

Max Planck Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

**Isolierung, Klonierung, Expression, Reinigung und
Kristallisation eukaryotischer
4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenasen -**

**Röntgenstrukturanalyse von Inhibitorkomplexen der
löslichen anorganischen Pyrophosphatase aus
*Saccharomyces cerevisiae***

Lars Linden

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ. Prof. Dr. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c Robert Huber
2. Univ. Prof. Dr. Dr. Adalbert Bacher

Die Dissertation wurde am 18.01.00 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Chemie am 10.03.00 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 1995 bis Oktober 1997 in der Abteilung Molekulare Wirkstoffforschung im Pflanzenschutzzentrum Monheim der Bayer AG, sowie von November 1997 bis Dezember 1999 in der Abteilung Strukturforschung am Max Planck Institut für Biochemie unter der Anleitung von Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich für die Überlassung des Themas, sein fortwährendes und reges Interesse am Fortgang der Projekte und seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit danken. Sein Wohlwollen und die ständige Förderung waren große Hilfen und schafften eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Frau Dr. Barbara Bieseler und Herrn Dr. Carl Fedtke danke ich für die Betreuung während meiner Zeit in Monheim, für die Bereitstellung von gleich zwei Arbeitsplätzen, und für konstruktive Diskussionen.

Herrn Dr. Günter Auerbach, Herrn Dr. Oliver Boscheinen, Herrn Marco Busch und Herrn Dr. Christoph Haussmann danke ich für die exzellente wissenschaftliche Kooperation mit der Bayer AG, für eine wirklich nette Atmosphäre und natürlich für mehrere hundert Milligramm Protein.

Hans Jürgen Steckel und Josef Hens danke ich für ihre Unterstützung im Labor ihre Hilfsbereitschaft und für wertvolle Tips und Anregungen.

Anke Koopmann, Christian Krebs, Birgit Tiemann, Edith Oehmen und all den Anderen in Monheim danke ich für die angenehme Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Stefan Steinbacher, Herrn Dr. Hans Georg Beisel und Herrn Oliver Einsle danke ich für die Einführung in die Benutzung kristallographischer Programme.

Frau Renate Rüller und Frau Gina Beckmann danke ich für die vielen kleinen und auch größeren Hilfen im Sekretariat. Herrn Werner Dersch danke ich für zahllose Filamente und andere technische Unterstützung

Eva Estebanez und Marta Garrido danke ich für die gute Nachbarschaft im Schreibzimmer und dafür, daß mir einiges spanisch – Verzeihung: natürlich katalanisch - vorkam.

Sandra de Macedo Ribeiro und Pedro José Barbosa Pereira danke ich für viele kleine Tips und Hilfen und die portugiesische Sichtweise des Lebens.

Allen Mitgliedern der Abteilung Strukturforschung, insbesondere Holger Dobbek, Dr. Markus Deibert, Oliver Einsle, Stefan Gerhardt, Rupert Lang, Michael Lt. Worbs, Dr. Stefan Strobl, Clemens Steegborn und den Kollegen im Labor K328/329 danke ich für die gute Atmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft.

Bettina Riebel danke ich dafür, daß sie trotz allem immer noch zu mir steht.

Mein besonderer Dank gebührt Kirsten Majert, für ihren Rückhalt, ihre Geduld und ihre moralische Unterstützung

Meinen Eltern danke ich dafür, daß sie mir diese Ausbildung ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1.1 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase	1
1.2 Lösliche anorganische Pyrophosphatase	2
Einleitung	4
2.1 Dioxygenasen	4
2.2 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (4-HPPD)	5
2.2.1 4-HPPD in tierischen Organismen, Pilzen und Bakterien	5
2.2.2 4-HPPD in Pflanzen	6
2.2.3 Klassifizierung von 4-HPPD	7
2.2.4 Kristallstruktur von <i>Pseudomonas</i> 4-HPPD	10
2.2.5 Inhibitoren von 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase	10
2.3 Anorganische Pyrophosphatase (PPase)	11
2.3.1 Physiologie der löslichen anorganische Pyrophosphatase aus <i>S. cerevisiae</i>	13
2.3.2 Inhibitoren von löslichen anorganischen Pyrophosphatasen	13
2.3.3 Bekannte Gene und Primärstruktur	14
2.3.4. Struktur des Pyrophosphatase Monomers und des aktiven Zentrums	15
2.3.5 Oligomere Organisation	17
2.3.6 Reaktionsmechanismus	17
2.4 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	18
2.4.1 Überblick	18
2.4.2 Proteinkristalle	19
2.4.3 Beugung von Röntgenstrahlung an Kristallen	20
2.4.4 Berechnung der Elektronendichte	24
2.4.5 Lösung des Phasenproblems	24
2.4.6 Molekularer Ersatz	25
Zielsetzung	26
Material und Methoden	27
3.0 Geräte und Chemikalien	27
3.1 Anzucht , Ernte und Lagerung des Pflanzenmaterials	27
3.2 Zellaufschluß und Gewinnung des Zellrohextraktes	27
3.3 Reinigung und Charakterisierung von Proteinen	28
3.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford	28
3.3.2 Aktivitätstest 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase	28
3.3.2.1 Radioaktiver Test	28
3.3.2.2 Photometrischer Test	30
3.3.3 Einengen und Umpuffern von Proteinlösungen	30
3.3.3.1 Ultrafiltration	30
3.3.3.2 Entsalzen von Proteinlösungen über Gelfiltration	31
3.3.3.3 Ammoniumsulfatfällung	31
3.3.4 Elektrophoretische Methoden	31
3.3.4.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	31
3.3.4.2 Färbungen	32
3.3.4.3 Elektroblothing	33
3.3.4.4 Isoelektrische Fokussierung	34
3.3.5 Reinigung 4-HPPD aus etiolierten Maiskeimlingen	34
3.3.5.1 Herstellung des Mais Rohextraktes	34
3.3.5.2 Reinigung von Mais-4-HPPD über Hydrophobe Interaktionschromatographie ..	35
3.3.5.3 Reinigung von Mais 4-HPPD über Anionenaustauschchromatographie	35
3.3.5.4 Reinigung der Mais 4-HPPD über Hydroxylapatitchromatographie	36
3.3.5.5 Molekulargewichtsbestimmung über Gelfiltrationschromatographie	36
3.3.5.6 Molekulargewichtsbestimmung über Dynamic Light Scattering (DLS)	37
3.3.7 Chromatofokussierung über Mono P	37
3.3.8 Proteolytische Spaltung von Proteinen	38
3.3.9 N-terminale Sequenzanalyse von Proteinen und Peptiden	38

3.4 Molekularbiologische Methoden	39
3.4.1 Arbeiten mit Bakterien	39
3.4.1.1 Verwendete Bakterienstämme	39
3.4.1.2 Verwendete Plasmide	40
3.4.1.3 Oligonucleotide für die PCR	40
3.4.1.4 Vermehrung von Bakterien.....	41
3.4.1.4.1 Flüssigkulturen	41
3.4.1.4.2 Fermentation von <i>E.coli</i>	42
3.4.1.4.3 Plattenkulturen	42
3.4.1.4.4 Konservierung von Bakterien.....	43
3.4.1.5 Herstellung transformationskompetenter Zellen	43
3.4.1.6 Transformation von Bakterien mit Fremd-DNA.....	43
3.4.2 Arbeiten mit Phagen	44
3.4.2.1 Anzucht der Bakterien zur Infektion mit Phagen.....	44
3.4.2.2 Herstellung eines Phagenlysates	44
3.4.2.3 Isolation von Phagen DNA	45
3.4.3 Arbeiten mit RNA	46
3.4.3.1 Isolierung von RNA aus pflanzlichen Geweben.....	46
3.4.3.2 RT-PCR	46
3.4.3.2.1 Synthese von Erststrang cDNA mit reverser Transkriptase	46
3.4.3.2.2 PCR zur Amplifikation einer spezifischen cDNA	47
3.4.4 Arbeiten mit DNA.....	47
3.4.4.1 Agarosegelelektrophorese	47
3.4.4.2 DNA-Sequenzierung („Cycle Sequencing“)	48
3.4.4.3 Vermehrung und Präparation von DNA-Fragmenten.....	49
3.4.4.3.1 Schnellisolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	49
3.4.4.3.2 Midipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	49
3.4.4.4 Reinigung und Konzentrierung von DNA.....	50
3.4.4.4.1 Ethanolfällung	50
3.4.4.4.2-Propanolfällung	50
3.4.4.4.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	50
3.4.5 Enzymatische Reaktionen an DNA	51
3.4.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	51
3.4.5.2 Spaltung der DNA durch Restriktionsendonucleasen	51
3.4.5.3 Behandlung mit alkalischer Phosphatase.....	52
3.4.5.3 Ligation von DNA Fragmenten	52
3.4.6 Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E.coli</i>	52
3.4.6.1 Zellaufschluß von <i>E.coli</i> durch Ultraschall	53
3.4.6.2 Reinigung von rekombinanter 4-HPPD über Metallchelate-chromatographie	53
3.4.6.3 Abspaltung des N-terminalen HisTag	53
3.4.6.4 Reinigung von rekombinanter ara 4-HPPD durch Ionenaustauschchromatographie.....	54
3.5 Kristallographische Methoden	54
3.5.1 Kristallisation von rekombinanter ara 4-HPPD	54
3.5.2 Datensammlung und Datenauswertung	55
3.6 Kristallisation von rekombinanter anorganischer Pyrophosphatase aus <i>S. cerevisiae</i>	55
3.6.1 Strukturlösung Modellbau und Verfeinerung	55
Ergebnisse	57
4.1 4-HPPD aus <i>Zea mays</i>	57
4.1.2 Vorversuche zur Wahl des Ausgangsmaterials.....	57
4.1.3 Einleitende Charakterisierung der Mais 4-HPPD.....	58
4.1.3.1 Bestimmung der pH Stabilität:	58
4.1.3.2 Effekt verschiedener zweiwertiger Ionen auf die Enzymaktivität.....	59
4.1.3.3 Inhibition und Stabilisierung von Mais 4-HPPD durch Sulcotrion	60
4.1.4 Reinigung von 4-HPPD aus Mais.....	61
4.1.4.1 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	61

4.1.4.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	62
4.1.4.3 DEAE-Sepharose FF	63
4.1.4.4 Mono Q	63
4.1.4.5 Hydroxylapatit	64
4.1.4.6 Bestimmung des apparenten Molekulargewichts über Gelfiltrationschromatographie.....	66
4.1.4.7 Bestimmung des isoelektrischen Punktes über Chromatofokussierung.....	66
4.1.4.8 Trypsinverdau und Mikrosequenzierung verschiedener Peptide.....	66
4.1.4.9 Vergleich mit bekannten Sequenzen.....	67
4.1.5 Isolation und Klonierung der cDNA	68
4.1.6 Heterologe Überexpression der Mais 4-HPPD in <i>E.coli</i>	70
4.1.7 Reinigung des rekombinanten Proteins	70
4.2 4-HPPD aus <i>Oryza sativa var. indica</i>	70
4.2.1 Isolation und Klonierung der cDNA	70
4.2.2 Heterologe Überexpression der Reis 4-HPPD in <i>E.coli</i>	71
4.2.3 Reinigung des rekombinanten Proteins	71
4.3 4-HPPD aus <i>Mus musculus</i>	73
4.3.1 Isolation und Klonierung der cDNA	73
4.3.2 Heterologe Überexpression von Maus 4-HPPD in <i>E.coli</i>	75
4.3.3 Reinigung des rekombinanten Proteins	75
4.4 Isolation und Klonierung der 4-HPPD aus Mensch.....	76
4.4.1 Überexpression und Reinigung der Mensch 4-HPPD	77
4.5 4-HPPD aus <i>Arabidopsis thaliana</i> (ara 4-HPPD)	79
4.5.1 Isolation und Klonierung des Gens	79
4.5.2 Heterologe Überexpression der ara 4-HPPD in <i>E.coli</i>	79
4.5.3 Reinigung des rekombinanten Proteins	79
4.5.4 Stabilisierung von ara 4-HPPD durch Zugabe von Eisen ^(III) salzen	81
4.5.5 Herstellung N-terminaler Deletionsmutanten.....	82
4.5.6 Kristallisation	83
4.5.7 Datensammlung	83
4.6 Anorganische Pyrophosphatase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86
4.6.1 Kristallisation	86
4.6.2 Cokristallisation mit Inhibitoren	86
4.6.3 Datensammlung und Auswertung.....	87
4.6.4 Strukturlösung der Inhibitor Komplexe.....	88
4.6.5 Architektur des aktiven Zentrums.....	89
Diskussion	94
5.1 4-HPPD aus etiolierten Maiskeimlingen.....	94
5.1.1 Einleitende Biochemische Charakterisierung.....	94
5.1.2 Reinigung der Mais 4-HPPD	95
5.2 Rekombinante 4-HPPD cDNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , Mais und Reis	96
5.2.1 Isolation der cDNA und Klonierung	97
5.2.3 Expression und Reinigung	97
5.2.4 Sequenzvergleich der bekannten pflanzlichen 4-HPPDs	98
5.3 Rekombinante 4-HPPD aus Maus und Mensch.....	101
5.3.1 Isolierung und Klonierung sowie Expression und Reinigung von 4-HPPD aus Maus und Mensch	101
5.4 Kristallisation von 4-HPPD aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	101
5.5 Anorganische Pyrophosphatase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	102
5.5.1 Kristallisation des Enzyms	103
5.5.2 Inhibitor Komplexe mit PNP und PCP.....	103
5.5.3 Reaktionsmechanismus.....	106
Literaturverzeichnis	108
Abkürzungen	116

Zusammenfassung

1.1 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase

4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (4-HPPD) ist ein mononukleares nicht-Häm-enthaltendes Eisen(II)Enzym und gehört zur Gruppe der 2-Oxosäure abhängigen Dioxygenasen. Das Protein katalysiert die Umsetzung von 4-Hydroxyphenylpyruvat zu Homogentisinsäure und ist im Stoffwechsel der meisten Organismen am Abbau der aromatischen Aminosäure Tyrosin beteiligt. Tyrosin wird zu 4-Hydroxyphenylpyruvat desaminiert, von 4-HPPD zu Homogentisinsäure umgesetzt und diese weiter bis zu den Endprodukten Fumarat und Acetoacetat abgebaut.

In Pflanzen ist 4-HPPD ein Schlüsselenzym bei der Synthese von α -Tocopherol (Vitamin E) und Plastochinon, dem Elektronencarrier der Photosynthese. Dieses macht die 4-HPPD zu einem Zielenzym für die Entwicklung von Herbiziden. Inhibitoren des Enzyms gehören zu den 1,3 Diketonen und zu den Isoxazolen. Sie sind ebenfalls pharmazeutisch interessant und werden bei der Therapie von Tyrosinämien eingesetzt. Zur gezielten Entwicklung weiterer Inhibitoren ist die Kenntnis der räumlichen Struktur der 4-HPPD wünschenswert.

In dieser Arbeit sollten besonders die pflanzlichen 4-HPPD Enzyme näher biochemisch charakterisiert werden. Ferner sollte ausreichend rekombinantes Protein für Kristallisationsexperimente mit 4-HPPD zur Verfügung gestellt, und auch die Kristallisation versucht werden.

Hier wurde zum ersten Mal die Reinigung und einleitende biochemische Charakterisierung nativer 4-HPPD aus Maiskeimlingen beschrieben. Das Enzym wurde über 5 Chromatographieschritte um einen Faktor von 1251 angereichert. Ausgehend von 5 kg Maiskeimlingen, entsprechend 80 g Protein konnten am Ende 20 μ g 4-HPPD gewonnen werden. Nach Trypsinspaltung konnten 7 Peptide in ihrer Sequenz bestimmt werden, darunter auch der *in vivo* N-Terminus.

Diese Sequenzinformation ermöglichte erstmals die Identifizierung, Isolierung und Klonierung der Mais 4-HPPD cDNA.

Weiterhin gelang die ebenfalls bisher noch nicht beschriebene Reis 4-HPPD zu identifizieren und klonieren.

Außerdem wurde als dritte pflanzliche 4-HPPD die in ihrer Sequenz bereits bekannte cDNA des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* kloniert.

Die cDNAs für die Säuger 4-HPPDs aus Mensch und Maus wurden ebenfalls kloniert. Der Vergleich der 4-HPPDs aus Pflanzen mit den Säugerenzymen soll die Entwicklung spezifischer Inhibitoren erleichtern.

Alle fünf 4-HPPDs wurden heterolog in aktiver Form in *E.coli* überexprimiert und durch Metallchelat- und Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Die Ausbeuten an homogenem Protein mit einer Reinheit von >95 % lagen bei 50 mg/ml für die *Arabidopsis thaliana* 4-HPPD und 1-5 mg für alle anderen Organismen.

Kristallisationsexperimente wurden mit rekombinanter 4-HPPD aus *Arabidopsis thaliana*, aus Mensch und aus Maus durchgeführt. Kristalle der *Arabidopsis* 4-HPPD beugten Röntgenstrahlung bis ca. 2 Å: Die Raumgruppe wurde mit P422 und die Zellachsen als $a=b=98,5$ und $c=186,7$ bestimmt. Die Kristalle wiesen allesamt eine sehr hohe anisotrope Mosaizität entlang der Zellachse c auf. Es gelang dennoch einen auswertbaren Datensatz aufzunehmen. Nach der Aufklärung der Struktur eines verwandten Enzyms kann dieser zur Lösung der 4-HPPD Struktur über die Methode des molekularen Ersatzes verwendet werden.

1.2 Lösliche anorganische Pyrophosphatase

Lösliche anorganische Pyrophosphatase (PPase) katalysiert die Hydrolyse von Pyrophosphat zu Phosphat. Das Enzym nimmt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel aller Organismen ein. Eine große Anzahl lebenswichtiger Reaktionen, wie die Synthese von Nucleinsäuren, Proteinen, Lipiden und Polysacchariden werden durch die Hydrolyse von Nucleotidtriphosphaten zu Nucleotidmonophosphaten und PP_i vorangetrieben. Erst die Hydrolyse von PP_i zu P_i durch anorganische Pyrophosphatasen macht die Reaktionen irreversibel

Inhibitoren von löslicher anorganischer Pyrophosphatase finden als fungizide Wirkstoffe in Medizin und Pflanzenschutz Verwendung. Darüber hinaus sind sie wertvolle Therapeutika beim Kampf gegen bestimmte Krebsarten (Multiples Myelom) und gegen die Osteoporose. Eine genaue Kenntnis des Reaktionsmechanismus und der Architektur des aktiven Zentrums der PPase erleichtert die Entwicklung weiterer spezifischer Inhibitoren.

In dieser Arbeit wurde lösliche anorganische Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae* kristallisiert und die Struktur von Inhibitor-Komplexen mit den

Substratanaloga PNP (Imidodiphosphat) und PCP (Methyldiphosphonsäure) bestimmt.

Saccharomyces cerevisiae PPase kristallisiert in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ in zwei verschiedenen Kristallformen. Die Kristalle der Inhibitor Komplexe beugten die Röntgenstrahlung bis maximal 2.3 Å. Die Strukturen der Inhibitor Komplexe wurden durch molekularen Ersatz mit nativer Hefe PPase als Suchmodell gelöst.

Die Bindung der Substratanaloga löst keine nennenswerter Konformationsänderung des aktiven Zentrums aus. Die Substratanaloga werden über die vier Mg^{2+} Ionen, wie auch über Kontakte mit den basischen Aminosäuren des aktiven Zentrums gebunden. Ein Vergleich mit den Kristallstrukturen der ruhenden PPase und der PPase mit dem gebundenen Reaktionsprodukt, erlaubt die Bestätigung des postulierten S_N2 Reaktionsmechanismus. Das nukleophil am Phosphat angreifende Wassermolekül konnte ebenfalls wie auch die generelle Säure, ein anderes Wassermolekül in der Struktur identifiziert werden.

Einleitung

2.1 Dioxygenasen

Dioxygenasen katalysieren in der Natur eine Vielzahl wichtiger Reaktionen, welche die Inkorporation von aktiviertem Sauerstoff beinhalten. Im Gegensatz zu den von Monooxygenasen katalysierten Reaktionen werden hier beide Atome des Sauerstoffmoleküls auf das jeweilige Substrat übertragen.

Neben den Enzymen mit Häm als Cofaktor gibt es eine wachsende Gruppe von mononuklearen nicht-Häm-enthaltenden Eisen(II) Enzymen (Que and Ho, 1996). Diese katalysieren, wie auch die Häm-Enzyme, ein breites Spektrum unterschiedlicher, metabolisch interessanter Reaktionen.

Catechol-Dioxygenasen und Rieske-Dioxygenasen ermöglichen Mikroorganismen z.B. den Abbau von Umweltgiften durch die intradiolische bzw. extradiolische Spaltung von aromatischen Ringen (Han *et al.*, 1995). Isopenicillin-N-Synthase und Deacetoxycephalosporin-Synthase katalysieren die Synthese von Vorstufen der β -Lactam Antibiotika Penicillin und Cephalosporin bei Pilzen. In tierischen Organismen kommen vor allen den Enzymen der Gruppe der 2-Oxosäure abhängigen Dioxygenasen vielfältige metabolische Bedeutungen, wie die posttranslationale Modifikationen von Aminosäuren, z.B. von Prolin in Kollagen durch Prolyl-Hydroxylase oder in einigen Blutgerinnungsfaktoren zu. Auch beim Abbau von aromatischen Aminosäuren spielen Dioxygenasen, so z.B. 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase oder Homogentisin Dioxygenase eine große Rolle. In pflanzlichen Organismen katalysieren 2-Oxosäure abhängige Dioxygenasen wichtige Schritte der Gibberellinsynthese, sowie der Synthese von α -Tocopherolen und des Elektronencarriers der Photosynthese, Plastochinon.

Während die beiden Enzymklassen viele mechanistische Gemeinsamkeiten aufweisen, gibt es doch einige signifikante Unterschiede. Bei Häm-Enzymen ist der Eisen-Porphyrin Cofaktor kovalent an das Protein gebunden. Es bleibt nur eine Koordinationsstelle zur Bindung von O_2 frei. Als Elektronendonator für die Reaktion dient hier NADH und es wird eine Reduktase für den Transfer der Elektronen auf die Hämgruppe benötigt.

Im Gegensatz dazu wird bei den mononuklearen nicht Häm-Eisen(II) Enzymen O_2 durch eine Vielzahl verschiedener, oft metallgebundener Substrate und Cofaktoren

zur Oxidationsstufe des Peroxids reduziert. Diese mechanistische Besonderheit erfordert allerdings eine flexiblere Koordination des Eisen(II)atoms im aktiven Zentrum.

Der Vergleich der bislang bekannten Kristallstrukturen von Protocatechuat 3,4 Dioxygenase aus *Pseudomonas* (Ohlendorf *et al.*, 1988; Ohlendorf *et al.*, 1994); 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2 Dioxygenase aus *Pseudomonas* (Han *et al.*, 1995; Senda *et al.*, 1996); Isopenicillin-N-Synthase aus *Penicillium* (Roach *et al.*, 1995); 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase aus *Pseudomonas* (Serre *et al.*, 1999) und Lipoxygenase aus Soja (Boyington *et al.*, 1994) zeigt ein gemeinsames Strukturmotiv dieser Klasse von Enzymen. Das Eisen(II) im aktiven Zentrum ist durchweg über eine „katalytische Triade“ aus zwei Histidinresten und einer Carboxylgruppe koordiniert. (Hegg and Que, 1997). Dies ermöglicht die Bindung von weiteren Liganden an die drei verbleibenden Koordinationsstellen des Eisenatoms.

2.2 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (4-HPPD)

4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (4-Hydroxyphenylpyruvat:Sauerstoff Oxidoreduktase, hydroxylierend, decarboxylierend; EC 1.13.11.27) ist ein mononucleares nicht Häm-Eisen(II) Enzym. Es katalysiert die Bildung von Homogentisinsäure (2,5-Dihydroxyphenylacetat) aus 4-Hydroxyphenylpyruvat. (vgl. Abb. 1) Diese Reaktion beinhaltet zunächst eine oxidative Decarboxylierung der 2-Oxosäureseitenkette, gefolgt von der Hydroxylierung des aromatischen Rings und einer 1,2 Umlagerung der Carboxymethylgruppe (Forbes and Gordon, 1994).

2.2.1 4-HPPD in tierischen Organismen, Pilzen und Bakterien

In den meisten Organismen ist 4-HPPD am Abbau der aromatischen Aminosäure Tyrosin beteiligt. Tyrosin wird zunächst von Tyrosinaminotransferase (EC 2.6.1.5) zu 4-Hydroxyphenylpyruvat desaminiert, von 4-HPPD zu Homogentisinsäure umgesetzt und diese weiter bis zu den Endprodukten Fumarat und Acetoacetat abgebaut (vgl. Abb. 1a))(Crouch *et al.*, 1997).

Bei Säugern ist die 4-HPPD vor allem in Niere und Leber lokalisiert. Die Konzentration in der Leber ist jedoch sehr viel höher als in der Niere. Es verwundert daher nicht, daß die ersten homogenen Enzympräparationen aus Säugerlebern

gewonnen wurden (Buckthal *et al.*, 1987; Lin and Crawhall, 1976; Lindblad *et al.*, 1970).

Beim Menschen ist der autosomal rezessiv vererbte Enzymdefekt der 4-HPPD als Tyrosinämie vom Typ III bekannt. Die Krankheit ist durch eine erhöhte Tyrosinkonzentration und massive Ausscheidung von 4-Hydroxyphenylpyruvat und dessen Derivaten mit dem Urin charakterisiert. Die Patienten sind mental retardiert, aber die Leber ist nicht in Mitleidenschaft gezogen (Endo *et al.*, 1991).

2.2.2 4-HPPD in Pflanzen

In photosynthetisch aktiven Organismen ist 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase ein Schlüsselenzym in der Biosynthese von Plastochinon und α -Tocopherol (Abb. 1b+c)). Plastochinon ist der essentielle Elektronencarrier zwischen Photosystem II und dem Cytochrom b_6f Komplex und auch Elektronenquelle für NAD(P)H: Plastochinon Oxidoreduktasen (Berger *et al.*, 1993). α -Tocopherol (Vitamin E) ist bei Pflanzen, ebenso wie beim Menschen ein membranassoziierter Bestandteil des antioxidativen Systems. Es funktioniert als Radikalfänger und ist strukturelle Komponente von Membranen. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, daß das Enzym in Pflanzen ebenfalls am Abbau von Tyrosin beteiligt ist.

Die Stellung der 4-HPPD im Stoffwechsel von Pflanzen macht 4-HPPD zu einem interessanten Zielenzym für neuentwickelte Herbizide (vgl. 2.2.5). Die Inhibition von 4-HPPD führt zum Ausbleichen der Pflanzen (Chlorose) und ist letal. Das Ausbleichen der Pflanze geht einher mit einer Akkumulation von Phytoen, einem Carotinoidvorläufer. Vermutlich wird das Enzym Phytoendesaturase als Konsequenz des Fehlens von Plastochinon indirekt inhibiert (Schulz *et al.*, 1993; Norris *et al.*, 1995).

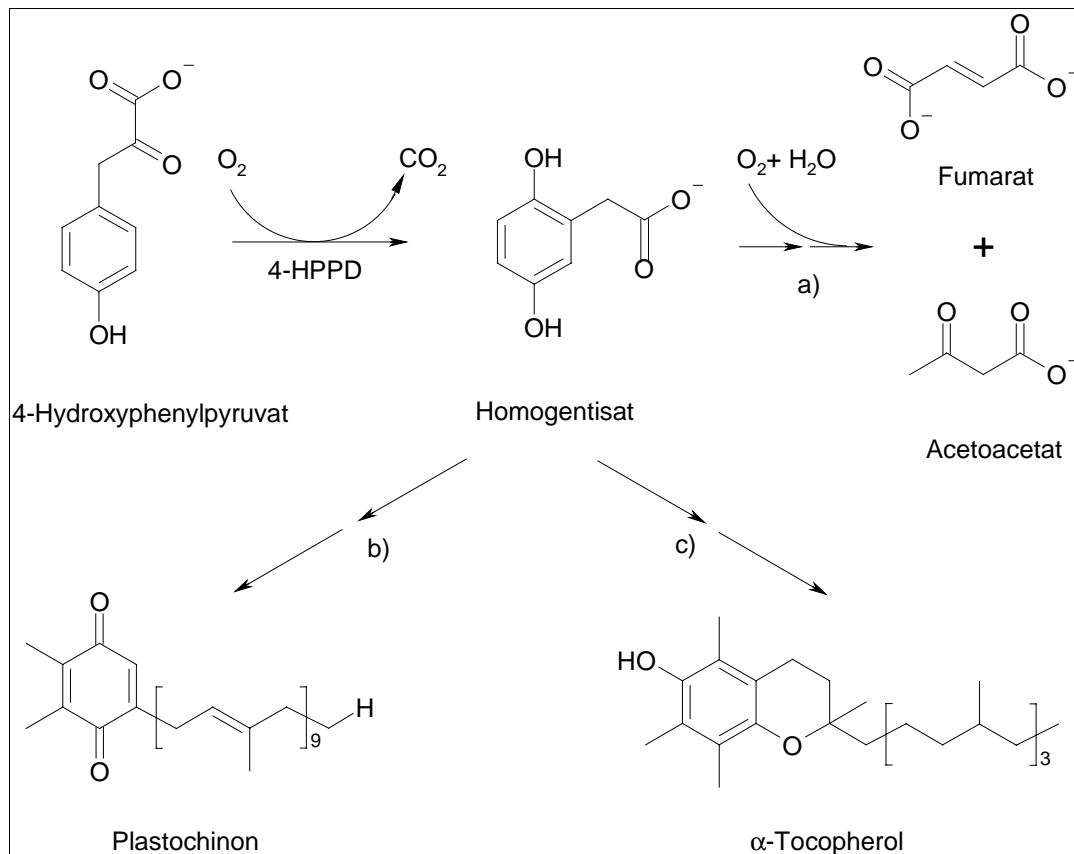


Abb. 1 4-HPPD in verschiedenen Stoffwechselwegen: a) Abbau von Tyrosin zu Fumarat und Acetoacetat; b) Biosynthese von Plastochinon (Pflanzen); c) Biosynthese von α -Tocopherol (Pflanzen).

2.2.3 Klassifizierung von 4-HPPD

Das Enzym gehört zur Gruppe der 2-Oxosäure abhängigen Dioxygenasen. Diese benötigen neben O_2 und dem jeweiligen Substrat eine 2-Oxosäure für ihre Aktivität. Außerdem ist Ascorbat als Cofaktor essentiell für die Enzymaktivität (Que and Ho, 1996). In Abwesenheit von Ascorbat wird wahrscheinlich das Fe(II) zum Fe(III) oxidiert und das jeweilige Enzym somit inaktiviert. Zur Aufrechterhaltung der vollen Enzymaktivität *in vitro* ist weiterhin die Verwendung eines Redoxsystems, wie Ascorbat:Katalase (Lindstedt and Rundgren, 1982b), oder GSH:Dichlorophenol-indophosphat notwendig (Lindblad, 1971).

Im Unterschied zu den anderen 2-Oxosäure abhängigen Enzymen ist bei 4-HPPD die 2-Oxosäure kovalenter Bestandteil des Substratmoleküls und nicht zusätzlicher Ligand.

Es sind mittlerweile einige Gensequenzen verschiedener bakterieller, tierischer und pflanzlicher 4-HPPDs bekannt und die jeweiligen Proteine zum Teil biochemisch charakterisiert (s. Tab. 1).

Organismus	SwissProt	Referenz
<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	P32754	(Ruetschi <i>et al.</i> , 1993)
<i>Mus musculus</i> (Maus)	P49429	(Endo <i>et al.</i> , 1995)
<i>Rattus norvegicus</i> (Ratte)	P32755	(Gershwin <i>et al.</i> , 1987)
<i>Sus scrofa</i> (Schwein)	Q02110	(Endo <i>et al.</i> , 1992)
<i>Coccidioides immitis</i>	Q00415	(Wyckoff <i>et al.</i> , 1995)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Q22633	(Wilkinson, 1995)
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Q27203	(Hummel <i>et al.</i> , 1992)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P93836	(Norris <i>et al.</i> , 1998)
<i>Daucus carota</i> (Möhre)	O23920	(Garcia <i>et al.</i> , 1997)
<i>Hordeum vulgare</i> (Gerste)	O48604	(Kleberjanke and Krupinska, 1997)
<i>Pseudomonas sp.</i>	P80064	(Ruetschi <i>et al.</i> , 1992)
<i>Streptomyces avermitilis</i>	Q53586	(Denoya <i>et al.</i> , 1994)
<i>Shewanella colwelliana</i>	P23996	(Fuqua <i>et al.</i> , 1991)

Tab. 1 Die bislang bekannten 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenasen.

Alle bekannten eukaryotischen 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenasen sind Homodimere. Die molekulare Masse der Monomere liegt bei 43-48 kDa. Die bisher am besten untersuchte prokaryotische 4-HPPD aus *Pseudomonas* ist im Gegensatz dazu ein Homotetramer aus Monomeren mit einer Masse von 41kDa (Ruetschi *et al.*, 1992). Alle bisher bekannten Enzyme enthalten Fe(II) im aktiven Zentrum.

Die Aminosäuresequenzen von 4-HPPD aus Pflanzen, Tieren und Prokaryoten zeigen jeweils zueinander nur geringe Homologien von 30-35 % (vgl. Abb. 2). Die konservierten Bereiche beschränken sich fast ausschließlich auf den C-terminalen Bereich der Proteine.

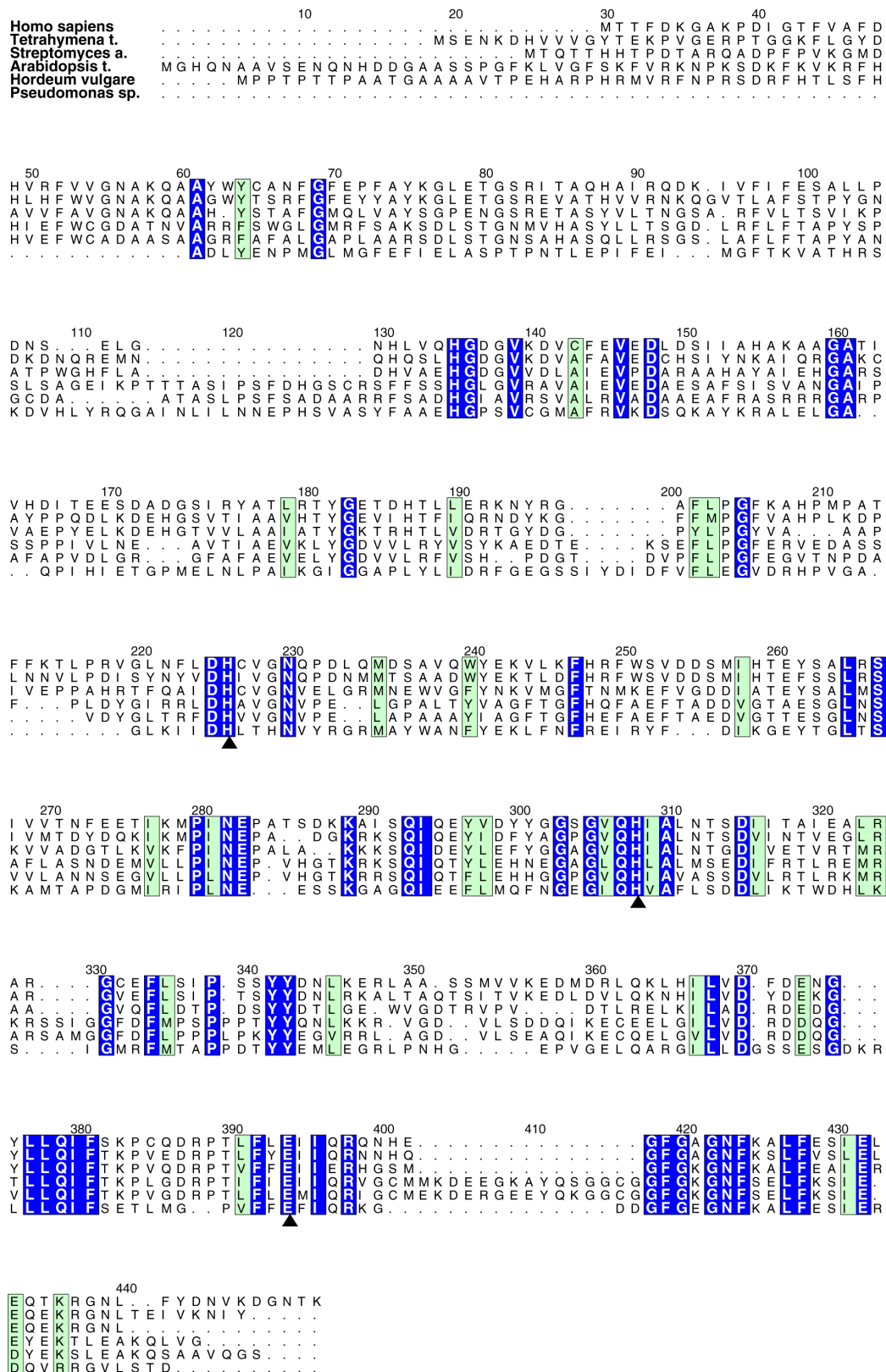


Abb. 2 Aminosäuresequenzvergleich verschiedener tierischer (Mensch, *Tetrahymena t.*), pilzlicher (*Streptomyces s.*), pflanzlicher (*Arabidopsis t.*, *Hordeum vulgare*) und bakterieller (*Pseudomonas sp.*) 4-HPPDs. Farbige unterlegte Aminosäuren sind konserviert. Die Pfeile bezeichnen die das Fe(II) bindenden Reste.

2.2.4 Kristallstruktur von *Pseudomonas* 4-HPPD

Bisher gibt es noch keine Struktur einer eukaryotischen 4-HPPD. Das tetramere Enzym aus *Pseudomonas* ist allerdings seit kurzem in seiner Struktur aufgeklärt (Serre *et al.*, 1999).

Pseudomonas 4-HPPD ist ein homotetrameres Enzym. Jedes Monomer besteht aus einer N-terminalen Domäne (AS 1-155) und einer C-terminalen Domäne (AS 156-355). Die Anordnung der Sekundärstrukturelemente beider Domänen folgt dem Muster $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ und ist in jeder Domäne zweimal wiederholt, so daß eine „Barrel“artige Struktur entsteht. Ein sehr ähnliches Faltungsmuster findet man auch in zwei weiteren nicht-Häm Fe(II) Dioxygenasen aus *Pseudomonas*, 2,3-Dihydroxybiphenyl-Dioxygenase (Senda *et al.*, 1996) und Catechol 2,3-Dioxygenase (Kita *et al.*, 1999), sowie in humaner Glyoxylase. Bei 4-HPPD aus *Pseudomonas* finden sich allerdings kurze, zusätzliche α -Helices, welche die Proteinkontakte im Tetramer vermitteln. Beide Domänen der Monomere sind bei der Tetramerisierung beteiligt. Die Sequenzhomologie von 4-HPPD zu den beiden anderen Enzymen liegt unter 15 %.

Bei verschiedenen 4-HPPDs konservierte Aminosäuren findet man vornehmlich in der C-terminalen Domäne (Abb. 2), sie zeigen fast alle in das Innere der „Barrel“ Struktur. Weitere konservierte Reste bilden die Grenzfläche von beiden Domänen zueinander. In der N-terminalen Domäne sind nur wenige Aminosäuren konserviert. Diese verbinden Sekundärstrukturelemente miteinander.

Das aktive Zentrum ist innerhalb der „Barrel“-Struktur der C-terminalen Domäne lokalisiert und bildet dort eine tiefe, sehr hydrophobe Tasche. Das Fe(II)atom wird von H161, H240 und E322 tetraedrisch koordiniert. Es bleiben so drei Koordinierungsstellen für das Substrat und das Sauerstoffmolekül frei.

2.2.5 Inhibitoren von 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase

Es gibt bislang zwei Klassen von 4-HPPD Inhibitoren, die sogenannten 1,3 Diketone und die Isoxazole.(Abb. 3). Der Wirkmechanismus ist bei beiden Klassen der gleiche, da Isoxazole durch Ringöffnung zu 1,3 Diketonen metabolisiert werden. Die Inhibitoren binden kompetitiv mit dem Substrat an das Fe(II)atom im aktiven Zentrum (Lee *et al.*, 1998; Pallett *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 1993; Secor, 1994)und haben Inhibitionskonstanten von ca. $7,0 \cdot 10^{-5}$.

Das 1,3 Diketon NTBC (2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexandion) wird in der Therapie von Tyrosinämie des Typs I eingesetzt. Durch die Hemmung von 4-HPPD wird hier die Akkumulation von Fumarylacetoacetat und dessen gesättigten Abbauprodukten verhindert und so schwere Nieren- und Leberschäden vermieden (Ellis *et al.*, 1995; Lock *et al.*, 1998).

Sulcotrion (2-(2-chloro-4-methansulfonylbenzoyl)-1,3-cyclohexandion) und Isoxaflutol (5-cyclopropyl-isoxazol-4-yl-2-mesy-4-trifluoromethylphenylketon) werden als Herbizide eingesetzt (Lee *et al.*, 1998; Pallett *et al.*, 1998; Viviani *et al.*, 1998). Beide führen zum Ausbleichen, zu Gewebnekrosen und schließlich zum Tod der Pflanze. Sulcotrion wird unter dem Markennamen Mikado™ für den Einsatz in Maiskulturen vertrieben.

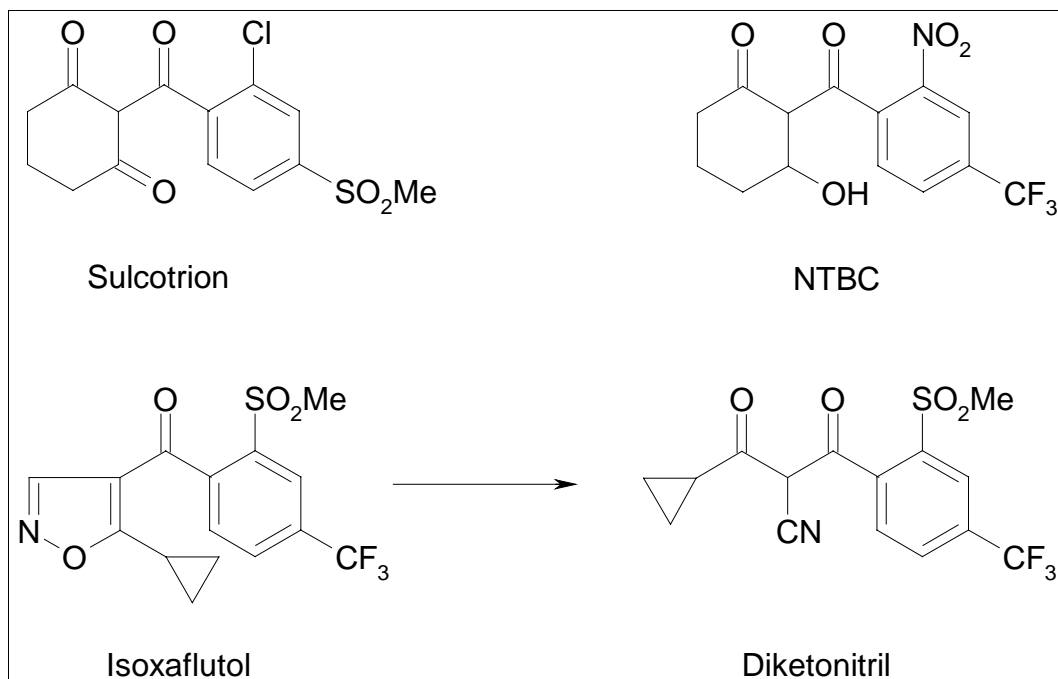


Abb. 3 Inhibitoren von 4-HPPD

2.3 Anorganische Pyrophosphatase (PPase)

Pyrophosphat (PP_i) ist das kleinste Mitglied der Familie der Polyphosphate. Bei seiner Bildung werden zwei Phosphatreste (P_i) über eine Phosphoanhydridbindung miteinander verknüpft. Bereits 1928 wurde in tierischem Gewebe ein spezifisches Enzym entdeckt, welches PP_i zu P_i hydrolysierte (Kay, 1928). Später erkannte man die ubiquitäre Verbreitung von anorganischen Pyrophosphatasen in verschiedensten

Organismen und Geweben, welche letztendlich ihre zentrale Position im Stoffwechsel der Zelle widerspiegelt. Eine große Anzahl lebenswichtiger Reaktionen, wie die Synthese von Nukleinsäuren, Proteinen, Lipiden und Polysacchariden werden durch die Hydrolyse von Nukleotidtriphosphaten zu Nukleotidmonophosphaten und PP_i vorangetrieben (Stetten, 1960). Erst die Hydrolyse von PP_i zu P_i durch anorganische Pyrophosphatasen macht die Reaktionen irreversibel (Kornberg, 1962). Die Kontrolle der PP_i Konzentration im Bereich von wenigen μM stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus für die obengenannten Reaktionen dar.

Dieser Mechanismus macht anorganische Pyrophosphatasen zu einem interessanten Zielenzym für therapeutische Anwendungen in der Medizin und auch im Pflanzenschutz. Inhibitoren der PPasen werden vor allem bei der Behandlung von Krankheiten wie Osteoporose und dem Multiplen Myelom (s. 2.3.2) eingesetzt. Ein weiteres Anwendungsgebiet für Inhibitoren der löslichen anorganischen Pyrophosphatasen ist der Einsatz als Antimykotikum bzw. als Fungizid in der Behandlung von Pilzinfektionen wie auch im Bereich des Pflanzenschutzes.

Neben den löslichen anorganischen Pyrophosphatasen, auf die in dieser Arbeit näher eingegangen werden soll, gibt es noch zwei andere Gruppen von Pyrophosphatasen.

Als erstes zu nennen wären die nur bei Pflanzen und bestimmten Bakterien vorkommenden membrangebundenen vakuoläre Pyrophosphatasen.

In diesen Organismen ist die intrazelluläre Konzentration von PP_i um ein Vielfaches höher als in tierischen Organismen, und PP_i dient als Phosphorylgruppendonator zusammen mit oder anstelle von ATP. Die Hydrolyse von PP_i wird hier begleitet vom Aufbau eines Protonengradienten über die Vakuolenmembran. Somit unterscheidet sich diese Enzymfamilie sowohl in ihrem Aufbau als auch in ihrer Funktion stark von den löslichen anorganischen Pyrophosphatasen. S. Reviews: (Baltscheffsky and Baltscheffsky, 1992; Baltscheffsky *et al.*, 1999; Rea and Poole, 1993).

Die zweite Gruppe bilden die ebenfalls membranassoziierten mitochondrialen Pyrophosphatasen. Diese Enzyme nehmen eine intermediäre Stellung zwischen den löslichen und den protonenpumpenden Pyrophosphatasen ein. Sie sind über nichtkatalytische Untereinheiten in der inneren Mitochondrienmembran verankert (Volk *et al.*, 1983). Ihre katalytischen Untereinheiten ähneln in ihrer Struktur und

Funktion den löslichen Pyrophosphatasen, auch arbeiten diese Enzyme nicht als Protonenpumpe (Lundin *et al.*, 1991).

2.3.1 Physiologie der löslichen anorganische Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die bislang am Besten untersuchten löslichen, anorganischen Pyrophosphatasen sind die aus *E.coli* und *Saccharomyces cerevisiae*. Sie ähneln sich stark in ihren biochemischen Eigenschaften, wie Substratspezifität, Reaktionskinetik und Inhibitoren. Beide Enzyme sind im wesentlichen „perfekte“ Enzyme. Das Verhältnis von K_{cat}/K_m , als Maß für die Effektivität der Enzyme, liegt mit $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ nah am Maximalwert für Enzyme unter Diffusionskontrolle (Fersht, 1984). Die Hydrolyse von PP_i zu 2 P_i wird gegenüber der nichtkatalysierten Hydrolyse in Wasser um einen Faktor von 10^{10} beschleunigt. Die Rückreaktion, also die Synthese von PP_i wird mit etwa 0,5 – 1 % der Geschwindigkeit der Hinreaktion katalysiert (Daley *et al.*, 1986). Anorganische Pyrophosphatase wird durch zweiwertige Ionen aktiviert. Mg^{2+} ist der natürliche Aktivator. Generell sinkt die Aktivität in der Reihenfolge $\text{Mg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+} \gg \text{Cd}^{2+} \gg \text{Ca}^{2+}$ (Cooperman, 1982). Calcium ist ein natürlicher Inhibitor der Pyrophosphatase (Moe and Butler, 1972). In der Gegenwart von Zn^{2+} , Mn^{2+} oder Co^{2+} , nicht aber Mg^{2+} , ist die PPase in der Lage, Monoester von PP_i wie z.B. ADP oder ATP mit etwa 1 % der Reaktionsrate für MgPP_i umzusetzen (Schlessinger and Coon, 1960).

2.3.2 Inhibitoren von löslichen anorganischen Pyrophosphatasen

Natürliche Inhibitoren von anorganischen Pyrophosphatasen sind P_i und eventuell Polyphosphate (Baykov *et al.*, 1999). Ca^{2+} als Komplex mit PP_i , ist ein starker kompetitiver Inhibitor der PPase. Allerdings inhibiert Ca^{2+} erst im mikromolaren Bereich, also jenseits von physiologisch vorkommenden Ca^{2+} Konzentrationen.

Bisphosphonate sind Substratanaloga, in denen die Sauerstoffbrücke zwischen den beiden Phosphatomen durch ein Kohlenstoffatom ersetzt sind. Diese inhibieren lösliche Pyrophosphatasen aus Säugern recht stark (K_i im mikromolaren Bereich). Mitochondriale und bakterielle PPasen werden allerdings nicht von ihnen gehemmt (Smirnova *et al.*, 1988; Unguryte *et al.*, 1989). Bisphosphonate wie Pamidronat[®], Alendronat[®] und Clodronat[®] (Abb. 4) werden vor allem in der Therapie von

Osteoporose (Golden, 1998) sowie in der Onkologie eingesetzt (Desikan *et al.*, 1999).

Imidodiphosphat (P-N-P) (Abb. 4) ist ebenfalls ein starker Inhibitor, wird allerdings langsam von anorganischen Pyrophosphatasen hydrolysiert (Smirnova *et al.*, 1986). Eukaryotische Pyrophosphatasen werden überdies durch F^- inhibiert. Die Inhibition ist das Resultat einer Stabilisierung des Enzym-Substratkomplexes durch das Fluorid (Baykov *et al.*, 1992).

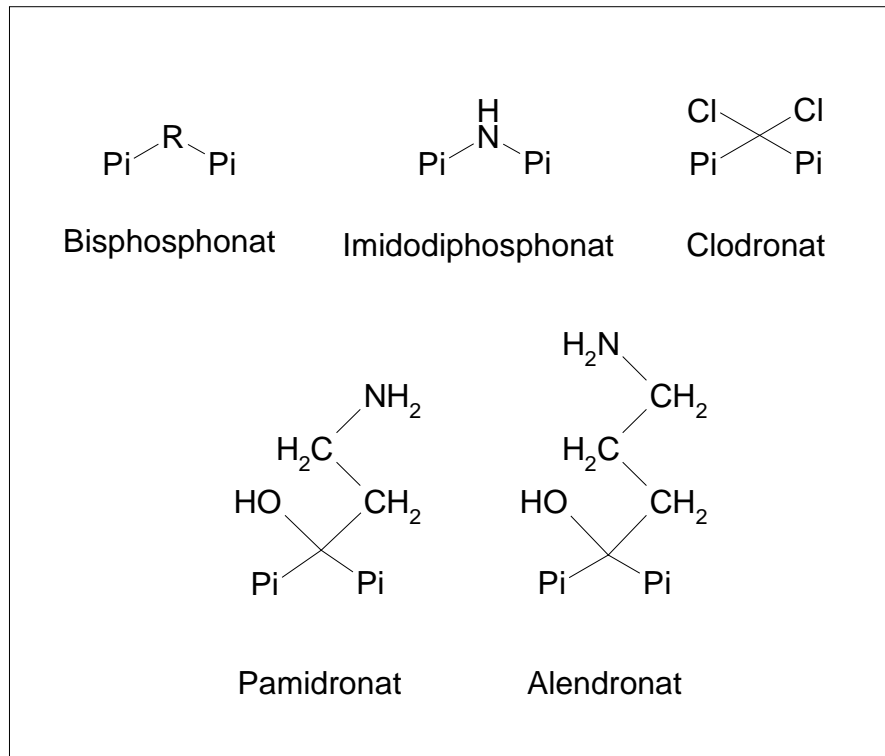


Abb. 4 Inhibitoren der anorganischen Pyrophosphatase

2.3.3 Bekannte Gene und Primärstruktur

Bis jetzt sind die Gene von acht prokaryotischen (*E.coli*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Thermoplasma acidophilum*, thermophiles Bakterium PS-3, *Bartonella bacilliformis*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* und *Synechocystis 6803*) sowie sieben eukaryotischen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum* und *Bos taurus*) löslichen anorganischen Pyrophosphatasen bekannt (Baykov *et al.*, 1999).

Die PPasen sind in ihrer Aminosäuresequenz nur sehr schlecht konserviert. Die *E. coli* Pyrophosphatase entspricht den Aminosäuren 28-225 des Enzyms aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Sequenzhomologie beider Pyrophosphatasen

beträgt jedoch nur ca. 25 %. In allen bekannten, löslichen, anorganischen Pyrophosphatasen sind überhaupt nur 17 Aminosäuren völlig konserviert. Davon liegen 13 im aktiven Zentrum, welches insgesamt aus 17 polaren Aminosäuren und drei aromatischen Aminosäuren besteht (Harutyunyan *et al.*, 1996).

2.3.4. Struktur des Pyrophosphatase Monomers und des aktiven Zentrums

Am besten untersucht und in ihrer Struktur aufgeklärt sind die Enzyme aus *E. coli* (Oganessyan *et al.*, 1994; (ankare *et al.*, 1996) und *Saccharomyces cerevisiae* (Harutyunyan *et al.*, 1981). Außerdem sind die Kristallstrukturen von zwei weiteren prokaryotischen Pyrophosphatasen (*Thermus thermophilus* (Teplyakov *et al.*, 1994) und *Sulfolobus acidocaldarius* (Hansen *et al.*, 1999)) bekannt. Die Strukturen der prokaryotischen Pyrophosphatasen sind untereinander sehr ähnlich mit Rms Abweichungen von weniger als 1 Å/C α .

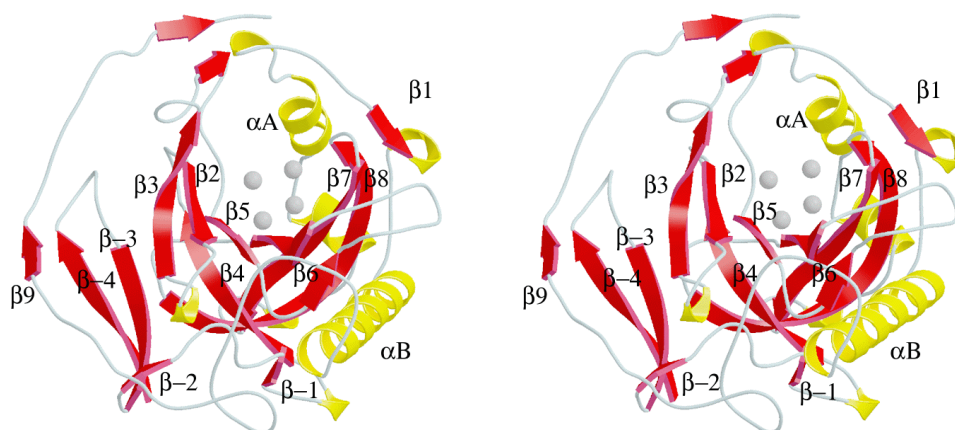


Abb. 5 Stereobild des PPase Monomers aus *Saccharomyces cerevisiae* nach (Harutyunyan *et al.*, 1996). α -Helices sind in gelb, β -Faltblattstrukturen in rot und Mn^{2+} in grau dargestellt.

Sowohl bei den bakteriellen, als auch bei der Hefe PPase, ist eine Kernstruktur bestehend aus 8 β -Strängen und 2 α -Helices konserviert (Harutyunyan *et al.*, 1981), (Oganessyan *et al.*, 1994). Das Faltungsmuster der Pyrophosphatase folgt dem Oligonukleotid-Bindungs-Motiv („OB-fold“) (Murzin, 1996). Die β -Stränge β 1, β 4, β 5 β 7 und β 6 bilden dabei eine Art verdrehtes „ β -Barrel“. Dieses wird oben durch

α -Helix B und unten durch einen „Loop“ zwischen β 5 und β 6 abgeschlossen (s. Abb. 5).

Im Inneren des „ β -Barrel“ liegt als relativ große Ausbuchtung von ca. 20 Å das aktive Zentrum. Es wird bei löslicher anorganischer Pyrophosphatase aus Hefe von 20 überwiegend polaren Aminosäuren geformt. Der Grund des aktiven Zentrums ist hydrophob und wird aus den Aminosäuren Y93, W188, F189 und K154 gebildet. Dieser hydrophobe Kern wird unmittelbar von den positiv geladenen Aminosäureresten von K56, L78, K193 und K198 umgeben. Die gegenüberliegende Wand der Tasche des aktiven Zentrums ist ausschließlich aus den negativ geladenen Aminosäuren E48, E58, D71, D115, D117, D120, D147, E148, E150 und D152 aufgebaut (vgl. Abb. 6). Davon binden die vier Aspartatreste D115, D120, D147 und D152, sowie der Glutamatrest E58 die vier Mn^{2+} Ionen, welche für die Substratbindung und die Hydrolyse des PP_i notwendig sind.

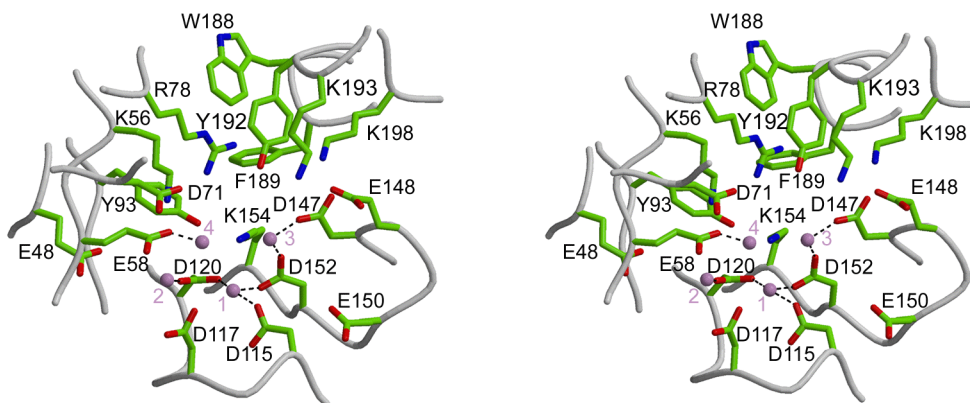


Abb. 6 Stereobild des aktiven Zentrums von PPase aus *Saccharomyces cerevisiae* im Komplex mit Mn^{2+} nach (Harutyunyan *et al.*, 1996). Die Aminosäuren des aktiven Zentrums sind in grün, das C α Rückrad des Proteins in grau und die Manganatome in lila dargestellt.

Die löslich anorganische Pyrophosphatase aus Hefe ist mit 282 Aminosäuren pro Monomer wie alle anderen eukaryotischen Pyrophosphatasen deutlich größer als die bakteriellen Enzyme mit ihren etwa 170 Aminosäuren. Daraus resultiert ein viel größerer hydrophober Kernbereich. Die Hauptunterschiede sind N- und C-terminale Verlängerungen, die zusammen mit β 3 ein zusätzliches β -Faltblatt aus β 9, β 4 und β 3 bilden (vgl. Abb. 5).

2.3.5 Oligomere Organisation

Hefe PPase ist ein Homodimer mit Monomeren von ca. 30 kDa, wogegen die bakteriellen Enzyme Homohexamere aus Monomeren von ca. 20 kDa bilden (vgl. Abb. 7).

Die Struktur der bakteriellen Pyrophosphatasen ist dabei eher ein Dimer aus Trimeren als ein Trimer aus Dimeren. Die Organisation als Trimer ermöglicht dabei eine zusätzliche Stabilisierung des Enzyms, da so ein großer Anteil der Oberfläche gegenüber des Lösungsmittels abgeschirmt wird (Teplyakov *et al.*, 1994; Salminen *et al.*, 1996). Die Intermonomerkontakte sind dabei hydrophober Natur, während die Intertrimerkontakte durch ionische Bindungen zwischen Resten der α -Helix A vermittelt werden.

Bei der löslichen anorganische Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae* werden die Dimerkontakte durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Resten von W152, H87/H87 und W152 vermittelt. Diese Interaktion erinnert stark an das „base stacking“ in DNA und wird auf beiden Seiten jeweils durch R51 zusammengehalten (Heikinheimo *et al.*, 1996).

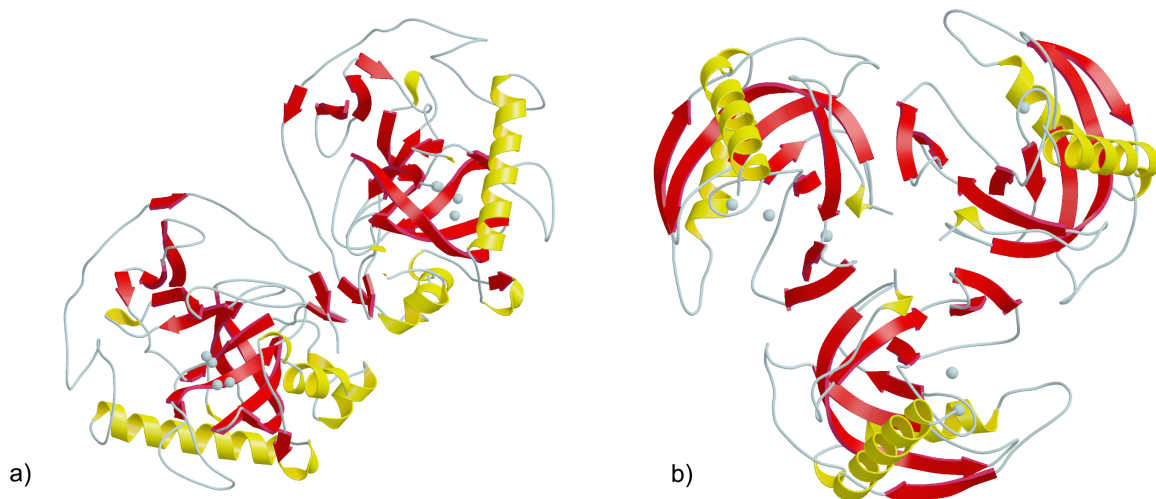


Abb. 7 a) Dimer der *Saccharomyces cerevisiae* PPase. b) Trimer der *E.coli* PPase.

2.3.6 Reaktionsmechanismus

Der postulierte Reaktionsmechanismus der Hydrolyse des PP_i folgt einem S_N2 Mechanismus (Gonzalez and Cooperman, 1986). Ein Hydroxylanion (Ow) greift die P_i1 Gruppe der entgegengesetzten Richtung zu der P-O Etherbindung an (vgl. Abb.

8). Die trigonal-bipyramidale Koordination des Übergangszustandes wird durch die Metallionen und positiv geladene Seitenketten stabilisiert. Dadurch wird die P-O Bindung geschwächt und das Phosphoratom der P_i1 Gruppe Richtung O_w verschoben. Diese Verschiebung von etwa 1.0 \AA reicht aus, um die P-O Bindung zu spalten (Heikinheimo *et al.*, 1996).

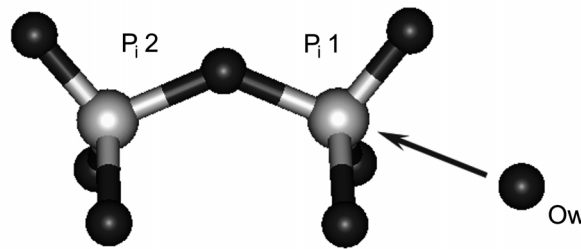


Abb. 8 Nukleophiler Angriff der Hydroxylgruppe O_w bei der PP_i Hydrolyse.

2.4 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

Das Gebiet der Strukturaufklärung von Proteinen mit Hilfe von Röntgenstrahlung ist in verschiedenen Lehrbüchern detailliert ausgeführt (Blundell and Johnson, 1976; Drenth, 1994; Giacovazzo *et al.*, 1992; Helliwell, 1992; Stout and Jensen, 1989). Im folgenden soll nur eine kurze Übersicht der wichtigsten Grundprinzipien gegeben werden.

2.4.1 Überblick

Proteinstrukturen bieten die Möglichkeit, biochemische Prozesse in der Zelle auf atomarer Ebene zu verstehen. In der chemischen Wirkstoffsynthese versucht man, mit Hilfe von Atommodellen der Protein–Inhibitor–Komplex das Bindemotiv zu ergründen, um dann eine synthetische Substanz mit verbesserten Eigenschaften synthetisieren zu können. Im Dezember 1999 waren in der Proteindatenbank in Brookhaven mehr als 11 000 freigegebene Proteinstrukturen hinterlegt. Davon waren 83% mit Hilfe von Diffraktionstechniken bestimmt, während 15% durch kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) bestimmt wurden und 2% auf theoretischen Methoden beruhten. Dies unterstreicht eindrucksvoll die zentrale Rolle der Proteinkristallographie auf dem Gebiet der Strukturbiologie. Die NMR-

Spektroskopie ergänzt die Diffraktionstechniken, da sie Informationen über die Dynamik von Makromolekülen liefert und nicht auf die Kristallisierfähigkeit des Materials angewiesen ist. Die routinemäßige Anwendbarkeit der Methode ist allerdings auf Moleküle mit einer Masse von bis zu etwa 25 kDa beschränkt.

2.4.2 Proteinkristalle

Grundvoraussetzung für eine Strukturanalyse durch Röntgendiffraktionsmethoden ist die Fähigkeit des zu analysierenden Proteins, Einkristalle zu bilden. Dies ist jedoch nur in der Regel bei hochreinen Proteinen möglich. Es sind verschiedene Techniken zur Kristallisation von Proteinen bekannt (McPherson, 1990), von denen der Dampfdiffusionsmethode heute im allgemeinen die größte Bedeutung zukommt. Dazu versetzt man die Protein- oder Komplexlösung mit einem Fällungsmittel und erzeugt einen Konzentrationsgradienten innerhalb eines abgeschlossenen Gefäßes. Durch Diffusion des Lösungsmittels aus der Protein- oder Komplexlösung in ein Reservoir höherer Salz oder Präzipitanzkonzentration bildet sich eine übersättigte Lösung, in der sich bei günstigen intermolekularen Wechselwirkungen Kristallisationskeime bilden. An diesen Keimen erfolgt dann das Kristallwachstum, indem sich die Moleküle geordnet aneinander lagern. Die auftretenden Wechselwirkungen werden u. a. durch die Protein- oder Komplexkonzentration, durch die chemischen Eigenschaften und Konzentration des Fällungsmittels, Temperatur und pH bestimmt. Dadurch stellt die Kristallisation ein vieldimensionales Problem dar, das man durch faktorielle Experimente zu lösen versucht (Carter and Carter, 1979; Jancarik and Kim, 1991).

Die Struktur eines Kristalls läßt sich mit Hilfe seiner Symmetrie beschreiben. Kleinste strukturelle Entität ist die asymmetrische Einheit, aus der durch Anwendung der kristallographischen Punktsymmetrie die Elementarzelle erzeugt wird. Diese baut durch regelmäßige Wiederholung in allen drei Raumrichtungen über die kristallographische Translationsymmetrie den Kristall auf. Allerdings bilden gerade Makromoleküle keine perfekten Kristalle. Sie bestehen aus kleinen Blöcken, die mosaikartig gegeneinander leicht versetzt sind. Außerdem bilden sie durch einen hohen Lösungsmittelgehalt von ca. 30-70% eine lockere Packung, die in vielen Fällen nur durch wenige Kristallkontakte zwischen den Molekülen zusammengehalten wird. Dieser Umstand läßt sich ausnutzen, um kleine Moleküle

oder Schweratomverbindungen durch Lösungsmittelkanäle in den Kristall einzubringen.

2.4.3 Beugung von Röntgenstrahlung an Kristallen

Die wichtigsten Röntgenstrahlungsquellen in der Proteinkristallographie sind Drehanodengeneratoren und Synchrotrone. Beim Drehanodengenerator trifft ein Elektronenstrahl im Vakuum auf eine rotierende Kupferanode. Dabei wird Röntgenstrahlung freigesetzt, aus der sich der gewünschte Strahlungsanteil (Cu-K α : $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) herausfiltern lässt. Synchrotronstrahlung entsteht durch die auf einer Kreisbahn gehaltene Ladung, wobei spezielle Geräte die Beschleunigung dieser Ladung lokal verstärken (Wiggler und Undulatoren), so die abgegebene Strahlungsleistung maximieren und ein bestimmtes Wellenlängenspektrum festlegen. In sogenannten „Beamlines“ wird diese Strahlung durch geeignete röntgenoptische Systeme fokussiert und die gewünschte Wellenlänge eingestellt. Diese hat üblicherweise Werte zwischen $0,9 \text{ \AA}$ und $1,8 \text{ \AA}$.

Trifft Röntgenstrahlung auf einen Kristall, regt ihr oszillierendes elektrisches Feld die Elektronen zu Schwingungen mit gleicher Frequenz an. Die Elektronen wirken als oszillierende Dipole und senden ihrerseits sekundäre Strahlung mit der Frequenz der einfallenden Strahlung aus, die aber um 180° phasenverschoben ist. Diese elastische oder kohärente Streuung, auch Thomson-Streuung genannt, wird unter Vernachlässigung von Mehrfachstreuung durch die kinematische Streutheorie beschrieben. Aufgrund der Phasenverschiebung der gebeugten Einzelwellen, ausgehend von jedem Punkt endlicher Elektronendichte, summiert sich die Gesamtintensität der resultierenden Sekundärstrahlung aller Elektronen zur Intensität null (destruktive Interferenz), wenn nicht der Gangunterschied ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist (konstruktive Interferenz). Die Beugung der Röntgenstrahlung am Kristallgitter lässt sich nun mathematisch wie folgt beschreiben:

Die durch periodische Wiederholung der Elementarzelle auftretenden Translationsvektoren ergeben in ihrer Gesamtheit das Kristallgitter. Dieses Gitter wird von Netzebenen durchzogen, die verschiedene Gitterpunkte beinhalten und die durch ihre Schnittpunkte mit den Achsen der Elementarzelle charakterisiert werden (Miller-Indices). Die Ansammlung aller Normalenvektoren dieser Netzebenenscharen

bilden das reziproke Gitter. Die reziproken Gittervektoren werden vom Ursprung des reziproken Gitters aus gezeichnet, und ihre Länge entspricht dem reziproken Abstand der Ebenen einer Netzebenenschar. Bei kohärenter Streuung an einer Netzebenenschar des Gitters trifft unter einem Winkel θ zwischen einfallendem Strahl und Netzebenenschar konstruktive Interferenz auf, wenn der Gangunterschied zwischen den an verschiedenen Ebenen einer Schar gebeugten Wellen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist. Dies ist Gegenstand der Bragg'schen Gleichung:

$$n \lambda = 2d_{hkl} \sin \theta_{hkl}$$

n : ganze Zahl, λ : Wellenlänge, d : Netzebenenabstand

In der sogenannten Ewald-Konstruktion lässt sich die Bragg'sche Gleichung unter Verwendung des reziproken Gitters als Vektordiagramm darstellen (Abb. 9). Dabei befindet sich der Kristall im Mittelpunkt der Ewald-Kugel mit dem Radius $1/\lambda$. Der Ursprung des reziproken Gitters (U) liegt an dem Punkt auf der Oberfläche der Ewald-Kugel, an dem sie ein Vektor in Richtung des einfallenden Strahls schneidet. Für jeden Punkt P des reziproken Gitters, der auf der Kugeloberfläche liegt, ist die Reflexionsbedingung erfüllt. Bei einer Rotation des Kristalls dreht sich neben dem Kristallgitter auch das reziproke Gitter, so daß zu verschiedenen Zeitpunkten für unterschiedliche Reflexe die Beugungsbedingung erfüllt ist.

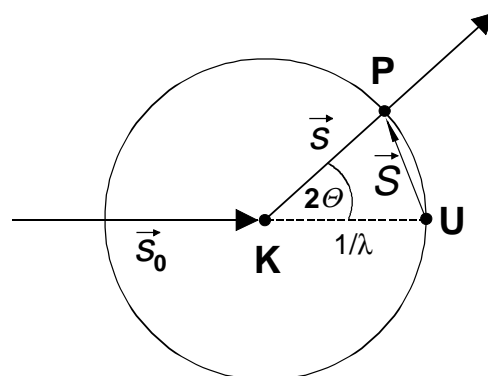


Abb. 9 Ewald-Konstruktion (Ewald, 1921)

Die Intensität der gebeugten Strahlung wird vom Inhalt der Elementarzelle bestimmt. Da ein Kristall die Konvolution des Elementarzelleninhaltes mit dem dreidimensionalen Gitter darstellt, ergibt sich das Diffraktionsmuster des Molekülkristalls aus dem Produkt der molekularen Transformation mit dem reziproken Gitter. Das Produkt beider Transformationen resultiert in einer Abbildung der molekularen Transformation an den reziproken Gitterpunkten, wodurch die Intensität an einem reziproken Gitterpunkt hoch ist, wenn die zugrundeliegende molekulare Transformation an diesem Punkt eine hohe Intensität besitzt, und umgekehrt.

Da die Elektronenhülle eines Atoms ein endliches Volumen einnimmt, hängt die gestreute Gesamtwelle vom Einfallswinkel ab. Bei großen Streuwinkeln ist die Phasendifferenz zwischen den Wellen, die an unterschiedlichen Positionen innerhalb der Atomhülle gebeugt werden, ebenfalls hoch, so daß die resultierende Gesamtintensität mit zunehmendem Winkel und damit höherer Auflösung abnimmt. Die an einem Atom gestreute Gesamtwelle errechnet sich durch das Aufsummieren aller individuellen Beiträge innerhalb des Atomvolumens:

$$f(\vec{S}) = \int_V \rho(\vec{r}) \exp[2\pi i \vec{r} \cdot \vec{S}] dV$$

Unter der Annahme, daß die Elektronendichte des Atoms kugelsymmetrisch ist, hängt dieser atomare Formfaktor f nur von der Länge des Streuvektors \vec{S} ab, nicht aber von dessen Richtung. Die atomaren Formfaktoren innerhalb einer Elementarzelle mit n Atomen summieren sich unter Multiplikation mit ihrem jeweiligen Phasenwinkel zum Strukturfaktor \vec{F} auf:

$$\vec{F}(\vec{S}) = \sum_{j=1}^n f_j \exp[2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{S}]$$

Dabei gibt der Vektor \vec{r}_j die Position des Atoms j in Fraktalkoordinaten an. Analog zur Winkelabhängigkeit der Strahlungsintensität im Falle einer nichtpunktförmigen Streuquelle bewirkt auch die thermische Schwingung von Atomen eine zunehmende

destruktive Interferenz der gestreuten Wellen gerade bei großen Streuwinkeln. Deshalb wird der atomare Formfaktor mit einem Temperaturfaktor B multipliziert:

$$T(iso) = \exp\left[-B \frac{\sin^2 \Theta}{\lambda^2}\right] \quad B = 8\pi^2 \cdot \bar{u}^2$$

Der Temperaturfaktor ist außerdem mit der mittleren quadratischen Auslenkung der Atome verknüpft:

Zusätzlich zu dieser dynamischen Unordnung gehen in den Temperaturfaktor allerdings noch andere Faktoren ein, z. B. statische Unordnung, falsche Datenskalierung, Absorption oder nicht korrekte Kurven für die atomaren Formfaktoren.

Aufgrund der Fehlordnung (Mosaizität) der Kristalle sind die Beugungsreflexe nicht unendlich scharf. Die Netzebenenscharen eines Kristalls befinden sich nur über einen endlichen Winkelbereich in Reflexstellung. Die Gesamtintensität $I(\vec{h})$ eines gebeugten Strahls für einen Kristall, der mit einer gleichförmigen Winkelgeschwindigkeit ω durch die Reflexposition rotiert und sich in einem Röntgenstrahl mit der Intensität des einfallenden Strahls befindet, ist durch die Darwin'sche Formel gegeben (Darwin, 1914):

$$I(\vec{h}) = \frac{I_0}{\omega} \lambda^3 \frac{e^4}{m^2 c^4} \frac{1 + \cos^2 2\Theta}{2} \frac{L A V_x}{V^2} |F(\vec{h})|^2$$

dabei sind λ die Wellenlänge der Röntgenstrahlung, e die Elementarladung, m die Elektronenmasse und c die Lichtgeschwindigkeit. Der Term $(1 + \cos^2 2\Theta)/2$ stellt den Polarisierungsfaktor dar, der die partielle Polarisierung des gebeugten Strahls für den Bragg-Winkel θ angibt, wenn der Primärstrahl unpolarisiert ist. L ist der Lorentzfaktor und berücksichtigt die relative Zeit, die jeder Reflex in der Reflexposition verbringt. A ist der Absorptionsfaktor, V_x das Kristallvolumen und V das Volumen der Elementarzelle. $|F(\vec{h})|$ ist die Strukturfaktoramplitude für den Reflex \vec{h} . Somit ist bei kinematischer Streuung ohne Mehrfachstreuung die Intensität $I(\vec{h})$ des gebeugten Röntgenstrahles proportional zum Amplitudenquadrat des Strukturfaktors $\vec{F}(\vec{h})$.

2.4.4 Berechnung der Elektronendichte

Der Strukturfaktor $\vec{F}(\vec{h})$ ist die Fourier-Transformation der Elektronendichte. Daher lässt sich die Elektronendichte ρ am Ort xyz durch inverse Fourier-Transformation berechnen:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \vec{F}(hkl) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$

Es gilt, $\vec{F}(hkl) = |\vec{F}(hkl)| \exp i\alpha(hkl)$, wobei $\alpha(hkl)$ den Phasenwinkel des Reflexes hkl darstellt. Im Beugungsexperiment erhält man aus den integrierten Intensitäten lediglich die Strukturamplituden $|\vec{F}(hkl)|$, nicht aber die zugehörigen Phasenwinkel, ohne die die Elektronendichte des Moleküls nicht berechnet werden kann.

2.4.5 Lösung des Phasenproblems

Zur Lösung des Phasenproblems gibt es verschiedene Ansätze:

1. Multipler isomorpher Ersatz (MIR)
2. Multiple anomale Dispersion (MAD)
3. Molekularer Ersatz (MR)
4. Direkte Methoden

Ohne vorhandene strukturelle Informationen ist die Methode des multiplen isomorphen Schweratomersatzes die wichtigste Methode zur Phasenbestimmung in der Proteinkristallographie. Aufgrund des technischen Fortschrittes an Synchrotron-Beamlines gewinnt auch die MAD-Methode zunehmend an Bedeutung (Hendrickson *et al.*, 1989). Ist die Struktur eines homologen Proteins bereits bekannt, kann diese mit Hilfe von Patterson-Suchmethoden (Molekularer Ersatz) unter günstigen Umständen zur anfänglichen Phasenbestimmung herangezogen werden (Hoppe, 1957; Rossmann and Blow, 1962; Huber, 1965). Diese Methode findet auch in steigendem Maße Anwendung, da eine immer größere Zahl von Proteinstrukturen zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu spielen direkte Methoden nach wie vor in der Proteinstrukturanalyse (Karle, 1989) trotz erster Erfolge (Acta Cryst. 1993, D49, 1. Ausgabe) keine bedeutende Rolle. In erster Linie sind dafür die limitierte

Auflösung der Röntgenbeugungsexperimente an Proteinen und die große Anzahl der Atome in der Elementarzelle verantwortlich. In der Kleinmolekülkristallographie, in der atomare Auflösung erreicht wird, sind die direkten Methoden allerdings das Standardverfahren zur Phasenbestimmung. Im folgenden soll lediglich die MR-Methode kurz beschrieben werden, da sie in der vorliegenden Arbeit Verwendung fand.

2.4.6 Molekularer Ersatz

Gibt es zu dem untersuchten Protein ein verwandtes Molekül mit bekannter dreidimensionaler Struktur, so können die Phasen mit Hilfe der Pattersonfunktion (Patterson, 1934) bestimmt werden:

$$P(uvw) = \frac{2}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)|^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw)$$

Dabei wird die bekannte Struktur in die Elementarzelle der unbekanntes Struktur rotiert und translatiert (Hoppe, 1957; Rossmann and Blow, 1962; Huber, 1965). Durch eine Fourier-Transformation lassen sich nun die Phasen bestimmen.

Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Enzyme 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase aus verschiedenen eukaryotischen Organismen und lösliche anorganische Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae* untersucht werden. Beide Enzyme haben eine große Bedeutung als Zielenzyme in Medizin und Pflanzenschutz.

Native Mais 4-HPPD sollte aus etiolierten Maiskeimlingen isoliert werden. Im Vordergrund sollte hier die Gewinnung von Sequenzinformation zur Klonierung des Gens stehen. Überdies sollte eine einleitende biochemische Charakterisierung des Enzyms durchgeführt werden.

Ziel der Arbeit war auch die Klonierung der 4-HPPD Gene einerseits aus *Arabidopsis thaliana* als Modellorganismus, sowie aus Mais und Reis als Kulturpflanzen und andererseits aus Mensch und Maus als in der Medizin relevante tierische Organismen. Die Enzyme sollten heterolog in *E.coli* überexprimiert und gereinigt werden. Wenn möglich sollte die jeweilige rekombinante 4-HPPD kristallisiert und so die Grundlage einer Strukturlösung von eukaryotischer 4-HPPD gelegt werden.

Saccharomyces cerevisiae PPase sollte zusammen mit verschiedenen Substratanaloga kristallisiert werden. Des Weiteren sollte die Struktur der PPase-Inhibitor-Komplexe über Röntgenstrukturanalyse gelöst werden. Zusammen mit den bereits bekannten PPase-Strukturen sollte ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, oder der bereits postulierte Reaktionsmechanismus verifiziert werden.

Material und Methoden

3.0 Geräte und Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Sigma, Aldrich, Roth, Serva, Biomol, BioRad, Pharmacia, Qiagen, Stratagene, Invitrogen, Clontech, Merck, und Roche bezogen. Die Qualität entsprach mindestens *zur Analyse*. 1-¹⁴C-Tyrosin wurde von Amersham bezogen.

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräte waren von den Firmen Beckmann, Sorvall, Eppendorf, Millipore, Qiagen, Pharmacia, Stratagene, BioRad, Gilson und Branson

3.1 Anzucht , Ernte und Lagerung des Pflanzenmaterials

Ungebeizte Maiskörner der Sorte *Zea mays* „mutin“ wurden in mit Vermiculite gefüllten Pflanzschalen (30 x 40 cm) ausgelegt, dünn mit dem Substrat bedeckt, angegossen und in eine verdunkelte Klimakammer gestellt. Die Kultur erfolgte bei 22°C ohne Nachtabsenkung bei 60 % relativer Luftfeuchte und andauernder Dunkelheit. Die Maiskörner keimten nach 24-48 h. Nach weiteren 4-5 Tagen wurden die Maiskeimlinge bei einer Größe von ca. 5 cm geerntet und sofort in flüssigen Stickstoff überführt. Die Keimlinge wurden bei -80°C gelagert.

3.2 Zellaufschluß und Gewinnung des Zellrohextraktes

Der Zellaufschluß wurde bei kleinen Mengen in einer Braun Kaffeemühle, bei größeren Mengen (ab 200 g) in einer Retsch Zentrifugalmühle durchgeführt. Beide Geräte wurden zunächst mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die tiefgefrorenen Maiskeimlinge wurden in mehreren Pulsen zu einem feinen Mehl vermahlen und in Aufschlußpuffer M (2 ml/ g FG) überführt. Nach dem Auftauen wurden Zell- und Gewebetrümmer 15 min bei 20 000 xg und 4°C abzentrifugiert.

Aufschlußpuffer M : 100 mM KP_i pH 7.0

5mM Natriumascorbat

2 µM Sulcotrion

3.3 Reinigung und Charakterisierung von Proteinen

3.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der Proben wurde photometrisch bei 595 nm nach (Bradford, 1976) ermittelt. Dazu wurde eine Eichkurve mit BSA in den Konzentrationen von 0,1 bis 15 µg /ml im Absorptionsbereich von 0-1,2 erstellt.

200 µl Bradfordreagenz (BioRad) wurden mit 1-50 µl Proteinlösung versetzt und mit H₂O ad 1ml aufgefüllt. Die Proben wurden mindestens 5 min bei RT inkubiert und anschließend die Extinktion bei 595 nm bestimmt.

3.3.2 Aktivitätstest 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase

3.3.2.1 Radioaktiver Test

Die Aktivität der 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase wurde modifiziert nach (Lindstedt and Odelhog, 1987a) bestimmt. Bei der Umsetzung von 4-Hydroxyphenylpyruvat zu Homogentisinsäure wird CO₂ freigesetzt. Dieses kann bei Verwendung von radioaktiv markiertem 1-¹⁴C-4-Hydroxyphenylpyruvat leicht nachgewiesen werden.

a) Herstellung des Substrates

1-¹⁴C-4-Hydroxyphenylpyruvat konnte durch die oxidative Desaminierung von kommerziell erhältlichem 1-¹⁴C-Tyrosin gewonnen werden. Die Reaktion wurde durch das Enzym Aminosäureoxidase katalysiert. Hierzu wurden 50 µl 1-¹⁴C-Tyrosin (50 µCi/ml bei 55mCi/mMol) mit 50 µl 1 N NaOH und 100 µl 200 mM KPO₄ pH 6.5 mit 30500 U Katalase und 0.15 U 1-Aminosäureoxidase 90 min bei 30°C inkubiert.

Längere Inkubationszeiten bzw. größere Mengen 1-Aminosäureoxidase verringern die Ausbeute durch weitere Oxidation des Substrates.

Das Reaktionsprodukt 1-¹⁴C-4-Hydroxyphenylpyruvat wurde durch die Adsorption an den Ionenaustauscher Dowex WX8 gereinigt. Dazu wurde zunächst eine Säule aus 400 µl Dowex in einer 1,25 ml Multipettenspitze hergestellt. Diese wurde mit dem zehnfachen Volumen 0,1 M HCl equilibriert. Die zu reinigende Probe wurde 1:1 mit

H₂O verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Nach dem Einsinken der Probe wurde das 1-¹⁴C-4-Hydroxyphenylpyruvat mit insgesamt 2 ml H₂O eluiert. Dabei wurden Fraktionen à 250 µl gesammelt, im LSC auf ihre Radioaktivität untersucht und die Fraktionen mit mehr als 1000 dpm/µl vereinigt.

b) Durchführung des Aktivitätstests :

Für den Test wurden 20 ml Scintillationsgefäße verwendet. In die Kunststoffdeckel wurde ein Glasfaserrundfilter eingelegt. Anschließend wurde durch Deckel und Glasfaserfilter eine Kanüle eingestochen. Der Rundfilter wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn, zur Absorption des freigesetzten ¹⁴CO₂, mit 200 µl gesättigter Ba(OH)₂-Lösung getränkt. Außerdem wurden 1 ml Tuberkulinspritzen mit je 250 µl 4 N H₂SO₄ aufgezogen.

Benötigte Lösungen:

P_i-Puffer : 50 mM KPO₄ pH 7,3
Ascorbat : 990 mM in P_i-Puffer
Katalase : 25000 U/ml Katalase in P_i-Puffer
Substrat : 1-¹⁴CO₂-4-Hydroxyphenylpyruvat (2000 dpm/µl ≅ 0,33 nMol/20 µl) in P_i-Puffer

Der Testansatz bestand aus 750 µl P_i-Puffer, 100 µl Ascorbat, 100 µl Katalase und 50 µl der zu bestimmenden Probe in einem Scintillationsgefäß. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe des Substrates gestartet und die Gefäße mit den bereits vorbereiteten Deckeln verschlossen. Die Ansätze wurden nun 45 min bei 30°C geschüttelt und die Reaktion durch Injektion der Schwefelsäure gestoppt. Durch die Ansäuerung des Mediums wurde das gelöste ¹⁴CO₂ in die Gasphase überführt. Zur quantitativen Fällung des ¹⁴CO₂ durch das Ba(OH)₂ in den Filtern wurden die Ansätze weitere 45 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Gefäße geöffnet, die Glasfaserrundfilter in frische Scintillationsgefäße mit 5 ml Filtercount™ überführt und die Menge des gebundenen ¹⁴CO₂ im LSC bestimmt.

3.3.2.2 Photometrischer Test

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte modifiziert nach (Lindstedt and Rundgren, 1982a) in einem photometrischen Test bei 308 nm.

Bei dieser Wellenlänge wird die Abnahme von 4-HP in der Enolform gemessen. In wäßrigen Lösungen liegt 4-HP jedoch zum überwiegenden Teil in der Ketoform vor. Durch die Zugabe von Boratpuffer wird das Gleichgewicht in Richtung Enolform verschoben. Unter den gewählten Bedingungen liegt 4-HP zu 25 % in der Enolform vor. Die Zugabe von 0,8 M KH_2PO_4 beschleunigt die Einstellung des Gleichgewichts. Der Testansatz benötigte vor der Messung ca. 5-10 min zur Einstellung des Keto-Enolgleichgewichts. Die 4-HPPD Aktivität wurde für 15 min bei 25°C bestimmt.

Der Testansatz enthielt:	900 μl	0,8	M	KH_2PO_4
		0,4	M	H_3BO_3
		0,2	M	Tris/HCl pH 7,5
		5,7	mM	Ascorbinsäure
		1200	U	Katalase
		250	μM	4-HP

Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von :

100 μl	10	mM	Hepes/NaOH pH 7,0
	0,1	mM	FeSO_4
	1-5	μg	4-HPPD

3.3.3 Einengen und Umpuffern von Proteinlösungen

3.3.3.1 Ultrafiltration

Eine Methode zum schnellen und effektiven Einengen und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen ist die Ultrafiltration durch hydrophile, inerte Membranen. Hier wurden Membranen aus Polysulfonether (Biomax 30 kDa, Millipore) bzw. aus regenerierter modifizierter Zellulose (YM 10 + YM 30, Amicon) mit definierten Ausschlußgrößen von 10 und 30 kDa verwendet. Größere Volumina (50-300 ml) wurden mit Rührzellen der Firma Amicon eingengt. Hierbei wurde die Proteinlösung

unter langsamen Rühren durch eine horizontal liegende Membran gedrückt. Der dazu nötige Druck von 3,5 bar wurde über eine Stickstoff-Druckgasflasche erzeugt. Kleinere Volumina konnten durch Zentrifugation in Ultrafree 15 Ultrafiltrationseinheiten (Millipore) eingeengt werden. Die Polysulfonethermembran ist senkrecht angeordnet, so daß bei einer Zentrifugation eine tangentielle Anströmung der Membran erfolgt. Die Verluste durch Adsorption von Protein an die Membranoberfläche sind hierbei minimal.

Durch mehrmaliges Auffüllen mit Puffer und erneutes Einengen können so Proteinlösungen entsalzt und umgepuffert werden.

3.3.3.2 Entsalzen von Proteinlösungen über Gelfiltration

Die Entsalzung von Proteinlösungen erfolgte entweder durch Gelfiltration über PD-10 Säulen oder HiTrap Desalting Säulen (beide Pharmacia Biotech, Freiburg), oder Ultrafiltration (3.3.3.1).

3.3.3.3 Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfatfällung wurde zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen angewandt. Durch das Ausnützen der unterschiedlichen Löslichkeit verschiedener Proteine bei Ammoniumsulfatkonzentrationen zwischen 10 und 90 % Sättigung kann auch ein Reinigungseffekt erzielt werden.

Der zu fällenden Proteinlösung wurde das fein gemörserte Ammoniumsulfat langsam bis zum gewünschten Sättigungsgrad unter ständigem Rühren zugegeben. Anschließend wurde die Lösung für 30 min auf Eis gerührt und 30 min bei 20000 xg und 4°C zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde im jeweiligen Puffer der Wahl resuspendiert.

3.3.4 Elektrophoretische Methoden

3.3.4.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Für die diskontinuierliche SDS Gelelektrophorese wurde die von (Laemmli, 1970) beschriebene Methode leicht modifiziert. Es wurden entweder 17 x 15 cm große

Gele, oder Minigele der Größe 8,5 x 9 cm jeweils mit einer Dicke von 0,8 mm verwendet. Die großen Gele wurden einzeln, die Minigele wurden zu jeweils 8 im Gelgießstand (Eigenbau MPI für Biochemie, Martinsried) gegossen und anschließend feucht bei 4°C gelagert.

Trenngel:	12,5	% Acrylamid	Sammelgel:	5,0	% Acrylamid
	0,3	% Bisacrylamid		0,3	% Bisacrylamid
	0,8	% SDS		0,8	% SDS
	0,375	M Tris/HCl pH 8,8		0,125	M Tris/HCl pH 6,8
	0,1	% APS		0,05	% APS
	0,5	% TEMED		0,25	% TEMED
Laufpuffer :	0,025	M Tris	2x Probenpuffer:	63,0	mM Tris/HCl pH 6,8
	0,192	M Glycin		0,05	% Bromphenolblau
	0,1	% SDS		4	% SDS
				10	% Glycerin
				375	mM DTT

Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag auf das Gel 1:1 mit 2x Probenpuffer vermischt und 3 min bei 95°C erhitzt.

3.3.4.2 Färbungen

a) Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Die Silberfärbung von Proteingelen erfolgte modifiziert nach der Methode von (Willoughby and Lambert, 1983).

Die Gele wurden zunächst zur Fixierung und zur Entfernung des SDS 3 x 15 min in Fixierer inkubiert, anschließend 4 x 2 min in H₂O gewaschen und 2 min in 1,5 % (v/v) Glycerin stabilisiert. Erst unmittelbar vor der Färbung wurden 35 ml Lösung A mit 65 ml Lösung B gemischt und hinzugegeben. Die Färbung dauerte 7-10 min. Das Gel wurde kurz mit H₂O gespült und die Färbung durch zweimaliges Waschen in 50 mM EDTA gestoppt.

Fixierer : 45 % Methanol (v/v) + 10 % Essigsäure (v/v)
Lösung A : 0,5 M Na_2CO_3
Lösung B : 2 mM NH_4NO_3
 12 mM AgNO_3
 3,5 mM Wolframatokieselsäure
 0,5 % Formaldehyd (v/v)

b) Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Die Gele wurden 30 min in Färbelösung inkubiert (Schüttler). Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte in Entfärber 2-4 h bei 45°C, oder über Nacht bei Raumtemperatur.

Färbelösung : 50 % Ethanol (v/v) + 10 % Essigsäure (v/v)
 + 0,1 % Coomassie R 250 (w/v)
Entfärber : 30% Ethanol (v/v) + 7 % Essigsäure (v/v)

c) Coomassiefärbung von PVDF-Membranen

PVDF-Membranen wurden 10 min in Färbelösung (s. b) gefärbt und zur Entfärbung über Nacht in PVDF-Entfärber inkubiert.

PVDF-Entfärber : 50 % Methanol (v/v) + 10 % Essigsäure (v/v)

3.3.4.3 Elektroblothing

Der Membrantransfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen wurde im Tank-Blot Verfahren (Towbin *et al.*, 1979) durchgeführt. Es wurde eine Polyvinylidendifluoridmembran (Millipore, Immobilon PVDF, Porengröße 0,45 μm) verwendet. Die hydrophobe Membran wurde zunächst 1 min in Methanol benetzt. Anschließend wurde das Methanol durch Waschen in H_2O entfernt und die Transfermembran für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Der Aufbau des „Blotting-Sandwiches“ war wie folgt:

Schaumstoffpad	(Anode)
2 Lagen 3 MM Papier (Whatman)	
PVDF Membran	
Polyacrylamid-Gel	
2 Lagen 3 MM Papier	
Schaumstoffpad	(Kathode)

Alle Komponenten des „Blotting-Sandwiches“ wurden vor dem Zusammenbau in Transferpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte in einer Blotkammer (BioRad Trans Blot Cell) für 4 h bei 285 mA in einem Eisbad.

Transferpuffer : 20 % Methanol (v/v)
 25 mM Tris
 190 mM Glycin

3.3.4.4 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde unter Verwendung von 5 % Acrylamid Fertiggelen der Firma NOVEX im pH Bereich von 3,0 bis 7,0 nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.5 Reinigung 4-HPPD aus etiolierten Maiskeimlingen

3.3.5.1 Herstellung des Mais Rohextraktes

Je 250 g schockgefrorene, etiolierte Maiskeimlinge (3.1) wurden, wie unter 3.2 beschrieben, in der Retsch Zentrifugalmühle aufgeschlossen, mit Aufschlußpuffer M versetzt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde über einen Faltenfilter geklärt und anschließend eine Ammoniumsulfatfällung bis 45 % Sättigung (3.3.3.3) durchgeführt. Das Proteinpellet wurde in 10 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 % (v/v) Glycerin; 2 µM Sulcotrion aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.5.2 Reinigung von Mais-4-HPPD über Hydrophobe Interaktionschromatographie

65 ml Rohextrakt (s.o.) wurden mit 35 ml 3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7,5 versetzt, die Lösung 15 min bei 20000 xg und 4°C abzentrifugiert und auf eine in 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 % (v/v) Glycerin; 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ equilibrierte Phenylsepharose FF (Säulenvolumen 140 ml; Flußrate 12 ml/min) (Pharmacia) aufgetragen. Verunreinigungen wurden über einen steilen Gradienten von 1 M bis 0,075 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entfernt und die Säule mit insgesamt 6 Säulenvolumen Puffer gewaschen. Die Elution der 4-HPPD erfolgte mit 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 % (v/v) Glycerin. Fraktionen mit 4-HPPD Aktivität (3.3.2) wurden vereinigt und mit einer Amicon Rührzelle eingeeengt (3.3.3.1).

3.3.5.3 Reinigung von Mais 4-HPPD über Anionenaustauschchromatographie

a) DEAE-Sepharose FF

Die eingeeengten Fraktionen der Reinigung über Phenylsepharose FF wurden 1:1 mit 10 mM Tris/HCl verdünnt und auf eine in 100 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 % (v/v) Glycerin equilibrierte DEAE-Sepharose FF Säule (Säulenvolumen 48 ml; Flußrate 8.00 ml/min) aufgetragen. Die Elution der 4-HPPD erfolgte in einem linearen Gradienten von 0-300 mM NaCl. Die Fraktionen mit 4-HPPD Aktivität wurden vereinigt, über eine Amicon Rührzelle eingeeengt und in 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 % Glycerin umgepuffert.

b) Mono Q

Die Probe aus Schritt a) wurde nun auf eine mit 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 % Glycerin (v/v) equilibrierte Mono Q HR 10/10 Säule (Säulenvolumen 8 ml; Flußrate 4 ml/min) (Pharmacia) aufgetragen und über einen linearen Gradienten von 0-200 mM NaCl die 4-HPPD eluiert. Die 4-HPPD Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, über eine Amicon Rührzelle bis auf 5 ml eingeeengt und anschließend über PD 10- Säulen (3.3.3.2) in 10 mM KP_i pH 5,7 umgepuffert.

3.3.5.4 Reinigung der Mais 4-HPPD über Hydroxylapatitchromatographie

Die Probe nach Mono Q wurde weiter über eine in 10 mM KP_i pH 5,7 equilibrierte Säule aus keramischem Hydroxylapatit (CHT; BioRad) gereinigt (HR 5/20; Säulenvolumen 4 ml; Pharmacia). Die 4-HPPD wurde über einen linearen Gradienten von 10-250 mM KP_i pH 5,7 von der Säule eluiert. Die Fraktionen wurden sofort mit 1/10 des Volumens 1M Tris/HCl pH 7,5 neutralisiert und es wurde ein Aktivitätstest durchgeführt. Die Fraktionen mit 4-HPPD Aktivität wurden über SDS-Gelelektrophorese analysiert und die 4-HPPD identifiziert.

3.3.5.5 Molekulargewichtsbestimmung über Gelfiltrationschromatographie

Mittels Gelfiltration können Proteine chromatographisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Bei den verwendeten Säulenmaterialien handelt es sich um poröse Matrices definierter Porengröße. Je größer ein Molekül ist, desto schlechter kann es in die Poren eindringen und desto früher wird es von der Säule eluiert. Diesen Molekularsiebeffekt nutzt man aus, um Proteine unterschiedlicher Größe voneinander zu trennen oder um, nach vorheriger Eichung mit Proteinen bekannter Größe, das Molekulargewicht von noch unbekanntem Proteinen zu bestimmen. Hier wurde eine Superose 12 HR 10/30 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) zur Molekulargewichtsbestimmung verwendet.

Die Chromatographie erfolgte isokratisch bei 0,3 ml/min mit 100 mM HEPES/NaOH pH 7,0; 200 mM NaCl. Das Ausschlußvolumen wurde mit Dextranblau ($MW 2 \times 10^6$ Da) als 1,8 ml und das totale Säulenvolumen mit Isathin als 12 ml bestimmt. Die Berechnung der Eichgerade erfolgte nach Ermittlung der K_{av} Werte der verwendeten Eichproteine. Dabei ist K_{av} definiert als :

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

Hier ist V_e das Elutionsvolumen des Proteins, V_0 das Ausschlußvolumen der Säule und V_t das gesamte Bettvolumen der Säule.

Eichproteine:

Aldolase (Tetramer)	156 kDa
BSA	66 kDa
Ovalbumin	45 kDa
Aldolase (Monomer)	39 kDa
Kohlensäure-Anhydrase	29 kDa
Cytochrom C	16 kDa

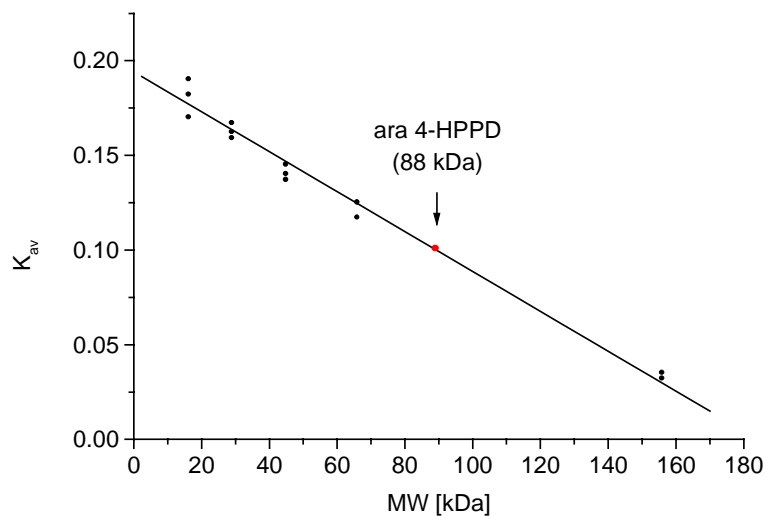


Abb. 10 Eichgerade Superose 12 HR 10/30

3.3.5.6 Molekulargewichtsbestimmung über Dynamic Light Scattering (DLS)

Die Molekulargewichtsbestimmung wurde mit einem „Dyna Pro“ Light scattering System der Firma Protein Solutions durchgeführt. Das Protein wurde in einer Konzentration von etwa 1mg/ml im jeweiligen Puffer verdünnt und durch einen 0,1 µm Membranfilter gedrückt, um Aggregate und Staubpartikel zu entfernen.

3.3.7 Chromatofokussierung über Mono P

Die Chromatofokussierung wurde mit einer Mono P HR 5/5 Säule (Pharmacia) im pH Bereich von 7-4 durchgeführt. Die Säule wurde zunächst mit 5 Säulenvolumina 25 mM BisTris/HCl pH 6,7 + 10 % (v/v) Glycerin equilibriert. Die zu trennende Probe wurde in dem gleichen Puffer aufgetragen und anschließend mit 10 ml Polybuffer™

74 (Pharmacia) ein pH-Gradient aufgebaut und die Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punktes eluiert.

3.3.8 Proteolytische Spaltung von Proteinen

Das zu spaltende Protein wurde nach SDS Gelelektrophorese und anschließender Färbung mit Coomassie Blau R 250 aus dem Gel ausgeschnitten.

Die Gelstücke wurden 2 x 10 min in 1 ml H₂O gewaschen und 2 x 10 min in 500 µl H₂O:AcN₃ 1:1 entfärbt. Das Gelstück wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 100 µl 100 mM Tris/HCl pH 8,5 aufgenommen. Die Spaltung erfolgte mit 1 µg Trypsin über Nacht bei 37°C.

Die so gewonnenen Peptide wurden über RP-HPLC auf einer 2,1 x 215 mm Vydac C18 Säule aufgetrennt (Laufmittel, A: 0,01 % HCOOH in H₂O; B:0,1 % HCOOH in CH₃CN), die Peaks von Hand fraktioniert und anschließend sequenziert (3.3.9).

Über diese Methode lassen sich nur relativ kurze Peptide gewinnen, da die längeren in der Gelmatrix fixiert vorliegen und so nicht eluiert werden können.

3.3.9 N-terminale Sequenzanalyse von Proteinen und Peptiden

Proteine können über den automatisierten Edman-Abbau sequenziert werden. Die jeweils N-terminale Aminosäure wird chemisch in das spezifische PTH Derivat umgewandelt. Durch den Vergleich mit Standard-Aminosäuregemischen werden die PTH-Derivate nach Auftrennung über HPLC den Aminosäuren zugeordnet und somit identifiziert. Die Proben wurden nach Auftropfen oder Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran, im Labor von Dr. Dürr, Zentrale Forschung Dienste Strukturforschung, Bayer AG Leverkusen sequenziert.

Verwendet wurde ein Applied Biosystems Automated Sequencer 476A mit online HPLC. Die erhaltenen Sequenzen wurden zum Teil über MALDI-PSD (Kratos) anhand ihrer Massen verifiziert.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Arbeiten mit Bakterien

Bei allen Arbeiten mit Bakterien wurde sorgfältig auf die Sterilität der Arbeitsgeräte und Medien und somit auf die Vermeidung von Kontaminationen durch andere Mikroorganismen oder Phagen geachtet. Kulturmedien, Lösungen und Arbeitsgeräte wurden autoklaviert oder steril filtriert.

3.4.1.1 Verwendete Bakterienstämme

BL 21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)
HMS 174(DE3)	F ⁻ <i>recA1 hsdR(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) Rif^R</i> (DE3)
AD494(DE3)	<i>Δara-leu7967 ΔlacX74 ΔphoA Pvull phoR Δmal F3</i> F' (<i>lac⁺(lac^g)pro</i>) <i>trxB::kan</i> (DE3)
DH5α	F ⁻ <i>φ80dlacZΔM15 ΔlacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1</i> <i>hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1</i>
Y1090r ⁻	<i>Δ(lac)U169 Δlon? AraD139 strA supF mcrA mcrB hsdR</i> <i>trpC22::Tn10 (Tet^r) (pMC9 Amp^r Tet^r)</i>

Alle Stämme sind *E.coli* K12 Derivate. Sie wurden von den Firmen Novagen (HMS174(DE3); BL 21(DE3)) und Stratagene (Y1090r⁻; DH5α; BL 21(DE3)) bezogen.

DE3-Stämme sind λDE3 lysogen, d.h. sie tragen das Gen für T7 RNA Polymerase unter Kontrolle des *lacUV5* Promotors. Diese Stämme sind damit geeignet zur Expression von Genen unter der Regulation des T7 Promotors.

3.4.1.2 Verwendete Plasmide

pGEX4T2	: pTac-Promotor; Ampicillinresistenz; Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein mit Thrombin abspaltbar
pTrcHisB	: pTrc-Promotor; N-terminaler HisTag
pET 3a	: T7-Promotor;Ampicillinresistenz
pET 14b	: T7-Promotor;Ampicillinresistenz; N-terminaler HisTag mit Thrombin abspaltbar
pET 21d	: T7/lac-Promotor; Ampicillinresistenz; C-terminaler HisTag
pET 32a	: T7/lac-Promotor; Ampicillinresistenz; N,C-terminaler HisTag; Thioredoxin-Fusionsprotein mit Thrombin abspaltbar
pLysS	: pET kompatibles Plasmid, trägt das Gen für Lysozym und reduziert durch dessen Expression die basale Expression von pET-Konstrukten; Chloramphenicolresistenz.
pMosblue	: universelles Plasmid zur Klonierung von DNA Fragmenten; Ampicillinresistenz

3.4.1.3 Oligonukleotide für die PCR

MHDF1	5´-ATGACAACCTACAACAACAAAGGACCA-3´
MHDR1	5´-TTACATTCCAGACCTCACACATTGGGC-3´
MHDFNdel	5´-GGAATTCCATATGACAACCTACAACAACAAAGGACCA-3´
MHDRBamHI	5´-CGCGGATCCTTACATTCCAGACCTCACACCATTGGGC-3´
MHDFRcal	5´-ACACTCATGACAACCTACAACAACAAAGGACCA-3´
MHDFBamHI	5´-CGCGGATCCATGACAACCTACAACAACAAAGGACCA-3´
MHDRNotI	5´-AAGGAAAAAAGCGGCCGCCATTCCAGACCTCACACCATT-3´
MHDREcoRI	5´-CGGAATTCTTACATTCCAGACCTCACACCATTGGGC-3´
HHDFNdel	5´-GGAATTCCTATGACGACTTACAGTGACAAAGGGGC-3´
HHDRBamHI	5´-GCGGATCCTTACATGCCGGGCACCACCC-3´
CHDNdel	5´-GGAATTCCTATGGCATCAGCAGCGG-3´
CHDBamHI	5´-GCGGATCCTTATTGCTTGGCTTCAAGG-3´

RHDNdel	5´-GGAATTCCTATGCCTCCCACTCCCACCCCCACCGCC-3´
RHDBamHI	5´-GCGGATCCTTATTGCTTGGCTTCAAGG-3´
AHDNdel	5´-GGAATTCCTATGGGCCACCAAA-3´
AHDBamHI	5´-GCGGATCCTTATTGCTTGGCTTCAAGG-3´
ΔN31Ndel	5´-GGAATTCCTATGTTTCGTAAGAAAGAATCC-3´
ΔN45Ndel	5´-GGAATTCCTATGCGCTTCCATCACATCGA-3´
ΔN55Ndel	5´-GGAATTCCTATGGACGCAACCAACGTCGCT-3´
ΔN84Ndel	5´-GGAATTCCTATGTCCGGTGACCTCCGATTC-3´
T7P	5´-TAATACGACTCACTAT-3´
T7R	5´-GTTTTCCAGTCACGACGT-3´
MF	5´-CTCTACGGCGACGTCGTGCT-3´
MR	5´-AGCACGACGTCGCCGTAGAG-3´
M2F	5´-CTGCTCCCGCTCAACGAGC-3´
M2R	5´-GCTCGTTGAGCGGGAGCAG-3´

3.4.1.4 Vermehrung von Bakterien

3.4.1.4.1 Flüssigkulturen

Autoklaviertes LB-Medium (Luria-Bertani Medium) wurde, nach Zugabe der jeweils erforderlichen Antibiotika, mit einer einzelnen Kolonie einer Plattenkultur angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden, soweit nicht anders beschrieben, bei 37°C und 200-250 Upm im Schüttler inkubiert.

LB-Medium : 10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl

ad 1000 ml mit H₂O, pH 8,0 mit NaOH einstellen.

Die jeweiligen Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums unter 60°C zugegeben. Dazu wurden 1000 x konzentrierte Stammlösungen hergestellt, diese steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Antibiotika Stammlösungen:

Ampicillin	:	100 mg/ml	in H ₂ O
Carbenicillin	:	100 mg/ml	in H ₂ O
Kanamycin	:	15 mg/ml	in H ₂ O
Chloramphenicol	:	34 mg/ml	in Ethanol (vor Licht geschützt lagern !)

3.4.1.4.2 Fermentation von *E.coli*

Batch-Fermentationen der Expressionsplasmide pET14bMHPD bzw. pET14bAHPD wurden von der Firma Rheinbiotech (Hilden) durchgeführt. Die Fermentationen erfolgten im 20 l Maßstab in LB-Medium + 100 mg/l Carbenicillin, ohne Regulation von pH und pO₂. Ausgehend von einer Plattenkultur wurde zunächst eine 200 ml Vorkultur in LB-Medium + 100 mg/l Carbenicillin beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 3,0-3,5 bei 37°C kultiviert. Mit dieser wurde der Fermenter bei einer Start-OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 30°C gefahren. Nach der Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte die weitere Kultur über Nacht bei 18°C. Die Zellen wurden schließlich durch Durchflußzentrifugation geerntet, 1:1 in Aufschlußpuffer R aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Aufschlußpuffer R: 50 mM KP_i pH 8,0 + 500 mM NaCl

3.4.1.4.3 Plattenkulturen

LB-Medium wurde mit 1,5 % Agar versetzt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde das jeweils erforderliche Antibiotikum zugegeben (3.4.1.4.1) und je 30-35 ml in eine sterile Petrischale gegeben. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Platten bei 4°C gelagert.

Zum Ausplattieren von Kulturen wurden 100-200 µl einer Flüssigkultur auf die Platte gegeben und mittels eines Drygalskispatels gleichmäßig verteilt. Alternativ wurde mittels einer sterilen Impföse eine Einzelkolonie gleichmäßig ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend 14-20 h bei 37°C inkubiert.

3.4.1.4.4 Konservierung von Bakterien

Plattenkulturen können bei 4°C ca. 6 Wochen gelagert werden. Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterien wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 500 µl einer in der stationären Phase befindlichen Flüssigkultur mit dem gleichen Volumen Glycerin vermischt, 20 min auf Eis inkubiert und daraufhin in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.4.1.5 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Die Herstellung transformationskompetenter Bakterien erfolgte nach (Hanahan, 1983). 30 ml LB-Medium wurden mit 0,2 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde 5 min auf Eis gekühlt und dann abzentrifugiert (5 min, 4000 xg, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 10 ml TFB I resuspendiert und erneut 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nochmals wie oben abzentrifugiert und in 2 ml TFB II aufgenommen. Die Suspension wurde weitere 15 min auf Eis inkubiert, in Aliquots von je 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TFB I (TransForming Buffer I) : 30mM Kaliumacetat pH 6,8
10mM CaCl₂
100mM RbCl
50mM MnCl₂
15 % Glycerin (v/v)

TFB II (TransForming Buffer II) : 10mM MOPS pH 5,8
10mM RbCl
15mM CaCl₂
15 % Glycerin (v/v)

3.4.1.6 Transformation von Bakterien mit Fremd-DNA

100 µl transformationskompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 µl eines Ligationsansatzes bzw. 0,01-1 µg Plasmid-DNA für weitere 30 min auf Eis

inkubiert. Die Bakterien erhielten für 30 s einen Hitzeschock bei 42°C und wurden anschließend für weitere 2 min in ein Eisbad überführt. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium wurden die Zellen 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert und schließlich 200 µl auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

SOB-Medium: 20 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 0,5 g NaCl
 ad. 1000 ml mit H₂O; autoklavieren und vor Gebrauch 10 ml
 einer steril filtrierten 1 M MgCl₂-Lösung hinzugeben
SOC-Medium: 2 ml 20 % (w/v) Glucose + 98 ml SOB

3.4.2 Arbeiten mit Phagen

3.4.2.1 Anzucht der Bakterien zur Infektion mit Phagen

50 ml LB-Medium + 0,2 % Maltose wurden mit einer Einzelkolonie Y1090r^r beimpft. Die Kultur wurde 16 h bei 37°C im Schüttler inkubiert und anschließend 10 min bei 4000 xg abzentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden in 20 ml 10 mM MgSO₄ aufgenommen und die OD₆₀₀ durch Verdünnung in SM + 20 mM MgCl₂ auf 2,0 eingestellt.

SM : 0,1 M Tris/HCl pH 7,5
 0,1 M NaCl
 2,0 % Gelatine

3.4.2.2 Herstellung eines Phagenlysates

Je 100 µl der unter 3.4.2.1 gewonnenen Bakterien wurden mit je 100 µl einer 1:10⁴ bzw. 1:10⁵ verdünnten λgt11 cDNA Bank aus Mäuseleber (Clontech) vermischt und in 3 ml 0,7 % Topagar bei 47°C aufgenommen. Die Suspension wurde auf jeweils eine auf 42°C vorgewärmte und unter der Sterilbank getrocknete LB-Agarplatte gleichmäßig verteilt. Nach dem Erstarren wurden die Platten 16 h bei 37°C inkubiert. Die höhere Verdünnung brachte bereits eine konfluente Lyse und wurde zur

Herstellung des Phagenlysates verwendet. Dazu wurden 5 ml SM auf die Platte gegeben, 3 h bei RT inkubiert, anschließend wieder abgenommen und mit 1 ml SM nachgespült. Das Phagenlysat wurde mit 120 µl Chloroform versetzt und Zelltrümmer und Agarreste 10 min bei 5000 xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4°C gelagert.

3.4.2.3 Isolation von Phagen DNA

Die Isolation von Phagen DNA wurde unter Verwendung des Lambda DNA Kits (Qiagen) durchgeführt. 10 ml Phagenlysat wurden mit 30 µl L1 für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurden 2 ml 4°C kalter Puffer L2 hinzugegeben und die Mischung für 60 min auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C für 10 min bei 10000 xg. Das Pellet wurde in 1 ml L3 resuspendiert, vorsichtig mit 1 ml L4 vermischt, 10 min im Wasserbad bei 70°C inkubiert, in ein Eisbad überführt, mit 1 ml L5 versetzt und bei 4°C für 30 min bei 15000 xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut bei 4°C für 10 min bei 15000 xg zentrifugiert.

Der so geklärte Überstand wurde auf eine bereits mit 1 ml Puffer QBT equilibrierte QiagenTip 20 aufgetragen. Nach dem Einsinken wurde mit 2 ml QC gewaschen und die DNA mit 1,5 ml QF eluiert.

Zur Fällung wurde die DNA mit 0,7 Volumina 2-Propanol versetzt und 30 min bei 4°C und 15 000 xg pelletiert. Abschließend wurde die DNA mit 1,5 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut bei 4°C für 10 min bei 15000 xg abzentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde in 100 µl TB aufgenommen.

- L1 : 300 mM NaCl; 100 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,2 mg/ml BSA; 20 mg RNase A; 6 mg/ml DNase 1
- L2 : 30 % PEG 6000; 3 M NaCl
- L3 : 100 mM NaCl; 100 mM Tris/HCl pH 7,5; 25 mM EDTA
- L4 : 4 % SDS
- L5 : 3 M Kaliumacetat pH 5,5
- QBT : 750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15 % Ethanol; 0,15 % Triton X-100
- QC : 1,0 M NaCl; 50 mM MOPS pH7,0; 15 % Ethanol
- QF : 1,25 M NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 8,5; 15 % Ethanol
- TB : 10 mM Tris/HCl pH 8,5

3.4.3 Arbeiten mit RNA

Bei allen Arbeiten mit RNA wurden stets nur RNase freie Puffer verwendet. Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden doppelt autoklaviert. RNA-Präparationen wurden mit 0,2 U/ μ l RNase Inhibitor (Invitrogen) versetzt und bei -20°C gelagert.

3.4.3.1 Isolierung von RNA aus pflanzlichen Geweben

Die RNA Isolierung erfolgte mit dem „RNeasy Plant Mini Kit“ (Qiagen). Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in tiefgefrorenem Zustand fein aufgemörsert. Je 100 mg Gewebe wurden in 450 μ l Guanidiniumisothiocyanatpuffer (RLT) aufgenommen, die Zellen so lysiert und die Proteine denaturiert. Durch eine Zentrifugation durch einen „Qiashreder“ wurde das Zellmaterial homogenisiert. Das Lysat wurde nun mit 225 μ l Ethanol versetzt und durch Zentrifugation an eine Silicagel Matrix (RNeasy Mini Spin column) gebunden. Die RNA wurde einmal mit 700 μ l Puffer RW1 und zweimal mit 500 μ l Puffer RPE gewaschen. Die RNA (10-20 μ g) wurde mit 50 μ l H_2O von der Säule eluiert.

RLT, RW1, RPE : keine Herstellerangaben

3.4.3.2 RT-PCR

Bei der RT-PCR wird polyadenylierte mRNA zunächst mit reverser Transkriptase (RT) in cDNA übersetzt. Die gewünschte cDNA wird nun mit genspezifischen Primern amplifiziert.

3.4.3.2.1 Synthese von Erststrang cDNA mit reverser Transkriptase

Zur Synthese von cDNA aus RNA mit einem hohen Gehalt von Sekundärstruktur wurde die „displayTHERMO-RT“ von Display Systems Biotech verwendet. Die RNA wird zunächst 10 min bei 65°C denaturiert und anschließend 40 min bei 42°C und 15 min bei 65°C durch die reverse Transkriptase transkribiert.

Versuchsansatz:	4	µl	5x displayTHERMO-RT Puffer
	2	µl	dNTP Mix (5 mM)
	2	µl	T ₂₅ V Primer oder genspezifischer Primer (10 µM)
	1	µl	Initiator Mix
	1	µg	RNA
ad	18	µl	H ₂ O (RNase frei)

Nach der 10 minütigen Inkubation bei 65°C werden 2 µl Terminator Mix zugegeben. Die cDNA konnte entweder sofort für die PCR verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

3.4.3.2.2 PCR zur Amplifikation einer spezifischen cDNA

Die gesuchte cDNA wurde über eine modifizierte PCR (vgl. 3.4.5.1) mit genspezifischen Primern amplifiziert.

Der hohe Sekundärstrukturanteil der RNA und damit auch der cDNA machte eine Verlängerung der Elongationszeit auf 10 min und eine Erhöhung der Zyklenzahl auf 35 nötig. Zur Erhöhung der Spezifität wurden 10 % (v/v) „Q-Solution“ (Qiagen) zugegeben.

3.4.4 Arbeiten mit DNA

3.4.4.1 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in Agarosegelen. Als Laufpuffer wurde TBE oder TAE verwendet. Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 1,0 - 1,5 % Agarose (w/v) (Biozym) in Laufpuffer aufgekocht bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Die gelöste Agarose wurde mit H₂O wieder auf das Ausgangsvolumen gebracht und nach Abkühlen der Lösung auf 50-60°C mit 0,05 % Ethidiumbromid zur Detektion der DNA unter UV-Licht versetzt. Die Agarose wurde nun in vorbereitete Gelkammern gegossen und nach dem Erstarren mit Laufpuffer überschichtet.

Die zu trennenden Proben wurden mit einem Fünftel ihres Volumens 6x Probenpuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 8-10

mA/cm Gellänge für 45-120 min. Die aufgetrennte DNA konnte unter UV-Licht ($\lambda=254$ nm) aufgrund der Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids detektiert werden.

TAE : 40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA gelöst bei pH 8,0

TBE : 90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA gelöst bei pH 8,0

6x Probenpuffer : 30 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

3.4.4.2 DNA-Sequenzierung („Cycle Sequencing“)

Die DNA Sequenzierung unter gleichzeitiger Anwendung der Polymerase Kettenreaktion (PCR; vgl.3.4.5.1) beruht auf der Kettenabbruchmethode nach (Sanger *et al.*, 1977). Die benötigten DNA-Mengen sind hier jedoch deutlich kleiner, da die DNA-Vorlage nach jedem Amplifizierungszyklus und darauffolgender Denaturierung wieder freigesetzt wird und damit erneut für die Anlagerung des Primers zur Verfügung steht.

1 μ g einer Plasmid-DNA-Vorlage wurde mit 3,2 pmol Sequenzierprimer und 7 μ l PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Terminator Mix) versetzt und mit H₂O auf 20 μ l aufgefüllt. Der Terminator Mix (Applied Biosystems) bestand aus dNTPs, sowie aus mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs in jeweils optimierten Konzentrationen. Außerdem waren 168,4 mM Tris/HCl pH 9,0; 4,2 mM (NH₄)₂SO₄; 42,1 mM MgCl₂ und 0,42 U/ μ l AmpliTaq DNA-Polymerase enthalten. Die Sequenzierreaktion mit dem Temperaturprofil einer PCR führte zur Amplifikation von verschiedenen langen DNA-Fragmenten, die jeweils mit einem fluoreszenzmarkierten ddNTP endeten. Die Reaktionsprodukte wurden mit Hilfe von Micro-Spin S-200 Säulchen (Pharmacia) aufgereinigt, mit Ethanol gefällt und auf ein Polyacrylamid Gel aufgetragen. Die Elektrophorese, Detektion der Fluoreszenzsignale, sowie deren Auswertung wurden mit einem ABI Prism DNA-Sequenator (Modell 373, Applied Biosystems) durchgeführt.

3.4.4.3 Vermehrung und Präparation von DNA-Fragmenten

3.4.4.3.1 Schnellisolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Schnellisolierung bis 20 µg Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Plasmid Mini Prep Kits (Qiagen) modifiziert nach (Birnboim and Doly, 1979) durchgeführt. Die Bakterien werden dabei durch eine NaOH/SDS-Behandlung lysiert und Proteine sowie genomische DNA durch Kaliumacetat gefällt. Die weitere Reinigung der Plasmid-DNA geschieht durch Ionenaustauschchromatographie.

4 ml einer *E.coli* Übernachtskultur wurden bei 4000 xg 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl P1 resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 300 µl P2 gegeben und die Zellen maximal 5 min bei RT lysiert. Anschließend wurden 350 µl N3 hinzupipettiert, und denaturierte Nukleinsäuren und Proteine wurden durch Zentrifugation (10000 xg 10 min, 4°C) entfernt. Der so gewonnene Überstand wurde auf eine Qiaprep spin Säule aufgetragen und 1 min bei 10000 xg abzentrifugiert. Die Säule wurde nun nacheinander mit 500 µl PB und 750 µl PE gewaschen, die Puffer jeweils wie oben abzentrifugiert und verworfen. Nach einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt, zur Entfernung von Pufferresten, kann die an die Säule gebundene Plasmid-DNA durch eine weitere Zentrifugation in 50 µl TE eluiert werden.

P1 : 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100µg/ml RNase A

P2 : 200 mM NaOH; 1 % SDS

N3+PB+PE : keine Herstellerangaben

3.4.4.3.2 Midipräparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Reinigung von Plasmid-DNA bis 100 µg wurde der Plasmid Midi Kit (Qiagen) verwendet. Die Methode beruht auf den gleichen Prinzipien wie der Mini prep Kit (3.4.4.3.1). 100 ml Bakterienkultur wurden abzentrifugiert (4000 xg, 10 min 4°C) und das Pellet in 4 ml P1 resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde das gleiche Volumen P2 dazugegeben, der Ansatz gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Es wurden nun 4 ml P3 hinzugefügt, erneut gemischt und präzipitiertes Protein und DNA abzentrifugiert (20000 xg, 30 min 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert (20000 xg, 15 min, 4°C). Der geklärte Überstand wurde nun auf

eine mit QBT (3.4.2.3) equilibrierte QiaTip 100 Säule aufgetragen. Nach dem Einsinken der Probe wurde die Säule mit 2 x 10 ml QC gewaschen und die DNA mit 5 ml QF eluiert. Anschließend erfolgte eine 2-Propanolfällung (3.4.4.2)

3.4.4.4 Reinigung und Konzentrierung von DNA

3.4.4.4.1 Ethanolfällung

Gelöste Nukleinsäuren wurden nach Zugabe von 1/10 des Probenvolumens 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 3 Volumina Ethanol auf Eis bzw. bei -20°C, 15 min bis über Nacht gefällt und durch Zentrifugation (20-30 min, 15000 xg, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit wenig Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Das trockene Pellet wurde in H₂O oder TB-Puffer (s. 3.4.2.3) aufgenommen.

3.4.4.4.2-Propanolfällung

Durch Zugabe von 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat pH 4.8 und 1 Volumen 2-Propanols wurden durch 30 min Inkubation auf Eis Nukleinsäuren gefällt und anschließend wie unter 3.4.4.4.1 abzentrifugiert und resuspendiert.

3.4.4.4.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde zunächst das, das jeweilige DNA-Fragment enthaltende Agarosestück aus dem Gel ausgeschnitten. Die weiteren Schritte wurden unter Verwendung des Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) durchgeführt. Das Agaroseblöckchen wurde im dreifachen Volumen des Gelstückgewichtes Puffer QX1 (3 M NaI, 4 M NaClO₄, 10 mM Na₂SO₃, 10 mM Tris/HCl pH 7,0) aufgenommen und 10 min bei 50-60°C bis zur vollständigen Auflösung der Agarose inkubiert. Die Suspension wurde nun auf eine Qiaquick Spin Säule gegeben und 1 min bei 14000 Upm in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert. Die DNA bindet bei diesem Schritt an die Säule. Als erster Waschschrift wurden 750 µl QX1 auf die Säule gegeben und wie oben abzentrifugiert. In einem zweiten

Waschschritt wurden 750 µl Puffer PE (keine Herstellerangaben) auf die Säule pipettiert und wie oben abzentrifugiert.

Zur Entfernung etwaiger Reste des Puffers PE wurde dieser verworfen und die Säule erneut wie oben zentrifugiert. Die DNA wurde in einem Volumen von 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5 durch eine weitere Zentrifugation eluiert.

3.4.5 Enzymatische Reaktionen an DNA

3.4.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Durch die PCR können innerhalb kurzer Zeit definierte DNA-Abschnitte bis zu 10^6 fach amplifiziert werden (Saiki *et al.*, 1985). Die gewünschte DNA-Sequenz wird mit Hilfe zweier Oligonukleotide als Primer, die jeweils komplementär an Strang und Gegenstrang des DNA-Abschnitts binden, und der thermostabilen Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq) bzw. *Pyrococcus woesei* (Pwo) vervielfacht. Ein Standard PCR-Reaktionszyklus hatte folgendes Profil:

1. Denaturierung der zu amplifizierenden DNA bei 94°C für 30 s (vor Beginn der Reaktion für 3 min)
2. Anlagerung („Annealing“) der Primer bei 50-70°C
3. Elongation bei 72°C für 1-4 min (Als Abschluß 7 min)

Die Schritte 1.-3. wurden 25-35 Mal wiederholt.

3.4.5.2 Spaltung der DNA durch Restriktionsendonucleasen

Zur Charakterisierung von DNA durch Restriktionsanalyse oder bei der Konstruktion von Plasmiden wurden 0,1-2,0 µg DNA mit 0,1-2 U verschiedener Restriktionsendonucleasen für 60-120 min nach den jeweiligen Angaben des Herstellers gespalten. Bei Doppelspaltungen mit Enzymen unterschiedlicher Pufferanforderungen wurde zuerst mit dem Enzym gespalten, das die niedrigere Salzkonzentration benötigt, dann die Salzkonzentration erhöht und das zweite Restriktionsenzym zugegeben. Zur Kontrolle der Reaktion wurden die Ansätze auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (3.4.4.1).

3.4.5.3 Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase wurde durchgeführt, um die 5'-Phosphorsäuremonoester zu hydrolysieren, die nach Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen entstanden. Alle verwendeten Vektoren wurden so behandelt, um eine mögliche Religation zu verhindern. Die geschnittene DNA wurde mit 0,2 U „shrimp“ alkalischer Phosphatase pro μg Plasmid-DNA für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Inkubation für 20 min bei 65°C gestoppt.

3.4.5.3 Ligation von DNA Fragmenten

Die dauerhafte Verbindung von zwei DNA-Fragmenten erfordert die Knüpfung von Phosphodiesterbindungen mit Ligase. Dazu muß zumindest ein DNA-Fragment ein 5'-Phosphat tragen. Standard-Ligationsansätze wurden bei einem molaren Vektor zu Insert Verhältnis von 1:1 und 1:3 durchgeführt. Die Ligation erfolgte für 16 h bei 16°C.

150 - 300 ng Vektor DNA
x ng Insert DNA (molares Verhältnis Vektor : Insert s.o.)
2 μl 10x Ligationspuffer (Gibco)
1 μl T4-Ligase (Gibco)
ad 20 μl mit H₂O

3.4.6 Expression von rekombinanten Proteinen in *E.coli*

Die Expression von rekombinanten Proteinen erfolgte in Flüssigkulturen (3.4.1.4.1). Diese wurden mit stationären Kulturen der verschiedenen *E.coli* K12 Stämme (3.4.1.1), transformiert mit unterschiedlichen Expressionsplasmidkonstrukten bei einer OD₆₀₀ von 0,1 - 0,2 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Zur Optimierung der Expression des jeweiligen Konstruktes wurden die Kulturen für verschiedene Zeiten (4-16 h) bei unterschiedlichen Temperaturen (18°C-37°C) bei 200 Upm inkubiert.

3.4.6.1 Zellaufschluß von *E.coli* durch Ultraschall

Die rekombinanten *E.coli* Zellen wurden durch gepulsten Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen in einem Rosettengefäß auf Eis in einem Branson Sonifier 250 mit MacroTip für 7 min, bei 50 % Intensität und 50 % „Duty-Cycle“ sonifiziert. Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile wurden anschließend abzentrifugiert (20000 xg, 15 min, 4°C).

3.4.6.2 Reinigung von rekombinanter 4-HPPD über Metallchelatchromatographie

Die Reinigung der rekombinanten 4-HPPD mit N-terminaler 6x Histidinmarkierung (HisTag; Plasmidkonstrukte pET14bAHPD, pET14bRHD, pET14bMHPD) erfolgte durch Metallchelatchromatographie über eine mit Co^{2+} beladene Talonsäule (Clontech). Dazu wurde der nach Zellaufschluß erhaltene Zentrifugationsüberstand auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 30 Säulenvolumen Aufschlußpuffer R (3.4.1.4.2) gewaschen und unspezifisch gebundene Proteine mit 15 Säulenvolumina 100 mM HEPES/NaOH pH 7,0; 200 mM NaCl; 15 mM Imidazol entfernt. Die Elution der His-4-HPPD erfolgte in einem Schritt mit 3 Säulenvolumina 100 mM HEPES/NaOH pH 7,0; 200 mM NaCl; 250 mM Imidazol. Das Protein wurde über Ultrafiltration (3.3.3.1) eingeeengt und in 10 mM HEPES/NaOH pH 7,0 umgepuffert.

3.4.6.3 Abspaltung des N-terminalen HisTag

Die Abspaltung des HisTag von rekombinanter 4-HPPD erfolgte durch Inkubation mit rekombinantem, biotinyliertem Thrombin (Novagen).

Die Proteinlösung wurde 16 h bei 4°C mit 0,5 U Thrombin/mg Protein inkubiert.

Das biotinylierte Thrombin konnte nach einer Inkubation mit 20 µl Streptavidin Agarose/U Thrombin für 60 min bei 4°C gebunden und durch eine Zentrifugation (5 min, 10000xg, 4°C), oder Filtration der Probe über einen 0,22 µm Membranfilter (Millipore GV) entfernt werden.

3.4.6.4 Reinigung von rekombinanter ara 4-HPPD durch Ionenaustauschchromatographie

Nach der Abspaltung des N-terminalen HisTag wurde dieser und die verbliebenen Verunreinigungen durch Ionenaustauschchromatographie über eine Resource Q Säule (Säulenvolumen 6 ml; Flußrate 6 ml/min) (Pharmacia) abgetrennt. Die Säule wurde zunächst mit 10 Säulenvolumen Puffer A (50 mM Hepes/NaOH pH 7,0) equilibriert. Es wurden jeweils 50-120 mg rekombinanter *Arabidopsis thaliana* 4-HPPD in 10 mM Hepes/NaOH pH 7,0 aufgetragen. Ungebundenes Protein wurde durch Waschen mit 4 Säulenvolumen Puffer A entfernt. Die Auftrennung und Elution der 4-HPPD erfolgte in einem linearen Gradienten von 0-300 mM NaCl. Anschließend wurde die Säule mit je 3 Säulenvolumen 1 M NaCl und Puffer A gewaschen. Aliquots der gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch über SDS-PAGE (3.3.4.1) aufgetrennt, die Fraktionen mit 4-HPPD vereinigt, über Ultrafiltration (3.3.3.1) eingeeengt und in 10 mM Hepes/NaOH pH 7,0 umgepuffert. Das Protein wurde so für die Kristallisation verwendet (3.5) oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.5 Kristallographische Methoden

3.5.1 Kristallisation von rekombinanter ara 4-HPPD

Gereinigte rekombinante ara 4-HPPD wurde durch Ultrafiltration in 10 mM Hepes/NaOH pH 7,0 umgepuffert und eingeeengt bis zu einer Konzentration von 12 mg/ml. Die Kristallisation wurde nach dem Dampfdruckdiffusionsverfahren, (McPherson, 1982) im hängenden Tropfen durchgeführt. Ein das Protein und einen Anteil Reservoirlösung enthaltender Tropfen befand sich an der Unterseite eines silikonisierten Deckglases über einem mit Präzipitant gefülltem Reservoir. Das Deckglas verschloß das Reservoir luftdicht. Die höher konzentrierte Reservoirlösung entzog dem Tropfen langsam über den Dampfdruck Wasser. Der Tropfeninhalt wurde ankonzentriert bis das Protein kristallisierte. Die ara 4-HPPD kristallisierte in einer 1:1 Mischung aus Proteinlösung und 50 % MPD + 6 % PEG 200 in 25 mM Natriumcitrat/HCl pH 5,6.

3.5.2 Datensammlung und Datenauswertung

Die Kristalle rekombinanter 4-HPPD wurden entweder in eine silanisierte Glaskapillare montiert, oder mit einer Nylonschlinge aufgenommen und in flüssigem N₂ schockgefroren.

Die Messung erfolgte mit Graphit monochromatisierter CuK α Röntgenstrahlung ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$) von einem Rigaku RU 200 Röntgendrehanodengenerator (Rigaku, Tokyo, Japan; maximale Leistung: 45kV bei 120 mA) auf einer Imageplate (MarResearch, Hamburg). Zur Bestimmung der Kristallorientierung und der Elementarzellparameter, sowie zur weiteren Prozessierung der Diffraktionsdaten wurde MOSFLM 6.00 (Leslie, 1998) verwendet. Die Datenskalierung und Reduktion wurde mit SCALA und TRUNCATE aus dem CCP4 Programmpaket (Collaborative Computational Project, 1994) durchgeführt.

3.6 Kristallisation von rekombinanter anorganischer Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Gereinigte rekombinante anorganischer Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae*. wurde durch Ultrafiltration bis auf 7–9 mg/ml eingengt. Die Kristallisation erfolgte nach dem Dampfdruckdiffusionsverfahren im sitzenden Tropfen (McPherson, 1982). Der Tropfen befand hier oberhalb eines mit Präzipitant gefüllten Reservoirs auf einem Plastiksockel. Das Reservoir wurde luftdicht mit transparenter Klebefolie verschlossen. Die höher konzentrierte Reservoirlösung entzog dem Tropfen langsam über den Dampfdruck Wasser. Der Tropfeninhalt wurde ankonzentriert bis das Protein kristallisierte. Die PPase kristallisierte in einer 1:1 Mischung aus Proteinlösung und 30 – 35 % PEG 1000 + 0,1 M Na-Citrat/HCl pH 6,0.

3.6.1 Strukturlösung Modellbau und Verfeinerung

Für alle Patterson-Suchen wurde das Programm AMoRe (Navaza, 1994) verwendet. Als Suchmodell diente die *Saccharomyces cerevisiae* PPase (Harutyunyan *et al.*, 1996). Alle Verfeinerungen wurden mit X-PLOR 3.851 (Brünger, 1992a) durchgeführt. Als Zielfunktion wurde der kristallographische R-Faktor minimiert, wobei geometrische Parameter (Engh and Huber, 1991) berücksichtigt wurden. Um

ein objektives Kriterium für den Erfolg der Verfeinerung zu haben, wurden 5 % aller Reflexe zufällig ausgewählt und als *Testset* nicht mit in die Verfeinerung einbezogen (Brünger, 1992b). Der aus ihnen berechnete *freie* R-Faktor liegt im Regelfall etwa 5 % höher als der kristallographische R-Faktor und warnt vor einer Überanpassung der Messdaten an das Modell. Im Anschluß an die Verfeinerungen wurden individuelle Temperaturfaktoren korrigiert. Atomare Modelle wurden mit dem Programm O Version 6.2.3 (Jones *et al.*, 1991) in die Elektronendichte eingepasst.

Die Inhibitormodelle wurden mit dem Programm SYBYL Version 6.4 (Tripos Inc., St. Louis, USA 1997) generiert und energetisch minimiert.

Ergebnisse

4.1 4-HPPD aus *Zea mays*

4.1.2 Vorversuche zur Wahl des Ausgangsmaterials

Das Ausgangsmaterial für eine erfolgreiche Reinigung von 4-HPPD aus einer Pflanze sollte eine möglichst hohe spezifische 4-HPPD Aktivität und eine möglichst wenig komplexe Proteinzusammensetzung aufweisen. Zunächst wurden verschieden alte Keimlinge der Kulturpflanzen Mais und Reis auf ihre 4-HPPD Aktivität hin untersucht (vgl. Abb. 11). Es wurden jeweils gleich alte etiolierte und normal ergrünte Keimlinge verglichen.

Bei Reis zeigte sich eine von Keimlingsalter und Etiolierung relativ unabhängige spezifische 4-HPPD Aktivität von etwa 0,03 nmol 4-HP/mg Protein/min. Die spezifische Aktivität des Enzyms in Maiskeimlingen war bei 3 Tage alten Pflanzen ca. 3x höher, 0,095 nmol 4-HP/mg Protein/min. Sie sank mit zunehmendem Keimlingsalter allerdings deutlich ab. Außerdem ist die zur Verfügung stehende Biomasse bei Maiskeimlingen deutlich größer als bei Reiskeimlingen. Für die Reinigung wurden 6 Tage alte etiolierte Maiskeimlinge verwendet. Dieses Ausgangsmaterial wies eine relativ niedrige Komplexität in der Proteinzusammensetzung, d.h. eine relativ hohe spezifische Aktivität der 4-HPPD bei einer ausreichenden Verfügbarkeit von Biomasse auf.

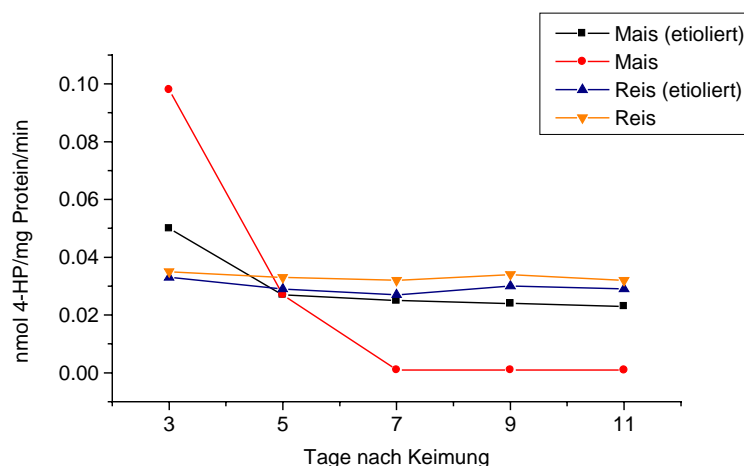


Abb. 11 Spezifische 4-HPPD Aktivität verschieden alter Keimlinge von Mais und Reis.

4.1.3 Einleitende Charakterisierung der Mais 4-HPPD

Eine korrekte Bestimmung der 4-HPPD Aktivität im Maisrohextrakt nach Zellaufschluß war wegen der Existenz eines unbekanntes, niedermolekularen Inhibitors des Enzyms nicht möglich. Der Inhibitor konnte durch eine Ammoniumsulfatfällung oder durch Gelfiltrationschromatographie über Sephadex G25 vollständig abgetrennt werden (s. Tab. 2). Die Mais 4-HPPD im mit Ammoniumsulfat gefällten Rohextrakt wurde daher für alle im folgenden beschriebenen Experimente zur einleitenden Charakterisierung verwendet.

	nmol/mg Protein/min
Rohextrakt	0.005 ± 0.002
nach Sephadex G25	0.025 ± 0.004
nach Ammoniumsulfatfällung	0.024 ± 0.004

Tab. 2 Spezifische 4-HPPD Aktivität von 6 Tage alten Maiskeimlingen nach Zellaufschluß; Ammoniumsulfatfällung (80 %), oder Umpuffern über Sephadex G25.

4.1.3.1 Bestimmung der pH Stabilität

Die pH Stabilität der Mais 4-HPPD wurde anhand einer mit Ammoniumsulfat gefällten und über DEAE-Sepharose vorgereinigten Probe bestimmt.

Die Proben wurden vor der Aktivitätsbestimmung 4 h im entsprechenden Puffer inkubiert. Zwischen pH 5 und pH 6,5 wurde Na-Citrat, zwischen pH 7 und pH 9 wurde Tris als Puffersubstanz verwendet.

Die Mais 4-HPPD besitzt einen relativ schmalen Bereich der pH Stabilität zwischen pH 7,0 und pH 8,0 (s. Abb. 12). Unterhalb von pH 5,5 bzw. oberhalb von pH 8,5 ist dagegen kaum noch Enzymaktivität nachweisbar. Bei sauren pH Werten wird wahrscheinlich das Fe^(II) im aktiven Zentrum der 4-HPPD oxidiert.

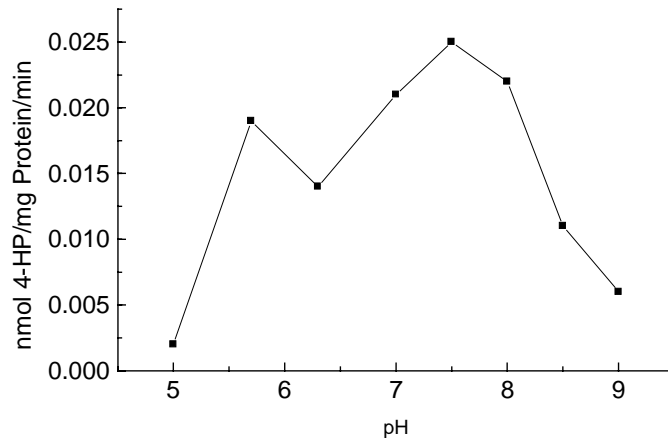


Abb. 12 Bestimmung der pH Stabilität der Mais 4-HPPD.

4.1.3.2 Effekt verschiedener zweiwertiger Ionen auf die Enzymaktivität

Mais 4-HPPD besitzt ein Fe(II) im aktiven Zentrum. Wird dieses Fe(II) zu Fe(III) oxidiert, so ist die 4-HPPD nicht mehr aktiv. Es wurde versucht, das Enzym durch die Zugabe von Fe(II) und verschiedener anderer zweiwertiger Ionen zu stabilisieren (vgl. Tab. 3).

Die Metallionen wurden jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen (0,01 mM, 0,1 mM; 1,0 mM) zum Testansatz hinzugefügt. Cu^{2+} störte den radioaktiven Aktivitätstest schon in der niedrigsten Konzentration erheblich. Bei Mn^{2+} ließ sich in den beiden höheren Konzentrationen ein leicht stabilisierender Effekt beobachten. Zn^{2+} wirkte in den beiden höheren Konzentrationen inhibierend auf das Enzym. Mg^{2+} und Ca^{2+} zeigten keinen Effekt auf die Aktivität der Mais 4-HPPD, bzw. sie wirkten in einer Konzentration von 1 mM leicht inhibierend. EDTA und EGTA als Komplexbildner mit zweiwertiger Ionen haben in den genannten Konzentrationen ebenfalls keinen Effekt auf die 4-HPPD Aktivität, wirken in höheren Konzentrationen allerdings inhibierend. Dies beruht auf ihrer Fähigkeit Fe^{2+} zu chelatieren.

Metallion	Aktivität [%]		
	0,01 mM	0,1 mM	1,0 mM
Fe ²⁺	101	98	97
Ca ²⁺	100	101	92
Mn ²⁺	98	102	112
Zn ²⁺	84	67	18
Mg ²⁺	101	98	91
Cu ²⁺	-*	-*	-*
EDTA	101	97	99
EGTA	95	98	97

Tab. 3 Effekte verschiedener zweiwertiger Ionen auf die 4-HPPD Aktivität im Maisrohextrakt im radioaktiven Aktivitätstest; * = konnte nicht bestimmt werden.

4.1.3.3 Inhibition und Stabilisierung von Mais 4-HPPD durch Sulcotrion

Die Mais 4-HPPD ließ sich wie alle bisher bekannten 4-HPPDs durch 1,3-Diketone wie z.B. Sulcotrion inhibieren. Der pl_{50} Wert konnte mit 8.5 bestimmt werden. Gleichzeitig wurde das Enzym aber auch durch die Zugabe von Sulcotrion in Lösung stabilisiert. Bei Lagerung bei 4°C verlor ein Maisrohextrakt innerhalb von 24 h 53 % seiner 4-HPPD Aktivität. Nach 96 h bei 4 °C war keine Enzymaktivität mehr messbar. Zur Stabilisierung der Enzymaktivität wurde Sulcotrion in Konzentrationen von 10^{-8} M– 10^{-5} M zugegeben. Nach der Lagerung wurde zur Aktivitätsbestimmung der 4-HPPD das Sulcotrion über Gelfiltration entfernt. Bereits bei der niedrigsten Sulcotrionkonzentration konnte eine deutliche Stabilisierung der Mais 4-HPPD beobachtet werden. Bei einer Sulcotrionkonzentration von 10^{-5} M konnten die Aktivitätsverluste um 50 % vermindert werden (s. Tab. 4).

Fraktion	Lagerung	Aktivität [%]
Maisrohextrakt	„frisch“	100
	- 80 °C	90
	24 h 4°C	47
	24 h 4°C + 10 ⁻⁸ M Sulcotrion	61
	24 h 4°C + 10 ⁻⁷ M Sulcotrion	64
	24 h 4°C + 10 ⁻⁶ M Sulcotrion	73
	24 h 4°C + 10 ⁻⁵ M Sulcotrion	74

Tab. 4 Stabilisierung von Mais 4-HPPD durch Sulcotrion; Lagerung 24 h bei 4°C.

4.1.4 Reinigung von 4-HPPD aus Mais

Das Ausgangsmaterial für die Reinigung von 4-HPPD aus Mais bildeten 5 kg etiolierte, 6 Tage alte Maiskeimlinge. Diese wurden in Portionen von jeweils 500 g verarbeitet und zum geeigneten Zeitpunkt während der Reinigung vereinigt.

Mais 4-HPPD konnte zur Aufbewahrung während der Reinigung ohne größeren Aktivitätsverlust (5-10 %) in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert werden (vgl. Tab. 4). Die Reinigung bestand aus einer Ammoniumsulfatfällung und verschiedenen chromatographischen Methoden. Die gesamte Reinigung ist in Tab. 5 zusammengefasst. Insgesamt konnte ein Anreicherungsfaktor von 1251 erreicht werden. Die Ausbeute an 4-HPPD betrug 0,6 % oder ca. 20 µg, welche zur Mikrosequenzierung verwendet wurden. Die Aktivitätsverluste bei den einzelnen Chromatographieschritten waren teilweise erheblich und eine Stabilisierung der Mais 4-HPPD während der Aufreinigung durch die Zugabe von mindestens 10 % Glycerin und 2 µM Sulcotrion zu allen verwendeten Puffern nur zum Teil erfolgreich.

4.1.4.1 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Den ersten Reinigungsschritt bei der Aufreinigung von nativer Mais 4-HPPD bildete eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung zwischen 45 % und 22 %. Unterhalb von 22 % ist Mais 4-HPPD gut löslich. Oberhalb von 45 % fällt kein weiteres Enzym mehr aus. Nach dem Zellaufschluß in der Zentrifugalmühle (Retsch) wurde der so erhaltene Rohextrakt zunächst mit 45 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt und

abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Aufschlußpuffer M resuspendiert, erneut mit 22 % (w/v) versetzt und wiederum abzentrifugiert.

Bei diesem Schritt werden bereits kontaminierende Proteine sowie ein Großteil von niedermolekularen Inhaltsstoffen wie Phenole und andere sekundäre Pflanzenstoffe abgetrennt. Durch die Ammoniumsulfatfällung wurde die 4-HPPD Aktivität um den Faktor 2,5 (s. Tab. 5) angereichert. Die Ausbeute in diesem Schritt betrug 77,5. Der so erhaltene Überstand konnte sofort für die hydrophobe Interaktionschromatographie auf Phenylsepharose verwendet werden.

4.1.4.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Der nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung erhaltene Überstand wurde auf eine mit 50 mM Tris/HCl pH 7,5 + 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 10 % Glycerin equilibrierte Phenyl-Sepharose FF Säule aufgetragen. Die Leitfähigkeit wurde in einem Schritt auf 10 % abgesenkt und kontaminierende Proteine abgetrennt (s. Abb. 13). Die Mais 4-HPPD bindet sehr stark an die Phenyl-Sepharose, so daß zur vollständigen Elution eisgekühlter 10 mM Tris/HCl pH 7,5 + 20 % Glycerin Puffer verwendet werden mußte. Die Ausbeute in diesem Reinigungsschritt lag bei 17 %, bei einer Anreicherung der 4-HPPD um den Faktor 7. Die die Aktivität enthaltenden Fraktionen von jeweils drei Säulenläufen wurden vereinigt.

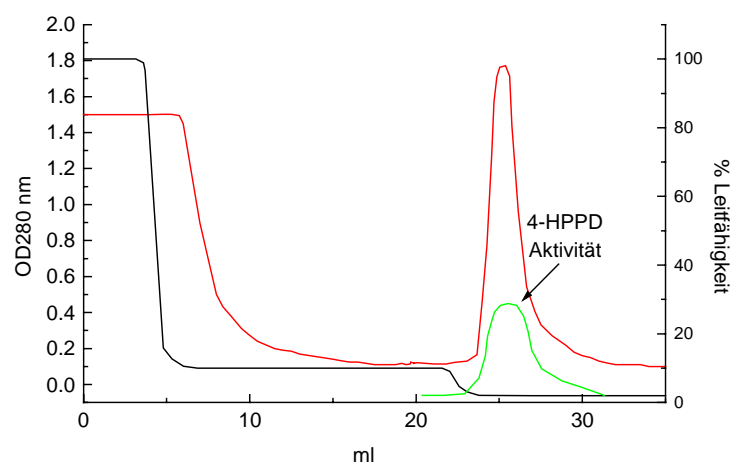


Abb. 13 Reinigung von Mais 4-HPPD über Phenyl-Sepharose FF; die 4-HPPD Aktivität ist in grün eingezeichnet.

4.1.4.3 DEAE-Sephrose FF

Zur weiteren Reinigung des Enzyms wurde eine Ionenaustauschchromatographie über den schwachen Anionenaustauscher DEAE-Sephrose FF durchgeführt. Die Säule war equilibriert mit 50 mM Tris/HCl pH 7,5. Die 4-HPPD Aktivität eluierte in einem linearen Gradienten zwischen 100 und 200 mM NaCl (vgl. Abb. 14).

Der Anreicherungsfaktor lag in diesem Schritt bei 3,5 bei einer Ausbeute von 30 %

Die Fraktionen mit 4-HPPD Aktivität wurden vereinigt, durch Ultrafiltration in einer Amicon Rührzelle entsalzt, und umgepuffert in 50 mM Tris/HCl pH 7,5 + 10 % Glycerin.

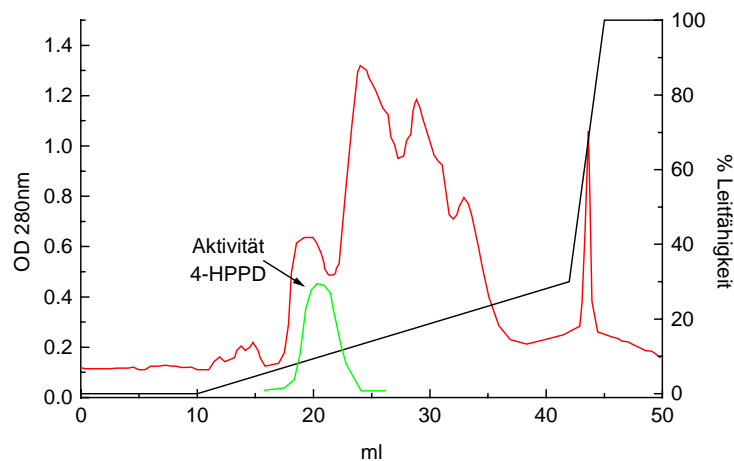


Abb. 14 Reinigung von Mais 4-HPPD über DEAE-Sephrose FF; die 4-HPPD Aktivität ist in grün eingezeichnet.

4.1.4.4 Mono Q

Die gesammelten Fraktionen von 2 DEAE-Sephroseläufen wurden auf einer Mono Q HR 10/10 Säule weiter aufgereinigt. Mono Q ist ein starker Anionenaustauscher mit einer etwas anderen Spezifität als DEAE-Sephrose und einer wesentlich höheren Auflösung. Die Säule war ebenfalls mit 50 mM Tris/HCl pH 7,5 equilibriert und die 4-HPPD Aktivität eluierte in einem linearen Gradienten zwischen 100 und 150 mM NaCl (s. Abb. 15). Die Ausbeute lag hier bei 28,3 %; bei einem Anreicherungsfaktor von 2,5.

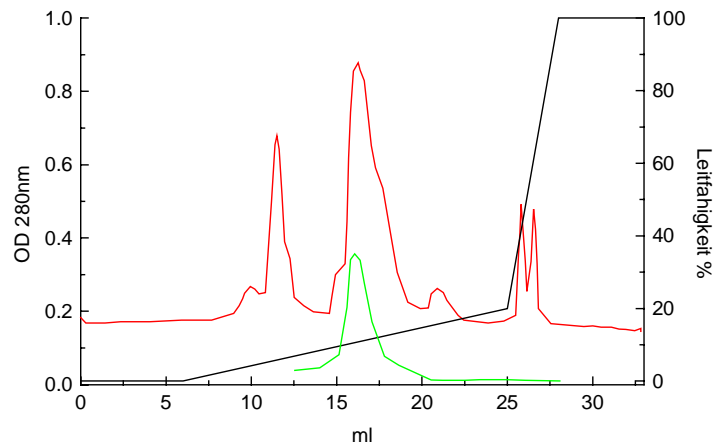


Abb. 15 Reinigung von Mais 4-HPPD über Mono Q; die 4-HPPD Aktivität ist in grün eingezeichnet.

4.1.4.5 Hydroxylapatit

Die 4-HPPD Fraktionen nach Mono Q wurden vereinigt und über Ultrafiltration in einer Amicon Rührzelle entsalzt und umgepuffert in 10 mM KP_i pH 5,7. Eine Säule aus keramischen Hydroxylapatit (CHT 20 μ m; BioRad) wurde ebenfalls mit diesem Puffer equilibriert und die Probe aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 10 bis 250 mM KP_i . Die 4-HPPD eluierte kurz nach der Hauptkontamination (Amylogenin), konnte aber nicht ganz von dem 42 kDa großen Protein abgetrennt werden. (s. Abb. 16).

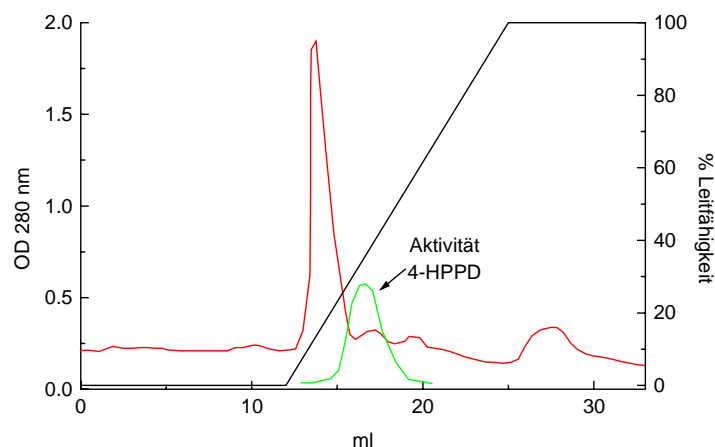


Abb. 16 Reinigung von Mais 4-HPPD über keramisches Hydroxylapatit; die 4-HPPD Aktivität ist in grün eingezeichnet.

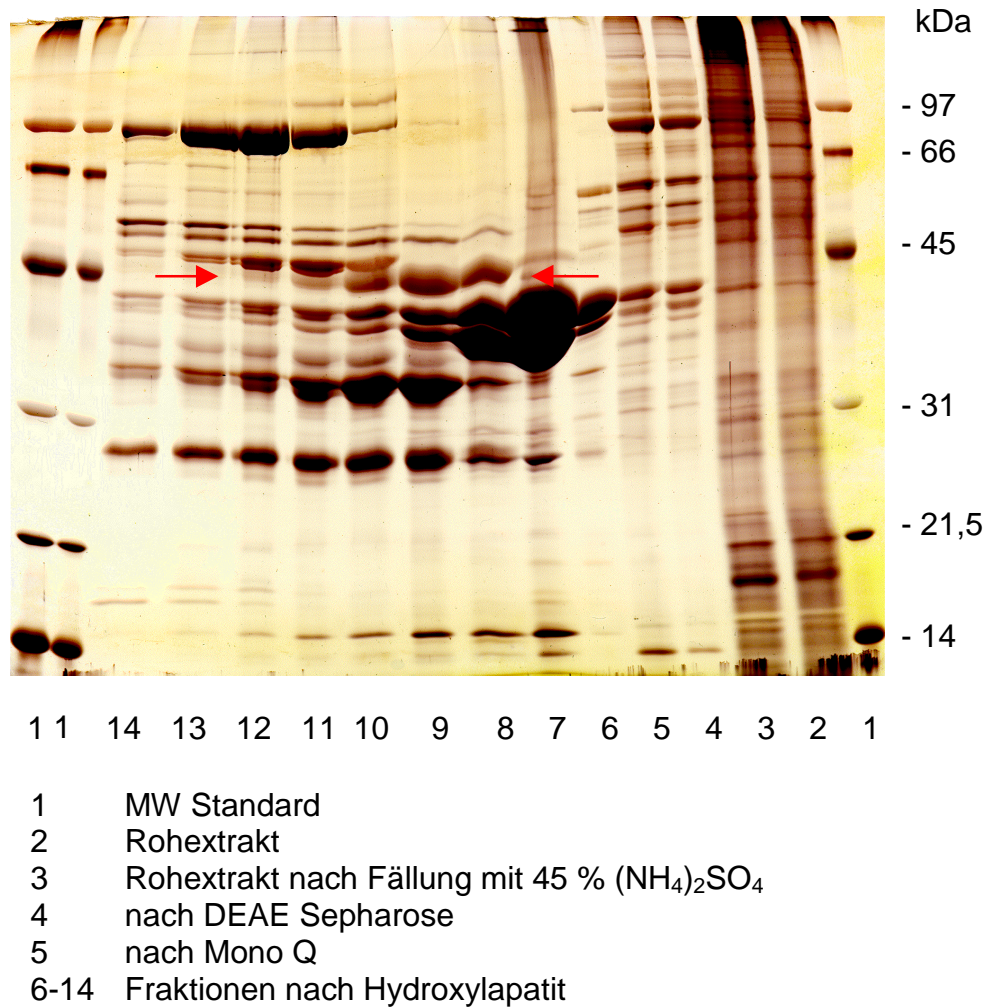


Abb. 17 SDS-PAGE verschiedener Fraktionen der Reinigung von 4-HPPD aus Maiskeimlingen.

Fraktion	Protein [mg]	spez. Aktivität [nmol/mg Protein/min]	Anreicherung	Gesamtaktivität [nmol/min]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	ca. 80000	0,02	1	1600	100,0
45 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	ca. 25000	0,05	2,5	1240	77,5
Phenylseph. FF	615	0,34	17	210	13,1
DEAE Seph. FF	51,4	1,2	60	61,7	3,9
Mono Q	6,05	3	150	18,2	1,1
CHT	0,38	25,02	1251	9,5	0,6

Tab. 5 Zusammenfassung der Reinigung von Mais 4-HPPD aus etiolierten Maiskeimlingen.

Auf eine weitere Aufreinigung wurde an dieser Stelle verzichtet, obwohl die Mais 4-HPPD noch nicht homogen vorlag. Der erreichte Reinigungsgrad ermöglichte ein Ausschneiden der 4-HPPD Bande nach SDS-PAGE. So konnten ausreichende Mengen des Enzyms für einen Trypsinverdau (4.1.4.8) und anschließende Aminosäuresequenzierung gewonnen werden. Bei einer weiteren Aufreinigung hätten die Aktivitätsverluste in keinem Verhältnis zum gewünschten Zweck, der Gewinnung von Sequenzinformation, gestanden.

4.1.4.6 Bestimmung des apparenten Molekulargewichts über Gelfiltrationschromatographie

Die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts erfolgte mit einer mit Ammoniumsulfat gefällten und über DEAE-Sepharose bereits vorgereinigten Probe auf einer Superose 12 HR 10/30. Die Bestimmung wurde dreimal durchgeführt.

Anhand des Vergleichs mit der zuvor erstellten Eichgerade (s. Abb. 10) ließ sich das Molekulargewicht der Mais 4-HPPD mit 88 kDa ermitteln. Dies ist deutlich größer als das Molekulargewicht des Monomers mit 48 kDa, so daß Mais 4-HPPD vermutlich, wie auch alle anderen bisher bekannten eukaryotischen 4-HPPDs, als Dimer vorliegt.

4.1.4.7 Bestimmung des isoelektrischen Punktes über Chromatofokussierung

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Mais 4-HPPD erfolgte an einer durch Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie über DEAE Sepharose vorgereinigten Probe durch Chromatofokussierung über eine Mono P Säule. Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt (Die Chromatogramme sind nicht abgebildet). Der isoelektrische Punkt konnte so mit 5,5 bestimmt werden.

4.1.4.8 Trypsinverdau und Mikrosequenzierung verschiedener Peptide

Die Proteine der die 4-HPPD Aktivität enthaltenen Fraktion nach Chromatographie über Hydroxylapatit wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie Blau R250 gefärbt und die vermutlich die 4-HPPD enthaltende Bande ausgeschnitten. Nach der Spaltung mit Trypsin und anschließender Trennung der Peptide über HPLC konnten die Sequenzen von insgesamt 6 Peptiden bestimmt werden. Außerdem konnte der N-Terminus des Proteins bestimmt werden. Während

der Reinigung von 4-HPPD wurde ein 43 kDa großes Protein ebenfalls stark angereichert und konnte auch im letzten Reinigungsschritt nur partiell abgetrennt werden. Diese Hauptkontaminante wurde ebenfalls N-terminal ansequenziert und konnte als Amylogenin identifiziert werden. Die Homologie zu Reis Amylogenin beträgt 96 % (EMBL:TAE18625; De Pater S., Buijk A. & Kijne J., 1999).

4.1.4.9 Vergleich mit bekannten Sequenzen

Durch einen Vergleich mit den 4-HPPD Sequenzen von *Arabidopsis thaliana* und *Daucus carota* konnten alle über Mikrosequenzierung erhaltenen Peptide eindeutig als Mais 4-HPPD Fragmente identifiziert werden (s. Abb. 18).

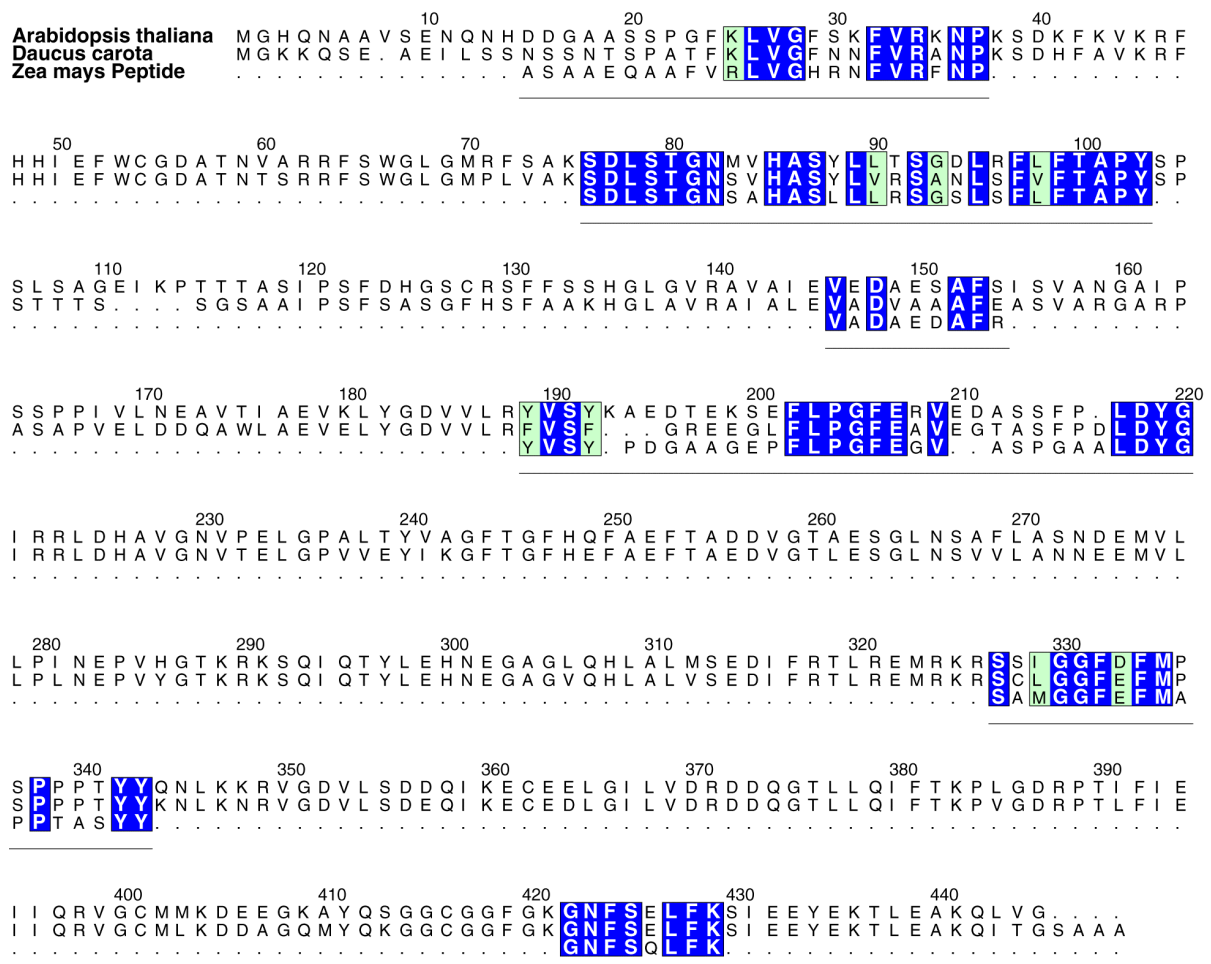


Abb. 18 Sequenzvergleich der Peptide von Mais 4-HPPD mit den Aminosäuresequenzen der 4-HPPD von *Arabidopsis thaliana* und *Daucus carota*. Konservierte Aminosäuren sind dunkelblau, homologe Aminosäuren sind grün unterlegt.

4.1.5 Isolation und Klonierung der cDNA

Die cDNA der Mais 4-HPPD wurde über RT-PCR isoliert. Dazu wurde zunächst Gesamt-RNA aus 6 Tage alten etiolierten Keimlingen präpariert. Die Ausbeute betrug 254 µg RNA/g Frischgewebe. Die Erststrang-cDNA-Synthese erfolgte mit OligodT-Primern. Aufgrund des hohen Sekundärstrukturanteils der Mais 4-HPPD mRNA wurde die reverse Transkription mit einer thermostabilen RT bei 65 °C durchgeführt. Die Erststrang cDNA Synthese mit AMV bzw. M-MLV reverser Transkriptase bei 42°C führte nicht zum gewünschten Erfolg.

Anschließend folgte eine modifizierte PCR mit genspezifischen Primern (s. 3.4.3.2.2). Der 5'-Primer wurde anhand des N-Terminus der nativen Mais 4-HPPD definiert (CHDNdel). Der 3'-Primer wurde ausgehend von der Konsensussequenz des konservierten C-Terminus aller bis dahin bekannten pflanzlichen 4-HPPDs gewählt (CHDBamHI). Beiden Primern wurde eine Restriktionsschnittstelle zur späteren Klonierung in einen Expressionsvektor angehängt. So konnte ein ca. 1300 Bp großes DNA-Fragment spezifisch amplifiziert werden. Die putative Mais 4-HPPD cDNA wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI geschnitten und in den ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen Expressionsvektor pET14b ligiert. Das Plasmidkonstrukt Mais 4-HPPD in pET14b wurde in kompetente *E.coli*. BL21(DE3) transformiert. Die Zellen wurden auf LB_{Carb} Platten plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ausgehend von einer über Nacht Flüssigkultur wurde Plasmid-DNA isoliert und zur Überprüfung der korrekten Sequenz mit den Primern T7F, T7R, MF, MR, M2F und M2R sequenziert (vgl. Abb. 19).

```
1 TTCGTCCGCTTCAACCCGCGCTCCGACCGCTTCCACACGCTCGCGTTCACCACGTGGAGCTCTGGTGC
  F V R F N P R S D R F H T L A F H H V E L W C
70 GCCGACGCGGCCTCCGCCGCGGGCCGCTTCTCCTTCGGCCTGGGCGCGCCGCTCGCCGACGCTCCGAC
  A D A A S A A G R F S F G L G A P L A A R S D
139 CTCTCCACGGGCAACTCCGCGCACGCGTCCCTGCTGCTCCGCTCCGGCTCCCTCTCCTTCTTCTCAGC
  L S T G N S A H A S L L L R S G S L S F L F T
208 GCGCCCTACGCGCACGGCGCCGACGCTGCCACCGCCGCGCTGCCCTCCTTCTCCGCCGCCGCCGCGCGG
  A P Y A H G A D A A T A A L P S F S A A A A R
277 CGCTTCGCAGCCGACCACGGCCTCGCGGTGCGCGCCGTCGCGCTCCGCGTCGCCGACGCCGAGGACGCC
  R F A A D H G L A V R A V A L R V A D A E D A
346 TTCCGCGCCAGCGTCGCGGCCGGGGCGCGCCCGGCGTTCGGCCCCGTCGACCTCGGCCGCGGCTTCCGC
  F R A S V A A G A R P A F G P V D L G R G F R
415 CTCGCCGAGGTGAGCTCTACGGCGACGTCGTGCTCCGGTACGTGAGCTACCCGGACGGCGCCGCGGGC
  L A E V E L Y G D V V L R Y V S Y P D G A A G
484 GAGCCCTTCTGCGGGGTTTCGAGGGCGTGGCCAGCCCCGGGGCGCCGACTACGGGCTGAGCAGGTTTC
  E P F L P G F E G V A S P G A A D Y G L S R F
553 GACCACATCGTCGGCAACGTGCCGGAGCTGGCGCCCCGCCCGCCTACTTCGCCGGCTTACGGGGTTC
  D H I V G N V P E L A P A A A Y F A G F T G F
622 CACGAGTTCGCCGAGTTCACGACGGAGGACGTGGGCACCGCGGAGAGCGGCCTCAACTCCATGGTGCTC
  H E F A E F T T E D V G T A E S G L N S M V L
691 GCCAACAACTCGGAGAACGTGCTGCTCCCCTCAACGAGCCGGTGCACGGCACCAAGCGCCGAGCCAG
  A N N S E N V L L P L N E P V H G T K R R S Q
760 ATACAGACGTTCTGACCACCGCGGCCCGGGCGTGCAGCACATGGCGCTGGCCAGCGACGACGTG
  I Q T F L D H H G G P G V Q H M A L A S D D V
829 CTCAGGACGCTGAGGGAGATGCAGGCGCGCTCGGCCATGGGCGGCTTCGAGTTCATGGCGCCTCCCACA
  L R T L R E M Q A R S A M G G F E F M A P P T
898 TCCGACTACTACGACGGCGTGAGGCGGCGCGCCGGGACGTGCTCACGGAAGCACAGATTAAGGAGTGC
  S D Y Y D G V R R R A G D V L T E A Q I K E C
967 CAGGAGCTAGGGGTGCTGGTGGACAGGGATGACCAGGGCGTGTGCTCCAAATCTTCACCAAGCCAGTG
  Q E L G V L V D R D D Q G V L L Q I F T K P V
1036 GGGGACAGGCCAACGCTGTTCTTGAAATCATCCAAAGGATCGGGTGCATGGAGAAGGATGAGAAGGGG
  G D R P T L F L E I I Q R I G C M E K D E K G
1105 CAAGAATACCAGAAGGGTGGCTGCGGCGGGTTCGGCAAGGGAACTTCTCGCAGCTGTTCAAGTCCATC
  Q E Y Q K G G C G G F G K G N F S Q L F K S I
1174 GAGGATTATGAGAAGTCCCTTGAAGCCAAGCAA
  E D Y E K S L E A K Q
```

Abb. 19 Sequenz der Mais 4-HPPD cDNA.

4.1.6 Heterologe Überexpression der Mais 4-HPPD in *E.coli*

Die Überexpression erfolgte wie unter 3.4.5 beschrieben in Schüttelkolben bei Raumtemperatur. Die Ausbeute betrug etwa 3 mg lösliche Mais 4-HPPD/l Bakterienkultur mit einer spezifischen Aktivität von 4,4 nmol/mg Protein/min.

4.1.7 Reinigung des rekombinanten Proteins

Die rekombinante Mais 4-HPPD wurde wie unter 3.3.3 beschrieben durch Chromatographie über eine Metallchelatsäule gereinigt (s. Abb. 20).

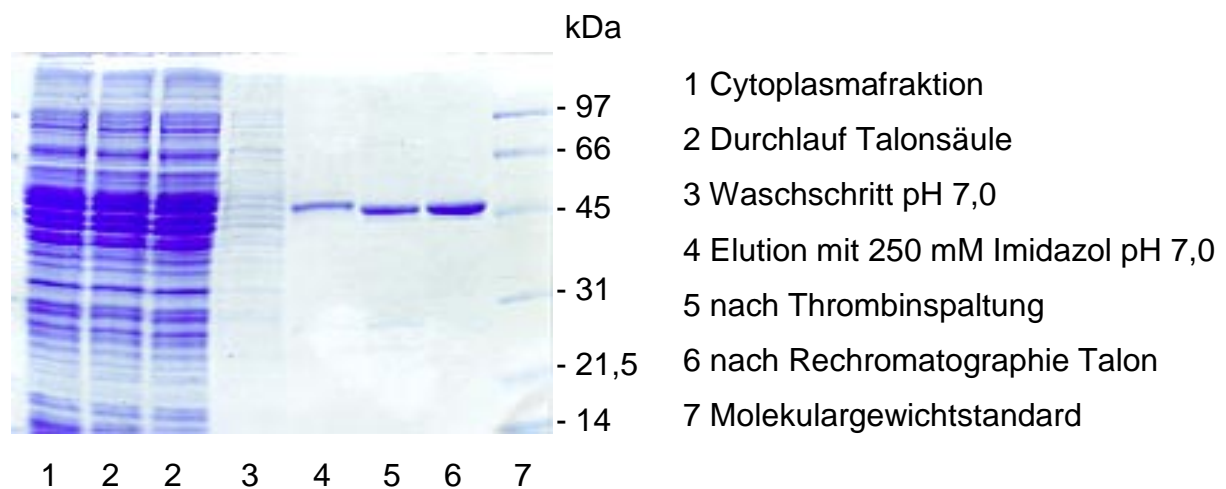


Abb. 20 SDS-PAGE der Reinigung rekombinanter Mais 4-HPPD aus *E.coli*.

4.2 4-HPPD aus *Oryza sativa var. indica*

4.2.1 Isolation und Klonierung der cDNA

Die cDNA der Reis 4-HPPD wurde wie unter 3.1.5 für Mais beschrieben über RT-PCR isoliert. Die Ausbeute betrug 183 µg RNA/g Frischgewebe.

Anschließend folgte eine modifizierte PCR mit genspezifischen Primern (s. 3.4.3.2.2). Der 5'-Primer wurde anhand eines EST Klones aus dem „Rice Genome Project“ (EMBL C26160) definiert (RHDNdel). Der 3'-Primer wurde ausgehend von der Konsensussequenz des konservierten C-Terminus aller bis dahin bekannten pflanzlichen 4-HPPDs gewählt (CHDBamHI). Beiden Primern wurde eine Restriktionsschnittstelle zur späteren Klonierung in einen Expressionsvektor angehängt. So konnte ein ca. 1250 Bp großes DNA-Fragment spezifisch amplifiziert

werden. Die Reis 4-HPPD cDNA wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI geschnitten und in den ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen Expressionsvektor pET14b ligiert. Das Plasmidkonstrukt Reis 4-HPPD in pET14b wurde in kompetente *E.coli* BL21(DE3) transformiert. Die Zellen wurden auf LB_{Carb} Platten plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ausgehend von einer über Nacht Flüssigkultur wurde Plasmid-DNA isoliert und zur Überprüfung der korrekten Sequenz mit den Primern T7F, T7R, MF, MR, M2F und sequenziert (s. Abb. 22).

4.2.2 Heterologe Überexpression der Reis 4-HPPD in *E.coli*

Die Überexpression erfolgte wie unter 3.4.5 beschreiben in Schüttelkolben bei Raumtemperatur Die Ausbeute betrug etwa 3 mg lösliche Reis 4-HPPD/l Bakterienkultur mit einer spezifischen Aktivität von 4.4 nmol/mg Protein/min.

4.2.3 Reinigung des rekombinanten Proteins

Die rekombinante Reis 4-HPPD wurde wie unter 3.3.3 beschrieben durch Chromatographie über eine Metallchelatsäule gereinigt (s. Abb. 21.)

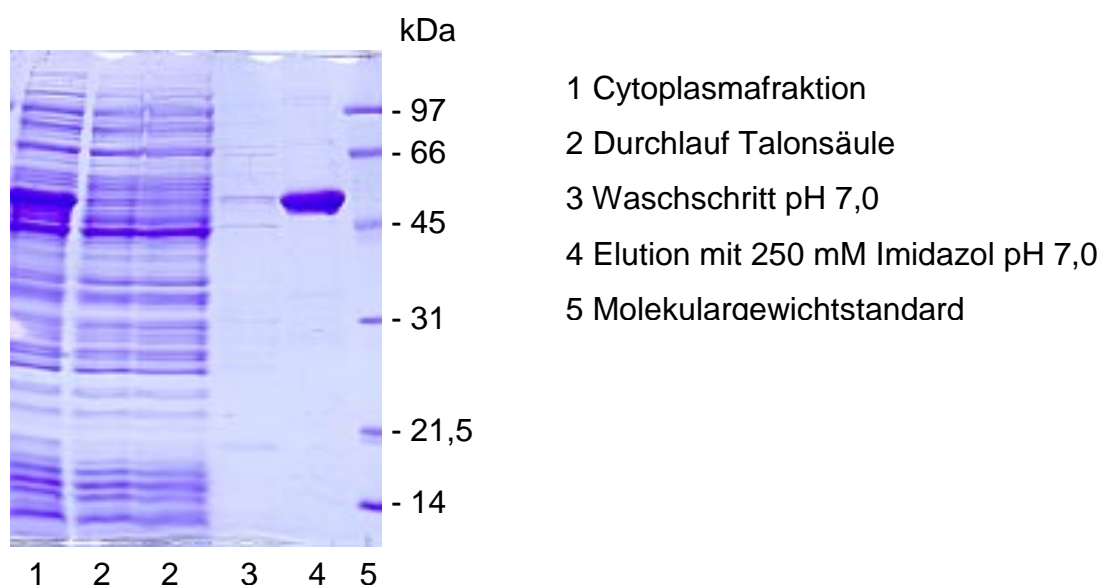


Abb. 21 SDS-PAGE der Reinigung rekombinanter Reis 4-HPPD aus *E.coli*.

```

1 ATGCCTCCCACTCCACCCCCACCGCCACCACCGGCGCCGTCTCGGCCGCTGCGGCGGCGGGGAGAAC
  M P P T P T P T A T T G A V S A A A A A G E N
70 GCGGGGTTCCGCTCGTTCGGGCACCGCCGCTTCGTCCGCGCCAACCCGCGGAGCGACCGGTTCCAGGCG
  A G F R L V G H R R F V R A N P R S D R F Q A
139 CTCGCTTCCACCACGTTCGAGCTCTGGTGCGCCGACGCCGCGTCCGCCGCGGGCCGGTTCGCCTTCGCC
  L A F H H V E L W C A D A A S A A G R F A F A
208 CTGGGCGCGCCGCTCGCCGCCAGGTCCGACCTCTCCACGGGGAACTCCGCGCACGCTCCCTCCTCCTC
  L G A P L A A R S D L S T G N S A H A S L L L
277 CGCTCCGCTCCGTCGCGTTTCTTTCACCGCCCCCTACGGCGGCGACCACGGCGTTCGGCGCGGACGCG
  R S A S V A F L F T A P Y G G D H G V G A D A
346 GCCACCACCGCCTCCATCCCTTCTTCTCCCCAGGCGCCGCGCGGAGGTTCCGCCGCGGACCACGGCCTC
  A T T A S I P S F S P G A A R R F A A D H G L
415 GCGGTGCACGCCGTGGCGCTGCGCGTCCGCCGACCGCGCCGACGCTTCCGCGCCAGCGTTCGGCGCCGGT
  A V H A V A L R V A D A A D A F R A S V A A G
484 GCGCGCCCGGCGTTCCAGCCCCGCGACCTCGGCGGTGGCTTTCGGCCTCGCGGAGGTGGAGCTCTACGGC
  A R P A F Q P A D L G G G F G L A E V E L Y G
553 GACGTCGTGCTCCGTTTTCGTCAGCCACCCGGACGGCGCCGACGCGCCCTTCTCCCGGGTTTCGAGGGC
  D V V L R F V S H P D G A D A P F L P G F E G
622 GTCAGCAACCCGGGCGCCGTGGACTACGGCCTCCGCCGGTTCGACCACGTCGTCGGCAACGTGCCGGAG
  V S N P G A V D Y G L R R F D H V V G N V P E
691 CTCGCTCCGGTAGCCGCGTACATCTCCGGGTTTACCGGGTTCCACGAGTTCGCCGAGTTCACCGCCGAG
  L A P V A A Y I S G F T G F H E F A E F T A E
760 GACGTGGGCACCGCCGAGAGCGGCCTCAACTCGGTGGTGCTCGCCAACAACGCGGAGACCGTGCTGCTG
  D V G T A E S G L N S V V L A N N A E T V L L
829 CCGCTCAACGAGCCGGTGCACGGCACCAAGCGGCGGAGCCAGATACAGACGTACCTGGACCACCACGGC
  P L N E P V H G T K R R S Q I Q T Y L D H H G
898 GGCCCGGGGGTGCAGCACATCGCGCTGGCCAGCGACGACGTGCTCGGGACGCTGAGGGAGATGCGGGCG
  G P G V Q H I A L A S D D V L G T L R E M R A
967 CGCTCCGCCATGGGCGGCTTCGAGTTCTTGGCGCCGCCGCCCAACTACTACGACGGCGTTCGGCGG
  R S A M G G F E F L A P P P P N Y Y D G V R R
1036 CGCGCCGGGACGTGCTCTCGGAGGAGCAGATCAACGAGTGCCAGGAGCTCGGGGTGCTCGTGGACAGG
  R A G D V L S E E Q I N E C Q E L G V L V D R
1105 GATGACCAGGGGTGTTGCTCCAGATCTTACCAAGCCAGTAGGAGACAGGCCAACCTTTTCTTGGAG
  D D Q G V L L Q I F T K P V G D R P T F F L E
1174 ATGATACAAAGGATTGGGTGCATGGAGAAGGATGAGAGTGGGCAGGAGTACCAGAAGGGCGGCTGCGGC
  M I Q R I G C M E K D E S G Q E Y Q K G G C G
1243 GGGTTTGGGAAGGGCAACTTCTCGGAGCTGTTCAAGTCCATTGAGGAGTATGAGAAGTCCCTTGAAGCC
  G F G K G N F S E L F K S I E E Y E K S L E A
1312 AAGCAATAG
      K Q *

```

Abb. 22 cDNA Sequenz der 4-HPPD aus *Oryza sativa*.

4.3 4-HPPD aus *Mus musculus*

4.3.1 Isolation und Klonierung der cDNA

Die cDNA für Maus 4-HPPD wurde über die Polymerase Kettenreaktion aus einer Mäuseleber λ gt11 cDNA Bank (Clontech) isoliert. Die cDNA Bank wurde zunächst amplifiziert, ein Phagenlysat hergestellt und die λ DNA aufgereinigt.

Ausgehend von der bereits bekannten cDNA Sequenz (Genbank Accession No. D29987; (Endo *et al.*, 1995)) wurden die Oligonukleotidprimer MHDF I und MHDR I definiert und die Maus 4-HPPD cDNA über PCR amplifiziert. Der gesamte PCR-Ansatz wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt. Das gewünschte PCR-Produkt (1181 Bp) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aus dem Agaroseblöckchen eluiert. Anschließend wurde die DNA in den Klonierungsvektor pMosblue ligiert und in kompetente *E.coli* DH5 α transformiert. Die positiven Klone konnten über Blau/Weiß Selektion identifiziert werden. Ausgehend von einer über Nacht Flüssigkultur wurde Plasmid-DNA isoliert und zur Überprüfung der korrekten Sequenz mit den Primern T7 und U19mer sequenziert (s. Abb. 23).

Die pMosblue-Maus4-HPPD Plasmid DNA wurde als Ausgangsmaterial für alle weiteren Klonierungen verwendet.

Maus 4-HPPD wurde in verschiedene Expressionsvektoren kloniert, um eine maximale Überexpression zu erreichen. Die cDNA wurde über eine erneute PCR zunächst amplifiziert und durch die Wahl von geeigneten Primern jeweils mit den entsprechenden terminalen Restriktionsschnittstellen versehen (s Tab. 6).

Vektor	Primer forward	Primer reverse	<i>E.coli</i> ,Expressionsstamm
pET3a	MHDFNdel	MHDRBamHI	HMS174(DE3)/BL21(DE3)
pET14b	MHDFNdel	MHDRBamHI	HMS174(DE3)/BL21(DE3)
pET21d	MHDFRcal	MHDRNotI	HMS174(DE3)
pET32a	MHDFRcal	MHDRBamHI	AD494 (DE3)
pThioHisB	MHDFRcal	MHDRBglI	DH5 α
pGEX4T2	MHDFBamHI	MHDREcoRI	DH5 α
pTrcHisB	MHDFBamHI	MHDREcoRI	DH5 α

Tab. 6 verwendete Expressionsvektoren und PCR Primer.

```

1 ATGACAACCTACAACAACAAAGGACCAAAGCCTGAGAGAGGCCGGTTCCTCCATTTCCACTCGGTGACC
  M T T Y N N K G P K P E R G R F L H F H S V T

70 TTCTGGGTTGGCAATGCCAAGCAGGCTGCTTCCTTCTACTGCAACAAGATGGGCTTTGAACCTCTGGCC
  F W V G N A K Q A A S F Y C N K M G F E P L A

139 TACAGGGGCCTAGAGACTGGCTCCCGGGAGGTAGTCAGCCACGTCATCAAGCGAGGGAAAAATTGTGTTT
  Y R G L E T G S R E V V S H V I K R G K I V F

208 GTTCTCTGCTCTGCTCTCAATCCCTGGAACAAAGAGATGGGCGACCACTTGGTGAAGCATGGCGACGGG
  V L C S A L N P W N K E M G D H L V K H G D G

277 GTGAAAGACATCGCATTTCGAGGTGGAAGACTGCGACCACATTGTGCAGAAAAGCTCGAGAACGGGGCGCC
  V K D I A F E V E D C D H I V Q K A R E R G A

346 AAAATTGTGCGGGAGCCATGGGTGGAGCAAGACAAATTTGGGAAGGTGAAGTTTGTGCTGCAGACG
  K I V R E P W V E Q D K F G K V K F A V L Q T

415 TATGGAGATACCACACACACCCTGGTGGAGAAGATCAACTACACTGGCCGTTTCTTACCTGGATTTCGAG
  Y G D T T H T L V E K I N Y T G R F L P G F E

484 GCCCCAACATAACAAGGATAACCCTGCTTCCAAAACACTACCCAGATGTAACCTTGAGATCATTGACCACATT
  A P T Y K D T L L P K L P R C N L E I I D H I

553 GTAGGCAACCAACCCGACCAAGAAATGCAGTCTGCCTCAGAATGGTACCTGAAAAACCTGCAGTTCCAC
  V G N Q P D Q E M Q S A S E W Y L K N L Q F H

622 CGGTTCTGGTCCGTGGACGACACGCAGGTGCACACGGAGTACAGCTCTCTGCGCTCCATTGTGGTGACC
  R F W S V D D T Q V H T E Y S S L R S I V V T

691 AACTACGAGGAATCCATCAAAAATGCCCATCAACGAGCCAGCTCCGGGCAGGAAGAAGTCTCAGATCCAG
  N Y E E S I K M P I N E P A P G R K K S Q I Q

760 GAATATGTGGACTATAATGGGGGTGCTGGGGTCCAGCACATCGCTCTCAAGACGGAAGACATCATCACA
  E Y V D Y N G G A G V Q H I A L K T E D I I T

829 GCAATCCGCCACTTGAGGGAGCGAGGCACGGAGTTCTTGGCAGCCCCATCTTCTTACTACAAACTGCTT
  A I R H L R E R G T E F L A A P S S Y Y K L L

898 CGGGAGAATCTCAAGTCAGCCAAGATCCAGGTGAAAGAGAGCATGGACGTCCTGGAGGAGCTGCATATC
  R E N L K S A K I Q V K E S M D V L E E L H I

967 CTAGTCGACTATGACGAGAAAGGCTACCTCCTACAGATCTTCACCAAGCCCATGCAGGACCGGCCACACA
  L V D Y D E K G Y L L Q I F T K P M Q D R P T

1036 CTCTTCCTGGAAGTCATTCAACGTCACAACCACCAGGGCTTTGGAGCGGGCAACTTCAACTCTCTGTTC
  L F L E V I Q R H N H Q G F G A G N F N S L F

1105 AAGGCGTTTCGAGGAGGAGCAAGCCCTACGGGGCAACCTCACTGACCTGGAGCCCAATGGTGTGAGGTCT
  K A F E E E Q A L R G N L T D L E P N G V R S

1174 GGAATGTAA
      G M *

```

Abb. 23 cDNA Sequenz der Maus 4-HPPD.

Das PCR Produkt und der jeweilige Vektor wurden jeweils mit den entsprechenden Restriktasen geschnitten und der Vektor an seinem 3' Ende mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurden PCR-Produkt und Vektor mit T4-Ligase ligiert und in *E.coli* transformiert. Verwendet wurden die jeweils unter 3.1.4.4 angegebenen *E.coli* K12 Derivate.

4.3.2 Heterologe Überexpression von Maus 4-HPPD in *E.coli*

Die Überexpression erfolgte entweder in Schüttelkolben oder durch Fermentation bei Rheinbiotech. Die erreichbare Ausbeute betrug bei Verwendung der Expressionsvektoren pET14b oder pET32a etwa 5 mg lösliche Maus 4-HPPD/l Bakterienkultur mit einer spezifischen Aktivität von 5,8 nmol/mg Protein/min im Rohextrakt.

4.3.3 Reinigung des rekombinanten Proteins

Die Reinigung von Maus 4-HPPD erfolgte durch zweifache Chromatographie über eine Talon Metallchelatsäule. Zunächst wurden die Zellpellets in Aufschlußpuffer R aufgenommen, mit Ultraschall aufgeschlossen und zur Klärung des Überstands abzentrifugiert. Durch die erste Chromatographie über eine Talon Metallchelatsäule konnte die Maus 4-HPPD bis zu etwa 90 % gereinigt werden (s. Abb. 24). Der N-terminale HisTag wurde quantitativ mit Thrombin abgespalten. Zur Abtrennung der verbliebenen Kontaminationen, der HisTags und des Thrombins sowie zur Gewinnung einer homogenen Enzymfraktion wurde eine weitere Chromatographie über die Talonsäule durchgeführt (s. Abb. 24). Dazu wurde die Probe durch Ultrafiltration in 50 mM KP_i pH 7.5 + 250 mM NaCl + 10mM Imidazol umgepuffert. Die Säule wurde ebenfalls in diesem Puffer equilibriert. Der Durchlauf enthielt die aktive Maus-4HPPD mit einer spezifischen Aktivität von 99,9 nmol/mg Protein/min.

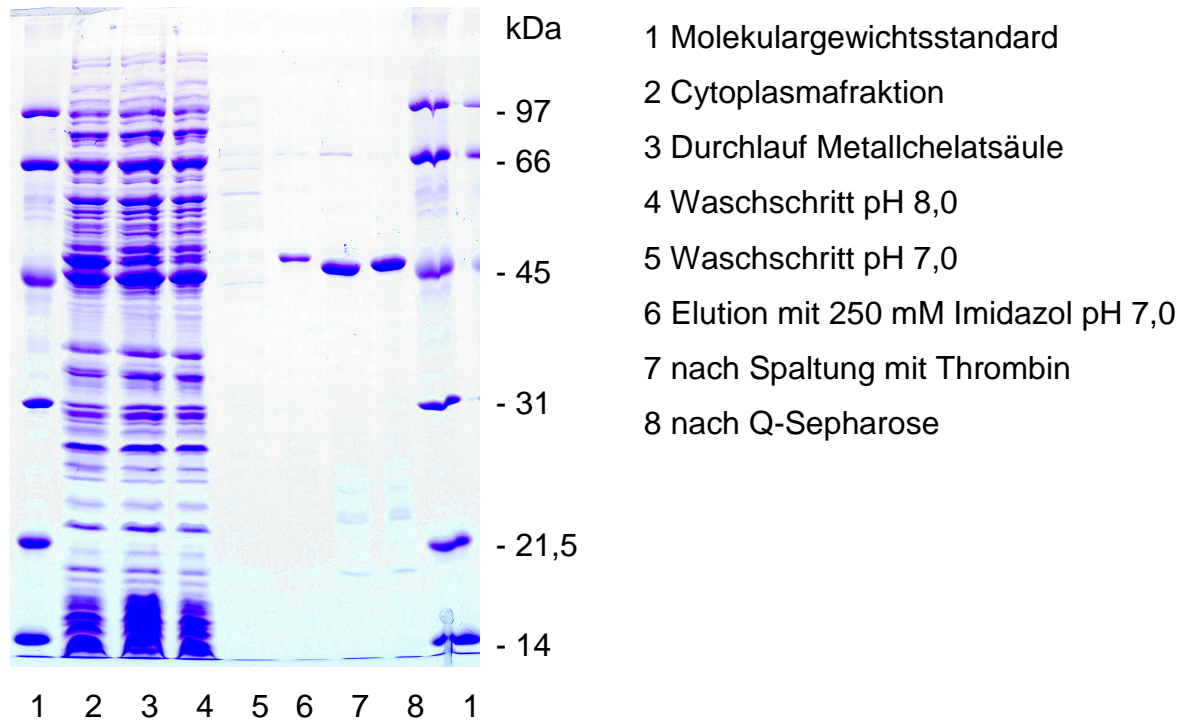


Abb. 24 SDS-PAGE der Reinigung rekombinanter Maus 4-HPPD aus *E.coli*.

Fraktion	spezifische Aktivität [nmol/mg Protein/min]	Proteinmenge [mg/l <i>E.coli</i>]
Cytoplasmafraktion	5,8	165
Durchlauf Metallchelatsäule	0,0	139
Waschschrift pH 8,0	0,1	12,1
Waschschrift pH 7,0	45,9	9,2
Eluierte 4-HPPD	99,9	4,5

Tab. 7 Reinigung von Maus 4-HPPD; Proteinmenge und spezifische Aktivität der einzelnen Fraktionen bezogen auf 1 l Bakterienkultur in LB-Medium.

4.4 Isolation und Klonierung der 4-HPPD aus Mensch

Die cDNA für humane 4-HPPD wurde über die Polymerase Kettenreaktion aus einer Leber λ TriplEx cDNA Bank (Clontech) isoliert.

Ausgehend von der bereits bekannten cDNA Sequenz (Genbank Accession No. NM_002150; (Ruetschi *et al.*, 1993)) wurden die Oligonukleotidprimer HHDFNdel

und HHDRBamHI definiert und die humane 4-HPPD cDNA über PCR amplifiziert. Nach der Verifizierung der DNA Sequenz (s. Abb. 26) wurde das PCR-Produkt wie unter 3.3.1 beschreiben gereinigt, in pET14b ligiert und in *E.coli* BL21(DE3) transformiert.

4.4.1 Überexpression und Reinigung der Mensch 4-HPPD

Die Überexpression erfolgte wie unter 3.4.5 beschreiben in Schüttelkolben bei Raumtemperatur. Die erreichbare Ausbeute betrug etwa 1-3 mg lösliche humane 4-HPPD/l Bakterienkultur mit einer spezifischen Aktivität von 3,8 nmol/mg Protein/min im Rohextrakt.

Die Reinigung der Mensch 4-HPPD erfolgte wie unter 3.3.3 beschreiben. Die Ausbeute betrug weniger als 1 mg 4-HPPD /l Bakterienkultur (vgl. Abb. 25).

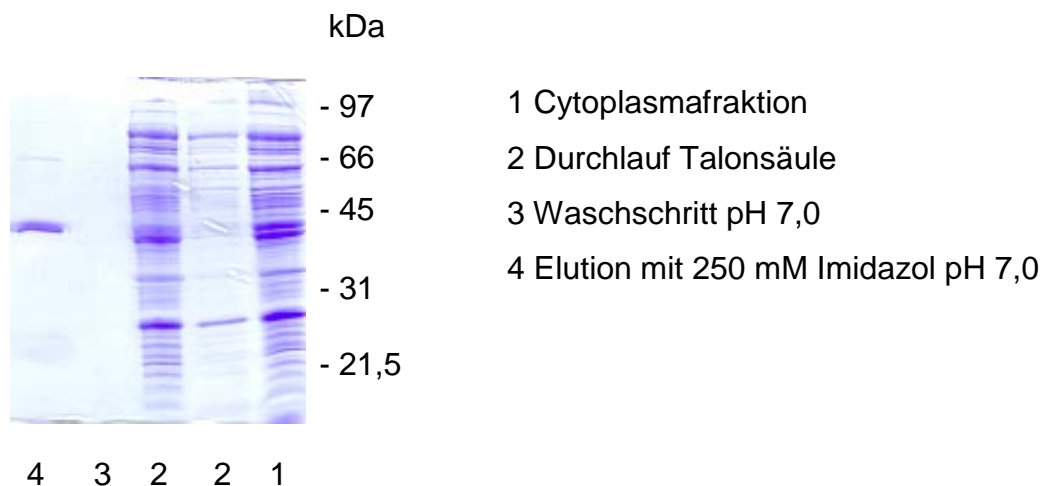


Abb. 25 SDS-PAGE der Reinigung rekombinanter Mensch 4-HPPD aus *E.coli*.

```

1 ATGACGACTTACAGTGACAAAGGGGCAAAGCCTGAGAGAGGCCGATTCTCCACTTCCACTCTGTGACC
  M T T Y S D K G A K P E R G R F L H F H S V T

70 TTCTGGGTTGGCAACGCCAAGCAGGCCGCGTCATTCTACTGCAGCAAGATGGGCTTTGAACCTCTAGCC
  F W V G N A K Q A A S F Y C S K M G F E P L A

139 TACAGGGCCTGGAGACCGGTTCCCGGGAGGTGGTCAGCCATGTAATCAAACAAGGGAAGATTGTGTTT
  Y R G L E T G S R E V V S H V I K Q G K I V F

208 GTCCTCTCTCAGCGCTCAACCCCTGGAACAAAGAGATGGGCGATCACCTGGTGAAACACGGTGACGGA
  V L S S A L N P W N K E M G D H L V K H G D G

277 GTGAAGGACATTGCGTTTCGAGGTGGAAGATTGTGACTACATCGTGCAGAAAACACGGGAACGGGGCGCC
  V K D I A F E V E D C D Y I V Q K A R E R G A

346 AAAATCATGCGGGAGCCCTGGGTAGAGCAAGACAAGTTTGGGAAGGTGAAGTTTGCTGTGCTGCAGACG
  K I M R E P W V E Q D K F G K V K F A V L Q T

415 TATGGGGACACCACACACCCTGGTGGAGAAGATGAACTACATCGGCCAATTCTTGCCTGGATATGAG
  Y G D T T H T L V E K M N Y I G Q F L P G Y E

484 GCCCCAGCGTTCATGGACCCCTACTTCTAAACTGCCCAAATGCAGTCTGGAGATGATCGACCACATT
  A P A F M D P L L P K L P K C S L E M I D H I

553 GTGGGAAACCAGCCTGATCAGGAGATGGTGTCCGCCTCCGAATGGTACCTGAAAAACCTGCAGTTCAC
  V G N Q P D Q E M V S A S E W Y L K N L Q F H

622 CGCTTCTGGTCCGTGGATGACACGCAGGTGCACACGGAATATAGCTCTCTGCGATCCATTGTGGTGGCC
  R F W S V D D T Q V H T E Y S S L R S I V V A

691 AACTATGAAGAGTCCATCAAGATGCCCATCAATGAGCCAGCGCCTGGCAAGAAGAAGTCCCAGATCCAG
  N Y E E S I K M P I N E P A P G K K K S Q I Q

760 GAATATGTGGACTATAACGGGGGCGCTGGGGTCCAGCACATCGCTCTCAAGACCGAAGACATCATCACA
  E Y V D Y N G G A G V Q H I A L K T E D I I T

829 GCGATCTCGCCATTGAGAGAGAGAGGCCTGGAGTTCTTATCTGTTCCCTCCACGTACTIONAACTG
  A I R H L R E R G L E F L S V P S T Y Y K Q L

898 CGGGAGAAGCTGAAGACGGCCAAGATCAAGGTGAAGGAGAACATTGATGCCCTGGAGGAGCTGAAAATC
  R E K L K T A K I K V K E N I D A L E E L K I

967 CTGGTGGACTACGACGAGAAAGGCTACCTCCTGCAGATCTTCACCAAACCGGTGCAGGACCGGCCACG
  L V D Y D E K G Y L L Q I F T K P V Q D R P T

1036 CTCTTCTGGAAGTCATCCAGCGCCACAACCACCAGGGTTTTTGGAGCCGGCAACTTCAACTCACTGTTT
  L F L E V I Q R H N H Q G F G A G N F N S L F

1105 AAGGCTTTCGAGGAGGAGCAGAACCTGCGGGTAACCTCACCAACATGGAGACCAATGGGGTGGTGCC
  K A F E E E Q N L R G N L T N M E T N G V V P

1174 GGCATGTAA
      G M *

```

Abb. 26 cDNA Sequenz 4-HPPD aus Mensch.

4.5 4-HPPD aus *Arabidopsis thaliana* (ara 4-HPPD)

4.5.1 Isolation und Klonierung des Gens

Zur Isolation der cDNA für *Arabidopsis thaliana* 4-HPPD wurde zunächst Gesamt-RNA aus *Arabidopsis* Keimlingen (Bayer AG) isoliert. Nach der Synthese von Erststrang cDNA mit reverser Transkriptase wurde die 4-HPPD cDNA mittels der Polymerasekettenreaktion amplifiziert.

Ausgehend von der bereits bekannten cDNA Sequenz (Genbank Accession No. U89267; (Bartley, 1997)) wurden die Oligonukleotidprimer AHDFNdeI und AHDBamHI definiert und die ara 4-HPPD cDNA über PCR amplifiziert. Der gesamte PCR-Ansatz wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt. Das gewünschte PCR-Produkt (1337 Bp) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aus dem Agaroseblöckchen eluiert. Anschließend wurde die DNA mit den Restriktasen NdeI und BamHI geschnitten und in die ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen und dephosphorylierten Expressionsvektoren pET3d und pET14b ligiert. Die Vektorkonstrukte wurden in kompetente *E.coli* HMS174(DE3) transformiert. Die Zellen wurden auf LB Platten plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.5.2 Heterologe Überexpression der ara 4-HPPD in *E.coli*

Die Überexpression erfolgte wie unter 3.4.5 beschreiben entweder in Schüttelkolben oder durch Fermentation bei der Firma Rheinbiotech.

Die erreichbare Ausbeute betrug etwa 30-50 mg lösliche ara 4-HPPD/l Bakterienkultur mit einer spezifischen Aktivität von 32 nmol/mg Protein/min (Tab. 8).

4.5.3 Reinigung des rekombinanten Proteins

Die rekombinante ara 4-HPPD wurde über eine Zweischrittreinigung isoliert. Die Zellpellets wurden in Aufschlußpuffer R aufgenommen, mit Ultraschall aufgeschlossen und zur Klärung des Überstands abzentrifugiert. Durch Chromatographie über eine Talon Metallchelatsäule konnte die ara 4-HPPD bis zu etwa 95 % gereinigt werden (vgl. Abb. 27). Der N-terminale HisTag wurde quantitativ mit Thrombin abgespalten. Zur Abtrennung der verbliebenen Kontaminationen, der HisTags und des Thrombins sowie zur Gewinnung einer homogenen Enzymfraktion wurde eine Chromatographie über Resource Q durchgeführt (s. Abb. 28).

Ara 4-HPPD eluiert in zwei nicht vollständig trennbaren Peaks. Beide Peaks enthalten aktives Protein, zeigen Aktivität und verhalten sich bei der Kristallisation gleich.

Der zweite Peak enthält allerdings noch Proteinkontaminationen. Daher wurden die Peaks getrennt gesammelt und zur Kristallisation eingesetzt.

Beide Peaks enthalten ara 4-HPPD als Dimer. Dieses wurde durch Gelfiltrationschromatographie über Superose 6 (apparentes MW ca. 90 kDa) und durch „Dynamic Light Scattering“ (MW= 102 kDa) verifiziert.

Die ara 4-HPPD wurde für die Kristallisation über Ultrafiltration bis zu einer Konzentration von 12 mg/ml eingengt und in 10 mM Hepes/NaOH umgepuffert.

Ausbeuten und spezifische Aktivitäten der ara 4-HPPD während der Reinigung sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Fraktion	Proteinmenge [mg]	spezifische Aktivität [nmol/mg Protein/min]
Zellrohextrakt	221	13,3
ara-4HPPD nach Talon	104	32
ara-4HPPD nach Resource Q Pool 1	51	31
ara-4HPPD nach Resource Q Pool 2	36	27

Tab. 8 ara 4-HPPD Reinigung; Proteinmenge und spezifische Aktivität der einzelnen Fraktionen bezogen auf 2 l Bakterienkultur in LB-Medium.

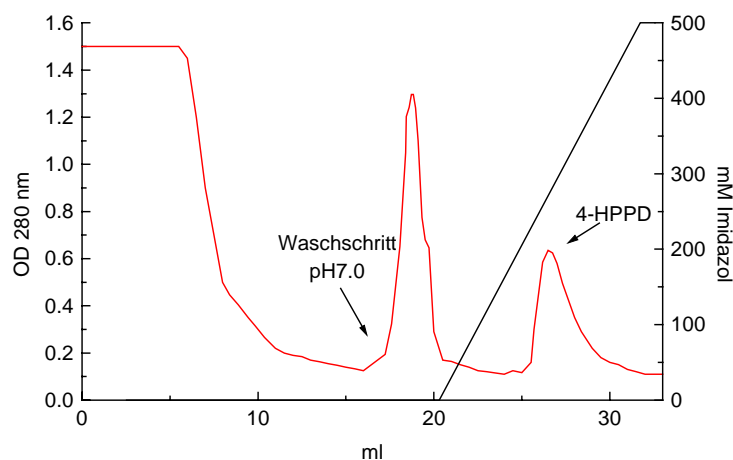


Abb. 27 Metallchelatchromatographie der ara-4HPPD über Talon.

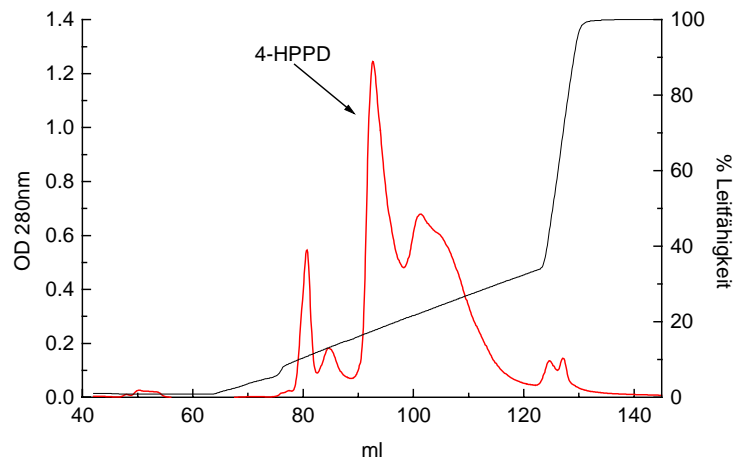


Abb. 28 Ionenaustauschchromatographie der ara-4-HPPD über Resource Q.

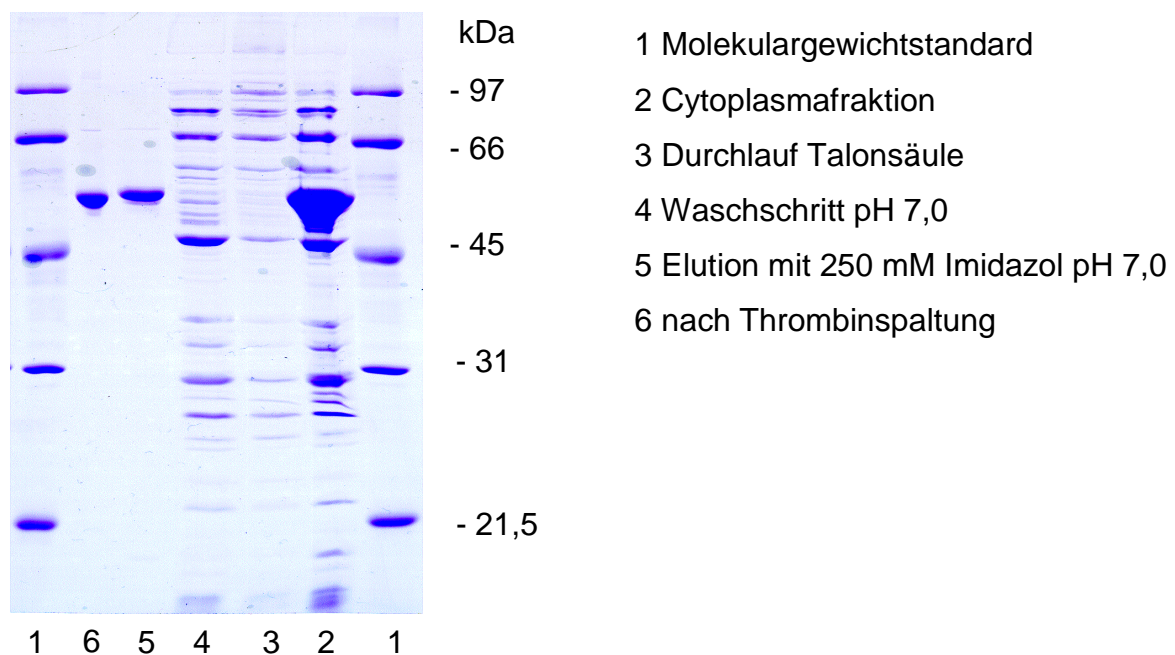


Abb. 29 SDS-PAGE der Reinigung rekombinanter ara-4HPPD aus *E. coli*.

4.5.4 Stabilisierung von ara 4-HPPD durch Zugabe von Eisen^(III)salzen

Gereinigte ara 4-HPPD 12 mg/ml in 10 mM HEPES/NaOH pH 7,0 verlor bei einwöchiger Lagerung bei 4°C ihre Aktivität fast vollständig. Sie konnte allerdings durch die Zugabe von 0,1 mM Fe^(III) Salzen wieder zu 100 % rekonstituiert werden. Abbildung 30 zeigt die Effekte von verschiedenen Fe^(III) Salzen auf die Aktivität

7 Tage gelagerter ara 4-HPPD. FeI_2 und FeBr_2 zeigten einen inhibierenden Effekt auf die ara 4-HPPD. Alle anderen $\text{Fe}^{(II)}$ Salze waren in der Lage das Enzym wieder zu aktivieren. $\text{Fe}^{(III)}$ Salze und Reduktionsmittel wie DTT und 2-Mercaptoethanol hatten keinen aktivierenden Effekt auf ara 4-HPPD.

Durch die Zugabe von 0,1 mM Fe-Gluconat konnte vollständig inaktive ara 4-HPPD auch nach 30 tägiger Lagerung im Kühlschrank noch reaktiviert werden. Der Aktivitätsverlust im Vergleich zu frischem Material betrug hier ca. 15 % .

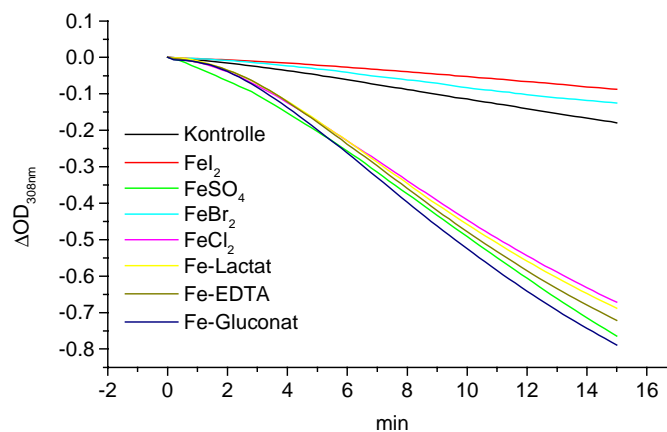


Abb. 30 Der aktivierende Effekt verschiedener $\text{Fe}^{(II)}$ Salze auf ara 4-HPPD im Aktivitätstest wie unter 3.3.2.2 beschrieben.

4.5.5 Herstellung N-terminaler Deletionsmutanten.

Zur Verbesserung der Kristallordnung wurden N-terminale Deletionsmutanten von ara 4-HPPD hergestellt. Dies geschah über eine PCR mit entsprechenden N-terminalen Primern. Insgesamt wurden 4 Mutanten erzeugt, die um 31, 45, 55 und 84 Aminosäuren verkürzt waren. Die Mutante ara Δ N31 war ähnlich aktiv wie der Wildtyp und wurde auch zur Kristallisation eingesetzt. Die Mutanten ara Δ N45 und ara Δ N55 zeigten nur noch 53 bzw. 48 % der Aktivität des Wildtyps und ara Δ N84 war inaktiv (s. Tab. 9).

Mutante	Aktivität [%]
Wildtyp	100
ara Δ N31	101
ara Δ N45	53
ara Δ N55	48
ara Δ N84	3

Tab. 9 Enzymaktivität verschiedener ara 4-HPPD Deletionsmutanten.

4.5.6 Kristallisation

Ara-4 HPPD kristallisierte unter den in 3.5.2 beschriebenen Bedingungen. Erste tetragonale Kristalle konnten bei Raumtemperatur nach etwa 10 Tagen beobachtet werden. Sie wuchsen in 4-6 Wochen bis zu einer Größe von 0,2 x 0,2 x 0,3 mm. Diese beugten die Röntgenstrahlung einer konventionellen Röntgenquelle (Cu-Drehanode) bis zu einer Auflösung von ca. 3,2 Å. Ohne Abspaltung des HisTag kristallisierte ara 4-HPPD ebenfalls unter den angegebenen Bedingungen. Bei der Kristallisation von ara Δ N31 mußte die MPD Konzentration um 5 % abgesenkt werden. Die Kristalle von am N-Terminus modifizierter ara 4-HPPD waren jedoch allesamt stark verwachsen und fehlgeordnet. Ara 4-HPPD kristallisierte außerdem mit verschiedenen niedermolekularen PEG's als Präzipitantz. Diese Kristalle waren allerdings ebenfalls fehlgeordnet. Alle ara-4 HPPD Kristalle zeigten eine anisotrope Mosaizität entlang einer der Kristallachsen. Diese machte eine Datensammlung meist unmöglich. Es gelang jedoch, einen Datensatz mit einer Mosaizität von 0,9° aufzunehmen und auszuwerten.

4.5.7 Datensammlung

Die Kristalle wurden mit einer Nylonschlinge aus dem Tropfen geerntet und sofort in flüssigen N₂ überführt. Der Kristallisationspuffer funktioniert hier als Cryoprotektanz. Die Datensammlung erfolgte bei 100 K auf einem Imageplate Detektor (MarResearch, Hamburg). Die Auswertung der Daten wurde mit MOSFLM 6.00 durchgeführt. Die Zellkonstanten betragen a=b=98,5 Å und c=186,7 Å mit $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ und die Raumgruppe wurde mit P422 bestimmt. Zur Aufnahme des Datensatzes

wurde der Kristall parallel zu einer der zweizähligen Achsen orientiert und über einen Bereich von insgesamt 45° jeweils um 1° pro Bild weitergedreht.

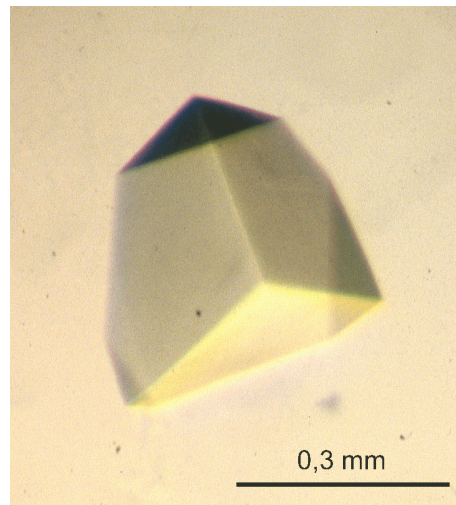


Abb. 31 Kristall von ara 4-HPPD.

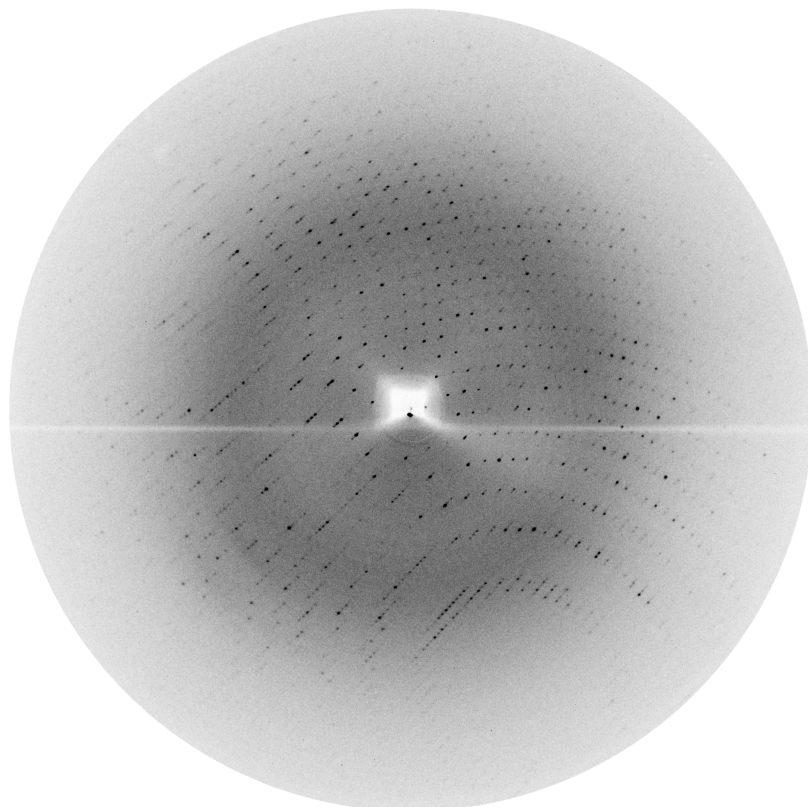


Abb. 32 1° Rotationsaufnahme ara 4-HPPD Kristall auf einem Imageplate Detektor. Der Plattenrand lag bei $2,9 \text{ \AA}$.

Datensatz	ara-4HPPD
Auflösung (Å)	3,2
Raumgruppe	P422
Zellachsen a=b,c (Å)	98,5, 186,7
Vollständigkeit (%)	82
Multiplizität	2,3
gemessene Reflexe	67542
unabhängige Reflexe	16577
R_{merge}^1	11,2

Tab. 10 Statistik der Datensammlung von *ara* 4-HPPD (¹ Der R_{merge} ist definiert als $\sum_h \sum_i i[l(h,i) - \langle l(h) \rangle] / \sum_h \sum_i i l(h,i)$, wobei $l(h, i)$ die Intensität der Messung i von h und $\langle l(h) \rangle$ der entsprechende Durchschnittswert von h für alle i Messungen von h ist; die Summation geht über alle Messungen).

4.6 Anorganische Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae*

4.6.1 Kristallisation

PPase aus Hefe kristallisierte unter den in 3.5.2 beschriebenen Bedingungen. Erste tetragonale Kristalle konnten bei Raumtemperatur nach etwa 1-2 Tagen beobachtet werden. Sie wuchsen in 2-3 Wochen bis zu einer Größe von 1 x 0,6 x 0,6 mm. Es traten zwei verschiedene Kristallformen in einem Tropfen auf. Beide Kristallformen hatten die Raumgruppe $P2_12_12_1$. Kristallform I hatte Zellachsen von ca. $a=50,00$; $b=77,50$; $c=161,50$ Å und Kristallform II hatte Zellachsen von $a=52,00$; $b=76,50$; $c=141,50$ Å. Kristalle beider Kristallformen beugten die Röntgenstrahlung einer konventionellen Röntgenquelle (Cu-Drehanode) bis zu einer maximalen Auflösung von ca. 2,0 Å.

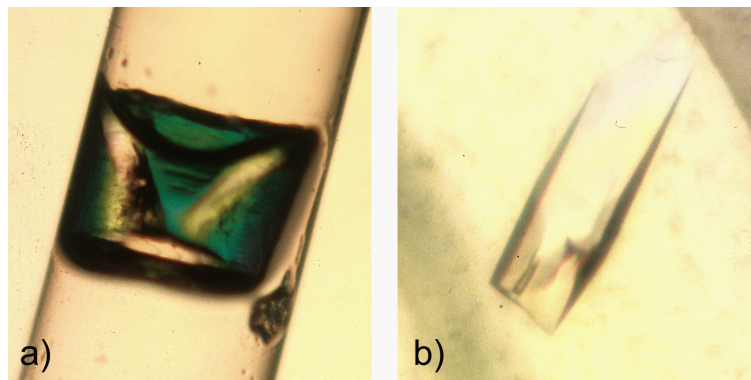


Abb. 33 Kristalle von PPase aus *Saccharomyces cerevisiae*. a) Kristallform I, montierter Kristall in Glaskapillare ($\varnothing 1$ mm); b) Kristallform II, die Größe des Kristalls beträgt ca. 0,6 x 0,3 x 0,2 mm.

4.6.2 Cokristallisation mit Inhibitoren

Kristalle der Hefe PPase Kristallform I wurden über Nacht in vorher equilibrierten Tropfen von 32,5 % PEG 1000 + 0,1 M Na-Citrat/HCl pH 6,0 + 10 mM $MgCl_2$ mit den Inhibitoren PNP (Imidodiphosphat) oder PCP (Methyldiphosphonsäure) jeweils in einer Konzentration von 30 mM inkubiert.

4.6.3 Datensammlung und Auswertung

Die Datensammlung erfolgte bei 4 °C auf einem Imageplate Detektor (MarResearch, Hamburg). Die Auswertung der Daten wurde mit MOSFLM 6.01 (Leslie, 1998), SCALA und TRUNCATE (CCP4) durchgeführt. Die Datenauswertung der verschiedenen Datensätze ist in Tab. 11 zusammengefasst.

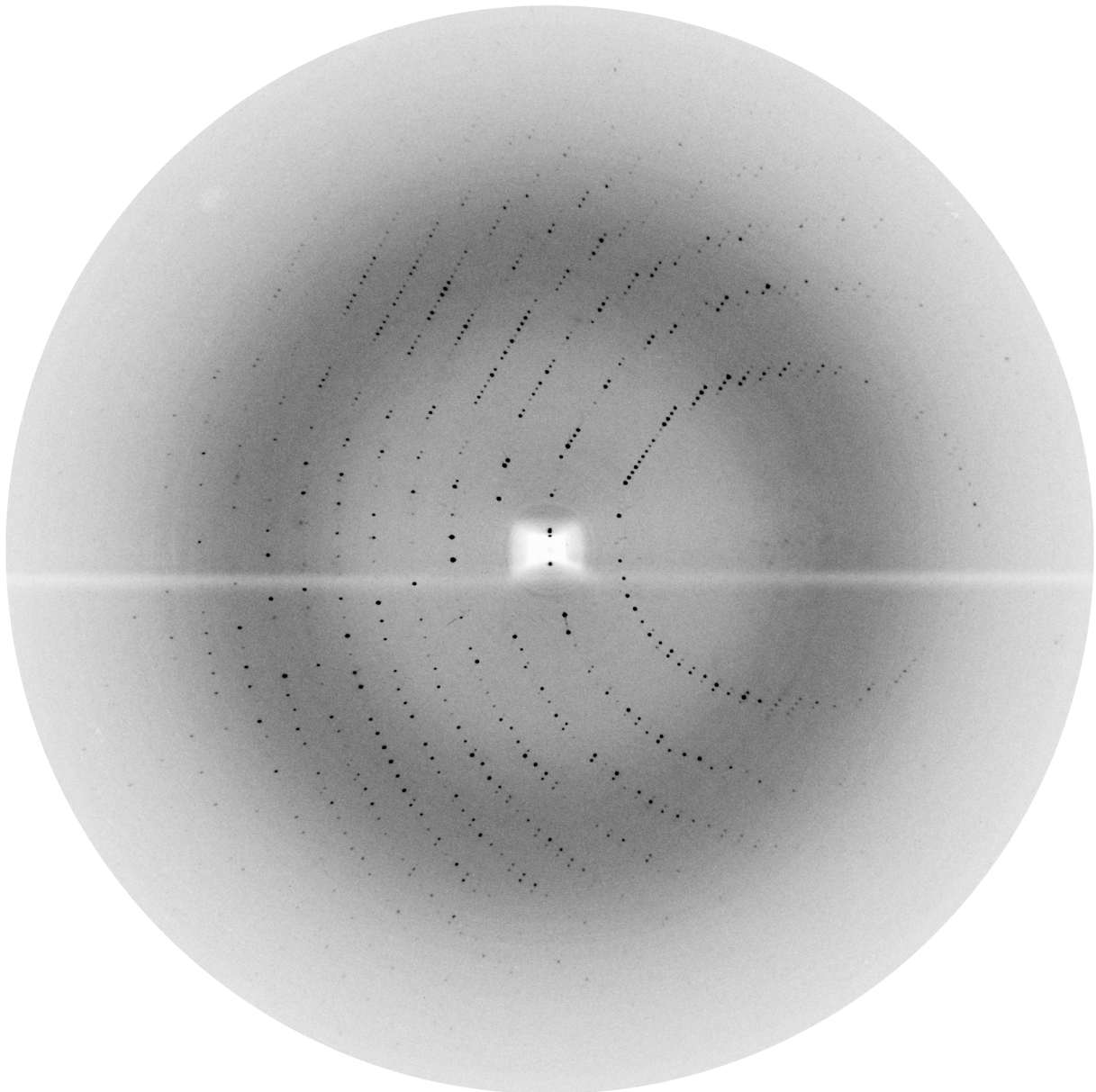


Abb. 34 1° Rotationsaufnahme Hefe PPase auf einem Imageplate Detektor. Der Plattenrand lag bei 2,0 Å.

Datensatz	PNP	PCP
Auflösung [Å]	2,30	2,45
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellachsen a, b, c	51,27 77,74 164,44	48,77 78,04 160,86
Vollständigkeit [%]	99,2	98,2
Multiplizität	3,5	5,4
R _{merge} ¹	9,6	13,4
gemessene Reflexe	196456	148846
unabhängige Reflexe	31841	22810

Tab. 11 Statistik der Datensammlung von *Saccharomyces cerevisiae* PPase mit den Inhibitoren PNP und PCP (¹ Der R_{merge} ist definiert als $\sum h \sum i [l(h,i) - \langle l(h) \rangle] / \sum h \sum i l(h,i)$, wobei l(h, i) die Intensität der Messung i von h und l(h) der entsprechende Durchschnittswert von h für alle i Messungen von h ist; die Summation geht über alle Messungen).

4.6.4 Strukturlösung der Inhibitorkomplexe

Die Inhibitorkomplexe wurden über die Methode des molekularen Ersatzes mit dem Programm AMoRe (Navaza, 1994) gelöst. Als Suchmodell wurde die *Saccharomyces cerevisiae* PPase ohne Heteroatome und Wassermoleküle (Harutyunyan *et al.*, 1996) verwendet. Die Verfeinerungen wurden mit X-PLOR 3.851 (Brünger, 1992a) durchgeführt.

Die Statistik der Verfeinerung der Datensätze der Inhibitorkomplexe von *Saccharomyces cerevisiae* PPase mit PNP und PCP sind in Tab. 11 zusammengefasst. Das so erhaltene Modell gibt die Aminosäuren 1-282 beider PPase Monomere wieder. Die C-terminalen 4 Aminosäuren und der ebenfalls C-terminale HisTag sind in der Elektronendichte nicht erkennbar. Ansonsten entsprechen die so erhaltenen Modelle sehr gut dem Suchmodell mit einem Dimer in der asymmetrischen Einheit. Die mittlere Rms-Abweichung für die Koordinaten des Suchmodells lag bei 0,27 bzw 0,29 Å. Bedingt durch die limitierte Auflösung der

Datensätze (2,3 Å für PNP; 2,45 Å für PCP) wurden nur 170 bzw. 112 Wassermoleküle eingebaut. Die R-Faktoren wurden bis auf 18,8 (PNP) und 18,6 (PCP) verfeinert.

Datensatz	PNP	PCP
Auflösungsbereich [Å]	12-2,3	12-2,45
unabhängige Reflexe [$I > 2\sigma$]	29848	22773
R-Faktor	18,8	18,6
Freier R-Faktor	23,15	22,4
Rms Abweichung		
Bindungslängen [Å]	0,006	0,007
Bindungswinkel [°]	1,37	1,47
Koordinaten [Å]	0.29	0.27
mittlerer B Faktor [Å ²]	37,07	25,00
Proteinatome	4498	4498
Mg ²⁺ Ionen	8	8
PNP Atome	18	18
Wassermoleküle	170	112

Tab. 12 Verfeinerungsstatistik von *Saccharomyces cerevisiae* PPase mit den Inhibitoren PNP und PCP.

4.6.5 Architektur des aktiven Zentrums

Das aktive Zentrum der *Saccharomyces cerevisiae* PPase besteht aus 20 Aminosäuren. Diese formen eine relativ weite Tasche, deren Boden von den aromatischen Resten Y93 F189 W188 gebildet wird. Der vom Lösungsmittel zugängliche Eingangsbereich des aktiven Zentrums wird ausschließlich von positiven Aminosäureresten K56, L78, K193 und K198 aufgebaut. Die gegenüberliegende Wand des aktiven Zentrums besteht aus den negativ geladenen Aminosäuren E48, E58, D71, D115, D117, D120, D147, E148, E150 und D152 (vgl. Abb. 6).

Die Lokalisation der vier Mg²⁺ Ionen und der Substratanaloga PNP und PCP ergab sich eindeutig aus Bereichen hoher positiver Differenzdichte (s. Tab. 13). Alle 4

Magnesiumatome sind oktaedrisch koordiniert, zum Teil mit negativ geladenen Aminosäureseitenketten, zum Teil mit Wassermolekülen und zum Teil mit den Atomen der Inhibitoren PNP und PCP.

Atom	σ in F_o-F_c	
	PNP	PCP
Mg ²⁺ 1	5,4	5,1
Mg ²⁺ 2	5,2	4,1
Mg ²⁺ 3	4,7	3,9
Mg ²⁺ 4	4,2	2,4
PO ₃ 1	5,3	3,9
PO ₃ 2	4,9	4,1

Tab. 13 Dichtepeaks der Magnesiumionen und der Inhibitoren PCP und PNP im aktiven Zentrum der Hefe PPase.

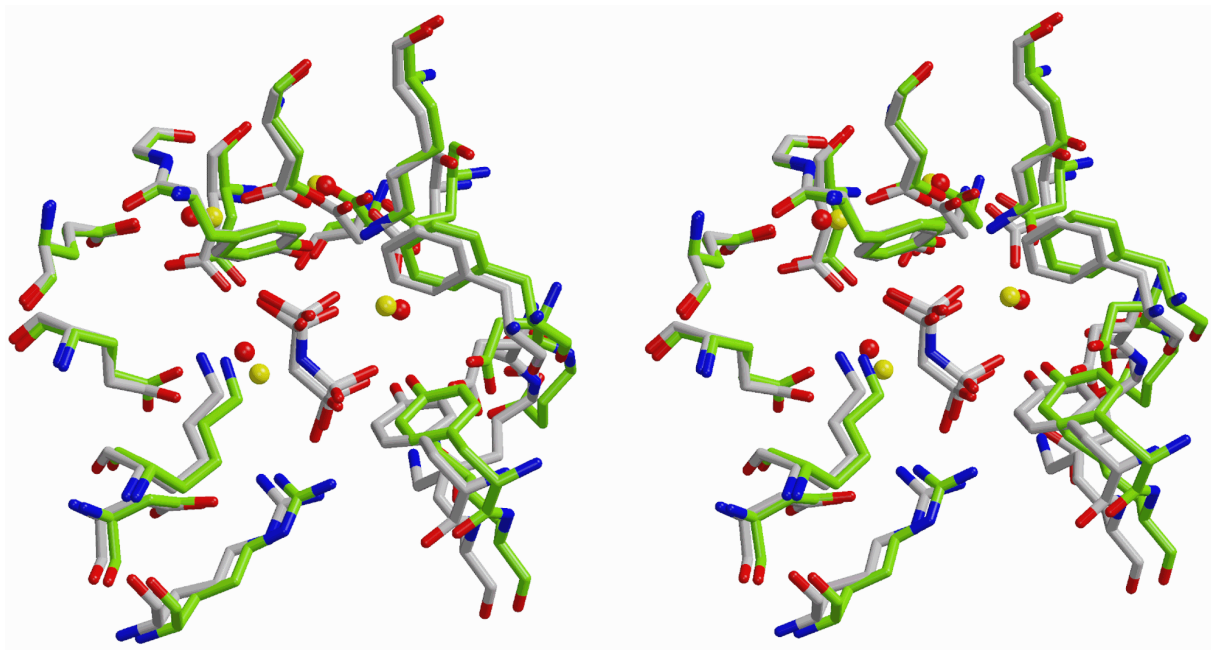


Abb. 35 Stereobild einer Überlagerung der aktiven Zentren von Hefe PPase im Komplex mit PNP (grün; Mg²⁺ rot) und PCP (grau; Mg²⁺ gelb).

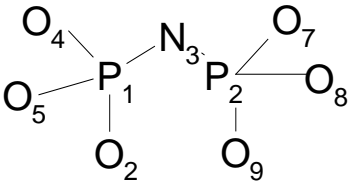
Überlagert man die aktiven Zentren der Inhibitor Komplexe von PPase mit PNP und PCP so zeigen sich erhebliche Übereinstimmungen, sowohl in der Position des Substratanalogons, als auch der Mg^{2+} Ionen (s. Abb. 35). Im folgenden soll daher vor allem auf die Architektur des aktiven Zentrums der Hefe PPase im Komplex mit PNP eingegangen werden. Dieser Inhibitor ähnelt dem natürlichen Substrat am meisten in Bindungslängen und Bindungswinkeln. Außerdem sind im Inhibitor Komplex mit PCP nicht alle Koordinierungsstellen der Mg^{2+} Ionen klar zu identifizieren und überdies ist Mg^{2+} 4 nur schwach in der Dichte erkennbar.

Mg^{2+} 1 ist koordiniert mit D115, D120 und D152 und drei Wassermolekülen (1, 2 und 3), bindet also die Substratanaloga nicht direkt. Eines dieser Wassermoleküle (1) kann allerdings eine Wasserstoffbrückenbindung zum O_7 Atom des PNP aufbauen (s. Tab. 15). Mg^{2+} 2 ist koordiniert mit den Carboxylgruppen von D117 und D120, den Wassermolekülen 1, 4 und 5 und dem O_8 Atom des Liganden. Mg^{2+} 3 ist wiederum an zwei Carboxylgruppen von D147 und D152 und zwei Wassermoleküle (6 und 7) gebunden. Außerdem verbrückt es die beiden Phosphatgruppen des PNP über die Atome O_5 und O_7 . Mg^{2+} 4 ist koordiniert mit E58, den Wassermolekülen 4, 10, 8 und 9, sowie dem Stickstoffatom (N_3) des PNP. Der Inhibitor selber bindet außer an die genannten Mg^{2+} Atome und Wassermoleküle vor allem an die Seitenketten der basischen Aminosäuren K56, R78, K154, K193 und an die OH Gruppen von Y93 und Y192. Eine Phosphatgruppe (P_i1) des Inhibitors ist dabei dem Inneren des aktiven Zentrums und damit den Magnesiumionen 1 und 2 zugekehrt. Die andere Phosphatgruppe (P_i2) hat Kontakt mit dem Lösungsmittel und ist relativ nahe dem Eingang des aktiven Zentrums und mit den erwähnten basischen Aminosäuren koordiniert.

Alle gerade genannten Interaktionen sind in den Tabellen 14 und 15 sowie in Abb. 36 zusammengefasst.

von	nach	Distanz (Å)	von	nach	Distanz [Å]
Mg ²⁺ 1	D115	2,64	Mg ²⁺ 3	D147	3,17
	D120	2,16		D152	2,33
	D152	2,30		PNP (O ₇)	2,40
	H ₂ O 1	2,56		PNP (O ₅)	2,50
	H ₂ O 2	2,06		H ₂ O 6	3,30
	H ₂ O 3	3,24		H ₂ O 7	2,60
Mg ²⁺ 2	D117	3,80	Mg ²⁺ 4	E58	2,70
	D120	2,60		PNP (N ₃)	2,90
	PNP (O ₈)	2,70		H ₂ O 4	3,43
	H ₂ O 1	2,70		H ₂ O 8	2,84
	H ₂ O 4	2,79		H ₂ O 9	2,55
	H ₂ O 5	3,06		H ₂ O 10	3,73

Tab. 14 Mögliche Koordination der Mg²⁺ Ionen im aktiven Zentrum der PPase im Komplex mit PNP. Symbole in Klammern bezeichnen die Atome des PNP wie in Tab. 15. X)wieder.

			von	nach	Distanz [Å]
			O ₇	Mg ²⁺ 3	2,51
				K154	3,23
				H ₂ O 1	2,70
			O ₈	Mg ²⁺ 2	3,12
				K56	3,13
				H ₂ O 4	2,80
				H ₂ O 12	3,74
			O ₉	Y93	2,63
				H ₂ O 7	3,23
				H ₂ O 11	2,58
			N ₃	Mg ²⁺ 4	2,93
				H ₂ O 9	3,41
von	nach	Distanz [Å]			
O ₂	R78	3,05			
	Y192	2,82			
O ₄	R78	2,82			
	H ₂ O 9	2,81			
O ₅	Mg ²⁺ 3	2,40			
	K193	3,32			
	H ₂ O 7	3,16			

Tab. 15 Interaktionen des Inhibitors PNP mit den Atomen des aktiven Zentrums der Hefe PPase.

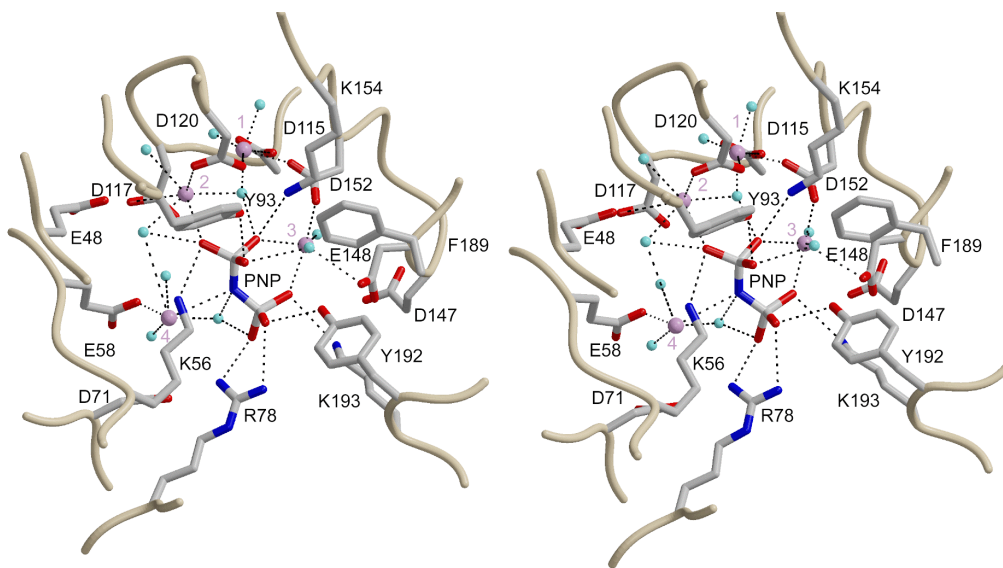


Abb. 36 Stereobild des aktiven Zentrums von *Saccharomyces cerevisiae* PPase. im Komplex mit PNP. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums und das C α Rückgrat des Proteins sind in grau, Wassermoleküle in hellblau und die Magnesiumatome in lila gezeichnet. Die Koordinierung der Mg²⁺ und Bindungen des PNP sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

Diskussion

5.1 4-HPPD aus etiolierten Maiskeimlingen

4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase ist ein Schlüsselenzym der α -Tocopherol- und Plastochinonsynthese bei Pflanzen. Dies macht es zu einem guten Zielenzym für herbizide Wirkstoffe. In dieser Arbeit wurde die Mais 4-HPPD aus etiolierten Keimlingen aufgereinigt, um einerseits Sequenzinformationen, wichtig zur Identifizierung des Gens, zu erhalten und um andererseits eine einleitende biochemische Charakterisierung des Enzyms durchführen zu können. Maiskeimlinge wurden als Ausgangsmaterial gewählt, da sie von allen getesteten Pflanzenarten (*Arabidopsis*, Reis, Erbse, Gerste) die höchste spezifische 4-HPPD Aktivität aufwiesen. Mais ist eine der vier wichtigsten Kulturpflanzen überhaupt und daher von großem Interesse im Bereich des Pflanzenschutzes.

5.1.1 Einleitende Biochemische Charakterisierung

Mais 4-HPPD wird im Zellrohextrakt durch einen unbekanntes, endogenen niedermolekularen Inhibitor gehemmt. Diese Verbindung lässt sich über Gelfiltration oder Ammoniumsulfatfällung abtrennen. Insgesamt ist die Mais 4-HPPD im Rohextrakt oder in partiell aufgereinigten Fraktionen instabil. Das Enzym kann nur zum Teil durch die Zugabe von Sulcotrion stabilisiert werden (s. 3.1.3.3). Sulcotrion chelatiert das $\text{Fe}^{(II)}$ im aktiven Zentrum der 4-HPPD und schützt es vermutlich so vor einer Oxidation. Inaktive Mais 4-HPPD kann weder durch die Zugabe von Reduktionsmitteln, noch von Fe^{2+} oder anderer zweiwertiger Ionen reaktiviert werden. Zweiwertige Ionen haben außerdem keine stabilisierende Wirkung (s. 3.1.3.2).

Im Gegensatz dazu kann rekombinante ara 4-HPPD mit $\text{Fe}^{(III)}$ Salzen zu 100 % in ihrer Aktivität rekonstituiert werden (s. 3.5.4). Dies deutet auf eine unterschiedlich feste Bindung des Eisenatoms im aktiven Zentrum, also auf eine unterschiedliche Koordination des $\text{Fe}^{(III)}$ hin. Auch andere Additive, wie Glycerin oder BSA können den Aktivitätsverlust nicht verringern. Bei einer Lagerung bei 4°C ist nach wenigen Tagen keine Enzymaktivität mehr messbar. Die 4-HPPD kann allerdings nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert werden. Der Aktivitätsverlust beträgt dabei

5-10 %. Mais 4-HPPD hat einen relativ schmalen Bereich der pH Stabilität etwa zwischen pH 7,0 und 8,0. Im sauren Bereich wird wahrscheinlich das Fe^{2+} im aktiven Zentrum oxidiert bzw. aus dem Enzym herausgelöst.

Der isoelektrische Punkt der Mais 4-HPPD konnte nach Chromatofokussierung mit 5,6 bestimmt werden. Dies deckt sich recht gut mit dem später anhand der cDNA Sequenz errechneten pI von 5,48.

Das apparente Molekulargewicht des Enzyms konnte über Gelfiltrationschromatographie nur relativ ungenau mit 88 kDa bestimmt werden. Dies ist deutlich größer als das Molekulargewicht des Monomers mit 48 kDa, allerdings auch kleiner als das Molekulargewicht des erwarteten Dimers mit 96 kDa. Die Bestimmungen wurden mit einer nur teilweise aufgereinigten Fraktion durchgeführt, so daß möglicherweise Verunreinigungen das Ergebnis beeinträchtigten.

5.1.2 Reinigung der Mais 4-HPPD

Mais 4-HPPD konnte im Verlauf der Proteinreinigung um einen Faktor von 1251 angereichert werden (s. 4.1.4.5). Trotz des hohen Reinigungsfaktors lag die 4-HPPD am Ende der Reinigung nicht homogen vor. Die Ausbeute betrug lediglich 0,6 % und die Verluste an Gesamtaktivität waren bei jedem Reinigungsschritt erheblich. Das Enzym war auch nur bedingt durch die Zugabe von Sulcotrion zu stabilisieren.

Auf eine weitere Aufreinigung wurde verzichtet, da jeder weitere Reinigungsschritt weitere, große Aktivitätsverluste bedeutet hätte. Nach einer Auftrennung über SDS-PAGE konnte die Mais 4-HPPD Bande ausgeschnitten werden. Ausgehend von 5 kg etiolierten Maiskeimlingen, entsprechend einer Gesamtproteinmenge von etwa 80 g, blieben am Ende nur 20 µg 4-HPPD. Das Protein wurde im Gel mit Trypsin verdaut und die Sequenz von insgesamt sieben Peptiden, darunter auch der *in vivo* N-Terminus, über Mikrosequenzierung bestimmt.

Alle über Mikrosequenzierung gewonnenen Peptide konnten durch Sequenzvergleiche mit den 4-HPPDs aus *Daucus carota* und *Arabidopsis thaliana* als Fragmente der Mais 4-HPPD identifiziert werden (vgl. Abb. 18).

4-HPPD ist in Maiskeimlingen und anderen pflanzlichen Geweben nur in geringer Menge vorhanden. Außerdem ist das Enzym recht instabil. Es ist daher nicht oder nur mit extrem hohem Aufwand möglich, ausreichend Protein für eine umfassende biochemische Charakterisierung oder gar Strukturaufklärung aufzureinigen. Die über

Mikrosequenzierung gewonnene Sequenzinformation konnte allerdings zur Identifikation der Mais cDNA genutzt werden. Die Klonierung der Mais 4-HPPD cDNA, sowie eine Überexpression des Proteins in *E. coli* bieten die Möglichkeit ausreichend Protein für eine weitere Charakterisierung zu gewinnen.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Reinigung einer nativen Mais 4-HPPD beschrieben. Mais 4-HPPD ist wie alle bislang bekannten eukaryotischen 4-HPPDs wahrscheinlich ein Dimer. Das Monomermolekulargewicht des Enzyms mit 48 kDa stimmt gut mit dem der anderen 4-HPPDs aus Pflanzen überein (Bartley, 1997; Chrost *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 1999). Die spezifische Aktivität des Enzyms betrug 25,06 nmol/mg Protein/min. Diese Ergebnisse stehen in klarem Gegensatz zu der Publikation von (Barta and Böger, 1996).

Die Autoren beschreiben hier die Aufreinigung eines monomeren Enzyms mit einem Molekulargewicht von 43 kDa bis zu Homogenität. Dies bei einem Aufreinigungsfaktor von nur 105 und einer geringen spezifischen Aktivität von nur 1,18 nmol/mg Protein/min.

In der vorliegenden Arbeit wird ebenfalls ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 43 kDa bei der Aufreinigung der Mais 4-HPPD in sehr großer Menge angereichert. Es kann erst im letzten Chromatographieschritt abgetrennt werden. (vgl. 4.1.4.5). Über seine N-terminale Aminosäuresequenz konnte dieses Protein als Amylogenin (EMBL:TAE18625) identifiziert werden. Aller Wahrscheinlichkeit nach haben (Barta and Böger, 1996) die Aufreinigung von Amylogenin beschrieben. In ihrer Präparation war Mais 4-HPPD als „Verunreinigung“ enthalten.

5.2 Rekombinante 4-HPPD cDNA aus *Arabidopsis thaliana*, Mais und Reis

Die umfassende biochemische Charakterisierung und Kristallisation einer pflanzlichen 4-HPPD als potentiell Zielenzym für herbizide Wirkstoffe erfordert große Mengen, d.h. mehr als 100 mg an gereinigtem Protein. Diese Mengen sind nur rekombinant durch heterologe Überexpression des Enzyms in *E. coli* zu gewinnen.

In dieser Arbeit wurden die 4-HPPD aus dem dikotylen Ackerunkraut und Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* und aus den monokotylen Kulturpflanzen Mais und Reis kloniert, in *E. coli* überexprimiert und bis zur Homogenität gereinigt.

Die 4-HPPD cDNAs aus Mais und Reis wurden in dieser Arbeit erstmals beschrieben. Die 4-HPPD aus *Arabidopsis thaliana* wurde ausgehend von der bereits bekannten Sequenz (Genbank Accession No. U89267; (Bartley, 1997)) kloniert. Zusammen mit den 4-HPPDs aus Maus und Mensch (s. 4.3) bilden diese Arbeiten ein breites Fundament und eine gute Ausgangsposition zur Kristallisation und vergleichenden, biochemischen Analyse eines oder mehrerer Enzyme und zur Entwicklung selektiv wirkender herbizider Wirkstoffe.

5.2.1 Isolation der cDNA und Klonierung

Die Isolation und Synthese der cDNA der drei pflanzlichen 4-HPPD cDNAs erfolgte über RT-PCR. Zunächst wurde aus dem jeweiligen Pflanzenmaterial Gesamt-RNA isoliert und diese mit Oligo dT Primern zur Erststrang cDNA Synthese verwendet. Die *Arabidopsis thaliana* cDNA konnte problemlos mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern amplifiziert werden. Zur Amplifikation von Mais 4-HPPD cDNA wurden ein 5'-Primer ausgehend von der *in vivo* N-terminalen Aminosäuresequenz und ein 3'-Primer ausgehend von der sehr konservierten C-terminalen Nukleotidsequenz der 4-HPPDs aus *Hordeum vulgare*, *Daucus carota* und *Arabidopsis thaliana* definiert. Dieser 3'-Primer wurde ebenfalls zur Amplifikation der Reis cDNA verwendet. Der 5'-Primer für die Reis 4-HPPD wurde aus dem EST Klon EMBL C26160 abgeleitet. Die reverse Transkription von Mais und Reis 4-HPPD mRNA war mit Standardmethoden zunächst nicht möglich, da die mRNA starke Sekundärstrukturen bildete. Nur der kombinierte Einsatz einer thermostabilen reversen Transkriptase (DISPLAY Systems), eines modifizierten PCR Protokolls (s. 3.4.3.2.2) und der „Q-Solution“ (Qiagen) ermöglichte schließlich die Amplifikation der cDNA in voller Länge. Die cDNAs wurden alle nach Anheftung der Restriktionsschnittstellen NdeI und BamHI in den Expressionsvektor pET14b kloniert.

5.2.3 Expression und Reinigung

Die pflanzlichen 4-HPPDs aus *Arabidopsis thaliana*, Mais und Reis wurden heterolog in *E.coli* BL21 (DE3) unter der Kontrolle des starken T7 Promotors im Expressionsvektor pET14b exprimiert. Der Vektor enthält zusätzlich einen N-terminalen HisTag, der mit Thrombin abspaltbar ist. Bei einer Inkubation bei 37 °C

wurden alle drei Enzyme in großer Menge, allerdings zum größten Teil unlöslich in „inclusion bodies“ exprimiert. Eine Expression bei Raumtemperatur führte zu einem verlangsamten Zellwachstum und auch zu größeren Mengen löslicher aktiver 4-HPPD. Die Ausbeute betrug bei ara 4-HPPD bis etwa 50 mg Protein/l Bakterienkultur. Die Ausbeuten von löslicher Mais und Reis 4-HPPD waren deutlich geringer, etwa 1-3 mg Protein/l Bakterienkultur. Alle drei Enzyme konnten durch eine Einschrittreinigung über eine Talon Metallchelatsäule bis zu einem Reinheitsgrad von mindestens 90 % aufgereinigt werden.

Für die Kristallisation und Strukturlösung eines Proteins werden mindestens 100 mg homogenes Protein benötigt. Daher wurde nur die 4-HPPD aus *Arabidopsis* für Kristallisationsexperimente eingesetzt (vgl. 4.4). Die lösliche Expression von Mais und Reis 4-HPPD ist zu gering und muß zunächst optimiert werden. Dies könnte über eine Fusion mit den gut löslichen Proteinen Glutathion-S-Transferase, Maltose binding Protein oder Thioredoxin versucht werden. Alternativ könnte eine Expression der 4-HPPD in Hefe durchgeführt werden. Nach Abspaltung des Fusionsproteins über eine geeignete Protease kann auch hier die Kristallisation versucht werden.

5.2.4 Sequenzvergleich der bekannten pflanzlichen 4-HPPDs

Die bis jetzt bekannten pflanzlichen 4-HPPDs aus *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Daucus carota* und *Arabidopsis thaliana* sind zueinander sehr homolog (insgesamt > 70 % Identität). Der C-terminale Bereich der Enzyme ist deutlich besser konserviert als der N-terminale Bereich. Besonders fällt dabei auf, daß die N-Termini der 4-HPPDs besonders in den ersten 25 Aminosäuren stark von einander abweichen (s. Abb. 37). Zwischen den Enzymen aus den monokotylen Pflanzen *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare* und *Zea mays* einerseits, und aus den dikotylen Pflanzen *Daucus carota* und *Arabidopsis thaliana* andererseits, lassen sich zwar jeweils Homologien erkennen, welche jedoch im Vergleich zum Rest der Proteine eher gering sind. Die N-Termini der monokotylen Pflanzen *Oryza sativa* und *Hordeum vulgare* sind sehr reich an Prolin, Threonin und Alanin. Sie enthalten auf den ersten 20 AS keine einzige geladene Aminosäure. Die Enzyme der α -Tocopherol- und der Plastochinonsynthese sind ausnahmslos im Chloroplastenvelope lokalisiert (Soll *et al.*, 1985), daher scheint es logisch und wahrscheinlich, daß auch die 4-HPPD im Chloroplasten lokalisiert ist. Die

N-terminale Sequenz bis Aminosäure 45 wurde mit dem Programm PSORT untersucht und weist Homologien mit einem Chloroplastenimportsignal auf. Für ein solches Signal würde auch der um ca. 15 Aminosäuren verkürzte, über Mikrosequenzierung bestimmte *in vivo* N-Terminus der 4-HPPD aus *Zea mays* sprechen.

Bei den 4-HPPDs aus dikotylen Pflanzen wird jedoch eine Lokalisation im Cytoplasma angenommen (Garcia *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 1999). Auch bei 4-HPPD aus Suspensionszellkulturen von *Daucus carota* werden *in vivo* die ersten 31 Aminosäuren abgespalten (Garcia *et al.*, 1997). Bei diesen Ergebnissen muss jedoch berücksichtigt werden, daß die Autoren zum einen die Lokalisation von 4-HPPD in einer nicht grünen Suspensionszellkultur der Möhre und zum anderen von *Arabidopsis thaliana* 4-HPPD in transgenem Tabak beschreiben. Ob die Situation bei unmodifizierten dikotylen Pflanzen genauso ist, muß erst noch gezeigt werden. In welchem Zellkompartiment Mais und Reis 4-HPPD lokalisiert sind, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht eindeutig geklärt werden.

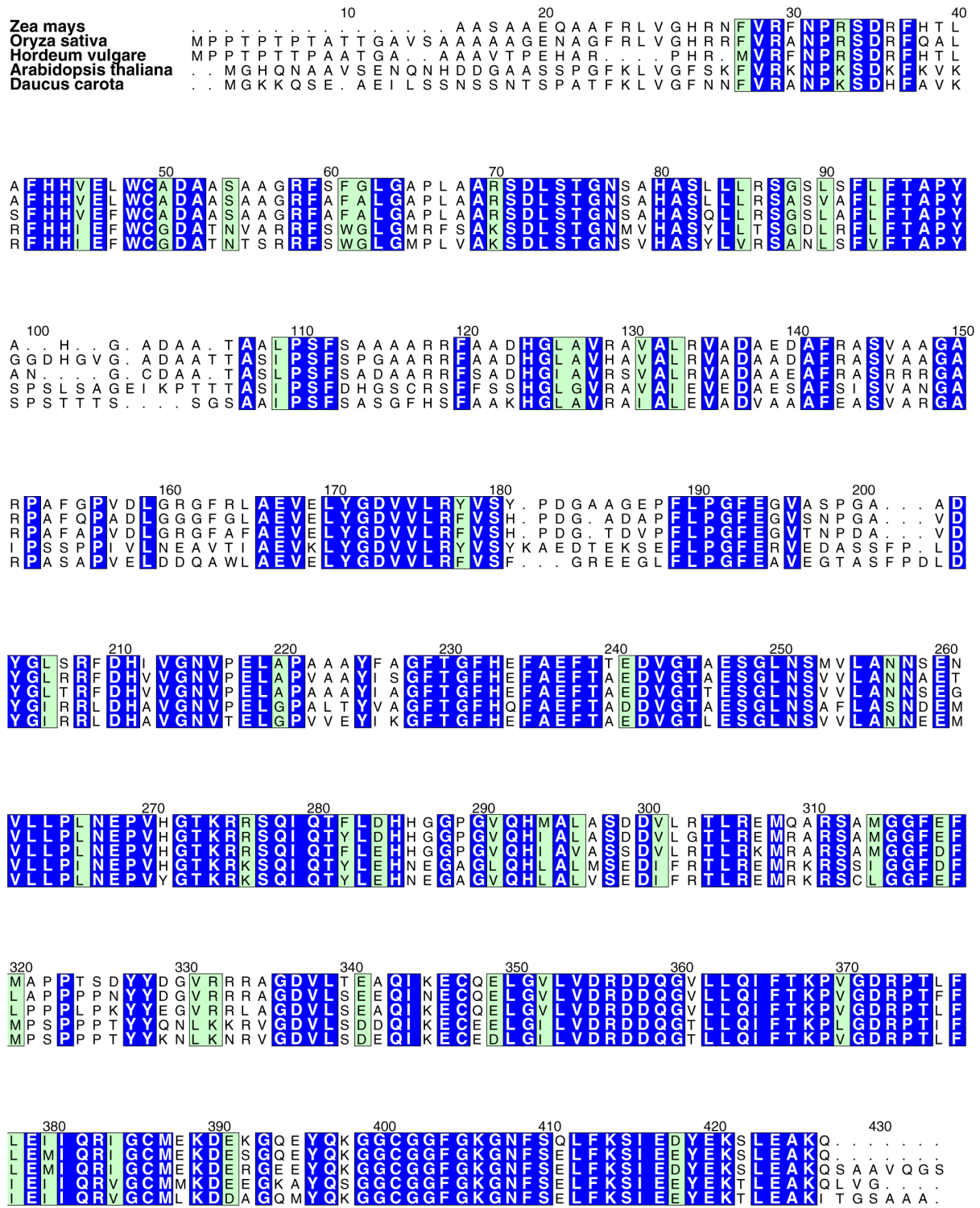


Abb. 37 Sequenzvergleich der pflanzlichen 4-HPPD Enzyme. Konservierte Reste sind farbig unterlegt.

5.3 Rekombinante 4-HPPD aus Maus und Mensch

In tierischen Organismen ist 4-HPPD in Leber und Niere lokalisiert und katalysiert einen Schritt beim Abbau aromatischer Aminosäuren, insbesondere von Tyrosin. Diese von der 4-HPPD in Pflanzen abweichende Funktion im Stoffwechsel macht eine weitere Charakterisierung der Säugerenzyme auch für den Bereich des Pflanzenschutzes interessant, da Toxizitätsprobleme von 4-HPPD Inhibitoren ausgeschlossen werden müssen. Eine Kristallisation und Strukturlösung einer Säuger 4-HPPD würde zu einem besseren Verständnis von Gemeinsamkeiten im Reaktionsmechanismus, sowie zur Entwicklung für Pflanzen spezifischer Inhibitoren führen. Auch im medizinischen Bereich werden spezifische Inhibitoren von Säuger 4-HPPD zur Therapie von Tyrosinämien benötigt.

5.3.1 Isolierung und Klonierung sowie Expression und Reinigung von 4-HPPD aus Maus und Mensch

Die Isolierung der beiden Säuger 4-HPPDs erfolgte über PCR aus Leber cDNA Banken mit genspezifischen Primern der beiden bereits bekannten Gene. Kloniert wurden beide cDNAs wie, bereits zuvor beschrieben, in pET Vektoren (Novagen). Die Expression erfolgte in *E.coli*. Beide Säuger 4-HPPDs wurden überwiegend in „inclusion bodies“ exprimiert. Die maximal erreichbare Ausbeute an löslicher, aktiver 4-HPPD pro Liter Bakterienkultur betrug 1 mg beim humanen Enzym und 5 mg beim Mausenzym. Die Menge an löslichem Protein ließ sich durch die Verwendung verschiedener Fusionsproteine (Glutathion-S-Transferase, Thioredoxin), oder verschiedener Promotoren (T7, Tac, Trc) nicht erhöhen. Eine Expression in Hefezellen sollte hier in Zukunft erwogen werden. Mit Maus 4-HPPD wurden Kristallisationsexperimente durchgeführt, bis jetzt konnten allerdings keine Kristalle beobachtet werden.

5.4 Kristallisation von 4-HPPD aus *Arabidopsis thaliana*

Die 4-HPPD aus *Arabidopsis thaliana* kristallisierte in 50 % MPD + 6 % PEG 200 und 0,1 M Na-Citrat pH 5,4-5,8. Der Kristallisationspuffer war hier gleichzeitig ein Cryoprotektanz. Die Kristalle beugten die Röntgenstrahlen eines Drehanoden-

generators teilweise bis 2,0 Å. Die Raumgruppe der Kristalle war P422 mit Zellkonstanten von $a = b = 98,5$ und $c = 186,7$. Allerdings wiesen fast alle 4-HPPD Kristalle eine hohe anisotrope Mosaizität entlang der c Achse auf. Die Mosaizität betrug durchweg mehrere Grad und machte eine Datenauswertung unmöglich. Alle Versuche, die Kristallordnung durch eine Variation der Kristallisationsbedingungen zu verbessern waren nicht von Erfolg gekrönt. Insgesamt wurden über 10000 verschiedene Kristallisationsbedingungen untersucht.

Es gelang jedoch, genau einen Datensatz eines besser geordneten Kristalls aufzunehmen. Dieser Datensatz reicht zur Auflösung der Struktur jedoch nicht aus, da bislang kein verwandtes Protein in seiner Raumstruktur aufgeklärt worden ist und Patterson Suchmethoden somit nicht zu Strukturlösung herangezogen werden können. Der Kristall war in seiner Qualität leider nicht zu reproduzieren, daher konnte die Struktur auch nicht über die Methode des Isomorphen Ersatzes (MIR) gelöst werden. Die Kristallisation von 4-HPPD mit angeheftetem N-terminalem HisTag, oder die Kristallisation von verschiedenen N-terminal verkürzten Enzymmutanten führte leider zu einer Verschlechterung der Kristallordnung. Auf C-terminale Deletionsmutanten musste verzichtet werden, da alle 4-HPPDs in diesem Bereich eine hochkonservierte Aminosäuresequenz aufweisen. Bei 4-HPPD aus Ratte reicht eine Deletion von 13 Aminosäuren am C-terminalen Ende aus, um das Enzym komplett zu inaktivieren (Lee *et al.*, 1996). Ein C-terminal angehängter HisTag bewirkt ebenfalls eine Inaktivierung des Enzyms (eigene Beobachtungen). Eine Strukturlösung von *Arabidopsis thaliana* 4-HPPD kann nach Aufklärung der Kristallstruktur einer 4-HPPD eines anderen Organismus über die Methode des molekularen Ersatzes versucht werden.

5.5 Anorganische Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae*

Lösliche anorganische Pyrophosphatase katalysiert die Hydrolyse von PP_i zu 2 P_i und somit eine sehr wichtige Reaktion im Stoffwechsel aller bekannter Organismen. Erst die Spaltung des Pyrophosphats macht viele Reaktionen, die durch die Hydrolyse von Nukleotidtriphosphaten zu Nukleotidmonophosphaten und PP_i vorangetrieben werden, irreversibel (Kornberg, 1962; Stetten, 1960). Die Entwicklung selektiver PPase Inhibitoren steht sowohl im Pflanzenschutz bei der Bekämpfung von Pilzen, als auch in der Medizin bei der Therapie von Osteoporose und der Krebsbekämpfung im Mittelpunkt des Interesses. Die Röntgenstrukturanalyse von

Inhibitorkomplexen der *Saccharomyces cerevisiae* Pyrophosphatase ermöglicht eine weitere Charakterisierung der Architektur ihres aktiven Zentrums und des Reaktionsmechanismus der PP_i Hydrolyse. Ausgehend von den hier gewonnenen Erkenntnissen können weitere PPase Inhibitoren entwickelt werden.

5.5.1 Kristallisation des Enzyms

Lösliche anorganische Pyrophosphatase kristallisierte in 30-35 % PEG 1000, 0,1 M Na-Citrat pH 6,0 + 10 mM $MgCl_2$. Unter diesen Bedingungen traten zwei Kristallformen auf. Beide hatten die Raumgruppe $P2_12_12_1$, unterschieden sich aber in ihren Zellkonstanten. Kristallform 1 mit ihren Zellkonstanten von ca. $a=50$, $b=77,5$, und $c=161,5$ Å. war bereits bekannt (Heikinheimo *et al.*, 1995). Kristallform II wurde hier zum ersten Mal beschrieben und hat Zellkonstanten von $a=52,00$; $b=76,50$; $c=141,50$ Å. Beide Kristalle beugten Röntgenstrahlung etwa gleich gut und wurden zur Herstellung von Inhibitorkomplexen verwendet.

Die Substratanaloga PNP und PCP und auch das eigentliche Substrat PP_i haben keine sehr hohe Affinität zu *Saccharomyces cerevisiae* PPase. Der K_m Wert für PP_i liegt, wie auch der pI_{50} Wert von PNP, im mikromolaren Bereich (Rumsfeld, 1997; Tuominen *et al.*, 1998). Zur Bildung von Inhibitorkomplexen mußten die Kristalle 1-2 Tage in Lösungen mit Inhibitorkonzentrationen von mindestens 5-10 mM eingelegt werden. Die Kristallpackung könnte hier das Eindringen der Inhibitoren in das aktive Zentrum des Enzyms erschwert haben. Eine Cokristallisation mit dem Enzym war nicht möglich. Vermutlich waren die Inhibitoren über einen so langen Zeitraum (2-3 Wochen), in Lösung, unter den Kristallisationsbedingungen nicht stabil.

5.5.2 Inhibitorkomplexe mit PNP und PCP

Die nicht hydrolysierbaren Substratanaloga PNP und PCP haben große Ähnlichkeit mit dem natürlichen Substrat und binden in das aktive Zentrum der PPase. In der Elektronendichte ist die Orientierung der Phosphatgruppen klar zu erkennen, wie am Beispiel von PNP in Abb. 38 dargestellt.

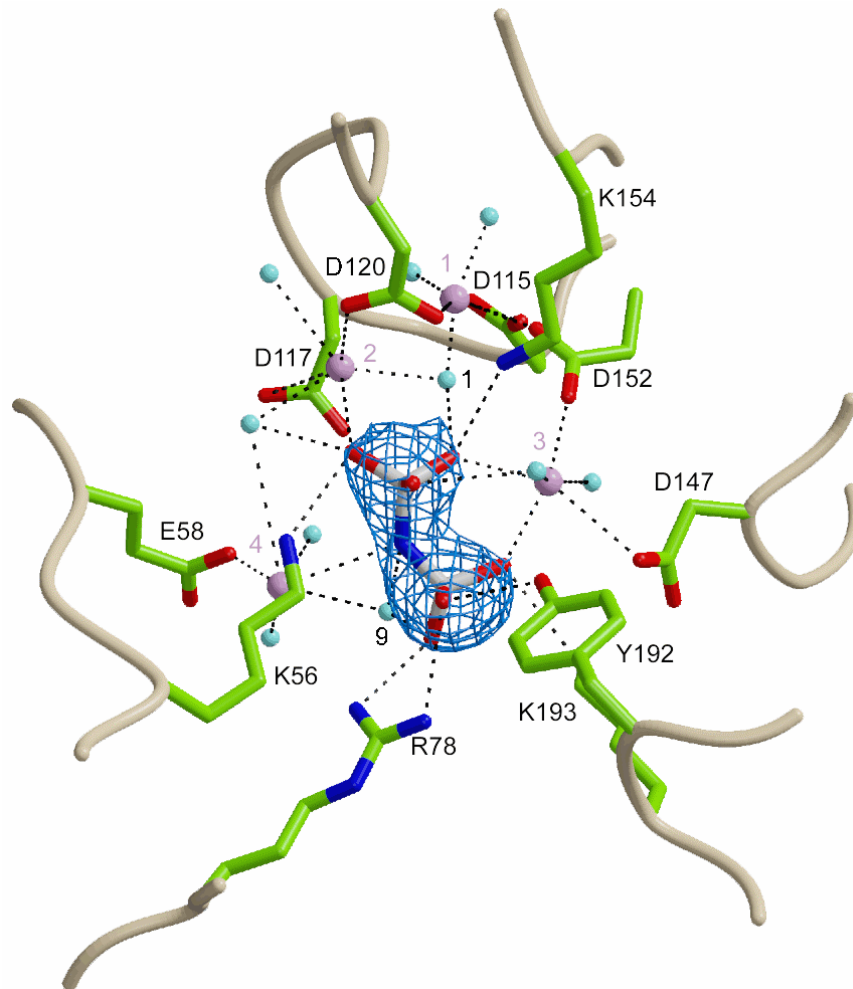


Abb. 38 Aktives Zentrum von *Saccharomyces cerevisiae* PPase im Komplex mit PNP. Das C α Rückgrat des Proteins ist in grau, die Aminosäuren des aktiven Zentrums sind in grün, Wasser in hellblau und Mg²⁺ Atome in lila dargestellt. Eine mit 1,0 σ konturierte $2F_o - F_c$ Elektronendichte ist dem PNP überlagert.

PPase ist in seinen kinetischen Eigenschaften ein nahezu perfekter Katalysator. Das Verhältnis von K_{cat}/K_m liegt bei $3 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Harutyunyan *et al.*, 1996). Seine hohe Wechselzahl wird durch eine nur moderate Affinität zu seinem Substrat erkauft. Dies erklärt auch die hohe Mobilität von PNP oder PCP sowie von Mg²⁺ 3 und Mg²⁺ 4, welche sich in den Inhibitorkomplexen von PPase und PCP oder PNP durch recht hohe B-Faktoren von 50-65 ausdrückt. Die Magnesiumatome 1 und 2 sind dagegen relativ fest gebunden. Diese Beobachtungen lassen sich gut mit dem in der Literatur diskutierten Mechanismus der Substratbindung in Einklang bringen (Baykov *et al.*, 1999; Harutyunyan *et al.*, 1996). Hiernach binden zunächst die Magnesiumionen

Mg^{2+} 1 und Mg^{2+} 2 an das aktive Zentrum. Anschließend erfolgt die Bindung des Substrats zusammen mit Mg^{2+} 3. Mg^{2+} 4 bindet zum Schluß und ist für die Hydrolyse des Pyrophosphats wohl nicht essentiell (Harutyunyan *et al.*, 1996). Alle bisher veröffentlichten Arbeiten zeigen Hefe PPase mit gebundenen Mn^{2+} Ionen statt mit dem physiologischen Cofaktor Mg^{2+} (Harutyunyan *et al.*, 1996; Harutyunyan *et al.*, 1981; Heikinheimo *et al.*, 1995). Mn^{2+} bindet weitaus stärker als Mg^{2+} an das Enzym, trotzdem enthält das aktive Zentrum einer „ruhenden“ PPase nur ein gebundenes Mn^{2+} Ion. In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals alle 4 physiologisch wichtigen Mg^{2+} Ionen identifiziert werden; Mg^{2+} 4 scheint jedoch relativ mobil zu sein.

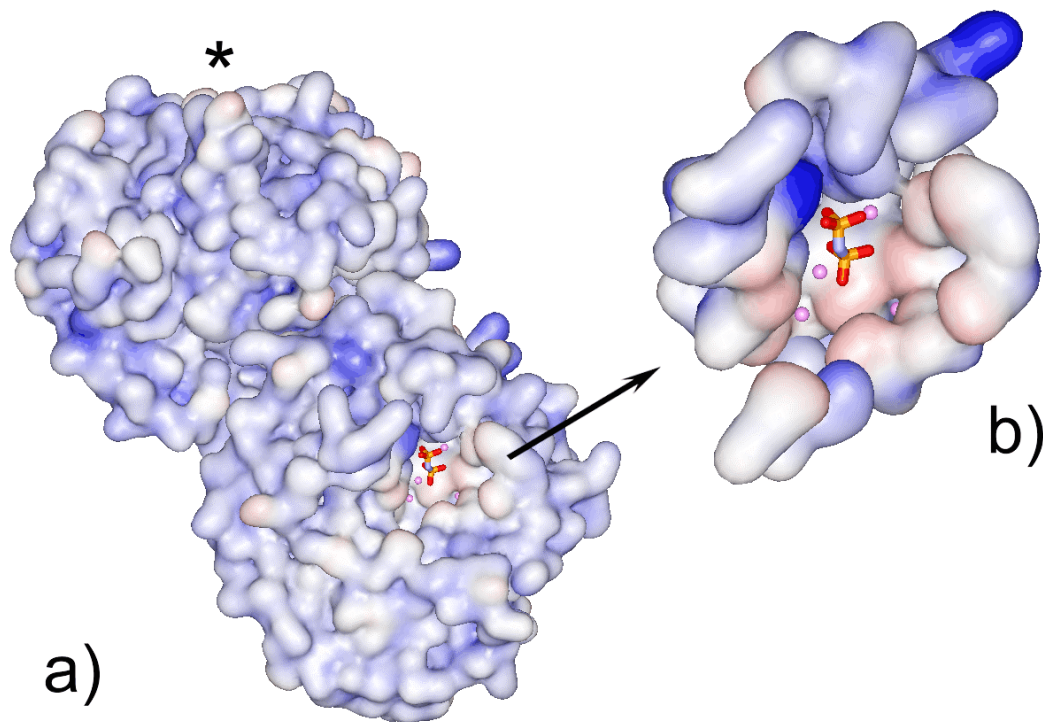


Abb. 39 Oberflächendarstellung a) des PPase Dimers b) Ausschnittvergrößerung des aktiven Zentrums, mit jeweils dem gebundenen PNP. Die Oberflächen sind gemäß ihres elektrostatischen Potentials eingefärbt. Mg^{2+} Ionen sind in lila dargestellt. Mit * ist die Lage des aktiven Zentrums des anderen Monomers bezeichnet.

Die Größe der Tasche des aktiven Zentrums, seine Lokalisation an der Moleküloberfläche und der Abstand von ca. 40 Å zwischen den beiden Substratbindungsstellen des PPase Dimers legen die Vermutung nahe, daß auch

noch sehr viel größere Inhibitormoleküle als PNP oder PCP binden können (vgl. Abb. 39). Die Vielzahl von Aminosäuren, die an der Substratbindung beteiligt sind bieten einen breiten Spielraum für die Entwicklung von spezifisch wirkenden und fester bindenden Inhibitoren.

5.5.3. Reaktionsmechanismus

Die Hydrolyse von Pyrophosphat folgt wahrscheinlich einem S_N2 Mechanismus. Ein Hydroxylanion greift die P_i 2 Phosphatgruppe aus der Richtung entgegengesetzt der P-O Bindung an. Es bildet sich ein trigonal bipyramidaler Übergangszustand aus (Baykov *et al.*, 1999). Dieser Übergangszustand wird stabilisiert durch die Mg^{2+} Ionen und die positiv geladenen Aminosäureseitenketten von K56 und K154 für P_i 2 und von R78, K193 und der OH-Gruppe von Y192 für P_i 1. Dies schwächt die P-O Bindungen. Das Wassermolekül (H_2O 1; Abb. 38) wird durch seine Bindung an Mg^{2+} 1 und Mg^{2+} 2 sowie seine Wasserstoffbrückenbindung an D117 stark polarisiert, so daß letztendlich die generelle Base, das Hydroxylanion am P2 Atom als Nukleophil angreift. Die P_i 2 Gruppe bewegt sich ein Stück auf das Hydroxylanion zu, wodurch die P-O Bindungen gespalten wird. P_i 1 verläßt das aktive Zentrum als Abgangsgruppe. Ein weiteres Wassermolekül (H_2O 9; Abb. 38) fungiert hier als generelle Säure.

Eine Überlagerung des PNP Inhibitorkomplexes mit nativer PPase einerseits und der PPase mit den gebundenen Reaktionsprodukten andererseits zeigt, daß alle drei Strukturen große Übereinstimmungen zeigen. Nach der Bindung von PNP lassen sich so gut wie keine Konformationsänderungen im aktiven Zentrum beobachten. Die Position der Mg^{2+} Ionen ist jedoch etwa 0,5-1 Å voneinander verschieden (s. Abb. 40). Die obengenannten Interaktionen können auch hier beobachtet werden (vgl. Abb. 36) Das nukleophile Wasser (H_2O 1) ist ebenfalls erkennbar. Es liegt allerdings nicht entgegengesetzt der P2-N3 Bindung orientiert, welche bei PNP die P-O Bindung ersetzt. In der beobachteten Orientierung wäre H_2O 1 nicht in der Lage das Phosphoratom P2 anzugreifen. Es ist denkbar, daß das eigentliche Substrat, etwa 180° um seine Längsachse gedreht bindet und so denn nukleophilen Angriff ermöglicht.

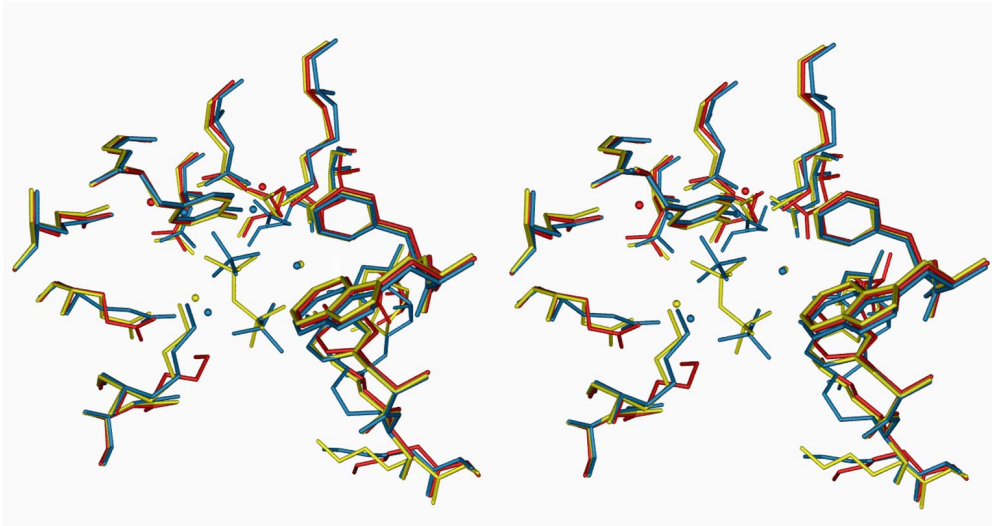


Abb. 40 Stereobild der Überlagerung des aktiven Zentrums von Hefe PPase im Komplex mit PNP (gelb), ohne Liganden (rot) (Harutyunyan *et al.*, 1981); und im Komplex mit 2 P_i (blau) (Harutyunyan *et al.*, 1996).

Ausgehend von den hier diskutierten Ergebnissen werden weitere Komplexstrukturen von *Saccharomyces cerevisiae* PPase z.B. mit Inhibitoren der Klasse der Bisphosphonate, oder mit Nukleotiden und Nukleotidanaloga weiteren Aufschluß zu den Bindungsmöglichkeiten im aktiven Zentrum der Pyrophosphatase geben können. Erste Ergebnisse bei der Cokristallisation mit dem nichthydrolysierbaren ATP Analogon AMPPNP zeigen eine - wenn auch nur sehr schwache - Besetzung des aktiven Zentrums durch die β und γ Phosphatgruppe des Liganden. Diese Ergebnisse müssen noch optimiert werden, geben allerdings Anlass zu der Annahme, daß auch relativ große Inhibitormoleküle in der Lage sind in das aktive Zentrum der PPase zu binden. Die Inhibitorkomplexe können auch als Grundlage für „Modelling“ Experimente dienen. Berücksichtigt man das unterschiedliche Bindungsverhalten der vier Mg²⁺ Ionen, Mg²⁺ 1 und 2 binden viel stärker als Mg²⁺ 3 und 4 (s. 5.2.2), so sind z.B. Inhibitoren denkbar, welche die Metallatome ganz oder teilweise ersetzen. Weiteren Aufschluß über unterschiedliche Bindungsspezifitäten und Gemeinsamkeiten, sowie Unterschiede in der Architektur des aktiven Zentrums bei verschiedenen löslichen Pyrophosphatasen kann die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse anderer besonders eukaryotischer Pyrophosphatasen bieten.

Literaturverzeichnis

- Baltscheffsky, M. and Baltscheffsky, H. (1992) Inorganic pyrophosphate and inorganic pyrophosphatase. *In: Ernster L. (ed) Molecular mechanisms in bioenergetics. Elsevier, Amsterdam*, 331-348.
- Baltscheffsky, M., Schultz, A. and Baltscheffsky, H. (1999) H⁺-proton-pumping inorganic pyrophosphatase: a tightly membrane-bound family. *FEBS Letters.*, **452**, 121-123.
- Barta, I.C. and Böger, P. (1996) Purification and Characterization of 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase From Maize. *Pesticide Science*, **48**, 109-116.
- Bartley, G.E. (1997) Cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA for p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiology*, **113**, 1465-1468.
- Baykov, A.A., Alexandrov, A.P. and Smirnova, I.N. (1992) A two-step mechanism of fluoride inhibition of rat liver inorganic pyrophosphatase. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **294**, 238-243.
- Baykov, A.A., Cooperman, B.S., Goldman, A. and Lahti, R. (1999) Cytoplasmic Inorganic Pyrophosphatase. *In: Schröder H. C., Müller W. E. G. (eds) Progress in Molecular and Subcellular Biology; Springer Verlag Berlin, Heidelberg*, **23**, 127-150.
- Berger, S., Ellersiek, U., Kinzelt, D. and Steinmuller, K. (1993) Immunopurification of a subcomplex of the NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase from the cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC6803* [published erratum appears in *FEBS Lett* 1993 Sep 6;330(1):110]. *FEBS Letters*, **326**, 246-250.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*, **7**, 1513-1523.
- Blundell, T.L. and Johnson, L.N. (1976) *Protein Crystallography*. Academic Press, London, Uk.
- Boyington, J.C., Gaffney, B.J., Amzel, L.M., Doctor, K.S., Mavrophilipos, D.V., Mavrophilipos, Z.V., Colom, A. and Yuan, S.M. (1994) The x-ray structure and biophysical studies of a 15-lipoxygenase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **744**, 310-313.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brünger, A.T. (1992a) X-PLOR, version 3.581. A system for X-ray crystallography and NMR. *Yale University Press, New Haven*.
- Brünger, A.T. (1992b) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, **355**, 472-475.
- Buckthal, D.J., Roche, P.A., Moorehead, T.J., Forbes, B.J. and Hamilton, G.A. (1987) 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from pig liver. *Methods in Enzymology*, **142**, 132-138.

- Carter, C.W., Jr. and Carter, C.W. (1979) Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *Journal of Biological Chemistry*, **254**, 12219-12223.
- Chrost, B., Falk, J., Kernebeck, B., Molleken, H. and Krupinska, K. (1999) Tocopherol biosynthesis in senescing chloroplasts - A mechanism to protect envelope membranes against oxidative stress and a prerequisite for lipid remobilization? *Chloroplast: From Molecular Biology to Biotechnology.*, **64**, 171-176.
- Cooperman, B.S. (1982) The mechanism of action of yeast inorganic pyrophosphatase. *Methods in Enzymology*, **87**, 526-548.
- Crouch, N.P., Adlington, R.M., Baldwin, J.E., Lee, M.H. and Mackinnon, C.H. (1997) A Mechanistic Rationalisation For the Substrate Specificity of Recombinant Mammalian 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (4-Hppd). *Tetrahedron*, **53**, 6993-7010.
- Daley, L.A., Renosto, F. and Segel, I.H. (1986) ATP sulfurylase-dependent assays for inorganic pyrophosphate: applications to determining the equilibrium constant and reverse direction kinetics of the pyrophosphatase reaction, magnesium binding to orthophosphate, and unknown concentrations of pyrophosphate. *Analytical Biochemistry*, **157**, 385-395.
- Darwin, C.G. (1914) The theory of x-ray reflexion. *Phil. Mag.*, **27**, 315-333.
- Denoya, C.D., Skinner, D.D. and Morgenstern, M.R. (1994) A *Streptomyces avermitilis* gene encoding a 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase-like protein that directs the production of homogentisic acid and an ochronotic pigment in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **176**, 5312-5319.
- Desikan, K.R., Dhodapkar, M.V., Munshi, N.C. and Barlogie, B. (1999) Recent advances in the treatment of multiple myeloma. *Current Opinion in Hematology*, **6**, 216-221.
- Drenth, J. (1994) *Principles of X-ray Crystallography*. Springer Verlag, New York, USA.
- Ellis, M.K., Whitfield, A.C., Gowans, L.A., Auton, T.R., Provan, W.M., Lock, E.A. and Smith, L.L. (1995) Inhibition of 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase By 2-(2-Nitro-4-Trifluoromethylbenzoyl)-Cyclohexane-1,3-Dione and 2-(2-Chloro-4-Methanesulfonylbenzoyl)-Cyclohexane-1,3-Dione. *Toxicology & Applied Pharmacology*, **133**, 12-19.
- Endo, F., Awata, H., Katoh, H. and Matsuda, I. (1995) A nonsense mutation in the 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase gene (Hpd) causes skipping of the constitutive exon and hypertyrosinemia in mouse strain III. *Genomics*, **25**, 164-169.
- Endo, F., Awata, H., Tanoue, A., Eda, Y. and Matsuda, I. (1991) Tyrosinaemia type III: immunochemical studies on 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase and molecular cloning of cDNA for the enzyme. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **14**, 783-786.
- Endo, F., Awata, H., Tanoue, A., Ishiguro, M., Eda, Y., Titani, K. and Matsuda, I. (1992) Primary structure deduced from complementary DNA sequence and expression in cultured cells of mammalian 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase. Evidence that the enzyme is a homodimer of identical subunits homologous to rat liver-specific alloantigen F. *Journal of Biological chemistry*, **267**, 24235-24240.

- Engh, R.A. and Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallographica*, **A47**, 392-400.
- Ewald, P.P. (1921) Das "reziproke Gitter" in der Strukturtheorie. *Zeitschrift für Kristallographie*, **56**, 129-156.
- Fersht, A. (1984) Enzyme structure and mechanism. *W.H. Freeman and Co., New York*, 2nd edition, 221-247.
- Forbes, B.J.R. and Gordon, G.A. (1994) Mechanism and Mechanism-Based Inactivation of 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase. *Bioorganic Chemistry*, **22**, 343-361.
- Fuqua, W.C., Coyne, V.E., Stein, D.C., Lin, C.-M. and Weiner, R.M. (1991) Characterization of melA: a gene encoding melanin biosynthesis from the marine bacterium *Shewanella colwelliana*. *Gene*, **109**, 131-136.
- Garcia, I., Rodgers, M., Lenne, C., Rolland, A., Sailland, A. and Matringe, M. (1997) Subcellular Localization and Purification of a P-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase From Cultured Carrot Cells and Characterization of the Corresponding Cdna. *Biochemical Journal*, **325**, 761-769.
- Garcia, I., Rodgers, M., Pepin, R., Hsieh, T.F. and Matringe, M. (1999) Characterization and subcellular compartmentation of recombinant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from Arabidopsis in transgenic tobacco. *Plant Physiology*, **119**, 1507-1516.
- Gershwin, M.E., Coppel, R.L., Bearer, E., Peterson, M.G., Sturgess, A. and McKay, I.R. (1987) Molecular cloning of the liver-specific rat F antigen. *Journal of Immunology*, **139**, 3828-3833.
- Giacovazzo, C., Monaco, H.L., Viterbo, D., Scordari, F., Gilli, G., Zanotti, G. and Catti, M. (1992) *Fundamentals of Crystallography*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Golden, B.D. (1998) The prevention and treatment of osteoporosis. *Arthritis Care & Research*, **11**, 124-134.
- Gonzalez, M.A. and Cooperman, B.S. (1986) Glutamic acid-149 is important for enzymatic activity of yeast inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry*, **25**, 7179-85.
- Han, S., Eltis, L.D., Timmis, K.N., Muchmore, S.W. and Bolin, J.T. (1995) Crystal Structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB degrading Pseudomonad. *Science*, **270**, 976-980.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, **166**, 557-580.
- Hansen, T., Urbanke, C., Leppanen, V.M., Goldman, A., Brandenburg, K. and Schafer, G. (1999) The extreme thermostable pyrophosphatase from Sulfolobus acidocaldarius: Enzymatic and comparative biophysical characterization. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **363**, 135-147.
- Harutyunyan, E.H., Kuranova, I.P., Vainshtein, B.K., Hohne, W.E., Lamzin, V.S., Dauter, Z., Teplyakov, A.V. and Wilson, K.S. (1996) X-Ray Structure of Yeast Inorganic Pyrophosphatase Complexed With Manganese and Phosphate. *European Journal of Biochemistry*, **239**, 220-228.

- Harutyunyan, E.H., Terzyan, S.S., Voronova, A.A., Kuranova, I.P., Smirnova, E.A., Vainshtein, B.K., Höhne, W. and Hansen, G. (1981) An X-ray study of yeast inorganic pyrophosphatase at 3 Å resolution. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **258**, 1481-1485.
- Hegg, E.L. and Que, L. (1997) The 2-His-1-carboxylate facial triad. An emerging structural motive in mononuclear non-heme iron (II) enzymes. *European Journal of Biochemistry*, **250**, 625-629.
- Heikinheimo, P., Lehtonen, J., Baykov, A., Lahti, R., Cooperman, B.S. and Goldman, A. (1996) The Structural Basis For Pyrophosphatase Catalysis. *Structure*, **4**, 1491-1508.
- Heikinheimo, P., Salminen, T., Lahti, R., Cooperman, B. and Goldman, A. (1995) New Crystal Forms of *Escherichia Coli* and *Saccharomyces Cerevisiae* Soluble Inorganic Pyrophosphatases. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **51**, 399-401.
- Helliwell, J.R. (1992) *Macromolecular crystallography with synchrotron radiation*.
- Hendrickson, W.A., Horton, J.R., Murthy, H.M., Pahler, A. and Smith, J.L. (1989) Multiwavelength anomalous diffraction as a direct phasing vehicle in macromolecular crystallography. *Basic Life Sciences*, **51**, 317-324.
- Hoppe, W. (1957) Die Faltmolekülmethode: Eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen. *Acta Crystallographica*, **10**, 750-751.
- Huber, R. (1965) Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Crystallographica*, **19**, 353-356.
- Hummel, R., Norgaard, P., Andreasen, P.H., Neve, S., Skjodt, K., Tornehave, D. and Kristiansen, K. (1992) A Tetrahymena gene encodes a protein that is homologous with the liver-specific F-antigen and associated with membranes of the Golgi apparatus and transport vesicles. *Journal of Molecular Biology*, **228**, 850-861.
- Jancarik, J. and Kim, S.-H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography*, **11**, 268-272.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallographica Section a Foundations of Crystallography*, **2**, 110-119.
- Kankare, J., Salminen, T., Lahti, R., Cooperman, B.S., Baykov, A.A. and Goldman, A. (1996) Structure of *Escherichia Coli* Inorganic Pyrophosphatase At 2.2-Angstrom Resolution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **52**, 551-563.
- Karle, J. (1989) Direct methods in protein crystallography. *Acta Crystallographica - Section a - Foundations of Crystallography*, **45**, 765-781.
- Kay, H.D. (1928) Phosphatases of mammalian tissues. II. Pyrophosphatases. *Biochemical Journal*, **22**, 1444-1448.

- Kita, A., Kita, S., Fujisawa, I., Inaka, K., Ishida, T., Horiike, K., Nozaki, M. and Miki, K. (1999) An archetypical extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: the crystal structure of catechol 2,3-dioxygenase (metapyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2. *Structure*, **7**, 25-34.
- Kleberjanke, T. and Krupinska, K. (1997) Isolation of Cdna Clones For Genes Showing Enhanced Expression in Barley Leaves During Dark-Induced Senescence As Well As During Senescence Under Field Conditions. *Planta*, **203**, 332-340.
- Kornberg, A. (1962) On the metabolic significance of of phosphorolytic and pyrophosphorolytic reactions. In: Kasha M., Pullman D. (eds) *Horizon in biochemistry*. Academic Press, New York, 251-264.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, D.L., Knudsen, C.G., Michaely, W.J., Chin, H.L., Nguyen, N.H., Carter, C.G., Cromartie, T.H., Lake, B.H., Shribbs, J.M. and Fraser, T. (1998) The structure-activity relationships of the triketone class of HPPD herbicides. *Pesticide Science*, **54**, 377-384.
- Lee, M.H., Zhang, Z.H., Mackinnon, C.H., Baldwin, J.E. and Crouch, N.P. (1996) The C-Terminal of Rat 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Is Indispensable For Enzyme Activity. *FEBS Letters*, **393**, 269-272.
- Leslie, A.G.W. (1998) *Mosflm 6.0 User Guide*. MRC Laboratory of molecular biology, Cambridge.
- Lin, K.T. and Crawhall, J.C. (1976) Purification of p-hydroxyphenylpyruvate hydroxylase from rat liver--requirement for cofactors. *Canadian Journal of Biochemistry*, **54**, 423-431.
- Lindblad, B. (1971) Radiochemical assays for p-hydroxyphenylpyruvate hydroxylase activity in human liver. *Clinica Chimica Acta*, **34**, 113-121.
- Lindblad, B., Lindstedt, S., Olander, B. and Omfeldt, M. (1970) Purification of p-hydroxyphenylpyruvate hydroxylase from human liver. *Acta Chemica Scandinavica*, **25**, 329-330.
- Lindstedt, S. and Odelhog, B. (1987a) 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Pseudomonas*. *Methods in Enzymology*, **142**, 143-148.
- Lindstedt, S. and Rundgren, M. (1982a) Blue color, metal content, and substrate binding in 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain P. J. 874. *Journal of Biological Chemistry*, **257**, 11922-11931.
- Lindstedt, S. and Rundgren, M. (1982b) Inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain P.J. 874 the enol tautomer of the substrate. *Biochimica et Biophysica Acta*, **704**, 66-74.
- Lock, E.A., Ellis, M.K., Gaskin, P., Robinson, M., Auton, T.R., Provan, W.M., Smith, L.L., Prisbylla, M.P., Mutter, L.C. and Lee, D.L. (1998) From Toxicological Problem to Therapeutic Use - the Discovery of the Mode of Action of 2-(2-Nitro-4-Trifluoromethylbenzoyl)-1,3-Cyclohexanedione (Ntbc), Its Toxicology and Development As a Drug. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **21**, 498-506.

- Lundin, M., Baltscheffsky, H. and Ronne, H. (1991) Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase, that is essential for mitochondrial function. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 12168-12172.
- McPherson, A. (1990) Current approaches to macromolecular crystallization. *European Journal of Biochemistry*, **189**, 1-23.
- McPherson, A.J. (1982) *Preparation and analysis of protein crystals*. Jon Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Moe, O.A. and Butler, L.G. (1972) Yeast inorganic pyrophosphatase. 3. Kinetics of Ca²⁺ inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, **247**, 7315-9.
- Murzin, A.G. (1996) Structural classification of proteins: new superfamilies. *Current Opinion in Structural Biology*, **6**, 386-394.
- Navaza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallographica*, **A50**.
- Norris, S.R., Barrette, T.R. and Dellapenna, D. (1995) Genetic Dissection of Carotenoid Synthesis in Arabidopsis Defines Plastoquinone As an Essential Component of Phytoene Desaturation. *Plant Cell*, **7**, 2139-2149.
- Norris, S.R., Shen, X.H. and Dellapenna, D. (1998) Complementation of the Arabidopsis Pds1 Mutation With the Gene Encoding P-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase. *Plant Physiology*, **117**, 1317-1323.
- Oganessyan, V.Y., Kurilova, S.A., Vorobyeva, N.N., Nazarova, T.I., Popov, A.N., Lebedev, A.A., Awaeva, S.M. and Harutyunyan, E.H. (1994) X-ray crystallographic studies of recombinant inorganic pyrophosphatase from *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, **348**, 301-304.
- Ohlendorf, D.H., Lipscomb, J.D. and Weber, P.C. (1988) Structure and assembly of protocatechuate 3,4-dioxygenase. *Nature*, **336**, 403-405.
- Ohlendorf, D.H., Orville, A.M. and Lipscomb, J.D. (1994) Structure of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* at 2.15 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **244**, 586-608.
- Pallett, K.E., Little, J.P., Sheekey, M. and Veerasekaran, P. (1998) The mode of action of isoxaflutole I. Physiological effects, metabolism, and selectivity. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, **62**, 113-124.
- Patterson, A.L. (1934) A Fourier series method for the determination of the components of interatomic distances in crystals. *Physical Reviews*, **46**, 372-376.
- Que, L.J. and Ho, R.Y.N. (1996) Dioxygen activation by Enzymes with mononuclear non-heme iron active sites. *Chemical Reviews*, **96**, 2607-2624.
- Rea, P.A. and Poole, J.R. (1993) Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **44**, 157-180.
- Roach, P.L., Schofield, C.J., Baldwin, J.E., Clifton, I.J. and Hajdu, J. (1995) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on recombinant isopenicillin N synthase from *Aspergillus nidulans*. *Protein Science*, **4**, 1007-1009.

- Rossmann, M.G. and Blow, D.M. (1962) The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallographica*, **15**, 24-31.
- Ruetschi, U., Delleßen, A., Sahlin, P., Stenman, G., Rymo, L. and Lindstedt, S. (1993) Human 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Primary structure and chromosomal localization of the gene. *European Journal of Biochemistry*, **213**, 1081-1089.
- Ruetschi, U., Odelhoeg, B., Lindstedt, S., Barros-Soederling, J., Persson, B. and Joernvall, H. (1992) Characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Primary structure of the *Pseudomonas* enzyme. *European journal of Biochemistry*, **205**, 738-744.
- Rumsfeld, J. (1997) Isolierung und Charakterisierung anorganischer Pyrophosphatasen. Diplomarbeit TU Braunschweig.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Salminen, T., Teplyakov, A., Kankare, J., Cooperman, B.S., Lahti, R. and Goldman, A. (1996) An Unusual Route to Thermostability Disclosed By the Comparison of *Thermus Thermophilus* and *Escherichia Coli* Inorganic Pyrophosphatasen. *Protein Science*, **5**, 1014-1025.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M. and Smith, M. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, **265**, 687-695.
- Schlessinger, M.J. and Coon, M.J. (1960) Hydrolysis of nucleoside di and triphosphates by crystalline preparations of yeast inorganic pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 30-36.
- Schulz, A., Ort, O., Beyer, P. and Kleinig, H. (1993) SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Letters*, **318**, 162-166.
- Secor, J. (1994) Inhibition of Barnyardgrass 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase By Sulcotrione. *Plant Physiology*, **106**, 1429-1433.
- Senda, T., Sugiyama, K., Narita, H., Yamamoto, T., Kimbara, K., Fukuda, M., Sato, M., Yano, K. and Mitsui, Y. (1996) Three-Dimensional Structures of Free Form and Two Substrate Complexes of an Extradiol Ring-Cleavage Type Dioxygenase, the Bphc Enzyme From *Pseudomonas Sp* Strain Kks102. *Journal of Molecular Biology*, **255**, 735-752.
- Serre, L., Sailland, A., Sy, D., Boudec, P., Rolland, A., Pebay-Peyroula, E. and Cohen-Addad, C. (1999) Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase: an enzyme involved in the tyrosine degradation pathway. *Structure*, **7**, 977-988.
- Smirnova, I.N., Baykov, A.A. and Avaeva, S.M. (1986) Studies on inorganic pyrophosphatase using imidodiphosphate as a substrate. *FEBS Letters*, **206**, 121-124.

- Smirnova, I.N., Kudryavtseva, N.A., Komissarenko, S.V., Tarusova, N.B. and Baykov, A.A. (1988) Diphosphonates are potent inhibitors of mammalian inorganic pyrophosphatase. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **267**, 280-284.
- Soll, J., Schultz, G., Joyard, J., Douce, R. and Block, M.A. (1985) Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **238**, 290-299.
- Stetten, D.W. (1960) Biosynthesis and Pyrophosphatase. *American Journal of Medicine*, **28**, 867-870.
- Stout, G.H. and Jensen, L.H. (1989) *X-ray structure determination*. John Wiley, New York.
- Teplyakov, A., Obmolova, G., Wilson, K.S., Ishii, K., Kaji, H., Samejima, T. and Kuranova, I. (1994) Crystal structure of inorganic pyrophosphatase from *Thermus thermophila*. *Protein Science*, **3**.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, 4350-4354.
- Tuominen, V., Heikinheimo, P., Kajander, T., Torkkel, T., Hyytia, T., Kapyla, J., Lahti, R., Cooperman, B.S. and Goldman, A. (1998) The R78K and D117E active-site variants of *Saccharomyces cerevisiae* soluble inorganic pyrophosphatase: Structural studies and mechanistic implications. *Journal of Molecular Biology*, **284**, 1565-1580.
- Unguryte, A., Smirnova, I.N. and Baykov, A.A. (1989) Kinetic models for the action of cytosolic and mitochondrial inorganic pyrophosphatases of rat liver. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **273**, 292-300.
- Viviani, E., Little, J.P. and Pallett, K.E. (1998) The mode of action of isoxaflutole II. Characterization of the inhibition of carrot 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by the diketone nitrile derivative of isoxaflutole. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, **62**, 125-134.
- Volk, S.E., Baykov, A.A., Kostenko, E.B. and Avaeva, S.M. (1983) Isolation, subunit structure and localization of inorganic pyrophosphatase of heart and liver mitochondria. *Biochemical and Biophysiological Acta*, **744**, 127-134.
- Wilkinson, J. (1995) *submitted to the EMBL/Genbank/DDBJ databases*.
- Willoughby, E.W. and Lambert, A. (1983) A sensitive silver stain for proteins in agarose gels. *Analytical Biochemistry*, **130**, 353-358.
- Wyckoff, E.E., Pishko, E.J., Kirkland, T.N. and Cole, G.T. (1995) Cloning and Expression of a Gene Encoding a T-Cell Reactive Protein From *Coccidioides Immitis* - Homology to 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase and the Mammalian F Antigen. *Gene*, **161**, 107-111.

Abkürzungen

4-HPPD	4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase
4-HP	4-Hydroxyphenylpyruvat
Å	Ångström (10^{-10} m)
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ara	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AS	Aminosäure
BSA	Bovine serum albumine
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DLS	Dynamic Light Scattering
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Di-Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	Expressed Sequence Tag
FF	Fast-Flow
FG	Frischgewicht
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinsulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kB	Kilobasen
KP _i	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄
LB	Luria Bertani
LSC	Liquid Scintillation Counter
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MOPS	3-NMorpholino-propansulfonsäure
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCP	Methylendiphosphonsäure
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PNP	Imidodiphosphat
PP	Pyrophosphat
PPase	lösliche anorganische Pyrophosphatase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenanteil pro Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil pro Volumenanteil