

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

Strukturelle Charakterisierung, Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse von Proteinen des Folatstoffwechsels, des Calvinzyklus und der Riboflavinbiosynthese

Stefan Gerhardt

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. Robert Huber
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher

Die Dissertation wurde am 18.06.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 09.07.2001 angenommen.

meinen Großeltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 1997 bis Juni 2001 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Robert Huber für seine Unterstützung, die er mir zuteil werden ließ, für das ständige Interesse am Fortgang der Projekte, sowie für die außerordentlich große wissenschaftliche Freiheit bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher möchte ich recht herzlich für die hervorragende und erfolgreiche Zusammenarbeit und die großzügige und freundliche Aufnahme während meines Aufenthaltes in seinem Arbeitskreis danken. Seine Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen waren stets eine große Motivation.

Herrn Dr. Jörg Freigang, Herrn Dr. Klaus Stenzel, Herrn Dr. Günter Auerbach und Herrn Christian Krebs danke ich für die exzellente wissenschaftliche Kooperation mit der BayerAG und für die unkomplizierte Unterstützung.

Frau Dr. Barbara Bieseler möchte ich ganz besonders danken, da sie mir die Möglichkeit eröffnete nach München zu gehen. Ihr stetiges Interesse aus der Ferne und ihr Vertrauen waren ein großer Rückhalt gerade in schwierigen Zeiten.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen Mitstreitern an der TU München im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bacher, insbesondere Frau Stefanie Echt, Herrn Dr. Markus Fischer, Frau Ilka Haase und Frau Ann-Kathrin Schott, die mich dort sehr geduldig ertrugen. Ihrem Engagement und ihrem Können verdankt diese Arbeit ihre Entstehung.

Herrn Dr. Karl-Heinz Mann, Herrn Marius Boicu und Frau Sylvia Koerner danke ich für die Durchführung der Proteinsequenzierung, bzw. DNA-Sequenzierung sowie der massenspektroskopischen Analyse.

Bei Herrn Dr. Hans Bartunik und Herrn Gleb Bourenkov möchte ich mich für die gute Unterstützung bei meinen Aufenthalten am Deutschen Elektronen Synchrotron in Hamburg bedanken.

Mein Dank gilt Frau Renate Rüller, Frau Gina Beckmann, Herrn Werner Dersch und Herrn Ottmar Paul für die immer freundliche Hilfe und unverdrossene Unterstützung bei der Überwindung diverser technischer und bürokratischer Hindernisse.

Den Mitgliedern der „Bayer-Arbeitsgruppe“ Frau Stefanie Bauer, Frau Stefanie Echt, Frau Iris Fritze, Herrn Michael Koch und nicht zu vergessen Frau Super-Ute Richter möchte ich für die tatkräftige Unterstützung danken und wünsche ihnen weiterhin alles Gute bei ihren Projekten.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Abt. Strukturforschung möchte ich mich für die freundschaftliche Atmosphäre und ihre ständige Hilfsbereitschaft danken. Insbesondere Martin Augustin, Gerd Bader, Markus Deibert, Holger Dobbek, Oliver Einsle, Markus Fischer, Ilka Haase, Jens Kaiser, Christian Krebs, Rupert Lang und Anja, Uli Rester und Chrissi mit Spike, Ann-Kathrin Schott, Stefan Steinbacher, Peter Sondermann und Jenny, Michael Lt. Worbs möchte ich vielmehr für ihre Freundschaft danken.

Ein liebevoller Dank gebührt meinen Eltern und meinem Bruder Thimo für ihr Vertrauen und den grenzenlosen Rückhalt in allen Belangen, meiner „kleinen Frau“ Bianca für die außerordentlich große Unterstützung über die große Distanz während dieser Zeit. Ohne ihre beeindruckende Treffsicherheit würde die Abteilung Huber wohl noch lange Zeit erfolglos fussballspielen.

Meinen Braker Freunden vor allem Jensens & Kerstin, Bernie & Julia, Tino & Sylvia und Ralf & Martina danke ich, weil sie stets mit großem Interesse und unendlicher Freundschaft an meiner Seite waren und mir die Heimreise nach Brake immer eine riesige Freude war.

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	4
2.1	Enzyme des Folatstoffwechsels und des Calvinzyklus	4
2.2	Enzyme der Riboflavinbiosynthese	7
2.3	Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	10
2.3.1	Überblick	10
2.3.2	Kristalle	11
2.3.3	Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen	12
2.3.4	Berechnung der Elektronendichte	15
2.3.5	Lösung des Phasenproblems	16
2.3.6	Molekularer Ersatz	17
2.3.7	Isomorpher Ersatz	18
2.3.8	Multiple Anomale Dispersion	19
2.4	Ziele der Arbeit	21
3	MATERIAL UND METHODEN	22
3.1	Material	22
3.1.1	Chemikalien	22
3.1.2	Geräte	22
3.1.3	Säulenmaterial	23
3.1.4	Materialien für mikro- und molekularbiologische Arbeiten	23
3.1.4.1	Bakterien	23
3.1.4.2	Plasmide	24
3.1.4.3	Enzyme und Kits	24
3.1.4.4	Synthetische Oligonukleotide	25
3.2	Mikrobiologische Methoden	27
3.2.1	Bakterien Flüssigkulturen	28
3.2.2	Bakterien Plattenkulturen	28
3.2.3	Transformation von Fremd-DNA in kompetente <i>E. coli</i> Zellen	28
3.2.4	Transformation über Elektroporation	29
3.2.5	Heterologe Expression von rekombinantem Protein in <i>E. coli</i>	29
3.2.6	Herstellung von <i>E. coli</i> Rohextrakten	30
3.3	Molekularbiologische Methoden	30
3.3.1	Methoden zur Nukleinsäure-Analyse	30
3.3.1.1	Agarosegelelektrophorese	30
3.3.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
3.3.1.3	Ethanol-fällung	31
3.3.2	Enzymatische Methoden	31
3.3.2.1	Enzymatische Spaltung von Plasmid DNA und DNA-Fragmenten	31
3.3.2.2	Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase	32
3.3.2.3	Ligation von DNA Fragmenten	32
3.3.2.4	Mutagenese von Plasmid-DNA	32
3.3.2.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	34
3.3.2.6	Automatisierte Sequenzierung von DNA („Cycle Sequencing“)	34

3.4	Proteinchemische Methoden	35
3.4.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	35
3.4.2	Proteinfällung	35
3.4.3	Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen	35
3.4.4	Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.4.5	Coomassie-Färbung der SDS-Polyacrylamidgele	37
3.4.6	Transfer von Proteinen durch Elektroblothing	37
3.4.7	N-terminale Sequenzierung nach <i>EDMAN</i>	38
3.4.8	Massenspektrometrie	38
3.4.9	Dihydrofolatreduktase Aktivitätstest	39
3.4.10	Proteinpräparation	39
3.4.10.1	Rückfaltungsansätze der Dihydrofolatreduktasen Domäne aus Soja	39
3.4.10.2	Rekombinante bifunktionelle Dihydrofolatreduktase aus Soja	41
3.4.10.3	Rekombinante Dihydrofolatreduktase-Domäne aus <i>A. thaliana</i>	42
3.4.10.4	Rekombinante chimäre Dihydrofolatreduktase aus <i>A. thaliana</i> und <i>Z. mays</i>	42
3.4.10.5	Wildtyp 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase aus <i>S. pombe</i>	42
3.4.10.6	W27G Mutante der Lumazin Synthase aus <i>S. pombe</i>	43
3.4.10.7	Wildtyp Riboflavin Synthase aus <i>S. pombe</i>	43
3.4.10.8	Rekombinante Transketolase aus <i>Zea mays</i>	43
3.4.11	Sequenzvergleich	43
3.5	Kristallographische Methoden	44
3.5.1	Kristallisation	44
3.5.2	Datensammlung und Datenreduktion	44
3.5.3	Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung	45
3.5.4	Analyse von Atommodellen	47
3.5.5	Inhibitormodelle	47
3.5.6	Graphische Darstellungen	47
4	ERGEBNISSE	48
4.1	Untersuchungen an pflanzlicher Dihydrofolatreduktase	48
4.1.1	Expression und Reinigung der nativen <i>glyDHFR</i> -TS	48
4.1.2	Klonierung, Mutagenese und Expression der <i>glyDHFR</i> -Domäne	51
4.1.3	Versuche zur Rekonstitution der <i>glyDHFR</i> -Domäne	55
4.1.4	Isolierung und Klonierung des <i>zmDHFR</i> -TS Gens aus <i>Zea mays</i>	56
4.1.5	Expression von rekombinanter <i>zmDHFR</i> -TS und <i>zmTS</i>	56
4.1.6	Versuche zur Kristallisation der <i>atDHFR</i> aus <i>A. thaliana</i>	57
4.1.7	Klonierung einer chimären <i>atzmDHFR</i> -TS	57
4.1.8	Reinigung der chimären <i>atzmDHFR</i> -TS	61
4.1.9	Kristallisation der chimären <i>atzmDHFR</i> -TS	62
4.1.10	Diskussion	63
4.2	Röntgenstrukturanalyse der Transketolase aus <i>Zea mays</i>	69
4.2.1	Kristallisation und Datensammlung	69
4.2.2	PATTERSON-Suche	71
4.2.3	Modellbau und Verfeinerung	71
4.2.4	Qualität des Atommodelles	72
4.2.5	Strukturbeschreibung der <i>zmTK</i>	73
4.2.6	Diskussion	79

4.3	Röntgenstrukturanalyse der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase aus <i>S. pombe</i>	80
4.3.1	Kristallisation und Datensammlung der Wildtyp <i>sspLS</i>	80
4.3.2	Wildtyp <i>sspLS</i> Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung	83
4.3.3	Kristallisation und Datensammlung von <i>sspLS</i> Komplexen und der Mutante W27G	84
4.3.4	Modellbau und Verfeinerung	86
4.3.5	Qualität der Atommodelle	87
4.3.6	Strukturbeschreibung einer <i>sspLS</i> Untereinheit	89
4.3.7	Anordnung der Untereinheiten zum <i>sspLS</i> Pentamer	90
4.3.8	Strukturvergleich zu Lumazin Synthasen anderer Organismen	91
4.3.9	Bindung von Riboflavin	95
4.3.10	Bindung des substratähnlichen Inhibitors	98
4.3.11	Bindung des produktähnlichen Inhibitors	99
4.3.12	Diskussion	102
4.4	Strukturlösung der Riboflavin Synthase aus <i>S. pombe</i>	106
4.4.1	Kristallisation, Datensammlung und Strukturlösung durch Multiple Anomale Dispersion (MAD)	106
4.4.2	Strukturbeschreibung der Riboflavin Synthase aus <i>S. pombe</i>	110
4.4.3	Lokalisierung des aktiven Zentrums der <i>sspRS</i>	112
4.4.4	Diskussion	115
5	ABKÜRZUNGEN	119
6	LITERATUR	120

1 Zusammenfassung

Essentielle Enzyme des Folatstoffwechsels, des Calvinzyklus und der Riboflavinbiosynthese spielen eine wichtige Rolle als potentielle *Target*-Proteine bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe für Pflanzenschutz und Medizin.

Ziel der Arbeiten war, durch röntgenkristallographische Untersuchungen an Enzymen dieser Stoffwechselwege detaillierte strukturelle Kenntnisse ihrer Reaktionszentren zu erlangen.

Bifunktionelle pflanzliche Dihydrofolatreduktase

Die bifunktionelle Dihydrofolatreduktase aus Soja (*Glycine max.*) (**glyDHFR-TS**) konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Optimierung der Expressionsbedingungen löslich überexprimiert und über Affinitäts- und Gelpermeationschromatographie gereinigt werden. Weiterhin konnte ausreichend rekombinantes Protein für Kristallisationsexperimente bereitgestellt werden. Durch Kenntnisse der Sequenz der bifunktionellen DHFR-TS aus *Zea mays* wurde ein weiteres pflanzliches Enzym aus einer Mais cDNA kloniert. Beide pflanzlichen Enzyme wurden in Hinblick einer wünschenswerten Röntgenstrukturanalyse modifiziert und mit der DHFR-TS aus dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* bezüglich ihres Löslichkeitsverhaltens charakterisiert. Des weiteren gelang durch die gezielte Konstruktion eines chimären synthetischen Genes, bestehend aus *A. thaliana* DHFR und *Z. mays* Thymidylatsynthase (TS), die Überexpression eines sehr gut löslichen, enzymatisch aktiven bifunktionellen Enzymes (**atzmDHFR-TS**). Das chimäre Protein wurde nachfolgend biochemisch eindeutig als aktive Dihydrofolatreduktase charakterisiert. Die Isolierung des Proteins über Ionenaustausch- und Gelpermeationschromatographie brachte eine um den Faktor 14fach gesteigerte Ausbeute an rekombinanter *atzmDHFR-TS*, verglichen mit der Ausbeute an Wildtyp *glyDHFR-TS*. In faktoriellen *Screening*-Experimenten konnten eine Anzahl an reproduzierbaren Kristallisationsbedingungen gefunden werden. Die Kristalle wurden in röntgenkristallographischen Untersuchungen eingesetzt, erwiesen sich jedoch als sehr stark fehlgeordnet.

Transketolase aus *Zea mays*

Die Kristallstruktur von Transketolase aus *Z. mays* (**zmTK**) konnte durch *PATTERSON*-Suchmethoden mit dem Hefe Suchmodell gelöst werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig die Kristallstruktur einer pflanzlichen Transketolase beschrieben werden. Das Atommodell mit gebundenem Thiaminpyrophosphat(TPP)-Cofaktor wurde bei einer Auflösung von 2,3 Å auf einen sehr guten kristallographischen *R*-Faktor von 16,6 % verfeinert. Ein Vergleich der Substratbindung zu bekannten Strukturen erlaubt eine genaue Untersuchung der Spezifität als Voraussetzung für ein rationales Drugdesign, an dem gemeinsam mit der BayerAG gearbeitet wird.

6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe*

Die *S. pombe* Lumazin Synthase (**sspLS**) wurde in Gegenwart von Riboflavin und substratähnlichen bzw. produktähnlichen Inhibitoren kristallisiert. Heterologe Expressionsversuche und ausführliche biochemische Charakterisierungen an der Wildtyp *sspLS* im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. A. Bacher (Technischen Universität München, Abteilung für Organische Chemie und Biochemie) zeigen ein neuartiges Merkmal einer kompetitiven „*feedback*“-Regulierung des Enzymes durch die hohe Affinität zur Bindung von Riboflavin mit einem $K_D = 1,2 \mu\text{M}$. Riboflavin ist das eigentliche Produkt des in der Biosynthese nachfolgendem Enzymes, der Riboflavin Synthase. Diese Fähigkeit der Riboflavinbindung konnte bislang bei keiner der homologen Enzyme aus anderen Organismen nachgewiesen werden. Durch die Strukturanalyse der *sspLS* in Komplex mit Riboflavin konnten strukturbasierte Erkenntnisse über dieses bis dahin unbekanntes Merkmal der regulativen Inhibition ($K_I = 17 \mu\text{M}$) der *sspLS* durch Riboflavin gemacht werden. Die Mutante **W27G** wurde aufgrund von Strukturinformationen konzipiert und kristallisiert. Die Kristallstrukturen der *sspLS* in Gegenwart von Riboflavin (**RIBO**), 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**NRAP**), 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (**CEOL**) und der Mutante **W27G** wurden durch *PATTERSON*-Suchmethoden gelöst und die Atommodelle bei einer Auflösung von 2,4 Å (**RIBO**), 2,4 Å (**NRAP**), 2,6 Å (**CEOL**) und 2,0 Å (**W27G**) auf kristallographische *R*-Faktoren von 18,0 % (**RIBO**), 18,3 % (**NRAP**), 17,5 % (**CEOL**) und 18,7 % (**W27G**)

verfeinert. Die Bindung des produktähnlichen Inhibitors CEOL konnte im Rahmen dieser Arbeiten erstmalig gezeigt werden.

Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe*

Die *S. pombe* Riboflavin Synthase (*sspRS*) wurde in Gegenwart des substratähnlichen Inhibitors, 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (**CEOL**) kristallisiert. Die dreidimensionale Struktur der *sspRS* konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Multiple Anomale Dispersion (MAD) an einem Hg-Schweratomderivatkristall gelöst werden. Abweichend von der trimeren Struktur der *sspRS* in Lösung wurde das Enzym durch kristallographische Untersuchungen an Kristallen der Bedingung 65 % (v/v) MPD, 0,1 M Bicine pH 9.0 als ein Monomer identifiziert. Das Atommodell der *sspRS* wurde bei einer Auflösung von 2,1 Å auf einen kristallographischen *R*-Faktor von 18,5 % verfeinert. Durch die Aufklärung der *sspRS*-CEOL-Komplexstruktur konnten genauere Informationen über die Substratbindungsstelle der *sspRS* erlangt und die strukturelle Grundlage für die Aufklärung eines Reaktionsmechanismus gegeben werden.

Veröffentlichungen, die Teile dieser Arbeit beinhalten werden:

Fischer, M., Haase, I., Feicht, R., Richter, G., Gerhardt, S., Changeux, J.P., Huber, R. & Bacher, A. Biosynthesis of Riboflavin. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine synthase of *Schizosaccharomyces pombe*. *Manuskript in Vorbereitung*.

Gerhardt, S., Haase, I., Steinbacher, S., Kaiser, J.T., Bacher, A., Huber, R. & Fischer, M. The Structural Basis of Riboflavin binding to *Schizosaccharomyces pombe* 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *Manuskript in Vorbereitung*.

Gerhardt, S., Schott, A.K., Steinbacher, S., Bacher, A., Huber, R. & Fischer, M. Crystal Structure of Riboflavin Synthase of *Schizosaccharomyces pombe*. *Manuskript in Vorbereitung*.

Gerhardt, S., Echt, S., Bader, G., Bourenkov, G.P., Freigang, J., Busch, M., Bacher, A., Huber, R. & Fischer, M. Crystal Structure of a Plant Transketolase. *Manuskript in Vorbereitung*

2 Einleitung

2.1 Enzyme des Folatstoffwechsels und des Calvinzyklus

In der Entwicklung des Pflanzenschutzes nimmt die Bedeutung der Herbizide seit ihrer Einführung Ende der 40er Jahre bei der Bekämpfung von Unkräutern stetig zu (Moreland, 1993). Der Schutz der Nutzpflanzen gegen Unkräuter dient der Erhaltung der Wirtschaftlichkeit und der Qualität der Ernten in der Agrarwirtschaft.

Herbizide sind Wirkstoffe, die durch die Inhibition eines einzelnen Enzymes, eines sogenannten *Targets*, in einem essentiellen Stoffwechselweg, zu einer nachhaltigen Schädigung der Pflanze führen. Von den circa 50 000 Genen einer Pflanze stellt jedoch nur ein kleiner Teil der Genprodukte ein solches letales *Target* dar (1-10%). Ein stetiges Anwachsen der Ansprüche an neue Herbizide (bisher erreichtes Wirkniveau, Toxizität, Selektivität und Umweltverträglichkeit) führte zur Entwicklung neuer effizienter Testmethoden.

Als innovativer Ansatz zur Kapazitätssteigerung wurden in der Pflanzenschutzindustrie *in vitro*-Testsysteme als Vorlauf für die *in vivo*-Tests etabliert. Im sogenannten *High Throughput Screening* (**HTS**) lassen sich mehrere 100 000 Substanzen in wenigen Tagen hinsichtlich ihrer inhibierenden Wirkung an einem einzelnen Enzym untersuchen. Für die schnelle und effiziente Untersuchung im HTS ist die Entwicklung einer Batterie von sensitiven, reproduzierbaren und automatisierbaren Aktivitätstests notwendig.

Ein weiterer alternativer Ansatz für die Entwicklung herbizider Wirkstoffe ist die Aufklärung der Röntgenstruktur des Proteins und die Bestimmung des Reaktionsmechanismus des *Targets*. Enzyme des Folatstoffwechsels und des Calvinzyklus sind dabei potentielle *Targets* bei der Entwicklung neuer herbizider Wirkstoffe.

Dihydrofolatreduktase

Dihydrofolatreduktase (**DHFR**, EC 1.5.1.3) tritt als Schlüsselenzym des Folatstoffwechsels in allen Bereichen des Lebens als Katalysator bei der Regenerierung von

Tetrahydrofolat (THF), einem wichtigen Cofaktor bei C_1 -Kohlenstoff-Transferreaktionen, auf (siehe Abbildung 2.1).

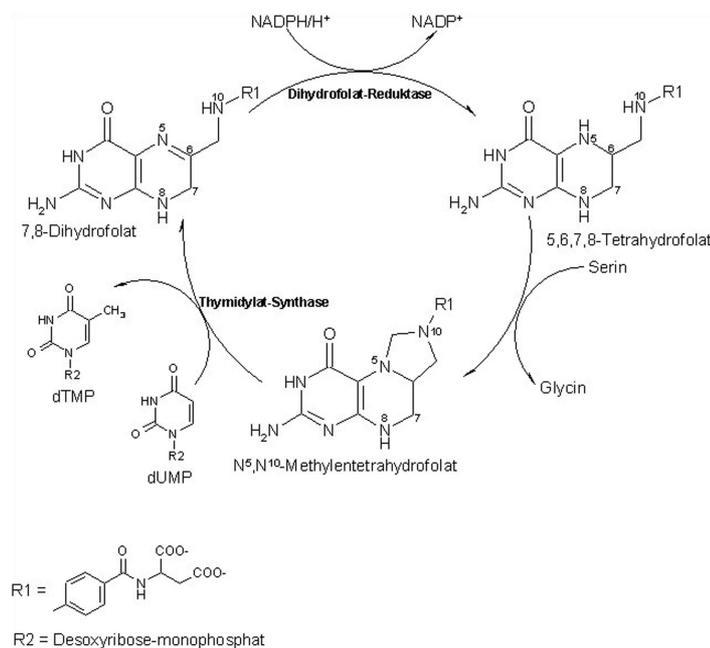


Abbildung 2.1 Tetrahydrofolat(THF)-Kreislauf im Folatstoffwechsel. Regenerierung des in der Thymidylatsynthase(TS)-Reaktion zu Dihydrofolat (DHF) umgewandelten Methylentetrahydrofolat durch Dihydrofolatreduktase (DHFR). Die Spaltung von Serin in Glycin wird durch Serin-Hydroxymethyl-Transferase katalysiert.

Während Mikroorganismen und Pflanzen THF ausgehend von Guanosintriphosphat synthetisieren können, sind sowohl der tierische als auch der menschliche Organismus auf die Aufnahme von Folsäure über die Nahrung angewiesen (Neuburger *et al.*, 1996). Die physiologische Auswirkung einer Hemmung der DHFR-Aktivität ist der Abbruch der Synthese von Thymin und Purinen. Ein Mangel dieser für die DNA-Replikation essentiellen Bausteine führt letztendlich zum Zelltod („*thymineless death*“) (Blakley, 1984). Wegen ihrer zentralen Rolle im Stoffwechsel ist die DHFR in der Human- und Veterinärmedizin eines der wichtigsten Angriffspunkte von Antibiotika und Cytostatika (Kraut und Matthews, 1987). Als Anwendung im Pflanzenschutz ist die Entwicklung neuer DHFR-Inhibitoren mit herbizider Wirkung vorstellbar. Verschiedenste Inhibitoren werden generell als Folat-Antagonisten zusammengefasst, wobei die antibakterielle Wirkung von Trimethoprim (TMP) den Vorteil besitzt, selektiv die DHFR bestimmter Organismen zu hemmen. Methotrexat (MTX) ist bislang der effektivste Antagonist, der in unterschiedlichen Organismen untersucht wurde (Blakley, 1984; Ratnam *et*

al., 1987) und wird vor allem zur Hemmung schnell wachsender Krebszellen eingesetzt (Banerjee, 1995).

Während eine Vielzahl verschiedener Kristallstrukturen von bakterieller, tierischer und menschlicher DHFR bereits bekannt sind (Bolin *et al.*, 1982; Byströff *et al.*, 1990; Dams *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 1990; Filman *et al.*, 1982; Hennig *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1996; Matthews *et al.*, 1986; McTigue *et al.*, 1992; Oefner *et al.*, 1988; Varughese *et al.*, 1992; Verma *et al.*, 1997; Volz *et al.*, 1982; Whitlow *et al.*, 1997), wurde bislang keine Struktur einer pflanzlichen DHFR aufgeklärt.

Oft tritt die DHFR als natürliches Fusionsprotein mit Thymidylatsynthase (TS, EC 2.1.1.45) auf, in Pflanzen (Balestrazzi *et al.*, 1995; Neuburger *et al.*, 1996; Ratnam *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1995) und Protozoen (Garvey und Santi, 1985; Reche *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1996) wird dies als der hauptsächliche Zustand angesehen. Die bakterielle und tierische DHFR ist dagegen ein monofunktionelles Enzym. Wegen der direkt aufeinander folgenden Reaktionen (siehe Abbildung 2.1) wurde eine Kanalisierung des Substrates DHF von TS auf DHFR („*substrate channeling*“) in bifunktioneller **DHFR-TS** postuliert (Liang und Anderson, 1998a; Liang und Anderson, 1998b) und im Fall von *Toxoplasma gondii* DHFR-TS nachgewiesen (Trujillo *et al.*, 1996). Die erste ermittelte Kristallstruktur von bifunktioneller *Leishmania major* DHFR-TS legt nahe, daß das *channeling* nicht allein durch einen engen Kontakt der aktiven Zentren zustande kommen kann, sondern ein möglicher Mechanismus auf der Verteilung der Oberflächenpotentiale basiert (Knighton *et al.*, 1994).

Transketolase

Ein wichtiges Enzym des Calvinzyklus ist die Transketolase (**TK**, D-Sedoheptulose-7-phosphat: D-Glycerinaldehyd-3-phosphat Glycoaldehydtransferase, EC 2.2.1.1). Sie katalysiert die reversible Übertragung einer C₂-Einheit von Sedoheptulose-7-phosphat (S7P) bzw. Fructose-6-phosphat (F6P) auf Glycerinaldehyd-3-phosphat. Dabei wird Ribose-5-phosphat (R5P) bzw. Erythrose-4-phosphat (E4P) und Xylulose-5-phosphat (Xu5P) gebildet. Im Pentosephosphatzyklus wird die Rückreaktion katalysiert. Die pflanzliche Transketolase stellt somit ein weiteres

potentielles *Target* für die Entwicklung von Herbiziden dar. Für die TK sind bislang in der Literatur keine Inhibitoren bekannt. Pflanzliche TK liegt mit einer Größe von 160 kDa als Homodimer vor (Teige *et al.*, 1998). Als Cofaktor benötigt die TK Thiaminpyrophosphat (TPP), sowie für die Entfaltung der maximalen Enzymaktivität zweiwertige Magnesiumionen (Murphy und Walker, 1982). Die Röntgenstruktur der Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae* (*sacTK*) wurde gelöst (Lindquist *et al.*, 1992; Nilsson *et al.*, 1993; Schneider und Lindqvist, 1998) und der Reaktionsmechanismus für das Enzym aufgeklärt. Dieser läuft über einen nukleophilen Angriff des C2-Kohlenstoffatoms des Thiazoliumringes des TPP auf die C2-Ketogruppe des Zuckersubstrates ab (siehe Abbildung 2.2).

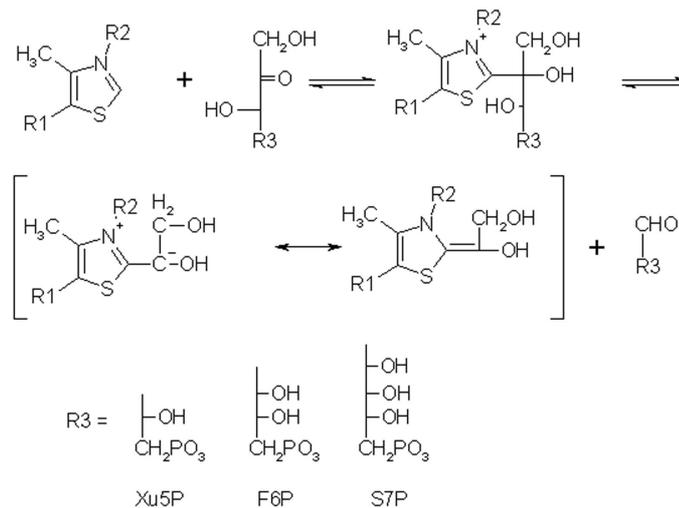


Abbildung 2.2 Reaktionsmechanismus des Thiaminpyrophosphates (TPP) in der Transketolase Reaktion. Dargestellt ist der Reaktionsablauf am C2-Kohlenstoffatom des Thiazoliumringes des TPP Cofaktors. Xu5P: Xylulose-5-phosphat, F6P: Fructose-6-phosphat, S7P: Sedoheptulose-7-phosphat.

2.2 Enzyme der Riboflavinbiosynthese

Riboflavin ist in Form der Flavocoenzyme FMN und FAD an vielen Redoxreaktionen beteiligt. Zur Biosynthese von Riboflavin sind nur Pflanzen, Bakterien und Pilze befähigt. Tiere müssen Riboflavin (Vitamin B₂) mit der Nahrung aufnehmen (Müller *et al.*, 1988). Die Riboflavinbiosynthese (siehe Abbildung 2.3) wurde vor vierzig Jahren zum erstenmal untersucht und ist weitgehend aufgeklärt. Aus S-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**1**) bildet sich unter Kondensation mit dem Pyrimidindion (5-Amino-6-ribitylamino-2,4-(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**2**)) unter

Phosphatabspaltung 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (**3**) (Neuberger und Bacher, 1986). Dieser von der Lumazin Synthase (6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase, **LS**) katalysierte Schritt ist regiospezifisch. Die C₁-Gruppe des Zuckerphosphates (**1**) wird in C₆-Position im Lumazin (**3**) eingebaut. Dieser erste Schritt der Kondensation verläuft über die Bildung einer Schiff'schen Base zwischen der Carbonylgruppe von **1** und der 5-Aminogruppe von **2**. Anschließend wird die Phosphatgruppe eliminiert. Durch Reaktion der 6-Aminoribitylgruppe mit der aus der Eliminierung entstandenen Carbonylgruppe zyklisiert das Intermediat unter Wasserabspaltung zu Lumazin (6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (**3**)).

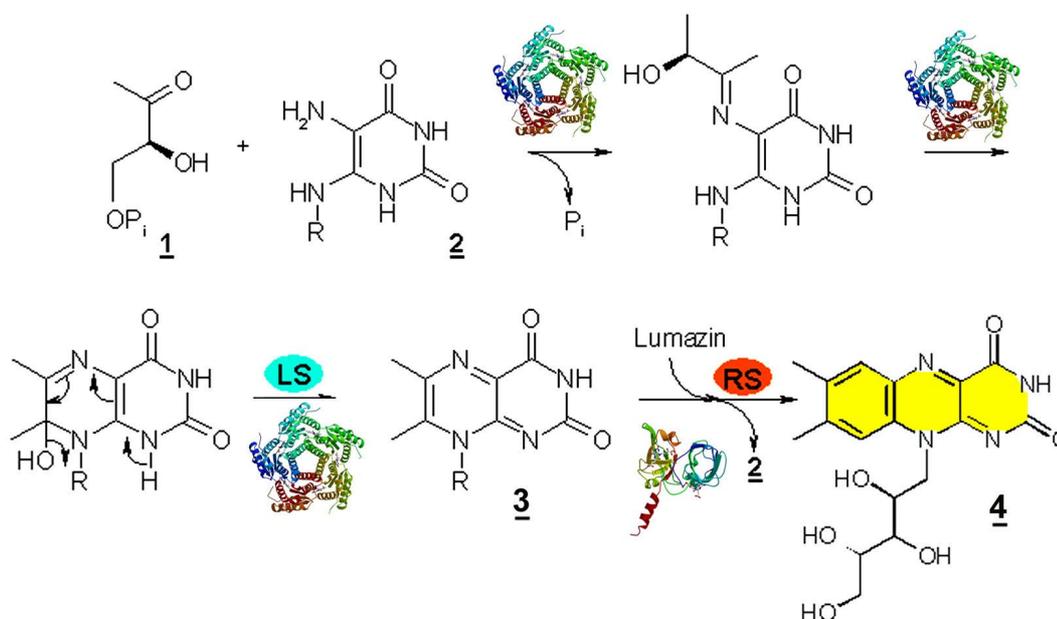


Abbildung 2.3 Riboflavinbiosynthese. Lumazin Synthase (LS) katalysiert die Kondensation von S-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (**1**) mit 5-Amino-6-ribitylamino-2,4-(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (**2**) unter Eliminierung einer Phosphatgruppe zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (**3**). Im nachfolgenden Schritt des Syntheseweges werden zwei Lumazinmoleküle (**3**) in einer Dismutationsreaktion zu Riboflavin (**4**) und dem Edukt (**2**) umgesetzt. Dieser letzter Schritt der Riboflavinbiosynthese wird von der Riboflavin Synthase (RS) katalysiert.

Dieser vorletzte Schritt im Biosyntheseweg von Riboflavin wird durch die LS katalysiert. Die Kristallstrukturen der LS aus verschiedenen Organismen konnten in den vergangenen Jahren gelöst werden. Die Kristallstrukturen der Lumazin Synthasen aus *Schizosaccharomyces pombe* (Fischer *et al.*, 2001), *Saccharomyces cerevisiae* (Meining *et al.*, 2000), *Magnaporthe grisea* (Persson *et al.*, 1999) und *Brucella abortus* (Braden *et al.*, 2000) sind als Homopentamere von bis zu 85 kDa Größe beschrieben. Die Enzyme aus *Escherichia coli* (Mörthl *et al.*, 1996), *Bacillus*

subtilis (Ladenstein *et al.*, 1994; Ritsert *et al.*, 1995), *Spinacia oleracea* (Persson *et al.*, 1999) und *Aquifex aeolicus* (Zhang *et al.*, 2001) bilden dagegen ikosaedrische Capside, die am besten als Dodekamere von Pentameren beschrieben werden können. Schon in den achtziger Jahren konnte durch Elektronenmikroskopie, negativ kontrastierter Proben von LS aus *B. subtilis* (**bacLS**) gezeigt werden, daß das Enzym eine kugelförmige Gestalt besitzt, mit einem Durchmesser von 168 Å und einer molekularen Masse von ca. 1 MDa (Bacher, 1986) (siehe Abbildung 2.4).

Die **bacLS** ist ein bifunktionelles Enzym und die am besten charakterisierte LS

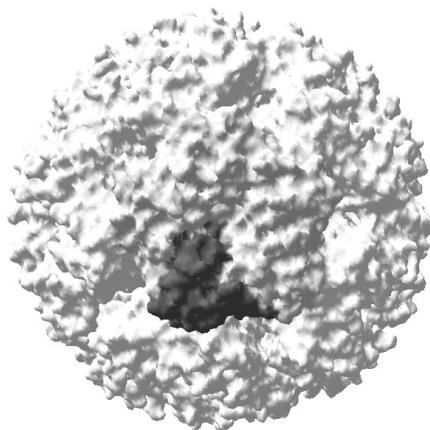


Abbildung 2.4 Capsidstruktur (60mer) der ikosaedrischen LS aus *B. subtilis*. Das Molekül besitzt 532 Symmetrie. Eine monomere β -Untereinheit (schwarz) wird über eine 5-zählige Symmetrieachse zum Pentamer aufgebaut (dunkelgrau).

(Bacher, 1986; Bacher *et al.*, 1980; Kis und Bacher, 1995; Ladenstein *et al.*, 1983; Ladenstein *et al.*, 1986; Ladenstein *et al.*, 1988). Die **bacLS** besteht aus einem Komplex von α_3 - mit β_{60} -Untereinheiten, wobei die β -Untereinheiten die Bildung des Lumazins katalysieren, also LS sind. Dieser Komplex wird schwere Riboflavinsynthase genannt (Bacher *et al.*, 1980). Schon früh konnte gezeigt werden, daß die trimeren α -Untereinheiten als Riboflavin Synthase (**RS**, E.C. 2.5.1.9) agieren. Die RS ist im Inneren des Capsides der **bacLS** eingeschlossen. Im

letzten Schritt der Riboflavinbiosynthese werden zwei Lumazinmoleküle unter Katalyse der RS zu Riboflavin (**4**) dismutiert. Bei dieser Dismutationsreaktion wird von einem Lumazinmolekül eine C_4 -Gruppe auf ein zweites Lumazin übertragen. Kis und Mitarbeiter (Kis *et al.*, 2001) konnten zeigen, daß die Bildung von Riboflavin aus Lumazin auch in Abwesenheit der RS unter physiologischen Bedingungen ablaufen kann. Die Mechanismen der enzymatischen Reaktion und der biomimetischen scheinen ähnlich zu sein, dennoch konnten bislang keine kristallographischen Daten als Hinweis für einen möglichen Reaktionsablauf erhalten werden. Vor kurzem wurde mit der RS aus *E. coli* (**ecRS**) die erste

Kristallstruktur einer RS aufgeklärt (Liao *et al.*, 2001). Komplexstrukturen der RS mit ligandierten Substrat- oder Produktanaloga konnten bisher nicht gelöst werden.

2.3 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

2.3.1 Überblick

Neben den Nukleinsäuren sind die Proteine die zweite wichtige Klasse von Biopolymeren in einer jeden Zelle und infolgedessen stellt deren Strukturbestimmung eines der meist bearbeiteten Themen in der modernen Forschung dar. Nicht zuletzt durch die Hoffnung, durch eine genauere Kenntnis der atomaren Struktur der Proteine gezielt pharmakologische Wirkstoffe oder Pflanzenschutzmittel herstellen zu können. Industriekonzerne sind durch die Möglichkeit, auf Basis der Proteinstruktur Wirkstoffe entwickeln zu können, verstärkt im Bereich der Strukturaufklärung tätig. Im wesentlichen tragen zwei Methoden entscheidend dazu bei, Proteinatommodelle und Protein-Inhibitor-Komplexe in nahezu atomarer Auflösung zu bestimmen. Mit der Methode der Kernresonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) können Proteine in Lösung analysiert und somit Informationen über ihre Dynamik erhalten werden. Da die Anwendbarkeit der Methode noch auf Proteine mit einem Molekulargewicht bis zu etwa 35 kDa beschränkt ist, steht zur Strukturanalyse höhermolekularer Proteine oft ausschließlich die Methode der Röntgenkristallographie zur Verfügung. Im Februar 2001 waren in der Proteindatenbank in Brookhaven mehr als 14510 Proteinstrukturen hinterlegt, von denen lediglich 15 % durch Kernresonanzmethoden und 2 % durch theoretische Methoden bestimmt wurden. Dies unterlegt eindrucksvoll die zentrale Rolle, die der Kristallographie in der Strukturbiologie zukommt, zu deren Meilensteine u.a. die Aufklärung der Doppelhelix-Struktur der Erbsubstanz (Watson und Crick, 1953), basierend auf Faserdiffraktionsaufnahmen, und die Bestimmung der ersten Proteinstrukturen von Myoglobin (Kendrew *et al.*, 1960) und Hämoglobin (Perutz *et al.*, 1960) zählen. Die wichtigsten Röntgenquellen für die Proteinstrukturanalyse sind Drehanodengeneratoren, meist mit $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung (1,54182 Å) und Synchrotrone mit Wellenlängen der Strahlung zwischen 0,7 und 1,8 Å. Eine

charakteristische Eigenschaft von Wellen und somit auch von Röntgenstrahlung ist ihre Fähigkeit zur Interferenz, hervorgerufen durch Beugung an einer dreidimensional periodischen Anordnung des zu untersuchenden Einkristalles. Die Proteinstrukturaufklärung durch Röntgenkristallographie ist somit auf die Kristallisierbarkeit des Proteinmaterials angewiesen. Dabei bestehen an das Protein hohe Anforderungen u.a. in Bezug auf Reinheit und Homogenität der Präparationen.

2.3.2 Kristalle

Verschiedene Methoden zur Erzeugung von Proteineinkristallen sind heute beschrieben (McPherson, 1990), von denen die Methode der Dampfdiffusion die häufigste Anwendung findet. Dazu wird die hochkonzentrierte Proteinlösung mit einem Fällungsmittel (Präzipitans) versetzt und ein Konzentrationsgradient über einem Reservoir mit höherer Konzentration des Präzipitanses erzeugt. Durch Diffusion des Lösungsmittels innerhalb eines abgeschlossenen Gefäßes bildet sich eine übersättigte Proteinlösung, in der sich bei günstigen intermolekularen Wechselwirkungen Kristallisationskeime aneinander gelagerter Proteinmoleküle bilden. An diesen Keimen kann dann ein definiertes Kristallwachstum erfolgen. Die auftretenden Wechselwirkungen werden u.a. durch die Proteinkonzentration, durch die chemischen Eigenschaften und Konzentration des Fällungsmittels, Temperatur und pH-Wert bestimmt. Dadurch stellt die Kristallisation ein vieldimensionales Problem dar, welches durch faktorielle *Screening*-Experimente eingegrenzt werden kann (Carter und Carter, 1979; Jancarik und Kim, 1991).

Alle Einkristalle werden durch eine Translation der sogenannten *Einheitszelle* um ganzzahlige Vielfache der Elementarzellvektoren in alle drei Raumrichtungen beschrieben. Die Einheitszelle oder auch Elementarzelle ist durch die Länge ihrer drei Achsen a , b und c und deren Winkel α , β und γ charakterisiert. Das Konzept der Einheitszelle stellt ein mathematisches Modell dar, das den Kristall in identische Komponenten unterteilt, so daß nur wenige Parameter notwendig sind, um die Anordnung der Atome zu beschreiben. Dadurch reduziert sich die Beschreibung des gesamten Kristalles auf die Beschreibung seiner Einheitszelle. Die Einheitszelle wird durch die Anwendung aller Symmetrieeoperatoren der jeweiligen kristallo-

graphischen Punktsymmetrie auf die kleinste sich wiederholende Einheit, der *asymmetrischen Einheit*, gebildet. Moleküle, die über die kristallographische Symmetrie der entsprechenden Raumgruppe verwandt sind, sind identisch und weisen auch eine identische kristallographische Umgebung auf. Für den Fall, daß mehrere Moleküle in einer asymmetrischen Einheit vorliegen, gilt für sie eine nicht-kristallographische Symmetrie, da diese Moleküle nicht mehr exakt identisch zueinander sind. Allerdings bilden gerade Proteine keine perfekten Kristalle aus. Proteinkristalle setzen sich aus kleinen Blöcken zusammen, die mosaikartig gegeneinander geringfügig verschoben und verkippt sind. Die ideale Periodizität ist dadurch gestört. Die polyvalente Oberfläche der Proteine bietet viele Möglichkeiten der Anordnung mit nur geringen energetischen Unterschieden. Damit ist eine reguläre ideale Ausrichtung der Moleküle im Proteinkristall nicht immer gegeben. Dieser Umstand äußert sich in einem makroskopischen Polymorphismus von Kristallformen und in der Existenz unterschiedlicher Einheitszellen gleicher Proteine. Dieser Umstand der Nicht-Isomorphie von Proteinkristallen stellt auch ein Problem bei der Phasenbestimmung mit der Methode des *Isomorphen Ersatzes* (MIR) dar.

Charakteristisch für Proteinkristalle ist eine, durch einen Solvensgehalt von etwa 40 % bis zu 80 % bedingte, lockere Packung der Moleküle, die in vielen Fällen nur durch wenige Kristallkontakte zusammengehalten werden. Dadurch entstehen große Lösungsmittelkanäle im Proteinkristall, durch die es möglich ist, z.B. Substrate, Inhibitoren und anorganische Salze in den Kristall einzubringen.

2.3.3 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen

Trifft Röntgenstrahlung auf einen Kristall, regt ihr oszillierendes elektrisches Feld die Elektronen der Atome im Proteinkristall zur Schwingung mit gleicher Frequenz an. Die Elektronen wirken als oszillierende Dipole und emittieren ihrerseits Sekundärstrahlung gleicher Frequenz, allerdings gegenüber der einfallenden Strahlung um 180° phasenverschoben. Diese elastische oder kohärente Streuung (*THOMSON*-Streuung (Thomson, 1903)) wird unter Vernachlässigung von Mehrfachstreuung durch die kinematische Streutheorie beschrieben.

In das **Kristallgitter** können Gitterebenen hineingelegt werden, die verschiedene Punkte des Kristallgitters enthalten. Unter der Annahme, daß die Achsen a , b und c der Einheitszelle parallel zu den Kristallachsen verlaufen, schneiden diese Gitterebenen die Achsen der Einheitszelle dann bei $x = a/h$, $y = b/k$ und $z = c/l$ (Friedrich *et al.*, 1912). Die ganzzahligen Variablen h , k und l werden als **MILLER-Indizes** bezeichnet. Die durch dreidimensionale periodische Wiederholung der Einheitszelle auftretenden Translationsvektoren bilden in ihrer Gesamtheit das Kristallgitter. Das daraus resultierende **reziproke Gitter** stellt hingegen die Ansammlung aller Normalvektoren der Netzebenenscharen des Kristallgitters dar, die vom Ursprung des reziproken Gitters aus gezeichnet werden. Die Länge eines reziproken Gittervektors ergibt sich aus dem reziproken Abstand der Ebenen einer Netzebenenschar. Erfolgt die Streuung kohärent an einer Netzebenenschar des Kristallgitters, so kommt es für einen bestimmten Einfallswinkel Θ zu einem Gangunterschied von einer Wellenlänge λ oder einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge $n\lambda$. Damit ist die Bedingung der konstruktiven Interferenz erfüllt. Diese wird durch die **BRAGG'sche Gleichung** beschrieben:

$$n\lambda = 2d \sin \Theta$$

d der Abstand der Netzebenenscharen

Θ der Winkel zwischen einfallendem Strahl und Netzebenenschar

λ die eingestreuete Wellenlänge

Durch die bereits erwähnte Fehlordnung im kristallinen Gitter beugen Proteinkristalle Röntgenstrahlen nur bis zu einem bestimmten Winkel Θ_{\max} . Nach dem **BRAGG'schen** Gesetz entspricht der Streuwinkel Θ_{\max} dem kleinsten beobachtbaren Netzebenenabstand d_{\min} , der als **Auflösung** einer Kristallstruktur bezeichnet wird.

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2 \sin \Theta_{\max}}$$

Unter Verwendung des reziproken Gitters läßt sich das **BRAGG'sche** Gesetz als Vektordiagramm darstellen (**EWALD-Konstruktion** (Ewald, 1921)) (Abbildung 2.5).

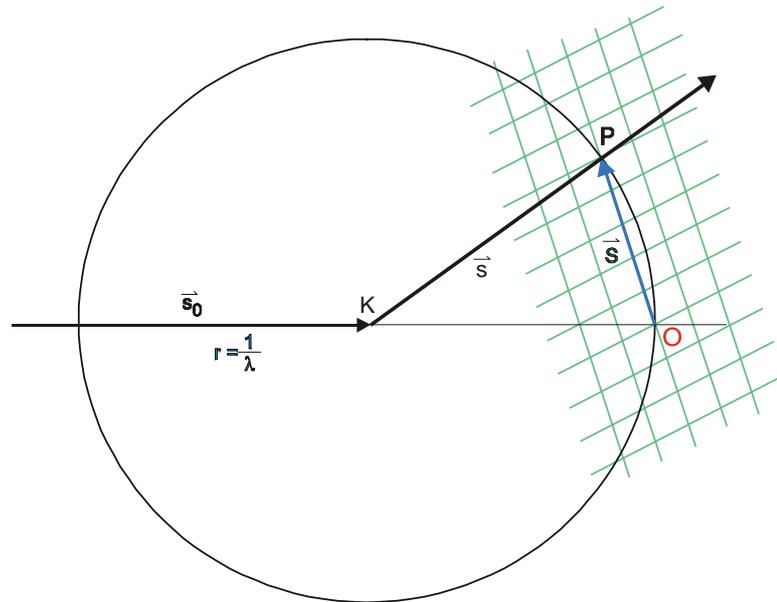


Abbildung 2.5 EWALD-Konstruktion (Ewald, 1921). Die Richtung des Primärstrahles s_0 geht vom Drehpunkt des Kristalles K zum Ursprung O des reziproken Gitters. Um den Kristall wird eine Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ gezeichnet. Der gebeugte Strahl wird durch den Vektor s und ein reziproker Gittervektor durch den Vektor S repräsentiert.

Die Reflexionsbedingung ist exakt erfüllt, wenn ein reziproker Gitterpunkt P die EWALD-Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ durchquert. Die Richtung des gebeugten Strahles ergibt sich aus der Verbindung des Kristalldrehpunktes K mit dem die Kugel durchquerenden reziproken Gitterpunkt P. Kristallgitter mit identischen Abmessungen beugen demnach auch Röntgenstrahlung in identischer Richtung.

Tatsächlich ist die Beugung des Primärstrahles das Ergebnis der Interferenz aller an den Elektronen der Atomhülle gebeugten Röntgenstrahlen. Die gesamte Streuintensität ergibt sich dabei als Überlagerung aller Elementarwellen.

Betrachtet man eine isolierte Einheitszelle, an der sich eine Röntgenwelle bricht, so ergibt sich ein richtungsabhängiges, kontinuierliches Beugungsbild. Durch die periodische Anordnung des Kristalles können diese Sekundärwellen jedoch nur in bestimmte Richtungen konstruktiv interferieren. Der mathematische Zusammenhang

zwischen den Positionen der Atome in der Einheitszelle und den gebeugten Röntgenstrahlen ist eine *FOURIER*-Transformation:

$$\vec{F}(h, k, l) = \sum_j f_j e^{2\pi i \vec{r}_j \cdot (h, k, l)}$$

Der Strukturfaktor F beschreibt die Summe der Streubeiträge über alle Atome j mit den fraktionellen Koordinaten \vec{r}_j in der Einheitszelle; f_j ist der Atomformfaktor, der die Auflösungsabhängigkeit der Streuintensität an dem jeweiligen Atom repräsentiert und unter Annahme von kugelsymmetrischer Ladungsverteilung in Abwesenheit von anomaler Streuung von der Elektronenzahl des jeweiligen Elementes abhängig ist.

Die Streuleistung eines Atomes verringert sich zusätzlich in auflösungsabhängiger Weise durch dessen thermischer Schwingung. Dieser Sachverhalt wird durch die Einführung des Temperaturfaktors berücksichtigt. Der Term $T(iso)$, der den Temperaturfaktor B enthält, wird mit dem atomaren Formfaktor multipliziert:

$$T(iso) = e^{-B \frac{\sin^2 \Theta}{\lambda^2}}$$

Der Temperaturfaktor ist mit der mittleren quadratischen Auslenkung wie folgt verknüpft:

$$B = 8\pi^2 \cdot \overline{u^2}$$

Ein Temperaturfaktor von $B = 30 \text{ \AA}^2$ würde demnach einer mittleren quadratischen Auslenkung $\overline{u^2}$ der atomaren Schwingung um eine Gleichgewichtsposition von $0,62 \text{ \AA}$ entsprechen.

2.3.4 Berechnung der Elektronendichte

Da die Röntgenstrahlen an der Atomhülle der Atome gebeugt werden, ergeben sich aus der Strukturanalyse nicht sofort die genauen Atompositionen sondern die dreidimensionale Verteilung der Elektronen der Atome, die als *Elektronendichteverteilung* bezeichnet wird. Die Elektronendichteverteilung ρ an jedem Punkt (x, y, z) in einem Kristall läßt sich aus der Strukturfaktoramplitude $F(h, k, l)$, die proportional

zur Quadratwurzel der gemessenen Intensität I für den Reflex (h,k,l) ist, der entsprechenden Phase ϕ_{hkl} und dem Volumen V der Einheitszelle durch inverse *FOURIER*-Transformation berechnen:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{i\phi_{hkl}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Der Gangunterschied ϕ_{hkl} eines Reflexes ist hierbei einer direkten Messung nicht zugänglich, da aus den integrierten Reflexintensitäten lediglich die Strukturamplituden $|F_{hkl}|$ bestimmt werden können. Diese Unbestimmtheit wird in der Proteinkristallographie als *Phasenproblem* bezeichnet.

2.3.5 Lösung des Phasenproblems

Im Gegensatz zur Bestimmung der Strukturfaktoramplitude, die sich direkt aus den gemessenen Reflexintensitäten ergibt, besteht keine Möglichkeit die zur Strukturanalyse wichtigen Phasenwinkel experimentell zu ermitteln. Verschiedene Methoden, die zu einem Erhalt der Phaseninformation führen, sind bekannt:

- a) die Methode des *Isomorphen Ersatzes* (MIR oder SIR) (Green *et al.*, 1954), bei dem Schwermetall-Derivate des Proteins im Kristall genutzt werden.
- b) die Methode der *Multiplen Anomalen Dispersion* (MAD) (Hendrickson, 1991), bei der Atome mit ausreichendem anomalen Streubeitrag (z.B. Hg oder Se) in das Protein eingebracht wurden. Die Messung der Beugungsdaten erfolgt bei verschiedenen Wellenlängen.
- c) die Methode des *Molekularen Ersatzes* (MR) (Hoppe, 1957a; Hoppe, 1957b; Huber, 1965; Rossmann und Blow, 1962), bei der die Phaseninformation aus einer hinreichend analogen Kristallstruktur erhalten wird.
- d) direkte Methoden (Hauptmann und Karle, 1953), die bei der Bestimmung bei Kleinmolekülstrukturen angewandt werden und noch nicht auf Proteinstrukturen übertragbar sind.

2.3.6 Molekularer Ersatz

Bei der Methode des Molekularen Ersatzes („*Molecular Replacement*“, MR) wird die notwendige Phaseninformation dadurch erhalten, daß ein hinreichend ähnliches Atommodell einer bekannten Kristallstruktur in einer *PATTERSON*-Suche eingesetzt wird. Aus den Koordinaten des bekannten Suchmodelles können, nach Positionierung in der zu lösenden Struktur, die Strukturfaktoramplituden F_{calc} und die Phasen ϕ_{calc} berechnet werden. Mit den Modellphasen und den experimentell erhaltenen Strukturfaktoramplituden F_{obs} wird eine Elektronendichtekarte (*PATTERSON*-Dichte) $P(x,y,z)$ für die zu bestimmende Kristallstruktur errechnet. Zur Positionierung des Suchmodelles wird die *PATTERSON-Funktion* benutzt:

$$P(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}|^2 \cos(2\pi[hu + kv + lw])$$

Die *PATTERSON-Funktion* stellt einen Satz von interatomaren Vektoren dar, deren Beträge und Richtungen den Abständen und Orientierungen zwischen den Atomen in der Einheitszelle entsprechen. Da sich im Normalfall Raumgruppe und Orientierung des Suchmodelles in der Einheitszelle von der gesuchten Struktur unterscheiden, muß das bekannte Atommodell korrekt in der neu bestimmten Einheitszelle der unbekannt Struktur plziert werden. Dieses sechsdimensionale Suchproblem läßt sich in je drei Rotations- und drei Translationsvariablen zerlegen. Die beiden Sätze an *PATTERSON*-Vektoren aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden F_{obs} und aus den berechneten F_{calc} der Modellatomkoordinaten werden in einer Produktfunktion korreliert, wobei der eine Vektorensatz in einer Rotationsfunktion in kleinen Winkelschritten um alle drei Achsen gegen den anderen gedreht wird. Dabei werden die Vektoren innerhalb des Moleküles (Selbstvektoren) zur Deckung gebracht. Nach der korrekten Orientierung erfolgt die Positionierung durch eine anschließende Translationsfunktion in allen drei Raumrichtungen der Einheitszelle, wobei die Kreuzvektoren zwischen den verschiedenen Molekülen herangezogen werden.

2.3.7 Isomorpher Ersatz

Bei der Methode des Isomorphen Ersatzes wird ein Datensatz eines Proteinkristalles (**NATI**) und in den meisten Fällen mehrere Datensätze unabhängiger isomorpher Schweratom-Derivate (**DERI**) der Kristalle aufgenommen (MIR). Die möglichst gute Kristallisomorphie ist dabei eine zwingend notwendige Eigenschaft, sowie die geordnete Bindung der Schweratome im Derivat-Kristall. Die Atompositionen der Schweratome können über *Differenz-PATTERSON-Funktionen* aus den Strukturfaktoramplituden (ΔF) von DERI und NATI erhalten werden, vorausgesetzt die Anzahl der gebundenen Schweratome ist nicht zu hoch.

Durch Vergleich von Nativ-, Derivat- und Differenzstrukturfaktoramplituden mit den komplexen Struktur Faktoren aus dem Schweratommodell können initiale Phasenwinkel für die Proteinstruktur Faktoren bestimmt werden. In manchen Fällen lassen sich bereits mit einem Derivat hinreichend genaue Proteinphasen bestimmen, (*Single Isomorphous Replacement, SIR*) oft sind jedoch mindestens zwei unabhängige Schweratom-Derivate nötig (*Multiple Isomorphous Replacement, MIR*).

Abbildung 2.6 zeigt die Ermittlung initialer Phasenwinkel durch MIR.

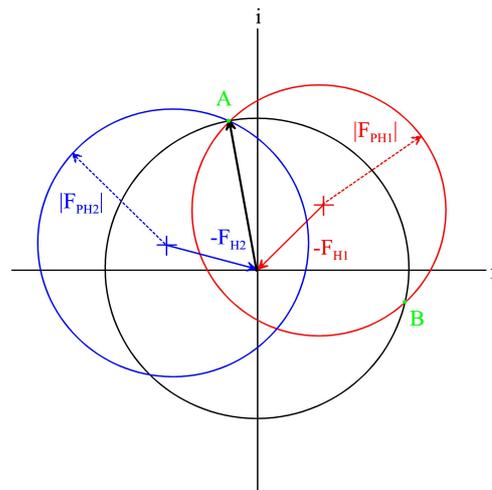


Abbildung 2.6 Harkerkonstruktion (Harker, 1956). Der schwarze Kreis mit Radius FP schneidet im Falle eines Derivates (FPH1) dessen Kreis (rot) an zwei Punkten A und B, so daß der Phasenwinkel nicht eindeutig bestimmt werden kann. Erst ein weiteres Derivat (FPH2) (blau) hebt diese Unbestimmbarkeit auf. Es ergibt sich ein Schnittpunkt (A) für alle drei Kreise, der einen eindeutigen Phasenwinkel markiert.

2.3.8 Multiple Anomale Dispersion

Bei der Bestimmung von Proteinphasen durch Multiple Anomale Dispersion (MAD) wird die Eigenschaft von Schweratomen als anomaler Streuer in Proteinkristallen ausgenutzt. Dazu wird Röntgenstrahlung mit variabler Wellenlänge (Synchrotronstrahlung) an der spezifischen Absorptionskante der Schweratome verwendet. In der Nähe dieser Absorptionskante des Elementes findet keine elastische Streuung der Elektronen statt. Wechselwirkung der Synchrotronstrahlung mit dem Atomkern, durch Ionisation eines Elektrons aus der K-Schale, bedingt eine Phasenverschiebung (*anomale Streuung oder Dispersion*), die sich von der Phasenverschiebung elastischer Streuung (180°) unterscheidet. Der Atomformfaktor ist somit nicht mehr länger eine reelle, sondern eine komplexwertige Zahl.

Dieses bedingt, daß die *FRIEDEL*-Paare F_{hkl} und F_{-h-k-l} (Reflexe mit identischen Strukturfaktoramplituden und Phasenwinkeln mit umgekehrten Vorzeichen) weder betragsmäßig noch in ihrem Phasenwinkelbetrag identisch sind, also die Strukturfaktoren F_{hkl} und F_{-h-k-l} keine komplex-konjugierten Zahlen mehr sind (siehe Abbildung 2.7). Dadurch kann aus den Amplitudendifferenzen (**BIJOVET-Differenzen**) dieser Reflexe eine *PATTERSON*-Dichte errechnet werden, aus der sich ein Modell der Substruktur aller bei einer bestimmten Wellenlänge anomal streuenden Atome erstellen läßt.

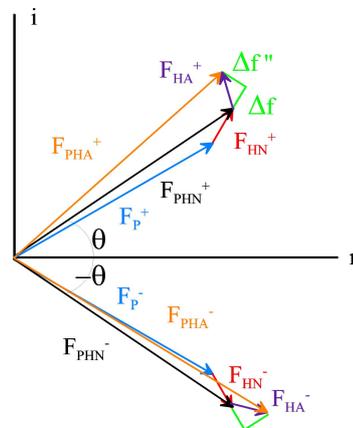


Abbildung 2.7 Der Einfluß der anomalen Dispersion auf Strukturfaktoren mit entgegengesetzten Vorzeichen für den Phasenwinkel. Ohne anomale Streuung gilt $F_{PHN}^+ = F_{PHN}^-$. Diese Strukturfaktoren setzen sich aus einem Beitrag des Proteins F_P und einem „normalen“ Beitrag F_{HN} des Schweratoms zusammen. Im Falle anomaler Streuung addiert sich eine reale Komponente Δf in Verlängerung zu F_{HN} und senkrecht dazu eine imaginäre Komponente $\Delta f''$, die stets einen kleinen Phasenwinkel dazu addiert. Als Folge davon weisen die kombinierten Strukturfaktoren aus „normalen“ und „anormalen“ Beiträgen F_{PHA}^+ und F_{PHA}^- sowohl unterschiedliche Amplituden als auch Phasenwinkel auf.

Analog zum MIR-Fall können nun durch eine *HARKER*-Konstruktion in Abbildung 2.7 initiale Proteinphasenwinkel bestimmt werden (siehe Abbildung 2.8).

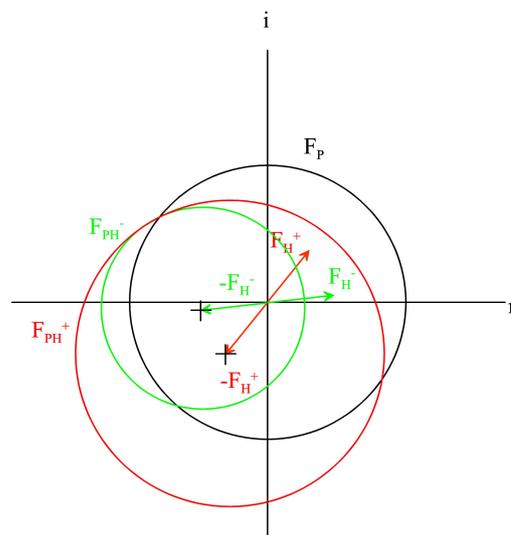


Abbildung 2.8 Vereinfachte Harkerkonstruktion, die die Ableitung eines eindeutigen Phasenwinkels mit Hilfe der anomalen Streuung erlaubt. Der Vektor für die „normalen“ Strukturfaktoramplituden ist mit F_P gegeben. Die beiden *BIWOET*-Paare sind mit F_H^+ und F_H^- gekennzeichnet. F_H^- ist vereinfacht mit einem Phasenwinkel mit entgegengesetztem Vorzeichen dargestellt, damit sich die drei Kreise in einem Punkt schneiden. Im MAD Experiment wird F_P durch Messung eines remote Datensatzes bestimmt, dessen Wellenlänge weit von der Absorptionskante entfernt ist.

2.4 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Enzyme von pflanzlicher Dihydrofolatreduktase (DHFR-TS) und Transketolase aus *Zea mays* (*zmTK*) untersucht werden. Beide Enzyme haben eine große Bedeutung als *Target*-Proteine in Medizin und Pflanzenschutz. Detaillierte strukturelle Kenntnisse dieser Enzyme erlauben eine genauere Untersuchung der Substratspezifität als Voraussetzung für ein Selektivitätsdesign möglicher Inhibitoren. Dazu sollte die pflanzliche Dihydrofolatreduktase heterolog exprimiert werden, gereinigt und kristallisiert werden. Nachfolgend sollte die dreidimensionale Struktur der DHFR-TS und der *zmTK* mit Hinblick auf ihre Aktivzentrumsgeometrie bestimmt werden.

Ziel der Arbeit war es weiter, die Strukturen der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase und der Riboflavin Synthase des Riboflavinbiosyntheseweges aus *Schizosaccharomyces pombe* kristallographisch aufzuklären. Die Analyse deren Kristallstrukturen würden strukturelle Grundlagen liefern bei der Formulierung des Reaktionsmechanismus und Erkenntnisse über einer neuartigen „*feedback*“-Inhibition der Lumazin Synthase aus *S. pombe* durch gebundenes Riboflavin geben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Ammoniumperoxodisulfat (BioRad, München)

Protogel (30 % (w/v) Acrylamid / 0,8 % (w/v) Bis-acrylamid) (National Diagnostics, USA)

Bacto-Trypton, Bacto-Agar und Hefe-Extrakt (Difco Laboratories, USA)

IPTG (Biomol, Hamburg)

Bradford Protein Assay (BioRad, München)

Soweit nicht anders vermerkt, wurden weitere Chemikalien von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) in p.a. Qualität bezogen.

3.1.2 Geräte

Dioden-Array Photometer DU 7500 (Beckmann, München)

Eagle EyeII (Stratagene, Heidelberg)

Äkta, sowie FPLC-System mit Gradient Programmer GP-250 und zwei Pumpen P500 (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Goniometerkopf (Huber Diffraktionstechnik, Rimsting)

Kühlzentrifuge J2-21 (Beckmann, München)

PHM 82 Standard pH-Meter (Radiometer Copenhagen, Dänemark)

Schüttelinkubator (Infors AG, Bottmingen, Schweiz)

PVDF Membran und Sterilfilter (Millipore GmbH, Eschborn)

Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, München)

Branson Sonifier Modell 250 (Fa. G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd)

Robocycler Gradient 96 (Stratagene, Heidelberg)

Drehanoden RU200 (RIGAKU) mit MARRESEARCH (Hamburg) *Image Plate* Detektoren

Zur Datenverarbeitung aller Art wurden Server und Workstations der Firma DIGITAL *alpha-stations* (OSF), SILICON GRAPHICS *work-stations* und *compute server* (IRIX) oder IBM-kompatible *personal computer* eingesetzt.

3.1.3 Säulenmaterial

Q-Sepharose-Fast-Flow (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Red-Sepharose Cl6B (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Methotrexat(MTX)-Agarose (Sigma Chemie, Deisenhofen)

Superdex 200 26/200 (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Superdex 75 26/200 (Amersham Pharmacia, Freiburg)

3.1.4 Materialien für mikro- und molekularbiologische Arbeiten

3.1.4.1 Bakterien

Folgende Derivate des *E. coli* Stammes K12 wurden für mikrobiologische Arbeiten und für die heterologe Expression rekombinanter Proteine verwendet:

<u><i>E. coli</i> DH5α</u> Genotyp:	(Stratagene GmbH, Heidelberg) (Hanahan, 1983) F ⁻ , <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>), ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15F λ ⁻
<u><i>E. coli</i> XL1Blue</u> Genotyp:	(Stratagene GmbH, Heidelberg) (Bullock <i>et al.</i> , 1987) <i>recA</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR-17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F ⁺ <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Δ M15, <i>Tn10</i> (tet ^r)]
<u><i>E. coli</i> BL21(DE3)</u> Genotyp:	(Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA) (Studier und Moffatt, 1986), (Studier <i>et al.</i> , 1990), (Studier, 1991) F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)
<u><i>E. coli</i> M15</u> Genotyp:	von Herrn A. von Loon freundlicherweise zur Verfügung gestellt. <i>lac</i> , <i>ara</i> , <i>gal</i> , <i>mtl</i> , <i>recA</i> ⁺ , <i>uvr</i> ⁺ , Str ^R , (pREP4: Kan ^R , <i>lacI</i>)

Alle Bakterienstämme wurden als chemisch kompetente Zellen bezogen. Die Lagerungstemperatur der kompetenten Zellen liegt bei -80°C.

3.1.4.2 Plasmide

pET3a/DHFR-TS

Expressionskonstrukt nativer, bifunktionaler Dihydrofolatreduktase (*glyDHFR-TS*) aus Soja (*Glycine max.*).

pET3a

(Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA) (Studier, 1991). Vektor zur Klonierung und Expression rekombinanter Gene in *E. coli*.

pET32a

(Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA) (Studier *et al.*, 1990). Vektor zur Klonierung und Expression von Genen als Thioredoxin-Fusionsprotein in *E. coli*.

pNCO113

Vektor zur Klonierung und Expression rekombinanter Gene in *E. coli* (Stueber *et al.*, 1990).

3.1.4.3 Enzyme und Kits

Pfu DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg)

Restriktionsenzyme (New England Biolabs (NEB), Schwalbach)

T4 DNA-Ligase (New England Biolabs (NEB), Schwalbach)

Calf intestine alkaline phosphatase (alkalische Phosphatase, CIP) (New England Biolabs (NEB), Schwalbach)

PRISM Ready Reaction BigDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kits (Perkin Elmer, Überlingen)

Qiagen Plasmid Preparation Kit (Mini) (Qiagen, Hilden)

Qiagen Plasmid Preparation Kit (Midi) (Qiagen, Hilden)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

QIAquick Nucleotid Removal Kit (Qiagen, Hilden)

QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg)

PCR-Script Amp Cloning Kit (Stratagene, Heidelberg)

3.1.4.4 Synthetische Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG-BIOTECH (Ebersberg) synthetisiert und für die Mutagenese an Plasmid-DNA verwendet. Die mutierten Nukleotide sind jeweils unterstrichen.

DRMUTE1 *forward* Primer (29mer)

5'-AGA-AAT-TCA-GTC-AGA-AAT-TGA-GTG-TGA-CA-3'

DRMUTE1rev *reverse* Primer (29mer)

5'-TGT-CAC-ACT-CAA-TTT-CTG-ACT-GAA-TTT-CT-3'

DRMUTE2 *forward* Primer (29mer)

5'-TTT-CAC-TAT-GTT-TGA-GCC-ATG-GTA-CTC-AT-3'

DRMUTE2rev *reverse* Primer (29mer)

5'-ATG-AGT-ACC-ATG-GCT-CAA-ACA-TAG-TGA-AA-3'

DRMUTD1 *forward* Primer (29mer)

5'-CAC-TTT-TAT-GCC-TGA-TGT-TGA-TTT-CAC-TA-3'

DRMUTD1rev *reverse* Primer (29mer)

5'-TAG-TGA-AAT-CAA-CAT-CAG-GCA-TAA-AAG-TG-3'

DRMUTD2 *forward* Primer (29mer)

5'-TCC-AGT-TGA-TTT-CGA-TAT-GTT-TCG-GCC-AT-3'

DRMUTD2rev *reverse* Primer (29mer)

5'-ATG-GCC-GAA-ACA-TAT-CGA-AAT-CAA-CTG-GA-3'

DRMUTDDE *forward* Primer (30mer)

5'-CCT-GAT-GTT-GAT-TTC-GAT-ATG-TTT-GAG-CCA-3'

DRMUTDDErev *reverse* Primer (30mer)

5'-TGG-CTC-AAA-CAT-ATC-GAA-ATC-AAC-ATC-AGG-3'

Die folgenden synthetischen Oligonukleotide wurden in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt, um die Gene für pflanzliche Dihydrofolatreduktase aus ihren verschiedenen Konstrukten zu amplifizieren und in entsprechende Expressionsvektoren einzufügen. Die jeweiligen Restriktionsschnittstellen sind

unterstrichen. Regionen, die komplementär zu den jeweiligen Genen sind, sind kursiv gehalten.

DRN*de1* *forward* Primer (30mer)

5'-GGG-AAT-TTC-CAT-ATG-CAA-AAG-ACT-TAC-CAA-3'
NdeI

DRN*de2* *forward* Primer (30mer)

5'-GGG-AAT-TTC-CAT-ATG-GCC-ACT-CAA-GAT-TGG-3'
NdeI

DRTS*Bam* *reverse* Primer (29mer)

5'-CGG-GAT-CCT-TAG-ACA-GAC-AGC-TTC-ATA-TC-3'
BamHI

DR*Bam* *reverse* Primer (29mer)

5'-CGG-GAT-CCT-TAC-CGT-ACA-CGC-ACA-TAA-GT-3'
BamHI

Die folgenden Oligonukleotide wurden in einer PCR eingesetzt, um die Gene für die Mais Dihydrofolatreduktase und die C-terminale Thymidylatsynthase-Domäne aus einer Mais cDNA zu isolieren. Die Primer sind in ihrer gesamten Länge genspezifisch (ohne Restriktionsschnittstellen) und daher kursiv dargestellt.

DRTS*corn.for* *forward* Primer (18mer)

5'-*ATG-GCC-GCA-GTT-CTA-GCC*-3'

maisTSF1 *forward* Primer (30mer)

5'-*GAA-TGA-CAA-ATT-TGA-AAC-AGA-GAA-TTT-CTC*-3'

maisTSR1 *reverse* Primer (30mer)

5'-*TTA-CAC-TGC-CAT-TTT-CAT-CTC-TAT-CTT-CTG*-3'

Die folgenden Oligonukleotide wurden bei der Firma INTERACTIVA Biotechnologie (Ulm) synthetisiert und eingesetzt, um die Gene für die N-terminale Dihydrofolatreduktase-Domäne aus *A. thaliana* und die C-terminale Thymidylatsynthase-Domäne aus *Z. mays* zu amplifizieren und als synthetisches bifunktionelles Gen in den Expressionsvektor pNCO113 einzufügen. Die jeweiligen Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Die Gen-Regionen, die komplementär zu den jeweiligen Domänen sind, sind kursiv gehalten und die Nukleotide des Linkers zwischen den Domänengrenzen sind hervorgehoben.

- AT-DHFR-Rbs-*EcoRI* *forward* Primer (60mer)
EcoRI
 5'-ATA-ATA-GAA-TTC-ATT-AAA-GAG-GAG-AAA-TTA-ACT-ATG-CCG-
 CAG-CGT-ACT-TAC-CAG-GTT-GTA-3'
- ZM-TS-*HindIII* *reverse* Primer (46mer)
HindIII
 5'-TAT-TAT-TAT-AAG-CTT-ACA-CTG-CCA-TTT-TCA-TCT-CTA-TCT-TCT-
 GGT-G-3'
- DHFRTS-ATZM-1 *reverse* Primer (79mer)
 5'-CGT-TTT-TGC-TTT-ACC-ACT-TTT-GTT-CGT-GTT-AAA-AAG-TCA-GTG-
 GCA-GAA-ACT-CAT-GAG-TCA-AAT-GGC-AAG-GAA-TCA-ACC-G-3'
- DHFRTS-ATZM-2 *reverse* Primer (78mer)
 5'-GAG-TCA-AAT-GGC-AAG-GAA-TCA-ACC-GAG-GTT-GAT-ACC-AAG-AAT-
 GAC-AAA-TTT-GAA-ACA-GAG-AAT-TTC-TCT-TTT-CTC-CCC-3'
- DHFRTS-ATZM-3 *reverse* Primer (76mer)
 5'-GAA-ACA-GAG-AAT-TTC-TCT-TTT-CTC-CCC-AAG-ATG-GTA-TAT-GAC-
 CGC-CAT-GAG-GAG-TAC-CAA-TAT-CTC-AAT-CTT-GTT-G-3'
- DHFRTS-ATZM-4 *reverse* Primer (77mer)
 5'-GAG-GAG-TAC-CAA-TAT-CTC-AAT-CTT-GTT-GAA-GAT-ATT-ATA-AGG-
 TCT-GGT-GCT-CAG-AAA-AAC-GAC-AGG-ACA-GGA-ACT-GG-3'
- DHFRTS-ATZM-5 *reverse* Primer (49mer)
 5'-GAA-AAA-CGA-CAG-GAC-AGG-AAC-TGG-AAC-ATT-GTC-AAA-ATT-TGG-
 GTG-TCA-G-3'
- DHFRTS-ATZM-*AflII* *reverse* Primer (49mer)
AflII
 5'-ATT-GTC-AAA-ATT-TGG-GTG-TCA-GAT-GCG-GTT-CAA-CTT-AAG-GAT-
 AAT-AAT-A-3'

3.2 Mikrobiologische Methoden

Bei allen Arbeiten mit Bakterien wurde sorgfältig auf die Sterilität der verwendeten Arbeitsgeräte, Medien und Lösungen geachtet. Medien, Lösungen und Arbeitsgeräte wurden autoklaviert, nicht autoklavierbare Lösungen steril filtriert. Standardisierte mikrobiologische, sowie molekularbiologische Methoden wurden nach Sambrook et al. (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Für DNA-Aufreinigungen und Plasmid-

Schnellisolierungen fanden Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben Anwendung.

3.2.1 Bakterien Flüssigkulturen

Autoklaviertes LB(Luria-Bertani)-Flüssigmedium wurde zur Expression rekombinanter Proteine und zur Vermehrung von Plasmid-DNA mit den jeweiligen Antibiotika versetzt und – soweit nicht anders beschrieben – bei 37°C und 200 bis 250 U/min im Schüttler kultiviert. Von den Antibiotika wurden 1000fach überkonzentrierte Stammlösungen erstellt, steril filtriert und diese bei –20°C gelagert.

Antibiotika-Lösungen: Ampicillin oder Carbenicillin 1000fach (100 mg/ml in ddH₂O)

LB-Medium: 10 g NaCl
10 g Bacto-Trypton
5 g Hefe-Extrakt
mit NaOH auf pH 8.0 eingestellt
ddH₂O ad 1 Liter

3.2.2 Bakterien Plattenkulturen

LB-Medium wurde mit 15 g/l Agar versetzt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C wurde das entsprechende Antibiotikum gewünschter Endkonzentration zugegeben und in sterile Petrischalen gegossen. Die Petrischalen wurden über Nacht in der Sterilbank belassen, anschließend steril verpackt und bei 4°C gelagert. Bakterienflüssigkulturen wurden mit einem sterilen Drygalski-Spatel auf den LB-Agar-Platten vereinzelt und diese anschließend für 12 Std. bei 37°C inkubiert.

3.2.3 Transformation von Fremd-DNA in kompetente *E. coli* Zellen

20 µl transformationskompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 µl eines Ligationsansatzes oder 0,01–1 µg Plasmid-DNA versetzt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 30 sec bei 42°C hitzeschockbehandelt und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 300 µl SOC-Medium wurde der Transformationsansatz für 1 Std. bei 37°C kultiviert. 150 µl der Ansätze wurden auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert oder direkt zum Animpfen von Expressionskulturen verwendet.

SOC-Medium: 0,5 g NaCl
 20 g Bacto-Trypton
 5 g Hefe-Extrakt
 ddH₂O ad 1 Liter

Die Lösung wurde autoklaviert und vor dem Gebrauch
10 ml einer steril filtrierten 1 M MgCl₂ und
2 ml einer 20 % (w/v) Glucose-Lösung hinzugegeben.

3.2.4 Transformation über Elektroporation

50 µl elektrokompente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in einer auf 4°C gekühlten Elektroporationsküvette (1 mm) mit 1 µl Ligationsansatz oder plasmidischer DNA versetzt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 1600 V mit einem BioPulse (BioRad, München). Die Zellen wurden mit LB- oder SOC-Medium aufgenommen und anschließend auf LB-Agar-Platten (3.2.2) ausgestrichen.

3.2.5 Heterologe Expression von rekombinantem Protein in *E. coli*

Transformanten wurden in 50 ml LB-Medium (siehe 3.2.1) angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Diese Übernachtskulturen wurden in 1 Liter Expressionskulturen überführt und bei 25°C bis 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6–0,8 auf einem Schüttler bei 150–200 U/min inkubiert. Die Induktion der Expression rekombinanten Proteins erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG.

Optimale Expressionsbedingungen für die native Dihydrofolatreduktase aus Soja (*glyDHFR-TS*) wurden mit dem Expressionskonstrukt pET3a/DHFR-TS im Rahmen dieser Arbeit durch direkte Überführung der Transformationsansätze in BL21(DE3) Zellen (siehe 3.2.3) in 12 x 1 Liter LB-100 µg/ml Carb.-Expressionskulturen ermittelt. Die Induktion erfolgte wie oben beschrieben. Die Proteinexpression wurde anschließend bei 25°C über eine Dauer von 6 Std. verfolgt.

Eine Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 30 min im Rotor JA4.2 bei 4200 U/min und 4°C. Zur Aufbewahrung wurden die Bakterienzellen auf Parafilm aliquotiert eingewogen und bei –80°C eingefroren.

3.2.6 Herstellung von *E. coli* Rohextrakten

Bakterienzellen aus 3.2.5 mit rekombinanter *glyDHFR*-TS wurden im Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM DTT, 20 % (w/v) Glycerin) resuspendiert und in einem Rosettengefaß unter Eiskühlung durch Ultraschall (MacroTip 3 x 5 min auf Stufe 8 bei 80 % Puls-Zyklus) aufgeschlossen (Branson, Sonifier 250). Die Trennung von Cytoplasma und unlöslicher Membranfraktion erfolgte durch Zentrifugation (30 min, JA 25.50, 20 000 U/min, 4°C). Die Proteine der Membranfraktion wurden in 8 M Harnstoffpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 8 M Harnstoff, 2 % (w/v) SDS) aufgenommen und 20 min bei 20 000 x g und 4°C zentrifugiert. Aliquots der Fraktionen wurden zur Beurteilung des Expressionsniveaus auf ein 12 % iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Methoden zur Nukleinsäure-Analyse

3.3.1.1 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte in Agarosegelen gewünschter Konzentration. Zur Herstellung eines Agarosegels wurden, je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente, 0,5-2,0 % Agarose (w/v) (Biomol, Hamburg) in TAE-Laufpuffer durch Erhitzen gelöst. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (1 µg/ml) wurde die Lösung in eine Flachbettgelapparatur gegossen und nach ihrem Erstarren mit TAE-Laufpuffer überschichtet. Die zu trennenden DNA-Proben wurden mit sechsfach Probenpuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 8-10 mA/cm Gellänge für 45 bis 120 min. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) detektiert und ihre Größe durch Größenstandards (Boehringer, Mannheim) ermittelt.

TAE-Puffer: 40 mM Tris
 20 mM Essigsäure
 1 mM EDTA gelöst bei pH 8.0

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

3.3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA-Mengen wurden anhand ihrer Bandenstärke und des Molekulargewichtes im Agarosegel unter UV-Licht abgeschätzt. Dazu konnte auch die Bandenstärke des entsprechenden Größenstandards herangezogen werden. Zur genaueren Bestimmung wurde eine entsprechende Verdünnung UV-spektrometrisch bei 260 nm vermessen. Eine $A_{260\text{nm}} = 1,0$ entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger oder 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA. Durch Bestimmung des Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ kann der Reinheitsgrad der DNA-Lösung bestimmt werden. Das Verhältnis für reine DNA-Präparationen liegt bei 1,8 bis 2,0.

3.3.1.3 Ethanolfällung

Zur Konzentrierung oder zum Pufferwechsel wurden gelöste Nukleinsäuren durch Zugabe von 1/9 des Probenvolumens 3 M Natriumacetat pH 6.0 und das 2,5fache an abs. Ethanol (-20°C) gefällt und durch Zentrifugation (20–60 min, 15 000 x g, 4°C) sedimentiert.

Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet anschließend einige Minuten luftgetrocknet. Das trockene Pellet wurde in sterilem ddH₂O oder 10 mM Tris/HCl pH 8.5 aufgenommen.

3.3.2 Enzymatische Methoden

3.3.2.1 Enzymatische Spaltung von Plasmid DNA und DNA-Fragmenten

Zur Charakterisierung von DNA durch Restriktionsanalyse oder bei der Konstruktion von Plasmiden wurden 0,1–2,0 μg DNA mit 0,1–2 Units verschiedener Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Schwalbach) für 60–120 min nach den jeweiligen Angaben des Herstellers geschnitten. Die Fragmentierung der DNA wurde über die elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel überprüft (siehe 3.3.1.1).

3.3.2.2 Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Geschnittene Plasmide wurden mit alkalischer Phosphatase EC 3.1.3.1 (CIP, New England Biolabs) behandelt, um eine Religation partiell geschnittener Plasmide zu minimieren und um die Klonierungseffizienz bei Ligationen (siehe 3.3.2.3) zu begünstigen. Nach Restriktion (siehe 3.3.2.1) wurden 0,2 U alkalische Phosphatase pro μg DNA eingesetzt und in dem Puffer nach Herstellerangaben inkubiert. Anschließend wurden die dephosphorylierten DNA-Fragmente über ein Agarosegel gereinigt.

3.3.2.3 Ligation von DNA Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung zweier DNA-Fragmente nach Spaltung durch Restriktionsenzyme erfordert die Bildung von Phosphodiesterbindungen durch DNA-Ligase. Dazu muß mindestens ein DNA-Fragment einen Phosphatrest am 5'-Ende tragen. In einem Ligationsansatz wurden geschnittener Vektor und die Insert-DNA in einem Verhältnis 1:1 oder 1:3 in Bezug auf pmol-DNA-Enden eingesetzt. Die Ligation erfolgte für 16 Std. bei 16°C.

Ligationsansatz: 150-300 ng Vektor DNA
 x ng Insert DNA (molares Verhältnis Vektor zu Insert (siehe oben))
 2 μl 10x Ligationspuffer (NEB)
 1 μl T4 DNA-Ligase (NEB)
 ad 20 μl mit ddH₂O

3.3.2.4 Mutagenese von Plasmid-DNA

Der QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit erlaubt *in vitro* die gezielte Veränderung der Sequenzabfolge von Plasmid-DNA. Dabei werden komplementäre Primer verwendet, die den gewünschten Nukleotidaustausch oder Deletion enthalten (siehe 3.1.4.4). In einer Thermocycling-Reaktion wird zunächst die doppelsträngige Plasmid-DNA denaturiert und die dann angelagerten Mutagenese-Primer durch die *Pfu* DNA-Polymerase verlängert. Dabei dient jeder Einzelstrang nur einmal als Vorlage („*Template*“). Die Synthese endet jeweils an den Primerbindungsstellen, wodurch neusynthetisierte „Tochter“-Stränge entstehen, die Lücken („*Nicks*“) enthalten. Die meisten *E. coli* Stämme sind *dam*⁺ und somit in der Lage, ihre eigene DNA durch Methylierung an der N₆-Amino-Gruppe des Adeninnukleotides vor

einem Abbau durch Restriktionsendonukleasen zu schützen. Die Endonuklease *DpnI* erkennt methylierte DNA und schneidet diese sequenzspezifisch. In einem *DpnI* Restriktionsansatz wird somit das Ausgangsplasmid, welches nicht die gewünschte Mutation enthält, eliminiert.

Zur Kontrolle der Mutationsrate wird ein pWhitescript-Kontrollplasmid eingesetzt, mit dem eine Blau-Weiß-Selektion der erhaltenen Transformanten möglich ist. Das Kontrollplasmid besitzt eine Punktmutation im *lacZ*-Gen, wodurch es in der Transkription von β -D-Galactosidase zum Abbruch kommt. Mit Hilfe von Kontrollprimern wird diese Mutation revertiert, wodurch die Transformanten auf X-Gal (10 % (w/v) in DMF)-LB-Carb.-Platten als blaue Kolonien erscheinen. Das Verhältnis von blauen zu weißen Kolonien ergibt die Mutationseffizienz, die bei 80 % liegen sollte.

Kontroll-Ansatz: 5 μ l 10 x Reaktionspuffer
 2 μ l (5ng/ μ l) pWhitescript Testplasmid
 1,25 μ l (125 ng) Kontrollprimer #1
 1,25 μ l (125 ng) Kontrollprimer #2
 1 μ l 10 mM dNTP-Mix
 ad 50 μ l mit ddH₂O

Mutagenese-Ansatz: 5 μ l 10 x Reaktionspuffer
 1 μ l Plasmid-DNA (50ng)
 1 μ l (125 ng) Mutageneseprimer #1
 1 μ l (125 ng) Mutageneseprimer #2
 1 μ l 1 mM dNTP-Mix
 ad 50 μ l mit ddH₂O

Alle Ansätze wurden mit 30 μ l Paraffinöl überschichtet und nach einer Erwärmung auf 95°C mit 1 μ l *Pfu* DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l) versetzt.

Cycling-Programm: [30 sec 95°C]
 [30 sec 95°C, 60 sec 55°C, 624 sec 68°C]₁₆ Zyklen
 [4°C Lagerung]

Nach Beendigung der Reaktion wurden 1 μ l *DpnI* (10 U) Restriktionsenzym hinzupipettiert und die Ansätze 1 Std. bei 37°C inkubiert. 1 μ l dieser Ansätze wurde für die Transformation in XL1Blue-Zellen eingesetzt. Nach der Transformation (siehe 3.2.3) in die *E. coli* Zellen werden die durch die Mutagenese-Methode entstandenen „Nicks“ durch *E. coli* DNA-Reperatursysteme geschlossen.

3.3.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1985) können innerhalb kurzer Zeit definierte DNA-Abschnitte *in vitro* enzymatisch exponentiell amplifiziert werden. Für die PCR-Reaktion werden zwei komplementäre Oligonukleotide („*Primer*“) (siehe 3.1.4.4) benötigt, die die zu amplifizierende Sequenz auf der DNA-Matrize („*Template*“) einschließen. Dadurch sind thermostabile DNA-Polymerasen wie z. B. *Taq*, *Pwo* und Deep Vent in der Lage, aus diesen Primern unter dNTP Verbrauch doppelsträngige DNA neu zu synthetisieren, die um das 10^6 bis 10^7 fache gegenüber der Ausgangskonzentration an *Template*-DNA angereichert ist.

50 µl PCR Ansatz:

5 µl 10x PCR-Puffer
1 µl [10 mM] dNTP-Mix
1 µl [50 µM] 3'-Primer#1
1 µl [50 µM] 5'-Primer#2
1 µl [100 ng] Plasmid DNA
ad 50 µl mit ddH ₂ O

Alle Reaktionen wurden wahlweise in einem *Hot-Top Thermocycler* durchgeführt oder die Ansätze mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Temperaturprogramme waren nach Zugabe von 0,5–1 µl der entsprechenden DNA-Polymerase üblicherweise wie folgt:

PCR-Programm:

[5 min 98°C]
[45 sec 98°C, 45 sec 60°C, 90s ec 72°C] ₃₀ Zyklen
[45 sec 98°C, 45 sec 60°C, 5 min 72°C]
[4°C Lagerung]

3.3.2.6 Automatisierte Sequenzierung von DNA („*Cycle Sequencing*“)

0,6 µg Plasmid-DNA wurde mit 3,2 pmol Sequenzierprimer und 4 µl ABI PRISM *ready reaction BigDyeDeoxy terminator cycle sequencing kit* (Terminator Mix) versetzt und mit Wasser auf 10 µl Reaktionsvolumen gebracht. Der Ansatz wurde mit 30 µl Mineralöl überschichtet und einer Thermocycling Reaktion unterzogen.

Cycling-Programm:

[4 min 96°C]
[30 sec 96°C, 15 sec 50°C, 4 min 60°C] ₂₅ Zyklen
[4°C Lagerung]

Anschließend wurden die Proben auf 20 µl Volumen mit Wasser aufgefüllt und einer Sequenzanalyse gemäß (Sanger *et al.*, 1977) zugeführt. Die Elektrophorese, die

Detektion der Fluoreszenzsignale und deren Auswertung wurden freundlicherweise von Herrn Marius Boicu am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried mit einem DNA-Sequenator (Modell 373, Applied Biosystems, USA) durchgeführt.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) photometrisch bei 595 nm bestimmt. Dazu wurde eine Eichgrade mit BSA in den Konzentrationen 0,1 bis 15 µg/ml im Absorptionsbereich von 0 bis 1,2 erstellt. 200 µl Bradfordreagenz (BioRad, München) wurden mit 1 bis 50 µl Probenlösung versetzt und mit Wasser auf 1 ml Volumen aufgefüllt. Die Extinktion bei 595 nm wurde nach 5 minütiger Inkubationszeit bei RT photometrisch bestimmt.

3.4.2 Proteinfällung

Zur Beurteilung einer niedrig konzentrierten Proteinlösung in einer SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine zuvor nach der Methode von Wessel (Wessel und Flugge, 1984) gefällt, um somit das Auftragsvolumen zu verringern. 100 µl einer Proteinlösung wurden in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 400 µl Methanol versetzt. Nach dem Zentrifugieren (10 sec, 15000 U/min, 4°C) wurden weitere 100 µl Chloroform zugegeben, die Lösung gemischt und erneut zentrifugiert. Nach Zugabe von 300 µl Wasser und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 1 min bei 12000 U/min abzentrifugiert. Die obere Phase wurde entfernt und die restliche Lösung mit 300 µl Methanol vermischt. Nach Zentrifugation (60 sec, 12000 U/min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Proteinpellet getrocknet.

3.4.3 Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen

Zum Pufferwechsel wurden Proteinlösungen über Gelfiltration (NAP-Säulen, Pharmacia) entsalzt und anschließend für die Vorbereitung der Kristallisationsexperimente durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Verwendet wurden Zentrifugationskonzentratoren des Typs Centriprep (V = 15 ml) und Centricon (V = 2 ml)

(Millipore, Eschborn). Die eingeeigneten Proteinlösungen (7–10 mg/ml) wurden abschließend durch Filtration (0,22 µm) mit einer Filtrationseinheit Ultrafree (Millipore, Eschborn) von Schwebstoffen befreit und bei 4°C gelagert.

3.4.4 Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichtes wurde durch eine diskontinuierliche, denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erreicht (Laemmli, 1970). Die durch SDS aus dem Probenpuffer stark negativ geladenen Proteine (ca. 1,4 g SDS pro g Protein) werden unter den denaturierenden und reduzierenden Bedingungen in einem vernetzten Polyacrylamidgel durch ein elektrisches Feld ihrer Größe nach getrennt. Dabei ist die Beweglichkeit der Proteine eine lineare Funktion ihres Molekulargewichtes. Dieser Zusammenhang kann zur Bestimmung der relativen Molekülmasse der Proteine genutzt werden.

Die SDS-PAGE wurde mit einem 5 % igen Sammelgel und einem 12 % igen Trenngel durchgeführt. Es wurden jeweils acht Gele (8,5 x 8 cm²) in eine Gelgießkammer (Eigenbau, MPI Martinsried) gegossen.

Sammelgel 5 %: 10 ml Acrylamid-Stammlösung (Protogel)
 7,5 ml 1 M Tris/HCl pH 6.8
 41,6 ml H₂O
 300 µl 20 % (w/v) SDS

Trenngel 12 %: 36 ml Acrylamid-Stammlösung (Protogel)
 17 ml 2 M Tris/HCl pH 8.8
 36 ml H₂O
 450 µl 20 % (w/v) SDS

Die Trenngellösung wurde nach Zugabe von 100 µl TEMED und 100 µl (0,1 g/ml) APS in die vorbereitete Gelgießapparatur gegossen und mit wenig Isopropanol blasenfrei überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Alkoholschicht entfernt, das Sammelgel mit 100 µl TEMED und 100 µl (0,1 g/ml) APS versetzt und in den Gießstand eingefüllt. Die Kämme für zehn bis zwölf Geltaschen wurden luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt. Die ausgehärteten Gele wurden in Haushaltsfolie luftdicht verschlossen und bis zu drei Wochen bei 4°C gelagert.

Für die Gelelektrophorese wurden die Proteinproben mit 10fach Probenpuffer versetzt und 5 min bei 96°C inkubiert. Die Trennung der Proteine erfolgte bei konstantem Strom von 15 mA je Gellänge im SDS-Laufpuffer. Zur Molekulargewichtsbestimmung der getrennten Proteine wurde ein SDS-PAGE-Größenstandard (Low-Range SDS-Marker BioRad, München) mitgetrennt.

10x Probenpuffer: 100 mM Tris/HCl pH 6.8
 200 mM DTT
 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
 20 % (w/v) Glycerin

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl pH 8.3
 200 mM Glycin
 0,1 % (w/v) SDS

3.4.5 Coomassie-Färbung der SDS-Polyacrylamidgele

Trenngele wurden nach erfolgter Elektrophorese in einer Coomassie-Lösung gefärbt. Dazu wurden die Gele in der Färbelösung durch Mikrowellen kurz erwärmt und 10 min bei RT geschüttelt, danach in Entfärbelösung solange gewaschen, bis der Hintergrund farblos erschien und anschließend getrocknet.

Coomassie-Färbelösung: 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
 40 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 40 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure

3.4.6 Transfer von Proteinen durch Elektroblothing

Durch Elektroblothing werden Proteine elektrophoretisch aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinyliden-difluorid(PVDF)-Trägermembran transferiert und dort fixiert. Der Membrantransfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen wurde in einer Transblot-Transfer-Cell durchgeführt (Towbin *et al.*, 1979). Die hydrophobe PVDF-Membran wurde zunächst 1 min in Methanol benetzt und anschließend in ddH₂O gewaschen. Die Transfermembran wurde danach für weitere 5 min im Transferpuffer inkubiert. Der Aufbau des „*Blotting-Sandwiches*“ war wie folgt:

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

Alle Komponenten des „*Blotting-Sandwiches*“ wurden vor dem Zusammenbau mit Transferpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte für 2 Std. bei 0,65 mA/cm² Gel.

Transferpuffer: 20 % (v/v) Methanol
 48 mM Tris/HCl pH 8.3
 39 mM Glycin
 0,037 % (w/v) SDS

3.4.7 N-terminale Sequenzierung nach *EDMAN*

Nach der Methode des *EDMAN*-Abbaus (Edman und Henschen, 1975) wird die N-terminale Aminosäure mit Phenylisothiocyanat umgesetzt und dabei als Phenylthiohydantoin-Derivat abgespalten. Nach einer HPLC-Auftrennung wird die Aminosäure durch Vergleich eines mitgetrennten Standard-Aminosäuregemisches identifiziert.

Die durch Elektroblothing (siehe 3.4.6) an PVDF Membranen fixierten Proteine wurden, wie unter 3.4.5 beschrieben, mit Coomassie Blue G-250 gefärbt und einer N-terminalen Sequenzanalyse zugeführt.

Zur Sequenzanalyse gereinigter rekombinanter Proteine wurden 60 bis 100 µg Protein in einem Gesamtvolumen von max. 100 µl auf eine mit 10 µl Methanol vorbehandelten ProSorb PVDF-Membran (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA) pipettiert und dort immobilisiert.

Die anschließende Sequenzierung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Mann am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried auf einem Applied Biosystems Sequenzierer 470A durchgeführt

3.4.8 Massenspektrometrie

Die relativen Molekularmassen der gereinigten Wildtyp Lumazin Synthase und Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* wurden an einem Triple-Quadrupol Ionenspray-Massenspektrometer API365 (Fa. SciEx, Thornhill, Ontario, Kanada) bestimmt. Eine Eichung der m/z-Skala wurde mit Ammonium-Addukten von Polypropylenglykol-Oligomeren durchgeführt. Aus den m/z-Peaks aller erzeugten Molekülonen mit multipler Ladung wurden die durchschnittlichen Molekularmassen ermittelt (Covey *et al.*, 1988), (Mann *et al.*, 1989). Die Spektren

wurden freundlicherweise von Frau Sylvia Koerner am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried erstellt und ausgewertet.

3.4.9 Dihydrofolatreduktase Aktivitätstest

Die Messung der Dihydrofolatreduktase Aktivität erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm über 2 min in einem Reaktionsvolumen von 1 ml. Dabei wird die Extinktionsabnahme durch die Umsetzung des Co-Substrates NADPH verfolgt. Da das Substrat Dihydrofolsäure (DHF) und das Co-Substrat bei der gewählten Wellenlänge ein gemeinsames Absorptionsmaximum zeigen, wird für die DHFR-Reaktion mit einem gemischten Molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 12300 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ gerechnet (Hillcoat *et al.*, 1967).

<u>Aktivitätspuffer:</u>	50 mM Tris/HCl pH 7.5
<u>Co-Substrat:</u>	600 μM (10fach) NADPH in 50 mM Tris/HCl pH 7.5
<u>Substrat:</u>	500 μM (10fach) DHF in 50 mM Tris/HCl pH 7.5
<u>Ansatz:</u>	800-x μl Aktivitätspuffer x μl (10–100 μg) DHFR Lösung 100 μl NADPH Lösung 100 μl DHF Lösung

3.4.10 Proteinpräparation

3.4.10.1 Rückfaltungsansätze der Dihydrofolatreduktasen Domäne aus Soja

Unlösliche, inaktive Protein Aggregate „*Inclusion Bodies*“ (IBs) werden häufig bei heterologer, cytoplasmatischer Expression rekombinanter Gene mit einem sehr hohen Expressionslevel in *E. coli* Zellen gebildet (Williams *et al.*, 1982). Diese IBs sind mit dem rekombinanten Zielprotein im starken Maße angereichert und können bis zu 30 % der gesamten Zellproteine betragen (Schein, 1989a). Analog zum faktoriellen *Screening* von Kristallisationsbedingungen von Proteinen, müssen auch die optimalen Pufferbedingungen durch eine Reihe an *in vitro* Rückfaltungsexperimenten ermittelt werden, in denen Parameter, wie Temperatur, pH, Ionenstärke oder Detergentien variiert werden.

Ein modifiziertes Protokoll nach Ruldoph (Ruldoph und Lilie, 1996) wurde angewandt, um die rekombinante N-terminale Dihydrofolatreduktasen Domäne (*glyDHFR*) (ca. 22 kDa) enzymatisch aktiv rückzufalten.

Die Proteinexpression der *glyDHFR*-Domäne erfolgte wie unter 3.2.5 beschrieben. Nach der Zellernte (30 min, Rotor JA 4.2, 4200 U/min, 4°C) wurde das Bakterienpellet in 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 300 mM NaCl Aufschlußpuffer resuspendiert (1/10 bezogen auf das Kulturvolumen) und nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym 30 min bei RT inkubiert. Für den anschließenden Zellaufschluß wurde der lysierte Zellextrakt für 15 min in einem Rosettengefäß mit Ultraschall behandelt (Sonifier, Stufe 8, 80–100 %, 0°C). Unlösliche Zellfragmente (u.a. IBs) wurden durch Zentrifugation abgetrennt (siehe 3.2.6). Die IBs wurden im Sonifikationspuffer mit 0,5 % (v/v) LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid, Fluka) homogenisiert und die Suspension erneut mit Ultraschall behandelt. Dieser Schritt der Homogenisierung und Zentrifugation wurde ein zweites Mal wiederholt. Abschließend wurden die IBs zweimal im Sonifikationspuffer ohne LDAO Zusatz gewaschen und durch Zentrifugation zurückgewonnen (30 min, JA 25.50, 20 000 U/min, 4°C). Die so gereinigten IBs wurden in 100 mM Tris/HCl pH 7.5 mit 6 M Guanidinium-HCl gelöst und mit einer Proteinkonzentration von ca. 20 mg/ml (OD_{280nm}) in verschiedene Rückfaltungsansätze eingesetzt, deren pH-Wert, Salzkonzentrationen und Arginin variiert wurden.

Rückfaltungsansätze: je 100 µl IB-Lösung in 10 ml Puffer X getropft

Renaturierungspuffer R: 3 M Harnstoff, 0,1 mM PMSF (in Isopropanol), 2 mM EDTA, 2 mM DTT

verschiedende pH-Werte:

Puffer 1: 50 mM Mes/Tris pH 5.0 + 150 mM NaCl + Puffer R

Puffer 2: 50 mM Mes/Tris pH 6.0 + 150 mM NaCl + Puffer R

Puffer 3: 50 mM Mes/Tris pH 6.5 + 150 mM NaCl + Puffer R

Puffer 4: 50 mM Mes/Tris pH 7.0 + 150 mM NaCl + Puffer R

Puffer 5: 50 mM Mes/Tris pH 7.5 + 150 mM NaCl + Puffer R

Puffer 6: 50 mM Mes/Tris pH 8.0 + 150 mM NaCl + Puffer R

Puffer 7: 50 mM Mes/Tris pH 8.5 + 150 mM NaCl + Puffer R

Puffer 8: 50 mM Mes/Tris pH 9.0 + 150 mM NaCl + Puffer R

unterschiedliche Salzkonzentrationen:

- Puffer 1: 50 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0 + Puffer R
- Puffer 2: 100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0 + Puffer R
- Puffer 3: 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0 + Puffer R
- Puffer 4: 200 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0 + Puffer R
- Puffer 5: 250 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0 + Puffer R
- Puffer 6: 300 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0 + Puffer R

variierende Argininkonzentrationen:

- Puffer 1: 0,5 M Arginin, 50 mM Tris/HCl pH 8.0 + Puffer R
- Puffer 2: 1,0 M Arginin, 50 mM Tris/HCl pH 8.0 + Puffer R
- Puffer 3: 1,5 M Arginin, 50 mM Tris/HCl pH 8.0 + Puffer R
- Puffer 4: 2,0 M Arginin, 50 mM Tris/HCl pH 8.0 + Puffer R

Alle Renaturierungsansätze wurden 3 Std. bei 37°C oder über Nacht bei 4°C gerührt und anschließend zentrifugiert (30 min, JA 25.50, 25000 U/min, 4°C). 500 µl der löslichen Fraktion wurden einer Proteinfällung (siehe 3.4.2) unterzogen und der Erfolg der Renaturierung wurde durch SDS-PAGE beurteilt.

3.4.10.2 Rekombinante bifunktionelle Dihydrofolatreduktase aus Soja

Die heterolog exprimierte Wildtyp Dihydrofolatreduktase (*glyDHFR-TS*) (siehe 3.2.5) wurde im ersten Schritt durch Affinitätschromatographie an einer Methotrexat(MTX)-Agarose Matrix gereinigt. Der Cytoplasmarextrakt aus 3.2.6 wurde dazu mit einer Flußrate von 1 ml/min (Peristaltikpumpe, Gilson) auf eine MTX-Agarosesäule ($V = 5$ ml) aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden mit dem Auftragspuffer 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM DTT herausgewaschen. Schwächer gebundene Proteine wurden anschließend mit 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM DTT, 500 mM NaCl abgelöst und die Säule nochmals mit dem Auftragspuffer gewaschen. Die Elution der gebundenen *glyDHFR-TS* erfolgte durch 25 ml substrathaltigem Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 2 mM DTT, 4 mM DHF). Die fraktionierten Proben wurden einer Proteinbestimmung (siehe 3.4.1) unterzogen und Aliquots auf einem 12 % igen SDS-Gel analysiert. Die vereinigten Proben der Eluatfraktionen wurden mit Centriprep Konzentratoren (MWcutoff 30 kDa) auf ca. 3 ml eingengt und mittels Gelpermeationschromatographie über Superdex 75 HiLoad 26/60 an einer FPLC-Anlage bei 25°C getrennt.

3.4.10.3 Rekombinante Dihydrofolatreduktase-Domäne aus *A. thaliana*

Die N-terminale Dihydrofolatreduktase-Domäne aus *Arabidopsis thaliana* (*atDHFR*) wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. A. Bacher, an der Technischen Universität München, Abteilung für Organische Chemie und Biochemie, in Garching kloniert, exprimiert und enzymatisch aktiv renaturiert. Die gereinigte *atDHFR* lag mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml in 50 mM KP_i pH 7,0, 250 mM KCl, 10 mM β -Mercaptoethanol vor und wurde mir freundlicherweise von Herrn Nicholas Schramek zur Verfügung gestellt.

3.4.10.4 Rekombinante chimäre Dihydrofolatreduktase aus *A. thaliana* und *Z. mays*

Die heterolog exprimierte, chimäre Dihydrofolatreduktase-Thymidylatsynthase aus *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* (*atzmDHFR-TS*) wurde durch Ionenaustauschchromatographie an einer FPLC-Anlage bei RT gereinigt. Die Cytoplasmafraktion wurde mit einer Flußrate von 2 ml/min auf eine Q-Sepharose FF Säule ($V = 92\text{ml}$) aufgetragen und mit dem Äquilierungspuffer 20 mM KP_i Puffer pH 7,0, 10 mM DTT gewaschen. Die Elution erfolgte mit 800 ml eines linearen Gradienten von 0 bis 1 M KCl in 20 mM KP_i Puffer pH 7,0, 10 mM DTT. Vereinigte Eluatfraktionen wurden nachfolgend auf eine mit 20 mM KP_i pH 7,0, 10 mM DTT äquilibrierte Red-Sepharose-Cl6B ($V = 13\text{ml}$) aufgetragen. Die anschließende Elution erfolgte in einem Gradienten von 0–2 M KCl ebenfalls in 20 mM KP_i pH 7,0, 10 mM DTT. Fraktionen der Red-Sepharose Reinigung wurden mit Konzentratoren (MWcutoff 30 kDa) eingengt und auf eine Superdex 200 26/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Dazu wurde ein 20 mM KP_i pH 7,0, 10 mM DTT, 100 mM KCl Laufpuffer verwendet. Vereinigte Proben aus der Gelfiltrationsreinigung wurden auf 10 mg/ml Proteinkonzentration eingengt und bei 4°C gelagert.

3.4.10.5 Wildtyp 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase aus *S. pombe*

Rekombinante Wildtyp Lumazin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* (*sspLS*) wurde an der Technischen Universität München, Abteilung für Organische Chemie und Biochemie, Prof. Dr. Dr. A. Bacher, in Garching gemäß (Fischer *et al.*, 2001).

exprimiert und gereinigt. Die Lumazin Synthase lag mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml in 20 mM KP_i pH 7.0, 100 mM KCl vor und wurde mir freundlicherweise von Frau Ilka Haase zur Verfügung gestellt.

3.4.10.6 W27G Mutante der Lumazin Synthase aus *S. pombe*

Die Mutante W27G der Lumazin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* wurde ebenfalls an der Technischen Universität München, Abteilung für Organische Chemie und Biochemie, Prof. Dr. Dr. A. Bacher, in Garching kloniert, exprimiert und gereinigt (Fischer *et al.*, 2001). Die Mutante lag mit einer Konzentration von 10 mg/ml in 100 mM KP_i pH 7.2 vor und wurde mir freundlicherweise von Frau Ilka Haase zur Verfügung gestellt.

3.4.10.7 Wildtyp Riboflavin Synthase aus *S. pombe*

Die Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* (*sspRS*) wurde auch an der Technischen Universität München, Abteilung für Organische Chemie und Biochemie, Prof. Dr. Dr. A. Bacher, in Garching kloniert, exprimiert und gereinigt. Das Enzym lag mit einer Konzentration von 9 mg/ml in 20 mM Tris/HCl pH 7.0, 100 mM KCl vor und wurde mir freundlicherweise von Frau Ann-Kathrin Schott zur Verfügung gestellt.

3.4.10.8 Rekombinante Transketolase aus *Zea mays*

N-terminal verkürzte Transketolase aus *Zea mays* (*zmTK*) wurde in der Abteilung Molekulare Wirkstoffforschung im Landwirtschaftszentrum der BayerAG in Monheim und an der Technischen Universität München, Abteilung für Organische Chemie und Biochemie, Prof. Dr. Dr. A. Bacher, in Garching kloniert, exprimiert und gereinigt. Kristalle und gereinigtes Protein wurden mir freundlicherweise von Frau Stefanie Echt zur Verfügung gestellt.

3.4.11 Sequenzvergleich

Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen BESTFIT und PILEUP (Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GCG, 1998), Madison, USA) durchgeführt.

3.5 Kristallographische Methoden

3.5.1 Kristallisation

Die Kristallisationsansätze erfolgten nach der Dampfdiffusionsmethode (McPherson, 1990) im sitzenden Tropfen „*sitting drop*“ in CrysChem Platten (Charles Supper Company) oder in luftdicht verschlossenen Polystyrol Dosen von 3 cm Höhe und 7,5 cm Durchmesser auf 1,5 cm hohen Kunststoffbänkchen. Die CrysChem Platten wurden mit transparenter Klebefolie (CrystalClear, MancoInc., Avon, USA) verschlossen. Der Kristallisationsverlauf wurde über mehrere Monate bei 20°C verfolgt.

Für das *Screening* einer großen Anzahl von Kristallisationsbedingungen wurde das Prinzip des *sparse matrix sampling* angewandt (Carter und Carter, 1979; Jancarik und Kim, 1991). Dabei wurden jeweils 2 µl (10 mg/ml) Proteinlösung mit 2 µl des Kristallisationspuffers vermischt und gegen 300 µl Reservoirlösung äquilibriert. In weiteren Versuchen kamen verschiedene Präzipitanzen (u.a. PEG verschiedener Molekulargewichte, MPD, Ammoniumsulfat, NaCl, Natriumcitrat) variiert gegen verschiedene pH-Werte, sowie unterschiedliche Additive (Hampton Research, USA) zum Einsatz.

3.5.2 Datensammlung und Datenreduktion

Zur Messung von Röntgendiffraktionsdaten wurden Kristalle von rekombinanter Wildtyp **Lumazin Synthase** aus *S. pombe* im natürlichen Komplex mit **Riboflavin** und im Komplex mit den Inhibitoren **5-Nitro-6-(D-ribitylamino)-2,4(1H,3H)-pyrimidindion** und **6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin**, sowie Kristalle der **Mutante W27G**, der rekombinanten **Transketolase** aus *Z. mays* und Co-Kristalle der **Riboflavin Synthase** aus *S. pombe* in silanisierte Quarzkapillaren (1,0 mm Ø, Mark-Röhrchen für röntgenographische Aufnahmen, W. Müller, Berlin) montiert. Beide Seiten der Kapillare wurden anschließend mit etwas Reservoirlösung gefüllt und mit Dentalwachs (Richter&Hoffmann Harvard Dental GmbH) verschlossen. Die Kapillaren wurden auf einem Goniometerkopf fixiert und die verschiedenen Datensätze als Serie von Rotationsaufnahmen mit einem Drehwinkel von $\Delta\phi = 1^\circ$ auf einer

Drehanode bei RT (50 kV, 100 mA) gesammelt. Die Messungen erfolgten mit Graphit monochromatisierter CuK α -Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ auf einer MAR345 *Image Plate*.

Die Bestimmung der Elementarzellparameter, der Raumgruppe und der Kristallorientierung, sowie die Integration der Reflexintensitäten erfolgte mit MOSFLM, v6.01 (Leslie, 1998). Eine anschließende Datenreduktion wurde mit den Programmen SCALA und TRUNCATE durchgeführt (CCP4, 1994).

Der Datensatz der **Mutante W27G** der Lumazin Synthase und der MAD-Datensatz der **Riboflavin Synthase** wurden an der *Beamline* BW6 (Wiggler-Beamline mit Toroidspiegel am Deutschen Elektronen Synchrotron DESY, Hamburg) aufgenommen. Dazu wurde Synchrotronstrahlung im Bereich von 0,949 bis 1,05 \AA verwendet. Die Datensätze wurden mit dem HKL-Programmpaket (Otwinowski und Minor, 1997) ausgewertet.

Zur Messung von Cryo-Daten wurden Kristalle in Schlaufen aus Nylon (Hampton Research) aufgenommen, in Cryopuffer transferiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.5.3 Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung

Die Kristallstrukturen der Lumazin Synthase und der Transketolase wurden durch *PATTERSON*-Suchmethoden „**Molecular Replacement**“ (Hoppe, 1957b; Huber, 1965; Rossmann und Blow, 1962) gelöst. Die Berechnungen wurden mit dem Programm MOLREP des CCP4 Programmpaketes (CCP4, 1994) durchgeführt.

Als Suchmodell der Lumazin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* diente ein konstruiertes Pentamer aus den Koordinaten der ikosahedrischen *Bacillus subtilis* Lumazin Synthase Struktur (Ritsert *et al.*, 1995) (PDB Eintrag 1RVV).

Die Röntgenstruktur der Transketolase aus *Zea mays* konnte mit den Koordinaten der *Saccharomyces cerevisiae* Transketolase (Nilsson *et al.*, 1997) (PDB Eintrag 1NGS) bestimmt werden.

Die MAD-Daten des Hg-Schweratomderivates eines *Schizosaccharomyces pombe* Riboflavin Synthase Kristalles wurden mit dem HKL-Programm (Otwinowski und

Minor, 1997) ausgewertet. Identifizierung und Verfeinerung der Schweratompositionen von anomalen *PATTERSON-FOURIER*-Synthesen oder Differenz-*PATTERSON*-Funktionen wurden mit den Programmen RSPS und MLPHARE (CCP4, 1994) vorgenommen. Die experimentelle Elektronendichte wurde mit MLPHARE berechnet.

Atomare Proteinmodelle wurden auf einer SILICON GRAPICS *work station* mit dem Programm MAIN (Turk, 1996) in die Elektronendichte eingepaßt. Diese Atommodelle wurden mit CNS (Brünger *et al.*, 1998) verfeinert. Als Zielfunktion wurde der kristallographische *R*-Faktor minimiert, wobei geometrische Parameter (Engh und Huber, 1991) berücksichtigt wurden, da die Zahl der Observablen im Verhältnis zur Anzahl der verfeinerten Parameter in der Proteinkristallographie im allgemeinen nicht ausreichend überbestimmt ist. Das Gewichtsverhältnis zwischen kristallographischem und geometrischem Term wurde dabei zu Beginn der Verfeinerung bestimmt und mit fortschreitender Qualität des Modelles schrittweise erhöht. Um ein objektives Kriterium für den Erfolg der Verfeinerungsrechnungen zu haben, wurden 5 % bzw. 10 % der Reflexe zufällig ausgewählt und als *TESTset* nicht in die Verfeinerung einbezogen (Brünger, 1992). Der so berechnete **freie R-Faktor**, im Regelfall ca. 5 % höher als der kristallographische **Arbeits-R-Faktor**, warnt dabei vor einer Überanpassung des Atommodelles an die Daten. Positionelle Verfeinerung und *simulated-annealing* (SA) alternierten mit visueller Inspektion der Elektronendichte und manuellem Einpassen bis zu einem Absinken des *R*-Faktors auf 30 %. Danach wurden Wassermoleküle automatisiert mit CNS eingebaut. Im Anschluss an die Koordinatenverfeinerung wurden individuelle Temperaturfaktoren verfeinert. Dabei wurden Einschränkungen auferlegt für direkt verknüpfte Atome und für über einen Winkel verknüpfte Atome, jeweils für Haupt- und Seitenketten. Die Zielwerte der Standardabweichungen betragen dabei $1,5\sigma$ (Hauptkette) und $2,0\sigma$ (Seitenkette) für benachbarte Atome und $2,0\sigma$ (Hauptkette) und $2,5\sigma$ (Seitenkette) für über Winkel verknüpfte Atome.

Bei Vorliegen von nicht-kristallographischer Symmetrie (*NCS*) wurden Einschränkungen der Positionen und Temperaturfaktoren für lokal symmetrieäquivalente Atome berücksichtigt.

3.5.4 Analyse von Atommodellen

Die Molekülgeometrien wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) analysiert. Überlagerungen und *least-square-fits* von Koordinaten wurden mit TOP3D (CCP4, 1994) durchgeführt. Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Programm STRIDE (Frishman und Argos, 1995) zugeordnet.

3.5.5 Inhibitormodelle

Das Inhibitormodell der Verbindung 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (CEOL) wurde mit dem Programm SYBYL Version 6.4 (Tripos Inc., St. Louis, USA 1997) generiert und energetisch minimiert.

3.5.6 Graphische Darstellungen

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme BOBSCRIPT (Esnouf, 1997), MOLSCRIPT (Kraulis, 1993), Raster3D (Merritt und Murphy, 1994) und Swiss-PdbViewer (<http://www.expasy.ch/spdv>) benutzt. Oberflächen wurden mit den Programmen GRASP (Nicholls *et al.*, 1993) und WebLabViewerPro (Molecular Simulations Inc., 1999) berechnet und dargestellt.

Zur Darstellung von Sequenzvergleichen wurde das Programm ALSCRIPT (Barton, 1993) angewandt.

Zur Nachbearbeitung von Bildern, sowie zu deren Konvertierung kamen die Programme PHOTOSHOP (Adobe Systems Inc., USA), XV (J. Bradley, Pennsylvania, USA) ILLUSTRATOR (Adobe Systems Inc., USA) und CorelDRAW (Corel Corporation Limited, 1998) zur Anwendung.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen an pflanzlicher Dihydrofolatreduktase

4.1.1 Expression und Reinigung der nativen *glyDHFR-TS*

Zu Beginn dieser Arbeit wurde versucht, die native bifunktionelle Dihydrofolatreduktase aus Soja (*glyDHFR-TS*), bestehend aus 530 Aminosäuren, in *E. coli* zu exprimieren und durch Affinitätschromatographie zu isolieren. Die Überexpression der *glyDHFR-TS* erfolgte, wie in 3.2.5 beschrieben, mit den Transformanten BL21(DE3)pET3a/*glyDHFR-TS* im Schüttelkolben bei 25°C. Dabei konnte der Anteil an löslich exprimierter *glyDHFR-TS* im Rahmen dieser Arbeit durch direkte Überführung der Transformationsansätze in die Expressionskulturen gesteigert werden.

Die spezifische Aktivität der löslichen *glyDHFR-TS* im Cytoplasmarextrakt lag

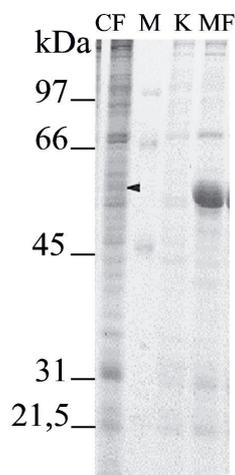


Abbildung 4.1 SDS-PAGE Analyse der Expression löslicher *glyDHFR-TS*. Die Bande der *glyDHFR-TS* bei 59 kDa ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

CF Cytoplasmarextrakt
 K BL21(DE3)pET3a
 MF Membranfraktion
 M Molekulargrößenstandard

bei herkömmlichen Proteinpräparationen unter Verwendung einer Vorkultur bei ca. 50–80 nmol/mg Gesamtprotein pro min. Durch direkte Überführung der Transformationsansätze aus 3.2.3 in 10 x 1 Liter Expressionskulturen konnten spezifische Aktivitäten der *glyDHFR-TS* im Rohextrakt von bis zu 250 nmol/mg Gesamtprotein pro min gemessen werden. Der Anteil an löslicher *glyDHFR-TS* konnte aus dem Cytoplasmarextrakt (CF) (ca. 10 mg/ml) über Affinitätschromatographie an MTX-Agarose gemäß 3.4.10.2 isoliert werden.

In Abbildung 4.2 ist exemplarisch die Isolierung der rekombinanten *glyDHFR*-TS

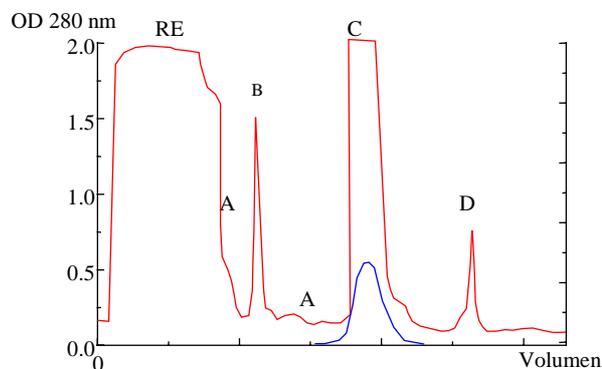


Abbildung 4.2 Elutionsprofil der *glyDHFR*-TS an einer MTX-Agarosesäule

über MTX-Agarose gezeigt. 200 ml Rohextrakt (ca. 10 mg/ml Gesamtproteingehalt) wurden mit einer Flußrate von 1 ml/min auf die MTX-Agarosesäule aufgetragen (RE) und nicht gebundene Proteine mit 100 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM DTT herausgewaschen (A). Schwach gebundene Proteine wurden nachfolgend mit 100 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM DTT und 500 mM NaCl entfernt (B) und die Säule erneut mit dem Auftragspuffer gewaschen (A). Die Elution der gebundenen *glyDHFR*-TS erfolgte in 25 ml 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM DTT mit 4 mM DHF (C). Um stark gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule abschließend mit 100 ml 1 M NaCl (D) gewaschen. Die

blaue Kurve zeigt den Verlauf der enzymatischen *glyDHFR*-TS Aktivität in den Eluatfraktionen (C). Diese lag im Mittel bei ca. 5,0 $\mu\text{mol/mg}$ Protein pro min. Die Ausbeute an MTX-Agarose gereinigter *glyDHFR*-TS betrug ca. 31 mg. Die vereinigten Eluatfraktionen ($V = 33$ ml) der MTX-Reinigung wurden auf ein Volumen von 3 ml eingengt und die *glyDHFR*-TS in einem weiteren Reinigungsschritt an einer Gelfiltrationssäule (Superdex 75 HiLoad 26/60), wie in 3.4.10.2 beschrieben, zur Homogenität isoliert (siehe Abbildung 4.3). Die Flußrate betrug 2 ml/min.

Die *glyDHFR*-TS konnte in mehreren Reinigungsexperimenten reproduzierbar bei einem Retentionsvolumen von 122 ml eluiert werden, was auf ein Molekulargewicht von etwa 120 kDa hinwies. Damit liegt die *glyDHFR*-TS in Lösung als Dimer vor.

Diese Daten konnten durch dynamische Lichtstreuungs-Experimente bestätigt werden.

Die Ausbeute an gereinigter *gly*DHFR-TS nach der Gelfiltration betrug ca. 10 mg.

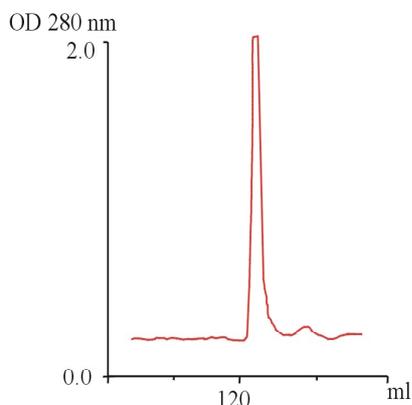


Abbildung 4.3 Elutionsprofil der *gly*DHFR-TS an einer Superdex 75 26/60 Gelfiltrationssäule

Die Reinheit und Homogenität der Präparation wurde auf einem SDS-Polyacrylamidgel kontrolliert (siehe Abbildung 4.4). Zur weiteren Charakterisierung wurde die gereinigte *gly*DHFR-TS auf einer PVDF-Membran immobilisiert und einer N-terminalen Sequenzanalyse zugeführt. Der Sequenzvergleich zeigte, daß das Start-Methionin posttranslational abgespalten wurde und die nachfolgenden 9 N-terminalen Aminosäuren identifizierten das gereinigte Protein eindeutig als *gly*DHFR-TS.

Die Abbildung 4.4 zeigt die hohe Reinheit der *gly*DHFR-TS mit der korrekten

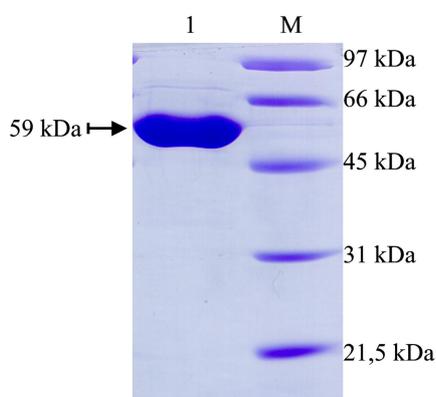


Abbildung 4.4 SDS-PAGE der Gelfiltration über Superdex 75 26/60
1 gereinigte *gly*DHFR-TS
M Molekulargrößenstandard

molekularen Masse von 59 kDa. Die *gly*DHFR-TS wurde mit einer Konzentration von 10 mg/ml in erste Kristallisationsexperimente eingesetzt. Jedoch erwies sich das Protein in einer großen Anzahl von *Screening*-Experimenten sowohl bei 20°C als auch bei 4°C als sehr instabil und präzipitierte schon nach einem Tag in nahezu allen Ansätzen sehr stark. Ein erster Kristall wuchs aus sehr viel Präzipitat mit 70 % MPD, 0,1 M HEPES pH 7.5 nach 2

Monaten bei 20°C. In einem ersten Röntgenbeugungsexperiment zeigte dieser ein für Proteinkristalle typisches Diffraktionsmuster, jedoch nur bis zu einer unzureichenden Auflösung von 12 Å.

Diese Kristallisationsbedingung war in weiteren Experimenten nicht optimierbar, so daß keine neuen Kristalle der nativen *gly*DHFR-TS erhalten wurden. Somit mußten

neue Strategien entwickelt werden, um kristallisierbares Material der pflanzlichen Dihydrofolatreduktase zu erhalten.

4.1.2 Klonierung, Mutagenese und Expression der *glyDHFR*-Domäne

Sequenzvergleiche zu der bereits bekannten Kristallstruktur der Dihydrofolatreduktase aus *E. coli* (*ecDHFR*) (PDB Eintrag 1RX9, (Sawaya und Kraut, 1997)) führten zu neuen Klonierungsstrategien.

Das Ergebnis einer sequenzbasierten Sekundärstrukturvorhersage (Rost, 1996; Rost und Sander, 1993; Rost und Sander, 1994) der 208 Aminosäuren der *glyDHFR*-Domäne stimmte mit den gefundenen Sekundärstrukturelementen in der aus 159 Aminosäuren bestehenden *ecDHFR* Struktur hervorragend überein (siehe Abbildung 4.5 unten).

Die N-terminalen 32 AS der *glyDHFR* konnten durch ein konserviertes Motiv ([V/I]-X-[A/C]↓A) als Signal-Peptidsequenz für den Transport des Proteins in die Chloroplasten identifiziert werden (Endo *et al.*, 1994; Gavel und Heijne, 1990).

Aus den Erkenntnissen des Strukturvergleiches und der Signal-Peptidsequenz der *glyDHFR* wurden die Oligonukleotide *DRNde1*, *DRNde2* und *DRBam* konzipiert, die die Gene für die gewünschten DHFR-Konstrukte mit den Schnittstellen *NdeI/BamHI* in einer PCR-Reaktion amplifizierten (3.3.2.5). Die aus einem Agarosegel gereinigten DHFR-Gene wurden in einem Restriktionsansatz (3.3.2.1) mit den entsprechenden Restriktasen geschnitten und in den Expressionsvektor pET3a (*NdeI/BamHI* geschnitten, dephosphoryliert) ligiert. Die Vektorkonstrukte pET3a/DHFR1 und pET3a/DHFR2 wurden in BL21(DE3)-Zellen transformiert. Die Transformanten wurden auf LB-Carb.-Platten vereinzelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ausgehend von einer 5 ml Übernachtskultur wurde die Plasmid-DNA beider Konstrukte isoliert und die insertierte Sequenz mit dem T7-Sequenzierprimer auf ihre Richtigkeit überprüft.

Die Überexpression an rekombinantem Protein erfolgte wie unter 3.2.5 beschrieben.

Parallel wurde eine weitere Möglichkeit der Löslichkeitssteigerung der DHFR-Domäne untersucht. Grundlage dazu waren die Arbeiten von Dale *et al.* an der

DHFR aus *Staphylococcus aureus* (Dale *et al.*, 1994). Durch gezielte Mutationen einzelner Aminosäuren an der Oberfläche des Proteins wurde eine Löslichkeitssteigerung erreicht, die eine Kristallisation der *aur*DHFR ermöglichten.

Die Mutagenesereaktionen wurden, wie in 3.3.2.4 beschrieben, mit den Mutageneseprimern (siehe 3.1.4.4) an pET3a/DHFR1 Plasmid-DNA durchgeführt. Die durch die Blau-Weiß Selektion ermittelte Mutageneseeffizienz betrug 99 %. Zur Überprüfung der erfolgreichen Aminosäureaustausche wurde eine DNA-Sequenzanalyse der erhaltenen Klone durchgeführt. Die Plasmid-DNA aus den Mutageneseansätzen wurde anschließend in den Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert und die rekombinanten Proteine, wie unter 3.2.5 beschrieben, überexprimiert.

Folgende Klone wurden auf ihre Überexpression modifizierter *gly*DHFR getestet:

BL21(DE3)pET3a/DHFR1
BL21(DE3)pET3a/DHFR2
BL21(DE3)pET3a/DR1E (S143E)
BL21(DE3)pET3a/DR1D (P152D)
BL21(DE3)pET3a/DR1EE (S143E; R159E)
BL21(DE3)pET3a/DR1DD (P152D; T156D)
BL21(DE3)pET3a/DR1EDD (P152D; T156D; S143E)
BL21(DE3)pET3a/DR1EED (S143E; R159E; P152D)
BL21(DE3)pET3a/DR1EEDD (S143E; R159E; P152D; T156D)

In Abbildung 4.5 sind die Aminosäuresequenzen dieser exprimierten DHFR-Konstrukte gezeigt.

Das Konstrukt 1 weist mit einer Gesamtlänge von 183 Aminosäuren einen N-Terminus ähnlich zur *ec*DHFR-Sequenz auf. Das Konstrukt 2 ist um weitere 9 N-terminale Aminosäuren nach der Spaltstelle der Signal-Peptidsequenz auf insgesamt 174 Aminosäuren verkürzt.

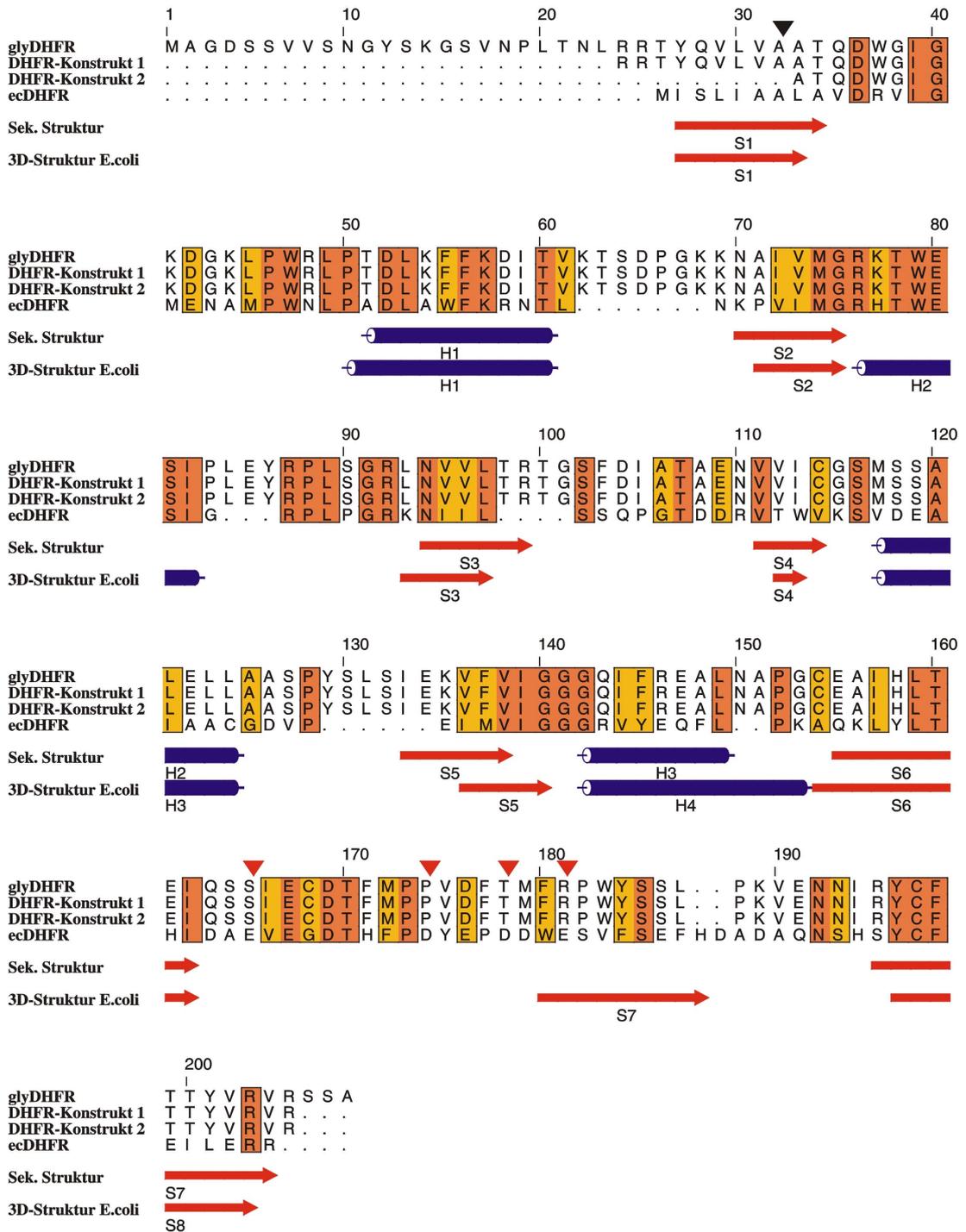


Abbildung 4.5 Sequenzvergleich der N-terminalen *glyDHFR*-Domäne und der klonierten Konstrukte 1 und 2 mit der *ecDHFR*. Identische Reste sind orange und konservierte Reste gelb gefärbt. Die Spaltstelle der Chloroplasten Signal-Peptidsequenz ist mit einem Dreieck (schwarz) gezeigt. Aminosäureaustausche durch Mutagenese sind mit einem roten Dreieck markiert. Bereiche von Faltblattstrukturen (rot) und Helices (blau) stimmen in beiden Proteinen überein. Die Numerierung bezieht sich auf die Sequenz der nativen *glyDHFR*-Domäne.

Alle Klone exprimierten, wie in Abbildung 4.6 gezeigt, die gewünschten Proteine der erwarteten molekularen Masse von 21 kDa, jedoch immer in Form von unlöslichen *Inclusion Bodies*.

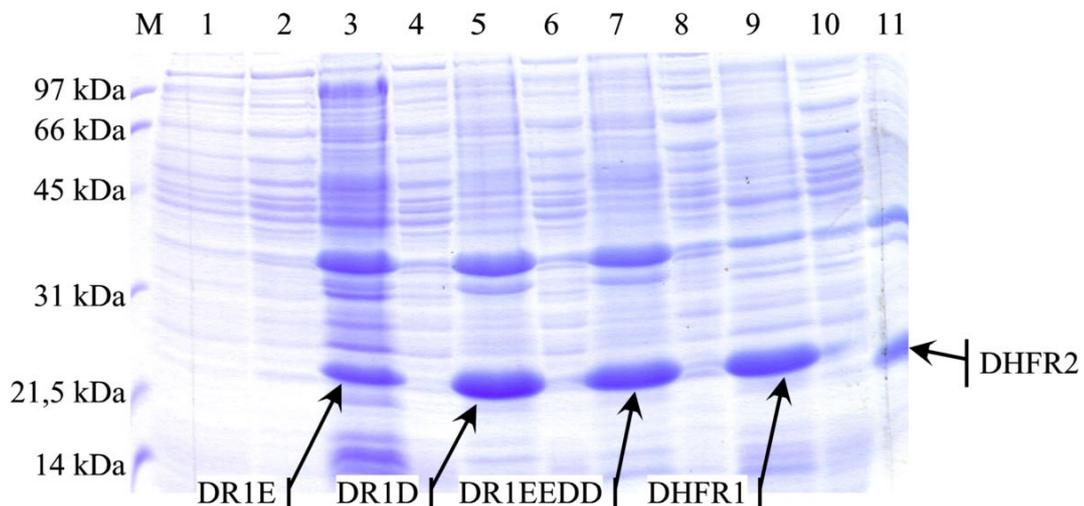


Abbildung 4.6 SDS-PAGE Analyse ausgewählter Konstrukte und Mutanten der N-terminalen *gly*DHFR-Domäne.

M Molekularer Größenstandard

1 Cytoplasmafraktion	BL21(DE3)pET3a (Kontrolle)
2 Cytoplasmafraktion	BL21(DE3)pET3a/DR1E
3 Membranfraktion	BL21(DE3)pET3a/DR1E
4 Cytoplasmafraktion	BL21(DE3)pET3a/DR1D
5 Membranfraktion	BL21(DE3)pET3a/DR1D
6 Cytoplasmafraktion	BL21(DE3)pET3a/DR1EEDD
7 Membranfraktion	BL21(DE3)pET3a/DR1EEDD
8 Cytoplasmafraktion	BL21(DE3)pET3a/DHFR1
9 Membranfraktion	BL21(DE3)pET3a/DHFR1
10 Cytoplasmafraktion	BL21(DE3)pET3a/DHFR2
11 Membranfraktion	BL21(DE3)pET3a/DHFR2

Die obige Abbildung 4.6 zeigt die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine der Konstrukte DHFR1 und DHFR2 der N-terminalen *gly*DHFR-Domäne, sowie der Mutanten DR1E, DR1D und DR1EEDD. Die spezifischen Enzymaktivitäten, bezogen auf den Gesamtproteingehalt der jeweiligen Cytoplasmafraktionen, lagen nicht signifikant über der Aktivität des jeweiligen Kontrollstammes BL21(DE3)pET3a ohne rekombinante DHFR.

Das zusätzlich bei etwa 37 kDa exprimierte Protein wurde in Sequenzanalysen als OmpA Protein aus *E. coli* identifiziert.

4.1.3 Versuche zur Rekonstitution der *gly*DHFR-Domäne

Erfolgreiche Renaturierungsversuche an monofunktionaler DHFR aus verschiedenen Organismen (Champness *et al.*, 1994; Delves *et al.*, 1993; Frieden, 1990; Hoeltzli und Frieden, 1998) wurden zum Anlass genommen, um die N-terminale *gly*DHFR-Domäne aus dem Konstrukt pET3a/DHFR1 in BL21(DE3) gezielt als *Inclusion Bodies* zu exprimieren. Die Expression und die anschließende Reinigung der IBs erfolgte wie unter 3.4.10.1 beschrieben. Alle Rückfaltungsansätze wurden über Nacht gegen 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM DTT dialysiert und der lösliche Überstand durch Zentrifugation (30 min, JA 25.50, 25000 U/min, 4°C) abgetrennt. Die Proteine des unlöslichen Pellets wurden in 8 M Harnstoff Puffer gelöst und zusammen mit Proteinen der löslichen Fraktion zur Beurteilung der Renaturierungseffizienz auf einem 12 % igen SDS-Gel getrennt.

In Abbildung 4.7 ist das Ergebnis der Renaturierung der N-terminalen *gly*DHFR-

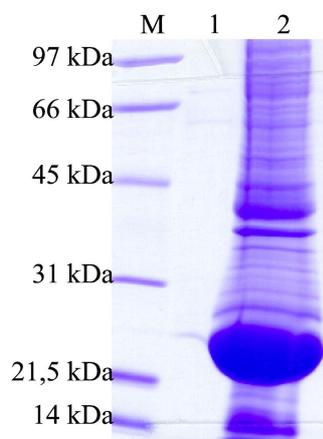


Abbildung 4.7 SDS-PAGE Analyse eines Renaturierungsansatzes der DHFR-Domäne aus Soja

M Molekulargewichtsstandard
1 Überstand nach Dialyse
2 Pellet nach Dialyse

Domäne aus dem Ansatz 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM Arginin, 2 mM DTT abgebildet.

In Spur 1 wurde ein Aliquot des löslichen Überstandes aufgetragen. Spur 2 zeigt die unlöslichen Proteine nach Dialyse und Zentrifugation. In allen weiteren Renaturierungsansätzen mit unterschiedlicher Pufferzusammensetzung konnte keine enzymatische

Aktivität der N-terminalen DHFR-Domäne im Überstand rekonstituiert werden. In vielen Ansätzen trat nach Zugabe der IB-Lösung eine sofortige Trübung ein, was eine irreversible Präzipitation des Proteins anzeigt. Somit

führten eine große Anzahl an Rückfaltungsexperimenten nicht zum gewünschten Erhalt an kristallisierbarem Material.

4.1.4 Isolierung und Klonierung des *zmDHFR-TS* Gens aus *Zea mays*

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde versucht, durch einen Wechsel des Organismus das notwendige lösliche Material zu erhalten. Dazu wurden die Gene für die bifunktionelle Dihydrofolatreduktase aus Mais (*zmDHFR-TS*) und der Thymidylatsynthase (*zmTS*) in einer modifizierten PCR-Reaktion mit genspezifischen Oligonukleotiden (3.1.4.4) aus einer Mais cDNA amplifiziert.

Abbildung 4.8 zeigt in den Spuren 1 und 2 die isolierten Gene der *zmTS* und der

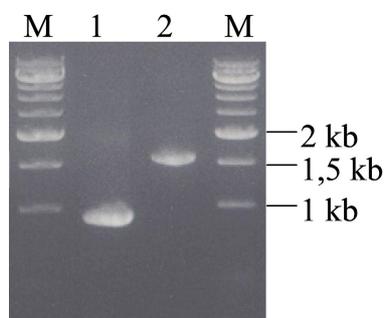


Abbildung 4.8 1% iges Agarosegel der *zmDHFR-TS* und *zmTS* PCR-Produkte

M 500 bp Marker
1 *zmTS*-Gen (919 bp)
2 *zmDHFR-TS* Gen (1566 bp)

zmDHFR-TS mit der erwarteten Größe von 981 bp bzw. 1,6 kb. Die amplifizierte DNA

wurde aus dem Agarosegel eluiert und in den „blunt end“ Klonierungsvektor ligiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in

elektrokompetente *E. coli* DH5 α transformiert und die Ansätze auf LB/X-Gal.-Platten

vereinzelt. Positive Klone konnten über eine Blau/Weiß-Selektion identifiziert werden und

deren Plasmid-DNA wurde aus 5 ml Über-

nachtkulturen isoliert. Eine weiterführende

Charakterisierung positiver Klone erfolgte durch ein erwartetes Fragmentierungsmuster durch *NotI/BamHI* und *KpnI/SacI* Restriktionsansätze (3.3.2.1).

4.1.5 Expression von rekombinanter *zmDHFR-TS* und *zmTS*

Zur nachfolgenden Genexpression wurden die Fragmente der *zmDHFR-TS* und der *zmTS* durch PCR, wie unter 3.3.2.5 beschrieben, mit den Erkennungssequenzen für die Endonucleasen *EcoRI* und *HindIII* versehen und im weiteren Verlauf in den Expressionsvektor pNCO113 kloniert. Die Überexpression beider Proteine erfolgte gemäß 3.2.5. in 1 Liter Expressionskulturen. Eine SDS-PAGE Analyse zeigte, daß die aus 521 Aminosäuren bestehende bifunktionelle *zmDHFR-TS* nur ein mäßiges Expressionsniveau hatte und zudem in unlöslichen *Inclusion Bodies* vorlag.

Ein Enzymtest ergab keine erhöhten spezifischen Enzymaktivitäten, bezogen auf den Gesamtproteingehalt der *zmDHFR*-TS in der Cytoplasmafraktion im Vergleich zu der Aktivität der *glyDHFR*-TS.

Die C-terminale *zmTS* Domäne (304 Aminosäuren) dagegen exprimierte vollständig in löslicher Form in sehr gutem Ausmaße.

4.1.6 Versuche zur Kristallisation der *atDHFR* aus *A. thaliana*

Im weiteren Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, eine andere pflanzliche DHFR zu kristallisieren (siehe 3.4.10.3). Die renaturierte *atDHFR*-Domäne lag mit einer niedrigen Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml vor und fiel quantitativ bei einer weiteren Aufkonzentrierung aus. Die *atDHFR* erwies sich auch bei dieser niedrigen Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml in einer großen Anzahl von *Screening*-Experimenten, sowohl bei 20°C als auch bei 4°C, als nicht stabil und präzipitierte sofort in allen Ansätzen irreversibel. Somit entzog sich das Protein einer möglichen Röntgenstrukturanalyse.

4.1.7 Klonierung einer chimären *atzmDHFR*-TS

Dennoch konnten aus den oben gewonnenen Ergebnissen neue Klonierungsstrategien ermittelt werden. Dazu zeigt Tabelle 4.1 die Löslichkeit, Kristallisierbarkeit und das Expressionsniveau der rekombinanten Proteine aller untersuchten Konstrukte im Vergleich zur nativen *glyDHFR*-TS.

	Expression	Löslichkeit	Kristallisation	Aktivität
<i>glyDHFR</i> -TS	sehr gut	mäßig	schlecht	MTX hemmbar
DHFR 1	gut	schlecht	nicht bestimmt	nicht bestimmt
DHFR 2	gut	schlecht	nicht bestimmt	nicht bestimmt
DHFR Mut.	gut	schlecht	nicht bestimmt	nicht bestimmt
<i>atDHFR</i>	sehr gut	schlecht	instabil	MTX hemmbar
<i>zmDHFR</i> -TS	mäßig	mäßig	nicht bestimmt	nicht bestimmt
<i>zmTS</i>	sehr gut	sehr gut	nicht bestimmt	nicht bestimmt

Tabelle 4.1 Übersicht über das Expressionsniveau, die Löslichkeit und die Kristallisierbarkeit der rekombinanten Proteine aller untersuchten Konstrukte pflanzlicher Dihydrofolatreduktasen.

Bei allen Versuchen zur Löslichkeitssteigerung durch Klonierung und Mutagenese der *glyDHFR* Domäne (DHFR1, DHFR2 und DHFR Mut) (siehe auch 4.1.2) konnte,

aufgrund der Unlöslichkeit der Proteine keine Aktivität bestimmt werden. Auch waren diese Proteine dadurch nicht in Kristallisationsexperimenten einsetzbar.

Die *atDHFR*-Domäne exprimierte mit einem hohen Expressionsniveau in M15 Zellen, jedoch lag das Protein ebenfalls in unlöslicher Form in den Zellen vor. Die enzymatische Aktivität der *atDHFR* wurde durch Renaturierung rekonstituiert (siehe 3.4.10.3).

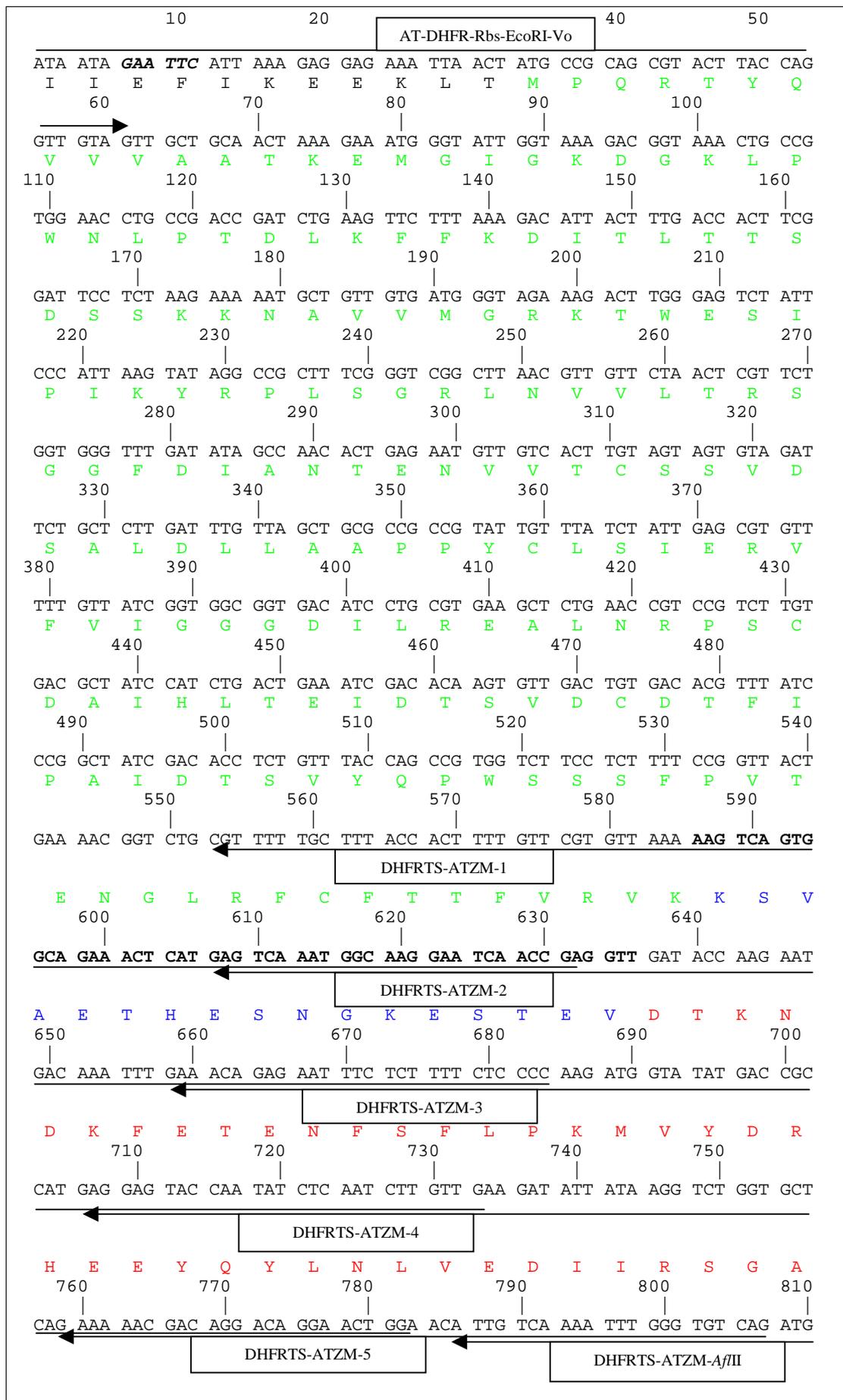
Einzig die *zmTS* exprimierte sehr gut löslich in einer hohen Ausbeute in M15 Zellen (siehe Tabelle 4.1).

Die sehr gute Löslichkeit der *zmTS*-Domäne sollte in nachfolgenden Experimenten genutzt werden, um ein C-terminales Fusionsprotein zu konstruieren, dessen Gesamtlöslichkeit in der *E. coli* Expression verbessert ist. Als N-terminaler Fusionspartner diene die *atDHFR*-Domäne, die sich durch ein hohes Expressionsniveau auszeichnet.

Die Oligonukleotide (siehe 3.1.4.4) für eine modifizierte PCR wurden so definiert, daß das bifunktionelle Gen der *atzmDHFR-TS* mit einer Länge von 1530 bp nachfolgend in den Expressionsvektor pNCO113 über *EcoRI/HindIII* Schnittstellen ligiert werden konnte.

In einer fünfstufigen PCR diene das Gen der *atDHFR* Domäne als *Template*, in der durch jeden Primer (DHFRTS-ATZM-1 bis 5) die DNA-Sequenz des *zmTS*-Gens an die *Template*-DNA angefügt wurde. Schließlich wurde durch den Primer DHFRTS-ATZM-5 eine *AlfII*-Schnittstelle angehängt, die eine erfolgreiche Klonierung des verlängerten Gens in die bereits klonierte *zmTS*-Sequenz erlaubte. Eine anschließende Sequenzierung des *atzmDHFR-TS* Gens bestätigte die korrekte Nukleotidsequenz.

In Abbildung 4.9 ist das erhaltene synthetische, bifunktionelle Gen und die Aminosäuresequenz der Chimäre *atzmDHFR-TS* dargestellt. Die Primer sind schematisch eingezeichnet und die entsprechenden Klonierungsschnittstellen sind kursiv dargestellt.



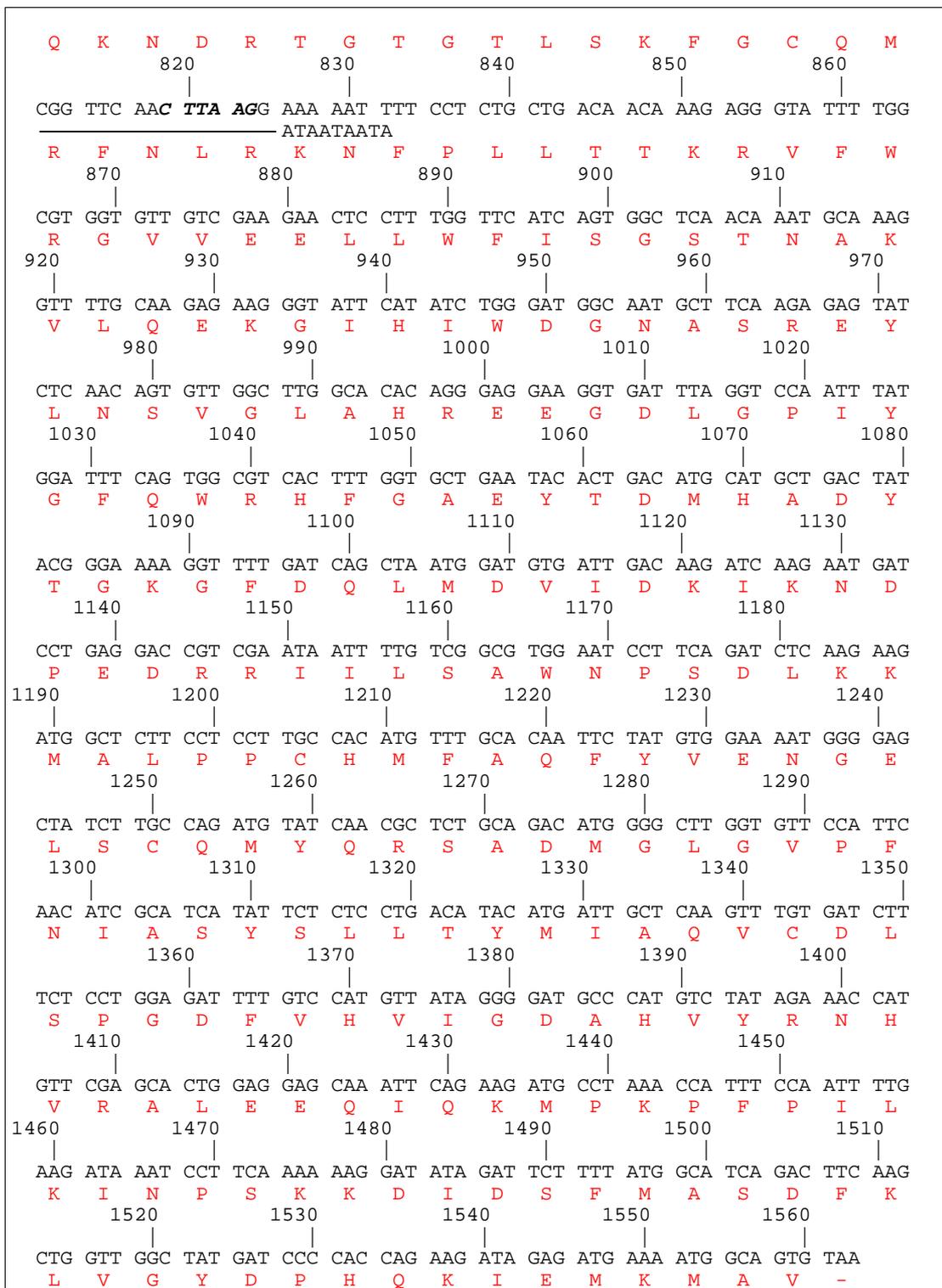


Abbildung 4.9 Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Chimären *atzmDHFR-TS*. Die Domäne der DHFR aus *A. thaliana* ist grün und die TS Domäne aus Mais ist rot markiert. Die Linkerregion (blau) zwischen den Domänengrenzen besteht aus der *atDHFR* Sequenz. Die Klonierungsprimer sind schematisch und die Schnittstellen kursiv dargestellt.

4.1.8 Reinigung der chimären *atzmDHFR-TS*

Das Konstrukt pNCO/*atzmDHFR-TS* wurde in den *E. coli* M15 Expressionsstamm transformiert und, wie in 3.2.5 beschrieben, überexprimiert. Eine SDS-PAGE Analyse zeigte das rekombinante Protein der chimären *atzmDHFR-TS* mit der erwarteten Bande bei 57,6 kDa vollständig in der löslichen Cytoplasmafraktion (siehe Spur 1 in Abbildung 4.10).

Ein Enzymtest bestätigte die gewünschte DHFR-Aktivität im Cytoplasmarextrakt. Der Umsatz des Substrates DHF lag mit 300 nmol/mg Gesamtprotein pro min signifikant über der Aktivität des Kontrollstammes ohne rekombinanter DHFR.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine effiziente Reinigungsmethode der rekombinanten Chimäre *atzmDHFR-TS* etabliert (siehe 3.4.10.4).

Die Spur 1 in Abbildung 4.10 zeigt die Auftrennung der löslichen Gesamtproteine der Cytoplasmafraktion. Die deutliche Bande bei 57,6 kDa läßt die *atzmDHFR-TS*

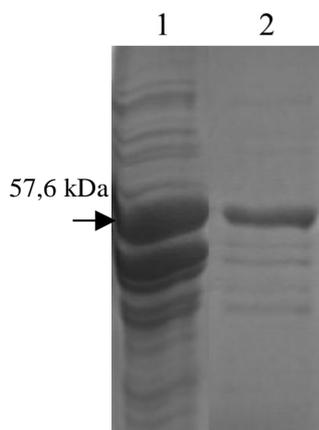


Abbildung 4.10 SDS-PAGE Analyse der Expression ersten Reinigung der Chimäre *atzmDHFR-TS*

1 Cytoplasmafraktion
2 nach Q-Sepharose FF

mit der korrekten Größe erkennen. In Spur 2 ist ein Aliquot der vereinigten Eluatfraktionen der Reinigung der löslichen Proteine an einer Q-Sepharose FF (V = 92ml) Säule aufgetragen. Rekombinante *atzmDHFR-TS* eluierte in einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M KCl (800 ml) bei ca. 150 mM KCl mit einer Flußrate von 5 ml/min.

Die Eluatfraktion der Q-Sepharose (siehe Spur 2 oben) wurden mit dem Äquilibrierungspuffer 20 mM KP_1 pH 7.0, 10 mM DTT auf das doppelte Volumen verdünnt und mit einer Flußrate von 3 ml/min auf eine Red-Sepharose Cl6B Säule aufgetragen. Anschließend wurde ein auf 140 ml verteilter linearer Gradient von 0 bis 2 M KCl angelegt. Die *atzmDHFR-TS* eluierte bei etwa 800 mM KCl (siehe Spur 3 in Abbildung 4.11). Die gesammelten Eluatfraktionen mit enzymatischer DHFR-Aktivität wurden vereinigt, aufkonzentriert und mit einem

Volumen von 3,5 ml in eine abschließende Gelfiltrationschromatographie über Superdex 200 26/60 eingesetzt.

In Abbildung 4.11 ist der Reinheitsgrad der *atzmDHFR*-TS nach der Red-Sepharose

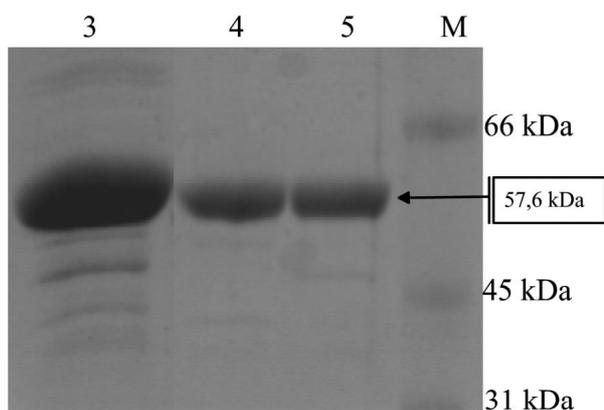


Abbildung 4.11 SDS-PAGE Analyse der weiteren Reinigung der Chimäre *atzmDHFR*-TS

3 nach Red-Sepharose C16B
4; 5 nach Superdex 200 26/60
M Molekulargrößenstandard

Reinigung (Spur 3) und nach der Gelfiltration über Superdex 200 26/60 (Spur 4 und 5) dokumentiert.

Die Ausbeute an gereinigter *atzmDHFR*-TS nach dieser sehr effizienten, dreistufigen Reinigungsmethode betrug 17,6 mg, erhalten aus 1,5 Litern Expressions-

kultur. Im Vergleich dazu betrug die Ausbeute an gereinigter *glyDHFR*-TS etwa 10 mg, erhalten aus 12 Litern Expressionskultur

(siehe 4.1.1). Durch diese Reinigungsmethode konnte hinreichend sauberes und kristallisierbares Material der *atzmDHFR*-TS erhalten werden, welches in einer großen Anzahl von Kristallisationsexperimenten eingesetzt wurde.

4.1.9 Kristallisation der chimären *atzmDHFR*-TS

Die gereinigte Chimäre *atzmDHFR*-TS wurde mit einer anfänglichen Konzentration von 10 mg/ml in 20 mM KP_i pH 7.0, 10 mM DTT, 60 mM KCl in *Screening*-Experimenten unter Verwendung der *sitting drop*-Methode (siehe 3.5.1) eingesetzt. Das Protein kristallisierte bereits nach einem Tag bei 20°C in Form kleiner Nadeln in einer Reihe von PEG-Kristallisationsbedingungen. Die Kristallisationstropfen setzten sich aus 2 μ l *atzmDHFR*-TS Lösung und 2 μ l Präzipitanslösung zusammen. Eine Optimierung der Parameter führte schließlich zu folgender Kristallisationsbedingung (siehe Kristallbild a Abbildung 4.12):

a) 11 % PEG 8000, 200 mM Ammoniumsulfat, 100 mM Mes, pH 6.4

In nachfolgenden Röntgenbeugungsexperimenten erwiesen sich diese Kristalle jedoch als nicht streuend.

Zur weiteren Optimierung wurde die Proteinlösung und die Konzentration der *atzm*DHFR-TS Lösung variiert. Die Proteinlösung wurde mit 10 mM HEPES pH 7.0, 10 mM DTT umgepuffert und mit dem Co-Substrat NADPH und den Inhibitoren MTX und dFUMP im molaren Verhältnis 1:10 versetzt. Die Kristallisationstropfen setzten sich aus 3 μ l *atzm*DHFR-TS Lösung und 1 μ l Präzipitanslösung zusammen. Diese Co-Kristallisationsexperimente führten in *sitting drop* und *hanging drop* Ansätzen in Polystyroidosen bei 20°C zu folgenden optimierten Bedingungen. Einzelne Kristalle wuchsen innerhalb von drei Tagen zu einer ausreichenden Größe.

b) 200 mM Ammoniumacetat, 1 M Na-K-Phosphat, 100 mM Tris/HCl pH 8.4

c) 1 M Na-K-Tartrat, 100 mM Tris/HCl pH 8.2

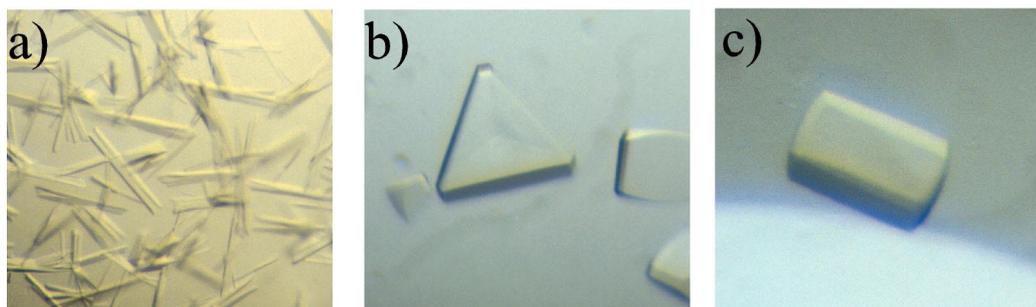


Abbildung 4.12 fehlgeordnete Kristalle der chimären *atzm*DHFR-TS in verschiedenen Kristallisationsbedingungen.

a) 11 % PEG 8000, 200 mM Ammoniumsulfat, 100 mM Mes pH 6.4

b) 200 mM Ammoniumacetat, 1 M Na-K-Phosphat, 100 mM Tris/HCl pH 8.4

c) 1 M Na-K-Tartrat, 100 mM Tris/HCl pH 8.2

In anschließenden Röntgenbeugungsexperimenten zeigten jedoch auch diese Kristalle kein verbessertes Streuvermögen, welches sich auch in nachfolgenden Versuchen durch eine kontrollierte Feuchtigkeitsregelung der Kristalle nicht erhöhen ließ (Kiefersauer *et al.*, 2000).

4.1.10 Diskussion

Die umfassende biochemische und kristallographische Charakterisierung einer pflanzlichen Dihydrofolatreduktase als potentiell Zielenzym für herbizide Wirkstoffe erfordert große Mengen (> 100 mg) an gereinigtem aktiven Protein. Diese Mengen sind nur rekombinant durch heterologe Überexpression des Enzymes in

E. coli Expressionssystemen zu gewinnen. Die Expression des bifunktionellen Gens der *glyDHFR-TS* in *E. coli* erwies sich als problematisch. Rekombinante *glyDHFR-TS* lag bei der Expression unter Kontrolle des starken T7-Promotors in BL21(DE3) mit einer Expressionshöhe von bis zu 50 % des gesamten Zellproteins jedoch zu 95-99 % in *Inclusion Bodies* vor. Die spezifische Aktivität der *glyDHFR-TS* in diesem geringen löslichen Anteil lag reproduzierbar bei ca. 50–80 nmol/(mg Gesamtprotein pro min) und somit signifikant über der Aktivität des jeweiligen Kontrollstammes BL21(DE3)pET3a ohne rekombinante DHFR. Die Ausbeute nach einem ersten Reinigungsschritt lag lediglich bei 0,8 bis 1 mg *glyDHFR-TS* aus 12 Litern Expressionskultur. Auf eine weitere Aufreinigung wurde verzichtet, da jeder weitere Reinigungsschritt erhebliche Aktivitäts- und Proteinverluste zur Folge hatte. Durch die direkte Überführung der Transformationsansätze in 10 x 1 Liter Expressionskulturen konnte die spezifische Aktivität der *glyDHFR-TS* im Rohextrakt um das Fünffache gesteigert werden. Diese gefundene Expressionsbedingung erbrachte erstmalig brauchbare Proteinausbeuten an gereinigter *glyDHFR-TS* bis etwa 31 mg pro 10 Liter Kulturvolumen. Die gereinigte *glyDHFR-TS* erwies sich unter den Kristallisationsbedingungen als äußerst instabil, und ein erster Proteinkristall wuchs erst nach drei Monaten. Dieser hatte in einem Röntgenexperiment leider nur eine unzureichende Streuleistung von 12 Å.

So mußten neue Klonierungsstrategien verfolgt und optimale Expressionsbedingungen gefunden werden, mit dem Ziel die gewünschte Menge an kristallisierbarer pflanzlicher Dihydrofolatreduktase zu erlangen.

Neue Klonierungsstrategien aus Sequenzvergleichen

Die bekannten pflanzlichen bifunktionellen Dihydrofolatreduktase aus *Glycine max.*, *Daucus carota*, *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* sind zueinander sehr homolog (insgesamt über 75 % Identität). Besonders fällt dabei auf, daß die N-Termini der pflanzlichen DHFR-TS in den ersten 30 Aminosäuren stark voneinander abweichen. Für die DHFR-TS aus Karotte konnte ein Chloroplastenvelope lokalisiert und der Transport des Proteins in die Chloroplasten nachgewiesen werden (Luo *et al.*, 1997). Vergleiche der Kristallstrukturen von bakterieller, humaner und tierischer monofunktionaler DHFR (Bolin *et al.*, 1982; Cody *et al.*, 1992; McTigue *et al.*, 1992)

zeigen eine genaue Übereinstimmung ihrer Sekundärstrukturelemente, trotz einer Sequenzhomologie unter 30 %. Die N-terminale DHFR-Domäne aus Soja ist zu 30 % homolog zur DHFR aus Mensch und aus *E. coli*. Somit kann die Kristallstruktur der *ecDHFR* möglicherweise erste Hinweise auf die Raumstruktur der *glyDHFR*-Domäne aus Soja geben. Das Ergebnis einer sequenzbasierten Sekundärstrukturvorhersage (Rost, 1996; Rost und Sander, 1993; Rost und Sander, 1994) der *glyDHFR*-Domäne stimmte mit den gefundenen Sekundärstrukturelementen in der *ecDHFR* Struktur hervorragend überein (siehe Abbildung 4.5). Aus diesen Erkenntnissen wurden Modifikationen des *glyDHFR*-TS Genes geplant und durchgeführt, die eine erhebliche Löslichkeitssteigerung des Proteins zum Ziel hatten (siehe 4.1.2). Auch die Arbeiten an der DHFR aus *Staphylococcus aureus* (Dale *et al.*, 1994) stimmten optimistisch, durch gezielte Mutationen einzelner Aminosäuren an der Oberfläche der *glyDHFR* eine Löslichkeitssteigerung zu erreichen (siehe 4.1.2). Leider gelang es nicht, im Rahmen dieser Arbeit die gewünschte Löslichkeit der *glyDHFR*-TS durch Klonierung der N-terminalen DHFR-Domäne zu erreichen.

In Bakterienzellen bilden Proteine mit einem ungewöhnlich hohen Expressionsniveau häufig unlösliche *Inclusion Bodies* (Schein, 1989b). Eine spätere Renaturierung der Struktur des Enzymes, mit Rekonstitution der enzymatischen Aktivität, ist oftmals sehr schwierig. Erfolge zur Renaturierung, wie es bei Arbeiten an der DHFR aus *Plasmodium falciparum* gelang (Sano *et al.*, 1994), konnten mit der *glyDHFR*-Domäne in Rahmen dieser Arbeit nicht erzielt werden.

Oft gelingt eine Löslichkeitssteigerung des rekombinanten Zielproteins durch eine heterologe Expression als Fusionsprotein. Gut lösliche Proteine wie Glutathion-S-Transferase (GST) oder Thioredoxin erhöhen in einer Fusion mit dem rekombinanten Protein dessen Löslichkeit im *E. coli* Cytoplasma (Frangioni und Neel, 1993). In Abbildung 4.13 sind alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Konstrukte schematisch dargestellt.

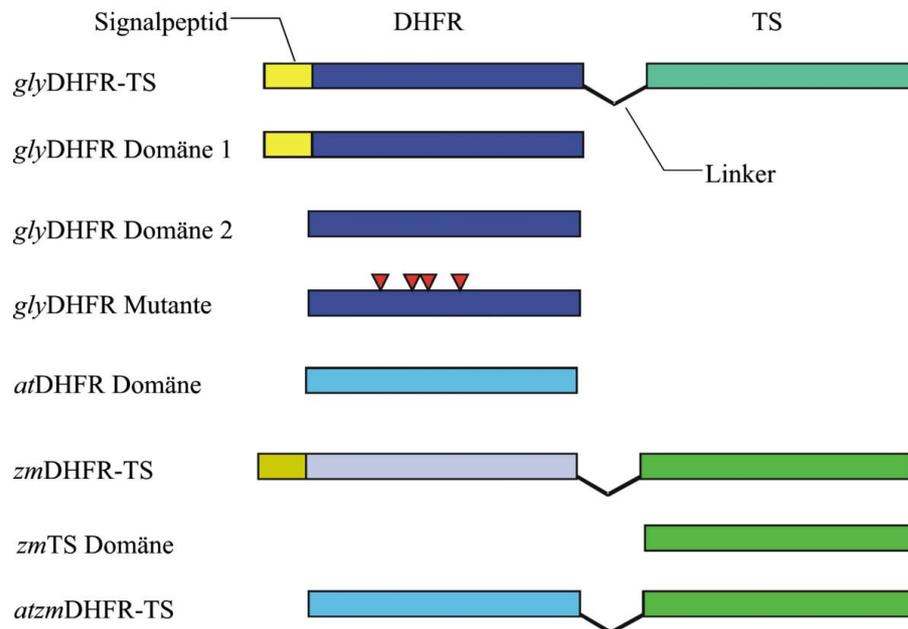


Abbildung 4.13 Schematische Übersicht aller untersuchten pflanzlichen DHFR Konstrukte. Die N-terminale DHFR ist blau und die C-terminale TS ist grün dargestellt. Die Signal-Peptidsequenz ist gelb und der Linker zwischen den Domänengrenzen gewinkelt gezeigt. Stellen der Aminosäurenaustausche sind mit einem Dreieck gekennzeichnet.

Aus den Versuchen zur Löslichkeit und Kristallisierbarkeit, sowie aus den Erkenntnissen des jeweiligen Expressionsniveaus der untersuchten DHFR-Konstrukte im Vergleich zur nativen *glyDHFR-TS* (siehe Tabelle 4.1 in 4.1.7), lag es nahe ein Fusionsprotein zu konzipieren, mit dem Ziel eine lösliche bifunktionelle DHFR-TS zu exprimieren, die die notwendige Proteinausbeute liefert und den Anforderungen an die Kristallisierbarkeit genügt. Die sehr gute Löslichkeit der *zmTS*-Domäne (grün dargestellt in Abbildung 4.13) sollte als C-terminaler Fusionspartner genutzt werden, um die Gesamtlöslichkeit eines chimären Proteins mit N-terminaler *atDHFR*-Domäne (hellblau) zu erhöhen. Die *atDHFR*-Domäne zeichnet sich durch ein hohes Expressionsniveau aus und zudem war das Gen auf eine bakterielle Expression optimiert (pers. Mitteilung Nicholas Schramek). Die Expression des chimären bifunktionellen *atzmDHFR-TS* Genes in *E. coli* M15 Zellen erwies sich wie erhofft als unproblematisch. Unter Kontrolle des T5-Promotors ließen sich Ausbeuten bis zu 170 mg aus 10 Liter Expressionskultur erzielen. Glücklicherweise neigte das Protein im Gegensatz zur nativen *glyDHFR-TS* nicht zur Präzipitation in den Kristallisationsversuchen. Chimäre *atzmDHFR-TS*

kristallisierte unter einer Reihe von verschiedenen Bedingungen. Leider streuten die Kristalle sehr schlecht oder überhaupt nicht, obwohl sie eine ausreichende Größe von mehreren 100 μm in allen drei Raumrichtungen erreichten. Ein Vergleich zur Aminosäuresequenz der bifunktionellen DHFR-TS aus *Leishmania major* (*lm*DHFR-TS), deren Kristallstruktur erfolgreich gelöst wurde (Knighton *et al.*, 1994) (siehe Abbildung 4.14), liefert eine mögliche Erklärung für die sehr hohe Fehlordnung der *atzm*DHFR-TS im Kristall.

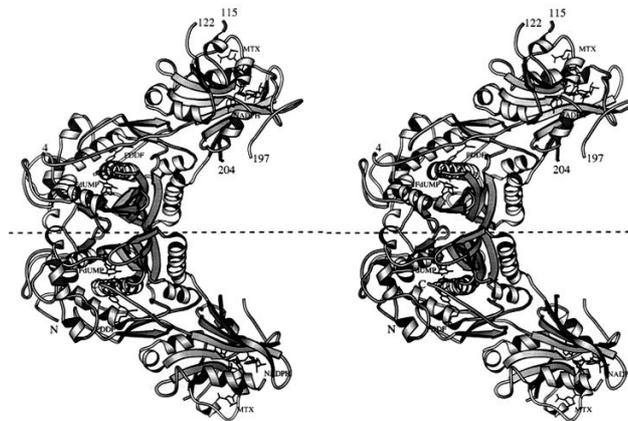


Abbildung 4.14 Kristallstruktur der *L. major* DHFR-TS.

Eine Untereinheit der homodimeren *lm*DHFR-TS besitzt eine Länge von 520 Aminosäuren, die zur Sequenz der *gly*DHFR-TS eine Identität von 44,8 % aufweisen. Auffälligster Unterschied zwischen den beiden Sequenzen ist das Auftreten einer Linkerpeptidsequenz von 15 Aminosäuren in der *gly*DHFR-TS (blau markiert in Abbildung 4.15), die die N-terminale DHFR-Domäne mit der C-terminalen TS-Domäne verbrückt. Diese Linkerregion ist in allen pflanzlichen Dihydrofolatreduktasen präsent und in ihrer Sequenzabfolge nicht konserviert. Die *lm*DHFR-TS besitzt diese wohl möglicherweise flexible Linkerregion nicht, wodurch der Domänenkontakt rigider sein könnte. Eine eingeschränkte Flexibilität begünstigt in den meisten Fällen die Kristallisation eines Proteins. Durch die wahrscheinlich zu hohe Beweglichkeit der beiden Domänen in der *atzm*DHFR-TS zueinander, ist vermutlich die Fehlordnung der Kristalle aus den verschiedenen Bedingungen zu erklären.

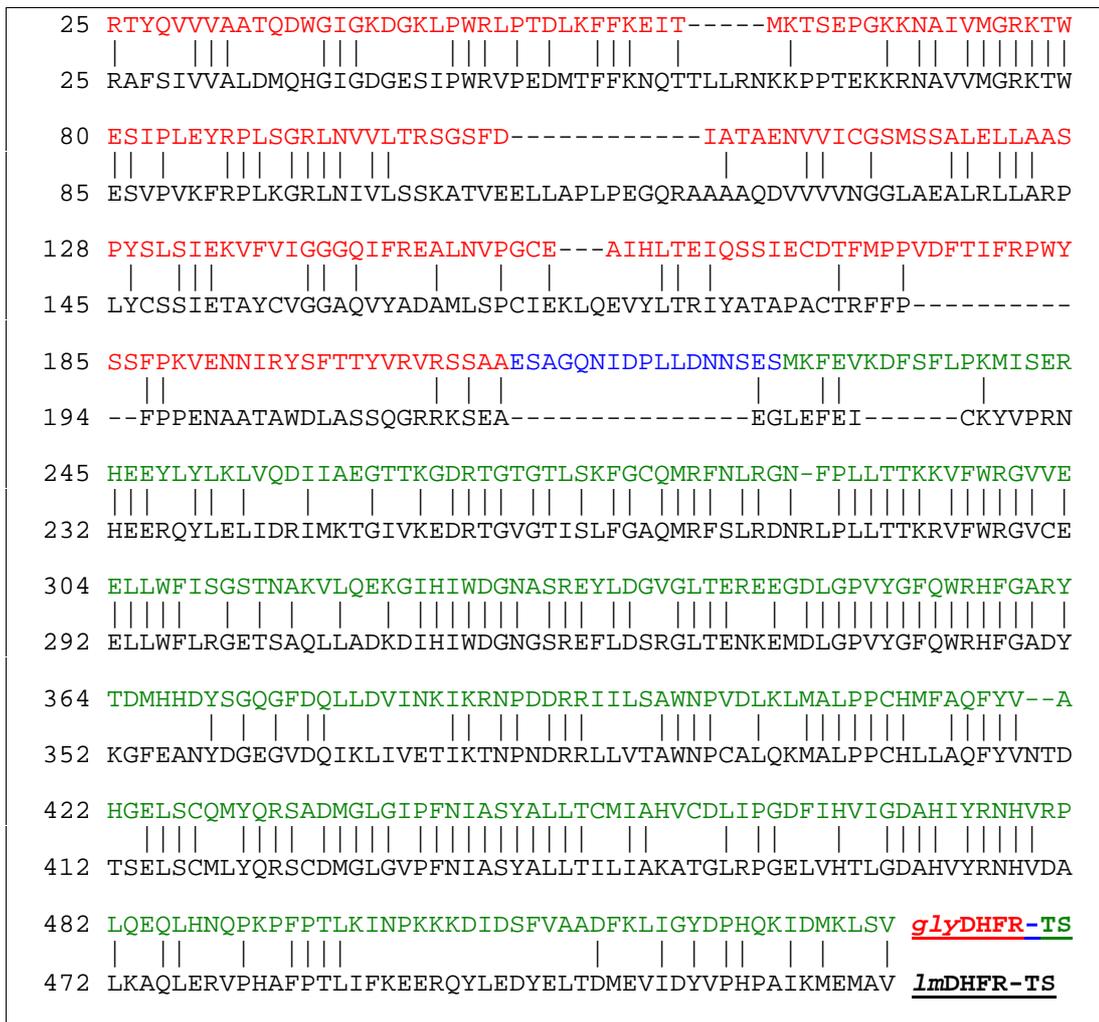


Abbildung 4.15 Aminosäuresequenzvergleich der glyDHFR-TS (oben) mit der *L. major* DHFR-TS. Die N-terminale DHFR-Domäne ist grün und die TS-Domäne ist grün markiert. Die verbrückten Linkersequenz ist blau gekennzeichnet.

Versuche, die Kristallordnung durch Variation der Linkerregion zwischen den Domänengrenzen der pflanzlichen Dihydrofolatreduktase zu verbessern, stellen weitere Möglichkeiten dar, die bislang jedoch noch nicht zum erhofften Erfolg geführt haben.

4.2 Röntgenstrukturanalyse der Transketolase aus *Zea mays*

4.2.1 Kristallisation und Datensammlung

Röntgentaugliche Kristalle mit einer Größe von etwa $0,5 \times 0,2 \times 0,2 \text{ mm}^3$ der rekombinanten Transketolase (*zmTK*) aus Mais wuchsen nach einer Woche aus der optimierten Präzipitansbedingung 13 % PEG 3350, 130 mM Ammoniumacetat. Die *zmTK* lag mit einer Konzentration von 12 mg/ml in 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM MgCl_2 , 50 μM TPP vor. Die Kristallisationstropfen (*sitting drops*) setzten sich aus 2 μl *zmTK* Lösung und 2 μl Präzipitanslösung zusammen. Als Zusatz wurden 0,5 μl 100 mM Spermin zum Kristallisationstropfen pipettiert. Der Ansatz wurde gegen 300 μl Bodenpuffer über die Gasphase äquilibriert (siehe 3.5.1).

Die Röntgenbeugungsdaten von einem *zmTK* Kristall wurden bei Raumtemperatur mit einer *Image Plate* auf einem Röntgendrehanodengenerator aufgenommen (siehe 3.5.2). Der Kristall beugte anfänglich bis zu einer maximalen Auflösung von $2,2 \text{ \AA}$ (siehe Abbildung 4.16), wurde aber durch die Röntgenstrahlung stark geschädigt.

Die Bestimmung der Raumgruppe, die Verfeinerung der Zellparameter und die Integration erfolgte mit dem Programm MOSFLM (Leslie, 1998). Die Statistik des Datensatzes ist nachfolgend in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Der Autoindizierungsalgorithmus nach Kabsch (Kabsch, 1988) lieferte eine hexagonale bzw. trigonale Gittermetrik mit Gitterkonstanten von $a = 136,4 \text{ \AA}$, $b = 136,4 \text{ \AA}$ und $c = 203,7 \text{ \AA}$ und Winkeln von $\alpha = \beta = 90^\circ$ und $\gamma = 120^\circ$. Die Auswertung des Datensatzes ergab Reflexe beginnend ab $h = k = 0$ und $l = 3$ mit charakteristischen Auslöschungen entsprechend $000l = 3n$. Die Existenz nur jedes dritten $000l$ -Reflexes wies auf eine Zuordnung der Raumgruppe $P3_121$ oder $P3_221$ hin. Eine endgültige Aussage über die tatsächliche Raumgruppe mußten die unterschiedlichen Lösungen aus der *PATTERSON*-Suche in den beiden Raumgruppen ergeben, da zu diesem Zeitpunkt keine Unterscheidung der Schraubenachse gemacht werden konnte.

Das Verhältnis von Zellvolumen zu molekularer Masse V_m beträgt $2,5 \text{ \AA}^3/\text{Dalton}$ für 3 *zmTK* Moleküle pro asymmetrischer Einheit (Solvensgehalt von 50 %) und liegt im für Proteine typischen Rahmen von $1,6\text{--}3,6 \text{ \AA}^3/\text{Dalton}$ (Matthews, 1968).

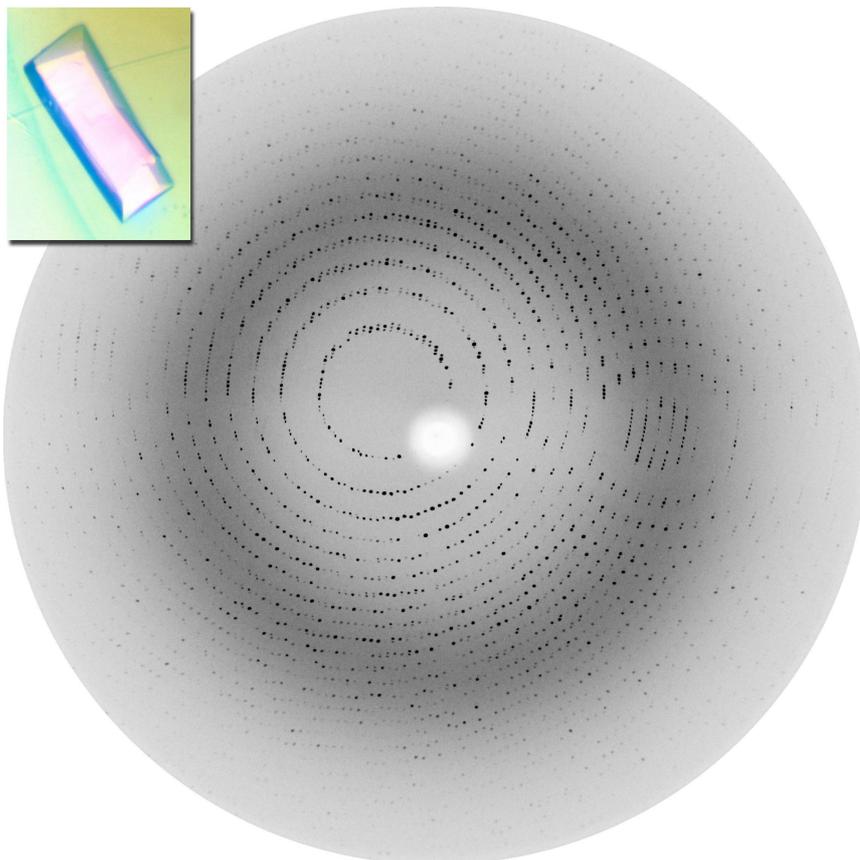


Abbildung 4.16 Kristall- und Röntgenbeugungsbild (maximale Auflösung: $2,2 \text{ \AA}$, Rotation: $1,0^\circ$, Wellenlänge $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) der nativen *zmTK*

Datenprozessierungsstatistik des <i>zmTK</i> Kristalles	
Raumgruppe	P3 ₁ 21
Zellkonstanten	a = b = 136,4 Å; c = 203,7 Å
Einheitszellvolumen [Å ³]	3 789 830
V_m [Å ³ /Dalton]	2,5 (50 % Solvens)
Anzahl Moleküle pro asym. Einheit	3
Begrenzende Auflösung	2,2
Anzahl gemessener Kristalle	1
Unabhängige Reflexe ($I > 1,8\sigma(I)$)	91552
Multiplizität	3,5
Vollständigkeit der Daten [%]	93,8 (93,8)
R_{merge}^*	0,12 (0,36)
* $R_{\text{merge}} = \frac{\sum I_i - \langle I \rangle }{\sum I_i}$, wobei I_i eine individuelle Messung der Intensität ist und $\langle I \rangle$ die gemittelte Intensität für diesen Reflex ist. Der in Klammern angegebene Wert entspricht einer Auflösungsschale von 2,42 – 2,3 Å.	

Tabelle 4.2 Datenprozessierungsstatistik des *zmTK* Kristalles

4.2.2 PATTERSON-Suche

Die Struktur der rekombinanten Transketolase aus Mais wurde mit Hilfe der *PATTERSON*-Suchmethode (*Molecular Replacement*) gelöst. Als Suchmodell diente die Kristallstruktur der Hefe Transketolase (*sacTK*) von Nilsson *et al.* (PDB Eintrag 1NGS). Die Orientierung und Positionierung eines TK Dimeres erfolgte zunächst getrennt in den möglichen Raumgruppen $P3_121$ und $P3_221$ mit dem Programm MOLREP, wobei die Daten im Auflösungsbereich von 19,92 Å bis 4,5 Å herangezogen wurden.

Eine eindeutige Charakterisierung der korrekten Raumgruppe $P3_121$ ergaben die klar abgehobenen Lösungen in der Rotationssuche und einer anschließenden Translationssuche. Ein erstes TK Dimer wurde mit einem Korrelationswert von 0,324 und einem *R*-Faktor von 53,9 % plaziert. Ein weiteres TK Monomer in der asymmetrischen Einheit konnte nachfolgend zu dem bereits plazierten Dimer mit einem Korrelationswert von 0,47 und einem *R*-Faktor von 48,4 % positioniert werden.

Die asymmetrische Einheit beinhaltet, wie oben erwähnt, 3 Moleküle – ein *zmTK* Dimer und ein *zmTK* Monomer, welches über die zweizählige kristallographische Symmetrieachse ein Dimer aufbaut. Die Überprüfung der Kristallpackung zeigt sinnvolle Kristallkontakte zwischen symmetrieverwandten *zmTK* Molekülen und bestätigt die korrekte Zuordnung der Raumgruppe **$P3_121$** .

4.2.3 Modellbau und Verfeinerung

Die *zmTK* Kristallstruktur wurde mit dem Program CNS unter Verwendung der Parameter von Engh und Huber verfeinert (Engh und Huber, 1991). Eine *rigid body* Verfeinerung und ein *simulated annealing* bei 2000 K ergab einen ersten kristallographischen Arbeits-*R*-Faktor von 35,7 % und einen freien *R*-Faktor von 39,3 %. Die berechnete $2F_o - F_c$ Elektronendichte bis zu einer Auflösung von 2,3 Å war von ausgezeichneter Qualität und erlaubte einen manuellen Einbau von Aminosäure 10 bis 675 pro Untereinheit des *zmTK* Atommodelles. Die Elektronendichte der N-terminalen neun Aminosäuren wurde auch in späteren Verfeinerungs- und Bauzyklen nicht interpretierbar, so daß sich das finale *zmTK* Atommodell auf

666 Aminosäuren pro Monomer erstreckt. Im späteren Verlauf der Verfeinerung wurden pro *zmTK* Molekül ein TPP Cofaktor und ein Mg^{2+} -Ion in ihre F_o-F_c Differenzdichten eingebaut. Des weiteren wurden insgesamt 440 Wassermoleküle identifiziert. Iterative Zyklen von manuellem Modellbau und Verfeinerung der Daten im Auflösungsbereich von 33,52 Å bis 2,3 Å, *ncs-restrains* und eine individuelle B-Faktor-Verfeinerung führten zu einem kristallographischen Arbeits-*R*-Faktor von 16,6 % und einem freien *R*-Faktor von 20,0 %.

4.2.4 Qualität des Atommodelles

Das final verfeinerte *zmTK* Atommodell besteht aus 3 TK Molekülen. Abgesehen von einigen an der Proteinoberfläche lokalisierten Seitenketten und den jeweiligen neun N-terminalen Aminosäuren der Monomere sind 1998 Aminosäuren, 3 TPP Cofaktoren, 3 Mg^{2+} -Ionen und 440 Wassermoleküle in ihrer $2F_o-F_c$ Elektronendichte sehr gut definiert.

Eine Verifizierung der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette im *zmTK* Atom-

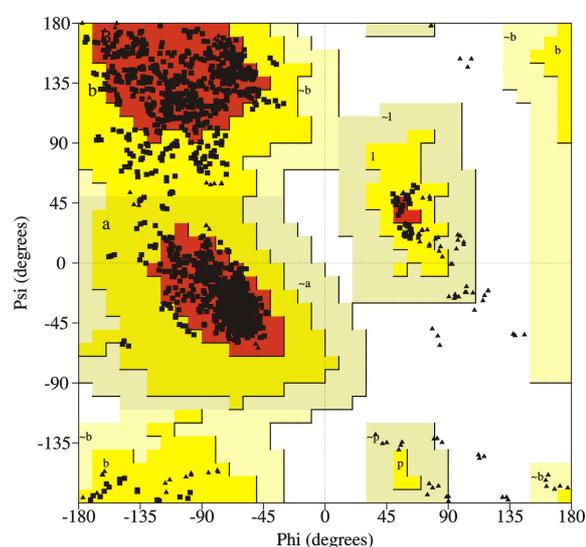


Abbildung 4.17 Ramachandran-Diagramm der dihedralen Hauptkettenwinkel Phi und Psi des *zmTK* Atommodelles

modell zeigt, daß sich 88,9 % aller Aminosäuren (ausgenommen Glycin und Prolin) in dem am meisten bevorzugten Bereich, 11,1 % sich im zusätzlich erlaubten Bereich und keine der Aminosäuren sich in dem weitläufig erlaubten oder im verbotenen Bereich der Ramachandran-Statistik befinden (Ramachandran und Sasisekharan, 1968). In Abbildung 4.17 ist die Ramachandran-Statistik aller 1998 Aminosäuren des bis 2,3 Å

verfeinerten *zmTK* Atommodelles graphisch dargestellt. Die Bereiche, die für L-Aminosäuren erlaubt sind, sind gelb dargestellt, wobei die sterisch günstigsten Regionen rot gezeichnet sind. Die weißen Flächen markieren die sterisch verbotenen Bereiche.

Eine detaillierte Verfeinerungsstatistik des *zmTK* Atommodelles ist in der Tabelle 4.3 zusammengestellt.

Verfeinerungsstatistik des <i>zmTK</i> Atommodelles	
Auflösungsbereich [Å]	33,52 – 2,3
Verwendete Reflexe ($I > 1,8\sigma(I)$)	91552
Vollständigkeit der Daten [%]	93,8
<i>R</i> -Faktor [%] *	16,6
<i>R</i> _{free} [%] #	20,0
<i>r.m.s.</i> -Abweichung von Idealwert der	
Bindungslängen [Å]	0,008
Bindungswinkel [°]	1,46
Mittlerer B-Faktor, Protein [Å ²]	24,6
Mittlerer B-Faktor, Ligand [Å ²]	20,7
Mittlerer B-Faktor, Solvens [Å ²]	23,5
Mittlerer B-Faktor, Ion [Å ²]	16,6
Anzahl Proteinatome (nicht H-Atome)	15246
Anzahl Ligandenatome (nicht H-Atome)	78
Anzahl Metallatome	3
Anzahl Wassermoleküle	440
(Φ,Ψ) Winkel Verteilung im	
bevorzugten Bereich [%]	88,9
zusätzlich erlaubten Bereich [%]	11,1
weitläufig erlaubten Bereich [%]	0,0
verbotenen Bereich [%]	0,0
* <i>R</i> -Faktor = $\sum_{hkl} F_{obs} - F_{calc} / \sum_{hkl} F_{obs} $	
# <i>R</i> _{free} berechnet mit 5 % Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden	

Tabelle 4.3 Verfeinerungsstatistik des *zmTK* Atommodelles

4.2.5 Strukturbeschreibung der *zmTK*

Die rekombinante Mais Transketolase (*zmTK*) besteht aus 675 Aminosäuren pro monomerer Untereinheit, die je in drei Domänen organisiert ist. Die einzelnen Domänen sind sich in ihrer Struktur untereinander sehr ähnlich und zeigen eine α/β -Faltung (Lindquist *et al.*, 1992; Nikkola *et al.*, 1994).

Die N-terminale PP-Domäne ist 332 Aminosäure lang und besitzt ein zentrales, fünfsträngiges paralleles β -Faltblatt mit $\beta 1\beta 2\beta 3\beta 5\beta 4$ -Topologie. Das β -Faltblatt ist von beiden Seiten von α -Helices ($\alpha 1$ bis $\alpha 11$) umgeben.

Die mittlere Pyr-Domäne erstreckt sich von Aminosäure 333 bis 542. Auch in dieser Domäne ist ein zentrales, sechssträngiges paralleles β -Faltblatt ($\beta 8\beta 7\beta 9\beta 10\beta 12\beta 11$) zwischen Helices $\alpha 12$ bis $\alpha 18$ eingebettet.

Die Struktur einer monomeren Untereinheit der *zmTK* ist in Bild a Abbildung 4.18 dargestellt.

Die PP-Domäne und die Pyr-Domäne überlagern mit einer *r.m.s.*-Abweichung von 1,68 Å für 92 C_α-Atome.

Beide Domänen sind in starkem Maße an der Bildung des Dimeres der enzymatisch aktiven *zmTK* und an der TPP-Cofaktor-Bindung beteiligt.

Die nachfolgende C-terminale Domäne (Aminosäure 543 bis 675) hat ein gemischtes zentrales β-Faltblatt mit vier parallelen (β16β17β15β18) und einem antiparallelen Strang (β14).

Die C-terminalen Domänen zweier benachbarter Untereinheiten leisten mit ihren Seitenketten keinen Beitrag zur Dimerbildung.

Die Funktion der C-terminalen Domäne ist weiter unklar (Schneider und Lindqvist, 1998), da sie auch mit keiner Aminosäure an der Bindung des TPP Cofaktors beteiligt ist.

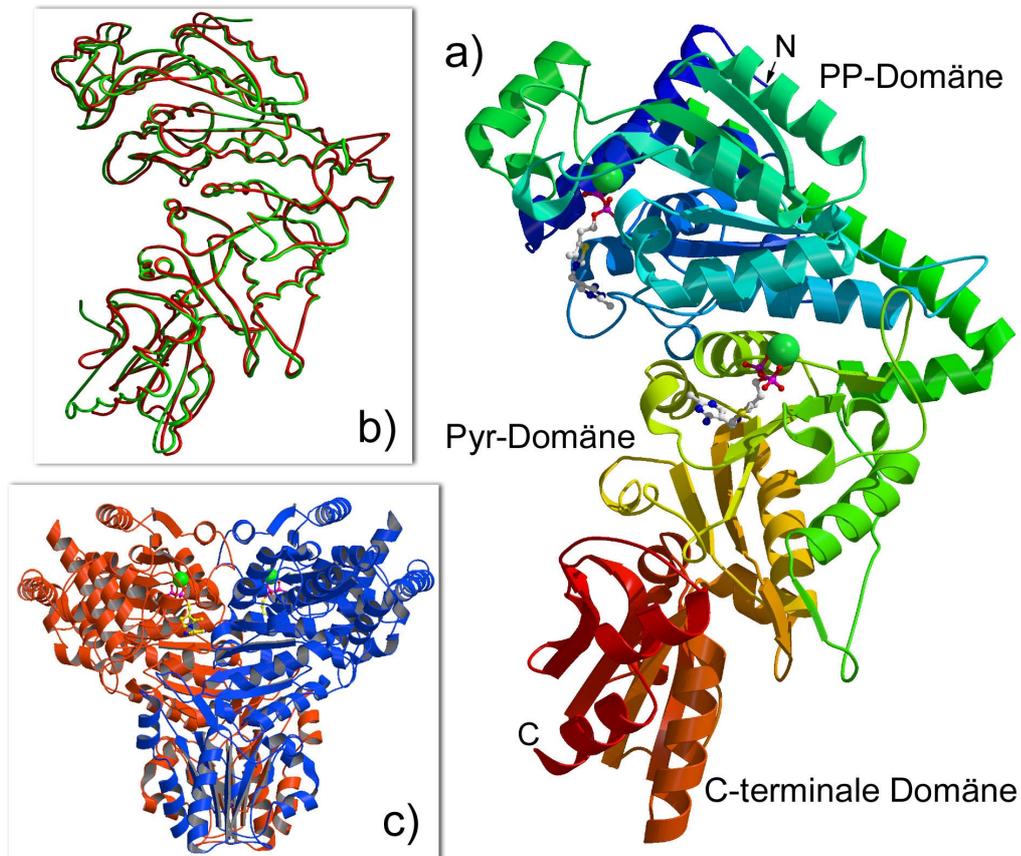


Abbildung 4.18 Atommodell der *zmTK*. a) Ribbon-Darstellung einer *zmTK* Untereinheit mit zwei gebundenen TPP Co-Faktoren und zwei Mg^{2+} -Ionen. b) Überlagerung der Kristallstrukturen der Hefe (grün) und der Mais Transketolase (rot) c) Ribbon-Darstellung des *zmTK* Dimers mit Blick senkrecht auf eine zweizählige nicht kristallographische Symmetrieachse. Mg^{2+} -Ionen sind als grüne Kugeln und die TPP Cofaktoren als „ball and stick“ Modelle dargestellt.

Die *zmTK* besitzt mit ca. 60 % eine sehr hohe Sequenzhomologie zur Aminosäuresequenz der *sacTK*, die zu 53 % identische Reste aufweist. Ein Sequenzvergleich beider Enzyme ist in Abbildung 4.19 gezeigt.

Auch die Kristallstrukturen beider Enzyme zeigen große Ähnlichkeiten und überlagern mit einer geringen *r.m.s.*-Abweichung von 0,91 Å für 638 C_{α} -Atome.

Eine Überlagerung der beiden Kristallstrukturen ist in Bild b Abbildung 4.18 gezeigt und macht die hohe strukturelle Homologie der Enzyme deutlich.

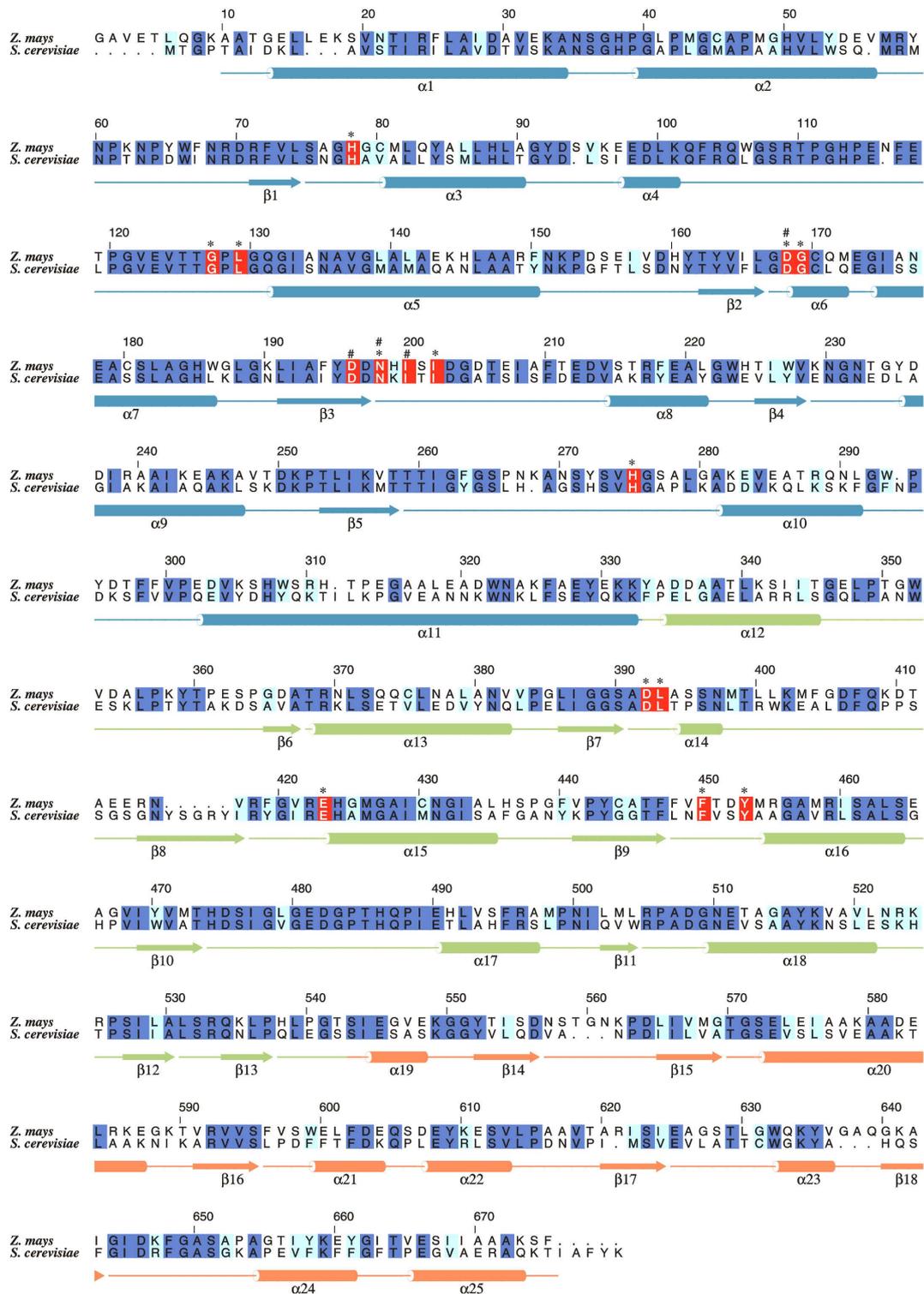


Abbildung 4.19 Vergleich der Aminosäuresequenzen der *zmTK* und der *sacTK*. Die Numerierung bezieht sich auf *zmTK* Sequenz. Konservierte Reste sind dunkelblau und homologe Aminosäuren hellblau dargestellt. Unter dem Alignment sind die *zmTK* Sekundärstrukturen der PP-Domäne (blau), der Pyr-Domäne (grün) und der C-terminalen Domäne (orangerot) dargestellt. Die rot markierten Reste sind an der TPP Bindung (*) und an der Mg²⁺-Bindung (#) beteiligt.

Das enzymatisch aktive Homodimer der *zmTK* wird durch Wechselwirkungen zwischen der PP-Domäne einer Untereinheit (A) und der Pyr-Domäne der benachbarten Untereinheit (B') und umgekehrt aufgebaut. Dabei entstehen zwei tiefe Taschen des aktiven Zentrums im *zmTK* Dimer, in denen je ein TPP Cofaktor und ein Mg^{2+} -Ion gebunden sind. Der Thiazoliumring des TPP Cofaktors wird durch überwiegend hydrophobe Wechselwirkungen mit Seitenketten beider Domänen im aktiven Zentrum gebunden.

Der Pyrimidinring des TPP Moleküles ist in einer tiefen hydrophoben Tasche gebunden, die vorwiegend durch die aromatischen Aminosäuren Tyr443', Phe447', Phe448', Phe450' und Tyr453' und dem aliphatischen Rest Val449' der Pyr-Domäne einer benachbarten Untereinheit (B') gebildet wird. Die Seitenketten Leu392', Glu423', Phe450' und Tyr453' der Pyr-Domäne (B') sind direkt an der Bindung des Pyrimidinringes beteiligt. Der hochkonservierte Rest Glu423' bildet eine Wasserstoffbrücke zum N1'-Atom des Pyrimidinringes aus, während die anderen Reste hydrophob wechselwirken. Die Abbildung 4.20 zeigt eine detaillierte Beschreibung dieser Bindungsverhältnisse im aktiven Zentrum.

Der Pyrimidinring des TPP Cofaktors steht in hydrophobem Kontakt mit einer Distanz von 3,5 Å zum Rest Phe450'.

Durch diese Protein-TPP-Wechselwirkungen unterscheidet sich die Konformation des TK gebundenen Cofaktors von der Konformation des ungebundenen TPP in der Kristallstruktur (Pletcher und Sax, 1972). Das im aktiven Zentrum der *zmTK* gebundene TPP Molekül weist eine V-förmige Konformation auf, durch die das katalytisch wichtige C2-Kohlenstoffatom des Thiazoliumringes in einem Abstand von 3,0 Å zur C4'-Aminogruppe des Pyrimidinringes gebracht wird. Dieser Abstand liegt in der gleichen Größenordnung wie im Falle der *sacTK* Struktur (3,1 Å) (Lindquist *et al.*, 1992).

Die Bindungstasche der Pyrophosphatgruppe des Cofaktors liegt am C-terminalen Ende des β -Faltblattes am Wendepunkt zwischen den Strängen $\beta 1$ und $\beta 2$ der PP-Domäne. Die Phosphatbindungsstelle und die Metallbindungstasche des Mg-Ions

werden ausschließlich durch die Seitenketten der N-terminalen PP-Domäne einer Untereinheit (A) gebildet.

Die Pyrophosphatgruppe ist direkt durch Kontakte zu den konservierten Resten His75, His272, Asn198 und durch Wechselwirkungen mit den Hauptketten N-Atomen der Reste Asp168 und Gly169 der Untereinheit (A) gebunden.

Das Magnesiumion nimmt eine wichtige Funktion für die Bildung des Dimeres und zum Erlangen der maximalen enzymatischen Aktivität der TK ein (Wang *et al.*, 1997). Andere zweiwertige Ionen, wie Ca^{2+} , Co^{2+} oder Mn^{2+} , werden durch Zugabe von Mg^{2+} -Ionen aus der Metallbindungsstelle verdrängt (Heinrich *et al.*, 1972).

Das gebundene Mg^{2+} -Ion ist fünffach über Seitenketten O-Atome von Asp168 und Asn198, über ein Hauptketten O-Atom von Ile200 und durch Wechselwirkungen der O-Atome beider Phosphatgruppen des Pyrophosphates koordiniert und besitzt eine quadratisch pyramidale Geometrie. Die freie sechste Koordinationsstelle wird durch ein konserviertes Wassermolekül besetzt, das über Hauptkettenwechselwirkungen zum N-Atom von Asp196 stabilisiert wird.

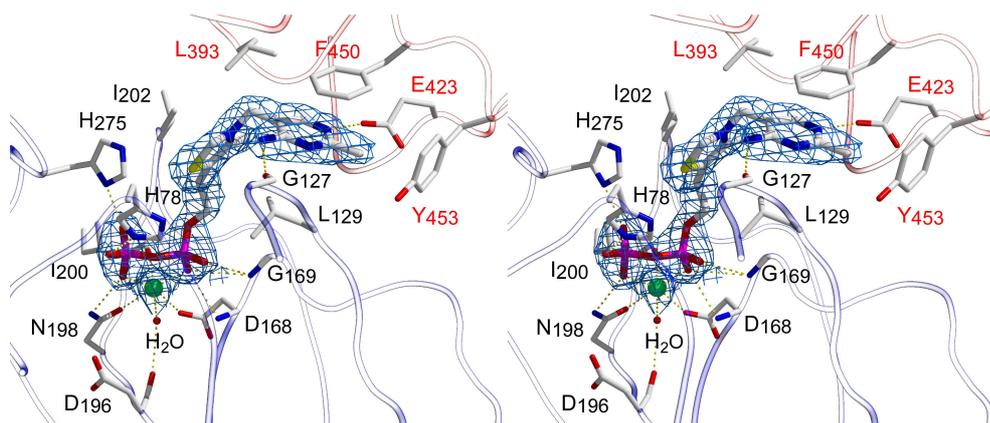


Abbildung 4.20 Stereoabbildung des aktiven Zentrums der *zmTK*. Die Reste der N-terminalen PP-Domäne sind blau und die Reste der benachbarten mittleren Pyr-Domäne rot dargestellt. Der TPP Cofaktor ist als „ball and stick“ Modell und das Mg^{2+} -Ion als grüne Kugel in ihrer $2F_o-F_c$ Elektronendichtekarte (bei $1,2\sigma$ konturiert) gezeigt.

4.2.6 Diskussion

Transketolase katalysiert die reversible Übertragung einer C₂-Einheit von Sedoheptulose-7-phosphat bzw. Fructose-6-phosphat (F6P) auf Glycerinaldehyd-3-phosphat. Aus dieser Reaktion entstehen Ribose-5-phosphat (R5P) bzw. Erythrose-4-phosphat und Xylulose-5-phosphat (Xu5P). Die pflanzliche Transketolase wird cytosolisch als *Precursor*-Protein in der Zelle gebildet. Das Enzym wird, wie die bifunktionelle Dihydrofolatreduktase, unter Abspaltung des Transitpeptides in die Chloroplasten transportiert. Die Sequenz des N-Terminus des maturierten Proteins weist mit AAVEAL die gleiche konservierte Schnittstelle der Signalpeptidsequenz wie die *glyDHFR-TS* auf (Endo *et al.*, 1994; Gavel und Heijne, 1990). Die maturierte, rekombinante Transketolase aus Mais (*zmTK*) hat eine Länge von 675 Aminosäuren, von denen 666 sehr gut in ihrer Elektronendichte definiert sind. Das Fehlen der Elektronendichte der ersten zehn N-terminalen Aminosäuren im *zmTK* Atommodell ist auf eine Fehlordnung des flexiblen N-Terminus zurückzuführen.

Die Entwicklung selektiver Inhibitoren steht im Pflanzenschutz bei der Bekämpfung von pathogenen Pilzen im Mittelpunkt des Interesses. Die Röntgenstrukturanalyse von Inhibitor-komplexen der *zmTK* würde eine weitere Charakterisierung der Architektur des aktiven Zentrums ermöglichen. Jedoch war es bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich Komplexstrukturen der *zmTK* in Gegenwart von F6P, Xu5P oder R5P zu lösen. Eine Vielzahl von *Soaking*-Experimenten mit den oben genannten Verbindungen waren nicht erfolgreich. Dies stimmt mit den Erkenntnissen der Arbeiten zur Komplexstruktur der Hefe Transketolase (*sacTK*) (Nilsson *et al.*, 1997) mit Donorsubstrat F6P überein. Auch dort konnte bei Co-Kristallisationsexperimenten keine für das F6P interpretierbare Dichte gefunden werden. Der Holoenzym-Donorsubstrat-Komplex erwies sich über einen längeren Zeitraum als nicht stabil und bei Kristallisationszeiten von mehreren Wochen wurde das kokristallisierte F6P zum Akzeptormolekül Erythrose-4-phosphat (E4P) umgesetzt. Aufgrund dieser Hinweise wurde die *Soaking*-Dauer der *zmTK* Kristalle verlängert, aber auch unter diesen Bedingungen konnte keine Dichte eines gebundenen Substrates identifiziert werden.

Durch die Kristallstruktur der Holo-*sacTK* mit gebundenem Akzeptorsubstrat konnte das aktive Zentrum der Transketolase und damit die zur Substratbindung erforderlichen Reste bestimmt werden. Durch eine Reihe an kristallographischen Untersuchungen und Mutagenesestudien an Aminosäuren, die an der Substratbindung teilnehmen der Hefe Transketolase (Lindquist *et al.*, 1992; Nilsson *et al.*, 1993; Schneider und Lindqvist, 1998) wurde der Reaktionsmechanismus umfassend aufgeklärt und beschrieben. Ein Sequenzvergleich der *sacTK* mit der *zmTK* erbrachte eine hohe Identität von 53 % und zeigte, daß alle an der Substrat- und Cofaktorbindung beteiligten Aminosäuren in der *zmTK* identisch sind. Durch diese sehr hohe Sequenzhomologie sind sicherlich auch die geringen *r.m.s.*-Abweichungen von 0,91 Å beider Strukturen zu erklären. Die Substratkomplexstrukturen der *sacTK* könnten aufgrund der geringen strukturellen Unterschiede als Grundlage für *Modelling*-Experimente an der *zmTK* dienen.

4.3 Röntgenstrukturanalyse der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase aus *S. pombe*

4.3.1 Kristallisation und Datensammlung der Wildtyp *sspLS*

Erste Kristalle der Wildtyp Lumazin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* (*sspLS*) wuchsen innerhalb von zwei Tagen aus der Präzipitationsbedingung 0,1 M Na-Acetattampfer pH 4,6, 2 M NaCl. Die *sspLS* lag mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml in 20 mM Kaliumphosphattampfer pH 7,0, 100 mM KCl vor. Aufgrund der hohen Affinität der *sspLS* zur Bindung von Riboflavin, zeigen die Kristalle eine charakteristisch gelbe Färbung (siehe Kristallbild Abbildung 4.21). Ein erster vollständiger Diffraktionsdatensatz eines *sspLS* Kristalles dieser Kristallisationsbedingung wurde bei Raumtemperatur mit einer *Image Plate* auf einem Röntgendrehanodengenerator gesammelt. Der Kristall beugte bis zu einer Auflösung von 2,8 Å. Die Indizierung der Reflexe ergab eine C-zentrierte orthorhombische Einheitszelle mit den Zellkonstanten $a = 111,2 \text{ \AA}$, $b = 145,5 \text{ \AA}$ und $c = 128,3 \text{ \AA}$. Die systematische Auslöschung jedes Reflexes mit ungeradem *MILLER*'schen Index

$00l:l = 2n$ weist auf eine Schraubenachse hin und legt die Raumgruppe auf **C222₁** fest.

Massenspektroskopische Experimente der *sspLS* in Lösung liefern eine molekulare Masse von 17 189 Da, die mit der berechneten Masse von 17 188 Da hervorragend übereinstimmt. Die *sspLS* sedimentiert in analytischen Ultrazentrifugationsexperimenten als eine einzelne Grenzschicht mit einer apparenten molekularen Masse von 87 kDa (Fischer *et al.*, 2001). Die biochemischen Hinweise auf ein Vorliegen der Wildtyp *sspLS* als Homopentamer werden durch die kristallographischen Daten bestätigt.

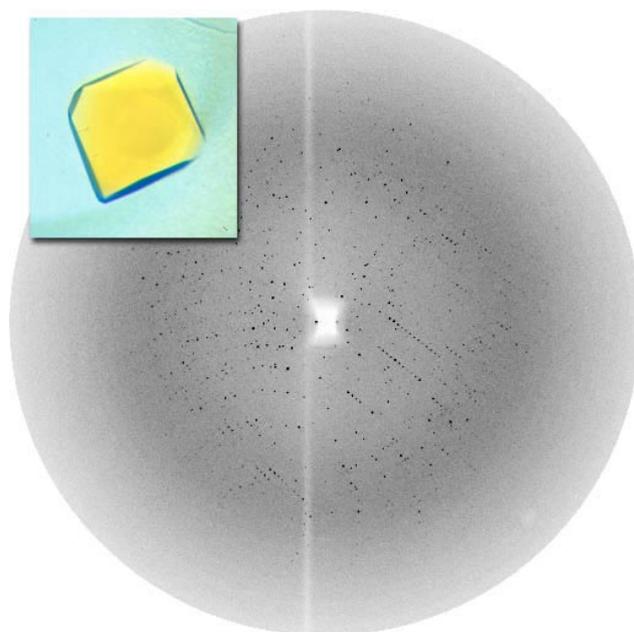
Das Volumen zu Massenverhältnis V_m beträgt für ein *sspLS* Pentamer pro asymmetrischer Einheit $3,05 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ mit einem Solvensgehalt von 59,7% (Matthews, 1968).

Die Statistik der MOSFLM Datenprozessierung (Leslie, 1998) dieses ersten Wildtyp *sspLS* Datensatzes bis zu einer Auflösung von $2,8 \text{ \AA}$ ist in Tabelle 4.4 angegeben.

Dieser Datensatz wurde zur Strukturlösung der Wildtyp *sspLS* durch *PATTERSON*-Suchmethoden verwendet (siehe 4.3.2).

Datenprozessierungsstatistik der Wildtyp <i>sspLS</i> bis 2,8 Å	
Raumgruppe	C222 ₁
Zellkonstanten	a = 111,2 Å; b = 145,5 Å; c = 128,3 Å α = β = 90°; γ = 120°
Einheitszellvolumen [Å ³]	2 075 185
V _m [Å ³ /Dalton]	3,05 (bei 59,7 % Solvengehalt)
Anzahl Moleküle pro asym. Einheit	5
Begrenzende Auflösung	2,8 Å
Anzahl der gemessenen Kristalle	1
Unabhängige Reflexe (I > 2,0σ(I))	25939
Multiplizität	3,4
Vollständigkeit der Daten [%]	99,9 (99,9)
R _{merge} *	0,13 (0,51)

* R_{merge} = Σ |I_i - <I>| / Σ I, wobei I_i eine individuelle Messung der Intensität ist und <I> die gemittelte Intensität für diesen Reflex ist.
Der in Klammern angegebene Wert entspricht einer Auflösungsschale von 2,95 – 2,8 Å.

Tabelle 4.4 Datenprozessierungsstatistik des ersten Datensatzes bis 2,8 Å der Wildtyp *sspLS*Abbildung 4.21 Kristall- und Röntgenbeugungsbild der Wildtyp *sspLS*. Die maximale Auflösung beträgt am Plattenrand 2,8 Å (Rotation: 1,0°, Wellenlänge λ = 1,5418 Å).

4.3.2 Wildtyp *sspLS* Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung

Als Modell für die *PATTERSON*-Suche wurde ein konstruiertes Pentamer der ikosaedrischen Lumazin Synthase Struktur aus *Bacillus subtilis* (*bacLS*) (PDB Eintrag 1RVV) (Ritsert *et al.*, 1995) verwendet.

Die Orientierung und Positionierung des LS Pentameres erfolgte durch Rotationsuche und anschließender Translationssuche in der Raumgruppe $C222_1$ in einem Auflösungsbereich von 38 bis 4,5 Å mit dem Programm MOLREP (CCP4, 1994).

Das LS Pentamer konnte eindeutig mit einem Korrelationswert von 0,379 und einem *R*-Faktor von 52 % plaziert werden. Die Überprüfung der Kristallpackung der plazierten LS Pentamere zeigte sinnvolle Kristallkontakte zu symmetrieverwandten LS Molekülen.

Ein anschließendes *rigid body fitting* und *simulated annealing* des positionierten Suchmodelles mit dem Programm CNS Version 1.0 (Brünger *et al.*, 1998) führte zu einem ersten kristallographischen Arbeits-*R*-Faktor von 37,2 %. 10 % der Reflexe wurden zur Berechnung des freien *R*-Faktors herangezogen, der bei 38,6 % lag.

Die erste Verfeinerung der einzelnen Atompositionen unter Verwendung der Parameter von Engh und Huber (Engh und Huber, 1991) ließ den *R*-Faktor um weitere 10 % auf 28,2 % sinken. Die aus diesen Koordinaten berechnete $2F_o - F_c$ -Elektronendichte war von guter Qualität und erlaubte den manuellen Einbau der *sspLS* Aminosäuresequenz. Eine abschließende Verfeinerung der Atompositionen ergab *R*-Faktoren von 24,5 % (kristallographisch) bzw. 25,9 % (frei).

Die Verfeinerungsstatistik des ersten Wildtyp *sspLS* Datensatzes bis zur einer Auflösung von 2,8 Å ist in Tabelle 4.5 zusammengestellt.

Verfeinerungsstatistik des Wildtyp <i>sspLS</i> Atommodelles bis 2,8 Å	
Auflösungsbereich [Å]	38,5 – 2,8
Verwendete Reflexe ($I > 2,0\sigma(I)$)	25939
Vollständigkeit der Daten [%]	99,9
<i>R</i> -Faktor [%] *	24,5
<i>R</i> _{free} [%] #	25,9
<i>r.m.s.</i> -Abweichung vom Idealwert der	
Bindungslängen [Å]	0,008
Bindungswinkel [°]	1,36
Mittlerer B-Faktor, Protein [Å ²]	40,9
(Φ, Ψ) Winkel Verteilung im	
bevorzugten Bereich [%]	90,1
zusätzlich erlaubten Bereich [%]	8,3
weitläufig erlaubten Bereich [%]	1,6
verbotenen Bereich [%]	0,0

**R*-Faktor = $\frac{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$
#*R*_{free} berechnet mit 10 % Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden

Tabelle 4.5 Verfeinerungsstatistik des *sspLS* Atommodelles bis 2,8 Å

4.3.3 Kristallisation und Datensammlung von *sspLS* Komplexen und der Mutante W27G

Aus den faktoriellen *Screening*-Ansätzen zur Kristallisation der Wildtyp *sspLS* mit gebundenem Riboflavin konnte eine weitere Bedingung erhalten werden. Um den nach der Isolierung vorliegenden Gehalt an *sspLS* gebundenem Riboflavin von etwa 13 % (Fischer *et al.*, 2001) zu erhöhen und dadurch eine vollständige Belegung aller aktiven Zentren zu erreichen, wurde festes Riboflavin in 10fach molarem Überschuß zur *sspLS* Lösung (10 mg/ml) in 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, 100 mM KCl zugegeben. Überschüssiges Riboflavin wurde anschließend durch Ultrafiltration (0,22 µm) entfernt. Die erhöhte Riboflavinbindung der *sspLS* konnte durch eine tief gelborange Färbung der Proteinlösung beobachtet werden. Kristalle der gleichen gelborangen Färbung wuchsen nach 2 Tagen aus der optimierten Präzipitationsbedingung 0,1 M Citratpuffer pH 4.9 bis 5.2, 1,5 M Natriumformiat bis zu einer Größe von etwa 0,4 x 0,2 x 0,2 mm³ (siehe Bild a Abbildung 4.22).

Ein Kristall der Wildtyp *sspLS* in Komplex mit Riboflavin lieferte einen vollständigen Datensatz (**RIBO**) bis zu einer maximalen Auflösung von 2,4 Å.

Die Kristalle der Mutante W27G der *sspLS* (**W27G**) wurden aus 0,1 M Citratpuffer pH 5.6, 1 M Ammoniumdihydrogenphosphat erhalten (siehe Kristallbild d Abbildung 4.22).

Die Kristalle der Wildtyp *spsLS* mit ihren Inhibitoren 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)-2,4-pyrimidindion (**NRAP**) und 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (**CEOL**) konnten aus Co-Kristallisationsexperimenten erhalten werden. Die Inhibitoren wurden in einem 10fach molaren Überschuß zur *spsLS*-Proteinlösung (10 mg/ml) gegeben und die Kristallisationsansätze gegen 0,1 M Citratpuffer pH 5.0 bis 5.5, 300 mM bis 700 mM Ammoniumdihydrogenphosphat äquilibriert (siehe Kristallbilder b und c Abbildung 4.22).

Alle Kristallisationsansätze (*sitting drops*) setzten sich aus 2 µl Protein- und 2µl Präzipitanslösung gegen 300 µl Bodenpuffer zusammen und wurden 2 Tage bei RT äquilibriert (siehe 3.5.1).

Die Abbildung 4.22 zeigt die verschiedenen Co-Kristalle der Wildtyp *spsLS* und der Mutante W27G aus den jeweiligen Präzipitansbedingungen.

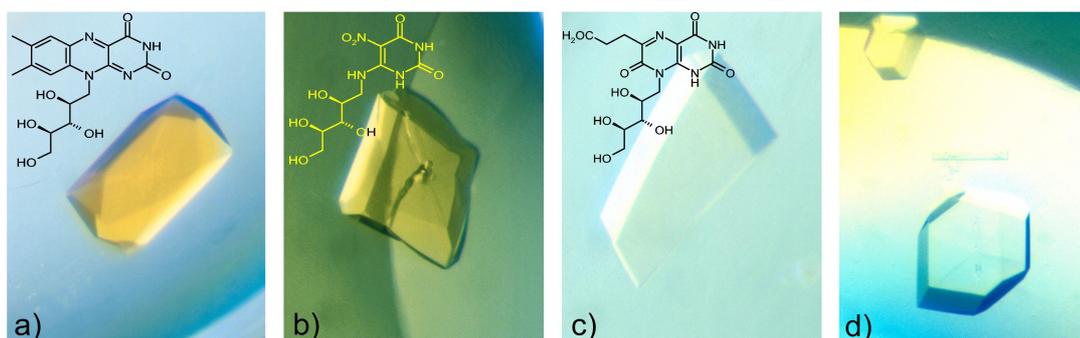


Abbildung 4.22 Kristalle der Wildtyp *spsLS* mit verschiedenen Substraten und der Mutante W27G
 a) Co-Kristall mit Riboflavin aus 0,1 M Citratpuffer pH 5.0, 1,5 M Na-formiat
 b) Co-Kristall mit Nitropyrimidindion aus 0,1 M Citratpuffer pH 5.2, 300 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
 c) Co-Kristall mit Carboxyethylumazin aus 0,1 M Citratpuffer pH 5.2, 600 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
 d) Kristall der Mutante W27G aus 0,1 M Citratpuffer pH 5.6, 1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

Die Röntgenbeugungsdaten von Kristallen der Wildtyp *spsLS* in Komplex mit Riboflavin und den Inhibitor-Co-Kristallen wurden bei RT mit einer *Image Plate* auf einem Röntgendrehanodengenerator aufgenommen (siehe 3.5.2).

Ein Nitropyrimidindion-Co-Kristall (NRAP) beugte bis zu einer maximalen Auflösung von 2,4 Å. Ein Co-Kristall des produktähnlichen Inhibitors Carboxyethylumazin (CEOL) erzielte eine Auflösung von 2,6 Å.

Die Beugungsdaten bis zu einer Auflösung von 2,0 Å eines W27G Kristalles wurden bei Raumtemperatur in einer Glaskapillare an der BW6 am DESY mit einem CCD

Detektor aufgenommen (siehe 3.5.2) und mit dem HKL-Programmpaket prozessiert (Otwinowski und Minor, 1997). Die Auswertung aller anderen Datensätze der *sspLS* erfolgte mit dem Programm MOSFLM (Leslie, 1998).

Die Prozessierungsstatistik der Datensätze RIBO, NRAP, CEOL und W27G ist in Tabelle 4.6 zusammengefasst.

Datenprozessierungsstatistik der gemessenen <i>sspLS</i> Kristalle				
Datensatz	RIBO	NRAP	CEOL	W27G
Raumgruppe	C222 ₁	C222 ₁	C222 ₁	C222 ₁
Zellkonstanten	a = 111,5 Å b = 145,52 Å c = 128,7 Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = 111,26 Å b = 145,04 Å c = 127,86 Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = 111,09 Å b = 145,18 Å c = 128,55 Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = 110,57 Å b = 144,02 Å c = 126,36 Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Einheitszellvolumen [Å ³]	2 088 219,3	2 063 296,1	2 073 260,3	2 012 193,5
Moleküle pro asym. Einheit	5	5	5	5
Auflösungsbereich	16,03 – 2,4 Å	15,6 – 2,4 Å	15,46 – 2,6 Å	20,0 – 2,0 Å
letzte Auflösungsschale	2,53 – 2,4 Å	2,53 – 2,4 Å	2,74 – 2,6 Å	2,03 – 2,0 Å
Begrenzende Auflösung	2,4 Å	2,4 Å	2,6 Å	2,0 Å
Unabhängige Reflexe [§]	40966	39592	32116	66756
Multiplizität	3,5	2,9	3,7	3,8
Vollständigkeit der Daten [%]	99,5 (99,5)	97,6 (97,6)	99,5 (99,5)	98,0 (98,0)
R_{merge}^*	0,078 (0,45)	0,07 (0,41)	0,07 (0,42)	0,051 (0,75)

* $R_{\text{merge}} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum I_i$, wobei I_i eine individuelle Messung der Intensität ist und $\langle I \rangle$ die gemittelte Intensität für diesen Reflex ist.
[§] Unabhängige Reflexe mit $I > 2,0\sigma(I)$
 Der in Klammern angegebene Wert entspricht der jeweiligen letzten Auflösungsschale

Tabelle 4.6 Datenprozessierungsstatistik der gemessenen *sspLS* Co-Kristalle und der Mutante W27G

4.3.4 Modellbau und Verfeinerung

Die *sspLS* Kristallstrukturen in ihren verschiedenen Komplexen RIBO, NRAP, CEOL und der Mutante W27G wurden mit dem Program CNS unter Verwendung der Parameter von Engh und Huber verfeinert (Engh und Huber, 1991). Als Atommodell diente die bei 2,8 Å verfeinerte Struktur der Wildtyp *sspLS* (siehe 4.3.2). Zu Beginn der Verfeinerungen wurden konventionelle *POWELL*-Energiminimierungsschritte und individuelle B-Faktor-Verfeinerungen im jeweiligen Auflösungsbereich der einzelnen Datensätze durchgeführt. His104 der jeweiligen Atommodelle wurde als multiples Konformer in die Elektronendichte eingebaut und verfeinert. Die jeweils fünf *ncs*-verwandten LS Untereinheiten des Pentamers in der asymmetrischen Einheit wurden mit *restraints* von 40 kcal/mol*Å² verfeinert. Die *r.m.s.*-Abweichungen der einzelnen Untereinheiten der Pentamere zueinander liegen in sehr guten Bereichen von 0,18 bis 0,28 Å für 146 C_α-Atome in

allen Atommodellen. Iterative Zyklen von Modellbau und Verfeinerungen, *bulk solvent* Korrektur und *restrained* individuelle B-Faktor-Verfeinerungen führten zu angemessenen kristallographischen *R*-Faktoren von 18,0 % (21,3 % freier *R*-Faktor) für die Komplexstruktur mit Riboflavin (**RIBO**), 18,3 % (21,3 %) (**NRAP**), 17,5 % (20,6 %) (**CEOL**) und 18,7 % (21,2 %) für die Struktur der Mutante **W27G**.

Eine detaillierte Verfeinerungsstatistik der *sspLS* Atommodelle ist in Tabelle 4.7 aufgeführt.

Verfeinerungsstatistik der <i>sspLS</i> Atommodelle				
	RIBO	NRAP	CEOL	W27G
Auflösungsbereich [Å]	16,03 – 2,4	15,6 – 2,4	15,46 – 2,6	20,0 – 2,0
Verwendete Reflexe ($I > 2,0\sigma(I)$)	40966	39592	32116	66756
Vollständigkeit der Daten [%]	99,5	97,6	99,5	98,0
<i>R</i> -Faktor [%] *	18,0	18,3	17,5	18,7
R_{free} [%] #	21,3	21,3	20,6	21,2
<i>r.m.s.</i> -Abweichung der				
Bindungslängen [Å]	0,012	0,009	0,009	0,012
Bindungswinkel [°]	1,75	1,43	1,44	1,59
Mittlerer B-Faktor, Protein [Å ²]	44,2	43,9	46,1	40,7
Mittlerer B-Faktor, Ligand [Å ²]	61,7	37,8	45,9	–
Mittlerer B-Faktor, Solvens [Å ²]	48,7	49,2	45,9	47,4
Mittlerer B-Faktor, Ion [Å ²]	49,8	39,8	55,6	–
Anzahl Proteinatome (nicht H)	5695	5713	5700	5677
Anzahl Ligandenatome (nicht H)	135	105	135	–
Anzahl ionischer Moleküle	25	25	25	–
Anzahl Wassermoleküle	94	127	45	205
(Φ, Ψ) Winkel Verteilung im				
bevorzugten Bereich [%]	96,0	94,8	95,6	96,4
zusätzlich erlaubten Bereich [%]	4,0	5,2	4,2	3,6
weitläufig erlaubten Bereich [%]	0,0	0,0	0,2	0,0
verbotenen Bereich [%]	0,0	0,0	0,0	0,0

R -Faktor = $\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum_{\text{hkl}} F_{\text{obs}}$
[#] R_{free} berechnet mit 10 % Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden

Tabelle 4.7 Verfeinerungsstatistik der *sspLS* Komplexstrukturen und der Mutante W27G

4.3.5 Qualität der Atommodelle

Alle *sspLS* Komplexstrukturen RIBO, NRAP, CEOL und die Struktur der Mutante W27G sind sehr gut in ihrer Elektronendichte definiert, mit Ausnahme einiger N-terminalen Aminosäuren. Letztere weisen Fehlordnung mit unterschiedlicher Länge von bis zu 11 Aminosäuren in den verschiedenen Untereinheiten der Pentamere auf. Das Fehlen jeglicher Elektronendichte für die N-terminalen Reste in den jeweiligen Untereinheiten zeigt deren hohe Beweglichkeit.

Das endgültige Modell der pentameren *sspLS* im Komplex mit Riboflavin (RIBO) umfasst 742 Reste (Untereinheit A, B und D 147 Aminosäuren, Untereinheit C 149 und E 152 Aminosäuren), fünf Riboflavin Moleküle und fünf Phosphatgruppen in der putativen Bindungsstelle des zweiten Substrates, 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat. Abgesehen von einigen auf der Oberfläche des *sspLS* Pentameres lokalisierten Seitenketten sind alle 742 Aminosäuren sehr gut in ihrer Elektronendichte definiert. In der Ramachandran-Darstellung der (Φ, Ψ)-Werte (Laskowski *et al.*, 1993) sind in *sspLS* mit Riboflavin 96 % der Aminosäuren (außer Glycin und Prolin) in dem am meisten bevorzugten Bereich und 4 % im zusätzlich erlaubten Bereichen zu finden.

Das endgültige Modell der *sspLS* im Komplex mit Nitropyrimidindion (NRAP) umfasst ebenfalls 742 Reste (Untereinheit A, B und D 147 Aminosäuren, Untereinheit C 149 und E 152 Aminosäuren), fünf NRAP-Moleküle und fünf Phosphatreste in der Bindungsstelle des zweiten Substrates. Eine Geometrie-Analyse des *sspLS* Modelles zeigt 94,8 % und 5,2 % der Aminosäuren in dem am meisten bevorzugten und den zusätzlich erlaubten Bereichen.

Das verfeinerte Modell der *sspLS* im Komplex mit Carboxyethylumazin (CEOL) besteht aus 744 Aminosäuren (Untereinheit A und C 149, B und D 147 und E 152 Aminosäuren), fünf CEOL-Moleküle und fünf Phosphatreste in der Bindungsstelle des zweiten Substrates, 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat.

Das Modell der Mutante W27G wird durch 746 Reste beschrieben (Untereinheit A und D 150, B 148, C 151 und E 147 Aminosäuren).

In der Ramachandran-Darstellung der (Φ, Ψ)-Werte sind für *sspLS* mit CEOL 95,6 % bzw. 4 % und für die Mutante W27G 96,4 % bzw. 3,6 % der Aminosäuren (außer Glycin und Prolin) in den am meisten bevorzugten und zusätzlich erlaubten Bereichen. Die Analyse zeigt auch, daß nur 0,2 % der Aminosäuren im weitläufig erlaubten Bereich liegen.

Die Parameter der Stereogeometrie der beschriebenen *sspLS* Modelle sind in der Tabelle 4.7 vergleichend aufgeführt.

4.3.6 Strukturbeschreibung einer *sspLS* Untereinheit

Übereinstimmend mit der Sekundärstruktur-Notation von Ladenstein an *bacLS* (Ladenstein *et al.*, 1988) besitzt *sspLS* eine $\beta_2\alpha_1\beta_3\alpha_2\beta_4\alpha_3\beta_5\alpha_4\alpha_5$ -Topologie. Die Abbildung 4.23 zeigt die Faltung und Abfolge der Sekundärstrukturelemente einer Untereinheit der pentameren *sspLS*.

Der Kern einer Untereinheit der LS aus *S. pombe* besteht aus einem zentralen

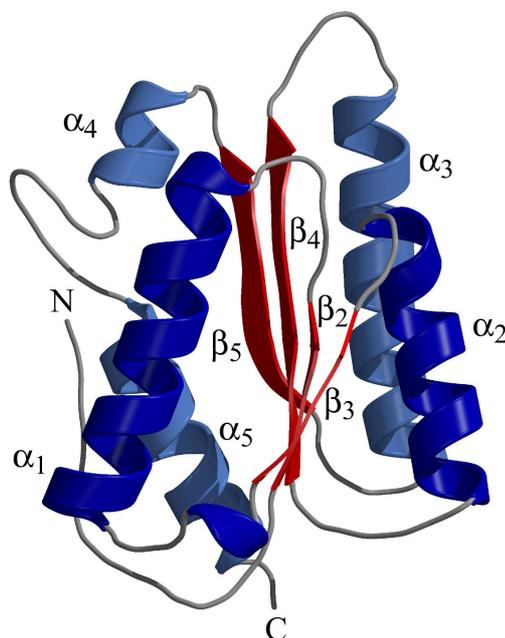


Abbildung 4.23 Abfolge der Sekundärstrukturelemente einer Untereinheit der *sspLS*. β -Faltblattstrukturen sind rot und Helix-Motive sind blau dargestellt.

parallelen β -Faltblatt mit vier Strängen

$\beta_2\beta_3\beta_4\beta_5$ (rot dargestellt), das auf

beiden Seiten durch zwei α -Helix

Motive $\alpha_1\alpha_4\alpha_5$ und $\alpha_2\alpha_3$ umgeben ist

(blau dargestellt). Alle bekannten

Kristallstrukturen der LS aus ver-

schiedenen Organismen beinhalten

drei Schichten ($\alpha/\beta/\alpha$), welche sie der

Klasse der α/β Proteine zuordnet. Die

LS aus *B. subtilis* (*bacLS*) (Ladenstein

et al., 1988; Ritsert *et al.*, 1995) (PDB

Eintrag 1RVV), *E. coli* (Mörthl *et al.*,

1996), *A. aeolicus* (PDB Eintrag

1HQK) (Zhang *et al.*, 2001) und

Spinat (*spiLS*) (Persson *et al.*, 1999)

(PDB Eintrag 1C2Y) zeigen in ihren Kristallstrukturen eine höhere Anordnung in

ihren Quartärstrukturen. Während 60 identische β -Untereinheiten dieser Enzyme

ikosaedrische Capside aufbauen, weist die LS aus *S. pombe* (*sspLS*) eine

homopentamere Struktur auf. Homologe LS Enzyme aus *S. cerevisiae* (*sacLS*) (PDB

Eintrag 1EJB) (Meining *et al.*, 2000), *M. grisea* (*magLS*) (PDB Eintrag 1C41)

(Persson *et al.*, 1999) und *B. abortus* (*bruLS*) (PDB Eintrag 1DIO) (Braden *et al.*,

2000) assemblieren ebenfalls pentamerisch.

Die monomeren Untereinheiten der verschiedenen LS Pentamere (*sspLS*, *sacLS*,

magLS und *bruLS*) und der Capside (*bacLS* und *spiLS*) überlagern mit geringen

r.m.s.-Abweichungen von 0,67 bis 1,01 Å. Dieses zeigt die strukturell sehr hohe Ähnlichkeit der Untereinheiten zueinander.

4.3.7 Anordnung der Untereinheiten zum *sspLS* Pentamer

Die Lumazin Synthase kommt in den verschiedenen Organismen entweder als Pentamer oder als ikosaedrisches Capsid vor. Die Anordnung der einzelnen monomeren Untereinheiten der *sspLS* zur Pentamer-Struktur ist in Abbildung 4.24 dargestellt.

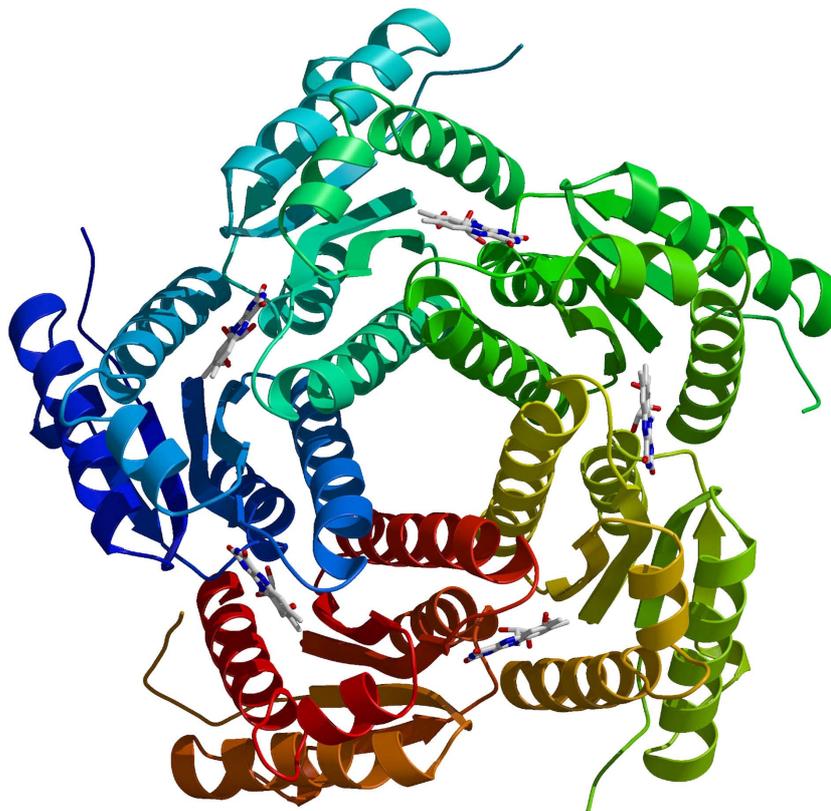


Abbildung 4.24 Ribbondarstellung des *sspLS* Pentameres im Komplex mit Riboflavin (*ball-and-stick*). Die innere Helix α_3 der einzelnen monomeren Untereinheiten bilden entlang der fünfzähligen, nicht-kristallographischen Symmetrieachse ein sehr stabiles, linksgängiges α -helikales Knäuel.

Bedingt durch die pentamere Anordnung der einzelnen Untereinheiten um die fünfzählige, nicht-kristallographische Symmetrieachse bildet die Helix α_3 im Inneren der *sspLS* eine Pore (siehe Abbildung 4.24) aus. Diese Pore besitzt einen überwiegend hydrophilen Charakter, der durch die Gegenwart von Glu100, Asp112,

Arg108 und His104 hervorgerufen wird. Der kürzeste Durchmesser der Pore beträgt 6,3 Å, gemessen zwischen His104 zweier gegenüberliegenden Untereinheiten. His104 weist in jeder Untereinheit des *sspLS* Pentameres multiple Konformationen auf. Ionische Wechselwirkungen zwischen Asp112 und Arg108` zweier benachbarter α_3 -Helices der Untereinheiten stabilisieren die Pentamerbildung.

4.3.8 Strukturvergleich zu Lumazin Synthasen anderer Organismen

Aus Überlagerungen monomerer Untereinheiten der Lumazin Synthase aus den verschiedenen Organismen können wichtige Erkenntnisse für die unterschiedlichen Formationen ihrer quartären Raumstruktur abgeleitet werden. Dazu wurde die Untereinheit der *sspLS* mit den monomeren Untereinheiten aus den Kristallstrukturen der ikosaedrischen *bacLS* und *spiLS*, sowie den pentameren Enzymen *sacLS*, *bruLS* und der *magLS* überlagert.

r.m.s.-Abweichungen zwischen 142 C α -Atome der *sspLS* mit:

<i>bacLS</i>	<i>spiLS</i>	<i>sacLS</i>	<i>bruLS</i>	<i>magLS</i>
0,90 Å	1,01 Å	0,88 Å	0,96 Å	0,67 Å

Tabelle 4.8 *r.m.s.*-Abweichungen der *sspLS* zu LS anderer Organismen

Der auffälligste Unterschied zwischen den jeweiligen Strukturen ist in der „Loop“-Region zwischen Helix α_4 und Helix α_5 lokalisiert (siehe Abbildung 4.23). In allen bekannten ikosaedrischen Strukturen weist diese verbrückende Schleife ein konserviertes G(T/G)K(A/H)GNKG-Motiv auf und schafft durch diese Sequenzabfolge multiple Kontakte zur Helix α_1 ` und Helix α_4 ` des benachbarten Pentameres in der jeweiligen Capsid-Struktur. In der Aminosäuresequenz der pentameren *sspLS* wird diese zur Bildung einer Capsid-Struktur notwendige Schleife durch die Insertion von Leu137 unterbrochen. Die dadurch bedingte Aufweitung der Schleife blockiert eine Anordnung der *sspLS* Pentamere zu einem Ikosaeder (60mer). Die Sequenz G(T/G)K(A/H)GNKG ist in allen ikosaedrischen Lumazin Synthasen aus Bakterien (Ladenstein *et al.*, 1988; Mörtl *et al.*, 1996) und Pflanzen (Jordan *et al.*, 1999; Persson *et al.*, 1999) streng konserviert.

Die Abbildung 4.25 zeigt die strukturellen Unterschiede der Lumazin Synthasen aus den verschiedenen Organismen.

Neben der unterschiedlichen Größe der Schleife („Loop“) ist auch die verschiedene Lage der N-terminalen Aminosäuren in den jeweiligen pentameren (N_p) oder ikosaedrischen (N_{ic}) Kristallstrukturen der Lumazin Synthasen zu beobachten.

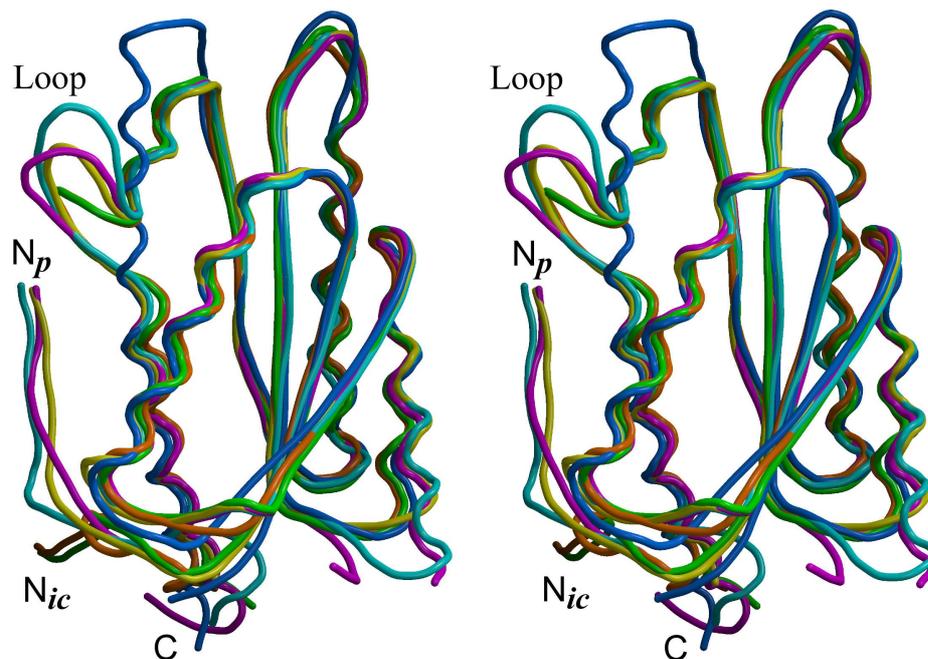


Abbildung 4.25 Stereodarstellung der Überlagerung je einer Untereinheit von pentameren (p) und ikosaedrischen (ic) Lumazin Synthasen. pentamerisch: *sspLS* (gelb), *bruLS* (blau), *magLS* (lila) und *sacLS* (hellblau). ikosaedrisch: *bacLS* (grün) und *spiLS* (orange).

In den Kristallstrukturen der ikosaedrischen LS (Ladenstein *et al.*, 1988; Persson *et al.*, 1999) scheint die Lage der N-terminalen Aminosäuren eine entscheidende Rolle bei der Formation eines 60meren Capsides zu spielen. Die N-terminalen Aminosäuren agieren als fünfter β -Faltblattstrang (β_1) mit dem zentralen viersträngigen Faltblatt einer benachbarten Untereinheit. Dadurch werden starke Pentamer-Pentamer-Kontakte ausgebildet und eine Formation zum Ikosaeder ermöglicht.

Die N-terminalen elf Aminosäuren der *sspLS* Untereinheiten erweisen sich als sehr beweglich und weichen stark in ihrer Lage zur der Orientierung der N-Termini in ikosaedrischen Strukturen ab (siehe Abbildung 4.25). Jedoch weisen alle N-Termini pentamerer LS diese abweichende Orientierung in gleicher Richtung auf.

Im Falle der definierten N-terminalen Reste 7 bis 12 der Untereinheit E der *sspLS* Struktur zeigt der N-Terminus in Richtung des Bereiches zwischen dem β_4 -Strang

und der Helix α_3 . Dadurch kommt Pro8 in einen Abstand von 4 Å nahe des im aktiven Zentrum konservierten Trp27` der benachbarten Untereinheit A` und besetzt somit die gegenüberliegende Seite der Substratbindungsstelle in der *spl*LS.

Das Vorhandensein von Pro8 und Pro10 ist verantwortlich für diese Konformation des N-Terminus. Diese Orientierung des N-Terminus in die große Tasche zweier benachbarter Untereinheiten zeigt sich in allen *spl*LS Atommodellen (RIBO, NRAP, CEOL und W27G), übereinstimmend mit den Beobachtungen in den Strukturen der *sac*LS und der *mag*LS.

4.3.9 Bindung von Riboflavin

Die fünf topologisch äquivalenten Bindungsstellen der pentameren Lumazin Synthase sind in einer großen Tasche zwischen benachbarten Untereinheiten des Pentameres lokalisiert. Dort werden zwei Substrate gebunden: 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat und 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (siehe Reaktionsschema in Abbildung 2.3). Die Bindungsstelle der letzteren Verbindung ist durch die Kristallstrukturen der *bacLS* in Komplex mit der Inhibitor Verbindung 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (NRAP) (Ritsert *et al.*, 1995), sowie durch *magLS* und *spiLS* in Komplex mit 5-Nitroso-6-(D-ribitylamino)-2,4-pyrimidindion umfassend charakterisiert (Persson *et al.*, 1999) worden. Die Bindungsstelle des zweiten Substrates (3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat) wurde durch die *sacLS* Kristallstruktur in Komplex mit (6-D-Ribitylamino-2,4-dihydroxy-pyrimidin-5-yl)-1-pentyl-phosphonsäure verifiziert (Meining *et al.*, 2000).

Die Lumazin Synthase aus *S. pombe* (*sspLS*) zeigt als erstes Enzym ein völlig neuartiges Merkmal: die Fähigkeit zur Bindung von Riboflavin mit hoher Affinität (Fischer *et al.*, 2001).

Riboflavin ist das eigentliche Produkt des im Biosyntheseweg nachfolgenden Enzymes, der Riboflavin Synthase. Die Überlagerungen der oben genannten Kristallstrukturen mit dem Atommodell der *sspLS* (RIBO) zeigen, daß das ligandierete Riboflavin als kompetitiver Inhibitor im aktiven Zentrum agiert. Ermittelte K_I -Werte von 17 μ M bestätigen diese Annahme (Fischer *et al.*, 2001).

Ein gebundenes Phosphation in der *bacLS* Struktur läßt die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Bindungsstelle im Protein vermuten. Diese Annahme wurde durch die *sacLS* Kristallstruktur mit dem Inhibitor (6-D-Ribitylamino-2,4-dihydroxy-pyrimidin-5-yl)-1-pentyl-phosphonsäure bestätigt. Die Phosphonatgruppe der Inhibitorverbindung wurde an gleicher Bindungsstelle identifiziert und wechselwirkt mit dem Guanidiniumsystem des konservierten Arg136 der *sacLS* Struktur.

In den vorliegenden *sspLS* Atommodellen konnte je ein Phosphat in der zweiten Substratbindungsstelle des Enzymes identifiziert werden. Der Phosphatrest interagiert mit dem Guanidiniumsystem des entsprechenden Arg133 der *sspLS* Struktur.

Wie bereits erwähnt, wird das aktive Zentrum durch zwei benachbarte Untereinheiten gebildet. Von der Untereinheit A nehmen die Reste zwischen dem Strang β_2 und der Helix α_1 , zwischen dem Strang β_3 und der Helix α_2 und der Strang β_4 und die Helix α_3 teil. Die Untereinheit B` steuert Reste des Stranges β_5 ` und Reste der Helices α_4 ` und α_5 ` zur Bildung der Substratbindungsstelle bei.

Der Isoalloxazinring des Riboflavin-Moleküles ist in einer überwiegend hydrophoben Tasche, die durch Trp27, Val86, Leu87, Ile88 und His94 gebildet wird, gebunden. Wasserstoffbrückenbindungen zu polaren Gruppen des Riboflavinringes werden durch einige Haupt- und Seitenketten-Kontakte des Proteins ausgebildet. Das Carbonyl-Sauerstoffatom von Val86 wechselwirkt mit der Imidogruppe N3 des Isoalloxazinringesystems. Weitere Wechselwirkungen werden durch die Ring-Sauerstoffatome O2 und Ser62-N, O4 und Ile88-N und O2 und Ser62-O γ ausgebildet (siehe Abbildung 4.27).

Der Isoalloxazinring vom Riboflavin ist im aktiven Zentrum der *sspLS* haupt-

sächlich durch zwei aromatische Packungskontakte gebunden. Das Indolsystem von Trp27 ist in einer nahezu parallelen Orientierung zum Isoalloxazinring des Riboflavins mit einem Abstand von ca. 3,4 Å. Auf der gegenüberliegenden Seite des Riboflavins ist His94 mit einem Abstand von von ca. 3,2 Å in einem zweiten aromatischen Kontakt. Das Riboflavin ist somit in einer Art „sandwich“-Packung zwischen den beiden aromatischen Ringsystemen

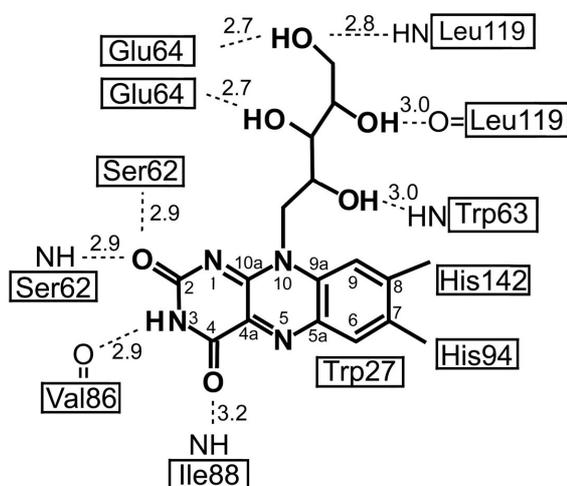


Abbildung 4.27 Schematische Darstellung der Riboflavinbindung im aktiven Zentrum der *sspLS*. Die Aminosäure Leu119 nimmt von einer benachbarten Untereinheit teil.

von Trp27 und His94 der *sspLS* fest gebunden.

In allen LS Sequenzen (siehe dazu Vergleich in Abbildung 4.26) ist entweder die aromatische Aminosäure Tryptophan (*S. pombe*) oder Phenylalanin (*S. oleracea*) in strukturell gleicher Position in Bezug auf Phe22 der *bacLS*. Dieses unterstreicht die Möglichkeit zur Ausbildung aromatischer Wechselwirkungen als wichtigstes Kriterium zur Substratbindung.

Die hohe Affinität der *sspLS* zu Riboflavin ($K_D = 1,2 \mu\text{M}$ ermittelt aus Gleichgewichtsdialysen) (Fischer *et al.*, 2001) ist eine neuartige Eigenschaft einer regulativen „*feedback*“-Inhibition der Lumazin Synthase durch Riboflavin, dem Produkt der Riboflavin Synthase. Um unligandierte *sspLS* zu erhalten, müssen relativ drastische Renaturierungsbedingungen (5 M Harnstoff) geschaffen werden, um das gebundene Riboflavin aus dem partiell aufgefalteten aktiven Zentrum auszulösen.

Dieses bemerkenswerte Merkmal wurde bei keiner LS aus den verschiedensten Organismen während der Genexpression oder Isolierung zuvor beobachtet, obwohl *sacLS* und *magLS* keine strukturellen Unterschiede in ihrer Substraterkennung zeigen.

Die Aminosäuren, die äquivalent zu Trp27 und His94 des aktiven Zentrums der *sspLS* sind, sind in der *magLS* (Trp25 und His127) und in der *sacLS* (Trp27, His98) Kristallstruktur mit gebundenen substratähnlichen Inhibitoren vorhanden, aber eine Fähigkeit zur Bindung von Riboflavin konnte nicht beobachtet werden (Persson *et al.*, 1999).

Die Ribityl-Seitenkette des gebundenen Riboflavin ist in einer hydrophile Tasche, die überwiegend von der benachbarten Untereinheit gebildet wird, plaziert. Die OH2 Hydroxyl-Gruppe des Zuckerrestes wird durch Wasserstoffbrückenbindung zum Hauptketten-Stickstoffatom von Trp63 gebunden. Die Hydroxyl-Gruppen OH3 und OH5 wechselwirken über Wasserstoffbrücken mit der Carboxyl-Seitenkette des streng konservierten Glu64 der Untereinheit A. Zusätzlich bilden die Hydroxyl-Gruppe OH5 zum Hauptketten-Stickstoffatom und die OH4-Hydroxyl-Gruppe zum

Carbonyl-Sauerstoffatom von Leu119' der Untereinheit B' weitere Wasserstoffbrückenbindungen.

Die Abbildung 4.28 zeigt diese Bindungsverhältnisse des Riboflavins im aktiven Zentrum der Wildtyp *sspLS*.

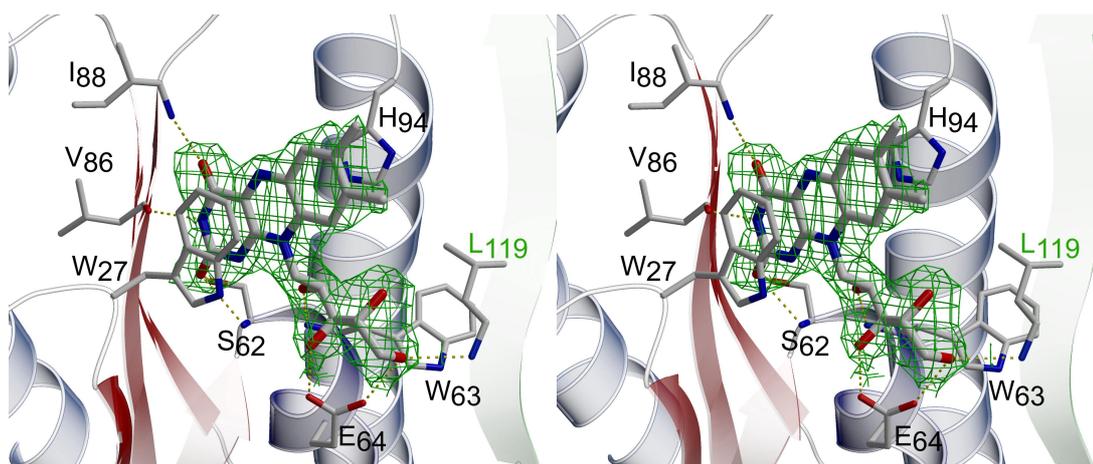


Abbildung 4.28 Stereoabbildung der Riboflavinbindung im aktiven Zentrum zweier benachbarter Wildtyp *sspLS* Untereinheiten. Die zweite Untereinheit ist grün dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen des Proteins zum Riboflavin sind eingezeichnet. Die $2F_o - F_c$ Elektronendichtekarte des Riboflavins ist bei 1σ konturiert.

4.3.10 Bindung des substratähnlichen Inhibitors

Der Inhibitor 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion ist strukturell dem natürlichen Substrat der Lumazin Synthase sehr ähnlich und konkurriert mit dem Riboflavin um dieselbe Bindungsstelle. Der Isoalloxazinring des Riboflavin-Moleküles wird durch den Pyrimidinring des Inhibitors in der hydrophoben Region (Trp27, Val86, Leu87, Ile88) verdrängt. Während die Ribitylkette in derselben hydrophilen Umgebung (Trp63, Glu64, Leu119') gebunden ist. Der Pyrimidinring steht zu Trp27 in hydrophober Wechselwirkung mit einer Distanz von 3,5 Å. Die peptidischen Amidgruppen von Ser62 und Ile88 sind über Wasserstoffbrücken direkt mit den O2 und O4 Carbonylfunktionen des Pyrimidinliganden gebunden. Das Hauptketten-Sauerstoffatom von Val86 steht in starkem Kontakt zum N3-Amid-Atom des Inhibitor-Moleküles. Die Hydroxyl-Gruppe der Seitenkette von Ser62 macht eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zum O2 Carbonyl-Sauerstoff des Liganden. Die Ribityl-Hydroxyl-Gruppen (OH2) und (OH5) sind über Wasserstoffbrücken zu Hauptketten-Stickstoffatomen von Trp63 und Leu119' der benachbarten

Untereinheit gebunden, während die in der Elektronendichte sehr gut definierte Aminosäure Glu64 durch zwei Wasserstoffbrücken die Ribityl-Hydroxyl-Gruppen (OH3) und (OH5) bindet. Eine unterschiedliche stereochemische Konformation der Hydroxyl-Gruppen, wie sie in Arabityl- oder in Xylityl-Zuckerresten vorkommen, würde die optimale Anordnung zu Glu64 verhindern (Ritsert *et al.*, 1995).

Ein anorganischer Phosphatrest ist in der Bindungsstelle des 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat sehr gut definiert. Das Phosphat ist in einem Abstand von 6,2 Å zum Pyrimidinring und 4,0 Å zur Nitrogruppe des Liganden überwiegend durch Hauptkettenwechselwirkungen von Ser91 und Thr92 und durch Wechselwirkungen zur Seitenkette von Arg133` der zweiten Untereinheit gebunden.

Die Abbildung 4.29 zeigt die vollständige Verdrängung des Riboflavins durch den Inhibitor 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (NRAP) in der Wildtyp *sspLS* und dessen Bindung im aktiven Zentrum.

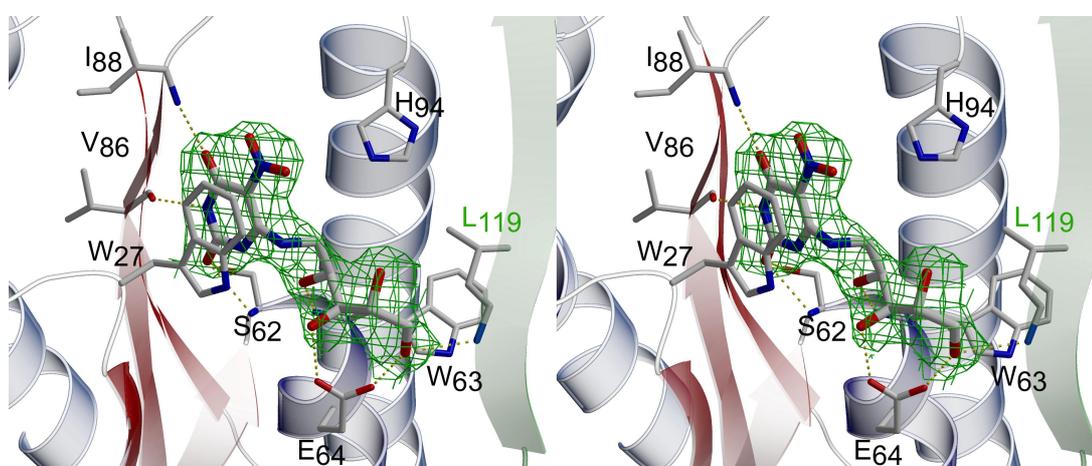


Abbildung 4.29 Stereoabbildung der Inhibitor-Bindung im aktiven Zentrum zweier benachbarter Wildtyp *sspLS* Untereinheiten. Das natürlich gebundene Riboflavin ist vollständig durch den Inhibitor NRAP verdrängt. Die benachbarte Untereinheit ist grün dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen des Proteins zum Liganden sind eingezeichnet. Die $2F_o - F_c$ Elektronendichtekarte vom NRAP ist bei 1σ konturiert.

4.3.11 Bindung des produktähnlichen Inhibitors

Um weitere Informationen über den regulativen Effekt durch die Bindung von Riboflavin der Wildtyp *sspLS* zu erlangen, wurde das Enzym mit einem Carboxyethyl-Lumazin-Derivat des eigentlichen Produktes der Reaktion, dem 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin kokristallisiert. Das im aktiven Zentrum fest gebundene

Inhibitormolekül 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin ist ebenfalls in der Elektronendichtekarte bei 2,6 Å wohl definiert und ist auch in der Lage, Riboflavin zu verdrängen.

Der produktanaloge Inhibitor ist in der gleichen Weise über hauptsächlich aromatische Packungskontakte gebunden, wie das zuvor beschriebene Riboflavin (siehe 4.3.9) oder der substratanaloge Inhibitor (siehe Abbildung 4.29). Der Lumazinring ist über aromatische Kontakte mit einem Abstand von 3,4 Å zu Trp27 des aktiven Zentrums gebunden. Die peptidischen Amidgruppen von Ser62 und Ile88 stehen mit einem Abstand von 3,0 Å in Wasserstoffbrückenbindungen zu den O2 und O4 Carbonyl-Gruppen des Lumazinringes des Liganden.

Das Hauptketten-Sauerstoffatom Val86 ist mit 2,6 Å stark zum N3-Stickstoff-Ringatom wasserstoffverbrückt. Das Seitenketten γ -O-Atom von Ser62 ist einer zweiten hydrophilen Wechselwirkung zur O2-Carbonylgruppe des Lumazinliganden gebunden. Die Bindungsverhältnisse der Ribityl-Seitenketten des Lumazinderivates ist exakt die gleiche, wie im Falle der Riboflavinbindung oder der des Nitro-pyrimidindions.

In Abbildung 4.30 ist die vollständige Verdrängung des Riboflavins durch das Produktderivat Carboxyethylumazin (CEOL) in der Wildtyp *sspLS* und die Bindung des Inhibitors im aktiven Zentrum gezeigt.

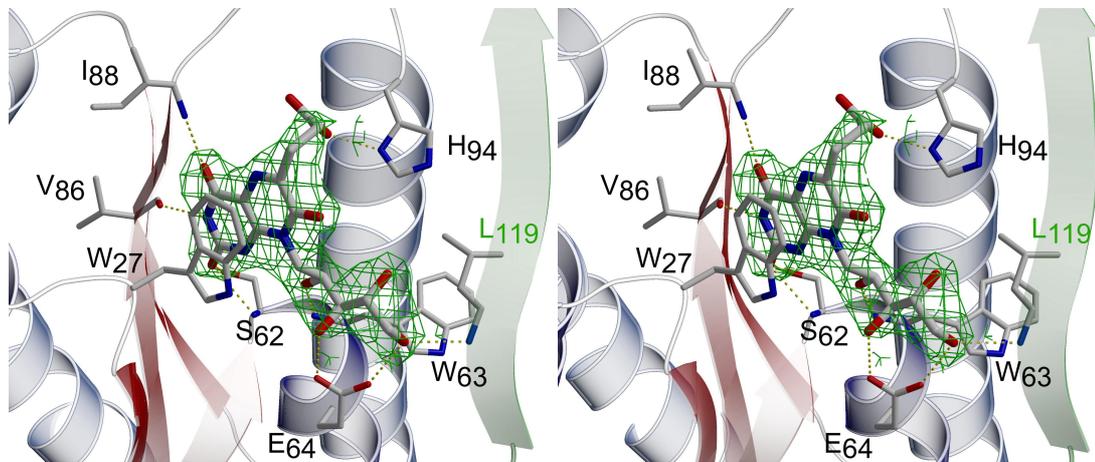


Abbildung 4.30 Stereoabbildung der Produkt-Inhibitor-Bindung im aktiven Zentrum zweier benachbarter Wildtyp *sspLS* Untereinheiten. Das natürlich gebundene Riboflavin ist vollständig durch das Produkt-Derivat CEOL verdrängt. Die benachbarte Untereinheit ist grün dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen des Proteins zum Liganden sind eingezeichnet. Die $2F_o - F_c$ Elektronendichtekarte vom CEOL ist bei 1σ konturiert.

Im Vergleich zur Bindung des substratähnlichen Inhibitors in Abbildung 4.29, bei der keinerlei Wechselwirkungen von His94 zum Liganden beobachtet werden konnten, sind auftretende hydrophobe Wechselwirkungen zum C6-Kohlenstoffatom des Lumazinringes erwähnenswert. Des weiteren ist das γ -N-Seitenkettenatom His94 über Wasserstoffbrückenbindung mit einem Abstand von $2,4 \text{ \AA}$ zur Carboxyl-Gruppe des Carboxylethyl-Substituenten gebunden.

Die hydrophoben Wechselwirkungen von His94 des aktiven Zentrums ist ein wichtiges Merkmal für die in 4.3.9 beschriebene Bindung von Riboflavin.

4.3.12 Diskussion

6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase (Lumazin Synthase, **LS**) katalysiert die Umsetzung von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4-(1*H*,3*H*)-pyrimidindion **2** mit S-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat **1** unter Phosphatabspaltung zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin **3**. Zwei Lumazinmoleküle dismutieren in der nachfolgenden Reaktion unter Katalyse der Riboflavin Synthase (**RS**) zu Riboflavin. Dabei wird das Substrat **2** der LS Reaktion wieder zurückgebildet.

Die Bindung von Riboflavin

Bei den Arbeiten zur Expression und Reinigung der LS aus *Schizosaccharomyces pombe* (*sspLS*) (Fischer *et al.*, 2001) wurde die Fähigkeit des Enzymes zur Bindung von Riboflavin aus der Umgebung festgestellt. Dieses Merkmal der Riboflavinbindung mit hoher Affinität war insofern überraschend, da bereits eine Vielzahl homologer bakterieller, fungaler und pflanzlicher LS exprimiert, gereinigt und auch kristallisiert wurden (Eberhardt *et al.*, 1996; Jordan *et al.*, 1999; Meining *et al.*, 2000; Meining *et al.*, 1998; Persson *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001). Alle diese LS zeigten jedoch nicht die beobachtete Fähigkeit zur Ligandierung von Riboflavin. Diese Fähigkeit ist allein dadurch bei *sspLS* zu detektieren, daß die Proteinlösung durch gebundenes Riboflavin gelb erscheint, riboflavinfreies Protein dagegen ist farblos. Ein vermuteter Mechanismus der regulativen *feedback*-Inhibition der *sspLS* durch gebundenes Riboflavin konnte durch biochemische Daten bestätigt werden (Fischer *et al.*, 2001). Eine röntgenkristallographische Bestimmung der Riboflavin-*sspLS*-Komplexstruktur (RIBO) zeigt, daß Riboflavin, wie angenommen, in die Substratbindungsstelle der *sspLS* bindet. Durch eine Reihe von Kristallstrukturen von LS anderer Organismen in Gegenwart verschiedener substratähnlicher Inhibitoren konnte schon früh die genaue Lage des aktiven Zentrums zwischen Kontaktstellen benachbarter Untereinheiten lokalisiert werden (Ladenstein *et al.*, 1988; Persson *et al.*, 1999; Ritsert *et al.*, 1995). Durch Überlagerungen dieser Komplex-Kristallstrukturen zeigt sich, daß Riboflavin um dieselbe Bindungsstelle mit den substratanalogen Inhibitoren konkurriert. Um ein besseres Verständnis der einzigartigen Fähigkeit des aktiven Zentrums der *sspLS* zu erlangen, wurden

erfolgreich Co-Kristallisationsexperimente mit einem substratähnlichen Inhibitor 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4-(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (NRAP) und der produktähnlichen Verbindung 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (CEOL) unternommen und nachfolgend die Kristallstrukturen beider Komplexmodelle aufgeklärt. Dabei ließ sich das mit einem $K_D = 1,2 \mu\text{M}$ gebundene Riboflavin aus der Substratbindungsstelle verdrängen. Der relative hohe Temperaturfaktor des Riboflavins von $61,7 \text{ \AA}^2$ gegenüber dem mittleren B-Faktor des Proteinmodelles ($44,2 \text{ \AA}^2$) läßt erwarten, daß Riboflavin vom Protein schwach gebunden wird und dadurch leicht durch die Inhibitoren zu verdrängen ist, die in ihrer chemischen Struktur sehr dem natürlichen Substrat bzw. Produkt ähneln. NRAP und CEOL weisen mit Werten von $37,8 \text{ \AA}^2$ bzw. $45,9 \text{ \AA}^2$ geringere Temperaturfaktoren auf. Alle Liganden (RIBO, NRAP, CEOL) sind dabei sehr gut in ihrer Elektronendichte definiert.

Aminosäuresequenzen aller bekannten LS weisen entweder die aromatischen Reste Tryptophan (*Saccharomyces cerevisiae*, *sacLS*) oder Phenylalanin (*Bacillus subtilis*, *bacLS*) an der Position Phe22 auf, bezogen auf die Struktur der *bacLS*. Die Möglichkeit zur Ausbildung aromatischer Packungskontakte dieser wichtigen Aminosäuren des aktiven Zentrums ist von entscheidender Bedeutung für die Substratbindung, als auch für die Bindung von Riboflavin in der *sspLS*, die an dieser Position ebenfalls ein Tryptophan (Trp27) aufweist. Die Mutation Trp27 zu Gly (W27G) bestätigte diese Annahme. Die Mutante W27G besitzt keine Fähigkeit zur Bindung von Riboflavin, sie exprimiert als farbloses Protein. Der Isoalloxazinring des Riboflavins ist in der *sspLS* überwiegend durch zwei aromatische „*stacking*“-Kontakte sandwichartig gebunden. Das Indolsystem von Trp27 steht mit einem Abstand von $3,4 \text{ \AA}$ in nahezu paralleler Orientierung und besetzt eine Seite des Liganden. Auf der gegenüberliegenden Seite des Riboflavins bildet His94 einen zweiten wichtigsten aromatischen Kontakt aus. Dieses neuartige Merkmal der *feedback*-Inhibition der *sspLS* durch Riboflavin ist daher so interessant und überraschend, weil die Sequenzen der *sacLS* und der *magLS* auf keinerlei Unterschiede in der Substraterkennung hinweisen. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums der *sspLS* (Trp27 und His94) sind ebenso in der *sacLS* Struktur an äquivalenter Position (Trp27 und His98) konserviert wie in der *magLS* (Trp25, His127) Kristallstruktur.

Dennoch wurde keine Fähigkeit beider Enzyme zur Bindung von Riboflavin je beschrieben (Meining *et al.*, 2000; Persson *et al.*, 1999). Ritsert *et al.* diskutierte an der Struktur des *bacLS* eine gewisse Mobilität des His88 (Position His94 in der *sspLS*) aufgrund hoher B-Faktoren und dadurch die Möglichkeit einer Protonenabstraktion vom Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (Ritsert *et al.*, 1995). His94 in der *sspLS* weist mit durchschnittlich 36 \AA^2 allerdings keine erhöhten Temperaturfaktoren auf, verglichen zu den Werten des gesamten Proteinmodelles. Mutagenesestudien an *bacLS* widerlegten durch Austausch von His88 gegen Ser allerdings die Annahme, daß His88 für die Lumazinbildung eine mechanistische Rolle einnimmt. Entgegen der Erwartungen besitzt die Mutante H88S der *bacLS* Lumazinsynthaseaktivität (Kis, 1994). Jedoch konnte eine gewisse Beweglichkeit des korrespondierenden His94 der *sspLS* in den Komplexstrukturen RIBO, NRAP und CEOL beobachtet werden. Bei der Bindung von Riboflavin in Abbildung 4.28 ist His94 deutlich in die Substratbindungsstelle orientiert und ist dadurch in der Lage, einen zweiten, möglicherweise wichtigen, aromatischen Kontakt zum Isoalloxazinring zu machen. Im aktiven Zentrum des CEOL-Atommodelles in Abbildung 4.30 ist His94 aus der Bindungsstelle herausgedreht und leicht verkippt. Aus Sequenzvergleichen (siehe Abbildung 4.26) und Überlagerungen der bis dahin bekannten LS können Erklärungen für die ungewöhnliche Art der Riboflavinbindung der *sspLS* abgeleitet werden. Da eine genaue Betrachtung der direkten Ligandierung des Riboflavin keinen Aufschluß darüber erbrachte, mußte die Annahme getroffen werden, daß womöglich Unterschiede in einer weiteren Koordinationssphäre des Riboflavins gefunden werden. Die *sspLS* weist an der Position 119 ein Leucin auf, während alle anderen LS an dieser Stelle ein konserviertes Phenylalanin aufweisen, mit Ausnahme der *B. abortus* LS, das dort ein Serin besitzt. Die *bruLS* Sequenz besitzt zwar ebenfalls den aromatischen Rest Trp20, weist aber eine Verschiebung der zweiten wichtigen Aminosäure His89 durch ein Arginin an der korrespondierenden Stelle 89 auf. Arg89 nimmt somit in Überlagerungen den Platz des Histidins ein. Dieses bedingt einen größeren Abstand zur Inhibitorverbindung und somit ist vermutlich die *bruLS* nicht in der Lage, Riboflavin zu binden (Braden *et al.*, 2000).

Die Abbildung 4.31 zeigt die Überlagerung der aktiven Zentren des *sps*LS Struktur (rot) und gebundenem Riboflavin (gelb) mit der Struktur der am nächsten verwandten *sac*LS (blau) mit gebundenem Inhibitor 6-D-Ribitylamino-2,4-dihydroxy-pyrimidin-5-yl)-1-pentyl-phosphonsäure (grün) (Meining *et al.*, 2000).

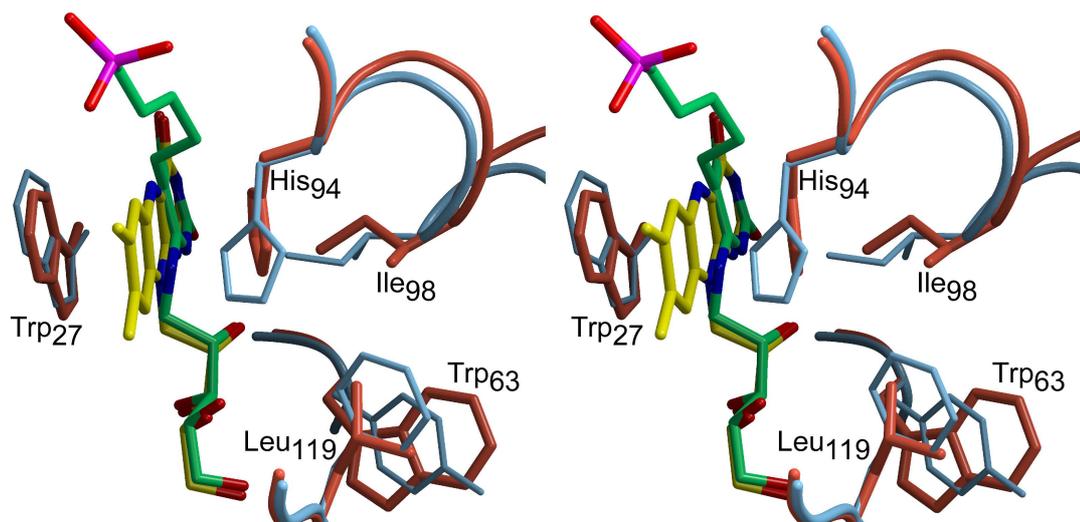


Abbildung 4.31 Stereodarstellung der Überlagerung der aktiven Zentren der *sps*LS Struktur (rot) und gebundenem Riboflavin (gelb) und der *sac*LS (blau) mit gebundenem Inhibitor 6-D-Ribitylamino-2,4-dihydroxy-pyrimidin-5-yl)-1-pentyl-phosphonsäure (grün). Die Numerierung der Reste ist bezogen auf die Sequenz der *sps*LS.

Eine Überlagerung der C_{α} -Atome der Reste Trp27, His94 und Leu119 der *sps*LS mit den korrespondierenden Resten Trp26, His97 und Phe122 der *sac*LS könnte trotz einer sehr geringen *r.m.s*-Abweichung von 0,23 Å eine mögliche Erklärung für die Riboflavinbindung der *sps*LS geben. Während die C_{α} -Atome der Reste Trp27 und His94 der *sps*LS mit den Positionen der Reste Trp26 und His97 der *sac*LS exakt übereinstimmen, tritt eine Verschiebung des konservierten Ile98 der *sps*LS um etwa 1 Å gegenüber Ile101 der *sac*LS auf. Grund dafür ist die erhöhte räumliche Ausdehnung von Phe122 der *sac*LS gegenüber Leu119 der *sps*LS an dieser Position. Durch Phe122 wird Ile101 der *sac*LS nach oben gedrückt, was zur Folge hat, daß sich der Abstand zum gebundenen Liganden vergrößert. Gleichzeitig wird eine zusätzliche Ligandenbindung durch His97 der *sac*LS durch Ile101 sterisch gehindert. His97 könnte sich somit nicht mehr in das aktive Zentrum orientieren. Die unterschiedliche Orientierung der Reste His94 der *sps*LS (rot) und His97 der *sac*LS (blau) ist deutlich in Abbildung 4.31 zu sehen. Weiteren Aufschluß über die

Richtigkeit dieser Annahme der Riboflavinbindung könnte die Röntgenstrukturanalyse einer Mutante L119F der *spsLS* geben. Diese Mutante L119F der *spsLS* sollte aller Voraussicht nach nicht die Fähigkeit haben, Riboflavin zu binden, da sie durch den Aminosäureaustausch eine der *sacLS* ähnliche Aktivzentrumsgeometrie besitzen sollte.

4.4 Strukturlösung der Riboflavin Synthase aus *S. pombe*

4.4.1 Kristallisation, Datensammlung und Strukturlösung durch Multiple Anomale Dispersion (MAD)

Kristalle der Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* (*spsRS*) im Komplex mit substratanalogen Inhibitor 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (CEOL) wurden durch *sitting drops* erhalten (siehe 3.5.1). Festes CEOL wurde in 10fach molarem Überschuß zur *spsRS* Lösung (9 mg/ml) gegeben und die Mischung anschließend durch Ultrafiltration (0,22 µm) für die Kristallisation vorbereitet. Hierzu wurden 2 µl *spsRS* (9 mg/ml) in 20 mM Tris/HCl pH 7.0, 100 mM KCl, CEOL mit 2 µl Reservoirlösung (65 % (v/v) MPD, 0,1 M Bicine pH 9.0) gemischt. Die Kristalle wuchsen innerhalb weniger Tage bei Raumtemperatur zu einer ausreichenden Größe von ca. 0,2 x 0,05 x 0,05 mm³. Diese Kristallisationsbedingung erwies sich aufgrund der hohen MPD Konzentration als cryotauglich und ein erster nativer Cryodatensatz (NATI) mit einer Auflösung von 2,7 Å wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie mit einer *Image Plate* auf einem Röntgendrehanodengenerator aufgenommen.

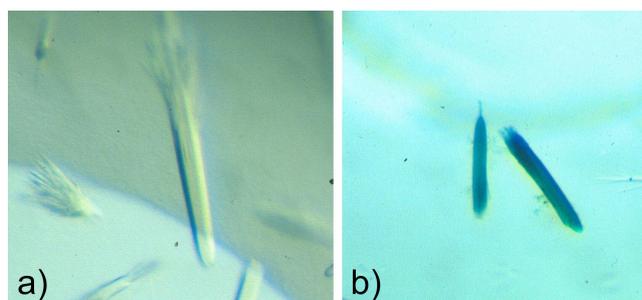


Abbildung 4.32 Kristalle der Wildtyp *spsRS* in a) 65 % (v/v) MPD, 0,1 M Bicine pH 9.0 und b) Schweratom-Soak mit $[Ta_6Br_{12}]^{2+}$ der gleichen *spsRS* Kristalle. Die grüne Färbung der Kristalle durch den Tantalbromid-Cluster ist deutlich zu erkennen.

Um Derivate der *sspRS* zu erhalten, wurden native Kristalle (NATI) mit verschiedenen Schweratomlösungen inkubiert. Durch ein einstündiges Einlegen der Kristalle in 2 mM Thimerosal (Natriumethylmercurithiosalicylat, $C_2H_5-HgS-C_6H_4COONa$), 65 % (v/v) MPD, 0,1 M Bicine pH 9.0 und durch soaken der nativen Kristalle mit festem Tantalbromid über Nacht, konnten zwei unabhängige Schweratomderivate (Hg-DERI 1 und Ta-DERI 2) erhalten werden. Bei der anschließenden Berechnung der Differenz-*PATTERSON*-funktionen zwischen NATI und den entsprechenden Derivaten wurden die möglichen Schweratompositionen der Hg-Atome vom Hg-DERI 1 und des $[Ta_6Br_{12}]^{2+}$ -Clusters vom Ta-DERI 2 eindeutig identifiziert. Durch eine zusätzliche Inkubation eines Tantal-Derivat-Kristalles in 2 mM Thimerosal, 65 % (v/v) MPD, 0,1 M Bicine pH 9.0 und Identifizierung der eventuellen Schweratomlagen über die Differenz-*PATTERSON*-funktion konnte ein drittes unabhängiges Hg/Ta-Doppelderivat (DERI 3) charakterisiert werden.

Von diesem gesicherten Hg-Derivat (Hg-DERI 1) wurden MAD-Daten am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg aufgenommen (siehe 3.5.2.)

Der Autoindizierungsalgorithmus nach Kabsch (Kabsch, 1988) lieferte eine hexagonale Gittermetrik mit Gitterkonstanten von $a = b = 70,32 \text{ \AA}$ und $c = 93,2 \text{ \AA}$ und Winkeln von $\alpha = \beta = 90^\circ$ und $\gamma = 120^\circ$. Die Auswertung des Datensatzes ergab Reflexe beginnend ab $h = k = 0$ und $l = 6$ mit charakteristischen Auslöschungen entsprechend $000l = 6n$. Die Existenz nur jedes sechsten $000l$ -Reflexes wies auf eine Zuordnung der Raumgruppe $P6_1$ oder $P6_5$ hin.

Das Verhältnis von Zellvolumen zu molekularer Masse $V_m = 3,0 \text{ \AA}^3/\text{Dalton}$ (Matthews, 1968) zeigt das Vorliegen eines *sspRS* Monomeres in der asymmetrischen Einheit mit einem Solvengehalt von 59 % an.

Die Abbildung 4.33 zeigt eine Diffraktionsaufnahme aus dem *sspRS* Hg-DERI 1 MAD-Datensatz, aufgenommen mit einem CCD-Detektor.

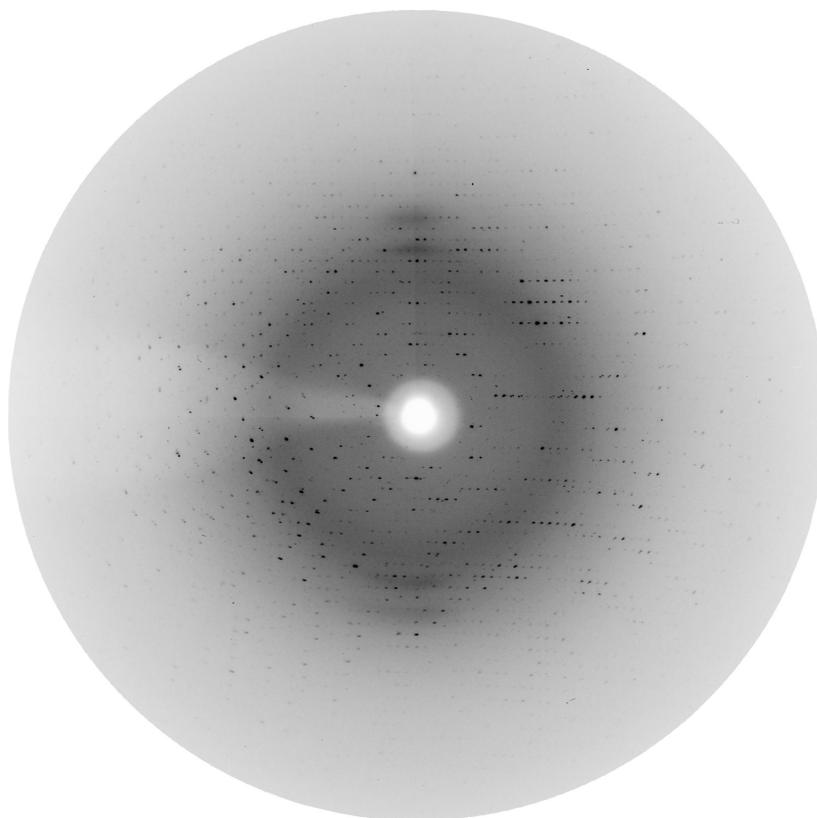


Abbildung 4.33 Rotationsaufnahme des MAD-Datensatzes der *sspRS* aufgenommen am DESY (Hamburg) auf einem CCD-Detektor. Die Auflösung am Detektorrand beträgt $2,0 \text{ \AA}$, der Plattenabstand 160 mm , die Rotation $0,5^\circ$ und die Wellenlänge $0,949 \text{ \AA}$.

Die Tabelle 4.1 zeigt die Statistik der MAD-Datensammlung und die Verfeinerungsstatistiken des Hg-Derivates (Hg-DERI 1) und des nativen Datensatzes (NATI).

Datenprozessierungs- und Verfeinerungsstatistik				
	Hg-DERI 1			NATI
	P6 ₁			P6 ₁
Raumgruppe				
Zellkonstanten	a = b = 70,50 Å			a = b = 70,32 Å
	c = 92,95 Å			c = 92,37 Å
	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$			$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
Auflösungsbereich [Å]	19,88 – 2,1			20,6 – 2,7
Unabhängige Reflexe ($I > 2,0\sigma(I)$)	15097 (19,88 – 2,1 Å)			6988 (20,6 – 2,7 Å)
letzte Auflösungsschale [Å]	2,14 – 2,1			2,85 – 2,7
	Remote	Peak	Edge	
Wellenlänge [Å]	0,9499	1,000	1,010	CuK α
Multiplizität	2,1	2,1	2,1	2,7
R_{merge} *	0,097	0,098	0,101	0,127
R_{merge} (letzte Auflösungsschale)	0,265	0,302	0,314	0,348
Vollständigkeit der Daten [%]	94,5	94,5	93,1	97,8
... in der letzten Auflösungsschale [%]	95,3	95,2	69,8	97,8
Unabhängige Reflexe §	28494	28350	27976	
R -Faktor [%] *	18,5			19,8
R_{free} [%] #	22,0			26,3
<i>r.m.s.</i> -Abweichung von Idealwert der				
Bindungslängen [Å]	0,006			0,007
Bindungswinkel [°]	1,24			1,21
Mittlerer B-Faktor, Protein [Å ²]	27,2			28,6
Mittlerer B-Faktor, Ligand [Å ²]	23,0			26,9
Mittlerer B-Faktor, Solvens [Å ²]	32,4			28,7
Mittlerer B-Faktor, Hg ²⁺ -Ion [Å ²]	40,6			
Anzahl Proteinatome (nicht H)	1558			1558
Anzahl Ligandenatome (nicht H)	54			54
Anzahl Schweratome	1			-
Anzahl Wassermoleküle	121			79
(Φ, Ψ) Winkel Verteilung im				
bevorzugten Bereich [%]	86,0			80,3
zusätzlich erlaubten Bereich [%]	14,0			19,7
weiläufig erlaubten Bereich [%]	0,0			0,0
verbotenen Bereich [%]	0,0			0,0
* R -Faktor = $\sum_{hkl} F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}} / \sum_{hkl} F_{\text{obs}}$				
# R_{free} berechnet mit 5 % Reflexe, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden				
§ Reflexe behandelt als unabhängige FRIEDEL-Paare				
* $R_{\text{merge}} = \sum I_i - \langle I \rangle / \sum I_i$, wobei I_i eine individuelle Messung der Intensität ist und $\langle I \rangle$ die gemittelte Intensität für diesen Reflex ist.				

Tabelle 4.9 Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistik des MAD-Datensatzes (Hg-DERI 1) und des nativen Datensatzes (NATI) der *sspRS*.

Eine anschließende MAD-Phasierung mit der Hg-Schweratomposition und allen drei gemessenen Wellenlängen (Peak, Remote und Edge) lieferte eine eindeutig interpretierbare Elektronendichtekarte, in der nach Dichtemodifikation (*solvent-flattening*) die Orientierung der Aminosäuren 1 bis 202 der *sspRS*-Sequenz sichtbar war. Die experimentelle Elektronendichte war von außerordentlich guter Qualität, so daß 203 der 208 Aminosäuren einer monomeren Untereinheit der *sspRS* eingebaut

wurden. Im weiteren Verlauf konnte die F_o-F_c Elektronendichte zweier Inhibitor-moleküle CEOL charakterisiert und deren Modelle eingepasst werden. Abschließend wurde das *sspRS* Atommodell bis zu einem R -Faktor von 18,5 % (freier R -Faktor 22 %) bei einer maximalen Auflösung von 2,1 Å verfeinert. Für die C-terminalen Aminosäuren 203–208 zeigte sich auch in diesem Stadium der Verfeinerungen keine interpretierbare Dichte.

Die Tabelle Tabelle 4.10 zeigt die Phasierungsstatistik des MAD-Datensatzes mit MLPHARE.

Phasierungsstatistik des Hg-MAD-Datensatzes				
Figure of merit (FOM) (19,88 – 2,5 Å)		0,55		
		Remote	Peak	Edge
Phasing power	Iso (cen)	–	1,23 (8499)	0,72 (318)
.....	Ano (acen)	–	0,89 (34)	0,99 (8533)
$R_{\text{cullis}}^{\#}$	Iso (cen)	–	0,79 (311)	0,85 (318)
.....	Iso (acen)	–	0,79 (8499)	0,83 (8533)
.....	Ano	0,84 (8427)	0,75 (8399)	0,73 (8394)

$\# R_{\text{cullis}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{PH}}(\text{hkl})| + |F_{\text{P}}(\text{hkl})| - F_{\text{Hcalc}}}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{PH}}(\text{hkl})| + |F_{\text{P}}(\text{hkl})|}$
 Die Daten in Klammern geben die jeweiligen unabhängigen Reflexe an

Tabelle 4.10 Phasierungsstatistik des Hg-MAD-Datensatzes

4.4.2 Strukturbeschreibung der Riboflavin Synthase aus *S. pombe*

Die Riboflavin Synthase aus *Schizosaccharomyces pombe* (*sspRS*) ist aufgrund ihrer Faltungstopologie der Klasse der α/β Enzyme zuzuordnen. Das atomare Modell des *sspRS* Monomeres besteht im Kern aus zwei β -barrels und einer C-terminalen α -Helix (siehe Ribbondarstellung Abbildung 4.34). Das N-terminale barrel besteht aus 90 Aminosäuren (Met1 bis Ser90) und die mittlere Domäne (C-barrel) schließt sich von Ser91 bis Val184 an. Beide Domänen weisen topologisch äquivalente Bindungsstellen des Substrates 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin auf, die im Falle des *sspRS* Atommodelles durch Bindung des substratähnlichen Inhibitors 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin eindeutig identifiziert und charakterisiert werden.

Die Hauptketten- C_{α} -Atome des N-barrel überlagern mit denen des C-barrel mit einer sehr geringen *r.m.s.*-Abweichung von 0,97 Å für 84 C_{α} -Atome, was die große Ähnlichkeit der beiden Domänen in ihrer Faltung zueinander zeigt und eine pseudo-zweizählige Symmetrie innerhalb des Proteins offensichtlich macht.

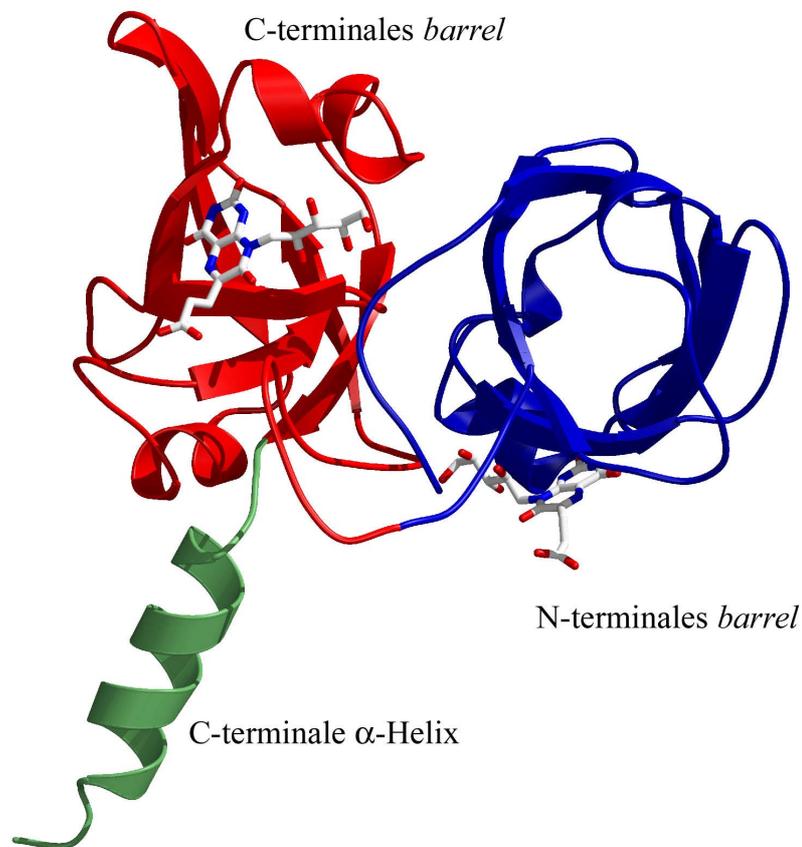


Abbildung 4.34 Ribbondarstellung der Domänenabfolge im *sspRS* Monomer. Das N-terminale β -*barrel* ist blau und das mittlere C- β -*barrel* ist rot dargestellt. Der Inhibitor ist als *ball-and-stick* im aktiven Zentrum der Domänen eingezeichnet. Die C-terminale α -Helix (grün) stabilisiert über Trimerisierungskontakte das eigentliche Trimer der RS (Liao *et al.*, 2001).

In Abbildung 4.35 ist die Überlagerung der Hauptketten- C_{α} -Atome der N-terminalen Domäne (blau) mit denen der mittleren Domäne (rot) gezeigt. Die Lagen, der beiden in den aktiven Zentren der *sspRS* Domänen gebundenen Lumazinderivate (*ball-and-stick*), kommen dabei in annähernd exakter Übereinstimmung.

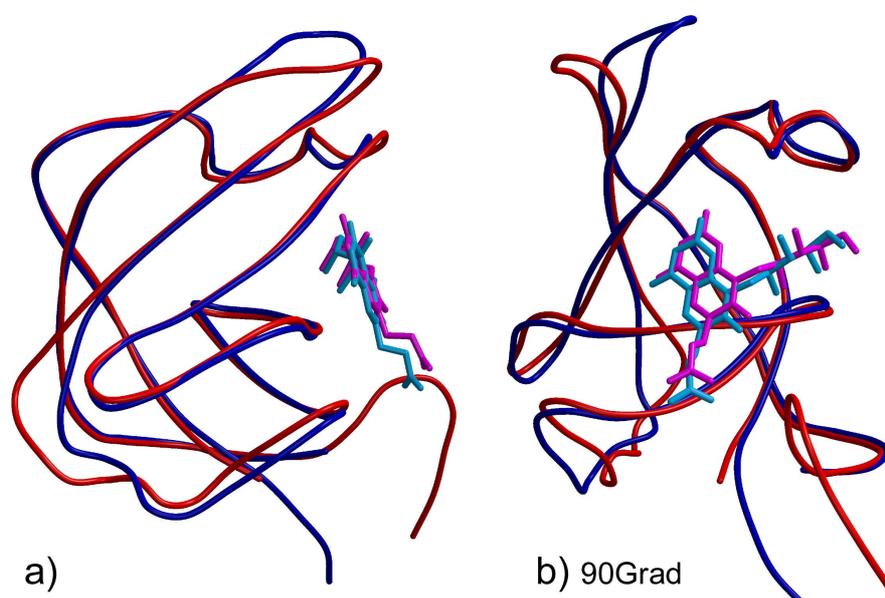


Abbildung 4.35 Überlagerung des N-terminalen *barrel* (blau) von Aminosäure Met1 bis Ser90 mit dem C-terminalen *barrel* (rot) von Ser91 bis Val184. Der Carboxyethylumazin Inhibitor ist in *ball-and-stick* dargestellt und markiert die Substratbindungsstelle in der *sspRS*. Die beiden Darstellungen sind gegeneinander um 90 Grad verdreht.

4.4.3 Lokalisierung des aktiven Zentrums der *sspRS*

Um genaue Kenntnisse über die Lage der aktiven Zentren und somit Informationen über den Reaktionsmechanismus zur Bildung von Riboflavin zu erlangen, wurde das Enzym mit einem Lumazinderivat des eigentlichen Eduktes der Reaktion, dem 6,7-Dimthyl-8-ribityllumazin kokristallisiert (siehe Reaktionsschema Abbildung 2.3). Die gebundenen Inhibitoren 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (CEOL) sind in ihrer Elektronendichtekarte bei $2,1 \text{ \AA}$ ausgezeichnet definiert und sind mit Temperaturfaktoren von $23,0 \text{ \AA}^2$ sehr rigide gebunden. Die Inhibitoren werden hauptsächlich über hydrophile Seitenkettenkontakte gebunden und identifizieren eindeutig zwei Substratbindungsstellen in den beiden *barrel*-Domänen auf gegenüberliegenden Seiten der *sspRS*.

Die Substratbindungsstelle im N-terminalen *barrel*

Der Lumazinderivat des Inhibitors ist in der N-terminalen Domäne (*N-barrel*) nur über sehr geringe hydrophobe und ausschließlich durch hydrophile Kontakte gebunden. Mit Ausnahme von His102, das Kontakte zur 7-Oxo-Gruppe des Lumazinderivates macht, sind keine weiteren aromatischen Aminosäuren im aktiven Zentrum des N-

zur zweiten Substratbindungsstelle des *C-barrel*, zumal eine Mutation des Cys48 eine heterologe Expression des rekombinanten Proteins verhindert (pers. Mitteilung Prof. Dr. A. Bacher).

Die Substratbindungsstelle im *C-barrel*

Der Lumazinring des Inhibitors ist, wie im N-terminalen *barrel*, ebenfalls im *C-barrel* nur über sehr geringe hydrophobe und überwiegend durch hydrophile Kontakte gebunden. Die einzigen aromatischen Aminosäuren, die in der Bindungstasche vorkommen, sind zwei Tyrosinreste (Tyr139 und Tyr164), die lediglich über Wasserstoffbrücken der Seitenketten Kontakte zum 6-Carboxyethyl-Substituenten und dem Ribitylrest des Liganden ausbilden.

Die peptidischen Amidgruppen von Ile162 und Thr148 stehen in Wasserstoffbrückenbindung zu den O2 und O4 Carbonylgruppen des Lumazinringes. Thr148 ist in topologisch gleicher Position wie die Position von Thr50 im N-terminalen *barrel* und bildet identische Wasserstoffbrücken zum Ringsystem des Liganden aus. Das Hauptketten-Sauerstoffatom von Met160 ist zum N3-Stickstoff-Ringatom wasserstoffverbrückt. Die Position von Ser67 des *N-barrel* ist im *C-barrel* durch Thr165 ersetzt und steht in einer hydrophilen Seitenkettenwechselwirkung zur O2-Carbonylgruppe des Lumazinliganden. Die Bindung der Ribityl-Seitenketten des Lumazinderivates im *C-barrel* wird, analog zum N-terminalen *barrel*, über das Seitenketten γ -O-Atom von Thr165 und Hauptkettenkontakte zum Stickstoffatom des konservierten Val6 des benachbarten *N-barrel* ausgebildet. Zusätzlich wird die Hydroxyl-Gruppe der Seitenkette Tyr164 über ein Wassermolekül an die OH5-Gruppe des Ribitylrestes gebunden.

Die Abbildung 4.37 zeigt die beschriebenen Bindungsverhältnisse des CEOL-Liganden in der zweiten Bindungsstelle des *C-barrels* (rot) im Detail.

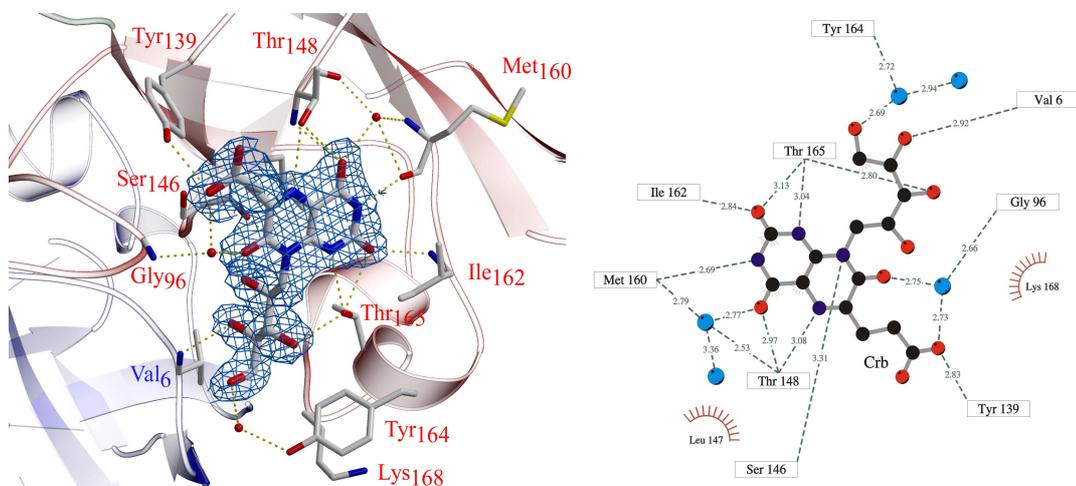


Abbildung 4.37 Bindungsverhältnisse des CEOL-Liganden im C-barrel (rot) der *sspRS*. Reste, die vom benachbarten N-terminalen barrel (blau) teilnehmen sind blau gekennzeichnet. Rechts ist die Inhibitorbindung schematisch dargestellt. Hellblaue Kugeln kennzeichnen gebundene Wassermoleküle im aktiven Zentrum. Die Wasserstoffbrücken sind in ihrer Länge eingezeichnet und hydrophobe Kontakte als Halbkreis dargestellt. Die 2F_o-F_c Elektronendichte vom CEOL ist bei 1 σ konturiert.

4.4.4 Diskussion

Kristallstruktur zeigt Widerspruch zur nativen *sspRS* Struktur in Lösung

Die Analyse der Kristallstruktur der *sspRS* aus der Kristallisationsbedingung 65 % (v/v) MPD, 0,1 M Bicine pH 9.0 zeigt eindeutig eine monomere Struktur des Proteins. Dieses Ergebnis der kristallographischen Auswertung steht im starken Widerspruch zu den biochemischen Daten der *sspRS* in Lösung.

Massenspektroskopische Experimente an der *sspRS* in Lösung liefern eine molekulare Masse von 22 862,8 Da, die mit der berechneten Masse von 22 861 Da sehr gut übereinstimmt. Die *sspRS* sedimentiert reproduzierbar in analytischen Ultrazentrifugationsexperimenten als eine einzelne Grenzschicht mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 70 kDa (pers. Mitteilung Frau Ann-Kathrin Schott). Diese biochemischen Daten weisen im Gegensatz zu den kristallographischen auf ein Vorliegen der Wildtyp *sspRS* als Trimer in Lösung hin. Die *sspRS* dagegen ist unter den gewählten Bedingungen im Kristall ein Monomer.

Auch die Annahme die Ligandierung des CEOL könnte die nativen Trimerstruktur der *sspRS* in Lösung zerstören, wurde durch UZ-Experimente nicht bestätigt. Unter

den gewählten Bedingung sedimentierte das Protein in Gegenwart von CEOL immer als Trimer.

Die erst kürzlich aufgeklärte trimere Kristallstruktur der RS aus *E. coli* (*ecRS*) (Liao *et al.*, 2001) zeigt, daß die Trimerisierung über mehrere hydrophobe Kontakte benachbarter Valinreste der C-terminalen Helix der Monomere und einer Salzbrücke stabilisiert wird. Im Falle der monomeren Kristallstruktur der *sspRS* scheint der hohe MPD-Gehalt (65 %) diese hydrophoben Trimerisierungskontakte zu verhindern. Faktorielle *Screening*-Ansätze zur Auffindung einer neuen Kristallisationsbedingung ohne MPD, würden Möglichkeiten bieten die *sspRS* in ihrer nativen Trimerstruktur aufzuklären.

Die Bildung von Riboflavin

Im letzten Schritt der Reaktion der Riboflavinbiosynthese werden zwei 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin **3** Moleküle zu Riboflavin **4** dismutiert. Bei dieser Dis-mutationsreaktion wird von einem Lumazinmolekül (Donor) eine C₄-Einheit auf das zweite Lumazinmolekül (Akzeptor) übertragen (siehe Reaktionsschema Abbildung 2.3). Rowan und Wood konnten zeigen, daß die Bildung von Riboflavin aus **3** auch in Abwesenheit einer enzymatischen Katalyse ablaufen kann (Rowan und Wood, 1968). Dabei wird von einem nukleophilen Angriff eines Wassermoleküles auf den Pteridinring des Donor-Moleküles **3** ausgegangen.

Bei der enzymatischen Bildung von Riboflavin durch RS muß die Funktion des Nukleophiles von einer Aminosäure im aktiven Zentrum übernommen werden. Durch die Aufklärung der CEOL-*sspRS*-Komplexstruktur können erstmals genauere Angaben darüber gemacht werden. Im aktiven Zentrum *sspRS* kommen als mögliches Nukleophil zwei Aminosäuren in Betracht, Cys48 im N-*barrel* und Ser146 im C-*barrel*. Die Thiolgruppe von Cys48 und die Hydroxylgruppe von Ser146 stehen in nahezu identischem Abstand von 3,9 Å zur C6-Position des Liganden. Diese beiden Aminosäuren sind streng konserviert und auch in der *ecRS* an diesen Positionen zu finden. In der *ecRS* Kristallstruktur wird noch eine weitere nukleophile Aminosäure vorgeschlagen, Ser41 im N-*barrel*. Ser41 steht allerdings in

der *sspRS* Komplexstruktur in einem Abstand von 5,2 Å zum Pteridinring von CEOL.

Bei der Umsetzung der Lumazinmoleküle zum Riboflavin wird von einer pentacyclischen Zwischenstufe der Reaktion ausgegangen. Cys48 im *N-barrel* und Ser146 im *C-barrel* bilden Hauptketten-Stickstoffatomwechselwirkung mit dem N8-Stickstoffatomen des Pteridinringsystems. Durch diese Bindungsverhältnisse, die in beiden Bindungsstellen topologisch äquivalent sind, bedingt durch die große Anzahl konservierter Reste, ist eine Seite des CEOL vollständig vom Protein abgeschirmt. Die gegenüberliegende Seite ist damit solvensexponiert. Diese spezielle Bindungsgeometrie des CEOL in der *sspRS* unterscheidet sich grundlegend von der Bindung des Inhibitors im aktiven Zentrum der *sspLS*. Durch die aromatischen *stacking*-Kontakte bei der Bindung in der *sspLS* sind beide Seiten des Lumazins des CEOL sterisch abgeschirmt. Nur durch diese spezifische Bindung des Lumazins in der *sspRS*, in der eine Seite des Ringsystems für die Reaktion mit einem weiteren Lumazinmolekül zugänglich ist, wird die Annahme der pentacyclischen Zwischenstufe gestützt.

Liao und Mitarbeiter diskutieren, daß die Formierung eines aktiven Zentrums durch das Zusammenkommen benachbarter Monomere gebildet wird. Die beiden anderen möglichen aktiven Zentrum bleiben dabei weit geöffnet (Liao *et al.*, 2001). Durch eine trimere Struktur kann immer nur eine Umsetzung der Lumazine zum Riboflavin zur Zeit ablaufen.

In Abbildung 4.38 ist die Bindung des Lumazinderivates in den aktiven Zentren der Domänen der *sspRS* gezeigt und die Zugänglichkeit des Pteridinringes der Lumazinmoleküle in einer Dismutationsreaktion deutlich zu sehen.

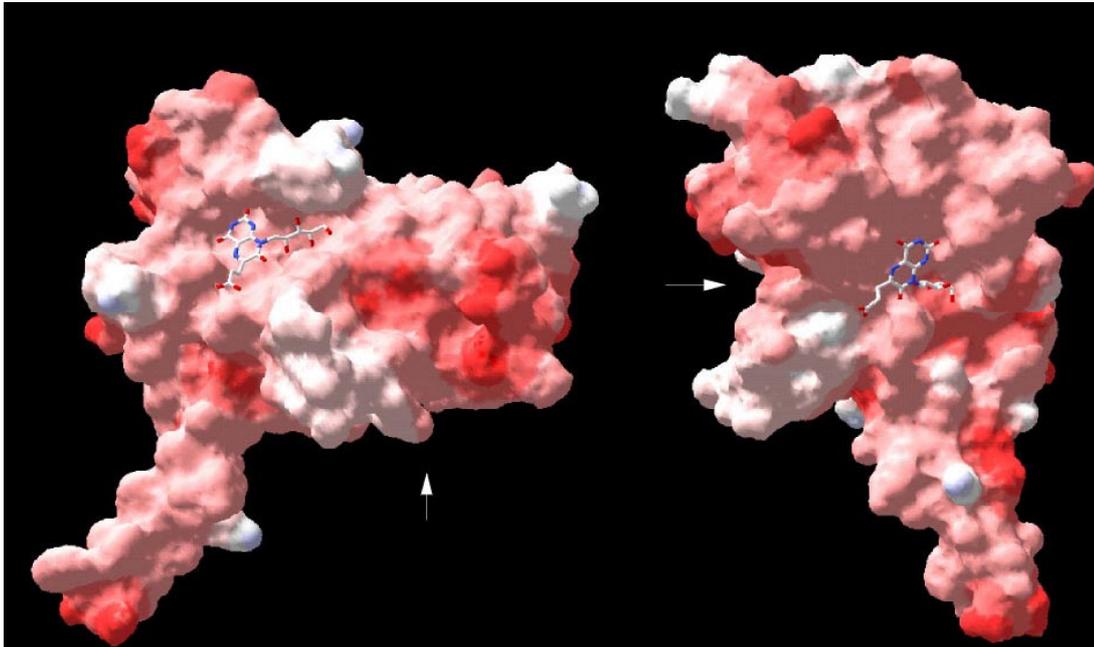


Abbildung 4.38 Oberflächenpotentialdarstellung von *sspRS*. Links ist die Bindung vom CEOL-Inhibitor (*ball-and-stick*) im C-*barrel* dargestellt. Rechts ist die Bindung des Inhibitors in dem N-terminalen *barrel* gezeigt. Die Pfeile markieren die jeweiligen gegenüberliegenden verdeckten Bindungsstellen der entsprechenden Domäne.

Durch die monomere Kristallstruktur der *sspRS* können die Erkenntnisse aus der *ecRS* bestätigt und der mögliche Reaktionsmechanismus verifiziert werden.

5 Abkürzungen

% (w/v)	Gewichtsprozent	magLS	<i>Magnaporthe grisea</i> LS
% (v/v)	Volumenprozent	MDa	Mega Dalton
Å	Ångström (1 Å = 10 ⁻¹⁰ m)	Mes	Morpholinoethansulfonsäure
Amp	Ampicillin	MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MR	<i>Molecular Replacement</i>
bacLS	<i>Bacillus subtilis</i> Lumazin Synthase	NRAP	5-Nitro-6-(D-ribitylamino)-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)- pyrimidindion
bruLS	<i>Brucella abortus</i> Lumazin Synthase	OD	Optische Dichte
BSA	Rinderserumalbumin	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
bp	Basenpaare	PCR	Polymerase Kettenreaktion
Carb	Carbenicillin	PDB	Protein Database
CEOL	6-Carboxyethyl-7-oxo-8- ribityllumazin	PVDF	Polyvinylidendifluorid
CIP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase	RIBO	Riboflavin
ddH ₂ O	<i>aqua bidestilata</i>	RS	Riboflavin Synthase
DHF	7,8-Dihydrofolsäure	RT	Raumtemperatur
DHFR	Dihydrofolatreduktase	SA	<i>simulated annealing</i>
DHFR-TS	Dihydrofolatreduktase- Thymidylatsynthase	SDS	Natriumdodecylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	sacLS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LS
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	spiLS	<i>Spinacia oleracea</i> LS
DTT	1,4-Dithiothreitol	sspLS	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> LS
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	sspRS	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> RS
<i>E. coli, ec</i>	<i>Escherichia coli</i>	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
ecRS	<i>Escherichia coli</i> Riboflavin Synthase	TK	Transketolase
g	Erdbeschleunigung	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
gly	<i>Glycine max.</i>	TS	Thymidylatsynthase
HEPES	Hydroxyethylpiperazin- ethansulfonsäure	U	Unit
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid	U/min	Umdrehungen pro Minute
kb	(kilo) Basenpaare	UV	Ultraviolettes Licht
kDa	(kilo) Dalton	UZ	Ultrazentrifugation
LB	Luria-Bertani	V	Volt
LS	6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase, Lumazin Synthase	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D- galactopyranosid
M	molar, mol/l	zm	<i>Zea mays</i>
MAD	<i>Multiple Anomalous Dispersion</i>		

6 Literatur

- Bacher, A. (1986). Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*; *Methods in Enzymology*, **122**, 192-9.
- Bacher, A., Baur, R., Eggers, U., Harders, H.D., Otto, M.K. und Schnepfle, H. (1980). Riboflavin synthases of *Bacillus subtilis*. Purification and properties; *Journal of Biological Chemistry*, **255**, 632-7.
- Balestrazzi, A., Branzoni, M., Carbonera, D., Parisi, B. und Cella, R. (1995). Biochemical Evidence For the Presence of a Bifunctional Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase in Plant Species; *Journal of Plant Physiology.*, **147**, 263-266.
- Banerjee, D. (1995). Molecular mechanisms of resistance to antifolates, a review.; *Acta Biochimica Polonica*, **42**, 457-464.
- Barton, G.J. (1993). ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments; *Protein. Eng.*, **6**, 37-40.
- Blakley, R.L. (1984) *Folates and Pterins. Chemistry and Biochemistry of Folates*. Wiley, New York.
- Bolin, J.T., Filman, D.J., Matthews, D.A., Hamlin, R.C. und Kraut, J. (1982). Crystal structures of *Escherichia coli* and *Lactobacillus casei* dihydrofolate reductase refined at 1.7 Å resolution. I. General features and binding of methotrexate; *Journal of Biological Chemistry*, **257**, 13650-62.
- Braden, B.C., Velikovskiy, C.A., Cauerhff, A.A., Polikarpov, I. und Goldbaum, F.A. (2000). Divergence in Macromolecular Assembly: X-ray Crystallographic Structure Analysis of Lumazine Synthase from *Brucella abortus*; *J. Mol. Biol.*, **297**, 1031-1036.
- 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. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures; *Nature*, **355**, 472-475.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. und Warren, G.L. (1998). Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination; *Acta Cryst.*, **D54**, 905-921.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987). XL1Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection.; *BioTechniques*, **5**, 376.
- Bystroff, C., Oatley, S.J. und Kraut, J. (1990). Crystal structures of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: the NADP⁺ holoenzyme and the folate.NADP⁺ ternary complex. Substrate binding and a model for the transition state; *Biochemistry*, **29**, 3263-77.
- Carter, C.W. und Carter, C.W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments; *J. Biol. Chem.*, **254**, 12219-12223.
- Champness, J.N., Achari, A., Ballantine, S.P., Bryant, P.K., Delves, C.J. und Stammers, D.K. (1994). The structure of *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase to 1.9 Å resolution; *Structure*, **2**, 915-24.
- Cody, V., Luft, J.R., Ciszak, E., Kalman, T.I. und Freisheim, J.H. (1992). Crystal structure determination at 2.3 Å of recombinant human dihydrofolate reductase ternary complex with NADPH and methotrexate-gamma-tetrazole; *Anti-Cancer Drug Design*, **7**, 483-91.
- COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER 4. (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography; *Acta Cryst. D*, **50**, 760-763.
- Covey, T.R., Bonner, R.F., Shushan, B.I. und Henion, J. (1988). The determination of protein, oligonucleotide and peptide molecular weights by ion-spray mass spectrometry.; *Rapid Commun. Mass Sp.*, **2**, 249-256.

- Dale, G.E., Broger, C., Langen, H., D'Arcy, A. und Stuber, D. (1994). Improving protein solubility through rationally designed amino acid replacements: solubilization of the trimethoprim-resistant type S1 dihydrofolate reductase; *Protein Engineering*, **7**, 933-9.
- Dams, T., Auerbach, G., Bader, G., Jacob, U., Ploom, T., Huber, R. und Jaenicke, R. (2000). The crystal structure of dihydrofolate reductase from *Thermotoga maritima*: Molecular features of thermostability; *Journal of Molecular Biology*, **297**, 659-672.
- Davies, J.F.d., Delcamp, T.J., Prendergast, N.J., Ashford, V.A., Freisheim, J.H. und Kraut, J. (1990). Crystal structures of recombinant human dihydrofolate reductase complexed with folate and 5-deazafolate; *Biochemistry*, **29**, 9467-79.
- Delves, C.J., Ballantine, S.P., Tansik, R.L., Baccanari, D.P. und Stammers, D.K. (1993). Refolding of recombinant *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase and characterization of the enzyme; *Protein Expression & Purification*, **4**, 16-23.
- Eberhardt, S., Richter, G., Gimbel, W., Werner, T. und Bacher, A. (1996). Cloning, sequencing, mapping and hyperexpression of the ribC gene coding for riboflavin synthase of *Escherichia coli*; *European Journal of Biochemistry*, **242**, 712-9.
- Edman, P. und Henschen, A. (1975) *Sequence determination. Protein Sequence determination*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Endo, T., Kawakami, M., Goto, A., America, T., Weisbeek, P. und Nakai, M. (1994). Chloroplast protein import. Chloroplast envelopes and thylakoids have different abilities to unfold proteins; *European Journal of Biochemistry*, **225**, 403-9.
- Engh, R.A. und Huber, R. (1991). Accurate Bond and Angle Parameters for X-ray Protein-Structure Refinement; *Acta Cryst.*, **A47**, 392-400.

-
- Esnouf, R.M. (1997). An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities; *J. Mol. Graph. Model.*, **15**, 132-134, 112-113.
- Ewald, P.P. (1921). Das "reziproke Gitter" in der Strukturtheorie; *Z. Kristallogr.*, **56**, 491-500.
- Filman, D.J., Bolin, J.T., Matthews, D.A. und Kraut, J. (1982). Crystal structures of *Escherichia coli* and *Lactobacillus casei* dihydrofolate reductase refined at 1.7 Å resolution. II. Environment of bound NADPH and implications for catalysis; *Journal of Biological Chemistry*, **257**, 13663-72.
- Fischer, M., Haase, I., Gerhardt, S., Changeux, J.-P., Huber, R. und Bacher, A. (2001). Biosynthesis of riboflavin. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine synthase of *Schizosaccharomyces pombe*.; *Manuskript in Vorbereitung*.
- Frangioni, J.V. und Neel, B.G. (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins.; *Anal. Biochem.*, **210**, 179-187.
- Frieden, C. (1990). Refolding of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: sequential formation of substrate binding sites; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 4413-6.
- Friedrich, W., Knipping, P. und Laue, M. (1912) Interferenz-Erscheinungen bei Röntgenstrahlen. *Sitzungsberichte der mathematisch-physikalischen Klasse der Königlich Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München*, pp. 303-322.
- Frishman, D. und Argos, P. (1995). Knowledge-based protein secondary structure assignment; *Proteins*, **23**, 566-79.
- Garvey, E.P. und Santi, D.V. (1985). Limited proteolysis of the bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase from *Leishmania tropica*; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**, 7188-92.

-
- Gavel, Y. und Heijne, G.v. (1990). A conserved cleavage-site motif in chloroplast transit peptides.; *FEBS Lett.*, **261**, 455-458.
- GCG. (1998) Wisconsin Package. . Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.
- Green, D.W., Ingram, V.M. und Perutz, M.F. (1954). The structure of hemoglobinIV. Sign determination by isomorphous replacement method.; *Proc. Roy. Soc. Sect. A*, **225**, 287-307.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformations of *Escherichia Coli* with plasmids.; *J.Mol.Biol.*, **166**, 557-580.
- Harker, D. (1956). The determination of the phases of the structure factors on non-centrosymmetric crystals by the method of double isomorphous replacement; *Acta. Cryst.*, **9**, 1-9.
- Hauptmann, H. und Karle, J. (1953) *Solution of the phase problem. I. The centrosymmetric crystal*. Polycrystal Book Service, Pittsburgh.
- Heinrich, P.C., Steffen, H., Janser, P. und Wiss, O. (1972). Studies on the reconstitution of apotransketolase with thiamine pyrophosphate and analogs of the coenzyme; *European Journal of Biochemistry*, **30**, 533-41.
- Hendrickson, W.A. (1991). Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation.; *Science*, **254**, 51-58.
- Hennig, M., Darcy, A., Hampele, I.C., Page, M.G.P., Oefner, C. und Dale, G.E. (1998). Crystal Structure and Reaction Mechanism of 7,8-Dihydroneopterin Aldolase From *Staphylococcus Aureus*; *Nature Structural Biology.*, **5**, 357-362.
- Hillocoat, B.L., Nixon, P.F. und Blakely, R.L. (1967). *Anal. Biochem.*, **21**, 178-189.
- Hoeltzli, S.D. und Frieden, C. (1998). Refolding of [6-F-19]Tryptophan-Labeled *Escherichia Coli* Dihydrofolate Reductase in the Presence of Ligand - a Stopped-Flow Nmr Spectroscopy Study; *Biochemistry.*, **37**, 387-398.

- Hoppe, W. (1957a). Die Faltmolekülmethode und ihre Anwendung in der röntgenographischen Konstitutionsanalyse von Biflorin; *Z. Elektrochem.*, **61**, 1076-1083.
- Hoppe, W. (1957b). Die Faltmolekülmethode: eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen; *Acta. Cryst.*, **10**, 750-751.
- Huber, R. (1965). Die automatisierte Faltmolekülmethode; *Acta. Cryst.*, **19**.
- Jancarik, J. und Kim, S.-H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins; *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409-411.
- Jordan, D.B., Bacot, K.O., Carlson, T.J., Kessel, M. und Viitanen, P.V. (1999). Plant riboflavin biosynthesis. Cloning, chloroplast location, expression, purification, expression, and partial characterization of spinach lumazine synthase.; *J. Biol. Chem.*, **274**, 22114-22121.
- Kabsch, W. (1988). Automatic indexing of rotation diffraction pattern.; *J. Appl. Cryst.*, **21**, 67-71.
- Kendrew, J.C., Dickerson, R.E., Strandberg, B.E., Hart, R.C. und Davies, D.R. (1960). Structure of myoglobin; a three-dimensional Fourier synthesis at 2Å resolution.; *Nature*, **185**, 422-427.
- Kiefersauer, R., Than, M.E., Dobbek, H., Gremer, L., Melero, M., Strobl, S., Dias, J.M., Soulimane, T. und Huber, R. (2000). A novel free-mounting system for protein crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes; *J. Appl. Cryst.*, **33**, 1223-1230.
- Kis, K. (1994) Kinetische Untersuchungen zur Funktion der Lumazinsynthase und der schweren Riboflavinsynthase. *Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München*. TU München, München.
- Kis, K. und Bacher, A. (1995). Substrate channeling in the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*; *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 16788-95.

- Kis, K., Kugelbrey, K. und Bacher A. (2001). Biosynthesis of Riboflavin. The Reaction Catalysed by 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine Synthase Can Proceed without Enzymatic Catalysis under Physiological Conditions.; *J. Org. Chem.*, **66**, 2555-2559.
- Knighton, D.R., Kan, C.C., Howland, E., Janson, C.A., Hostomska, Z., Welsh, K.M. und Matthews, D.A. (1994). Structure of and kinetic channelling in bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase; *Nature Structural Biology*, **1**, 186-94.
- Kraulis, P.J. (1993). MOLSCRIPT - A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures; *Scientist*, **7**, 16-16.
- Kraut, J. und Matthews, D.A. (1987) *Dihydrofolate reductase, Active Sites of Enzymes*. Wiley & Sons, New York.
- Ladenstein, R., Ludwig, H.C. und Bacher, A. (1983). Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*; *Journal of Biological Chemistry*, **258**, 11981-3.
- Ladenstein, R., Meyer, B., Huber, R., Labischinski, H., Bartels, K., Bartunik, H.D., Bachmann, L., Ludwig, H.C. und Bacher, A. (1986). Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Particle dimensions, crystal packing and molecular symmetry; *Journal of Molecular Biology*, **187**, 87-100.
- Ladenstein, R., Ritsert, K., Huber, R., Richter, G. und Bacher, A. (1994). The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. X-ray structure analysis of hollow reconstituted beta-subunit capsids; *European Journal of Biochemistry*, **223**, 1007-17.
- Ladenstein, R., Schneider, M., Huber, R., Bartunik, H.D., Wilson, K., Schott, K. und Bacher, A. (1988). Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Crystal structure analysis of the icosahedral beta 60 capsid at 3.3 Å resolution; *Journal of Molecular Biology*, **203**, 1045-70.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.; *Nature*, **227**, 680-685.

- Laskowski, R.A., McArthur, M.W., Moss, D.S. und Thornton, J.M. (1993). PROCHECK - A Programm to che check the stereochemical Quality of Protein Structures; *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291.
- Lee, H., Reyes, V.M. und Kraut, J. (1996). Crystal structures of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase complexed with 5-formyltetrahydrofolate (folinic acid) in two space groups: evidence for enolization of pteridine O4; *Biochemistry*, **35**, 7012-20.
- Leslie, A.G.W. (1998) MOSFLM., Cambridge, U.K.
- Liang, P.H. und Anderson, K.S. (1998a). Kinetic reaction scheme for the dihydrofolate reductase domain of the bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase from *Leishmania major*; *Biochemistry*, **37**, 12206-12.
- Liang, P.H. und Anderson, K.S. (1998b). Substrate channeling and domain-domain interactions in bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase; *Biochemistry*, **37**, 12195-205.
- Liao, D.I., Wawrzak, Z., Calabrese, J.C., Viitanen, P. und Jordan, D.B. (2001). Crystal Structure of Riboflavin Synthase; *Structure*, **9**, 399-408.
- Lindquist, Y., Schneider, G., Ermler, U. und Sundström, M. (1992). Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution.; *EMBO J.*, **11**, 2373-2379.
- Luo, M.Z., Orsi, R., Patrucco, E., Pancaldi, S. und Cella, R. (1997). Multiple Transcription Start Sites of the Carrot Dihydrofolate Reductase Thymidylate Synthase Gene, and Sub-Cellular Localization of the Bifunctional Protein; *Plant Molecular Biology.*, **33**, 709-722.
- Mann, Y., Meng, M. und Fenn, C.K. (1989). Interpreting mass spectra of multiply charged ions.; *Anal. Chem.*, **61**, 1702-1708.
- Matthews, B.W. (1968). Solvent content of protein crystals; *J. Mol. Biol.*, **33**, 491-497.

- Matthews, D.A., Smith, S.L., Baccanari, D.P., Burchall, J.J., Oatley, S.J. und Kraut, J. (1986). Crystal structure of a novel trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase specified in *Escherichia coli* by R-plasmid R67; *Biochemistry*, **25**, 4194-204.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization; *Eur. J. Biochem.*, **189**, 1-23.
- McTigue, M.A., Davies, J.F.d., Kaufman, B.T. und Kraut, J. (1992). Crystal structure of chicken liver dihydrofolate reductase complexed with NADP+ and biopterin; *Biochemistry*, **31**, 7264-73.
- Meining, W., Mörtl, S., Fischer, M., Cushman, M., Bacher, A. und Ladenstein, R. (2000). The Atomic Structure of Pentameric Lumazine Synthase from *Saccharomyces cerevisiae* at 1.85Å Resolution Reveals the Binding Mode of a Phosphonate Intermediate Analogue; *J. Mol. Biol.*, **299**, 181-197.
- Meining, W., Tibbelin, G., Ladenstein, R., Eberhardt, S., Fischer, M. und Bacher, A. (1998). Evidence for local 32 symmetry in homotrimeric riboflavin synthase of *Escherichia coli*; *Journal of Structural Biology*, **121**, 53-60.
- Merritt, E.A. und Murphy, M.E.P. (1994). Raster3D Version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics; *Acta Cryst.*, **D50**, 869-873.
- Moreland, D.E. (1993). Research on Biochemistry of Herbicides: An Historical Overview; *Zeitschrift für Naturforschung*, **48**, 121-131.
- Mörtl, S., Fischer, M., Richter, G., Tack, J., Weinkauf, S. und Adelbert, A. (1996). Biosynthesis of Riboflavin. Lumazine Synthase of *Escherichia Coli*.; *J. Biol. Chem.*, **271**, 33201-33207.
- Müller, F., Ghisla, A. und Bacher, A. (1988) *Vitamine II*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Murphy, D.J. und Walker, D.A. (1982). The properties of transketolase from photosynthetic tissue.; *Planta*, **155**, 316-320.

- Neuberger, G. und Bacher, A. (1986). Biosynthesis of riboflavin. Enzymatic formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*; *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **139**, 1111-6.
- Neuburger, M., Rebeille, F., Jourdain, A., Nakamura, S. und Douce, R. (1996). Mitochondria Are a Major Site For Folate and Thymidylate Synthesis in Plants; *Journal of Biological Chemistry*., **271**, 9466-9472.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R. und Honig, B. (1993). GRASP - graphical representation and analysis of surface properties.; *Biophys. J.*, **64**, A166.
- Nikkola, M., Lindqvist, Y. und Schneider, G. (1994). Refined structure of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.0 Å resolution; *Journal of Molecular Biology*, **238**, 387-404.
- Nilsson, U., Lindqvist, Y., Kluger, R. und Schneider, G. (1993). Crystal structure of transketolase in complex with thiamine thiazolone diphosphate, an analogue of the reaction intermediate, at 2.3 Å resolution; *FEBS Letters*, **326**, 145-8.
- Nilsson, U., Meshalkina, L., Lindqvist, Y. und Schneider, G. (1997). Examination of substrate binding in thiamin diphosphate-dependent transketolase by protein crystallography and site-directed mutagenesis.; *J. Biol. Chem.*, **272**, 1864.
- Oefner, C., D'Arcy, A. und Winkler, F.K. (1988). Crystal structure of human dihydrofolate reductase complexed with folate; *European Journal of Biochemistry*, **174**, 377-85.
- Otwinowski, Z. und Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillations mode; *Methods Enzymol.*, **276**, 307-326.
- Persson, K., Schneider, G., Jordan, D.N., Viitanen, P.V. und Sandalova, T. (1999). Crystal structure analysis of a pentameric fungal and an icosahedral plant lumazine synthase reveals the structural basis for differences in assembly; *Prot. Sci.*, **8**, 2355-2365.

- Perutz, M.F., Rossmann, M.G., Cullis, A.F., Muirhead, H., Will, G. und North, A.C.T. (1960). Structure of hemoglobin; a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5Å resolution, obtained by X-ray analysis.; *Nature*, **185**, 416-422.
- Pletcher, J. und Sax, M. (1972). Crystal and molecular structure of thiamine pyrophosphate hydrochloride.; *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 3998-4005.
- Ramachandran, G.N. und Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins; *Adv. Protein Chem.*, **23**, 283-437.
- Ratnam, S., Delcamp, T.J., Hynes, J.B. und Freisheim, J.H. (1987). Purification and characterization of dihydrofolate reductase from soybean seedlings; *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **255**, 279-89.
- Reche, P., Arrebola, R., Olmo, A., Santi, D.V., Gonzalez-Pacanowska, D. und Ruiz-Perez, L.M. (1994). Cloning and expression of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Trypanosoma cruzi*; *Molecular & Biochemical Parasitology*, **65**, 247-58.
- Ritsert, K., Huber, R., Turk, D., Ladenstein, R., Schmidt-Bäse, K. und Bacher, A. (1995). Studies on the Lumazine Synthase/Riboflavin Synthase Complex of *Bacillus subtilis*: Crystal Structure Analysis of Reconstituted β -subunit Capsids with Bound Substrate Analogue Inhibitor at 2.4Å Resolution; *J. Mol. Biol.*, **253**, 151-167.
- Rossmann, M.G. und Blow, D.M. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit; *Actas. Cryst.*, **15**, 24-31.
- Rost, B. (1996). PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks; *Methods in Enzymology*, **266**, 525-539.
- Rost, B. und Sander, C. (1993). Prediction of protein structure at better than 70% accuracy; *Journal of Molecular Biology*, **232**, 584-599.
- Rost, B. und Sander, C. (1994). Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure; *Proteins*, **19**, 55-77.

-
- Rowan, T. und Wood, H.C. (1968). The biosynthesis of pteridines. V. The synthesis of riboflavin from pteridine precursors.; *J. Chem. Soc.*, **4**, 452-458.
- Ruldoph, R. und Lilie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins.; *FASEB*, **10**, 49-56.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.; *Science*, **230**, 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fidds, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M. und Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA.; *Nature*, **265**, 687-695.
- Sano, G., Morimatsu, K. und Horii, T. (1994). Purification and characterization of dihydrofolate reductase of *Plasmodium falciparum* expressed by a synthetic gene in *Escherichia coli*; *Molecular & Biochemical Parasitology*, **63**, 265-73.
- Sawaya, M.R. und Kraut, J. (1997). Loop and Subdomain Movements in the Mechanism of *Escherichia Coli* Dihydrofolate Reductase - Crystallographic Evidence; *Biochemistry.*, **36**, 586-603.
- Schein, C.H. (1989a). Production of soluble recombinant proteins in bacteria.; *Bio/Technology*, **7**, 1141-1147.
- Schein, C.H. (1989b). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. Review; *Bio/Technology*, **7**, 1144-1149.
- Schneider, G. und Lindqvist, Y. (1998). Crystallography and mutagenesis of transketolase: mechanistic implications for enzymatic thiamin catalysis; *Biochimica et Biophysica Acta*, **1385**, 387-98.

- Studier, F.W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system; *J.Mol.Biol.*, **219**, 37-44.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes; *J.Mol.Biol.*, **189**, 113-130.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubenhoff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes; *Methods Enzymol.*, **185**, 60-89.
- Stueber, D., Matile, H. und Garotta, G. (1990) System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins; application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. In Lefkovits, I. and Pernis, P. (eds.), *Immunological Methods*, Vol. IV, pp. 121-152.
- Teige, M., Melzer, M. und Suss, K.H. (1998). Purification, properties and in situ localization of the amphibolic enzymes D-ribulose 5-phosphate 3-epimerase and transketolase from spinach chloroplasts; *European Journal of Biochemistry*, **252**, 237-44.
- Thomson, J.J. (1903) *Conduction of Electricity through Gases*.
- Towbin, H., Staehelin, T. und 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.
- Trujillo, M., Donald, R.G., Roos, D.S., Greene, P.J. und Santi, D.V. (1996). Heterologous expression and characterization of the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase enzyme of *Toxoplasma gondii*; *Biochemistry*, **35**, 6366-74.

- Turk, D. (1996) MAIN 96: An interactive software for density modifications, model building, structure refinement and analysis. In Bourne, P.E., Watenpaugh, K. (ed.) *Proceedings from the 1996 meeting of the International Union of Crystallography Macromolecular Macromolecular Computing School*.
- Varughese, K.I., Skinner, M.M., Whiteley, J.M., Matthews, D.A. und Xuong, N.H. (1992). Crystal structure of rat liver dihydropteridine reductase; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 6080-4.
- Verma, C.S., Caves, L.S.D., Hubbard, R.E. und Roberts, G.C.K. (1997). Domain Motions in Dihydrofolate Reductase - a Molecular Dynamics Study [Review]; *Journal of Molecular Biology.*, **266**, 776-796.
- Volz, K.W., Matthews, D.A., Alden, R.A., Freer, S.T., Hansch, C., Kaufman, B.T. und Kraut, J. (1982). Crystal structure of avian dihydrofolate reductase containing phenyltriazine and NADPH; *Journal of Biological Chemistry*, **257**, 2528-36.
- Wang, J.-L., Martin, P.R. und Singleton, C.K. (1997). Aspartate 155 of human transketolase is essential for thiamine diphosphate-magnesium binding, and cofactor binding is required for dimer formation.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1341**, 165-172.
- Wang, M.H., Ratnam, S. und Freisheim, J.H. (1995). Cloning, Nucleotide Sequence and Expression of the Bifunctional Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase From *Glycine Max*; *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure & Expression.*, **1261**, 325-336.
- Watson, J.D. und Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid.; *Nature*, **171**, 737-740.
- Wessel, D. und Flugge, U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids.; *Anal Biochem.*, **138**, 141-143.

- Whitlow, M., Howard, A.J., Stewart, D., Hardman, K.D., Kuyper, L.F., Baccanari, D.P., Fling, M.E. und Tansik, R.L. (1997). X-Ray Crystallographic Studies of *Candida Albicans* Dihydrofolate Reductase - High Resolution Structures of the Holoenzyme and an Inhibited Ternary Complex; *Journal of Biological Chemistry.*, **272**, 30289-30298.
- Williams, D.C., Van Frank, R.M., Muth, W.L. und Burnett, J.P. (1982). Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins; *Science*, **215**, 687-689.
- Yu, P.L., Zhao, J., Yu, M., Reid, R. und Santi, D.V. (1996). Functional expression of the dihydrofolate reductase domain of *Leishmania major* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase bifunctional protein; *Protein Expression & Purification*, **8**, 23-7.
- Zhang, X., Meining, W., Fischer, M., Bacher, A. und Ladenstein, R. (2001). X-ray Structure Analysis and Crystallographic Refinement of Lumazine Synthase from the Hyperthermophile *Aquifex aeolicus* at 1.6Å Resolution: Determinants of Thermostability Revealed from Structural Comparisons; *J. Mol. Biol.*, **306**, 1099-1114.