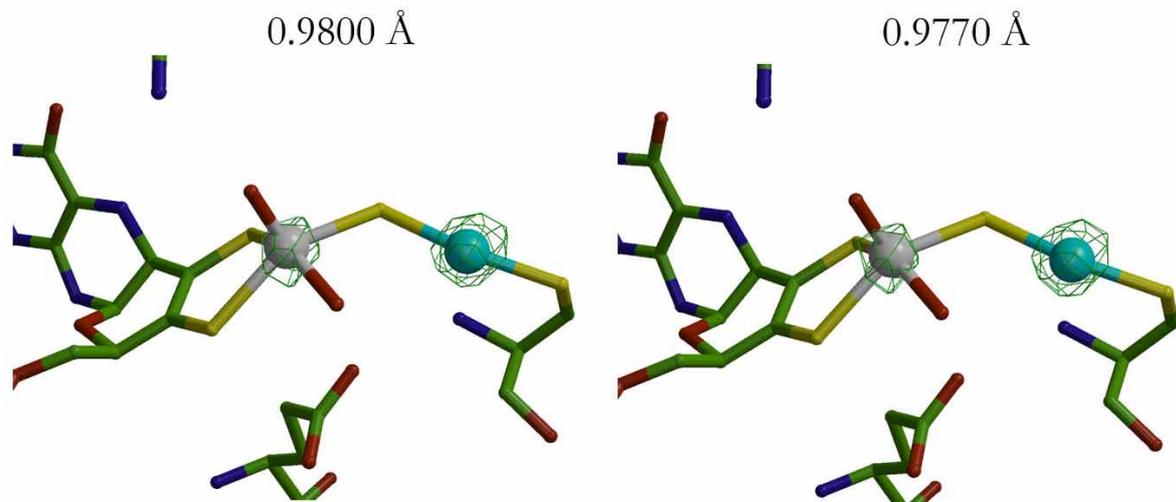


Abbildung 17: Anomale Differenz-Fouriersynthesen am aktiven Zentrum (Se-Kante). Anomale Differenzfourier-Synthesen wurden für einen Datensatz bei einer Wellenlänge von λ_1 :0.9800 Å (auf der niederenergetischen Seite der Se K-Kante) und λ_2 :0.9770 Å (auf der höherenergetischen Seite der Se K-Kante) berechnet. Die geringe Veränderung des anomalen Signals des Mo-nahen Atoms zwischen den beiden Wellenlängen zeigt, daß der Streuer sich im kontinuierlichen Bereich seiner elementtypischen Energieabsorption befindet und keine Absorptionskante in diesem Bereich hat. Die theoretische Absorptionskante von Se liegt bei 0.9795 Å, d.h. wäre das Mo-nahe Atom Se, so müssten sich seine anomalen Streueigenschaften bei 0.9800 Å und 0.9770 Å deutlich voneinander unterscheiden, was nicht der Fall ist.

Strukturbeschreibung der CO-Dehydrogenase

Die Dimerstruktur

CO-Dehydrogenase ist in Lösung ein Dimer und es wurden in der Patterson-Suche zwei Monomere pro asymmetrischer Einheit gefunden. Die Gesamtstruktur kann als Dimer von Heterotrimeren (LMS)₂ beschrieben werden (Abb.18). Das Vorliegen des Dimers in der asymmetrischen Einheit wurde zuvor durch die Berechnung des Matthews-Koeffizienten, wie auch durch die Berechnung einer Selbstrotationsfunktion nahegelegt. Das schmetterlingsförmige Dimer misst 145*100*70 Å³ mit einer solvens-zugänglichen Oberfläche von 78,076 Å². Die beiden Monomere des Dimers sind im wesentlichen identisch, mit einer *r.m.s.*-Abweichung von 0.30 Å für die korrespondierenden C α-Atome. Die Dimerkontakfläche umfaßt 2000 Å² und bedeckt 4.8 % der zugänglichen Oberfläche eines LMS-Monomers. Der Dimerkontakt wird durch eine Kopf-an-Kopf Anordnung der beiden L-Untereinheiten aufgebaut und ergibt sich im wesentlichen aus der Interaktion eines β-Faltblattes, das mit seinem nichtkristallographischen Symmetrieäquivalent im anderen Monomer interagiert.

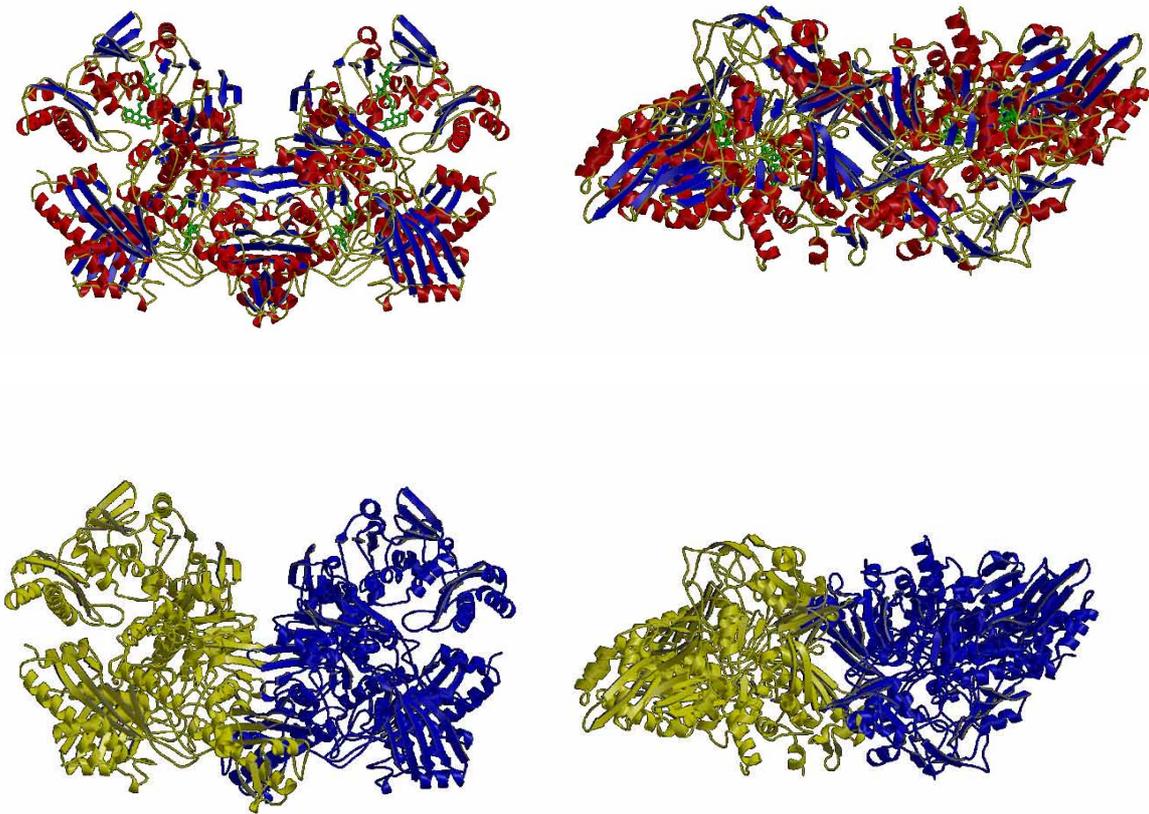


Abbildung 18: Bänderdarstellung des CO-Dehydrogenase Dimers. Auf der linken Seite liegt die zweizählige Symmetrieachse des Dimers vertikal in der Ebene der Abbildung. Auf der rechten Seite steht die zweizählige Achse senkrecht auf der Papierebene. Zur besseren Kenntlichmachung der Monomergrenzen sind in der unteren Reihe die Monomere unterschiedlich eingefärbt, während in der oberen Reihe die Einfärbung nach Sekundärstrukturelementen erfolgte.

Die Struktur des Monomers

Das CO-Dehydrogenase-Monomer besteht aus drei Untereinheiten, wobei jede der Untereinheiten eine Sorte von Kofaktor trägt. Die Redoxkomponenten eines LMS-strukturierten Monomers sind der MCD-Kofaktor mit dem benachbarten [CuMo]-Cluster, zwei [2Fe-2S]-Zentren vom Typ-I und Typ-II sowie ein nichtkovalent gebundenes FAD-Molekül (Abb.19). Die prosthetischen Gruppen bilden den Pfad, auf dem die Elektronen vom [CuMo]-Zentrum über das Typ-I [2Fe-2S]-Zentrum zum Typ-II [2Fe-2S]-Zentrum und schließlich zum FAD gelangen können. Die kürzesten Distanzen zwischen den einzelnen Kofaktoren sind 14.6 Å zwischen dem Mo-Ion und dem näher gelegenen Fe-Ion des proximalen Typ-I [2Fe-2S]-Zentrum, 12.4 Å zwischen den benachbarten Fe-Ionen des proximalen und des distalen Typ-II [2Fe-2S]-Zentrums, sowie 8.7 Å zwischen dem C7-Atom des FAD und dem näheren Fe-Ion des distalen [2Fe-2S]-Zentrums (Abb.19). Der kürzeste Abstand von Redoxzentren zwischen den beiden

Monomeren im Dimer ist 52.9 Å zwischen den beiden [CuMo]-Zentren und eine Interaktion zwischen den beiden Redoxketten scheint unwahrscheinlich.

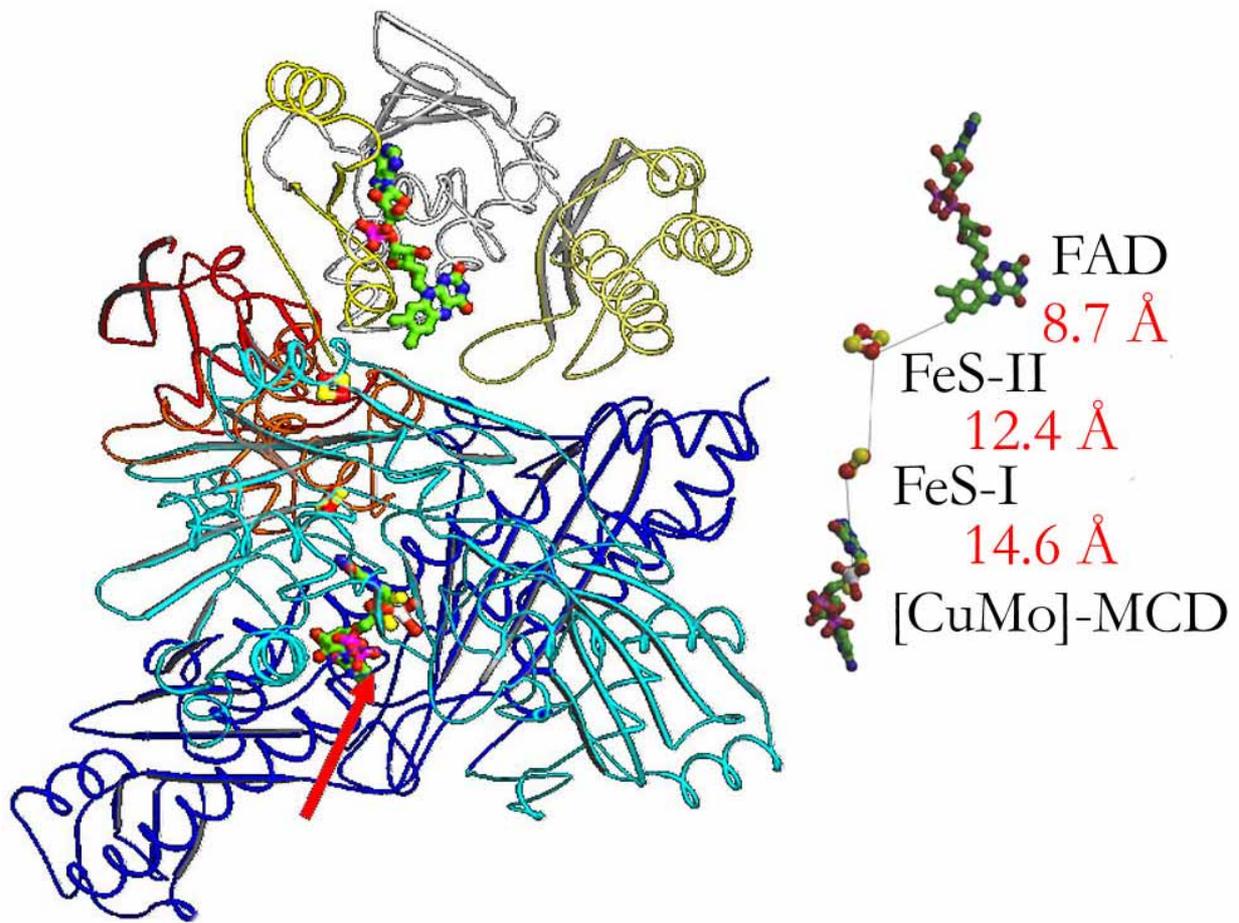


Abbildung 19: Aufbau des CO-Dehydrogenase-Monomers. Die drei Untereinheiten der CO-Dehydrogenase können weiter unterteilt werden in einzelne Domänen. Die L-Untereinheit in die cyan gefärbte N-terminale Domäne und die blaue C-terminale Domäne. Die S-Untereinheit trägt die Eisen-Schwefel-Zentren mit der N-terminalen Domäne in rot und der C-terminalen Domäne in orange. Die drei Domänen der M-Untereinheit sind gelb, weiss und cremefarben eingefärbt, sequentiell vom N-Terminus zum C-Terminus. Die kürzesten Verbindungen zwischen den Kofaktoren sind in der rechten Abbildung gekennzeichnet durch eine schwarze, unterbrochene Linie. Die Distanzen zwischen den Kofaktoren sind in rot eingetragen.

Aufbau der Untereinheiten

S-Untereinheit: Eisen-Schwefel-Cluster

Die S-Untereinheit ist das Eisen-Schwefel-Protein der CO-Dehydrogenase. Sie besteht aus 166 Aminosäuren und misst 45 Å * 30 Å * 40 Å. Die Untereinheit ist deutlich in eine N-terminale (aa 1-66) und eine C-terminale Domäne (aa 77-166) unterteilbar (Abb.20). Jede der Domänen trägt eines der spektroskopisch unterscheidbaren [2Fe-2S]-Zentren (Abb.20).

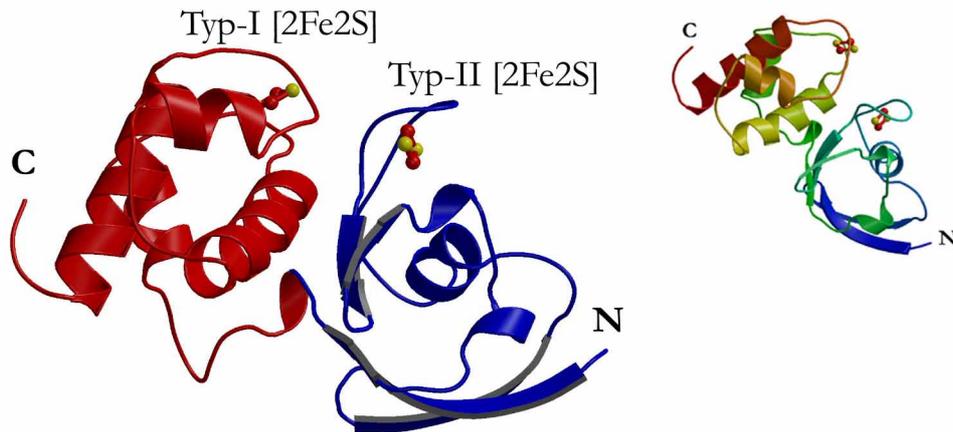


Abbildung 20: Bänderdarstellung des Eisen-Schwefel-Proteins der CO-Dehydrogenase, die S-Untereinheit. In der linken Abbildung ist die N-terminale Domäne in blau eingefärbt, die C-terminale Domäne in rot. In der rechtsstehenden Abbildung sind die Reste kontinuierlich vom N-Terminus zum C-Terminus von blau über grün und gelb bis rot eingefärbt.

Die C-terminale Domäne trägt das proximale Typ-I-Zentrum. Dieses [2Fe-2S]-Zentrum liegt 11 Å unterhalb der Proteinoberfläche im CO-Dehydrogenase Dimer verborgen, wobei es an der Untereinheiten Grenze zwischen S- und L-Untereinheit liegt. Das [2Fe-2S]-Zentrum ist am N-Terminus zweier α -Helices lokalisiert, die einen Teil des Vierhelixbündels mit zweizähliger Symmetrie bilden (Abb.20). Diese Faltung, wie auch das Bindemotiv CX_2CX_3CXC , wurde zum erstenmal für die entsprechende Domäne im Mop-Protein beschrieben (Romao, Archer et al. 1995) und scheint auf Molybdän-Hydroxylasen beschränkt zu sein.

Die Faltung der N-terminalen Domäne ist ähnlich zu den Pflanzen-Typ [2Fe-2S]-Ferredoxinen (Sticht und Roesch 1998). Sie trägt das distale Typ-II [2Fe-2S]-Zentrum, welches nahe der Grenzfläche der S-Untereinheit mit der M-, wie auch der L-Untereinheit liegt. Sie ist aufgebaut aus einem fünfsträngigen β -halfbarrel (Sheet A (Abb.21)), das eine orthogonal verlaufende α -Helix umfasst.

Die strukturelle Klassifizierung der Protein Datenbank-SCOP (Murzin, Brenner et al. 1995) teilt die N- und C-terminale Domäne ähnlich wie oben vorgeschlagen ein. Die Faltung der N-terminalen Domäne gehört danach zur Superfamilie der [2Fe-2S]-Ferredoxin verwandten Faltungen und wird als β -*grasp*, Ubiquitin ähnliches Motiv beschrieben. Die C-terminale Domäne bildet ihre eigene Superfamilie.

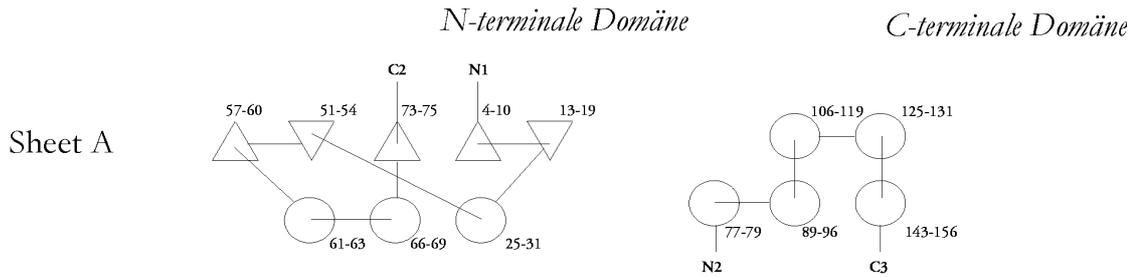


Abbildung 21: Topologiediagramm der S-Untereinheit. α -Helices werden durch Kreise symbolisiert und β -Faltblätter durch Dreiecke.

L-Untereinheit: Molybdän-Kofaktor-Bindung

Die L-Untereinheit ist herzförmig mit Dimensionen von $60 * 83 * 70 \text{ \AA}^3$ und besteht aus zwei Domänen (Abb.22).

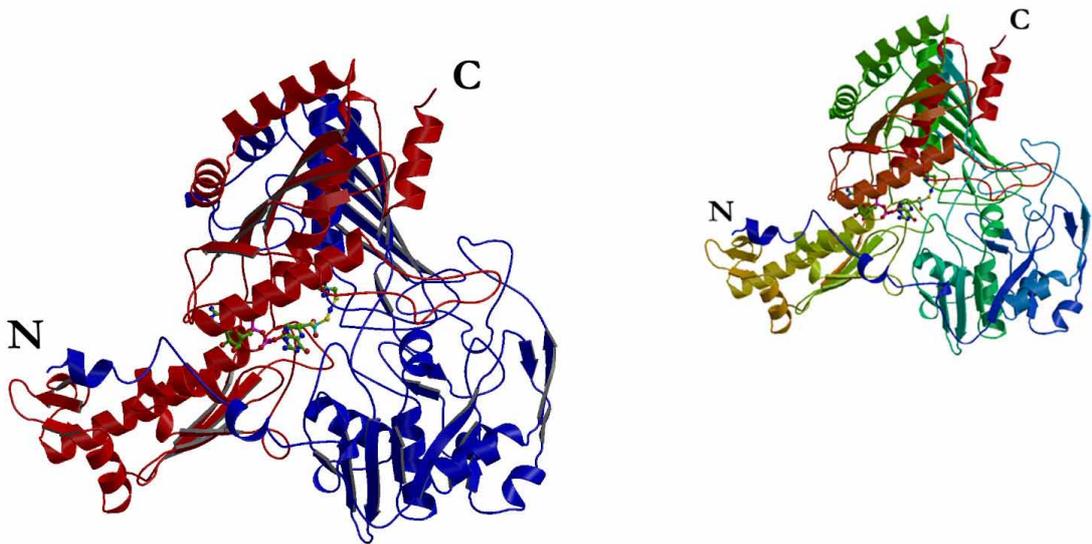


Abbildung 22: Bänderdarstellung des Molybdoproteins (L-Untereinheit). Links wurden die beiden Domänen in blau (N-terminale Domäne) und rot (C-terminale Domäne) eingefärbt. Rechts wurde das Protein kontinuierlich vom N-Terminus in blau über grün, gelb, orange zum C-Terminus in rot eingefärbt.

Seine N-terminale Domäne (aa 10-439) interagiert mit der M- und der S-Untereinheit im gleichen Monomer. Ihre Faltung wird durch ein sieben-strängiges (Sheet A (Abb.24)) und ein fünf-strängiges (Sheet E (Abb.24)) gemischtes β -Faltblatt dominiert. Die C-terminale Domäne (aa 440-809) kann weiter unterteilt werden in zwei Subdomänen. Die erste Subdomäne besteht aus einer zentralen α -Helix von 27 Aminosäuren, welches in ein kleines dreisträngiges β -Faltblatt (Sheet K (Abb.24)) gefolgt von einer α -Helix läuft, sowie einem viersträngigen β -Faltblatt (Sheet J (Abb.24)). Dieses interagiert mit seinem Symmetrieverwandten des anderen Monomers, und baut damit den Hauptdimer-Kontakt auf. Die zweite Subdomäne der C-terminalen Domäne besteht aus einem langen dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt (Sheet H (Abb.24)), das von sieben α -Helices umwunden wird. Der MCD-Molybdän-Kofaktor liegt eingebettet zwischen den

beiden Domänen und ist durch ein Netz aus Wasserstoffbrücken in der Untereinheit verankert (Abb.23).

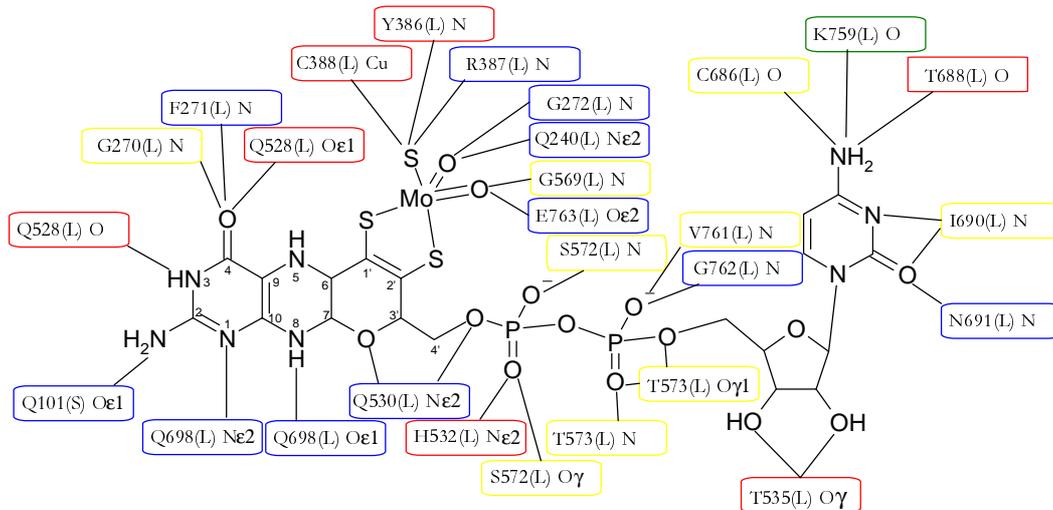


Abbildung 23: Interaktionen des MCD-Kofaktors mit der L- und S-Untereinheit. Schematische Darstellung der H-Brücken-Wechselwirkungen des Moco mit den umgebenden Protein-Resten. H-Brücken sind als durchgezogene Linien dargestellt und wurden ausgewählt, wenn sie Distanzen im Bereich von 2.5-3.3 Å zwischen möglichen H-Brückendonoren und -akzeptoren aufweisen. Die Farbe der umgebenden Kästchen entspricht dem Konservierungsgrad der Reste in der Molybdän-Hydroxylase, in einem Vergleich von ca. 50 Mitgliedern der Enzymfamilie. Blau: >90% konserviert, Grün: 70-90% konserviert, Gelb: 30-70% konserviert, Rot: <30% konserviert. Reste, die mit dem Pyranopterin-Teil des Kofaktors wechselwirken sind im allgemeinen hoch konserviert.

Die SCOP-Datenbank sieht für die L-Untereinheit eine Unterteilung in zwei Domänen vor, die der oben aufgeführten Einteilung nicht entspricht. Hiernach ist die N-terminale Domäne nur sehr klein (aa 10-146) und wird als eigene Superfamilie bezeichnet, die durch ein *β*-hammerhead-Motif gekennzeichnet ist. Die C-terminale Domäne (aa 147-809) wird als Molybdopterin-bindende Domäne bezeichnet.

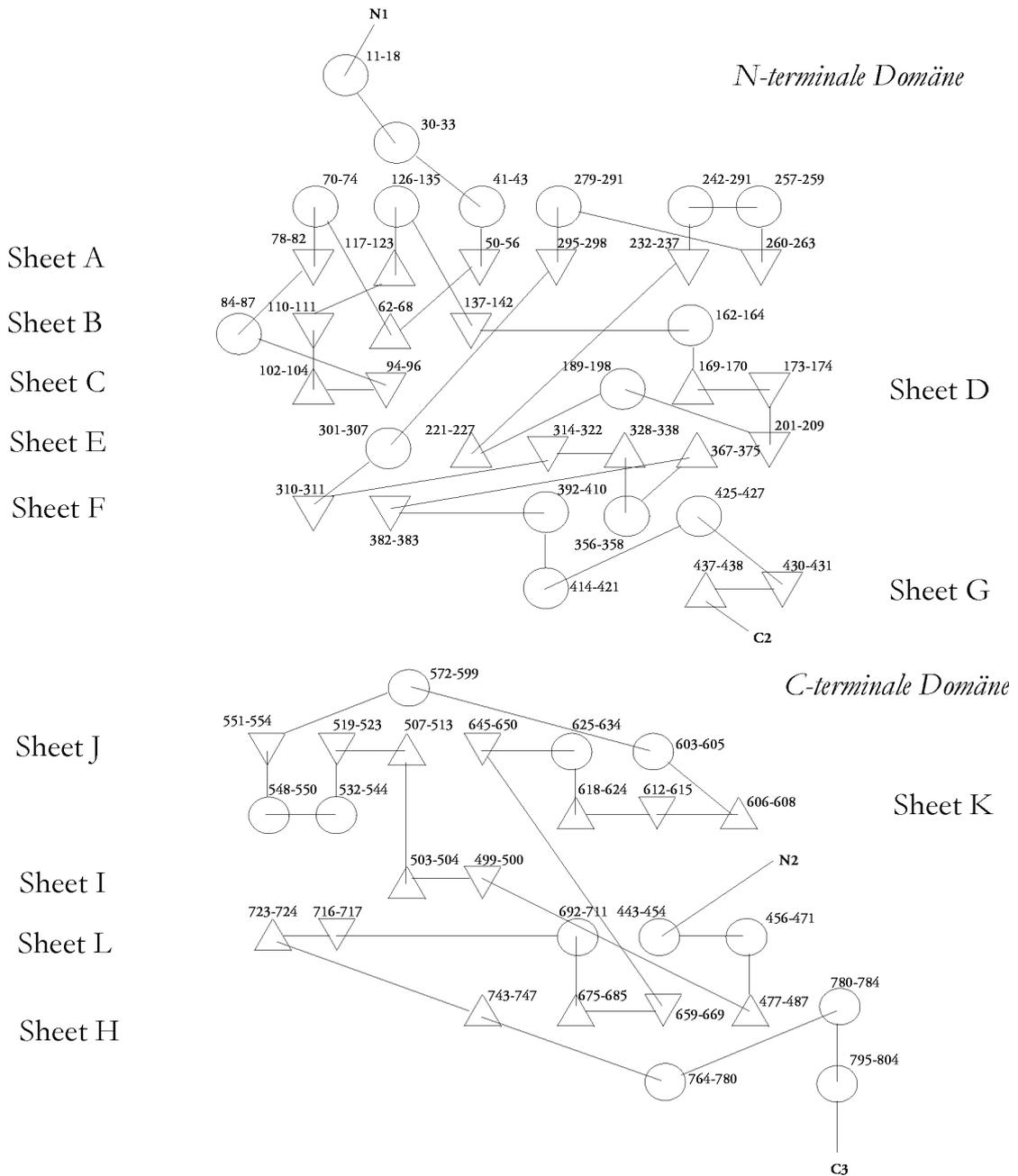


Abbildung 24: Topologiediagramm der L-Untereinheit. Dreiecke markieren β -Faltblätter und Kreise α -Helices.

M-Untereinheit: FAD

Die M-Untereinheit ist das Flavoprotein der CO-Dehydrogenase. Es bindet FAD in einem 1:1 Verhältnis und zeigt die Motive $^{32}\text{AGGHS}^{36}$ und $^{111}\text{TIGG}^{114}$. Beide Motive sind konserviert in der Molybdän-Hydroxylase-Familie (Dobbek, Gremer et al. 1999; Gremer, Kellner et al. 2000). Die M-Untereinheit wird in drei Domänen unterteilt, die N-terminale Domäne (aa: 1-54), die mittlere Domäne (aa: 60-174) und die C-terminale Domäne (aa: 180-285).

Die N-terminale Domäne wird aufgebaut durch ein dreisträngiges paralleles β -Faltblatt (β 1- β 3/Sheet A (Abb.25)), welches von zwei Helices (α 1- α 2) flankiert wird. Ein Loop zwischen α 2

und $\beta 2$ einer $\beta\alpha\beta$ -Einheit beinhaltet eines der beiden Doppel-Glycin Motive (Abb.25), die mit dem Pyrophosphat-Teil des FAD-Moleküls interagieren. Glycin-haltige Motive werden häufig in Nucleotid-bindenden Proteinbereichen gefunden werden (Schulz 1992).

Das Hauptstrukturelement der mittleren Untereinheit ist ein fünf-strängiges antiparalleles β -Faltblatt ($\beta 4$ - $\beta 8$ (Sheet B)(Abb.27)), das eine Insertion von sechs kleinen α -Helices ($\alpha 3$ - $\alpha 9$ (Abb.26)) beinhaltet, die sich um den Adenosin-Dinukleotid Teil des FAD wickeln. Eine dieser α -Helices trägt dabei das zweite Doppel-Glycin Motiv (aa 111-115 (Abb.26)), das ebenfalls mit dem FAD-Molekül interagiert. Die mittlere Domäne bildet zusammen mit der N-terminalen Domäne die beiden Flügel, die den Kofaktor halten.

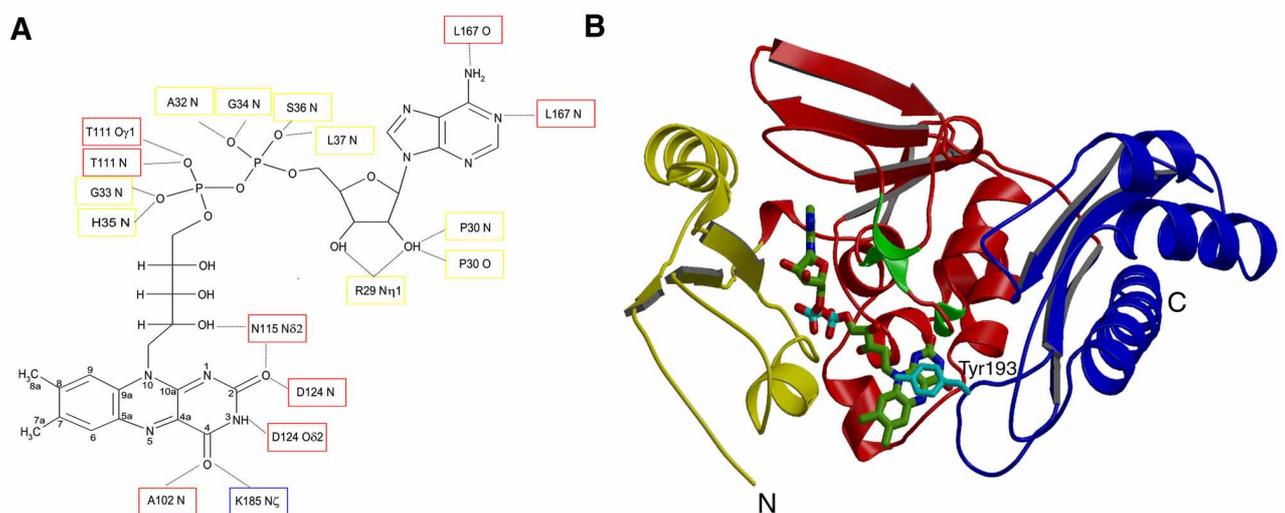


Abbildung 25: Die Struktur der M-Untereinheit. (A) Molekulare Interaktionen zwischen FAD und der M-Untereinheit. Die Atome des Isoalloxazinrings sind beschriftet. Die Aminosäuren, die das FAD Molekül über H-Brücken binden können sind markiert. Während die N-terminale Domäne (gelbe Kästchen) nur den Dinukleotid-Anteil des FAD Moleküls bindet, interagiert die mittlere Domäne auch mit dem Riboflavin-Anteil. Die C-terminale Domäne (Blaue Kästchen) zeigt nur eine mögliche Wasserstoffbrücke zum Isoalloxazinring. (B) Faltung der M-Untereinheit. Die N-terminale Domäne ist gelb eingefärbt, die mittlere Domäne rot und die C-terminale Domäne in blau. Tyr 193 verringert die Zugänglichkeit des Isoalloxazinringes für das umgebende Solvens und ist cyan eingefärbt.

Die C-terminale Domäne enthält ein drei-strängiges antiparalleles β -Faltblatt (Sheet D (Abb.27)), das in ein Drei-Helix-Bündel ($\alpha 10$ - $\alpha 12$ (Abb.26)) läuft. Der Isoalloxazin-Ring des FAD ist nur von einer Seite zugänglich ist, die nahe der Grenzfläche zwischen den Untereinheiten liegt. Der zentrale Teil des Isoalloxazin-Ringes wird von der umgebenden Lösung durch Tyr 193 geschützt, der ein Teil eines langgestreckten Loops zwischen dem ersten und zweiten Faltblatt der C-terminalen Domäne ist. Ein Teil des Dimethylbenzenringes bleibt weiterhin zugänglich. Dies gilt

für die C7- und C8-Positionen mit ihren Methyl-Gruppen, wie auch für die C9-Position des Isoalloxazin-Ringes. Das C4a- und N5-Atom kann evtl. durch Konformationsänderungen der C-terminalen Domäne oder Tyr 193 zugänglich werden.

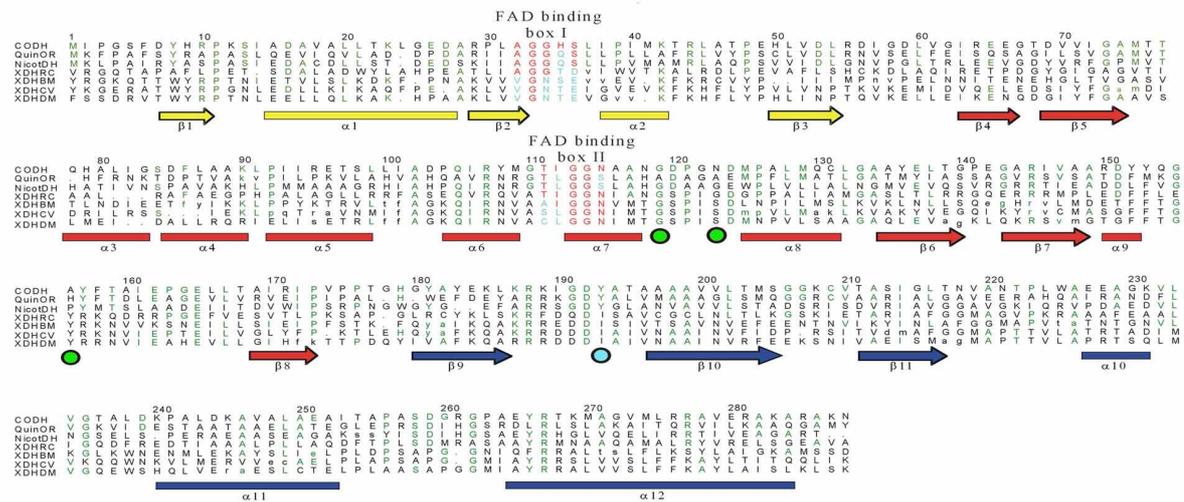


Abbildung 26: Sequenzvergleich der Mo-Hydroxylase-Flavoproteine. Sequenzvergleich von CoxM der CO-Dehydrogenase von *Oligotropha carboxidovorans* mit den korrespondierenden Bereichen repräsentativer Mitglieder der Molybdän-Hydroxylase-Familie. CODH, CO-Dehydrogenase von *O. carboxidovorans* (coxM, Swall: Q51323); QuinOR, Chinolin-2-Oxidoreduktase von *Pseudomonas putida* (qorM, Swall: P72222); NicoiDH, Nicotin-Dehydrogenase von *Arthrobacter nicotinovorans* (ndhA, Swall: Q17209); XDHCV, Xanthin-Dehydrogenase von *Calliphora vicina* (xdh, Swall: XDH CALVI); XDHDH, Xanthin-Dehydrogenase von *Drosophila melanogaster* (xdh, Swall: XDH DROME). Zwei Bereiche aus herausgehobenen Aminosäuren sind verantwortlich für die FAD-Bindung und in rot und blau markiert. Die entsprechenden Motive für die FAD-Bindung bei Enzymen der Molybdän-Hydroxylase Familie sind ähnlich zu denen, die für die Vanillyl-Alkohol-Oxidase-Familie der Flavoproteine gefunden werden. Die Sekundärstruktur wird dargestellt durch Pfeile für β-Falblätter und Balken für α-Helices, eingefärbt nach den Farben der Domänen. Aminosäure-Reste, die wenigstens dreimal in einer Reihe auftauchen sind in grün eingefärbt. Die Position von Tyr 193 ist markiert durch einen Cyan eingefärbten Kreis.

Die SCOP-Klassifizierung der M-Untereinheit gruppiert die N-terminale und mittlere Domäne zusammen in eine Domäne (aa 1-177) der Superfamilie der FAD bindenden Domänen mit zwei gemischten α/β Unterdomeänen. Die C-terminale Domäne wird definiert wie oben und bildet ihre eigene Superfamilie.

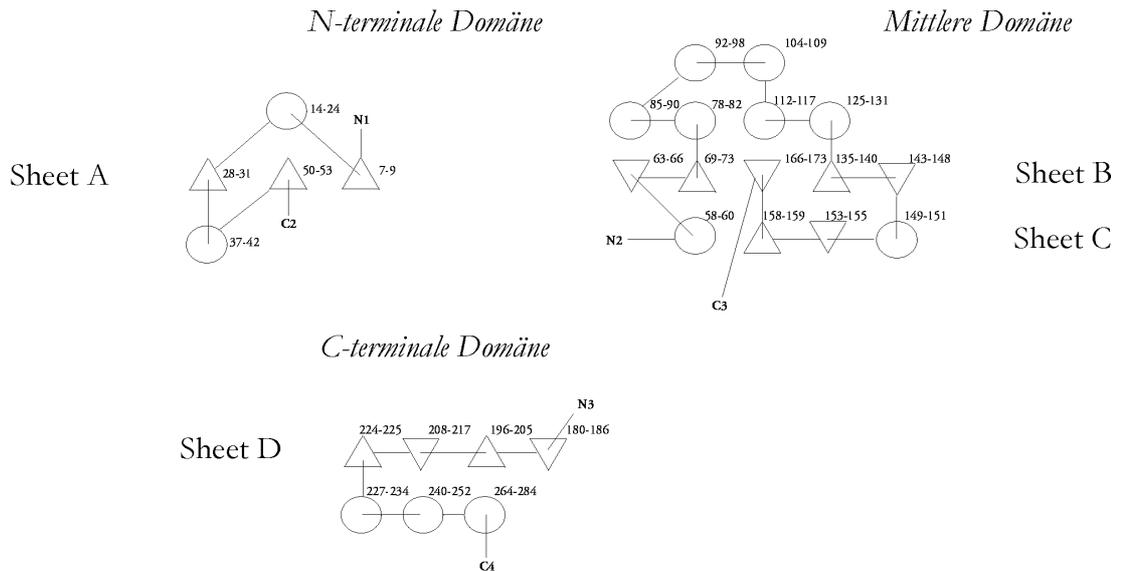


Abbildung 27: Topologiediagramm der M-Untereinheit. Dreiecke stellen β -Faltblätter und Kreise α -Helices dar.

Molybdän und Kupfer im aktiven Zentrum

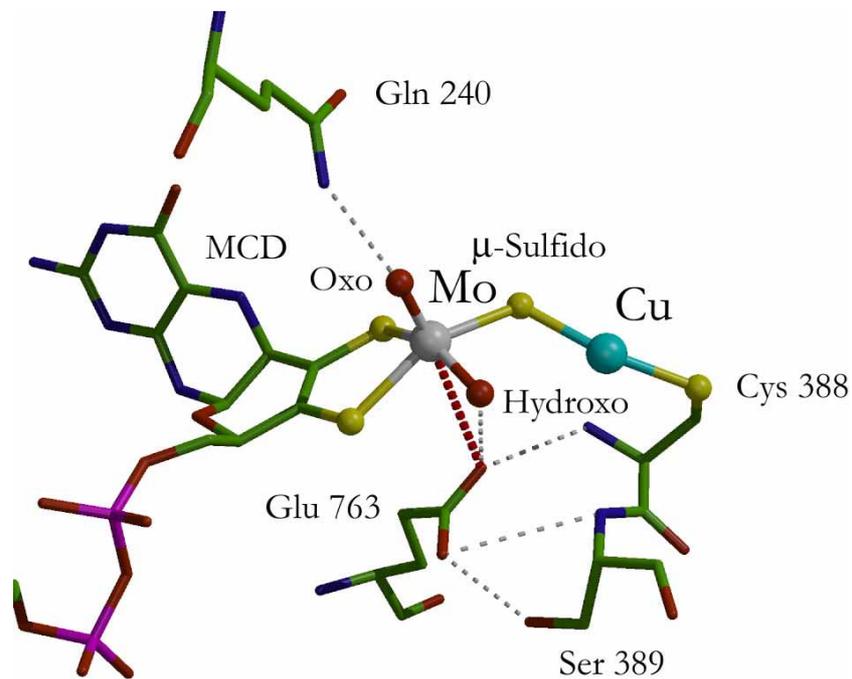


Abbildung 28: Der zweikernige [CuMo]-Cluster, das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenasen.

Das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase konnte durch die Kristallstruktur als ein neuartiges, zweikerniges Cu und Mo enthaltendes Zentrum charakterisiert werden (Abb.28). Das Mo-Ion

befindet sich in oxidiertem CO-Dehydrogenase im Oxidationszustand +VI und wird von 5 direkten Liganden koordiniert. Das Zentrum besteht auf der einen Seite aus einem Cu-Atom, gebunden an das S γ -Atom von Cys 388 und auf der anderen Seite aus der Mo-Hydroxo/-Oxo-Gruppe, ligandiert durch drei Schwefel-Atome. Zwei der Schwefel (S7 und S8) kommen dabei vom Molybdopterin-Kofaktor, während das dritte Atom ein Cu und Mo verbrückender μ -Sulfido-Ligand ist. Die Anwesenheit des μ -Sulfido-Liganden konnte erst bei der Untersuchung der hochaktiven Form der CO-Dehydrogenase erkannt werden. Dieses Enzym stammt aus einer Reinigung, die ein Protein mit bislang höchster spezifischer Aktivität lieferte (L.Gremer 2000). Redoxdifferenzspektren zwischen Dithionit-reduzierter und CO-reduzierter CO-Dehydrogenase lassen erkennen, daß dieses Enzym zu mehr als 90% katalytisch kompetent ist (L.Gremer 2000). Trotz der Pentakoordination des Mo weisen die Winkel zwischen den Liganden es als eine tetraedrische Koordination aus, wobei der Dithiolen-Ligand über einem Scheitelpunkt des Tetraeders sitzt und als ein einzelner zweizähniger Ligand betrachtet werden kann. Die Anwesenheit des voluminösen Dithiolen-Liganden bewirkt dabei eine Verkürzung des Winkels zwischen dem μ -Sulfido-Liganden und dem Hydroxo-Liganden, die der Dithiolen-Gruppe am nächsten sind (Abb.28). Unter den drei Schwefel-Liganden zeigt der μ -Sulfido-Ligand die stärksten Wechselwirkungen mit dem Mo, resultierend in kurzen Bindungsabständen zwischen μ -Sulfido-Liganden und Mo von 2.29-2.36 Å, typisch für eine Mo-S Einfachbindung mit Werten um 2.4 Å (Schindelin, Kisker et al. 1997).

Cu hat nur zwei direkte Liganden, es teilt den μ -Sulfido-Liganden mit Mo und ist zusätzlich an das S γ -Atom von Cys 388 gebunden (Abb.28). Sie liegen in einer verzerrt-linearen Anordnung vor und zeigen Bindungslängen um 2.18 Å. Die lineare Koordinationsgeometrie, wie das Fehlen von Cu(II)-typischen ESR- und UV/VIS-spektroskopischen Eigenschaften, kennzeichnen den Oxidationszustand des Cu-Atoms als Cu(+I).

Die CO-Dehydrogenase von *Hydrogenophaga pseudoflava*

CO-Dehydrogenase von H. pseudoflava in Gegenwart von Mo im Kulturmedium

Die Struktur der aktiven Mo^{plus} CO-Dehydrogenase von *H. pseudoflava* zeigt eine sehr ähnliche Faltung und Anordnung der Untereinheiten wie die CO-Dehydrogenase von *O. carboxidovorans*. Das schmetterlingsförmige Dimer hat eine Gesamtausdehnung von 145*100*70 Å³. Die beiden Monomere zeigen *rms*-Abweichungen von 0.24 Å für die C α -Atome. Der Aufbau in L-, M- und S-Untereinheit entspricht der *O. carboxidovorans*-Struktur. Die prosthetischen Gruppen bilden den Pfad für den intramolekularen Elektronentransfer mit den kürzesten Distanzen von Mo – Fe_{[2Fe-2S] I} = 14.4 Å, Fe_{[2Fe-2S] I} – Fe_{[2Fe-2S] II} = 12.5 Å, Fe_{[2Fe-2S] II} – FAD_{CH37a} = 8.8 Å. Eine Überlagerung der C α -

Atome der Monomere von *H. pseudoflava* und *O. carboxidovorans* CO-Dehydrogenasen zeigen *rms*-Abweichungen von 0.73 Å (0.64 Å, 0.43 Å und 0.79 Å für die L-, S- und M-Untereinheiten). Das Dimer-Grenzfläche der beiden Heterotrimeren ist dicht gepackt, bedeckt 4260 Å² der zugänglichen Oberfläche und wird durch eine Kopf-zu-Kopf Anordnung der beiden L-Untereinheiten aufgebaut.

Die S-Untereinheit hat Ausmaße von 45*30*40 Å³ und ist geteilt in eine C-terminale (aa 77-157) und eine N-terminale Domäne (aa 3-75), die beide je einen [2Fe-2S]-Cluster binden. Das Typ-I Zentrum liegt 12 Å unterhalb der Proteinoberfläche, nahe der Kontaktfläche zwischen der L- und S-Untereinheit und wird durch zwei Loops gehalten. Das erste Fe-Ion wird gebunden durch Cys 101 und Cys 138, das zweite durch Cys 104 und Cys 136. Gln 100 der S-Untereinheit kann über seine Amid-Gruppe mit einem der S-Atome des Typ-I Zentrums wechselwirken (3.3 Å) und über seine Oε1-Gruppe mit der Aminogruppe an der C2 Position des Pyrimidin-Ringes des Moco. Das Typ-II Zentrum liegt zwischen der S- und der M-Untereinheit. Das Faltungsmotiv wird aus einem fünfsträngigen antiparallelen/parallelen β-Faltblatt, welches eine α-Helix orthogonal zur Richtung der Faltblätter umschließt, gebildet. Ein Fe-Atom des [2Fe-2S]-Zentrums wird durch das Sγ-Atom des Cys 42 und Cys 47 koordiniert, das andere durch Cys 50 und Cys 62.

Die M-Untereinheit hat Dimensionen von 60*50*40 Å³ und wird aufgebaut durch eine N-terminale (aa 1-54), eine mittlere (aa 60-147) und eine C-terminale Domäne (aa 60-147) (Abb.29). FAD wird gebunden durch die N-terminale und die mittlere Domäne. Ein β-turn der N-terminalen Domäne trägt das Motiv ³²AGGHS³⁶, dessen Reste mit dem Pyrophosphat-Teil des FAD interagieren. Die mittlere Domäne beinhaltet ein fünfsträngiges antiparalleles β-Faltblatt mit einer Insertion von 6 kleinen α-Helices, die sich um den ADP Teil des FAD Moleküls winden. Eine dieser Helices beinhaltet das zweite FAD bindende Motiv ¹¹¹TIGGD¹¹⁵. Die C-terminale Domäne, die durch einen flexiblen Loop mit der mittleren Domäne verbunden ist, trägt Trp 193 auf einem ausgedehnten Loop. Die Trp-Seitenkette verbirgt den zentralen Teil des Isoalloxazinringes mit den redoxaktiven C4a- und N5 Atomen vor der umgebenden Lösung. Die C7- und C8-Methylgruppen, sowie das C9-Atom des Dimethylbenzenringes des FAD verbleiben der Lösung zugänglich. Mit Ausnahme weniger Aminosäureaustausche zwischen *O. carboxidovorans* und *H. pseudoflava* entsprechen sich die Interaktionen zwischen Protein und FAD.

Die L-Untereinheit hat eine herzförmige Gestalt mit Dimensionen von 85*75*70 Å³ und kann unterteilt werden in eine N-terminale Domäne (aa 7-435) und eine C-terminale Domäne (aa 440-803), die zueinander näherungsweise orthogonal liegen, wobei der Moco im Interface lokalisiert ist (Abb.29). Der Moco erstreckt sich im Inneren der L-Untereinheit mit einer maximalen Länge

von 17 Å zwischen der Oxo-Gruppe an der C4-Position des Pyrimidinringes des Pyranopterin und der Aminogruppe an der C4 Position des Cytosins. Der Kofaktor liegt mit seinem Pyranopterin-Teil und dem Mo-Ion an der Basis der Einstülpung des aktiven Zentrums, ausgebildet durch die N-terminale Domäne. Der 5'-CDP Anteil liegt in der entgegengesetzten Richtung tief verborgen von der C-terminalen Domäne. Die N-terminale Domäne besitzt zwei unterschiedene Subdomänen. Der untere, dünne Teil der Domäne besteht aus einem fünfsträngigen antiparallel-/parallelen β -Faltblatt, welches durch zwei α -Helices flankiert wird und einer dritten Helix über dem Faltblatt. Der dickere obere Teil wechselwirkt mit der S- und der M-Untereinheit im selben Monomer und der N-terminalen Domäne der L-Untereinheit des anderen Monomers. Seine Faltung wird dominiert durch ein siebensträngiges antiparallel/paralleles β -Faltblatt, welches eine zentrale α -Helix umhüllt, und ist flankiert durch zwei α -Helices. Die C-terminale Domäne kann in zwei Flügel unterteilt werden, die 85 Å umfassen. Der Pyrophosphat-Teil des Moco liegt am Schnittpunkt der Flügel. Der erste Teil besteht aus einem grossen viersträngigen antiparallel/parallelem β -Faltblatt, umgeben von fünf α -Helices. Der zweite Teil besteht aus einer großen, zentralen α -Helix, die in ein schmales, dreisträngiges, antiparalleles β -Faltblatt mündet, dem eine α -Helix und ein viersträngiges antiparallel/paralleles β -Faltblatt folgt, das mit dem anderen Monomer interagiert.

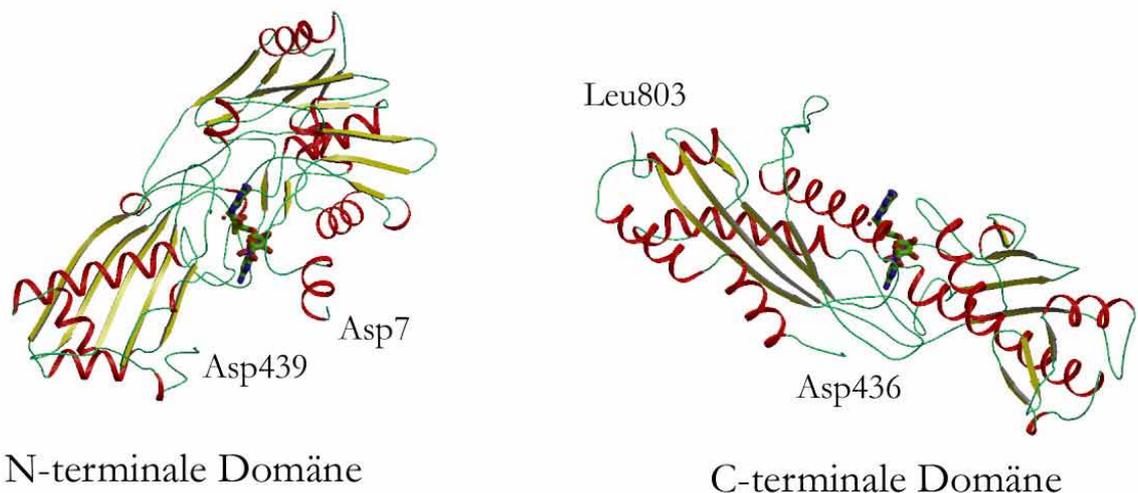


Abbildung 29: Bänderdarstellung der Faltung der L-Untereinheit der CO-Dehydrogenase von *H. pseudoflava*. Die N-terminale und C-terminale Domäne. Helices sind in rot, Faltblätter in gelb und *loops* in grün eingefärbt.

Ein Substratkanal mit Eingang nahe der Dimerrenzfläche endet am Moco. Es ist ein schmaler, hydrophober Kanal von 17 Å Länge und 6 Å Breite (gemessen von den C ^{β} -Atomen der umgebenden Aminosäuren). Der Kanal, wie der Moco, sind umgeben von der N-terminalen und

der C-terminalen Domäne. Das aktive Zentrum der *H. pseudoflava* CO-Dehydrogenase ist dem der *O. carboxidovorans* CO-Dehydrogenase sehr ähnlich. Aufgrund der geringeren Auflösung ist die Interpretation der Liganden des aktiven Zentrums nicht eindeutig, entspricht aber offensichtlich im wesentlichen dem der *O. carboxidovorans* CO-Dehydrogenase. Die Oxo-Gruppe ist in Wasserstoffbrücken-Distanz zur N ϵ 2 Gruppe von Gln 237, welcher Teil eines β -Turns einer $\beta\alpha\beta$ Einheit ist. In Trans-Position zur Oxo-Gruppe liegt O ϵ 2 von Glu 757 in einer Entfernung von 3.5 Å. Aufgrund der Parallelen in Reaktivität wie Inaktivierung ist anzunehmen, daß die Interpretation eines Se-Atoms im aktiven Zentrum (Hänzelmann, Dobbek et al. 2000) auch für *H. pseudoflava* nicht korrekt ist und hier, wie bei *O. carboxidovorans* CO-Dehydrogenase das [CuMo] Zentrum das Herz der katalytischen Einheit ist. Die Distanz zwischen Cu und Mo ist in *H. pseudoflava* CO-Dehydrogenase mit 4.4 Å etwa 0.6 Å länger als in dem *O. carboxidovorans* Enzym. Verfeinerungen des Temperatur-Faktors legen eine Cu Besetzung der untersuchten *H. pseudoflava* CO-Dehydrogenase Spezies von ca. 0.25 Mol pro Mol Monomer nahe.

Die Seitenkette von Arg 384 mit ihrer Guanidinium Gruppe erstreckt sich vom Mo-Ion bis zum Pyrazinring der Pyranopterin-Einheit mit NH1 und NH2 der Guanidinium-Gruppe nahe bei der NH8 Position des Pyrazin-Ringes. Arg 384 in der L-Untereinheit der *H. pseudoflava* CO-Dehydrogenase und Arg 387 in der L-Untereinheit der *O. carboxidovorans* CO-Dehydrogenase, wie Arg 533 von Mop (Romao, Archer et al. 1995) und Mod (Rebelo, Maciera et al. 2000) besitzen die gleiche Konformation und Orientierung der Seitenkette. Zusätzliche deutliche Dichte am C γ Atom von Arg 384 der *H. pseudoflava* CO-Dehydrogenase wurde als eine Hydroxyl-Gruppe, in 5.5 Å Abstand vom Mo-Ion modelliert. Ein mögliche Funktion dieser Hydroxyl-Gruppe könnte die Stabilisierung der gestreckten Konformation von Arg 384 sein. Die Tatsache, daß *O. carboxidovorans* CO-Dehydrogenase diese Modifikation nicht enthält, deutet allerdings an, daß sie für die Funktion nicht essentiell ist.

CO-Dehydrogenase von H. pseudoflava in Abwesenheit von Mo im Kulturmedium

Inaktive Mo^{minus} CO-Dehydrogenase wird produziert in Gegenwart eines Überschusses an Wolfram gegenüber Molybdän im Wachstumsmedium (Hänzelmann und Meyer 1998). Die Gesamtstruktur ist die gleiche wie bei Mo^{plus} CO-Dehydrogenase. Diese Ähnlichkeit umfaßt den Aufbau des Enzyms, welches ebenso ein Dimer aus Heterotrimeren ist, wie die Anwesenheit der beiden [2Fe-2S]-Zentren. Ein Nachweis von Cu wurde bei diesem Enzym noch nicht durchgeführt. Größere konformationelle Änderungen, wie Domänen- oder *Loop*-Bewegungen wurden nicht gefunden. Eine Überlagerung der C α -Atome des Monomers von Mo^{plus} und Mo^{minus} CO-Dehydrogenase ergibt eine *rms* Abweichung von 0.13 Å. Die L-Untereinheit von Mo^{minus} CO-Dehydrogenase beinhaltet nur den 5'-CDP Teil, aber nicht den Mo-Pyranopterin-Teil des Moco.

Das 5'-CDP liegt in Mo^{minus} an der Position und zeigt die gleichen Interaktionen, die dieser Molekülteil auch als Teil des MCD in Mo^{plus} CO-Dehydrogenase zeigt (Abb.30). Dieses Ergebnis bestätigt die zuvor durchgeführten biochemischen Messungen (Hänzelmann und Meyer 1998), in denen 5'-CDP auch als die wesentliche Nukleotid-Komponente der L-Untereinheit in Mo^{minus} CO-Dehydrogenase identifiziert wurde. Das Fehlen von Elektronendichte an der Position des Mo-Ions und des Pyranopterins deuten das Fehlen der beiden Komponenten an. Trotz der Abwesenheit des Pyranopterinringes zeigt die Umgebung um den fehlenden Kofaktor die gleichen strukturellen Elemente wie Mo^{plus} CO-Dehydrogenase. Die Mo^{minus} -Struktur bestätigt die These, daß ein Überschuß von Wolframaten über Molybdaten die Biosynthese des Moco auf der Ebene des MPT terminiert und MPT nicht in das Enzym eingebaut wird (Hänzelmann und Meyer 1998). 5'-CDP wird offensichtlich während der Faltung des Proteins eingebaut, um die Moco-Bindungsregion zu stabilisieren. Der Pyranopterin-Anteil ist nicht wesentlich in die Stabilisierung des Molybdoproteins involviert, da es seine korrekte Struktur und Konformation auch in seiner Abwesenheit erreicht.

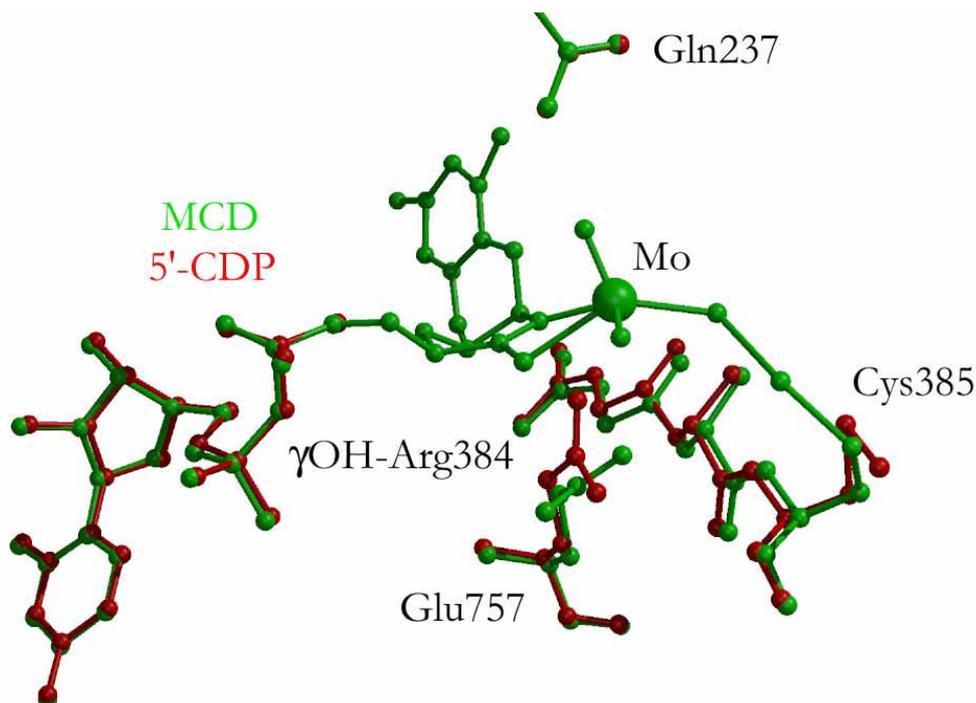


Abbildung 30: Überlagerung der aktiven Zentren von Mo^{plus} (grün) und Mo^{minus} (rot) *H. pseudoflava* CO-Dehydrogenase.

Alle Aminosäuren, die mit dem Moco in Mo^{plus} interagieren sind in Mo^{minus} CO-Dehydrogenase ebenfalls geordnet. Konformationsänderungen sind zu beobachten für die Carboxylat-Gruppe von Glu 757, die mit dem Mo-Ion interagiert und für den Cu Liganden Cys 385 (Abb.30). Dies bedeutet, daß die Konformationen von Glu 757 und Cys 385 teilweise durch ihre

Wechselwirkung mit Mo, bzw. dem Pyranopterinring bestimmt sind, während die hoch konservierten Reste Arg 384 und Gln 237 unverändert bleiben.

Die in Mo^{plus} modifizierte Aminosäure Arg 384 trägt auch in Mo^{minus} eine Hydroxyl-Gruppe an der C γ -Position, was für eine posttranslationale Modifikation spricht, die unabhängig von der Aktivität des Enzyms ist.

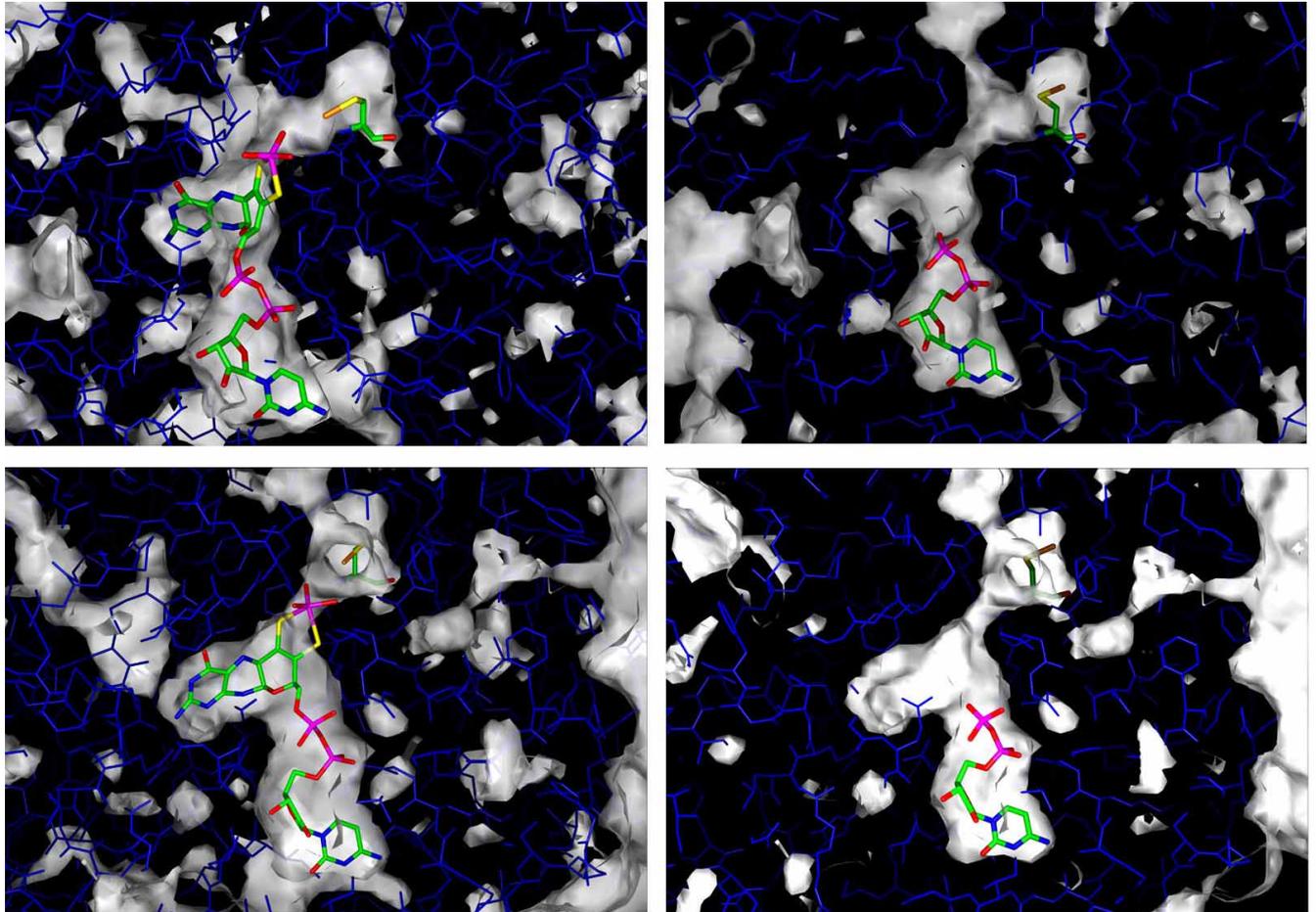


Abbildung 31: Oberflächendarstellung des Hohlraums um den MCD-Kofaktor. Links Mo^{plus}, rechts Mo^{minus}. Das aktive Zentrum von Mo^{plus} CO-Dehydrogenase als Stäbchen-Modell mit MCD–Mo–Cu–Cys 385. Der überwiegende Anteil des Enzyms ist in der inaktiven desulfo-Form, daher wurden drei Oxo-Liganden am Mo gefunden. Die van-der-Waals-Oberfläche des Proteins wurde berechnet unter Auslassung der Wasser-Moleküle, des MCDs und Cys 385. Rechts das aktive Zentrum von Mo^{minus} CO-Dehydrogenase mit 5'-CDP und Cys 385. Die Abbildung wurde mit INSIGHTII berechnet und erstellt.

Kristallographische Studien zum Reaktionsmechanismus

Das aktive Zentrum in der oxidierten as isolated Form

Die Bestimmung der exakten Geometrie des aktiven, oxidierten Enzyms ist von besonderer Bedeutung, da sie sowohl den Start- wie auch den Endpunkt des katalytischen Zyklus darstellt. Alle Veränderungen, die andere katalytische oder inaktive Spezies zeigen, werden an der aktiven Form gemessen.

Ein unvermeidbarer Effekt in der Röntgenkristallographie ist die Generierung von Elektronen durch die Absorption der Röntgenstrahlung durch das kristalline Material. Dies führt typischerweise zur Reduktion, teilweise auch zur Oxidation, von redox-sensitiven Gruppen. Obwohl dieser Prozess temperaturabhängig ist, tritt er auch bei -160°C noch meßbar auf (Nave 1995).

Um die Auswirkung dieser zeit- und dosisabhängigen Photoreduktion abschätzen zu können wurden zwei oxidierte Kristalle am Synchrotron vermessen. Vom ersten gefrorenen Kristall wurden im Laufe von 7 h ein hochaufgelöster und ein niedrigaufgelöster Datensatz gesammelt, die anschließend zu einem Datensatz bis 1.17 \AA Auflösung zusammengefaßt wurden. Ein zweiter gefrorener Kristall wurde in weniger als 1 h vermessen, wobei ein Datensatz bis 1.48 \AA Auflösung aufgenommen wurde.

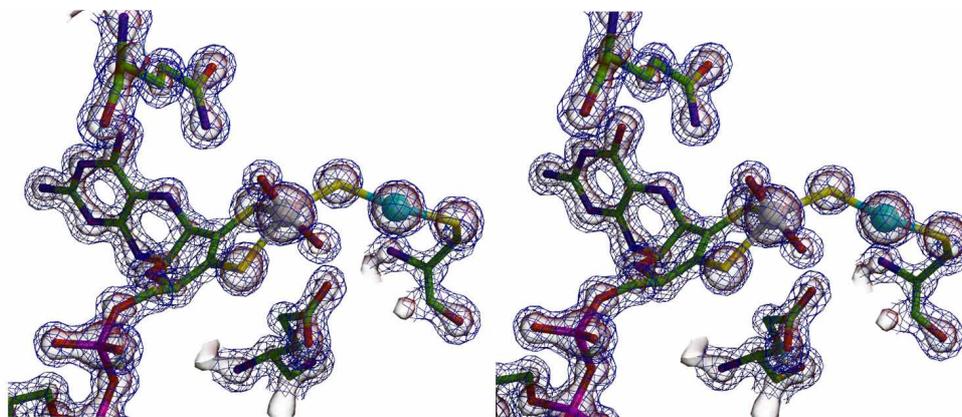


Abbildung 32: Stereodarstellung des [CuMo]-Zentrums in der oxidierten Form. $2F_o-F_c$ Fouriersynthese konturiert bei 1.0σ (Linien), bzw. 2.5σ (Oberfläche).

Das aktive Zentrum der oxidierten CO-Dehydrogenase trägt wie alle aktiven Formen den [CuMo]-Cluster (Abb.32). Mo ist fünfach koordiniert und tetraedrisch von seinen Liganden umgeben. Die Distanzen zu den Dithiolen-Schwefeln (Mo-S7' und Mo-S8') sind nahezu identisch und für Mo-S Einfachbindungen vergleichsweise lang (Abb.33). Die Wechselwirkung zwischen Mo und O ϵ 2 des Glu 763 ist mit 3.13 \AA , verglichen mit den reduzierten und Inhibitor-gebundenen Formen, kurz. Die Distanz zwischen Cu und Mo ist ebenfalls am kürzesten in der oxidierten Form.

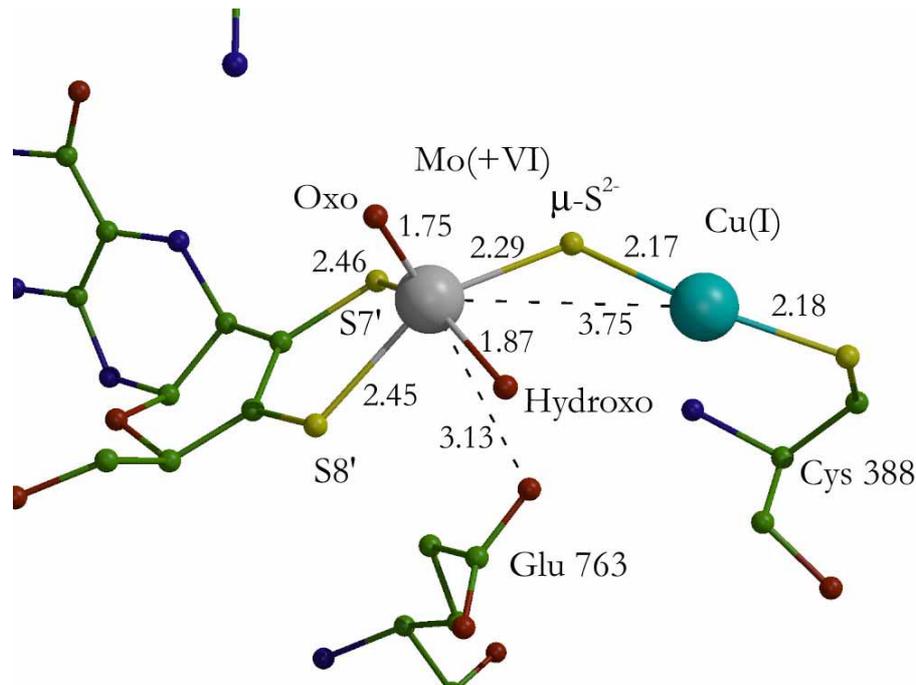


Abbildung 33: Darstellung des oxidierten aktiven Zentrums. Distanzen sind in Å angegeben. Zusätzlich wurden folgende Distanzen gemessen: Cu(I)-Hydroxo: 3.36 Å, S8'-S7': 3.15 Å, Mo-S γ (Cys388): 5.91 Å, Hydroxo- μ S: 3.08 Å, C7'-C8': 1.35 Å. Gemessene Winkel: Oxo-Mo-Hydroxo: 106.3°, Hydroxo-Mo- μ S: 95.6°, Oxo-Mo-S8: 100.7°, Oxo-Mo-S7: 101.4°, S8-Mo-S7: 79.4°, μ S-Cu(I)-S γ (Cys388): 155.7°.

Das aktive Zentrum in der nBIC-gebundenen Form

Der Ersatz des Sauerstoffatoms von CO durch die Gruppe NR ist das Charakteristikum von Isonitrilen (CNR). Die chemische Reaktivität dieser Stoffklasse zeigt deutliche Parallelen zu CO. Dies gilt insbesondere für die Zusammensetzung und Struktur von Metallisonitrilen und Metallcarbonylen.

n-Butylisonitril (nBIC) ist ein starker kompetitiver Inhibitor der CO-Dehydrogenase (L.Gremer, unveröffentlichte Ergebnisse) und kann als ein Analogon zu CO aufgefasst werden.

CO-Dehydrogenase-Kristalle wurden bei +18°C für knapp 2 h mit 10 mM nBIC inkubiert. Längere Inkubationszeiten waren nicht möglich, da die Kristalle nach 2 h Risse bekamen und zerfielen. Die Entfernung der nBIC-haltigen Lösung, sowie die anschließende Umhüllung mit Öl stoppte diesen Prozess und die Kristalle ließen sich nach dem gleichen Protokoll transformieren, das auch für die nativen Kristalle verwendet wurde.

Die schockgefrorenen Kristalle wurden am Synchrotron vermessen, wobei komplette Datensätze bis 1.09 Å Auflösung gesammelt werden konnten. Die verfeinerte Struktur zeigt, daß nBIC im aktiven Zentrum am [CuMo]-Cluster bindet. Dabei werden Bindungen von nBIC mit dem μ -Sulfido-Liganden des Mo, dem Hydroxo-Liganden sowie dem Cu-Ion ausgebildet (Abb.34).

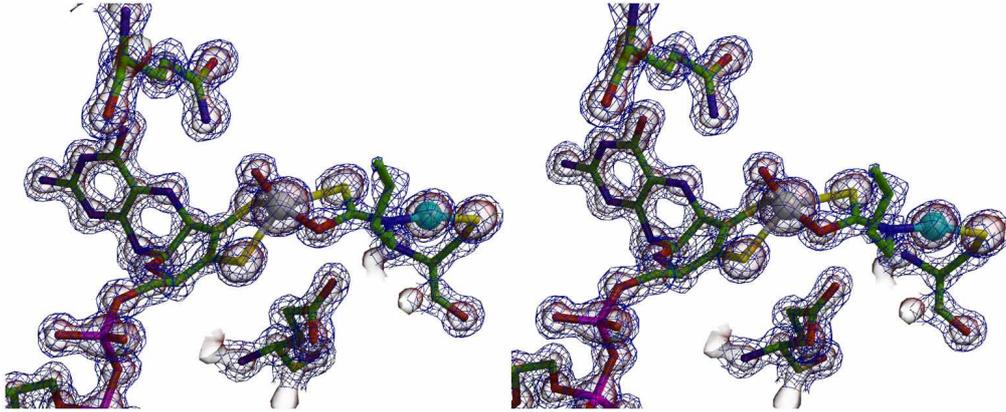


Abbildung 34: Stereodarstellung des [CuMo]-Zentrums nach der Bindung von nBIC. $2Fo-Fc$ Fouriersynthese konturiert bei 1.0σ (Linien), bzw. 2.5σ (Oberfläche).

Der resultierende planare, vieratomige Metallozyklus zeigt kurze Distanzen zwischen nicht direkt gebundenen Ringatomen (Abb.35). Die Bindung des Inhibitors führt zu grösseren strukturellen Änderungen des [CuMo]-Clusters und führt zum *open state* des aktiven Zentrums, in dem der Abstand zwischen Mo und Cu um mehr als 1 Å zugenommen hat. Die Öffnung des Zentrums löst zudem weitere Veränderungen des Cys 388 tragenden Loops im aktiven Zentrum aus. Diese Änderungen werden über die H-Brücken Wechselwirkung zwischen Glu 736 und dem Loop weitergegeben und resultieren in einer Zunahme der Distanz zwischen O $\epsilon 2$ von Glu 763 und Mo (Abb.35). Eine Verkürzung der Bindung des Oxo-Liganden am Mo von 1.73 Å im oxidierten Zustand auf 1.67 Å in der nBIC-gebundenen Form, deutet auf eine Erhöhung seiner Bindungsordnung mit der Ausbildung einer formalen Dreifachbindung zwischen dem Liganden und Mo hin (Abb.35).

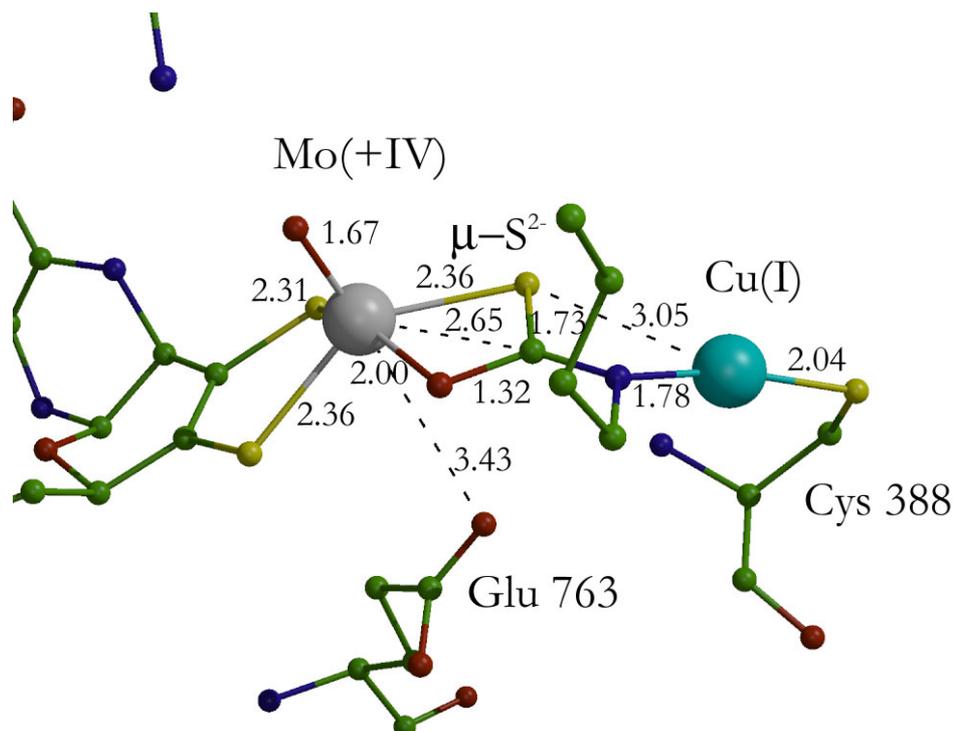


Abbildung 35: Darstellung des aktiven Zentrums, nach Bindung von nBIC. Distanzen sind in Å angegeben. Zusätzlich wurden folgende Distanzen gemessen: S8'-S7': 3.09 Å, Mo-S γ (Cys388): 6.84 Å, C(nBIC)-N(nBIC): 1.37 Å Hydroxo- μ S: 2.49 Å, C7'-C8': 1.39 Å. Gemessene Winkel: O2-Mo-O1: 103.7°, Hydroxo-Mo- μ S: 69.2°, Oxo-Mo-Hydroxo: 112.6°, Oxo-Mo-S8:105.6°, Oxo-Mo-S7: 106.2°, S8-Mo-S7: 82.7°.

Die Bindung von nBIC bewirkt am Cu eine Liganden-Substitution, durch die die Bindung zwischen Cu und dem zuvor Mo und Cu verbrückenden μ -Sulfido-Liganden gelöst und durch eine Bindung mit dem Stickstoffatom des nBIC ersetzt wird. Die Position des nBICs entspricht einer Insertion der CN⁻-Einheit in die Cu- μ -Sulfido-Bindung. Die beiden Cu-Liganden weisen auch nach der Liganden-Substitution wieder eine verzerrt lineare Geometrie auf.

CO-begaste, H₂-begaste und Dithionit-reduzierte CO-Dehydrogenase

CO-Dehydrogenase besitzt mit dem FAD, den [2Fe-2S]-Zentren und dem [CuMo]-Cluster drei prosthetische Gruppen, die unter physiologischen Bedingungen Änderungen in ihrem Redoxzustand durchmachen. Im aktiven Zentrum gilt dies insbesondere für Mo, welches während eines katalytischen Zyklus von Mo(+VI) auf Mo(+IV) und zurück wechselt.

CO-Dehydrogenase kann durch ihr physiologisches Substrat CO, das nicht-physiologische Substrat H₂ und durch klassische Reduktionsmittel wie Natriumdithionit reduziert werden. Alle drei Varianten der Reduktion wurden mit CO-Dehydrogenase-Kristallen unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Von H₂-reduzierten-Kristalle wurden bislang nur Datensätze bis 1.9 Å bei +20° C an einem Generator mit rotierender Anode gemessen. CO- und Dithionit-reduzierte Kristalle wurden schockgefroren und Datensätze zu nahe-atomarer Auflösung (CO: 1.21 Å; Dithionit :1.28 Å Auflösung) am Synchrotron gesammelt. Die Reduktion der Kristalle

unter Wirkung der Gase (H_2/N_2 und CO/N_2) konnte optisch durch die Entfärbung der Kristalle auf dem *Free-Mounting* Kristallhalter verfolgt werden, die Reduktion mit Dithionit wurde in Lösung durchgeführt, wobei ebenfalls die Entfärbung der Kristalle optisch verfolgt werden konnte.

Alle verfeinerten Strukturen zeigen nach erfolgter Reduktion sehr ähnliche Geometrien in ihren aktiven Zentren (Abb.36). Obwohl wir strukturelle Änderungen an allen Kofaktoren feststellen können, konnten keine Änderungen des organischen Anteils des Molybdopterin gefunden werden, wie sie für das Mop Protein beobachtet wurden (Huber, Hof et al. 1996).

Die Reduktion resultiert in einer Verlängerung der Distanz zwischen Cu und Mo von 3.75 auf 3.93 Å, eine Verlängerung der Bindung der Hydroxylgruppe am Mo auf 2.05 Å und einer Verkürzung der Distanz zwischen Mo und der Dithiolengruppe. Die Bindungslängen zwischen Mo und den Dithiolen-Schwefeln liegen zwischen der oxidierten und der nBIC gebundenen Form (Abb.35). Der reduzierte [CuMo]-Cluster ist etwas weiter geöffnet als in der oxidierten Form und zeigt eine grössere Distanz zwischen Mo und der Carboxyl-Gruppe von Glu 763. Die Gegenwart von gebundenem Substrat, Produkt oder Reduktans im aktiven Zentrum konnte nicht beobachtet werden.

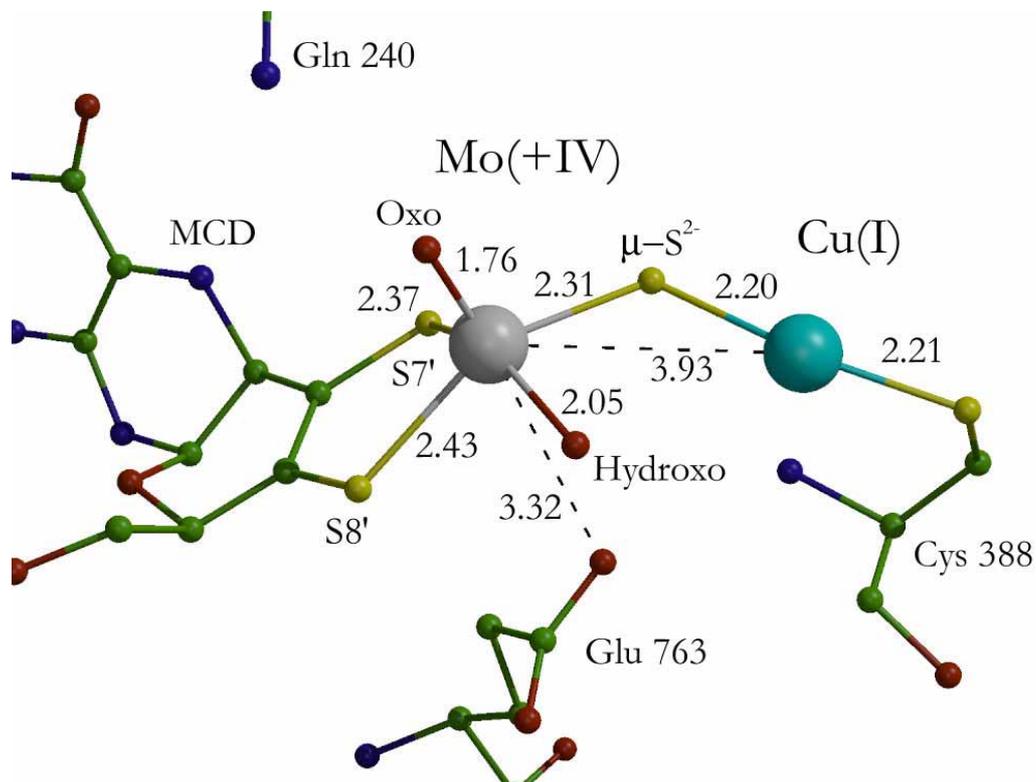


Abbildung 36: Das aktive Zentrum nach Reduktion mit CO , H_2 oder Dithionit. Die Reduktion resultiert in einer Verlängerung der Distanz zwischen Cu und Mo von 3.75 auf 3.93 Å, eine Verlängerung der Bindung der Hydroxylgruppe am Mo auf 2.05 Å und einer Verkürzung der Distanz zwischen Mo und der Dithiolengruppe. Distanzen sind in Å angegeben. Zusätzlich wurden folgende Distanzen gemessen: Cu(I)-Hydroxo: 3.35 Å, S8'-S7': 3.15 Å, Mo-S γ (Cys388): 6.06 Å, Hydroxo- μ S: 2.97 Å, C7'-C8': 1.41 Å. Gemessene Winkel: Oxo-Mo-Hydroxo: 109.8°, Hydroxo-Mo- μ S: 86.5°, Oxo-Mo-S8: 104.1°, Oxo-Mo-S7: 105.9°, S8-Mo-S7: 82.1°, μ S-Cu(I)-S γ (Cys388): 159.8°.

Inaktive Formen der CO-Dehydrogenase

CN⁻-Inaktivierung

Inkubiert man CO-Dehydrogenase, wie auch Xanthin-Dehydrogenase oder Xanthin-Oxidase, mit CN⁻ so wird das Enzym inaktiviert unter Freisetzung von Schwefel in Form von Thiocyanat nach der Gleichung: $\text{Mo}=\text{S} + \text{CN}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mo}=\text{O} + \text{SCN}^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+$. Die Veränderung der Mo-Liganden ist auch ESR-spektroskopisch in einem veränderten Mo(+V)-Signal nachweisbar. Die beiden entstehenden Spektren werden als „sulfo-“, bzw. „desulfo-“, Spezies bezeichnet (Gutteridge, Tanner et al. 1978) (Lorigan, Britt et al. 1994). Diese Inaktivierung mit CN⁻ gilt als generelles Merkmal der Molybdän Hydroxylasen.

Nach 20 stündiger Inkubationszeit mit 5 mM CN⁻ entstanden 1.97 mol Thiocyanat (Gremer 2000). Diese Abspaltung ging mit einer Veränderung der ESR-Spektren der Mo(+V)-Spezies einher, ohne daß Veränderungen in den Spektren der [2Fe-2S]-Zentren erkennbar waren und es ist davon auszugehen, daß der Schwefel des Thiocyanats nur aus dem μ -Sulfido-Liganden des [CuMo]-Zentrums stammt.

Kristalle, die für mehr als 24 h mit 10 mM KCN inkubiert wurden, konnten nach erfolgter Transformation am Synchrotron vermessen werden, wobei Daten bis zu einer Auflösung von 1.19 Å gesammelt wurden.

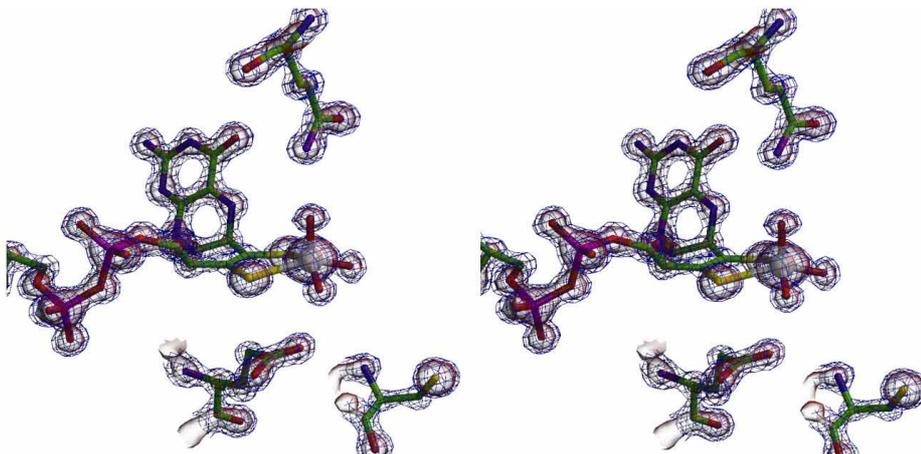


Abbildung 37: Stereodarstellung des aktiven Zentrums nach Inaktivierung mit CN⁻. *2Fe-2S* Fouriersynthese konturiert bei 1.0 σ (Linien), bzw. 2.5 σ (Oberfläche). Die Inaktivierung des Enzyms besteht in der Abspaltung des μ -Sulfido-Liganden und des Cu(I)-Ions. Die Koordinationsstelle des Sulfido-Liganden am Mo wird im inaktivierten Enzym durch eine Oxo-Gruppe besetzt. Nach der CN⁻-Inaktivierung wird Mo durch drei Oxo-Liganden koordiniert.

Die Inaktivierung des Enzyms beruht auf der Zerstörung des [CuMo]-Clusters (Abb.37). Cu(I) und der μ -Sulfido-Ligand werden abgespalten, wahrscheinlich unter Bildung von SCN⁻ und

[Cu(CN)₂]. An der ehemaligen Position des μ -Sulfido-Liganden am Mo sitzt ein zusätzlicher Oxo-Ligand.

Die resultierenden Interaktionen zwischen nicht-direkt gebundenen Liganden bestimmen wesentlich die Komplexgeometrie. Der O1- und O3-Ligand (Abb.38) haben gleiche Bindungslängen zum Mo, mit Werten zwischen den typischen Bindungslängen von Oxo- und Hydroxo-Liganden. Diese Verlängerung der Bindungen erlaubt den beiden Oxo-Gruppen, in einer Distanz von 2.66 Å voneinander zu verbleiben (Abb.38). Die Bewegung des S γ -Atoms von Cys 388 um mehr als 0.8 Å weg vom Mo zeigt die gespannte Konformation des Cys-Restes in der aktiven Form. Die Lage des Cys 388-tragenden Loops im aktiven Zentrum ist leicht verschoben, unter Vergrößerung der Distanz zu Mo und seine Lage ist dem *open state* des [CuMo]-Clusters am ähnlichsten.

Die Koordinationsgeometrie um das Mo-Ion ist wiederum tetraedrisch mit 109° zwischen O2-O1 und O2-O3, während der Winkel zwischen O1-O3 nur 96° beträgt. Diese Verkleinerung des idealen Tetraederwinkels beruht wahrscheinlich auf der Nähe des voluminösen Dithiolen-Liganden, trans zu O1 und O3.

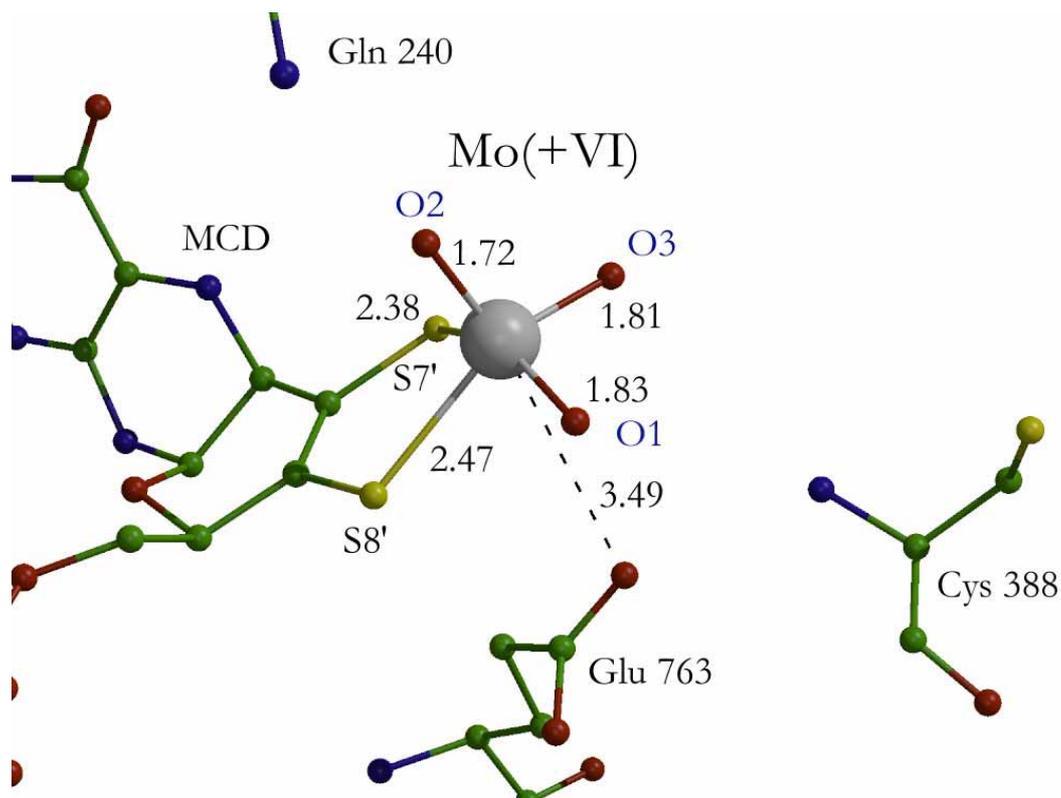


Abbildung 38: Das aktive Zentrum der CN⁻ inaktivierten CO-Dehydrogenase. Gemessene Distanzen sind in Å angegeben. Zusätzlich wurden folgende Distanzen gemessen: S8'-S7': 3.13 Å, Mo-S γ (Cys388): 6.62 Å, C7'-C8': 1.41 Å. Gemessene Winkel: O2-Mo-O1: 109.0°, O2-Mo-O3: 108.8°, O1-Mo-O3: 98°, O1-Mo-S8': 101.7°, O1-Mo-S7': 104.5°, S8-Mo-S7': 80.3°.

Die Gesamtgeometrie des CN⁻-inaktivierten trioxo-Mo-Komplexes ist nahe der des einfachsten Oxomolybdän-Komplexes, dem regulär tetraedrischen Tetraoxomolybdate(VI)-Dianion (MoO_4^{2-}).

Die rekonstituierte Form der CO-Dehydrogenase

Das Flavoprotein der CO-Dehydrogenase (M-Untereinheit) von *O. carboxidovorans* kann mit dem Detergenz Natrium-dodecylsulfat vom (LMS)₂ Dimer entfernt werden (Gremer, Kellner et al. 2000). Die daraus resultierenden M(LS)₂, bzw. (LS)₂ strukturierten Spezies konnten mit rekombinant in *E. coli* hergestelltem Apoflavoprotein wieder rekonstituiert werden (Gremer, Kellner et al. 2000). Die Ausbildung des Heterotrimeres (LMS)₂ verändert die Affinität des Apoflavoproteins für FAD von nicht-bindend für rekombinantes M alleine zu einem FAD-bindenden Flavoprotein im rekonstituierten Enzym. Obwohl offensichtlich alle notwendigen Kofaktoren im rekonstituierten (LMS)₂ Protein vorlagen, konnte keinerlei CO oxidierende Aktivität nachgewiesen werden.

Die Struktur der FAD-haltigen rekonstituierten CO-Dehydrogenase wurde kristallographisch bei 2,8 Å Auflösung untersucht und zeigte die gleiche Faltung und Bindung des Flavoproteins wie in Wildtyp CO-Dehydrogenase. Ursache der Inaktivierung des Enzyms ist wahrscheinlich die Unordnung des Loops im aktiven Zentrum, der das Cu ligandierende Cys 388 trägt. Dieser wie eine Reihe anderer Loops der L-Untereinheit in der rekonstituierten CO-Dehydrogenase sind ungeordnet und ziehen sich vom aktiven Zentrum bis zur Oberfläche der L-Untereinheit nahe des Interfaces zwischen L- und M-Untereinheit (Gremer, Kellner et al. 2000).

Strukturelle Charakterisierung des weiteren Elektronentransferweges

Geometrie der zwei [2Fe-2S]-Cluster im oxidierten und reduzierten Zustand

Im Gegensatz zu [4Fe-4S]-Zentren besitzen [2Fe-2S]-Zentren lokalisierte Ladungen, d.h. im oxidierten Zustand liegt ein Fe³⁺/Fe³⁺ Paar vor, während im reduzierten Zustand ein Fe²⁺/Fe³⁺ Paar vorliegt (Dugad, La Mar et al. 1990; Achim, Golinelli et al. 1996). Molybdän-Hydroxylasen verfügen über zwei [2Fe-2S]-Zentren pro Monomer, die aufgrund ihrer unterschiedlichen ESR-Charakteristika in Typ-I und Typ-II unterschieden werden. Die Lokalisierung bzw. Zuordnung der Zentren gelang mit Hilfe der Strukturanalyse (Gremer, Kellner et al. 1999) der nativen und rekonstituierten Spezies der CO-Dehydrogenase. Bei hohen Auflösungen konnten die zuvor ununterscheidbaren [2Fe-2S]-Kerne der beiden Zentren verglichen werden. Während das Typ-I Zentrum einen deutlich nicht-planaren Core enthält ist der Core des Typ-II Zentrums planar (Abb.39).

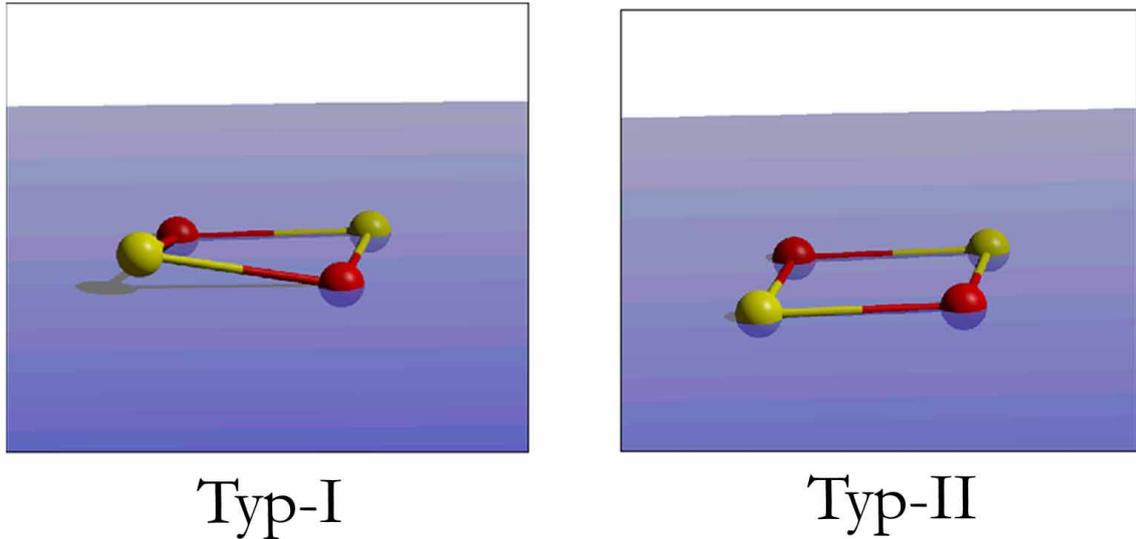


Abbildung 39: Nicht-planarer und planarer $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$ -Core der beiden ESR-spektroskopischen Arten von $[\text{2Fe-2S}]$ -Zentren in CO-Dehydrogenase.

Um die Determinanten zu bestimmen, die für die selektive Reduktion des einen Fe-Ions verantwortlich sind, wurden die Geometrien der reduzierten und oxidierten $[\text{2Fe-2S}]$ -Cluster vermessen. Theoretische Berechnungen von oxidierten und reduzierten $[\text{2Fe-2S}]$ -Clustern (Noodleman, Norman et al. 1985) legen geometrische Änderungen am reduzierten Fe-Ion nahe, wobei erwartet wird, daß alle Fe-S Bindungen des Fe^{2+} um 0.07 \AA länger werden, entsprechend dem Modell der lokalisierten Ladungen in $[\text{2Fe-2S}]$ -Clustern.

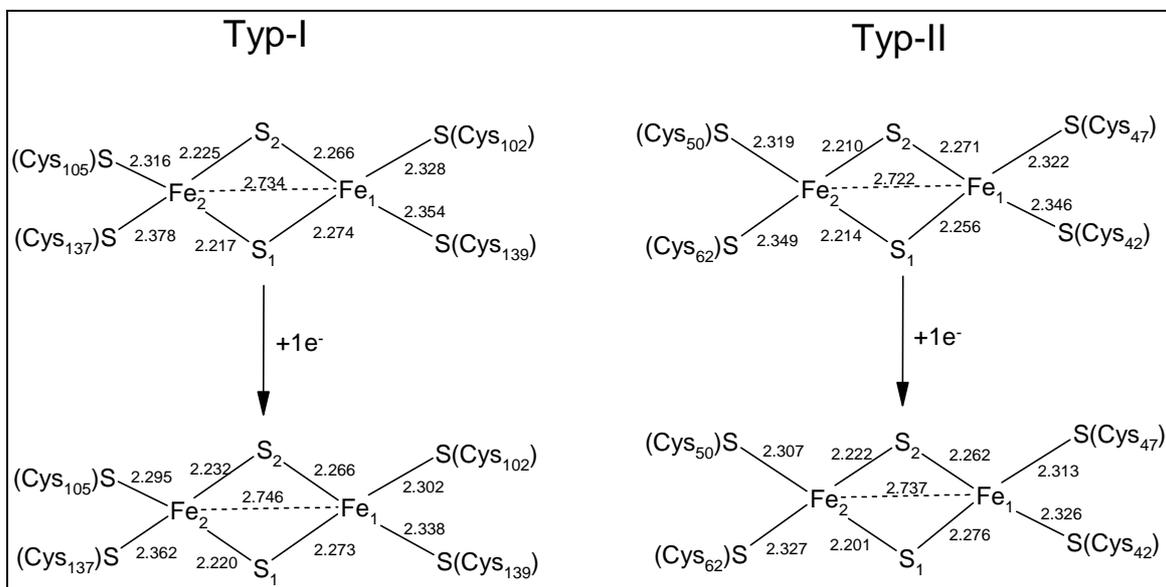


Abbildung 40: Vergleich der Distanzen des oxidierten und reduzierten Typ-I und Typ-II $[\text{2Fe-2S}]$ -Cluster. Die angegebenen Werte entsprechen den mittleren Bindungslängen als Durchschnitt der beiden unabhängigen Monomere in \AA . Die Strukturen besitzen abgeschätzte mittlere Fehler für die Fe-S Bindungen von ca. $2.8\text{-}6.3 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}$ (s. Diskussion).

Die unerwartet geringen Veränderungen zeigen dagegen statt der erwarteten Verlängerung der Fe-S Bindungslängen (Noodleman, Norman et al. 1985) im Mittel nur leichte Verkürzungen, die

beide Fe-Atome betreffen (Abb.40). Die mittleren Veränderungen für die Fe-S Bindungslängen durch die Reduktion liegen beim Typ-I Zentrum für Fe₁ bei -0.016 Å, für Fe₂ bei -0.010 Å beim Typ-II Zentrum für Fe₁ bei -0.009 Å, für Fe₂ bei -0.005 Å. Beide Zentren zeigen dagegen Verlängerungen des Fe₁-Fe₂ Abstandes nach der Reduktion (Abb.40). Aufgrund der geringen, beide Fe-Atome betreffenden geometrischen Änderungen läßt sich aus dem Bindungslängenvergleich nicht schließen, welches der beiden Fe-Atome reduziert vorliegt.

Stabilisierung und Zugänglichkeit des Isoalloxazinringes, sowie konformationelle Änderungen in unterschiedlichen Oxidationszuständen

Das Flavoprotein ist das letzte Glied der Elektronentransportkette in CO-Dehydrogenase, die vom [CuMo]-Cluster über die beiden [2Fe-2S]-Cluster läuft. Das FAD ist dabei als der reaktive Teil des Flavoproteins der finale Elektronenakzeptor und liegt im oxidierten Enzym als FAD und im reduzierten Enzym (CO, H₂ wie Dithionit reduziert), nach Aufnahme von zwei Elektronen und zwei Protonen als FADH₂ vor (Abb.41). Da der Elektronentransfer über die Eisen-Schwefel-Zentren stattfindet, muss die Reduktion des FAD in zwei Schritten erfolgen, dabei liegt der Isoalloxazinring nach Empfang des ersten reduzierenden Elektrons in der Semichinon-, nach Aufnahme des zweiten Elektrons in der Hydrochinon-Form vor. Die Geschwindigkeit, wie die Bereitschaft Elektronen aufzunehmen hängt von der Stabilisierung des Isoalloxazinringes ab [Ghisla, 1989 #367], dementsprechend variiert das Redoxpotential für die Zwei-Elektronen Reduktion auch deutlich um den Mittelwert von -200 mV mit Maximalwerten von -400 mV bis +60 mV [Ghisla, 1989 #367].

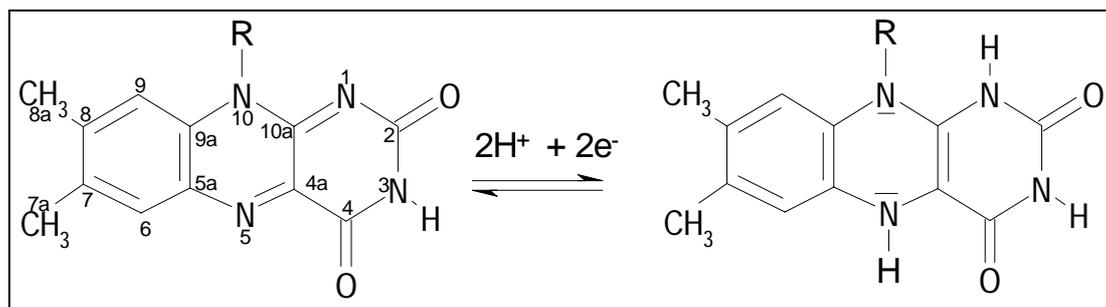


Abbildung 41: Oxidiertes und reduziertes Flavin.

Generell bewirkt die Nähe einer positiven Ladung eine Erhöhung, die Nähe einer negativen Ladung eine Erniedrigung des Redoxpotentials des Isoalloxazinringes [Ghisla, 1989 #367].

In CO-Dehydrogenase wird der Isoalloxazinring durch das positive, N-terminale Ende eines Helixdipols stabilisiert, der auf die N1-C2=O₂ Gruppe zeigt (Abb.42). Die Nähe der positiven Teilladung nahe dieser Gruppierung kann die anionische Form des Kofaktors stabilisieren und damit das Redoxpotential des Kofaktors erhöhen. Die positive Ladung kann ebenfalls von Bedeutung für die Faltung, bzw. den Einbau des FAD/FMN in das Enzym sein, wie für die

Dihydroorotat-Dehydrogenase [Björnberg, 1997 #368] und Trimethylamin-Dehydrogenase [Mewies, 1996 #369] gezeigt.

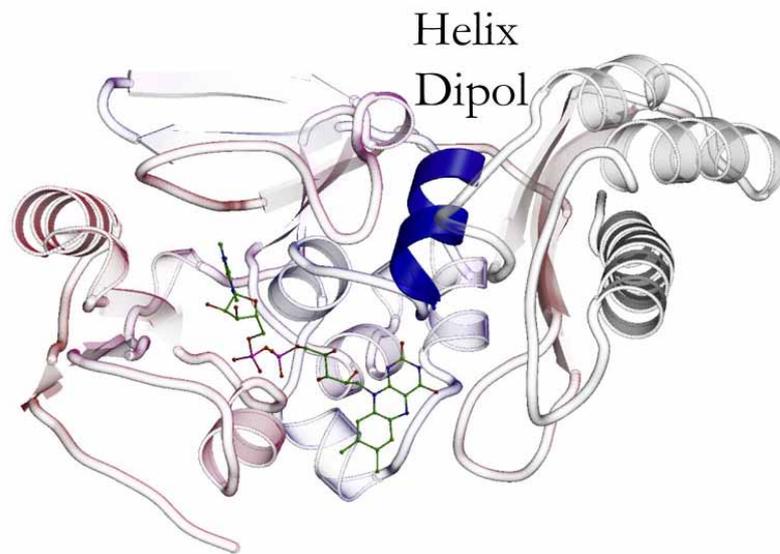


Abbildung 42: Stabilisierung der anionischen Form des Isoalloxazinringes (N1-C2=O2 Gruppierung) durch die positive Teilladung des N-Terminus einer Helix.

Die auf das FAD übertragenen Elektronen werden von der CO-Dehydrogenase auf ein membranassoziiertes *b*-Typ Cytochrom weitergegeben (Moersdorf, Frunzke et al. 1992). Die Art des Elektronenakzeptors variiert innerhalb der Molybdän-Hydroxylase-Familie und konformationelle Änderungen in der Nähe des FADs können die Affinität für unterschiedliche Akzeptoren innerhalb einer Enzymklasse verändern.

Veränderungen des Redoxzustandes des 7,8-Dimethyl-Isoalloxazinringes resultieren zum einen in Änderungen der Protonierung des Ringes und zum anderen in Veränderungen des Bindungszustandes. Dies gilt insbesondere für die „Endiamin-Subfunktion“, d.h. für die Atome N1, C10a, C4a und N5 des FAD.

H-Brücken am N5 Atom kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. In den meisten Enzymen ist dieses Atom in H-Brücken Distanz zu einem möglichen H-Donor [Fraaije, 2000 #370], wobei das H-Donor Atom dem Substrat gegenüberliegt und dabei wahrscheinlich die Stereochemie des Hydrid-Transfers mitbestimmt. Die H-Brücke wird im reduzierten Zustand aufgebrochen, da N5 selbst H-Donor Charakter bekommt.

In CO-Dehydrogenase ist das N5-Atom dagegen im oxidierten Zustand keinem möglichen H-Donor benachbart. Erst im reduzierten Zustand, d.h. nach Protonierung des N5-Atoms, bildet sich eine H-Brücke, in der N5 als möglicher Donor und der Carbonyl Sauerstoff von Gly 191 als möglicher Akzeptor auftritt (Abb.43). Daraus resultierende konformationelle Änderungen des

Gly-Carbonyls an einem gestreckten Loop der C-terminalen Domäne wirken sich ebenfalls in konformationellen Änderungen des schützenden, aromatischen Restes aus.

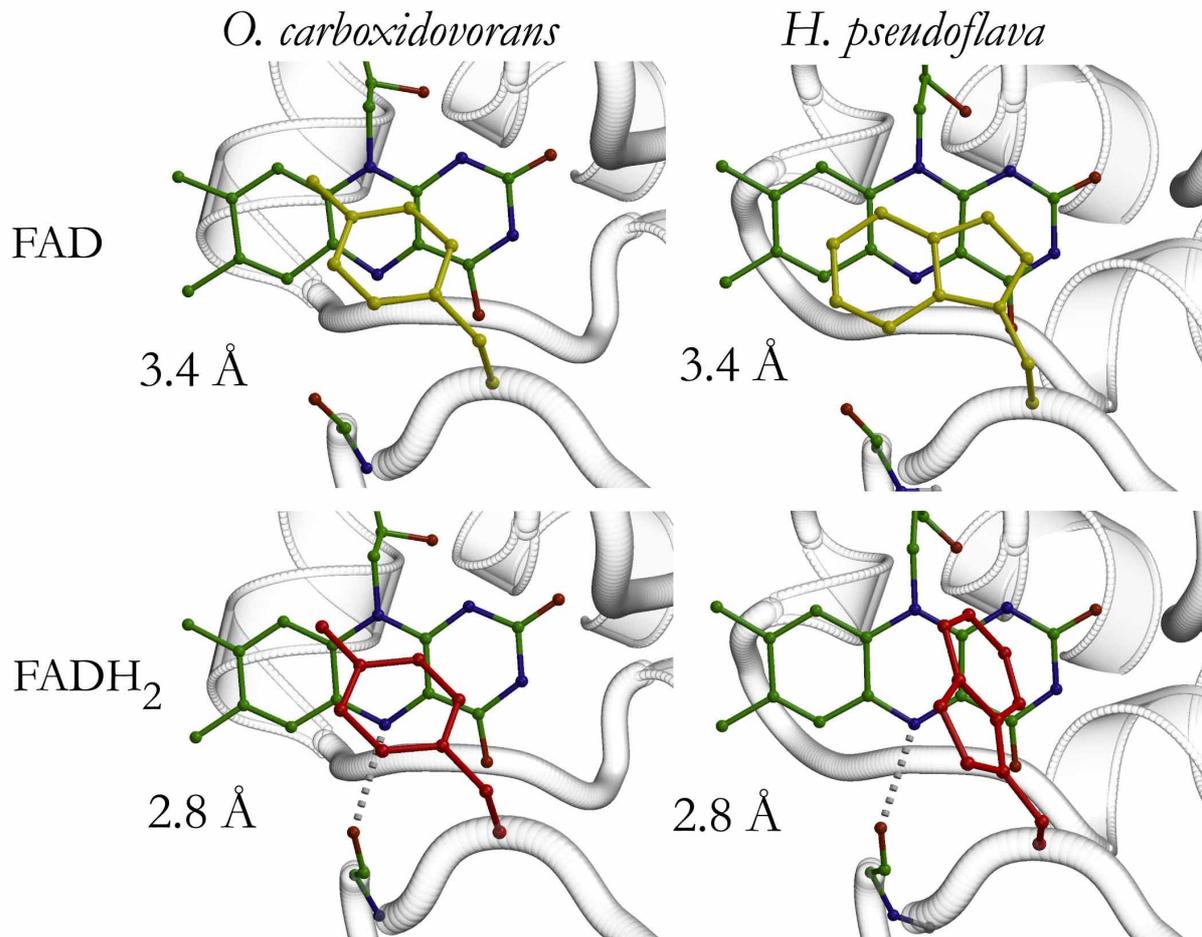


Abbildung 43: Oxidierter/Reduzierter Isoalloxazinring in *O. carboxidovorans* (links) und *H. pseudoflava* (rechts) CO-Dehydrogenase M-Untereinheit. In beiden Strukturen wird der Oxidationszustand des FAD, bzw. die Protonierung des N5-Atoms über eine H-Brücke mit dem Carbonyl-Sauerstoff von Gly 191 auf einen gestreckten Loop der C-terminalen Domäne der M-Untereinheit übertragen. Während die damit verbundenen konformationellen Änderungen in *H. pseudoflava* CO-Dehydrogenase zu einer Konformationsänderung des den Isoalloxazinring verdeckenden Trp-Restes (Trp 193) führen, verbleibt Tyr 193 von *O. carboxidovorans* CO-Dehydrogenase auch nach Reduktion in seiner alten Konformation. Die Distanzen geben die jeweilige Distanz zwischen dem Carbonyl-O und dem N5-Atom des Isoalloxazinringes an.

Offensichtlich führt die Reduktion des FAD, bzw. die neu ausgebildete H-Brücke bei den beiden CO-Dehydrogenasen zu unterschiedlichen Reaktionen. Während in *H. pseudoflava* CO-Dehydrogenase, die den Isoalloxazinring verdeckende Trp-Seitenkette nach Reduktion um 90° wegklappt und damit das N5-Atom frei zugänglich wird, verbleibt die in *O. carboxidovorans* schützende Tyr-Seitenkette an ihrer alten Position. Die Konformation von Gly 191 ist in beiden untersuchten Enzymen abhängig vom Oxidationszustand des Isoalloxazinringes. Seine Konformationsänderungen bewirken ebenfalls leichte Änderungen der Konformationen umliegender Reste, wie Trp 193 und Tyr 193.

Diskussion

Methodische Weiterentwicklungen

Zuordnung des Elementtyps

Ein oft auftretendes Problem in der Röntgenkristallographie ist die Identifikation des Elementtyps neu entdeckter Molekülgruppen. Diese treten insbesondere als unerwartete Modifikationen, bzw. als koordinierte Ionen in Proteinen auf, deren chemische Identität nicht eindeutig feststellbar ist. Häufig werden zur Identifizierung indirekte Hinweise verwendet, so bei Ionen ihre Koordinationsgeometrie, Art der Liganden und Bindungslängen, bzw. chemische Analysen.

Zur Bestimmung des Elementtyps einer unerwarteten Komponente des aktiven Zentrums von CO-Dehydrogenase wurden MAD-Techniken verwendet (Abb.14).

Erste Untersuchungen zeigten das Vorliegen einer Modifikation im aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase. Massenspektroskopische Analysen hatten zuvor neben der Anwesenheit von Fe und Mo auch die Präsenz von Se im Enzym gezeigt. Zu dieser Zeit lagen Datensätze vor, die an drei verschiedenen Wellenlängen gemessen wurden. Mit diesen Daten konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem Mo-nahen Atom um einen anomalen Streuer mit einer Absorptionskante zwischen 1.7316 Å und 0.9761 Å handeln muss. Dies, wie die Bindung an ein S γ -Atom eines Cys-Restes legten die Interpretation des Atoms als Se nahe.

Erst die spätere Berechnung von anomalen Fouriersynthesen bei 1.05 Å wiesen dieses Atom als anomalen Streuer bei dieser Wellenlänge aus, was nicht zu der erwarteten Absorptionskante des Se bei 0.98 Å paßt. Ein Absorptionsscan (Abb.15), durchgeführt an einem Kristall der hochaktiven CO-Dehydrogenase, zeigte das Vorliegen von Cu im Enzym. Messungen von kompletten Datensätzen vor und hinter der experimentell ermittelten Cu K-Kante erlaubten die Berechnung von anomalen Differenzfouriersynthesen, die eindeutig zeigten, daß das Mo-nahe Atom ein Cu-Ion sein muss, da die Absorptionskante des Elements durch diese Fouriersynthesen auf den Bereich zwischen 1.381 und 1.378 Å festgelegt werden konnte (Abb.16). Die zusätzlich durchgeführten Absorptionsscans wiesen in diesem 0.003 Å weiten Bereich nur einen anomalen Streuer aus, dessen Absorptionskante weiter auf 1.3795 Å verfeinert werden konnte, was der theoretischen K-Kante von Cu bei 1.3808 Å entspricht.

Diese Methode ist der direkteste Nachweis des Elementtyps eines Atoms in einer Proteinstruktur und stellt eine Erweiterung des methodischen Repertoires des Kristallographen dar.

Optimierung der Diffraktionsqualität von Proteinkristallen

Die Anzahl der Strukturen mit real atomarer Auflösung ($d < 1.2 \text{ \AA}$), wie die Zahl der Strukturen insgesamt, die in den letzten Jahren in der *Protein Data Base* (PDB) hinterlegt wurden, nimmt u.a. durch die Verwendung von Synchrotron-Strahlungsquellen und verbesserten Kristallisationsmethoden deutlich zu. Eine Analyse der in der PDB hinterlegten Strukturen zeigt, daß die weitaus meisten real atomar aufgelösten Strukturen ($d < 1.20 \text{ \AA}$) weniger als 50 kDa Protein pro asymmetrischer Einheit der Elementarzelle aufweisen (Abb.44). Die meisten Strukturen charakterisieren zudem nur einen katalytischen Zustand. Nur eine Struktur, die Methyl-Coenzym-M-Reduktase von *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Ermler, Grabarse et al. 1997) mit 300 kDa für das $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Dimer bei einer Auflösung von 1.16 \AA fällt aus diesem Rahmen heraus.

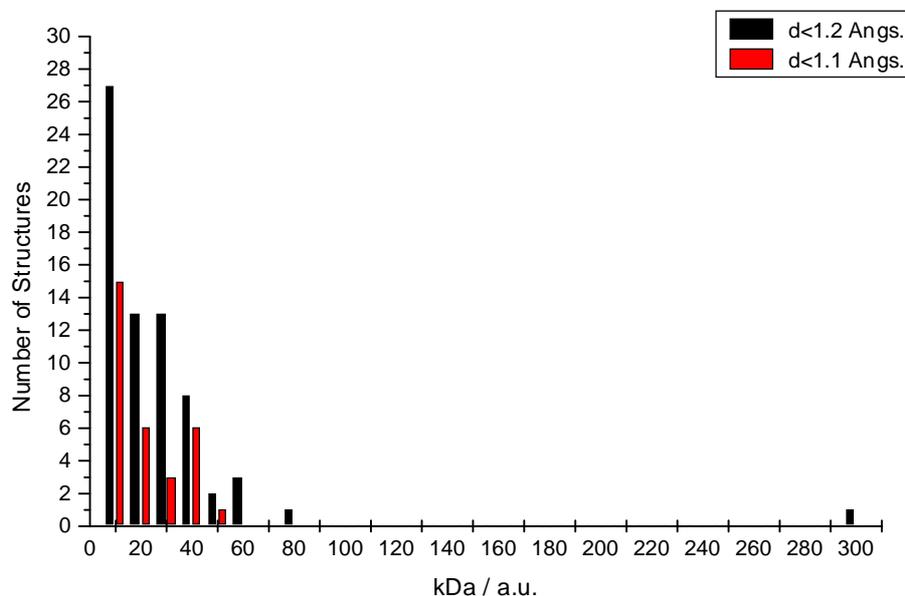


Abbildung 44: Anzahl der atomar aufgelösten Strukturen in der PDB (Stand: 8. September 2000). Aufgetragen ist die Anzahl der Strukturen in einem vorgegebenen Größenbereich. Als Größenkriterium wurde die Proteinmasse in der asymmetrischen Einheit der hinterlegten Kristallstrukturen gewählt.

Die Struktur der CO-Dehydrogenase bei 1.09 \AA ist etwa sechsmal grösser als die grösste zur Zeit in der PDB hinterlegte Struktur mit vergleichbarer Auflösung ($d < 1.10 \text{ \AA}$). Dies zeigt das grosse Potential der Kristalltransformation. Die mit ihr erreichbaren Verbesserungen in der Diffraktionsqualität von Kristallen bieten ein vielseitiges methodisches Hilfsmittel für kristallographisch-mechanistische Studien bei höchsten Auflösungen.

Genauigkeit der verfeinerten Koordinaten: Systematische und statistische Fehler

Systematische Fehler

a.) Photo-Reduktion/-Oxidation durch Röntgenstrahlung

Ein sowohl ungewollter wie unvermeidbarer Effekt von Röntgenstrahlen auf makromolekulare Kristalle ist die Schädigung der Probe durch die hochenergetische Strahlung. Einer der primären Effekte dieser Strahlung ist die Generierung von Elektronen durch Absorption der Röntgenphotonen (Nave 1995). Neben anderen Prozessen kann dies zur Reduktion von Redoxzentren führen. Obwohl tiefe Temperaturen zu einer Verminderung dieser Prozesse führen, treten sie auch bei -160°C noch auf. Dadurch sind Änderungen des Oxidationszustandes des Moco möglich (Schindelin, Kisker et al. 1997). Dies ist insbesondere in Untersuchungen, in denen der Unterschied zwischen oxidierten und reduzierten Redoxzentren aufgeklärt werden soll, störend.

Die Feststellung des Oxidationszustandes einer Probe in Lösung wird meist spektroskopisch vorgenommen, wobei u.a. Absorptionen im UV/VIS-Bereich von Elektronenübergängen (UV/VIS-Spektroskopie), die Detektierung paramagnetischer Zustände (EPR-Spektroskopie), die Messung der chemischen Verschiebung und der Quadrupol-Aufspaltung (Mössbauer-Spektroskopie) oder die Feststellung der exakten Lage der Absorptionskante (XAS) (George, Hedman et al. 1998) genutzt werden können. Obwohl diese Methoden theoretisch auch für die Untersuchung von kristallinen Proben geeignet sind, setzen sie das Vorhandensein geeigneter Spektrometer voraus und können nur in Ausnahmefällen an Kristallen vor, nach oder im Falle der UV/VIS-Spektroskopie während der Messung am Kristall durchgeführt werden.

Um die Auswirkung der Photoreduktion auf CO-Dehydrogenase Kristalle abschätzen zu können, wurden Messungen mit verringerter Strahlendosis am Synchrotron durchgeführt. Als Indikatoren des Oxidationszustandes der redoxaktiven Zentren wurde der Abstand zwischen Mo und Cu, der sich durch Reduktion vergrößert, sowie der Abstand zwischen dem Carbonyl-O von Gly 192M und dem N5-Atom des Isoalloxazinringes gewählt, da zwischen beiden Atomen nur im reduzierten Zustand des Isoalloxazinringes (Protonierung des N5) eine H-Brücke aufgebaut wird. Beide Distanzen können ebenfalls hinreichend genau bei den Auflösungen bestimmt werden, die mit CO-Dehydrogenase Kristallen an Röntgeneratoren mit konventioneller rotierender Anode erzielt werden können.

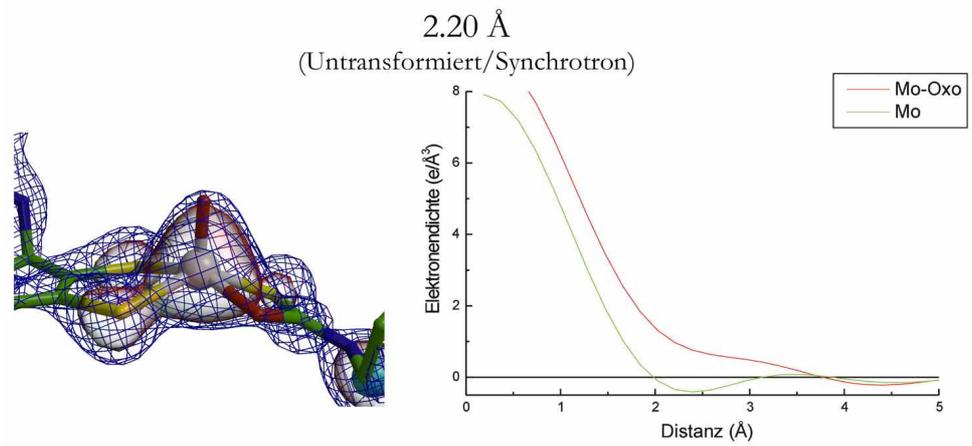
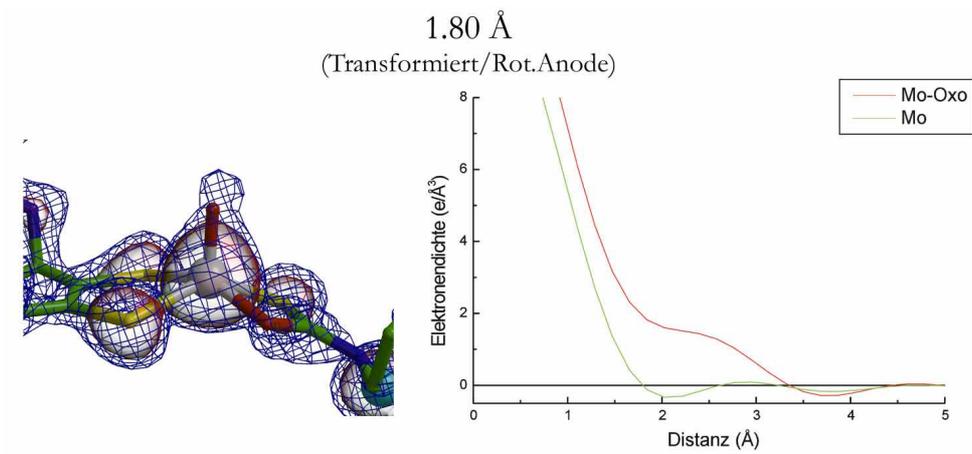
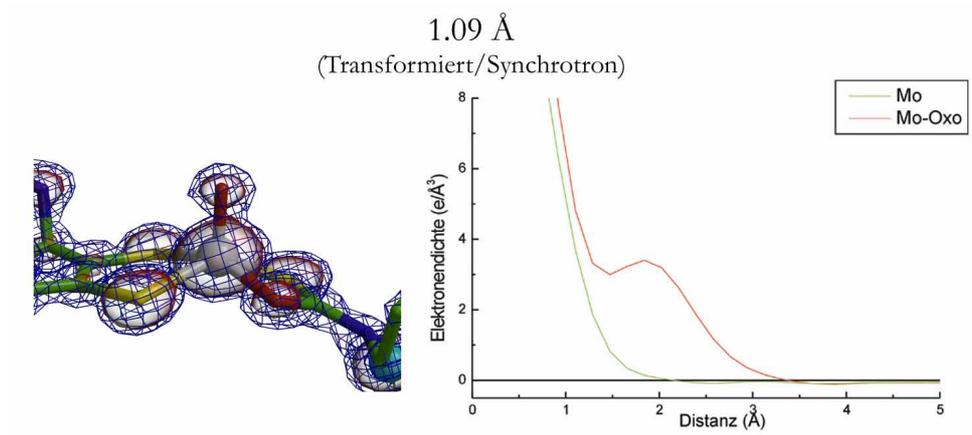
	Mo-Cu Distanz (Å)	N5-O Gly191 Distanz (Å)
Ox. Kurzmessung	3.74	3.47
Ox. Langmessung	3.84	3.04
Dithionit Red.	3.93	2.98

Tabelle 1: Einfluß der Röntgenstrahlung auf den Oxidationszustand des [CuMo]-Clusters und des Isoalloxazinringes. Die angegebenen Distanzen geben das Mittel der in den beiden Monomeren gemessenen Distanzen an.

Die Distanzen, die sich in dem Kristall zeigen, der weniger als eine Stunde dem Röntgenstrahl ausgesetzt war, entsprechen den Distanzen, die von einem oxidierten Kristall auf einem konventionellen Röntgengenerator gemessen wurden. Ein Kristall, der zur Optimierung der Auflösung für ca. 7h am Synchrotron gemessen wurde, zeigt dagegen Veränderungen der Distanzen und erscheint bereits teilweise reduziert (Tab.1).

b.) Fourierreihen-Abbruch-Phänomene in der Nähe elektronenreicher Atome und andere auflösungsabhängige Probleme

Eine Konsequenz der limitierten Auflösung makromolekularer Strukturen ist, daß ihre Fouriersynthesen Beiträge von Reihenabbrucheffekten zeigen können, die zur Ausbildung von positiven und negativen Wellen in der Fouriersynthese um streuende Atome führen. Dies tritt auf, wenn der Atomformfaktor des betreffenden Streuer am Limit der verfügbaren Daten nicht auf Null abgesunken ist. Dieser Effekt ist insbesondere dann beobachtbar, wenn es um Regionen nahe schwerer, elektronenreicher Atome wie Mo und W geht (Schindelin, Kisker et al. 1997). Das erste Minimum tritt dabei in einer Distanz vom Streuer auf, die in etwa der Auflösung des Datensatzes entspricht. Da die Analyse makromolekularer Strukturen typischerweise bei Auflösungen um ~ 2 Å stattfindet und die interessierenden Metall-Ligand Abstände in Mo-haltigen Proteinen ebenfalls um ~ 2 Å liegen, kann sich der Effekt der Abbruchwellen auf die Interpretation und Positionierung der Mo-Liganden auswirken (Schindelin, Kisker et al. 1997) (Abb.45).



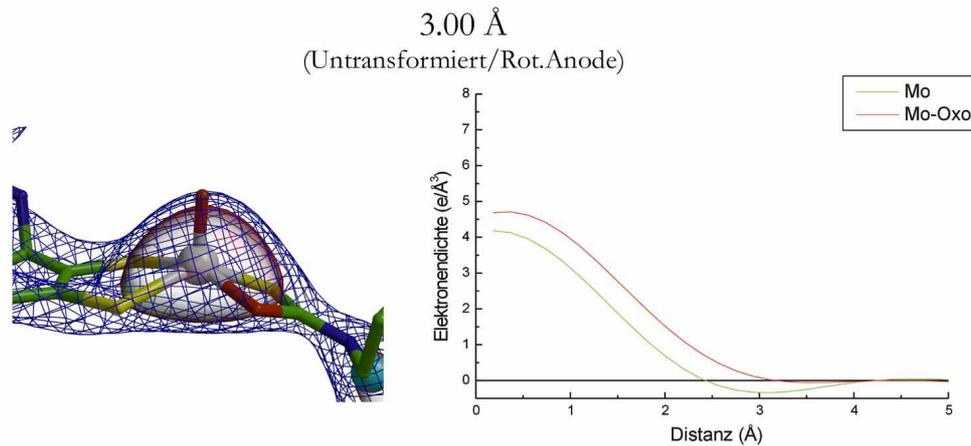


Abbildung 45: Fourierreihenabbruch-Effekte in der Nähe des Mo-Ions. Das Mo-Ion auf der linken Seite wurde mit einer $2F\theta$ - $F\theta$ Fouriersynthese dargestellt (Kontur Netz: 1σ , Oberfläche: $2,5\sigma$), gerechnet bei den jeweils angegebenen Auflösungen. Die rechts stehenden Diagramme zeigen den Einfluss der Fourierreihenabbruch-Effekte auf eine berechnete Elektronendichte ($F_{\text{Calc.}}/\varphi_{\text{Calc.}}$ -Fouriersynthese) bei verschiedenen Auflösungen um Mo alleine (Grüne Linie), bzw. eine Mo-Oxo Gruppe (Rote Linie) mit einer Bindungslänge von 1,67 Å. Den beiden Atomen wurde ein B-Faktor von $10,0 \text{ \AA}^2$ zugewiesen.

Die vergleichsweise geringe Auflösung makromolekularer Strukturen bedingt ebenfalls, daß das Verhältnis der experimentellen Observablen (gemessene Intensitäten) zur Anzahl der verfeinerten Parameter (Koordinaten und Temperaturfaktoren) deutlich kleiner ist als im Falle von Kleinmolekülstrukturen. Zusätzliche Informationen in makromolekularen Verfeinerungen stammen aus stereochemischen Beschränkungen (*Restraints*) in Form eines zusätzlichen Energiterms, die die Geometrie des Moleküls innerhalb zu erwartender Grenzen zu halten. Durch diese Beschränkungen wird aber auch eine Beeinflussung der Koordinaten vorgenommen, die die Verfeinerung hin zum angenommenen Modell tendieren läßt (Hodel, Kim et al. 1992). Diese Überlegungen sind insbesondere in Verfeinerungen von Metall-Ligand Distanzen in neuartigen Metalloproteinen wichtig. Wenn eine Beschränkung der Distanzen während der Verfeinerung vorgenommen wird, kann das Ergebnis nicht mehr als unbeeinflußt angenommen werden, während es im Falle uneingeschränkter Verfeinerungen zu falschen Werten verfeinern könnte. Diese Fehler können im Falle von Ligand-Metall Abständen $0,2$ - $0,3 \text{ \AA}$ ausmachen und einen Oxo-Liganden (typische Distanz $1,75 \text{ \AA}$) als Hydroxo- (typische Distanz $\sim 1,9 \text{ \AA}$) oder als Wasser-Liganden (typische Distanz $\sim 2,2 \text{ \AA}$) ausweisen.

Bei atomaren Auflösungen dagegen besteht die Möglichkeit, in einer anfangs berechneten Fouriersynthese die Liganden relativ genau zu plazieren (klare Maxima der (Differenz-) Fouriersynthese, Abb.46). Die anschließende Verfeinerung kann dann von Anfang an ohne Beschränkungen in der näheren Umgebung des Metalls durchgeführt werden und führt zu einem nahezu unbeeinflußten Bild.

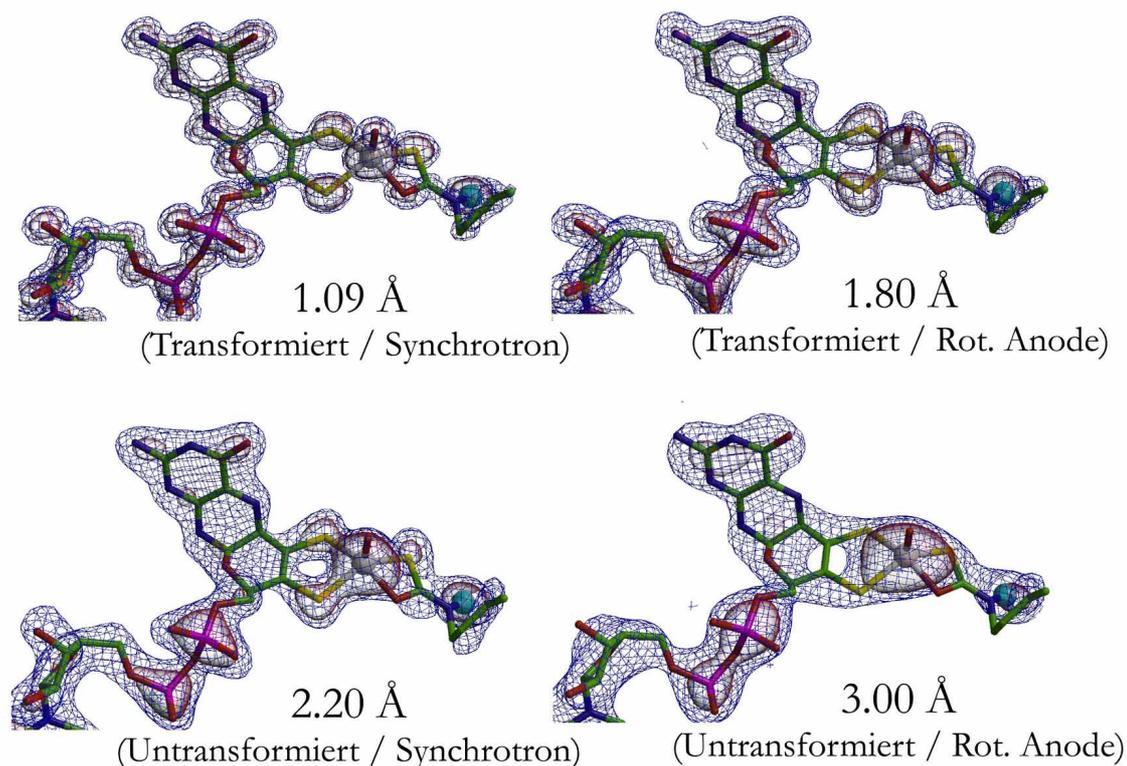


Abbildung 46: Einfluß der Auflösung der Daten auf eine $2Fo-Fc$ Fouriersynthese. Die Fouriersynthesen wurden alle mit dem gleichen Satz für F_o , F_c und $\varphi_{\text{prot.}}$ berechnet. Modell und Daten entstammen aus der bis 1.09 Å verfeinerten Struktur der nBIC-gebundenen Form der CO-Dehydrogenase.

Zufällige Fehler: Die Genauigkeit der verfeinerten Koordination

Für eine Abschätzung der Genauigkeit der verfeinerten Koordinaten wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen. So z.B. der Luzzati Plot und seine Nachfolger. Diesen Methoden ist die Beschränkung eigen, daß sie die Abhängigkeit des Koordinatenfehlers von der Elektronenzahl und dem Debye-Waller B-Faktor nicht betrachten (Cruickshank 1999), sondern nur zur Abschätzung eines mittleren Fehlers verwendet werden können. Eine individuelle Abschätzung der Varianz von Bindungslängen liefert dagegen die Inversion der *least-squares full-matrix* nach entsprechender Verfeinerung (Sheldrick und Schneider 1997), die allerdings für ein größeres Protein durch den enormen Speicherbedarf mit konventionellen Computern nicht durchführbar ist (Cruickshank 1999).

Das Vorliegen nicht-kristallographischer Symmetrie ermöglichte es allerdings, für die CO-Dehydrogenase Mittelwerte und mittlere Fehler für Bindungslängen und Abstände abzuschätzen, die ohne geometrische *restrains* verfeinert wurden. Als Beispiele wurden zwei Sätze von äquivalenten Bindungen (Atome mit ähnlichen Massen und Debye-Waller-B-Faktoren) ausgesucht, die zu unterschiedlichen Auflösungen verfeinert wurden. Dabei ergaben sich für 16 Fe-S Bindungen mittlere Fehler zwischen $2.8\text{-}6.3 \cdot 10^{-3}$ Å und für 10 C-C/N/O-Bindungen Fehler zwischen $7\text{-}26 \cdot 10^{-3}$ Å für verfeinerte Strukturen im Auflösungsbereich zwischen 1.09-1.48 Å.

Aufgrund der geringen Datenbasis, von jeder Bindung liegen nur zwei unabhängige Messungen vor, mag dieser Fehler den wahren Fehler unterschätzen.

In der vorliegenden Arbeit wurden solche Änderungen an den Redoxzentren als signifikant angesehen, die bei den entsprechenden Auflösungen mindestens dem zweifachen mittleren Fehler entsprachen. Dabei wurden alle Änderungen auf den Mittelwert der zwei unabhängigen Messungen/Monomere in der asymmetrischen Einheit bezogen.

Ist die CO-Dehydrogenase ein Selenoprotein ?

Unter den wenigen bekannten Se-haltigen Proteinen befinden sich einige Mo- und Wo-haltige Proteine, wie Formiat-Dehydrogenasen (es sind W- und Mo-haltige Formen bekannt), Nicotinat-Dehydrogenasen, Purin-Hydroxylasen und Xanthin-Dehydrogenasen (Schräder, Rienhöfer et al. 1999; Self und Stadtman 2000). Während Formiat-Dehydrogenasen Se in der Form von Selenocystein beinhalten, scheint es in den anderen Enzymen durch posttranslationale Modifikationen eingefügt zu sein. Die Abhängigkeit der Enzymfunktion von Se konnte für die Formiat-Dehydrogenase H aus *E. coli* auch strukturell belegt werden (Gladyshev, Boyington et al. 1996) (Boyington, Gladyshev et al. 1997).

Erste Hinweise für eine spezifische Funktion einer Se-haltigen Gruppe in CO-Dehydrogenase ergaben sich aus der Aktivierbarkeit des Enzyms durch Selenit. Dabei konnte mit radioaktiv markiertem ⁷⁵Se-Selenit ebenfalls nachgewiesen werden, daß es zu einem kovalenten Einbau des ⁷⁵Se kommt (Meyer und Rajagopalan 1984). Das vollaktivierte Enzym enthielt Se, Mo und FAD in einem 1:1:1 molaren Verhältnis, was als klarer Hinweis der katalytischen Funktion von Se angesehen wurde.

Die Anwesenheit von Selen im *as isolated* Enzym wurde ebenfalls durch Neutronenaktivierungs-Analyse, Fluoreszenz-Scans und EXAFS (unveröffentlichte Ergebnisse) bestätigt.

Die Suche nach der Position des Se im Enzym wurde im Rahmen dieser Arbeit mit anomalen Differenzfouriersynthesen durchgeführt und zeigte, daß Se weder im aktiven Zentrum (Abb.18) noch an einer anderen definierten Position in hochaktivem Protein vorliegt und damit eine essentielle katalytische Funktion für Se in der CO-Oxidation unwahrscheinlich erscheint. Eine möglich Erklärung für die Anwesenheit von Se in CO-Dehydrogenase wäre ein zufälliger Einbau des Elements indem es Schwefel ersetzt. Eine ähnliche Beobachtung wurde u.a. für ein Selenoprotein von *Clostridium kluyveri* berichtet, wo Se in Form von Selenomethioninen, die über das gesamte Polypeptid verteilt waren, vorlag (Sliwkowski und Stadtman 1985).

Strukturvergleich der CO-Dehydrogenasen mit der Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas*

Eine bereits vor der CO-Dehydrogenase strukturell charakterisierte Molybdän-Hydroxylase ist die Aldehyd-Oxidoreduktase von *D. gigas* (Mop) (Romao, Barata et al. 1993; Romao, Archer et al. 1995; Huber, Hof et al. 1996; Romao, Rösch et al. 1997) .

Ein Vergleich des CO-Dehydrogenase-Monomers mit dem Mop-Monomer (Abb.47) zeigt die prinzipielle Ähnlichkeit der beiden Strukturen für das Molybdäno- und Eisen-Schwefel-Protein. Obwohl das Mop-Monomer aus einer Polypeptid-Kette aufgebaut ist und die CO-Dehydrogenase eine Untereinheiten-Struktur besitzt, ist die relative Lage der beiden einander entsprechenden Untereinheiten gleich. Dies bewirkt insbesondere ähnliche Distanzen zwischen den redoxaktiven Gruppen.

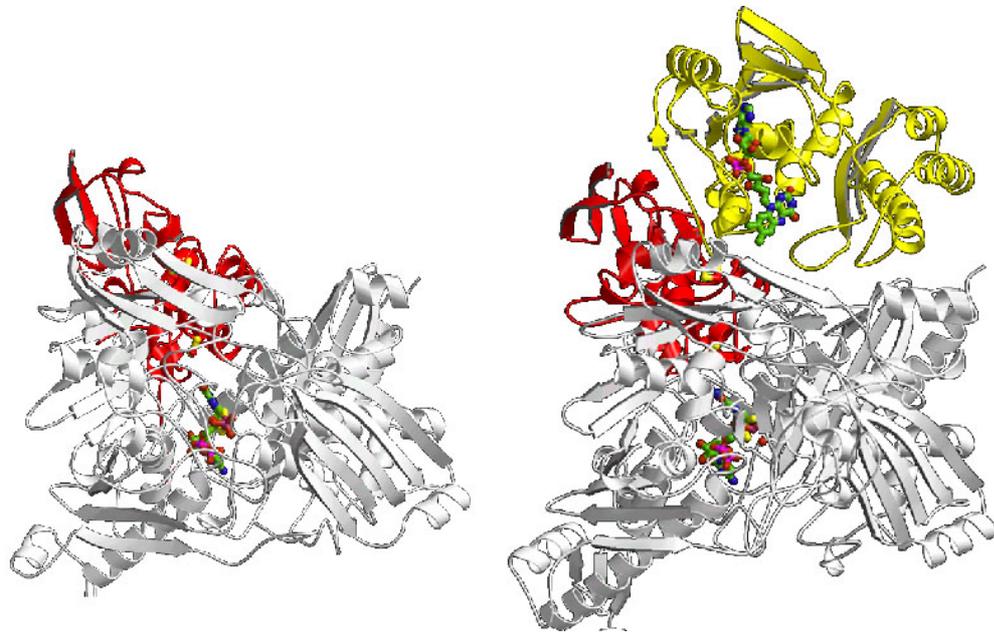


Abbildung 47: Vergleich des CO-Dehydrogenase Monomers mit der monomeren Mop-Struktur von *D. gigas*. Die Bänderdarstellung zeigt die generelle Ähnlichkeit der beiden Monomere für die Mo-MCD Kofaktor-haltige Untereinheit/Domäne in weiss und die [2Fe-2S]-Cluster-haltige Untereinheit /Domäne in rot. Die FAD-haltige M-Untereinheit in gelb ist nicht im Mop-Protein vorhanden. Während die S-Untereinheit und ihr korrespondierender Strukturteil in Mop sehr ähnlich sind, unterscheiden sich die korrespondierenden Bereiche der L-Untereinheit teilweise. Dies gilt insbesondere für den Substratkanal von Mop, der durch einen zusätzlichen *Loop* in CO-Dehydrogenase verengt wird, sowie für Bereiche der Dimer-Grenzfläche, das im Falle von Mop schwächer ausgeprägt ist.

Ein Sequenzvergleich zwischen Mop und Xanthin-Oxidasen/-Dehydrogenasen zeigte, daß diese eine Insertion von 387 Resten zwischen der Mo-haltigen Domäne und der Ferredoxin-Domäne aufweisen (Romao, Archer et al. 1995). Die Insertion der Reste liegt nach einem Sequenzvergleich innerhalb des verbindenden Loops zwischen den beiden funktionalen Einheiten und legte nahe, daß die Flavindomäne an der Stelle sei, an der der Verbindungsloop in Mop lag. Die Flavindomäne in CO-Dehydrogenase wurde dagegen direkt über dem Typ-II-

[2Fe-2S]-Zentrum gefunden (Abb48). Diese Position erlaubt kurze Distanzen zwischen den redoxaktiven Gruppen im Monomer.

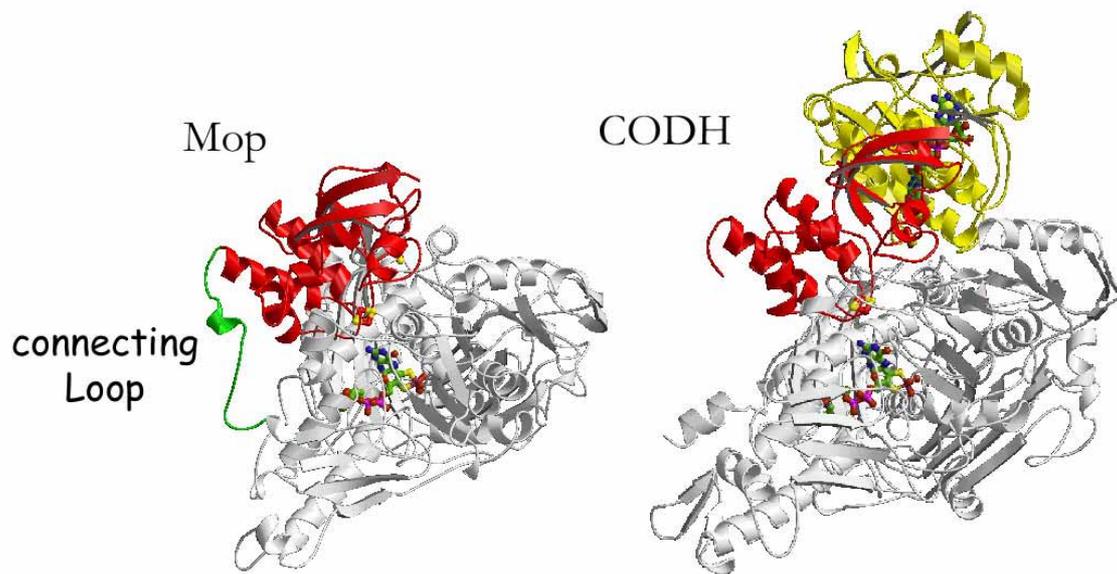


Abbildung 48: Der verbindende *loop* in Mop. Die Insertion der Reste, die Mop gegenüber den Flavin-haltigen Proteinen fehlen, liegen im grün eingefärbten Bereich. Dieser *loop* fehlt der CO-Dehydrogenase aufgrund ihrer Untereinheiten Struktur. Die M-Untereinheit liegt auf der gegenüberliegenden Seite der S-Untereinheit.

Beide Molybdän-Hydroxylasen liegen in Lösung als Dimere vor und für beide wurden Dimerstrukturen vorgeschlagen. Während im Falle der beiden CO-Dehydrogenase-Strukturen ein Dimer pro asymmetrischer Einheit der Elementarzelle gefunden wurde und die Dimere identisch sind, wurden für Mop (Romao, Archer et al. 1995) und die homologe Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio desulfuricans* (Mod) (Rebelo, Maciera et al. 2000) jeweils ein Monomer pro asymmetrischer Einheit gefunden und ihre vorgeschlagenen Dimerstrukturen beruhen auf Vergleichen der unterschiedlichen Packungen der Kristallstrukturen von Mop und Mod. Ein Vergleich der Dimerstrukturen von Mop/Mod und CO-Dehydrogenase (Abb.49) zeigt trotz der relativ hohen Konservierung der Faltung in den Bereichen der jeweiligen Dimerinteraktionen, daß beide offensichtlich unterschiedlich sind, wobei die jeweiligen Monomere um 90° gegeneinander verdreht erscheinen. Das Fehlen der M-Untereinheit in Mop/Mod scheint nicht der Grund dieser unterschiedlichen Dimerisierung zu sein, da auch das Mop/Mod-Dimer eine Positionierung der Flavoprotein-Untereinheit über dem N-terminalen Typ-II [2Fe-2S]-Zentrum erlauben würde.

Ein denkbarer Grund für die beobachteten Unterschiede kann aus der Notwendigkeit des Elektronentransfers zu einem membrangebundenen Cytochrom im Falle der CO-Dehydrogenase bestehen, während als physiologische Elektronakzeptor von Mop ein lösliches Flavodoxin identifiziert wurde (Barata, LeGall et al. 1993). Während beim CO-Dehydrogenase-Dimer die

Elektronen abgebenden Flavoproteine auf einer Seite des Dimers liegen und somit im membrangebundenen Zustand zwei Elektronentransportketten vom aktiven Zentrum bis zum membrangebundenen Cytochrom aufbauen können, erscheint ein solcher Transport im Mop/Mod-Dimer weder nötig noch möglich.

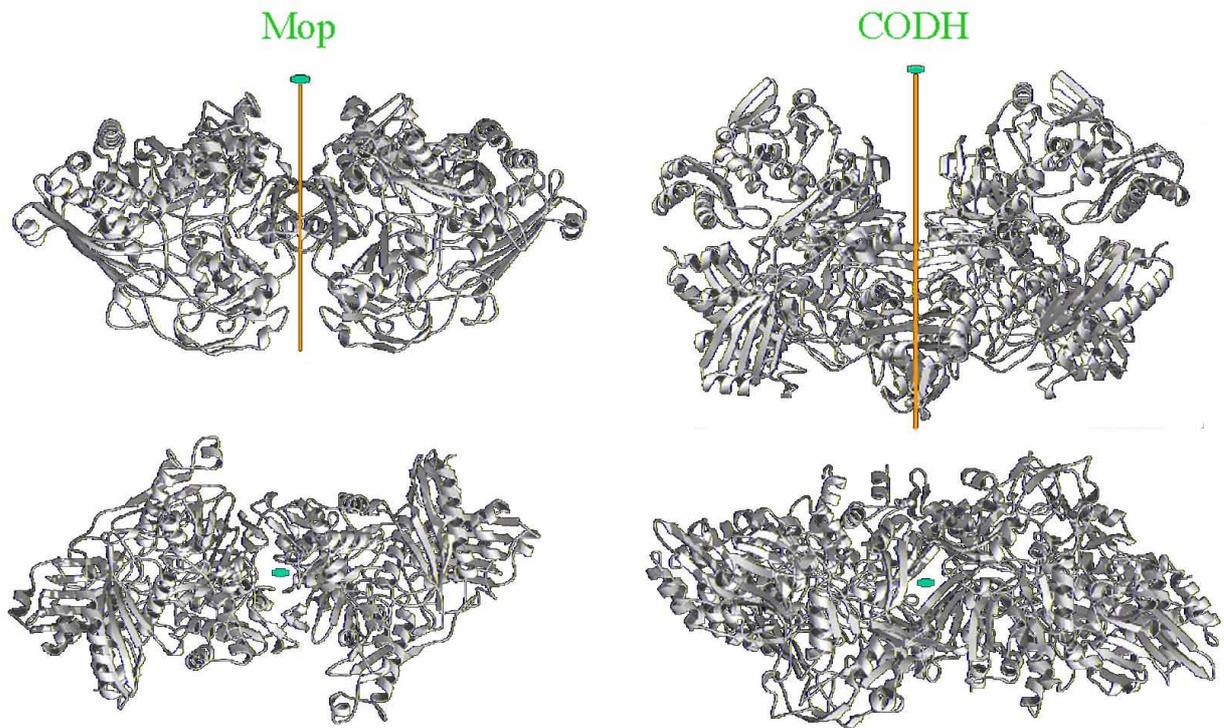


Abbildung 49: Vergleich der Dimerstrukturen von Mop und CO-Dehydrogenase. Die zweizählige Achse ist durch eine orange Linie in der oberen Reihe dargestellt, wo sie in der Ebene der Abbildung liegt. In der unteren Reihe steht die zweizählige Achse senkrecht auf der Ebene der Abbildung und wird durch eine grüne Ellipse dargestellt.

Eine ausgeprägte Homologie zwischen beiden Proteinen besteht auch auf der Ebene der Primärstruktur. Dabei sind aa 1-166 von Mop mit CoxS zu 28% (Schübel, Kraut et al. 1995) und aa 180-907 von Mop mit CoxL zu 25% identisch. In ihrer strukturellen Homologie unterscheiden sich die S- und L-Untereinheit verschieden stark von den korrespondierenden Bereichen in Mop. Während die S-Untereinheit und der korrespondierende Bereich von Mop kaum unterscheidbar sind, zeigen sich zwischen der L-Untereinheit und dem korrespondierenden Bereich von Mop deutliche Unterschiede (Abb.50). Dies gilt insbesondere für den Substratkanal von Mop, der in CO-Dehydrogenase durch einen zusätzlichen Loop geschlossen ist, sowie für den ersten Teil der C-terminalen Domäne, der in CO-Dehydrogenase die Dimer-Grenzfläche aufbaut.

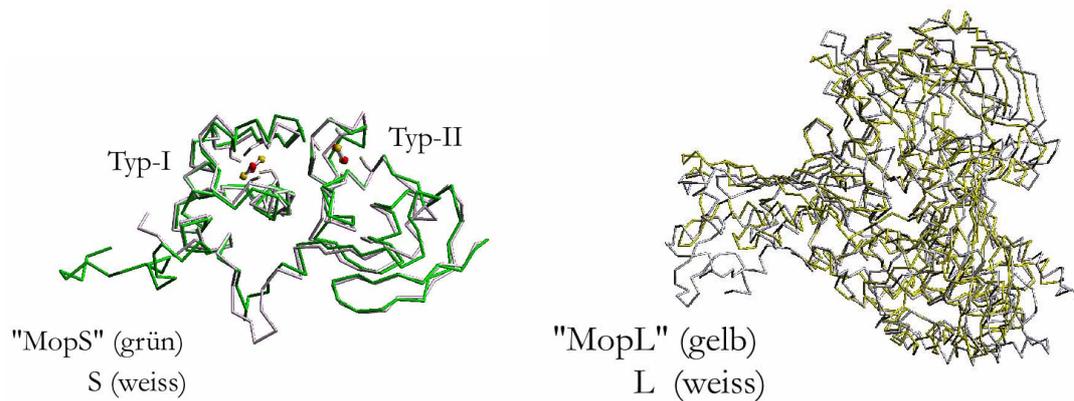


Abbildung 50: Überlagerung der S- und L-Untereinheit mit den korrespondierenden Bereichen von Mop (Romao, Archer et al. 1995). Während die L-Untereinheit einige Unterschiede in der Faltung zum entsprechenden Bereich von Mop zeigt, sind die beiden Domänen der S-Untereinheit mit Mop nahezu identisch. Nur zwischen den Domänen kommt es zu geringen Abweichungen.

Auch die aktiven Zentren von Mop und CO-Dehydrogenase zeigen neben deutlichen Parallelen auch klare Unterschiede, die über die Funktion der Enzyme Auskunft geben könnten. Während die Sekundärstrukturelemente nahe der aktiven Zentren in beiden Enzymen sehr ähnlich sind, ist schon die erste Koordinationssphäre des Mo-Ions unterschieden. *As isolated* Mop zeigt ähnlich wie die CN⁻-inaktivierte Form der CO-Dehydrogenase drei Sauerstoffliganden, von denen zwei als Oxo- und einer als Hydroxo-Ligand interpretiert wurde (Huber, Hof et al. 1996). Die Position des Hydroxo-Liganden stimmt mit der Position in CO-Dehydrogenase überein. Ebenso liegt in beiden Enzymen ein Oxo-Ligand in trans Position zu Glu 869 bzw. Glu 763.

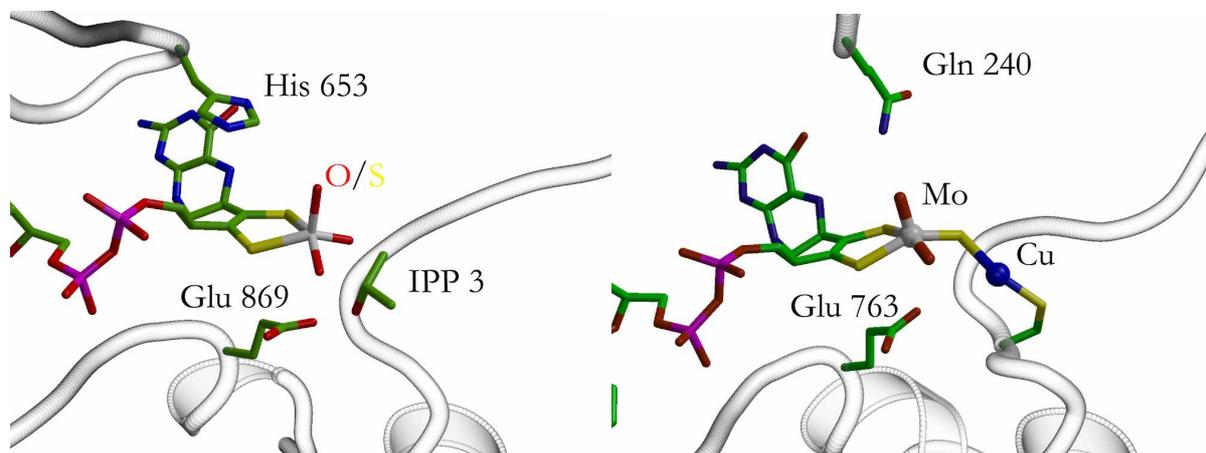


Abbildung 51: Vergleich der aktiven Zentren von Mop (links) und CO-Dehydrogenase (rechts). IPP 3 steht im aktiven Zentrum von Mop für ein Isopropanol-Molekül, das als mögliches Modell für den Michaelis-Komplex (Huber, Hof et al. 1996) in der putativen Substrattasche liegt. Mit O/S ist in der Mop-Struktur der apikale Oxo-Ligand gekennzeichnet, der nach Resulfurierung durch einen Sulfo-Ligand substituiert ist.

In beiden Zentren wechselwirkt ein hochkonservierter Glu-Rest mit Mo, wobei sich in *as isolated* Mop ein Abstand von 3.65 Å zwischen O ε2 des Glu-Restes und Mo ergibt, während in *as isolated* oxidierte CO-Dehydrogenase mit geschlossenem [CuMo]-Cluster sich ein Abstand von 3.13 Å

zeigt. Hier ähnelt Mop der CN^- -inaktivierten CO-Dehydrogenase, die mit 3.49 Å ebenfalls einen deutlich verlängerten Abstand zwischen Mo und O $\epsilon 2$ zeigt.

Während in Mop Resulfurierungsexperimente zum Austausch des apikalen Oxo-Liganden, trans zu Glu 869, führten (Huber, Hof et al. 1996) (Abb.51) liegt in *as isolated* CO-Dehydrogenase der verbrückende μ -Sulfido-Ligand trans zur Dithiolen-Gruppe des MCD-Kofaktors. Dieser Unterschied liegt wahrscheinlich in der zweiten Koordinationssphäre des Mo-Ions begründet, welche die präferentielle Koordinationsstelle des Sulfido-Liganden mitbestimmt. Das Cu-Ion in CO-Dehydrogenase kann den sehr labilen Sulfido-Liganden (Young 1997) (Stiefel 1997) am Mo stabilisieren, was sich auch in der gleichzeitigen Abspaltung von Cu und dem Sulfido-Liganden mit CN^- ausdrückt. Außerdem setzt das Cu-Ion als Substratbindungsstelle eine zusätzliche Präferenz, da der Sulfido-Ligand nach unserer Vorstellung an der Substratumsetzung direkt beteiligt ist. An der Stelle des resulfurierten Liganden in Mop liegt in CO-Dehydrogenase ein Oxo-Ligand, der in H-Brückendistanz zu Gln 240 positioniert ist (Abb.51). Dieser Gln-Rest ist innerhalb der Molybdän-Hydroxylase-Familie strikt konserviert mit den Ausnahmen von Mop und Mod, die an seiner Stelle ein Ile besitzen. In beiden Proteinen (Mop/Mod) wird als möglicher H-Brückendonator für den apikalen Oxo-Liganden eine His-Seitenkette gefunden.

Ein Isopropanol-Molekül, das als mögliches Modell für den Michaelis-Komplex interpretiert wurde und die Substratbindetasche in Mop markiert (Huber, Hof et al. 1996), liegt in etwa an der Position, in der in CO-Dehydrogenase das Cu-Ion liegt (Abb.51). Dies kann auf eine verwandte Art der Substratbindung und -orientierung hinweisen.

Eine besondere Eigenschaft von Mop und Mod sind ihre relativ geringen katalytischen Aktivitäten und ihre geringe Substratspezifität. Falls die Stabilisierung der Übergangszustandes durch einen *spectator-oxo* Effekt (Rappe und Goddard III 1980), wie für CO-Dehydrogenase vorgeschlagen (siehe Mechanismus Diskussion), ein gemeinsames Merkmal der Molybdän-Hydroxylasen ist, könnte die veränderte chemische Umgebung dieses Oxo-Liganden in Mop und Mod evtl. ihre geringe Aktivität erklären. Die hochkonservierte direkte Umgebung des *spectator oxo* Liganden (Gln 240 sowie Glu 763 in trans Position zum *spectator oxo* Liganden) läßt es wahrscheinlich erscheinen, daß er ein generelles Charakteristikum der Molybdän-Hydroxylasen ist.

Vergleich der Faltung von M mit anderen Flavoproteinen

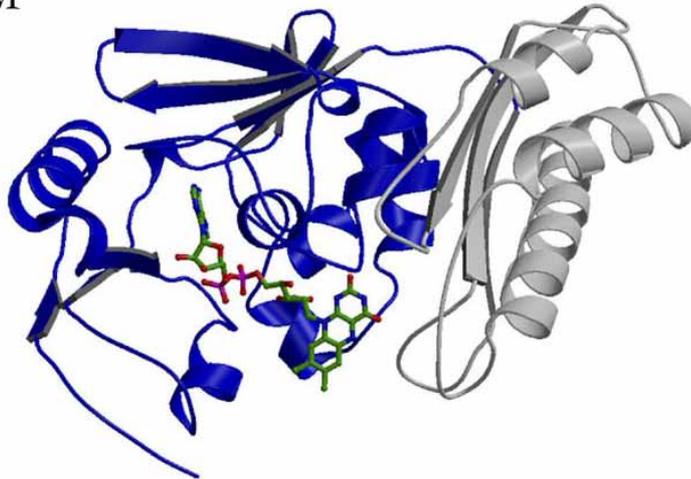
Durch die Verwendung des Programmes DALI (Holm und Sander 1993) konnten zwei Flavoproteine identifiziert werden, die Ähnlichkeiten zur M-Untereinheit der CO-Dehydrogenase zeigten. Es sind dies die UDP-*N*-acetylenopyruvylglucosamin-Reduktase von *Escherichia coli* (MurB) (Benson, Walsh et al. 1996) und die Vanillyl-Alkohol-Oxidase (VAO) von *Penicillium*

simplicissimum (Mattevi, Fraaije et al. 1997). Beide zeigen in den Bereichen, die direkt für die FAD-Bindung verantwortlich sind Ähnlichkeiten zur M-Untereinheit, d.h. sie besitzen entsprechende Bereich für die N-terminale und mittlere Domäne der M-Untereinheit. Keine Ähnlichkeit besteht dagegen zwischen der C-terminalen Domäne der M-Untereinheit und anderen Flavoproteinen (Abb.52).

VAO und MurB sind die Mitglieder einer neuen Oxidoreduktase-Familie, die sich durch eine konservierte FAD-bindende Domäne auszeichnet (Fraaije, van Berkel et al. 1998). Eine Variabilität in der Substraterkennung und -umsetzung wird innerhalb der Flavoproteinfamilie über eine individuelle Kappen-Domäne erzeugt. Ihr aktives Zentrum liegt in der Grenzfläche der beiden Domänen.

Die FAD-Bindemotive der Molybdän-Hydroxylasen, die aufgrund der Interaktion mit dem FAD sowie ihrer Konservierung charakterisiert werden können, sind aGgt entsprechend ³⁵AGGH³⁵ und AxpqiRnxatxGGn entsprechend ¹⁰²ADPQIRYMG TIGGN¹¹⁵ in CoxM. In der VAO-Familie findet man das ssGHs und shsG Motiv, die für die Pyrophosphat-Bindung verantwortlich sind (Fraaije, van Berkel et al. 1998). Beide Motive liegen in einer ähnlichen Entfernung voneinander in der Primärsequenz und entsprechen sich hinsichtlich ihrer Position in der Struktur.

CoxM



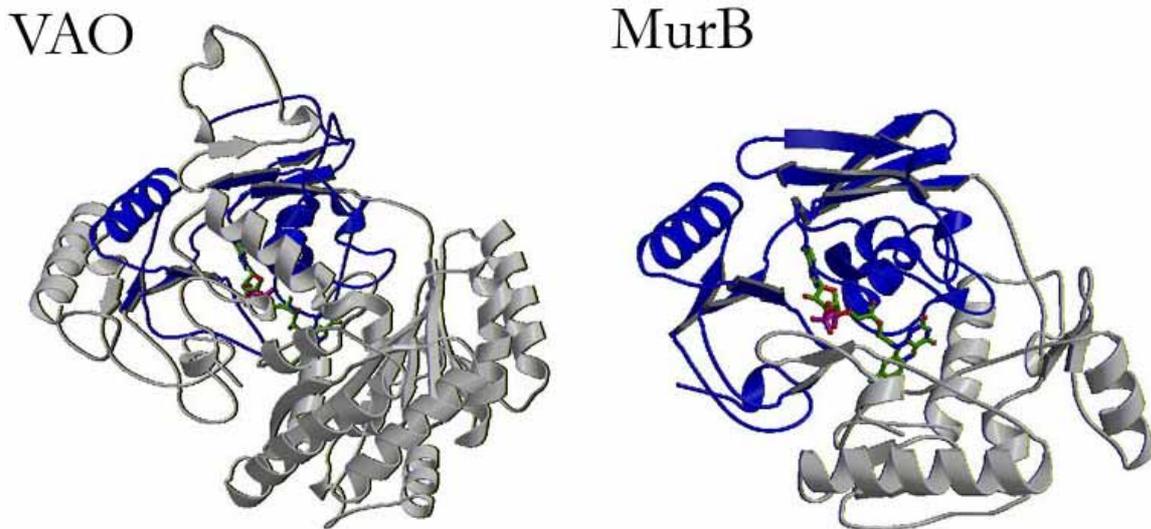


Abbildung 52: Vergleich der homolog strukturierten Flavoproteine der Vanillyl-Alkohol-Oxidase-Familie (VAO und MurB) und der M-Untereinheit der CO-Dehydrogenase. Vergleichbar gefaltete Bereiche sind blau eingefärbt und dienen der FAD-Bindung. Weiß eingefärbte Bereiche zeigen keine Ähnlichkeit in ihrer Faltung.

Obwohl die drei Flavoproteine eine ähnliche Faltung aufweisen, unterscheiden sich ihre Funktionen deutlich.

Da die N-terminale und mittlere Domäne offensichtlich eine funktional konservierte FAD-bindende Einheit darstellen, mag die C-terminale Domäne der M-Untereinheit eine Molybdän-Hydroxylasen-spezifische Funktion erfüllen.

Tyr 193 in der CO-Dehydrogenase von *O. carboxidovorans* wie auch Trp 193 in *H. pseudoflava* schützen das N5-Atom des Isoalloxazinringes gegen die umgebende Lösung. Die beobachteten konformationellen Änderungen nach Elektronenaufnahme des Isoalloxazinringes in den beiden CO-Dehydrogenasen, wobei im Enzym aus *H. pseudoflava* nach Reduktion des N5-Atoms das FAD sogar zugänglich wird (Abb.43), lassen vermuten, daß die Kontrolle der Zugänglichkeit des Isoalloxazinringes eine der Aufgaben der C-terminalen Domäne ist. Auch der gestreckte *loop*, der neben Tyr 193/Trp 193 ebenfalls Gly 191 trägt, welches durch seine Konformation den Oxidationszustand des FAD anzeigt, wird in seiner Lage erst durch das antiparallele Faltblatt der C-terminalen Domäne stabilisiert.

CO-Dehydrogenase als Prototyp für die Molybdän-Hydroxylasen

Die zwei vorliegenden Strukturen beschreiben erstmalig Molybdän-Eisen-Schwefel-Flavoproteine. Sie stimmen in den entsprechenden Bereichen mit der Struktur des Molybdän-Eisen-Schwefel-Proteins Mop aus *D. gigas* überein. Aufgrund der hohen Homologie der Aminosäuresequenz innerhalb der Molybdän-Hydroxylase-Familie kann erwartet werden, daß alle betreffenden Enzyme auch eine hohe strukturelle Homologie aufweisen. Dies macht die

Strukturen der CO-Dehydrogenasen, insbesondere für die FAD-tragende Untereinheit, wie auch für die Anordnung der Kofaktoren zum Prototyp für die Struktur der Molybdän-Hydroxylasen. Die Cu-bindende Aminosäure Cys 388 ist Teil eines Loop, der für CO-Dehydrogenasen konserviert ist. Vergleicht man diesen *loop* (VAYRCSFR) mit den homologen Bereichen anderer Molybdän-Hydroxylasen (Hänzelmann, Dobbek et al. 2000) so zeigt sich, daß die Zusammensetzungen jeweils typisch für einzelne Enzymklassen ist. So scheint es, daß dieser *loop* einen entscheidenden Beitrag zur Substratspezifität der Enzyme leistet. Vergleicht man die charakteristischen Motive der unterschiedlichen Substratklassen, so lassen sich folgende Subfamilien aufstellen:

- a.) VAYRCSFR (CO-Dehydrogenase)
- b.) –A(Y/F)R-GVG (Quinolin-2-Oxidoreduktase, Nicotin-Dehydrogenase)
- c.) –AMR-GHG (4-Hydroxybenzoyl-CoA-Reduktase)
- d.) –AFR-G(F/Y)G (prokaryontische und eukaryontische Xanthin-Oxidase/-Dehydrogenase, MOP, MOD, Aldehyd-Oxidase).

Im Mop-Protein z.B. ist dieser Bereich Teil eines gestreckten *loops*, der an einer vergleichbaren Position wie in der CO-Dehydrogenase liegt und mit einem Isopropanol-Molekül, ein mögliches Modell für den Michaelis Komplex der Aldehyd-Oxidation (Huber, Hof et al. 1996), interagiert.

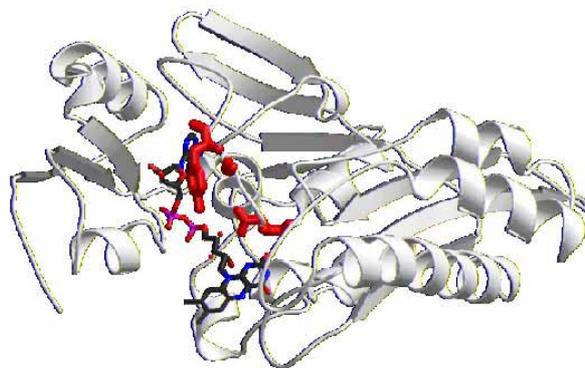


Abbildung 53: Lokalisierung der NAD⁺-Bindestelle in Xanthin-Dehydrogenasen. Die entsprechenden Reste der CO-Dehydrogenase, die in *roy* Mutanten der Xanthin-Dehydrogenase von *D. melanogaster* eine veränderte Affinität für NAD⁺ zeigen, sind als rote Ball-and-Stick Modelle dargestellt.

Der Hauptunterschied in der Funktion der konvertierbaren Xanthin-Oxidase und Xanthin-Dehydrogenase ist ihre Affinität für Elektronenakzeptoren (Hille 1996). Diese unterschiedlichen Reaktivitäten sind wahrscheinlich auf die Fähigkeit NAD⁺/NADH zu binden zurückführbar (Dobbek, Gremer et al. 1999). Affinitätsstudien mit dem Pyridinnukleotid-Analogon 5'-p-Fluorosulfonylbenzoyladenosine (5'-FSBA) (Nishino und Nishino 1987; Nishino, Schopfer et al. 1989), verwiesen auf einen Tyrosin-Rest, der die NAD⁺-Bindungsaffinität veränderte.

Reaktivitätsstudien von Xanthin-Dehydrogenase Varianten von *rosy* Mutanten Stämmen von *D. melanogaster* beinhalten Mutanten, die NAD^+ nur noch schlecht oder nicht mehr als Elektronenakzeptor nutzen konnten (Hughes, Bennett et al. 1992; Hughes, Doyle et al. 1992; Doyle, Burke et al. 1996). Durch Sequenzvergleiche von Xanthin-Oxidase/-Dehydrogenase-Sequenzen aus unterschiedlichen Quellen, konnten wir diese Mutationen, ebenso wie das gelabelte Tyr im CO-Dehydrogenase Modell lokalisieren (Abb.53). Die Mutationen entsprechen Gly 193, Asn 123 und Ala 156 in CoxM (Abb.53). All diese Reste sammeln sich auf zwei *loops* der mittleren Domäne der M-Untereinheit nahe der solvens exponierten Seite des Isoalloxazinringes des FAD. Die so lokalisierbare putative NAD^+ -Bindungsstelle in Xanthin-Dehydrogenase würde für einen Hydrid-Transfer vom Isoalloxazinring zu einem Pyridinring auf der *si*-Seite sprechen. Diese für Flavoproteine ungewöhnliche Stereochemie wurde bereits für die Interaktion vom Faltungshomologen MurB mit NADP^+ vorgeschlagen (Farmer, Constantine et al. 1996) (Constantine, Mueller et al. 1997).

Koordinationsgeometrie bei Mo-haltigen Proteinen: Einheit statt Vielfalt ? Eine verzerrt tetraedrische Koordinationsgeometrie beschreibt alle Mo-haltigen Zentren

Die Koordinationsgeometrie Molybdopterin-haltiger Enzyme weist in den bisherigen Beschreibungen große Variabilität auf (Hille 1996; Schindelin, Kisker et al. 1997). Die zugeordneten Geometrien scheinen zudem teilweise nur schwierig mit der Mo-Komplexchemie vereinbar zu sein (Young 1997). Die Interpretation der Geometrien am Mo geht dabei von einem „ein Atom–ein Ligand“ Modell aus und zählt die beiden Schwefelatome der Dithiolen-Gruppe als zwei Liganden.

Die beobachteten Winkel am Mo-Komplex des [CuMo]-Zentrums legen dagegen eine verzerrt tetraedrische Koordination nahe, in der die Dithiolen-Gruppe als ein zweizähliger Ligand interpretiert wird (Abb.54). Die Verzerrung der tetraedrischen Geometrie wird dabei wesentlich durch den voluminösen Dithiolen-Liganden hervorgerufen, was sich insbesondere in der Geometrie der CN^- -inaktivierten Form widerspiegelt. Die Interpretation einer tetraedrischen Geometrie hat für die Molybdän-Hydroxylasen zum einen den Vorteil, daß Spannungen bzw. Verzerrungen der Geometrie für Liganden vorhergesagt werden, die entscheidend an der Katalyse beteiligt sind und zum anderen erklärt, wieso die Bindungslängen zwischen Mo- und den Dithiolen-Liganden länger sind als für Mo–S Einfachbindungen zu erwarten wäre.

Molybdän Hydroxylasen

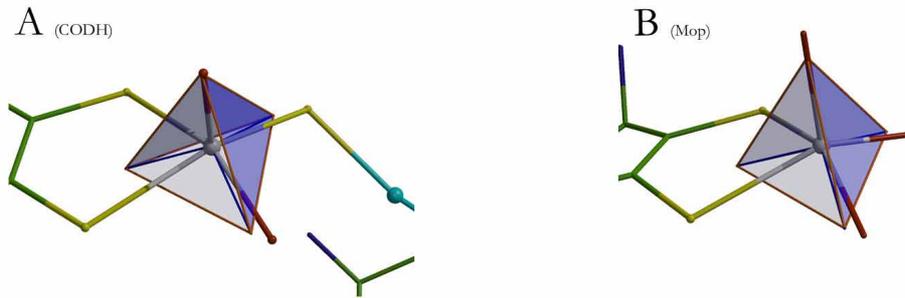


Abbildung 54: Verzerrt tetraedrische Geometrie der Mo-Liganden in der Molybdän-Hydroxylase-Familie. Der blau eingefärbte Tetraeder, der sein Zentrum an der Position des Mo hat, entspricht mit seinen Eckpunkten MoO_4^{2-} .

Die Beschreibung der Geometrie im „ein Atom –ein Ligand“ Modell der Sulfit-Oxidase ergibt eine näherungsweise quadratisch-pyramidale Geometrie (Kisker, Schindelin et al. 1997). Nimmt man dagegen vier Liganden an, ergibt sich eine verzerrt tetraedrische Geometrie (Abb.55). Vergleicht man die Geometrie um das Mo im [CuMo]-Cluster mit der Mo-Ligandengeometrie in der Sulfit-Oxidase sind klare Parallelen erkennbar. Auch hier ergibt sich für die der voluminösen Dithiolen-Gruppe gegenüberliegenden direkt an der Katalyse beteiligten Liganden (Kisker, Schindelin et al. 1997) (Hydroxo-/Thiolat(Cys)-Ligand) eine Verkürzung des Winkels.

Sulfit Oxidase Familie

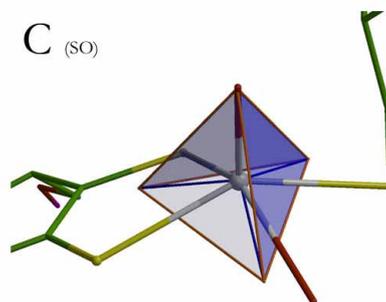


Abbildung 55: Ligandengeometrie der Sulfit Oxidase (Kisker, Schindelin et al. 1997). Auch hier kann eine verzerrt tetraedrische Geometrie gefunden werden. Die dem Dithiolen-Liganden gegenüberliegenden Liganden

(Hydroxo- /Thiolat(Cys)-Ligand) zeigen wie in der Mo-Hydroxylase Familie einen verkürzten Winkel. Der blau eingefärbte Tetraeder, der sein Zentrum an der Position des Mo hat, entspricht mit seinen Eckpunkten MoO_4^{2-} .

Interessant ist insbesondere, daß die Position der vier Liganden (Oxo-/Hydroxo-/Thiolat-/Dithiolen-Liganden) auch der Liganden-Geometrie der CO-Dehydrogenase entspricht.

Legt man die Interpretation der Dithiolen-Gruppe als einem Liganden zugrunde, vereinfacht sich insbesondere auch die Koordinationsgeometrie in der DMSO-Reduktase Familie und legt eine verzerrt tetraedrische Beschreibung nahe (Abb.56). Für die Formiat-Dehydrogenase H aus *E. coli* (Boyington, Gladyshev et al. 1997) und die ähnliche Nitrat-Reduktase aus *D. desulfuricans* (Dias, Than et al. 1999) wurde dabei in der oxidierten Form eine verzerrt trigonal-prismatische Geometrie beschrieben.

Für DMSO-Reduktasen wurden verschiedene Geometrien und unterschiedliche viele Liganden beschrieben. Allen DMSO-Reduktase-Strukturen gemeinsam ist ein Ser-Rest als Protein-Ligand (Abb.56). Für die DMSO-Reduktase aus *R. sphaeroides* (Schindelin, Kisker et al. 1996) wurde eine verzerrt trigonal-bipyramidale Geometrie gefunden mit einer Oxo-Gruppe bei Ligandierung durch beide Dithiolen-Gruppen. Die erste DMSO-Reduktase-Struktur aus *R. capsulatus* (Schneider, Löwe et al. 1996) zeigt dagegen zwei Oxo-Gruppen bei Ligandierung durch eine Dithiolen-Gruppe mit einer pentakoordinierten quadratisch-pyramidalen Geometrie. Eine zweite DMSO-Reduktase-Struktur aus *R. capsulatus* (McAlpine, McEwan et al. 1997) wurde als heptakoordiniert beschrieben, wobei zwei Oxo-Gruppen gleichzeitig mit den beiden Dithiolen-Gruppen das Mo koordinieren.

DMSO Reduktase Familie

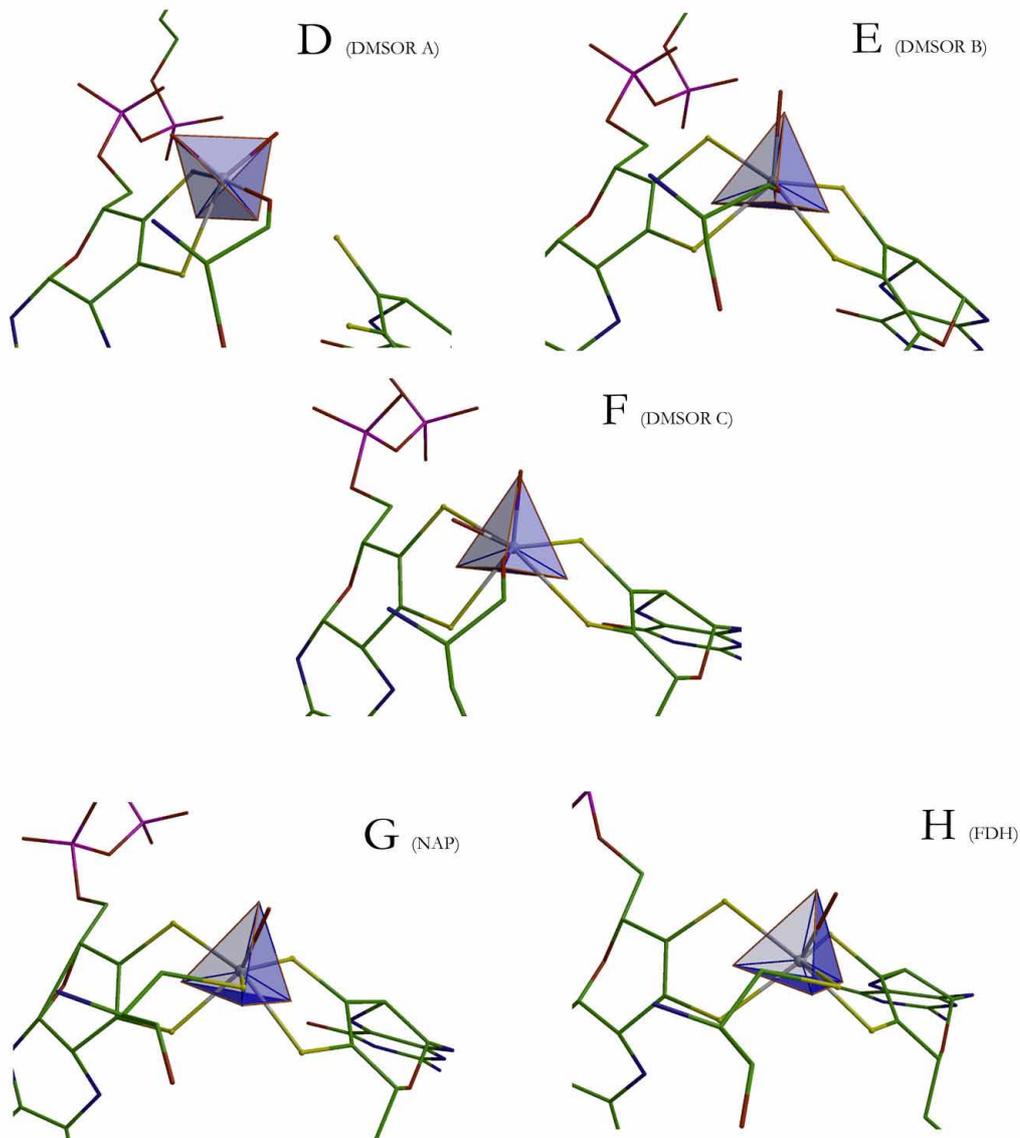


Abbildung 56: Koordinationsgeometrie in der DMSO-Reduktase Familie. Wie auch bei den beiden anderen Molybdopterin-haltigen Enzymfamilien kann die Mo-Koordinationsgeometrie in DMSO-Reduktase Familie als verzerrt tetraedrisch beschrieben werden. Einzig die DMSO-Reduktase Struktur von *R. capsulatus* (F) (McAlpine, McEwan et al. 1997) paßt nicht in dieses Bild und beruht vermutlich auf einer Fehlinterpretation (Li, Temple et al. 2000). Der blau eingefärbte Tetraeder, der sein Zentrum an der Position des Mo hat, entspricht mit seinen Eckpunkten MoO_4^{2-} .

Neuere Untersuchungen bei hohen Auflösungen (1.3 Å) an der DMSO Reduktase aus *R. spaeroides* (Li, Temple et al. 2000) sprechen für zwei mögliche Koordinationsumgebungen für das Mo-Ion. Ein hexakoordiniertes verzerrtes trigonales Prisma gebildet aus den beiden Dithiol-

Gruppen mit einem Oxo-Liganden (Abb. 56 E) ist ebenso möglich, wie eine pentakoordinierte quadratische Pyramide aus zwei Oxo-Liganden und einer Dithiolen-Gruppe (Abb.56 D), die im wesentlichen der DMSO-Reduktase Struktur von Schneider (Schneider, Löwe et al. 1996) entspricht. Beide Geometrien lassen sich ebenfalls alternativ als verzerrte Tetraeder interpretieren. Die DMSO-Reduktase Struktur von McAlpine (McAlpine, McEwan et al. 1997) scheint ebenso wie die *R. sphaeroides* Struktur alternative Zustände im aktiven Zentrum zu besitzen, wobei eine schwach besetzte Mo-Position als zusätzlicher Oxo-Ligand fehlinterpretiert wurde (Li, Temple et al. 2000). Zu dieser Interpretation paßt auch, daß die heptakoordinierte Geometrie sich als einzige nicht durch einen verzerrten Tetraeder beschreiben läßt (Abb.56 F). Die zusätzliche Oxo-Gruppe liegt über einer der Tetraederflächen und entspricht der Position des Mo-Ions in der pentakoordinierten Geometrie (Abb.56 D).

Die Komponenten des aktiven Zentrums

Das aktive Zentrum der Mo-haltigen CO-Dehydrogenase vereinigt mit den ionischen Formen von Mo, Cu, S und O ein interessantes Elementquartett, das weitreichende Möglichkeiten zur Katalyse bildet.

Dem neu entdeckten Cu kommt dabei eine besondere Rolle zu, die offensichtlich auch deutlich verschieden von der Funktion des Elements in anderen Cu enthaltenden Proteinen ist. Die Sonderrolle des Cu im [CuMo]-Cluster im Bereich der bioanorganischen Chemie spiegelt sich schon in der Geometrie seiner Liganden wider. Obwohl zweifach koordinierte Cu(I)-Komplexe in Lösung, anders als in Festkörpern, recht häufig sind (Zuberbühler 1983), werden sie in Proteinen selten beobachtet. Bislang wurde nur ein zweifach Cys-koordiniertes Cu(I)-Ion entdeckt, welches im Cu beladenen Metallothionein (PDB: 1AQR) auftritt und keine katalytische Funktion besitzt. Sonst findet man Cu(I) meist in verzerrt tetraedrischer Koordination (Messerschmidt 1998).

Da Cu(I) eine gefüllte d^{10} -Schale besitzt, fehlt ihm die Möglichkeit zur Ligandenfeldstabilisierung spezifischer Komplexgeometrien. Dies bedeutet, daß die Struktur von Cu(I)-Komplexen flexibel sein kann. Eine insbesondere für den Reaktionsmechanismus der CO-Dehydrogenase (CO- wie H_2 -Oxidation) wichtige Eigenschaft von Cu(I)-Komplexen ist neben ihrer Flexibilität auch ihre Labilität. Diese Labilität betrifft primär das häufige Auftreten von Substitutionsreaktionen am Cu(I)-Ion. Weiterhin besitzt Cu(I) gefüllte Orbitale zur Wechselwirkung mit π -Orbitalen eines Liganden und insbesondere in der zweifach koordinierten Form die Möglichkeit zur Erhöhung der Koordinationszahl. Dies kann auch bei Substitutionsreaktionen am Cu(I)-Komplex, wie für die CO-Oxidation vorgeschlagen (siehe unten), wichtig sein, wenn es sich um eine assoziative Substitution handelt. Diese Eigenschaften machen Cu(I) geeignet zur Bindung von CO.

Interessant ist auch die Reaktivität von CO mit Cu(I)-Komplexen. Die reversible Fixierung von CO in Cu(I)-haltigen Lösungen wird seit über einem Jahrhundert angewendet (Pasquali und Floriani 1983). Cu reagiert mit CO nur im Oxidationszustand +1 (Munakata und Kitagawa 1982) und absorbiert ein CO Molekül pro Cu(I)-Ion, wobei die Affinität des Cu stark von seinen weiteren Liganden abhängt. Die Stabilität der Carbonyl-Komplexe wird beherrscht durch die Natur der Bindung des/der koordinierenden Liganden, der geometrischen Struktur und des umgebenden Mediums (Munakata und Kitagawa 1982). Um eine reversible Bindung zwischen CO und Cu(I) zu erhalten, sollte in einfachen Komplexen einer der Liganden π -bindende Eigenschaften haben. Cu(I)-Carbonyle mit rein σ -bindenden Liganden werden dagegen eingesetzt, wenn stabile Komplexe gewünscht werden (Munakata und Kitagawa 1982). Um CO nukleophil angreifen zu können, muss das Molekül zuvor aktiviert werden. Dies geschieht, indem die Bindung von CO an Cu(I) dessen elektrophile Eigenschaften verstärkt.

Weiterhin ist für Cu(I) die Existenz stabiler Cu-H Bindungen charakteristisch und es wurde vorgeschlagen, daß diese Gruppe aus der Reaktion $\text{Cu}^+ + \text{H}_2 \rightarrow \text{Cu-H} + \text{H}^+$ entstehen kann (Pasquali und Floriani 1983).

Die Eigenschaften des Mo-oxo/-sulfido Komplexes stehen in den meisten Eigenschaften Cu(I) gegenüber. Mo ist fünffach koordiniert, wenn man den Carbonyl-Sauerstoff in 3.16 Å vom Mo nicht berücksichtigt, und liegt im oxidierten Zustand der CO-Dehydrogenase als $d^0 \text{Mo}(+VI)$ vor. Substratbindung und -umsetzung bei Mo-haltigen Enzymen spielt sich wahrscheinlich in der ersten und zweiten Koordinationssphäre des Metalls ab, obwohl es auch Hinweise aus der ENDOR-Spektroskopie für eine direkte Mo-Substratinteraktion bei der Xanthin-Oxidase gibt (Howes, Bray et al. 1996) (Lowe, Richards et al. 1997). Die Rolle des Mo ist offensichtlich die Aktivierung der Liganden, wie die Aufnahme bzw. Abgabe von zwei Elektronen. Nachdem im Falle der Molybdän-Hydroxylasen zwei verschiedene Arten von Sauerstoff-Liganden (Oxo- und Hydroxo-Liganden) vorliegen, ist nicht klar welcher der beiden Liganden auf das Substrat übertragen wird und in vorgeschlagenen Mechanismen findet man beide Varianten. Auch die Rolle der Sulfido-Gruppe in möglichen Mechanismen ist nicht klar. Interessant ist, daß im oxidierten Zustand Mo(+VI) direkt an den reduzierten Sulfido-Liganden (S^{2-}) gebunden ist. Die energetische Nähe des Mo-4d- und S-3p-Orbitals (Young und Wedd 1993) ermöglicht eine Redoxchemie zwischen Metall und Ligand, insbesondere wenn das oxidierte Mo auf den reduzierten Thio-Liganden (S^{2-}) trifft. Diese *non-innocent role* des Schwefel wird in Reaktionen widergespiegelt, in denen ein induzierter interner Elektronentransfer von S^{2-} auf Mo dieses paradoxerweise in Gegenwart von Oxidationsmitteln reduzieren kann (Coyle, Harmer et al. 1990). $[\text{MoOS}]^{2+}$ Komplexe sind selten, hochreaktiv und ihre Synthese schwierig. Dies liegt

offenbar an der Instabilität dieser Verbindungen (Young und Wedd 1993). Katalytische Zentren, die diese Komponenten nutzen haben offensichtlich einen Weg gefunden, sie zu stabilisieren.

Der katalytische Mechanismus

CO-Oxidation

Parallelen in der chemischen Reaktivität und elektronischen Struktur zwischen Isonitrilen und CO lassen vermuten, daß der Zustand in dem der kompetitive Inhibitor nBIC gebunden ist, dem Übergangszustand der CO-Oxidation am [CuMo]-Cluster entspricht. Nimmt man die oxidierte, nBIC-gebundene und CO-reduzierte Struktur zusammen, erhält man Einblick in die Schlüsselmomente der CO-Oxidation. Die erste Struktur repräsentiert dabei den Anfang und das Ende eines jeden Zyklus, die zweite einen intermediären Zustand und die dritte das reduzierte aktive Zentrum nach Produktbildung.

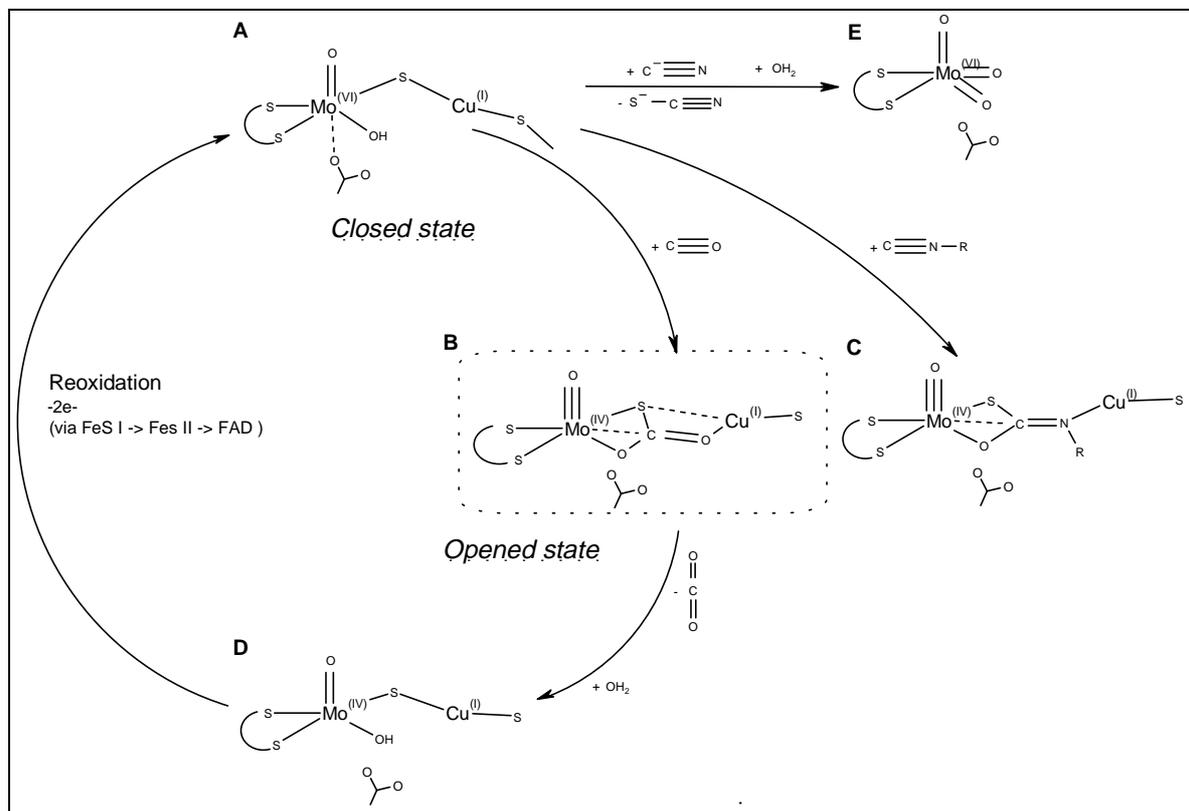


Abbildung 57: Katalytischer Zyklus der CO-Oxidation. Während die Zustände A, C, D und E direkt beobachtet wurden, ist der Zustand B (im Kasten) in Analogie zum Zustand C, der nBIC gebundenen Form, postuliert.

Die Katalyse beginnt, wenn das Substrat CO über den hydrophoben Substratkanal das aktive Zentrum erreicht. Der vermutlich erste Schritt der Katalyse ist die *end-on* Bindung von CO an Cu(I) durch Ligandensubstitution. Dies resultiert in einer Bewegung des Cu weg von Mo, die zum offenen Zustand des [CuMo]-Clusters führt. Konformationelle Änderungen des Cys 388 tragenden Loops, insbesondere von Cys 388 und Ser 389, die durch die Öffnung des Clusters

ausgelöst werden, werden über H-Brücken auf das hochkonservierte Glu 763 übertragen (Abb.28). Dies führt zur Vergrößerung der Distanz zwischen O ϵ_2 von Glu 763 und Mo, wie in der nBIC gebundenen Form beobachtet, und zur Schwächung der zuvor erfolgten Stabilisierung des hochgeladenen Mo-Ions durch die nahe negative Ladung (Tab.2). Diese Destabilisierung, wie die Nähe des reduzierten Sulfido-Liganden (S^{2-}) zu Mo(+VI) lassen es wahrscheinlich erscheinen, daß der Sulfido-Ligand durch eine interne Elektronenübertragung bei der Reduktion des Mo (Stiefel 1997) eine entscheidende Rolle spielt. Die Elektronenübertragung wäre dabei durch die Bindung des Substrat an Cu(I), d.h. durch die Öffnung des Clusters ausgelöst. Die Koordinierung von CO an Cu(I) verstärkt die Elektrophilizität von CO und erhöht seine Reaktivität mit der nukleophilen Hydroxo-Gruppe.

	Distanz: Mo-S(Cys 388)	Distanz: Mo-O ϵ_2 (Glu 763)
Oxidiert	5.91 Å	3.14 Å
Reduziert	6.06 Å	3.30 Å
nBIC gebunden	6.84 Å	3.44 Å
CN ⁻ inaktiviert	6.60 Å	3.49 Å

Tabelle 2: Abhängigkeit der Stabilisierung des Mo-Zentralions durch Glu 763 vom Zustand des [CuMo]-Clusters. Der Zustand des Clusters (offen/geschlossen) wird durch den Abstand zwischen dem S γ -Atom von Cys 388 und Mo angegeben, wobei ein kurzer Abstand zwischen beiden Atomen einem geschlossenen und ein langer Abstand einem geöffneten Cluster entspricht. Die CN⁻ inaktivierte Form wurde ebenfalls berücksichtigt, da sich durch die Zerstörung des Clusters für den Cys 388 tragenden Loop im aktiven Zentrum eine ähnlich relaxierte Konformation ergibt wie im nBIC gebundenen Zustand. Deutlich ist der Einfluss der Konformation des Cys tragenden Loops auf die Distanz zwischen Mo und O ϵ_2 (Glu 763) erkennbar.

Eine zusätzliche Triebkraft der Reaktion ist die Erhöhung der Bindungsordnung der Oxo-Gruppe. Dieses in der bioanorganischen Literatur für Mo-haltige Proteine kontrovers diskutierte Prinzip (Hille 1996) wird als *spectator oxo effect* (Rappe und Goddard III 1980) bezeichnet und geht auf die Untersuchung von Reaktionen an bivalenten Oxo-Gruppen in der Metathese und Epoxidierung von Olefinen zurück. Dabei wurde beobachtet, daß eine zweite *spectator* Oxo-Gruppe bei Cr-Katalysatoren für die Metathese von Alkenen die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich erhöht. Theoretische *ab initio* Studien für Cr- und Mo-Komplexe legen nahe, daß die Präsenz des *spectator oxo*-Liganden die Ausbildung des katalytischen Metallozyklus vorantreibt und dabei eine entscheidende Rolle in der Katalyse spielt. Die zusätzliche Energie, die sich aus der Ausbildung der Oxo-Dreifachbindung ergibt, kann für Dioxo-Molybdän Komplexe mehr als 100 kJ \cdot mol⁻¹ betragen, wenn die Koordinationssphäre durch ionische Gruppen dominiert wird (Rappe und Goddard III 1980). Das Vorherrschen von Schwefel-Liganden im Falle der CO-

Dehydrogenase sollte allerdings zu einem mehr ionischen Charakter der Oxo-Gruppe führen, wodurch der *spectator oxo* Effekt abgeschwächt würde (Hille 1996).

Die durch diese zusätzliche Bindung freigesetzte Energie führt zu einer weiteren Stabilisierung des beobachteten Übergangszustandes, in dem CO wahrscheinlich cis- μ -1,2 gebunden zwischen Cu- und dem Sulfido-Liganden vorliegt (Abb.57 B). Die ebenfalls beobachtete Flexibilität in den Bindungslängen zwischen Mo- und der Dithiolen-Gruppe kann Änderungen an anderen Mo-Liganden kompensieren.

Nach Ausbildung des Übergangszustandes sind wahrscheinlich die weiteren Reaktionen bestimmt durch die Stabilität der entstehenden Produkte und der Ablauf der Umsetzungen der CO- und nBIC-gebundenen Zwischenprodukten ist deutlich unterschieden. Dies könnte auch die Inhibition durch nBIC (L. Gremer, unveröffentlichte Ergebnisse) erklären.

Produktbildung und -freisetzung treten wahrscheinlich zusammen mit der Schließung des Clusters und dem Ersatz des eingebauten Hydroxo-Liganden durch Wasser auf. Die Bindungslänge zwischen Mo und dem neuen Liganden ist deutlich kürzer als für einen Wasser-Liganden zu erwarten wäre und eine erste Deprotonierung des sauren Metall-gebundenen Wasser-Moleküls (Hille, Retey et al. 1998), unter der möglichen Mitwirkung von Glu 763, zur Ausbildung des Hydroxo-Liganden hat wahrscheinlich bereits stattgefunden.

Ein entscheidendes Charakteristikum dieses Reaktionsmechanismus ist, daß die Elektronen durch die Mo reduziert wird, nur indirekt aus dem Substrat kommen. Vielmehr löst die Substratbindung eine Kette von Reaktionen aus, die zur Reduktion von Mo führen.

Folgende Grafik faßt die entscheidenden Schritte des entworfenen Reaktionsmechanismus zusammen.

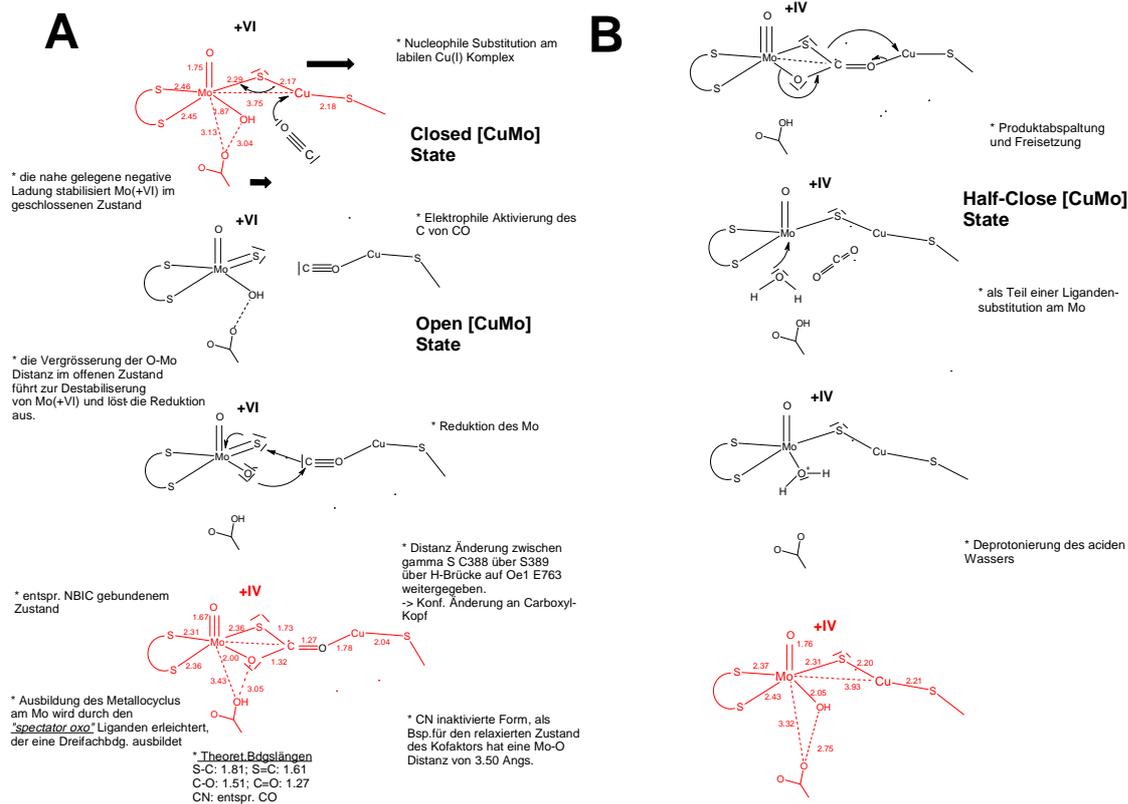


Abbildung 58: Hypothetischer Reaktionsmechanismus für die Oxidation von CO. Beobachtete Strukturen sind in rot eingefärbt. Die für isolierte Cu-CO Komplexe ungewöhnliche Orientierung des CO am Cu ist eine mögliche Alternative zur häufig gefundenen Bindung über das C-Atom des CO (Pasquali und Floriani 1983). Die Ausrichtung des schwachen Dipols des CO Moleküls könnte durch die anisotrop abgeschirmte Ladung des Mo(+VI)-Ions bewirkt werden. Ob allerdings CO am aktiven Zentrum zuerst den μ -Sulfido Liganden oder Cu(I) angreift, oder in die Cu- μ S Bindung inseriert, scheint ohne weitere Untersuchungen nicht entscheidbar.

H₂-Oxidation

Die H₂-oxidierende Aktivität der CO-Dehydrogenase beträgt ca. 10 bis 16 % der CO-oxidierenden Aktivität und obwohl sie wahrscheinlich keine physiologische Bedeutung hat, da *O. carboxidovorans* zur H₂-Oxidation eine spezifische membrangebundene [NiFe]-Aufnahme-Hydrogenase besitzt (Santiago und Meyer 1997), ist das Verständnis der Reaktion sowohl im Hinblick auf die CO-Oxidation der CO-Dehydrogenase, wie auch für Hydrogenasen im allgemeinen interessant.

Die Inaktivierung der CO-oxidierenden Aktivität der CO-Dehydrogenase resultiert ebenfalls im Verlust der Hydrogenase-Aktivität und die heterolytische Spaltung von H₂ verlangt offensichtlich die gleichen Bestandteile des aktiven Zentrums, die auch zur CO-Oxidation benötigt werden. Da kristallographische Studien zur H₂-Bindung nur indirekte Hinweise liefern können, muß ein plausibler Mechanismus für die H₂-Oxidation auf die Reaktionsmöglichkeiten des Substrats mit dem [CuMo]-Cluster, sowie die Parallelen zur CO-Oxidation abheben. Cu(I)-Salze können die heterolytische Spaltung von H₂ katalysieren, wobei das Hydrid-Ion am Cu(I) gebunden bleibt

(Pasquali und Floriani 1983). Angenommen, daß der Wechsel zwischen *open state* und *closed state* des [CuMo]-Clusters auch die treibende Kraft der H_2 -Oxidation ist, läßt sich folgendes Szenario denken:

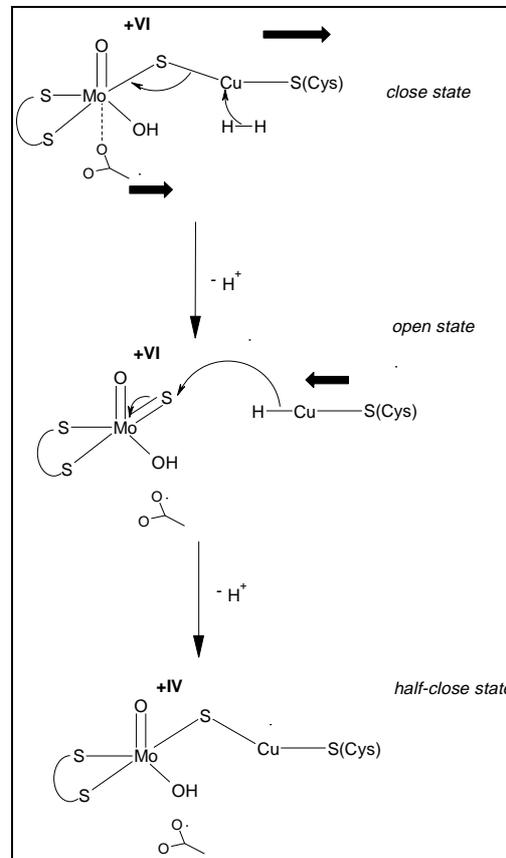


Abbildung 59: Hypothetischer Reaktionsmechanismus für die heterolytische H_2 -Spaltung und -Oxidation. Der Mechanismus basiert auf der Parallele zur CO-Oxidation, sowie der Vermessung der H_2 -reduzierten CO-Dehydrogenase.

Wenn das Hydrid-Ion den μ -Sulfido-Liganden am Cu(I) substituiert, und damit den *open state* des Clusters erzeugt, findet durch die Destabilisierung die Reduktion des Mo statt und das erste Proton wird abgespalten. Das zweite Proton wird freigesetzt, wenn die Bindung zwischen Cu und dem Sulfido-Liganden sich wieder bildet und dadurch das mit H_2 -reduzierte aktive Zentrum, wie beobachtet, liefert.

Interessant für das Verständnis der katalytischen Mechanismen von CO-Dehydrogenasen und Hydrogenasen ist die Tatsache, daß sowohl die Ni- als auch die Mo-haltige CO-Dehydrogenasen H_2 oxidieren können. Hydrogenasen, Fe-only wie [NiFe]-Hydrogenasen, zeigen dagegen eine kompetitive Hemmung in Gegenwart von CO. Dies läßt vermuten, daß die Interaktionen von H_2 und CO mit den jeweiligen Metallzentren ähnlich ist. Während Mo-haltige CO-Dehydrogenasen jedoch eine zusätzliche nukleophile Hydroxo-Gruppe in ihrem aktiven Zentrum tragen und damit CO oxidieren können, wird CO, wo diese Gruppe fehlt, zwar aktiviert aber nicht

umgesetzt. Es bleibt zu bemerken, daß Hydrogenasen im Gegensatz zu Mo-haltigen CO-Dehydrogenasen die Umsetzung von H_2 in beiden Richtungen katalysieren können (Garcin, Montet et al. 1998) und höhere spezifische Aktivitäten als CO-Dehydrogenasen für die H_2 -Oxidation aufweisen.

[CuMo]-haltige CO-Dehydrogenase als die späte biologische Alternative

Biologische Katalysatoren der CO-Oxidation können nach den Metallen ihrer aktiven Zentren wie ihrer Stabilität gegenüber Sauerstoff in zwei grosse Klassen eingeteilt werden, die zwischen den Mo- und Ni-haltigen Enzymen unterscheiden. Ein zusätzlicher Unterschied dieser Gruppen wird im Vergleich der evolutionären Perioden offenbar, in denen die verwendeten Metalle bioverfügbar wurden.

Ni und Fe waren bereits in der frühen anoxisch-reduzierenden Atmosphäre verfügbar und Organismen, die die Ni/Fe-CO-Dehydrogenase nutzen sind unter einem evolutionären Blickwinkel ursprünglich.

Cu-haltige Proteine sind dagegen erst spät entstanden. Mit dem Aufkommen der oxygenen Photosynthese veränderte sich die Atmosphäre der Erde langsam und wechselte ihren Charakter von reduzierend zu oxidierend. Während der entstehende oxidative Stress einerseits wahrscheinlich zu einer frühen biologischen Katastrophe führte, wurden andererseits Metalle wie Kupfer bioverfügbar. Während das Metall unter den reduzierenden, Sulfid-haltigen frühen Bedingungen als schwerlösliches Cu(I)-sulfid vorlag, wurde es nun zum gut löslichen Cu^{2+} -Ion oxidiert. Das Resultat dieser Veränderung war die Entwicklung von Kupferproteinen und -enzymen in denen Sauerstoff entweder als Substrat oder Elektronenakzeptor diente.

In den zwei Grundtypen von CO-Dehydrogenasen, den Cu/Mo-haltigen versus den Ni/Fe-haltigen, beobachten wir zwei biologische Lösungen zu einem ähnlichen Problem, der Oxidation von CO mit Wasser zur Generierung von zwei Elektronen und zwei Protonen. Beide Systeme sind wahrscheinlich charakteristisch für die Bedürfnisse wie die Möglichkeiten der evolutionären Perioden, in denen sie sich entwickelten.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahams, J. P. und R. A. G. De Graaff (1998). "New developments in phase refinement." Current Opinion in Structural Biol. **8**: 601-605.
- Achim, C., M. P. Golinelli, et al. (1996). "Mössbauer Study of Cys56Ser Mutant 2Fe Ferredoxin from *Clostridium Pasteurianum*: Evidence for Double Exchange in an [Fe₂S₂]⁺ Cluster." J. Am. Chem. Soc. **118**: 8168-8169.
- Barata, B. A. S., J. LeGall, et al. (1993). "Aldehyde Oxidoreductase Activity in *Desulfovibrio gigas*: In Vitro Reconstitution of an Electron-Transfer Chain from Aldehydes to the Production of Molecular Hydrogen." Biochem. **32**: 11559-11568.
- Beinert, H. (2000). "Iron-Sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises." JBIC **5**: 2-15.
- Benson, T. E., C. T. Walsh, et al. (1996). "The structure of the substrate-free form of MurB, an essential enzyme for the synthesis of bacterial cell walls." Structure **4**(1): 47-54.
- Bernstein, B. E. und W. G. J. Hol (1997). "Probing the limits of the molecular replacement method: the Case of *Trypanosoma brucei* Phosphoglycerate Kinase." Acta Cryst D **53**: 756-764.
- Bian, S. und J. A. Cowan (1999). "Protein-bound iron-sulfur centers. Form, function, und assembly." Coord. Chem. Rev. **190**: 1049-1066.
- Blundell, T. L. und L. N. Johnson (1976). Protein Crystallography. London, Academic Press.
- Bonam, D. und P. W. Ludden (1987). "Purification and characterization of carbon monoxide dehydrogenase, a nickel, zinc, iron-sulfur protein, from *Rhodospirillum rubrum*." J. Biol. Chem. **262**(7): 2980-7.
- Boyington, J. C., V. N. Gladyshev, et al. (1997). "Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe₄S₄ cluster." Science **275**(5304): 1305-8.
- Bray, R. C. (1975). Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. The enzymes. Boyer. New York, Academic Press : 300-419.
- Bray, R. C., G. N. George, et al. (1983). "Studies by e.p.r. spectroscopy of carbon monoxide oxidases from *Pseudomonas carboxydovorans* und *Pseudomonas carboxydohydrogena*." Biochem. J. **211**(3): 687-94.
- Brünger, A. T. (1992). "Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures." Nature **355**: 472-475.
- Brünger, A. T. (1992). X-PLOR Version 3.1. A System for Crystallography und NMR. New Haven, CT, Yale University Press.
- Brünger, A. T. (1993). "Assessment of Phase Accuracy by Cross Validation: the Free R Value. Methods und Applications." Acta Cryst. D **49**: 24-36.

- Brünger, A. T., P. D. Adams, et al. (1998). "Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination." Acta Cryst. D **54**(5): 905-921.
- Buerger, M. J. (1977). Kristallographie. Berlin, De-Gruyter.
- Burgess, B. K. und D. J. Lowe (1996). "Mechanism of molybdenum nitrogenase." Chem. Rev. **3011**(1996).
- Chan, M. K., S. Mukund, et al. (1995). "Structure of a hyperthermophilic tungstopterin enzyme, aldehyde ferredoxin oxidoreductase." Science **267**(5203): 1463-9.
- Chapman, M. S. und E. Blanc (1997). "Potential use of real-space refinement in protein structure determination." Acta Cryst. D **53**: 203-206.
- Collaborative Computational Project No. 4 (1994). "The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography." Acta Cryst. D **50**(5): 760-763.
- Constantine, K. L., L. Mueller, et al. (1997). "Characterization of NADP⁺ binding to perdeuterated MurB: backbone atom NMR assignments and chemical-shift changes." J. Mol. Biol. **267**(5): 1223-46.
- Coughlan, M. P., J. L. Johnson, et al. (1980). "Mechanism of inactivation of molybdoenzymes by cyanide." J. Biol. Chem **255**: 2694-2699.
- Cowtan, K. und P. Main (1998). "Miscellaneous Algorithms for Density Modification." Acta Cryst. D **54**: 487-493.
- Cowtan, K. D. und P. Main (1996). "Phase Combination and Cross Validation in Iterated Density-Modification Calculations." Acta Cryst. D **52**: 43-48.
- Coyle, C. L., M. A. Harmer, et al. (1990). Inorg. Chem. **29**: 14.
- Cruickshank, D. W. J. (1999). "Remarks about protein structure precision." Acta Cryst. D **55**: 583-601.
- Cypionka, H. und O. Meyer (1983). "Carbon monoxide-insensitive respiratory chain of *Pseudomonas carboxydovorans*." J. Bact. **156**(3): 1178-87.
- da Silva, F. J. J. R. und R. J. P. Williams (1994). The Biological Chemistry of Elements, the Inorganic Chemistry of Life. Oxford, Clarendon Press.
- Dauter, Z. (1999). "Data-collection strategies." Acta Cryst. D **1703-1717**.
- DeLano, W. L. und A. T. Brünger (1995). "The Direct Rotation Function: Rotational Patterson Correlation Search Applied to Molecular Replacement." Acta Cryst. D **51**: 740-748.
- Dias, J. M., M. E. Than, et al. (1999). "Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9 Å solved by MAD methods." Structure Fold. & Design **7**(1): 65-79.
- Dobbek, H., L. Gremer, et al. (1999). "Crystal structure and mechanism of CO-Dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selanyl cysteine." Proc. Nat. Acad. Sc. USA **96**(16): 8884-9.

- Dos Santos, J. P., C. Iobbi-Nivol, et al. (1998). "Molecular analysis of the trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase respiratory system from a *Shewanella* species." J. Mol. Biol. **284**(2): 421-33.
- Doyle, W. A., J. F. Burke, et al. (1996). "Properties of xanthine dehydrogenase variants from rosy mutant strains of *Drosophila melanogaster* and their relevance to the enzyme's structure and mechanism." Eur. J. Bioch. **239**(3): 782-95.
- Drenth, J. (1994). Principles of X-ray Crystallography. New York, USA, Springer-Verlag.
- Dugad, L. B., G. N. La Mar, et al. (1990). "Identification of Localized Redox States in Plant-Type Two-Iron Ferredoxins Using the Nuclear Overhauser Effect." Biochem. **29**: 2263-2271.
- Engh, R. A. und R. Huber (1991). "Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement." Acta Cryst. D **4**(1): 392-400.
- Ermler, U., W. Grabarse, et al. (1997). "Crystal Structure of Methyl-Coenzyme M Reductase: The Key Enzyme of Biological Methane Formation." Science **278**: 1457-1462.
- Ermler, U., W. Grabarse, et al. (1998). "Active site of transition-metal enzymes with a focus on nickel." Curr. Op. Struct. Biol. **8**: 749-758.
- Farmer, B. T., 2nd, K. L. Constantine, et al. (1996). "Localizing the NADP⁺ binding site on the MurB enzyme by NMR [letter]." Nat. Struct. Biol. **3**(12): 995-7.
- Ferry, J. G. (1995). "CO-Dehydrogenase." Ann. Rev. Microbiol. **49**: 305-33.
- Fraaije, M. W., W. J. H. van Berkel, et al. (1998). "A novel oxidoreductase family sharing a conserved FAD-binding domain." Trends Biochem. Sci. **23**: 206-207.
- Garcin, E., Y. Montet, et al. (1998). "Structural bases for the catalytic mechanism of [NiFe] hydrogenases." Biochem. Soc. Trans. **26**(3): 396-401.
- Garcin, E., X. Vernede, et al. (1999). "The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center." Structure Fold. & Design **7**(5): 557-66.
- Garman, E. (1999). "Cool data: quantity and quality." Acta Cryst. D **55**: 1641-1653.
- Garman, E. F. und T. R. Schneider (1997). "Macromolecular Cryocrystallography." J. Appl. Cryst. **30**: 211-237.
- George, G. N., B. Hedman, et al. (1998). "An edge with XAS." Nat. Struct. Biol.: 645-647.
- George, G. N., I. Pickering, et al. (2000). "A Novel Protein Bound Copper-Molybdenum Cluster." J. of Am.Chem.Soc.
- Georgiadis, M. M., H. Komiya, et al. (1992). "Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii* [see comments]." Science **257**(5077): 1653-9.
- Giacovazzo, C., H. L. Monaco, et al. (1992). Fundamentals of Crystallography. Oxford, UK, Oxford University Press.

- Gladyshev, V. N., J. C. Boyington, et al. (1996). "Characterization of crystalline formate dehydrogenase H from *Escherichia coli*. Stabilization, EPR spectroscopy, and preliminary crystallographic analysis." J Biol. Chem. **271**(14): 8095-100.
- Glusker, J. P., M. Lewis, et al. (1994). Crystal Structure analysis for chemists and biologists. Weinheim, Germany, VCH Verlagsgesellschaft GmbH.
- Gremer, L. (2000). Kristallstruktur und Funktion von Kohlenmonoxid-Dehydrogenase - ein Seleno-Molybdo-Eisen-Schwefel-Flavoprotein. Dissertation. am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Bayreuth.
- Gremer, L., S. Kellner, et al. (1999). A new type of flavin adenine dinucleotide-binding resolved in the molybdo iron-sulfur-flavoprotein Carbon Monoxide Dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans*. Flavins and Flavoproteins 1999: Proceedings of the thirteenth international symposium Konstanz, Germany. S. Ghisla, P. Kroneck, P. Macheroux und H. Sund. Berlin, Agency for scientific publications : 759-766.
- Gremer, L., S. Kellner, et al. (2000). "Binding of Flavin Adenine Dinucleotide to Molybdenum-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans*." J. Biol. Chem. **275**(3): 1864-1872.
- Gremer, L. und O. Meyer (1996). "Characterization of xanthine dehydrogenase from the anaerobic bacterium *Veillonella atypica* and identification of a molybdopterin-cytosine-dinucleotide-containing molybdenum cofactor." Eur. J. Biochem. **238**(3): 862-6.
- Gutteridge, S., S. J. Tanner, et al. (1978). "Comparison of the molybdenum centres of native and desulfo xanthine oxidase." Biochem. J. **175**: 887-897.
- Hänzelmann, P., H. Dobbek, L. Gremer, R. Huber, O. Meyer (2000). "The Effect of Intracellular Molybdenum in *Hydrogenophaga pseudoflava* on the Crystallographic Structure of the Seleno-Molybdo-Iron-Sulfur Flavoenzyme Carbon Monoxide Dehydrogenase ." J. Mol. Biol. **301**(5): 1221-1235.
- Hänzelmann, P. und O. Meyer (1998). "Effect of molybdate und tungstate on the biosynthesis of CO-Dehydrogenase and the molybdopterin cytosine-dinucleotide-type of molybdenum cofactor in *Hydrogenophaga pseudoflava*." Eur J Biochem. **255**(3): 755-65.
- Harp, J. M., B. L. Hanson, et al. (1999). "Macromolecular crystal annealing: evaluation of techniques and variables." Acta Cryst. D **55**: 1329-1334.
- Helliwell, J. R. (1997). Basic Principles of Anomalous Scattering und MAD. CCP4 Proc. 1997.
- Higuchi, Y., H. Ogata, et al. (1999). "Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of [NiFe] hydrogenase upon reduction with H₂, as revealed by x-ray structure analysis at 1.4 Angs. resolution." Structure Fold. & Design: 549-556.
- Hille, R. (1996). "The mononuclear molybdenum enzymes." Chem. Rev. **96**(7): 2757-2816.
- Hille, R., J. Retey, et al. (1998). "Mechanistic aspects of molybdenum-containing enzymes." FEMS Microbiol. Rev. **22**(5): 489-501.

Hodel, A., S. H. Kim, et al. (1992). "Model Bias in Macromolecular Crystallography." Acta Cryst. **A48**: 851-858.

Holm, L. und C. Sander (1993). "Protein structure comparison by alignment of distance matrices." J. Mol. Biol. **233**(1): 123-38.

Howes, B. D., R. C. Bray, et al. (1996). "Evidence favoring molybdenum-carbon bond formation in xanthine oxidase action: 17Q- und 13C-ENDOR und kinetic studies." Biochem. **35**(5): 1432-43.

Huber, R., P. Hof, et al. (1996). "A structure-based catalytic mechanism for the xanthine oxidase family of molybdenum enzymes." Proc. Nat. Acad. Sci. USA **93**(17): 8846-51.

Hughes, R. K., B. Bennett, et al. (1992). "Xanthine Dehydrogenase From *Drosophila-Melanogaster* Purification and Properties of the Wild-Type Enzyme und of a Variant Lacking Iron Sulfur Centers." Biochem. **31**(12): 3073-3083.

Hughes, R. K., W. A. Doyle, et al. (1992). "Use of Rosy Mutant Strains of *Drosophila-Melanogaster* to Probe the Structure and Function of Xanthine Dehydrogenase." Biochem. J. **285**(2): 507-513.

Jabri, E., Carr, M.B., Hausinger, R.P., Karplus, P.A. (1995). "The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*." Science **268**: 998-1004.

Johnson, M. K. (1998). "Iron-Sulfur Proteins: New Roles for Old Clusters." Curr. Op. in Chem. Biol. **2**: 173-181.

Kabsch, W. und C. Sander (1983). "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features." Biopolymers **22**: 2577-2637.

Kaim, W. und B. Schwederski (1995). Bioanorganische Chemie. Stuttgart, Teubner Verlag.

Kiefersauer, R., M. E. Than, et al. (2000). "A novel free-mounting system for protein crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes." J. of Appl. Crystal. **33**: 1223-1230.

Kim, J., D. Woo, et al. (1993). "X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0-Å resolution." Biochem. **32**(28): 7104-15.

Kisker, C., H. Schindelin, et al. (1997). "Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase." Cell **91**(7): 973-83.

Kleywegt, G. und T. A. Jones (1992). Daresbury Study Weekend Proceedings.

Kleywegt, G. J. (1996). "Use of non-crystallographic symmetry in protein structure refinement." Acta Cryst. D **52**(4): 842-857.

Kleywegt, G. J. und R. J. Read (1997). "Not your average density." Structure **5**: 1557-1569.

Kraut, M., I. Hugendieck, et al. (1989). "Homology and distribution of CO-Dehydrogenase structural genes in carboxydrotrophic bacteria." Arch. of Microbiol. **152**(4): 335-41.

- La Fortelle, E. d., J. J. Irwin, et al. (1997). "SHARP: A maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement and phasing program for the MIR und MAD methods." Cryst. Comput. **7**: 1-9.
- Lamzin, V. S. und K. S. Wilson (1997). Automated refinement for protein crystallography. Macromolecular Crystallography. C. W. Carter und R. M. Sweet. New York, Academic Press. Macromolecular Crystallography **Vol 277**: 269-306.
- Laskowski, R. A., M. W. MacArthur, et al. (1993). "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures." J. Appl. Cryst. **26**: 283-291.
- Leslie, A. G. W. (1991). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. CCP4 und ESF-EACMB Newsletters on Protein Crystallography. A. G. W. Leslie. Daresbury, Warrington UK.
- Leslie, A. G. W. (1999). "Integration of macromolecular diffraction data." Acta Cryst. D **55**: 1696-1702.
- Li, H.-K., C. Temple, et al. (2000). "The 1.3 Angs. Crystal Structure of Rhodobacter sphaeroides Dimethyl Sulfoxide Reductase Reveals Two Distinct Molybdenum Coordination Environments." J. of Am. Chem. Soc.
- Lorigan, G. A., R. D. Britt, et al. (1994). "Electron spin modulation spectroscopy of the molybdenum center of xanthine oxidase." Biochim. Biophys. Acta **1185**: 284-294.
- Lowe, D. J., R. L. Richards, et al. (1997). "Role of Mo-C bonds in xanthine oxidase action." Biochem. Soc. Trans. **25**(3): 774-8.
- Luscombe, N. M., R. A. Laskowski, et al. (1998). "New Tools and Resources for Analysing Protein Structures and Their Interaction." Acta Cryst. D **54**: 1132-1138.
- Massa, W. (1996). Kristallstrukturbestimmung. Stuttgart, Germany, Teubner.
- Mattevi, A., M. W. Fraaije, et al. (1997). "Crystal structures and inhibitor binding in the octameric flavoenzyme vanillyl-alcohol oxidase: the shape of the active-site cavity controls substrate specificity." Structure **5**(7): 907-20.
- Matthews, B. W. (1968). "Solvent content of protein crystals." J. Mol. Biol. **33**: 491-497.
- McAlpine, A. S., A. G. McEwan, et al. (1997). "Molybdenum active centre of DMSO reductase from Rhodobacter capsulatus: crystal structure of the oxidised enzyme at 1.82 Angs. resolution and the dithionite-reduced enzyme at 2.8 Angs. resolution." J. Biol. Inorg. Chem. **2**: 690-701.
- McRee, D. E. (1993). Practical Protein Crystallography. New York, Academic Press.
- Merritt, E. A. (1999). "Expanding the model: anisotropic displacement parameters in protein structure refinement." Acta Cryst. D **55**: 1109-1117.
- Messerschmidt, A. (1998). Copper Metalloenzymes. Comprehensive Biological Catalysis. New York, Academic Press.

- Meyer, O. (1982). "Chemical and spectral properties of carbon monoxide: methylene blue oxidoreductase. The molybdenum-containing iron-sulfur flavoprotein from *Pseudomonas carboxydovorans*." J. Biol. Chem. **257**(3): 1333-41.
- Meyer, O., K. Frunzke, et al. (1989). "Utilization of Carbon Monoxide By Aerobes Recent Advances." 6th International Symposium On Microbial Growth On C1 Compounds, Goettingen, West Germany, August **87**(3-4): 253-260.
- Meyer, O., K. Frunzke, et al. (1993). Biochemistry of the Aerobic Utilization of Carbon Monoxide. Microbial Growth on C1 Compounds. J. C. Murrell und D. P. Kelly. Andover, Intercept: 433-459.
- Meyer, O. und K. V. Rajagopalan (1984). "Selenite binding to carbon monoxide oxidase from *Pseudomonas carboxydovorans*. Selenium binds covalently to the protein and activates specifically the CO-methylene blue reaction." J. Biol. Chem. **259**(9): 5612-7.
- Meyer, O. und H. G. Schlegel (1978). "Reisolation of the carbon monoxide utilizing hydrogen bacterium *Pseudomonas carboxydovorans* (Kistner) comb. nov." Arch. Microbiol. **118**(1): 35-43.
- Meyer, O. und H. G. Schlegel (1979). "Oxidation of carbon monoxide in cell extracts of *Pseudomonas carboxydovorans*." J. Bacteriol. **137**(2): 811-7.
- Meyer, O. und H. G. Schlegel (1983). "Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria." Ann. Rev. Microbiol. **37**: 277-310.
- Mitchell, E. P. und E. F. Garman (1994). "Flash freezing of protein crystals: investigation of mosaic spread and diffraction limit with variation of cryoprotectant solution." J. Appl. Cryst. **27**: 1070-1074.
- Moersdorf, G., K. Frunzke, et al. (1992). "Microbial growth on carbon monoxide." Biodegradation **3**(1): 61-82.
- Moxley, J. M. und K. A. Smith (1998). "Factors Affecting Utilisation of Atmospheric Co By Soils." Soil Biology & Biochemistry **30**(1): 65-79.
- Munakata, M. und S. Kitagawa (1982). The Chemistry of Copper(I) Complexes in Solution. Copper Coordination Chemistry: Biochemical und Inorganic Perspectives. K. D. Karlin und J. Zubieta. New York, Adenine Press : 473-495.
- Murshudov, G. N., A. Lebedev, et al. (1999). "Efficient anisotropic refinement of Macromolecular structures using FFT." Acta Cryst. D **55**: 247-255.
- Murzin, A. G., S. E. Brenner, et al. (1995). "SCOP: a structural classification of protein database for the investigation of sequences und structures." J. Mol. Biol. **247**: 536-540.
- Navaza, J. (1994). "AMoRe: an Automated Package for Molecular Replacement." Acta Crystallographica A **50**: 157-163.
- Nave, C. (1995). "Radiation Damage in Protein Crystallography." Radiation Physics & Chemistry. **45**(3): 483-490.

- Nishino, T. und T. Nishino (1987). "Evidence for the Existence of a Tyrosyl Residue in Nicotinamide Adenine Dinucleotide Binding Site of Chicken Liver Xanthine Dehydrogenase." Biochem. **26**: 3068-3072.
- Nishino, T., L. M. Schopfer, et al. (1989). "Reactivity of chicken liver xanthine dehydrogenase containing modified flavins." J. Biol. Chem. **264**(11): 6075-85.
- Noodleman, L., J. Norman, J.G., et al. (1985). "Models for Ferredoxins: Electronic Structures of Iron-Sulfur Clusters with One, Two, and Four Iron Atoms." J. Am. Chem. Soc. **107**: 3418-3426.
- O'Dell Boyd, L. (1997). "The concept of trace element antagonism: The Cu-Mo-S triangle (Dick, 1952-1954)." Journal of Nutrition **127**(5 SUPPL): 1045S-1047S.
- Oh, B. Y. (1995). "A Probe Molecule Composed of Seventeen Percent of Total Diffractin Matter Gives Correct Solutions in Molecular Replacement." Acta Cryst. D **51**: 140-144.
- Otwinowski, Z. und W. Minor (1996). "Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode." Methods in Enzymology **276**: 307-326.
- Pasquali, M. und C. Floriani (1983). Copper(I)-Carbon Monoxide Chemistry: Recent Advance and Perspectives. Copper Coordination Chemistry: Biochemical und Inorganic Perspectives. K. D. Karlin und J. Zubieta. Guilderland, Adenine Press : 311-330.
- Peters, J. W. (1999). "Structure and mechanism of iron-only hydrogenases." Curr. Op. in Struct. Biol. **9**: 670-676.
- Peters, J. W., W. N. Lanzilotta, et al. (1998). "X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from Clostridium pasteurianum to 1.8 angstrom resolution [published errata appear in Science 1999 Jan 1;283(5398):35 and 1999 Mar 26;283(5410):2102]." Science **282**(5395): 1853-8.
- Ragsdale, S. W. and M. Kumar (1996). "Nickel-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthase." Chem. Rev **96**: 2515-2539.
- Rappe, A. K. und W. A. Goddard III (1980). "Bivalent spectator oxo bonds on metathesis and epoxidation alkenes." Nature **285**: 311-312.
- Rebelo, J., S. Maciera, et al. (2000). "Gene Sequence and Crystal Structure of the Aldehyde Oxidoreductase from Desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774." J. Mol. Biol. **297**: 135-146.
- Ribbe, M., D. Gadkari, et al. (1997). "N₂ fixation by Streptomyces thermoautotrophicus involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO-Dehydrogenase." J. Biol. Chem. **272**(42): 26627-33.
- Rodgers, D. W. (1994). "Cryocrystallography." Structure **15**: 1135-1140.
- Rohde, M., F. Mayer, et al. (1984). "Immunocytochemical localization of carbon monoxide oxidase in Pseudomonas carboxydovorans. The enzyme is attached to the inner aspect of the cytoplasmic membrane." J. Biol. Chem. **259**(23): 14788-92.
- Romao, M. J., M. Archer, et al. (1995). "Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido-reductase from D. gigas." Science **270**(5239): 1170-6.

- Romao, M. J., B. A. Barata, et al. (1993). "Subunit composition, crystallization and preliminary crystallographic studies of the *Desulfovibrio gigas* aldehyde oxidoreductase containing molybdenum and [2Fe-2S] centers." E. J. Biochem. **215**(3): 729-32.
- Romao, M. J., N. Rösch, et al. (1997). "The molybdenum site in the xanthine oxidase-related aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas* and a catalytic mechanism for this class of enzymes." J. Biol. Inorg. Chem. **2**: 782-785.
- Rossmann, M. G. (1995). "Ab initio phase determination and phase extension using non-crystallographic symmetry." Curr. Op. Struct. Biol. **5**: 650-655.
- Rossmann, M. G. und C. G. van Beek (1999). "Data processing." Acta Cryst. D **55**: 1631-1640.
- Samygina, V. R., S. V. Antonyuk, et al. (2000). "Improving the X-ray resolution by reversible flash-colling with concentration screening, as exemplified with PPase." Acta Cryst. D **56**: 595-603.
- Sanhueza, E., Y. Dong, et al. (1998). "Carbon Monoxide Uptake By Temperate Forest Soils - the Effects of Leaves and Humus Layers." Tellus Series B-Chemical & Physical Meteorology **50**(1): 51-58.
- Santiago, B. und O. Meyer (1997). "Purification and molecular characterization of the H₂ uptake membrane-bound NiFe-hydrogenase from the carboxidotrophic bacterium *Oligotropha carboxidovorans*." J. Bact. **179**(19): 6053-60.
- Santiago, B., U. Schubel, et al. (1999). "Sequence analysis, characterization and CO-specific transcription of the *cox* gene cluster on the megaplasmid pHCG3 of *Oligotropha carboxidovorans*." Gene **236**(1): 115-24.
- Schindelin, H., C. Kisker, et al. (1996). "Crystal structure of DMSO reductase: redox-linked changes in molybdopterin coordination [see comments]." Science **272**(5268): 1615-21.
- Schindelin, H., C. Kisker, et al. (1997). "The molybdenum-cofactor: a crystallographic perspective." J. Biol. Inorg. Chem **2**: 773-781.
- Schindelin, H., C. Kisker, et al. (1997). "Structure of ADP x AIF₄(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction." Nature **387**(6631): 370-6.
- Schneider, F., J. Löwe, et al. (1996). "Crystal Structure of Dimethyl Sulfoxide Reductase from *Rhodobacter capsulatus* at 1.88 Angs. Resolution." J. Mol. Biol. **263**: 53-69.
- Schröder, T., A. Rienhöfer, et al. (1999). "Selenium-containing xanthine dehydrogenase from *Eubacterium barkeri*." Eur. J. Biochem **264**: 862-871.
- Schübel, U., M. Kraut, et al. (1995). "Molecular characterization of the gene cluster *coxMSL* encoding the molybdenum-containing carbon monoxide dehydrogenase of *Oligotropha carboxidovorans*." J. Bact. **177**(8): 2197-203.
- Schulz, G.E. (1992). "Binding of nucleotides by proteins." Curr. Op. Struct. Biol. **2**: 61-67.

- Self, W. T. und T. C. Stadtman (2000). "Selenium-dependent metabolism of purines: A selenium-dependent purine hydroxylase and xanthine dehydrogenase were purified from *Clostridium purinolyticum* und characterized." Proc. Nat. Acad. Soc. **97**: 7208-7213.
- Sheldrick, G. M. und T. R. Schneider (1997). "SHELXL: high resolution refinement." Methods in Enzymology **277**: 319-343.
- Sliwkowski, M. X. und T. C. Stadtman (1985). "Incorporation and distribution of selenium into thiolase from *Clostridium kluyveri*." J. Biol. Chem. **260**(5): 3140-4.
- Smith, J. L. (1997). Multiwavelength Anomalous Diffraction in Macromolecular Crystallography. CCP4 Proceedings.
- Stephens, P. J., D. R. Jollie, et al. (1996). "Protein Control of Redox Potentials of Iron-Sulfur Proteins." Chem. Rev. **96**: 2491-2513.
- Sticht, H. und P. Roesch (1998). "The structure of iron-sulfur proteins." Progress in Biophysics&Molecular Biology **70**: 95-136.
- Stiefel, E. I. (1997). "Chemical keys to molybdenum enzymes." J.Chem.Soc.,Dalton Trans.: 3915-3923.
- Stout, G. H. und L. H. Jensen (1989). X-ray structure determination. New York, USA, John Wiley & Sons.
- Tong, L. und M. G. Rossman (1990). "The locked rotation function." Acta Cryst. A **46**: 783-792.
- Tsukihara, T., H. Aoyama, et al. (1996). "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å [see comments]." Science **272**(5265): 1136-44.
- Turk, D. (1992). Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen. München, TU München.
- Turkenberg, J. P. und E. J. Dodson (1996). "Modern developments in molecular replacement." Curr. Op. Struct. Biol **6**: 604-610.
- Volbeda, A., M. H. Charon, et al. (1995). "Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* [see comments]." Nature **373**(6515): 580-7.
- Young, C. G. (1997). "Models For the Molybdenum Hydroxylases." J. Biol. Inorg. Chem. **2**(6): 810-816.
- Young, C. G. und A. G. Wedd (1993). Models of Pterin-Containing Molybdenum Enzymes. Molybdenum Enzymes, Cofactors, und Model Systems, Amer. Chem. Soc.
- Zuberbühler, A. D. (1983). Copper(I), Dioxygen, and Catalysis. Copper Coordination Chemistry: Biochemical und Inorganic Perspectives. K. D. Karlin und J. Zubieta. New York, Adenine Press : 237-258.

Anhang

A. Kristallographische Datentabelle

Data set	Total / unique refl.	R _s	Resolu- tion Å	Comple- teness %	(I) / (σI), last shell	Model R-factor %	Last shell	Resolution Å	rmsd bond, Å	rmsd angle, degree
Ox-short	941.420/387. 014	0.046	1.49	95.9	25.1-3.5	13.5 / 16.9	13.3 / 19.8	18.1-1.48		
Ox-long	2.071.856/76 7.934	0.061	1.17	95.3	24.3-3.2	13.7 / 16.2	18 / 23	19.8-1.17		
Di- thio	2.011.470/63 2.876	0.066	1.28	98.9	22.5-1.9	14.8 / 18.0	19 / 24	17.0-1.28		
NBIC	3.044.532/93 1.603	0.081	1.09	94.5	19.1-2.0					
CO-red	2.234.419/70 7.024	0.073	1.21	94.1	25.2-1.9					
MAD,1 (0.9761 Å)	490.440/144. 247	0.034	2.2	92.6	14.9-2.8	18.8 / 23.1		25-2.2	0.0086	1.68
MAD,2 (1.7316 Å)	369.914/97.3 46	0.053	2.5	89.2	18.9-5.7					
M ₀ ^{plus} HP- CODH	433.970/162. 740	0.083	2.25	94.0	7.7-2.0	20.9 / 23.7	32.3 / 34.1	20-2.25	0.0073	1.72
M ₀ ^{minus} HP- CODH	570.740/138. 188	0.136	2.35	91.1	4.7-2.1	20.8 / 24.5	33.0 / 32.2	20-2.35	0.0063	1.63
CN (1)	430.811/105. 076	0.119	2.36	92.5	5.6-1.6	17.0 / 20.5		38-2.36	0.0059	1.56
CN (2)	2.299.197/74 4.094	0.077	1.19	95.6	20.8-2.1					

B. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Molybdoenzyme.

Abbildung 2: Die drei Hauptfamilien der einkemigen Molybdoproteine (n. (Hille 1996)).

Abbildung 3: Struktur des Mo-gebundenen Molybdopterin-Kofaktors.

Abbildung 4: Klassische Kupferzentren (nach (Kaim und Schwederski 1995)).

Abbildung 5: [2Fe-2S]-Zentrum.

Abbildung 6: Der Eisen-Molybdän-Kofaktor der Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii* (Kim, Woo et al. 1993).

Abbildung 7: Die aktiven Zentren der bekannten metallhaltigen Hydrogenasen (nach (Peters 1999)).

Abbildung 8: Verlauf der Kristalltransformation.

Abbildung 9: Absaug- und Messeinrichtung.

Abbildung 10: Plot der Selbstrotationsfunktion von *O. carboxidovorans* CO-Dehydrogenase.

Abbildung 11: Suchmodell für die Pattersonsuche.

Abbildung 12: Verwendung und Verbesserung der erhaltenen Phasensätze widergespiegelt an berechneten Fouriersynthesen in der Umgebung des FMN-Anteils des FAD.

Abbildung 13: Die Molybdän-Lage der L-Untereinheit.

Abbildung 14: Berechnete K-Absorptionskanten und f^o-Werte für die anomalen Streuer der CO-Dehydrogenase (Mo, Fe, Se, Cu).

Abbildung 15: Fluoreszenz-Scan (0.8-4.0 Å) an einem gefrorenen CO-Dehydrogenase Kristall.

Abbildung 16: Anomale Differenz-Fouriersynthesen am aktiven Zentrum (Cu-Kante).

Abbildung 17: Anomale Differenz-Fouriersynthesen am aktiven Zentrum (Se-Kante).

Abbildung 18: Bänderdarstellung des CO-Dehydrogenase Dimers.

Abbildung 19: Aufbau des CO-Dehydrogenase-Monomers.

Abbildung 20: Bänderdarstellung des Eisen-Schwefel-Proteins der CO-Dehydrogenase, die S-Untereinheit.

Abbildung 21: Topologiediagramm der S-Untereinheit.

Abbildung 22: Bänderdarstellung des Molybdoproteins (L-Untereinheit).

Abbildung 23: Interaktionen des MCD-Kofaktors mit der L- und S-Untereinheit.

Abbildung 24: Topologiediagramm der L-Untereinheit.

Abbildung 25: Die Struktur der M-Untereinheit.

Abbildung 26: Sequenzvergleich der Mo-Hydroxylase-Flavoproteine.

- Abbildung 27: Topologiediagramm der M-Untereinheit.
- Abbildung 28: Der zweikernige [CuMo]-Cluster, das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenasen.
- Abbildung 29: Bänderdarstellung der Faltung der L-Untereinheit der CO-Dehydrogenase von *H. pseudoflava*.
- Abbildung 30: Überlagerung der aktiven Zentren von Mo^{plus} (grün) und Mo^{minus} (rot) *H. pseudoflava* CO-Dehydrogenase.
- Abbildung 31: Oberflächendarstellung des Hohlraums um den MCD-Kofaktor.
- Abbildung 32: Stereodarstellung des [CuMo]-Zentrums in der oxidierten Form.
- Abbildung 33: Darstellung des oxidierten aktiven Zentrums.
- Abbildung 34: Stereodarstellung des [CuMo]-Zentrums nach der Bindung von nBIC.
- Abbildung 35: Darstellung des aktiven Zentrums, nach Bindung von nBIC.
- Abbildung 36: Das aktive Zentrum nach Reduktion mit CO, H₂ oder Dithionit.
- Abbildung 37: Stereodarstellung des aktiven Zentrums nach Inaktivierung mit CN⁻.
- Abbildung 38: Das aktive Zentrum der CN⁻ inaktivierten CO-Dehydrogenase.
- Abbildung 39: Nicht-planarer und planarer [Fe₂S₂]²⁺-Core der beiden ESR-spektroskopischen Arten von [2Fe-2S]-Zentren in CO-Dehydrogenase.
- Abbildung 40: Vergleich der Distanzen des oxidierten und reduzierten Typ-I und Typ-II [2Fe-2S]-Cluster.
- Abbildung 41: Oxidiertes und reduziertes Flavin.
- Abbildung 42: Stabilisierung der anionischen Form des Isoalloxazinringes (N1-C2=O2 Gruppierung) durch die positive Teilladung des N-Terminus einer Helix.
- Abbildung 43: Oxidierter/Reduzierter Isoalloxazinring in *O. carboxidovorans* (links) und *H. pseudoflava* (rechts) CO-Dehydrogenase M-Untereinheit.
- Abbildung 44: Anzahl der atomar aufgelösten Strukturen in der PDB (Stand: 8. September 2000).
- Abbildung 45: Fourierreihenabbruch Effekte in der Nähe des Mo-Ions.
- Abbildung 46: Einfluß der Auflösung der Daten auf eine 2Fo-Fc Fouriersynthese.
- Abbildung 47: Vergleich des CO-Dehydrogenase Monomers mit der monomeren Mop-Struktur von *D. gigas*.
- Abbildung 48: Der verbindende Loop in Mop.
- Abbildung 49: Vergleich der Dimerstrukturen von Mop und CO-Dehydrogenase.
- Abbildung 50: Überlagerung der S- und L-Untereinheit mit den korrespondierenden Bereichen von Mop (Romas, Archer et al. 1995).
- Abbildung 51: Vergleich der aktiven Zentren von Mop (links) und CO-Dehydrogenase (rechts).
- Abbildung 52: Vergleich der homolog strukturierten Flavoproteine der Vanillyl-Alkohol-Oxidase-Familie (VAO und MurB) und der M-Untereinheit der CO-Dehydrogenase.
- Abbildung 53: Lokalisierung der NAD⁺-Bindestelle in Xanthin-Dehydrogenasen.
- Abbildung 54: Verzerrt tetraedrische Geometrie der Mo-Liganden in der Molybdän-Hydroxylase-Familie.
- Abbildung 55: Ligandengeometrie der Sulfit Oxidase (Kisker, Schindelin et al. 1997).
- Abbildung 56: Koordinationsgeometrie in der DMSO-Reduktase Familie.
- Abbildung 57: Katalytischer Zyklus der CO Oxidation.
- Abbildung 58: Hypothetischer Reaktionsmechanismus für die Oxidation von CO.
- Abbildung 59: Hypothetischer Reaktionsmechanismus für die heterolytische H₂-Spaltung und -Oxidation.