

Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese:
Biochemische und kristallographische
Untersuchung von NifS-ähnlichen Proteinen

Jens Kaiser
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung
D-82152 Martinsried.

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese: Biochemische und kristallographische Untersuchung von NifS-ähnlichen Proteinen

Jens Thomas Kaiser

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauf

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

Die Dissertation wurde am 16.11.2000 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 22.02.2001 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 1997 bis Oktober 2000 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 dieser Arbeit sowie für die außerordentlich große wissenschaftliche Freiheit beim Bearbeiten der Projekte.

Frau Dr. Dorothea Kessler und Herrn Dr. Tim Clausen möchte ich danken für die gute Zusammenarbeit am ‚C-DES‘ Projekt, die eine zügige Bestimmung von mehreren Strukturen dieses Proteins erst erlaubte.

Herrn Dr. Erich Fritsche gebührt mein Dank für die gewissenhafte Einführung in das molekularbiologische Arbeiten und die Infrastruktur unserer Abteilung.

Unseren Sekretärinnen Frau Gina Beckmann und Frau Renate Rüller sei für ihre stete Hilfsbereitschaft beim Bewältigen so mancher behördlicher Hürde gedankt, Herrn Werner Dersch, Herrn Herbert Fischer und Herrn Otto Paul für die tadellose Instandhaltung der technischen Geräte in dieser Abteilung.

Herr Snežan Marinković sorgte nicht nur durch seinen Humor für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, seine ständige Hilfsbereitschaft ermöglichte auch ein schnelles und unkompliziertes Arbeiten im Labor.

Bei vielen kleinen und großen Fragen im Bereich der Proteinkristallographie und beim täglichen Kampf mit dem Rechner waren mir die Gespräche mit den Herren

Dr. Stefan Steinbacher, Dr. Oliver Einsle, Holger Dobbek, Dr. Mathias Bochtler, Dr. Hans Brandstetter und Saulius Grazulis eine große Hilfe.

Herrn Gleb Bourenkov und Herrn Dr. Hans-Dieter Bartunik sei an dieser Stelle für die gute Betreuung bei den Aufenthalten am Deutschen Elektronen-Synchrotron Hamburg gedankt. Die vorbildliche Pflege der BW6 sowie die Hilfe während der Meßzeiten waren unerlässlich für das gute Gelingen der Datensammlungen.

Den Herren Dr. Georg Beisel, Dr. Oliver Einsle, Saulius Grazulis, Dr. Manuel Than, und Dr. Stefan Steinbacher sei gedankt für die Pflege der Programmpakete auf dem ‚X-ray-Account‘, den Mitarbeitern des Rechenzentrums, insbesondere Herrn Günther Franz, Herrn Herbert Höfner und Herrn Horst Worsch gebührt mein Dank für die Betreuung der Rechenzentrumsinstallationen.

Den übrigen Mitgliedern der Abteilung Strukturforschung, besonders Gerd Bader, Stefan Gerhardt, Dr. Markus Wahl, Martin Augustin, Dr. Peter Sondermann, Stefan Ehlert, Ruppert Lang, Michael Worbs, Pablo Fuentes-Prior, Dr. Nedijlko Budisa, und Clemens Steegborn danke ich für die kollegiale und angenehme Arbeitsatmosphäre und den vielen Spaß, den man bei dem ein oder anderen Bierchen hatte.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung über viele Jahre hinweg.

INHALT

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Eisen-Schwefel-Cluster	3
2.2 NifS-ähnliche Proteine	5
2.3 Pyridoxalphosphat-abhängige Enzyme	8
2.4 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	11
2.4.1 Überblick	11
2.4.2 Kristallisation	11
2.4.3 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen	12
2.4.4 Berechnung der Elektronendichte	15
2.4.5 Lösung des Phasenproblems	15
2.4.5.1 Isomorpher Ersatz	16
2.4.5.2 Multiple anomale Dispersion	18
2.4.5.3 Molekularer Ersatz	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Material	21
3.1.1 Chemikalien	21
3.1.2 Biologisches Material	21
3.1.3 Geräte	22
3.2 Methoden	23
3.2.1 Gentechnische und mikrobiologische Methoden	23
3.2.1.1 Sequenzanalysen, -vergleiche und Datenbanksuchen	23
3.2.1.2 Aufzucht von E. coli Zellen	23
3.2.1.3 Aufzucht von A. vinelandii Zellen	24
3.2.1.4 Aufzucht von T. maritima Zellen	24
3.2.1.5 Herstellung transformationskompetenter E. coli	25
3.2.1.5.1 Chemisch kompetente Zellen	25
3.2.1.5.2 Elektrokompente Zellen	26
3.2.1.6 Präparation von genomischer DNA	26
3.2.1.7 Präparation von plasmidischer DNA	27
3.2.1.7.1 Schnellisolation von Plasmid-DNA durch Koch-Lyse	27

3.2.1.7.2	MIDI-Präparation von Plasmid-DNA	28
3.2.1.8	Verdau von DNA	29
3.2.1.9	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	29
3.2.1.10	Agarose Gelelektrophorese von DNA	29
3.2.1.11	Reinigung von DNA-Fragmenten	30
3.2.1.12	Konzentrationsbestimmung von DNA	31
3.2.1.13	Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase	31
3.2.1.14	Ligation von DNA	31
3.2.1.15	Transformation von E. coli	31
3.2.1.15.1	Transformation über Hitzeschock	31
3.2.1.15.2	Transformation über Elektroporation	32
3.2.1.16	Aufbewahrung von Bakterienkulturen	32
3.2.1.17	Sequenzierung von DNA	32
3.2.1.18	Rekombinante Expression von Proteinen in E. coli	33
3.2.1.19	Aufschluß von E. coli Zellen	33
3.2.2	Proteinchemische Methoden	34
3.2.2.1	Sequenzanalyse und –vergleich	34
3.2.2.2	Polyacrylamidgelelektrophorese	34
3.2.2.3	Aktivitätsmessung von NifS	35
3.2.2.4	Säulenchromatographie	36
3.2.2.5	Ammoniumsulfatfällung	36
3.2.2.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	37
3.2.2.7	Konzentrierung von Proteinen	37
3.2.2.8	Reduktion der co-Faktor-Protein SCHIFF'schen Base	37
3.2.2.9	UV-VIS Spektroskopie	38
3.2.3	Kristallographische Methoden	38
3.2.3.1	Kristallisation	38
3.2.3.2	Datensammlung und –reduktion	39
3.2.3.3	Phasierung	39
3.2.3.4	Modellbau und Verfeinerung	40
3.2.3.5	Modellanalyse und graphische Darstellung	40
4	Ergebnisse	42
<hr/>		
4.1	NifS aus Azotobacter vinelandii	42
4.1.1	Klonierung, Expression und Reinigung	42
4.1.2	Aktivität des Proteins	43
4.2	NifS aus Thermotoga maritima	44
4.2.1	Identifikation des Gens	44
4.2.2	Klonierung, Expression, Reinigung und Kristallisation	45
4.2.3	Aktivität des Proteins	47
4.2.4	Strukturlösung	48
4.2.5	Strukturbeschreibung	51
4.2.5.1	Natives Protein	51
4.2.5.2	Reduziertes tmNifS im Komplex mit Cystein	54
4.2.5.3	Allylglycin-inaktiviertes Protein	54
4.3	C-DES aus Synechocystis PCC6714	56

4.3.1	Strukturlösung	56
4.3.2	Strukturen	58
4.3.2.1	Natives Protein	59
4.3.2.2	Produktkomplex	61
4.3.2.3	K223A-Mutante	61
4.3.2.4	K223A-Mutante mit Substrat	61
5	Diskussion	62
5.1	Struktur von NifS aus <i>T. maritima</i>	62
5.2	Struktur von C-DES aus <i>Synechocystis</i>	63
5.3	Vergleich der Strukturen von tmNifS, C-DES und ecCsdB	65
5.4	Reaktionsmechanismen	69
5.5	Biologische Implikationen	72
6	Abkürzungen	73
7	Literatur	75

1 Zusammenfassung

Eisen-Schwefel-Cluster (Fe/S-Cluster) sind ubiquitäre co-Faktoren in vielen Proteinen, deren Funktion vom Elektronentransport über enzymatische Aktivität bis zur Genregulation reicht. Trotz ihrer universellen Bedeutung und der einfachen Darstellung von Modellverbindungen aus Fe(II), S^{2-} , S_8 und Thiolen ist der Biosyntheseweg dieser anorganischen Einheiten bis heute nicht geklärt. In *Azotobacter* wurde das Protein NifS beschrieben, welches für die Bildung des Fe/S-Cluster in Nitrogenase essentiell ist. NifS setzt Cystein zu Alanin und Schwefel um, der an einem strikt konservierten Cystein als Cysteinpersulfid gebunden wird. NifS-Homologe wurden in anderen Organismen von Bakterien bis hin zu Säugern identifiziert. Kessler und Mitarbeiter beschrieben C-DES aus *Synechocystis*, welches Sequenzhomologie zu NifS besitzt und der Schwefellieferant für den Aufbau der Fe/S-Cluster von Ferredoxinen ist. Dieses Enzym produziert jedoch Pyruvat und entbehrt des hochkonservierten Cysteins.

Zur Aufklärung des Mechanismus der Schwefelproduktion wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst NifS aus *A. vinelandii* kloniert und gereinigt. Da jedoch für dieses Protein keine Kristallisationsbedingung gefunden werden konnte, wurde dazu übergegangen, ein NifS-Homologes aus *T. maritima* (tmNifS) zu identifizieren, zu klonieren und zu reinigen. Die Struktur von tmNifS konnte über die Methode der multiplen anomalen Dispersion bestimmt werden und wurde bei einer Auflösung von 2.0Å zu einem R-Faktor von 20.9% verfeinert. Ein Substratkomplex des reduzierten Enzymes mit Cystein wurde ebenfalls charakterisiert (2.7Å, R-Faktor: 20%). NifS ist ein homodimeres, PLP-abhängiges Enzym, welches der PLP- α -Familie zugeordnet werden kann. Die Struktur von tmNifS ist daher ähnlich zu anderen Proteinen dieser Familie. Das unter den NifS-homologen Proteinen konservierte Cystein ist in einer hochflexiblen *Loop*-Struktur lokalisiert, wodurch es einerseits an der Desulfurierungsreaktion mitwirken kann, jedoch auch Stellen in größerer Entfernung erreicht. Dies legt den Schluß nahe, daß diese *Loop*-Struktur als ‚molekularer Kran‘ fungiert und gebildete S^0 -Spezies an andere Proteine weitergereicht werden können.

UV-VIS-spektroskopische Untersuchungen gestatteten es, zusammen mit der Anordnung der Seitenketten im Aktivzentrum, einen möglichen Reaktionsmechanismus aufzustellen, bei dem einem konservierten Histidin (H99) eine zentrale Rolle zugewiesen wurde. H99 steht mit dem PLP-*co*-Faktor in Aromaten-Ring-Interaktion. Somit kommt es aus elektrostatischen Gründen zu einer gegenseitigen Feinsteuerung der chemischen Eigenschaften. Es wurde postuliert, daß ein protoniertes Histidin den elektronenreichen chinonoiden Zustand des PLP stabilisiert, ein deprotoniertes H99 den elektronenärmeren, aromatischen Zustand. Mit H99 als generellem Säure-Base-Katalysator, ergibt sich so ein Reaktionszyklus der die Desulfurierungsreaktion erklärt.

Weiterhin konnte in Zusammenarbeit mit D. Kessler die Struktur von C-DES, sowie dessen Substrat- und Produktkomplex aufgeklärt werden. C-DES arbeitet nach einem anderen Mechanismus als NifS, da ihm das konservierte Cystein und der entsprechende *Loop* fehlt. Es wurde aus den Untersuchungen klar, daß C-DES Cystin als Substrat verwendet und ein freies Cysteinpersulfid generiert, welches in einer hydrophoben Tasche vor Hydrolyse geschützt wird. C-DES besitzt im Gegensatz zu NifS eine wesentlich größere Öffnung des Aktivzentrums, was eine Interaktion mit anderen Proteinen wahrscheinlich macht. Im Gegensatz zu NifS, welches den Schwefel bei anderen Proteinen ‚abliefern‘, scheint es hier nötig zu sein, daß der Schwefel aus dem Aktivzentrum von C-DES ‚geholt‘ wird.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in :

Jens T. Kaiser, Tim Clausen, Gleb P. Bourenkow, Hans-D. Bartunik, Stefan Steinbacher and Robert Huber (2000). Crystal Structure of a NifS-like Protein from *Thermotoga maritima*: Implications for Iron Sulfur Cluster Assembly, *J. Mol. Biol.* **297**, 451-464

Tim Clausen, Jens T. Kaiser, Clemens Steegborn, Robert Huber and Dorothea Kessler (2000). Crystal Structure of the cystine C-S-lyase from *Synechocystis*: Stabilization of cysteine persulfide for FeS cluster biosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(8), 3856-3861

J.T. Kaiser, T. Clausen, A. Mozzarelli, R. Huber, D. Kessler. Snapshots of the C-DES catalyzed reaction in crystal and in solution, *in preparation*.

2 Einleitung

2.1 Eisen-Schwefel-Cluster

Eisen-Schwefel-Cluster (Fe/S-Cluster) sind anorganische Einheiten in Proteinen, die in allen Lebensformen auftreten. Ihre Entdeckung geht auf die Untersuchung von photosynthetischen und Stickstoff fixierenden Organismen in den 50er und 60er Jahren des 20. Jahrhunderts zurück (Beinert *et al.*, 1997). Anfänglich wurden diese Proteine ausschließlich für Elektronentransportproteine gehalten, mittlerweile ist jedoch klar, daß ihre Funktion darüber hinaus sowohl regulatorisch als auch enzymatisch sein kann (Beinert & Kiley, 1999; Hidalgo & Demple, 1994; Johnson,

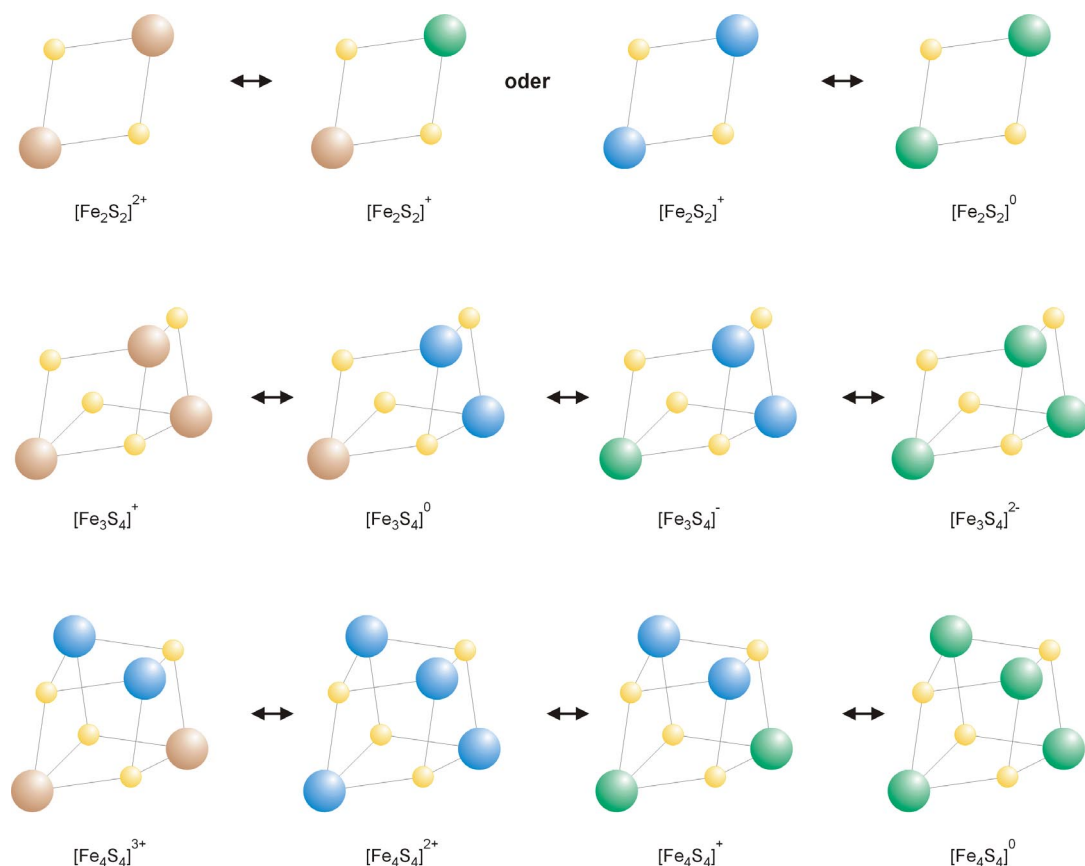


Abbildung 1: Exemplarische Beispiele verschiedener Fe/S-Cluster Geometrien und ihrer redox-Zustände. S²⁻: gelb, Fe³⁺ braun, Fe²⁺ grün, Fe^{2.5+} blau. Reihe 1: Fe₂S₂-Cluster, Reihe 2: Fe₃S₄-Cluster, Reihe 3 Fe₄S₄-Cluster. Aus der Anordnung ist ersichtlich, daß die Fe₂S₂-Raute die Grundstruktur der Fe/S-Cluster darstellt (nach Johnson, 1998).

1998). Nachdem gezeigt wurde, daß Eisen-Schwefel-Verbindungen verschiedener Stöchiometrien synthetisiert werden können, war aufgrund von vergleichenden Untersuchungen klar, daß in jenen Proteinen tatsächlich diesen Modellverbindungen identische Strukturen vorlagen (Hagen *et al.*, 1981; Hagen *et al.*, 1983; Ibers & Holm, 1980; Zhou *et al.*, 1996). Die Funktionsweise von Fe/S-Clustern ist in ihrer einzigartigen elektronischen Struktur und den damit verbundenen redox-Eigenschaften zu finden. Die Cluster können in verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen, wobei sowohl lokalisierte als auch delokalisierte Eisen-Oxidationsstufen beobachtet werden (Johnson, 1998). Weiterhin können sich Cluster verschiedener Stöchiometrien redox-abhängig in einander umwandeln. In Abbildung 1 sind drei der wichtigsten vorkommenden Geometrien dieser *co*-Faktoren dargestellt, Fe₂S₂-, Fe₃S₄- und Fe₄S₄-Cluster. Die grundlegenden Arbeiten von Holm und Mitarbeitern (Hagen *et al.*, 1983) lieferten Einblicke in die Reaktionsschritte bei der Bildung und Interkonversion von verschiedenen Fe/S-Clustern, die für das Verständnis der Funktionsweise dieser Module von großem Wert sind.

Die Einfachheit der chemischen Synthese der meisten dieser Verbindungen und die Tatsache, daß viele Fe/S-Cluster aus Proteinen entfernt und – durch Reaktion mit Fe(II)-Salzen, Schwefel und Thiolen – rekonstituiert werden können, führte lange Zeit zu der Annahme, daß Fe/S-Cluster spontan entstehen und bei ihrem Einbau keinerlei Unterstützung benötigen (Merchant & Dreyfuss, 1998). Betrachtet man jedoch die *in vitro* Synthesen, welche stets von Fe(II)-Verbindungen, elementarem Schwefel und Thiolen ausgehen, wird klar, daß die *in vivo* Darstellung durch die Bioverfügbarkeit dieser Substanzen limitiert wird. Erst in den 80er und 90er Jahren des 20. Jahrhunderts konnte von Dean und Kollegen gezeigt werden, daß der Fe/S-Cluster von *A. vinelandii* Nitrogenase die Unterstützung eines Enzymes benötigt, welches die Bildung des Clusters katalysiert (Jacobson *et al.*, 1989; Zheng *et al.*, 1993). Dieses Protein wird von dem *nifS*-Gen des *nif*-Operons (*nitrogen-fixation*-Operon) codiert und war der erste Vertreter einer großen Proteinfamilie, den NifS-ähnlichen Proteinen.

2.2 NifS-ähnliche Proteine

Nach der Feststellung, daß NifS die Rekonstitution des Fe/S-Clusters der Nitrogenase katalysiert, charakterisierten Zheng und Dean in ihren grundlegenden Arbeiten diese Proteine biochemisch (Zheng *et al.*, 1998; Zheng & Dean, 1994; Zheng *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1993). Es stellte sich heraus, daß NifS ein Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängiges Enzym ist, welches L-Cystein umsetzt. Produkt dieser Reaktion ist Alanin und – je nach Reaktionsbedingungen – H₂S oder elementarer Schwefel. Es konnte gezeigt werden, daß die primär entstehende Schwefelspezies ein Persulfid an Cystein 325 ist. NifS wird irreversibel durch alkylierende Agenzien gehemmt, was auf die Alkylierung des aktiven Cys325 zurückzuführen ist.

Die biologische Rolle ist somit evident: NifS bringt elementaren, atomaren Schwefel in eine bioverfügbare Form. Die Universalität dieses Mechanismus wird darin deutlich, daß mit NifS aus *A. vinelandii* auch Fe/S-Proteine anderer Organismen katalytisch *in vitro* rekonstituiert wurden (Chen *et al.*, 1997; Green *et al.*, 1996; Hidalgo & Demple, 1996).

NifS-ähnliche Proteine wurden – aufgrund von Sequenzhomologien – in nahezu jeder Art von Organismus gefunden (Flint, 1996; Kirby *et al.*, 1998; Kispal *et al.*, 1999; Lacourciere & Stadtman, 1998; Leong-Morgenthaler *et al.*, 1994; Mihara *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 1998; Patzer & Hantke, 1999), möglicherweise mit der Ausnahme des Archaeons *M. janaschii* (Patzer & Hantke, 1999). Abbildung 2 (Seite 7) zeigt einen Sequenzvergleich verschiedener NifS-ähnlicher Proteine, wobei die Konsensussequenz farblich hervorgehoben ist.

Ferner wurde festgestellt, daß einige NifS-ähnliche Proteine eine starke Präferenz von Selenocystein (SeCys) gegenüber Cys als Substrat zeigen (Lacourciere & Stadtman, 1998; Mihara *et al.*, 1997; Mihara *et al.*, 1999). In Prokaryonten werden sehr oft mehrere Paraloge dieses Proteins gefunden, was ein deutlicher Hinweis auf die Wichtigkeit und Vielfältigkeit dieses Enzyms ist. Eukaryonten, besitzen soweit

bekannt, nur ein NifS-ähnliches Protein, welches eine Präsequenz zum mitochondrialen Import besitzt (Kispal et al., 1999; Land & Rouault, 1998).

Eine interessante Sonderstellung innerhalb der NifS-Familie nimmt das auch in dieser Arbeit behandelte C-DES aus *Synechocystis* ein. Dieses Protein wurde durch Kessler und Mitarbeiter in einem Holoferredoxin-Rekonstitutionsassay identifiziert (Leibrecht & Kessler, 1997). Interessanterweise zeigte dabei keines der drei anderen NifS-ähnlichen Proteine in *Synechocystis* Aktivität. C-DES ist insofern bemerkenswert, als daß es durch Alkylierung nicht inhibierbar ist, Pyruvat statt Alanin als Reaktionsprodukt besitzt und katalytische Mengen Cystin zur Entfaltung seiner vollen Aktivität benötigt (Lang & Kessler, 1999).

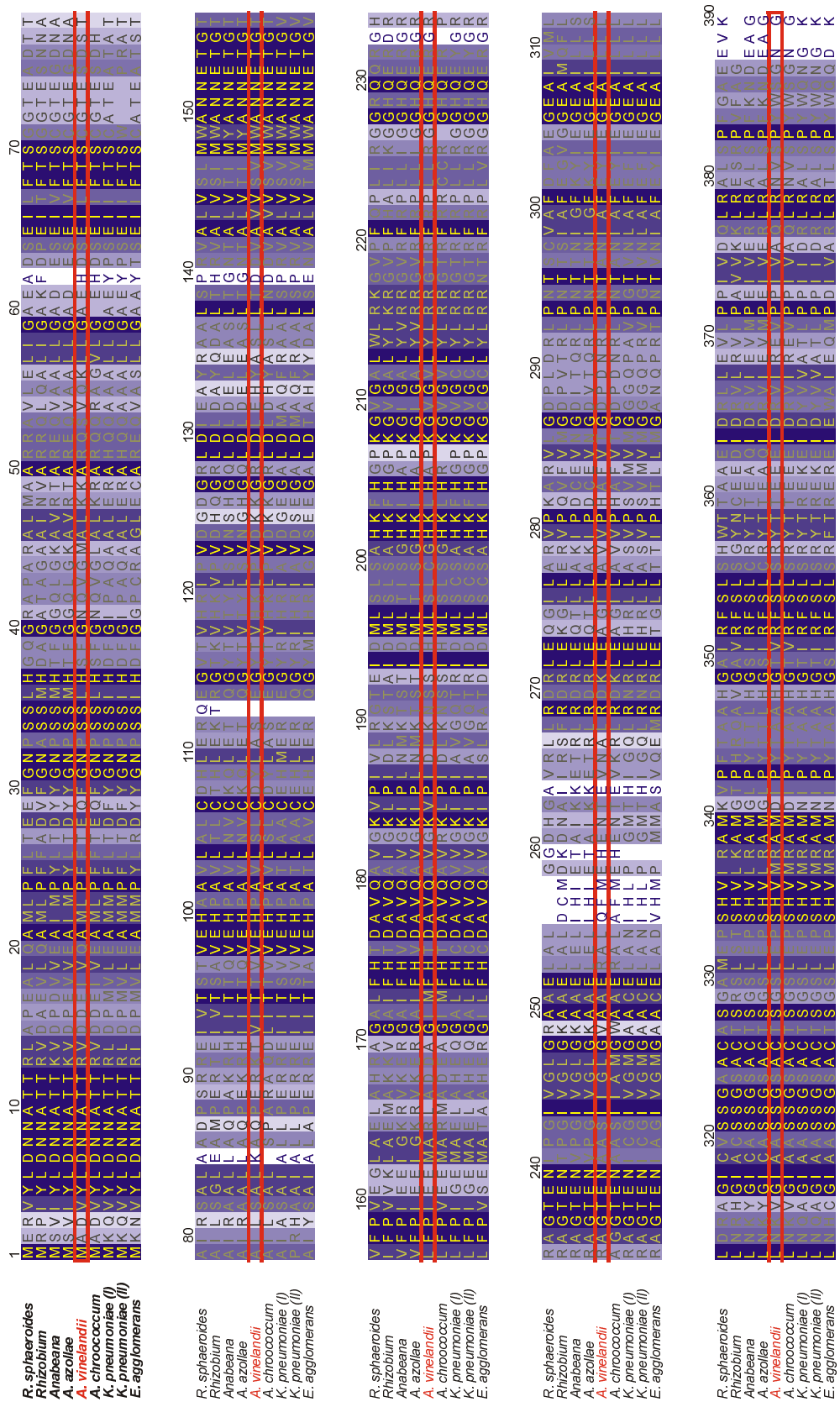


Abbildung 2: Sequenzvergleich verschiedener NifS-ähnlicher Proteine. Die Sequenzen sind nach Konserviertheit eingefärbt. Dunkelblau: Stark konserviert, weiß: Stark variabel. Die Sequenz von *A. vinelandii* NifS ist hervorgehoben.

2.3 Pyridoxalphosphat-abhängige Enzyme

Pyridoxal-5'-Phosphat wurde zu Beginn der 30er Jahre des 20. Jahrhunderts bei Nährstoffstudien an Ratten als Vitamin B6 entdeckt (György, 1934). Die Namensgebung ist auf das ursprünglich isolierte Pyridoxin, welches ein sauerstoffhaltiges (,ox') Pyridinderivat darstellt, zurückzuführen (György, 1964). Dieses ist in Abbildung 3 zusammen mit den *co*-Faktoren Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) und Pyridoxamin-5'-Phosphat (PMP) dargestellt. In allen Fällen wird von PLP eine

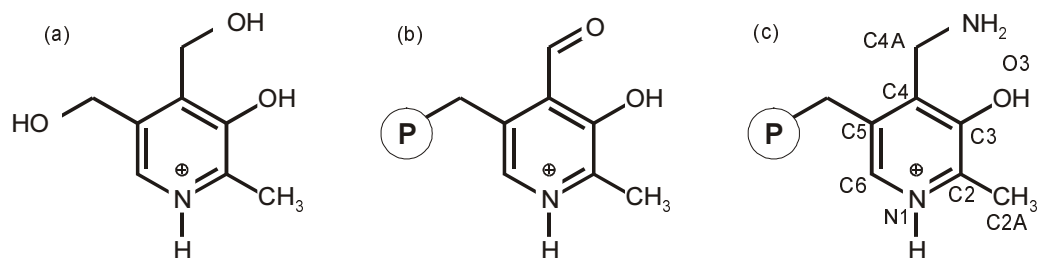


Abbildung 3: (a) Pyridoxin; (b) Pyridoxal-5'-Phosphat; (c) Pyridoxamin-5'-Phosphat. In (c) ist die Standardnomenklatur der Atome angegeben.

SCHIFF'sche-Base mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes geknüpft, wodurch sich das sogenannte *interne Aldimin* bildet. Diese reaktive Bindung ist die eigentliche aktive Gruppe PLP-abhängiger Enzyme. Im Verlauf der Katalyse wird die SCHIFF'sche Base-Bindung mit dem Protein gelöst und zum Substrat ausgebildet. Man spricht dann vom *externen Aldimin*. Das Ringsystem des *co*-Faktors wirkt nun als redox-Katalysator, wobei verschiedene Reaktionswege besprochen werden können. Diese sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Nach der Transaldiminierung kommt es durch den elektronenziehenden Charakter des PLP's zur Schwächung einer Bindung zu dem Substrat $C\alpha$. Die Umgebung des *co*-Faktors ist nicht nur für die Substrat- sondern auch für die Reaktionsspezifität von entscheidender Bedeutung. Abhängig von der Orientierung des Substrates relativ zum *co*-Faktor werden unterschiedliche Bindungen ($C\alpha$ -CO₂, $C\alpha$ -H α oder $C\alpha$ -R) geschwächt; somit wird die Reaktionsspezifität in verschiedene Richtungen gelenkt. Viele dieser initialen Reaktionen führen zu Zwischenstufen, welche wiederum

abhängig von der Proteinumgebung in verschiedene Richtungen weiterverlaufen können.

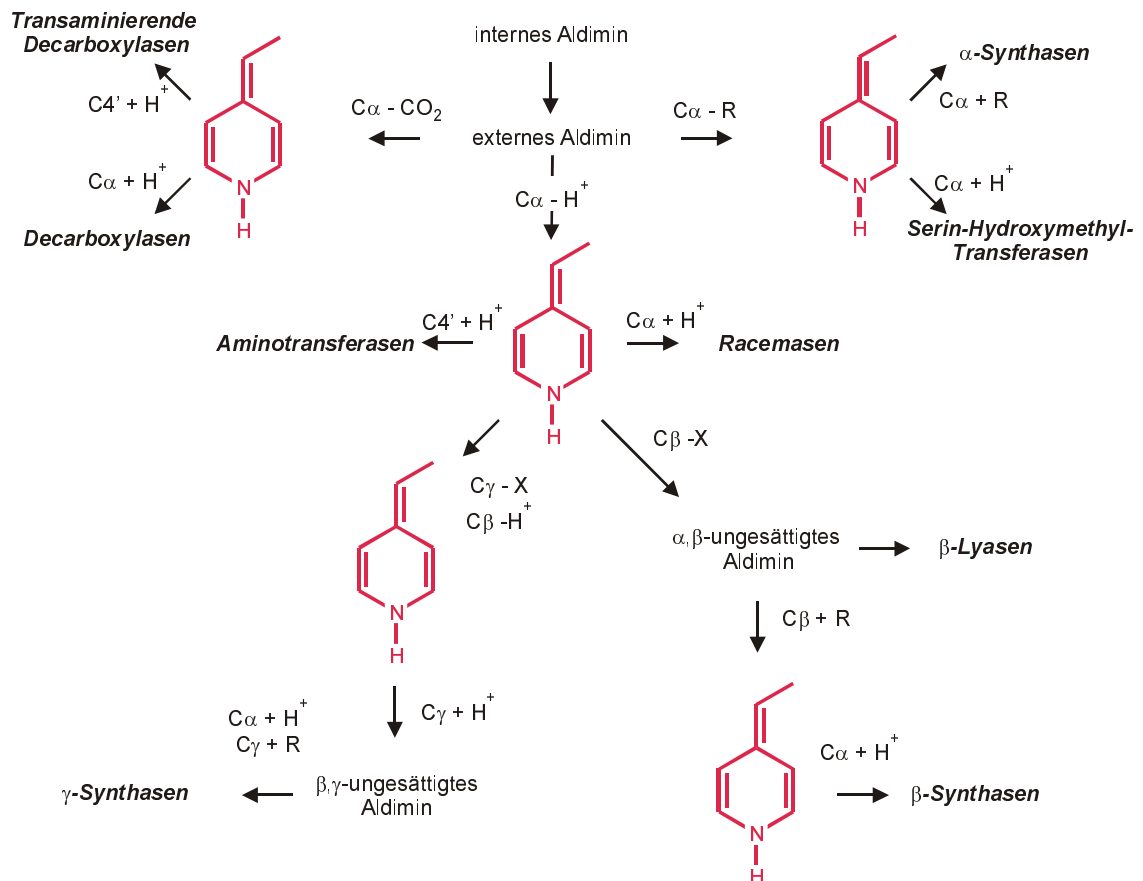


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Reaktionswege, die von PLP-abhängigen Enzymen besprochen werden können (nach John, 1995)

Ein wichtiges Mittel zur Bestimmung des genauen Reaktionsweges eines PLP-abhängigen Enzyms ist die UV-VIS-Spektroskopie. Dies liegt darin begründet, daß der *co*-Faktor in verschiedenen Zuständen ein deutlich unterschiedliches Absorptionsverhalten zeigt. In vielen Fällen ist zum Nachweis verschiedener Reaktionswege schon eine spektroskopische Untersuchung des reinen Proteins oder des Enzyms in Gegenwart von Substrate von großem Nutzen, insbesondere wenn es darum geht, das Vorhandensein einzelner Spezies im Reaktionsverlauf nachzuweisen. Oft kann auf diese Weise schon ein möglicher Reaktionsweg von einem anderen unterschieden werden. Wichtige spektroskopisch charakterisierbare

Intermediate sind in Abbildung 5 mit ihren Absorptionsmaxima dargestellt (Akhtar *et al.*, 1984; Benci *et al.*, 1999; Schnackerz *et al.*, 1995).

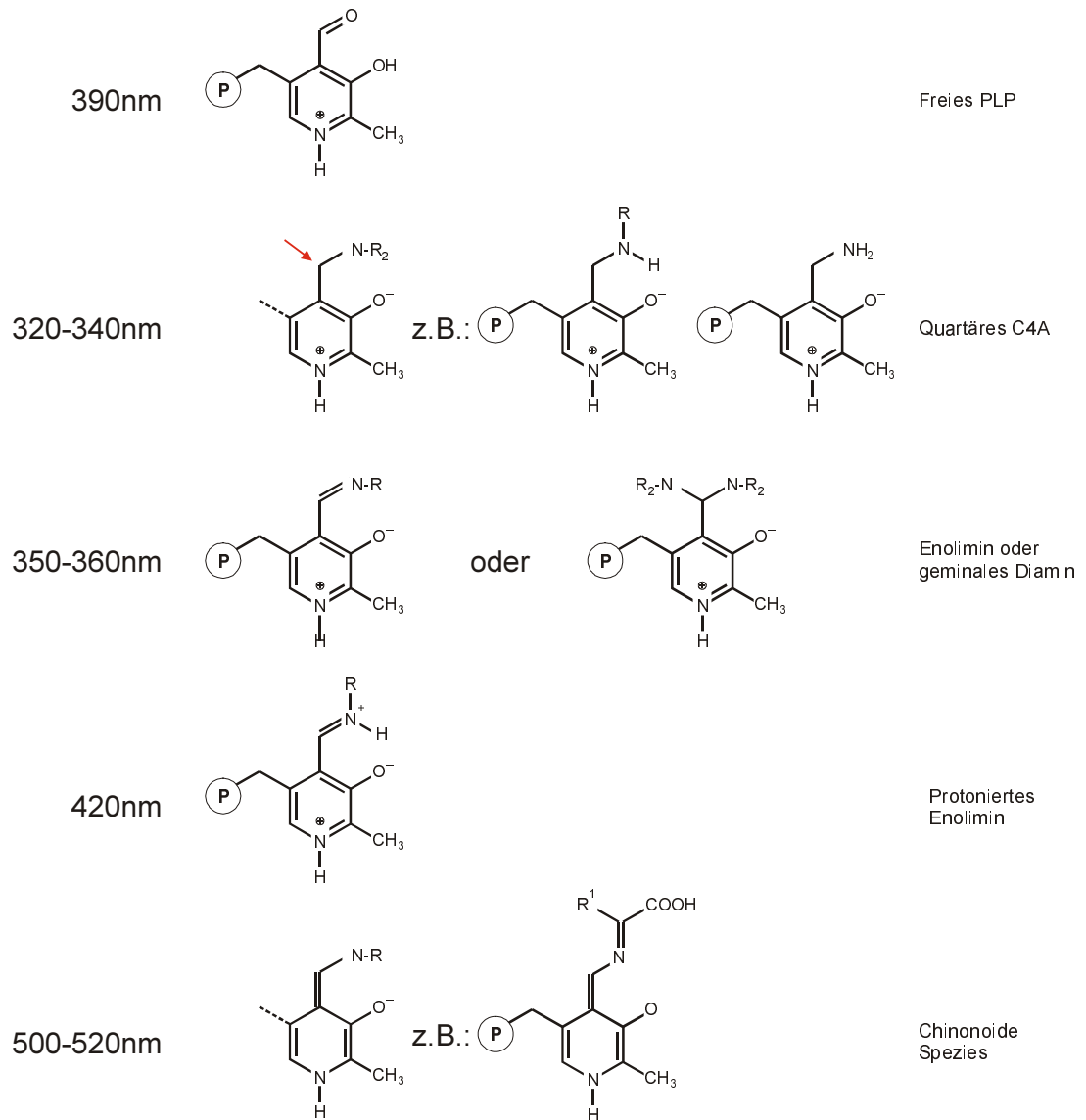


Abbildung 5: Absorptionsmaxima der wichtigsten PLP-Zustände(nach Akhtar *et al.*, 1984; Benci *et al.*, 1999; Schnackerz *et al.*, 1995).

2.4 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

2.4.1 Überblick

Die Methode der Strukturaufklärung von Proteinen über die Röntgenkristallographie ist in verschiedenen Lehrbüchern ausführlich behandelt (Blundell & Johnson, 1976; Drenth, 1994; Stout & Jensen, 1989). Im folgenden werden die wichtigsten Grundprinzipien deshalb nur kurz dargestellt.

Das Grundproblem bei dem Versuch atomare Strukturen aufzulösen ist in der Tatsache zu finden, daß sie – anders als mikroskopische Strukturen – nur schwer der direkten Abbildung zugänglich sind, da man mit elektromagnetischen Wellen nur Strukturen deutlich oberhalb ihrer Wellenlänge visualisieren kann. Dies wird für die atomare Mikroskopie in der Elektronenmikroskopie verwendet. Unvorteilhafter Weise führt die Wechselwirkung von Elektronen mit Materie zur Zerstörung biologischer Proben und wirklich detaillierte ‚mikroskopische‘ Aufnahmen von Proteinen sind nur schwer zu erhalten. Man ist statt dessen auf die Ausnutzung von Interferenzeffekten von Röntgenstrahlung angewiesen, die Wellenlängen im Bereich der zu untersuchenden Strukturen besitzt. Die wichtigsten Röntgenquellen für die Proteinstrukturanalyse sind Drehanodengeneratoren, meist mit $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung (1.54182\AA) und Synchrotrone mit Wellenlängen der Strahlung zwischen 0.9 und 1.8\AA .

Zur Ausbildung von Interferenzeffekten ist eine dreidimensional periodische Anordnung des zu untersuchenden Objekts notwendig: ein Kristall. Eines der Grundprobleme der Proteinstrukturaufklärung mit Röntgenmethoden ist somit die Erzeugung eines Proteinkristalles.

2.4.2 Kristallisation

Die Kristallisation von Proteinen sollte unter möglichst physiologischen Bedingungen stattfinden. Weiterhin sollte das Protein in hochreiner Form vorliegen. Heutzutage sind verschiedene Methoden zur Erzeugung von Proteineinkristallen bekannt (McPherson, 1990), von denen der Dampfdiffusionsmethode die weitaus

größte Bedeutung zukommt. Bei dieser Methode wird dem hochkonzentrierten Protein ein Fällungsmittel zugesetzt und diese Mischung über einem Reservoir mit höherer Konzentration des Fällungsmittels equilibriert. Der Konzentrationsgradient zwischen Proteinlösung und Reservoir wird durch die Dampfphase ausgeglichen, was zu einem Aufkonzentrieren des Proteins bis zur Übersättigung führt und im Idealfall ein geordnetes Abscheiden des Proteins aus der Lösung, die Kristallisation desselben, zur Folge hat. Die Ausbildung eines Proteinkristalles ist jedoch stark von den Bedingungen wie pH-Wert, Salzkonzentration, Art des Fällungsmittels, Temperatur usw. abhängig und in keinster Weise vorhersagbar. Dieses vieldimensionale Problem wurde versucht durch faktorielle Ansätze zu lösen (Carter & Carter, 1979; Jancarik & Kim, 1991), stellt aber auch heutzutage noch eines der Nadelöhre der Proteinkristallographie dar, da es rein empirisch, in günstigen Fällen halbempirisch, zu lösen ist.

Ein Kristall ist definitionsgemäß eine dreidimensional periodische Anordnung von Gitterbausteinen. Allgemein wird ein Kristall durch Translation der sogenannten *Elementarzelle* um ganzzahlige Vielfache der Elementarzellvektoren in alle drei Raumrichtungen aufgebaut. Die Elementarzelle wird durch Anwendung aller Symmetrieeoperatoren der jeweiligen kristallographischen Raumgruppe auf die kleinste sich wiederholende Einheit, die *asymmetrische Einheit*, gebildet.

2.4.3 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen

Trifft Röntgenstrahlung auf Materie, regt ihr oszillierendes elektrisches Feld die Elektronen zur Schwingung mit gleicher Frequenz an. Die Elektronen wirken als oszillierende Dipole und senden Sekundärstrahlung mit der Frequenz der einfallenden Strahlung aus. Für freie Elektronen ist die Streustrahlung der Einfallenden gegenüber 180° phasenverschoben. Im Normalfall können Proteinelektronen durch freie Elektronen approximiert werden, der Fall der anomalen Streuung wird unter 2.4.5.2 behandelt.

Die durch periodische Wiederholung der Elementarzelle in alle drei Raumrichtungen auftretenden Translationsvektoren bilden in ihrer Gesamtheit das Kristallgitter. Dieses Gitter wird von sogenannten Netzebenen durchzogen, die verschiedene

Gitterpunkte enthalten und durch ihre Schnittpunkte mit den Elementarzellachsen identifiziert werden, aus denen die MILLER'schen Indizes gebildet werden. Konstruktive Interferenz tritt nun nur auf, wenn der Gangunterschied zwischen den an einer Netzebenenschar gebeugten Wellen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist und somit die Interferenzbedingung erfüllt ist, welche sich in Form des BRAGG'schen Gesetzes formulieren läßt:

$$\frac{2d \sin \theta}{\lambda} = n$$

Hierbei ist d der Abstand zwischen Netzebenenscharen, θ der Streuwinkel und λ die verwendete Wellenlänge.

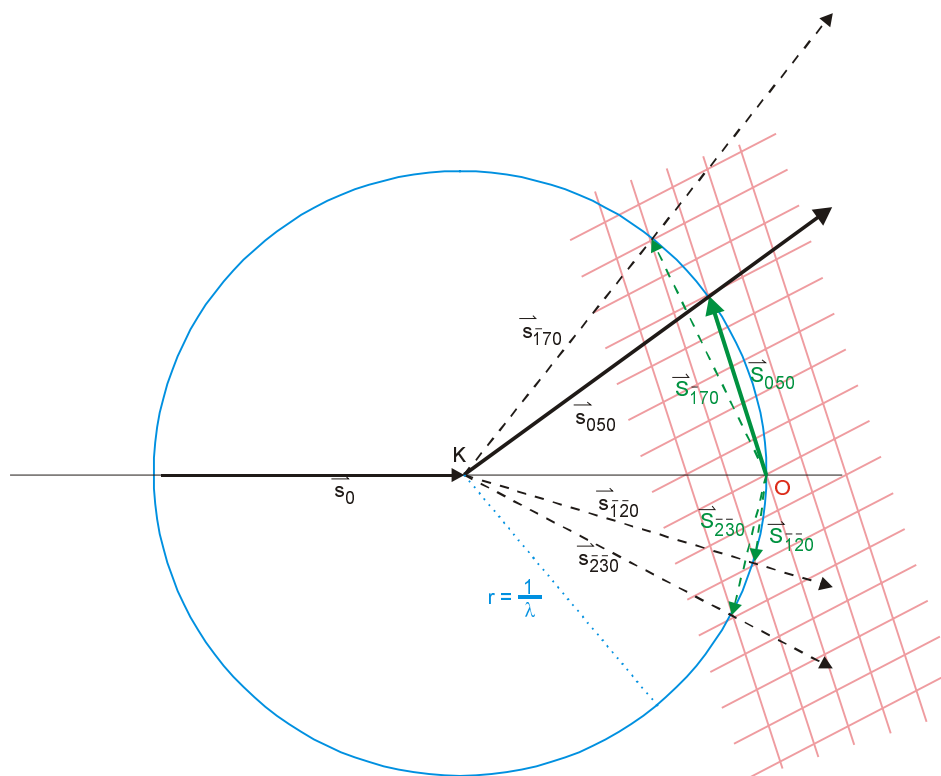


Abbildung 6: EWALD-Konstruktion (Ewald, 1921). Die Richtung des Primärstrahls (s_0) geht vom Drehpunkt des Kristalls (K) zum Ursprung (O) des reziproken Gitters, welches sich mit dem Kristall dreht. Um den Kristallursprung zeichnet man eine Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ (blau), die sogenannte EWALD-Kugel. Für alle Punkte des reziproken Gitters (hier 050 , $\bar{1}70$, $\bar{1}\bar{2}0$, $\bar{2}30$), welche auf der EWALD-Kugel liegen, sind die Reflexbedingungen entsprechend der BRAGG'schen Gleichung erfüllt. Die Vektoren vom Kristalldrehpunkt durch diese Punkte geben die Richtungen der vom Kristall bei diesem Drehwinkel ausgesandten Strahlen an.

Eine graphische Formulierung des BRAGG'schen Gesetzes ist in Abbildung 6 gezeigt. Hierzu ist die Einführung des sogenannten reziproken Gitters hilfreich. Das reziproke Gitter wird gebildet aus der Ansammlung der Normalenvektoren von Netzebenenscharen mit der Länge des reziproken Netzebenenabstandes.

Diese sogenannte EWALD-Konstruktion (Ewald, 1921) visualisiert die Erfüllung der Reflexionsbedingung. Die Reflexionsbedingung ist genau dann erfüllt, wenn ein reziproker Gitterpunkt die EWALD-Kugel (auf Englisch ‚*sphere of reflection*‘) mit dem Radius $1/\lambda$ durchquert. Die Richtung des gestreuten Strahles ist durch die Verbindung des Kristalldrehpunktes mit dem die Kugel durchquerenden reziproken Gitterpunkt gegeben. Deutlich wird, daß Gitter mit identischen Abmessungen auch Reflexe in identische Richtung abstrahlen. Wichtig für die Strukturbestimmung ist nun die Intensität der gestreuten Strahlen.

Betrachtet man eine isolierte Elementarzelle, an der sich eine Welle bricht, so ergibt sich ein richtungsabhängiges, kontinuierliches Diffraktionsbild. Durch die periodische Anordnung des Kristalls können diese Sekundärwellen jedoch nur in bestimmte Richtungen konstruktiv interferieren. Für die komplexen Strukturformfaktoren, durch welche die gestreuten Strahlen beschrieben werden, ergibt sich folgende Gleichung:

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

Die Summe erstreckt sich dabei über alle Atome j mit den fraktionellen Koordinaten \vec{r}_j in der Elementarzelle; f_j ist der Atomformfaktor, der die Richtungsabhängigkeit der Streuintensität an dem jeweiligen Atom repräsentiert und unter Annahme von kugelsymmetrischer Ladungsverteilung in Abwesenheit von anomaler Streuung nur von der Länge des Streuvektors (h, k, l) abhängig ist.

2.4.4 Berechnung der Elektronendichte

Die Elektronendichteverteilung in einem Kristall kann durch die Gesamtheit der Größen f_j und \vec{r}_j ausgedrückt werden, womit sie sich als inverse FOURIERtransformierte der Strukturfaktoren ergibt:

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

Der Phasenwinkel ϕ_{hkl} , der den Gangunterschied eines Reflexes im Vergleich zu einer am Ursprung der Elementarzelle gestreuten Welle angibt, ist hierbei der direkten Messung nicht zugänglich, da aus den integrierten Reflexintensitäten lediglich die Strukturamplituden $|F_{hkl}|$ bestimmt werden können. Diese Unbestimmtheit wird in der Proteinkristallographie als das *Phasenproblem* bezeichnet.

2.4.5 Lösung des Phasenproblems

Zur Lösung des Phasenproblems kann eine Funktion herangezogen werden, die nicht von den Phasen selbst abhängt, die sogenannte PATTERSONsummation:

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

Es kann gezeigt werden, daß diese Funktion einer Darstellung der interatomaren Distanzvektoren entspricht. Notgedrungen entspricht damit die Symmetrie der PATTERSONdichte der der Elektronendichte ohne jegliche translatorische Symmetrieelemente, und unter Hinzufügung eines Inversionszentrums. In bestimmten Bereichen dieser Dichtekarte kommt es durch kristallographische Symmetrieoperationen zu einer Häufung von Distanzvektoren. Diese Bereiche werden HARKER-Ebenen genannt.

Bei der großen Anzahl von Atomen in einer Proteinstruktur ist es unmöglich, aus der Anordnung der PATTERSON-Vektoren auf die Proteinstruktur zu schließen und so ein Modell zu generieren, aus dem initiale Phaseninformation abgeleitet werden kann. Man ist statt dessen darauf angewiesen, PATTERSON-Karten von Substrukturen zu

interpretieren und daraus Phaseninformation für die Proteinstruktur abzuleiten (SIR, MIR: siehe 2.4.5.1, MAD: siehe 2.4.5.2) oder experimentelle PATTERSON-Dichten mit theoretischen zu vergleichen, um ein Modell zur Bestimmung der initialen Phaseninformation zu plazieren (MR: siehe 2.4.5.3).

2.4.5.1 *Isomorpher Ersatz*

Bei der Methode des isomorphen Ersatzes wird ein Datensatz eines Proteinkristalles (,NATI‘) und mindestens ein Datensatz eines sogenannten ‚isomorphen Derivates‘ (,DERI‘) aufgenommen. Notwendige Eigenschaft eines verwendbaren Derivates ist vollständige Isomorphie der Proteinanordnung im Kristall und die geordnete Bindung von Schweratomen in diesem Kristall. In guter Näherung kann dann davon ausgegangen werden, daß die Differenzen in den bestimmten Strukturfaktor-amplituden (ΔF) von DERI und NATI allein auf Differenzen in den Strukturen zurückzuführen sind, also auf die in dem DERI-Kristall zusätzlich vorhandenen Atome.

Eine aus diesen ΔF s berechnete PATTERSONdichte sollte also durch ein geeignetes Schweratommodell interpretierbar sein. Aufgrund der wesentlich geringeren Anzahl der Schweratome im Vergleich zu den Proteinatomen ist dies auch praktisch durchführbar. Durch Vergleich von Nativ-, Derivat- und Differenzstrukturfaktor-amplituden mit den komplexen Strukturfaktoren aus dem Schweratommodell können initiale Phasenwinkel für die Proteinstrukturfaktoren bestimmt werden.

Dies ist in Abbildung 7 dargestellt. In manchen Fällen lassen sich so bereits mit einem Derivat hinreichend genaue Proteinphasen bestimmen, (*Single Isomorphous Replacement*, SIR) oft sind jedoch mindestens zwei unabhängige Derivate nötig (*Multiple Isomorphous Replacement*, MIR).

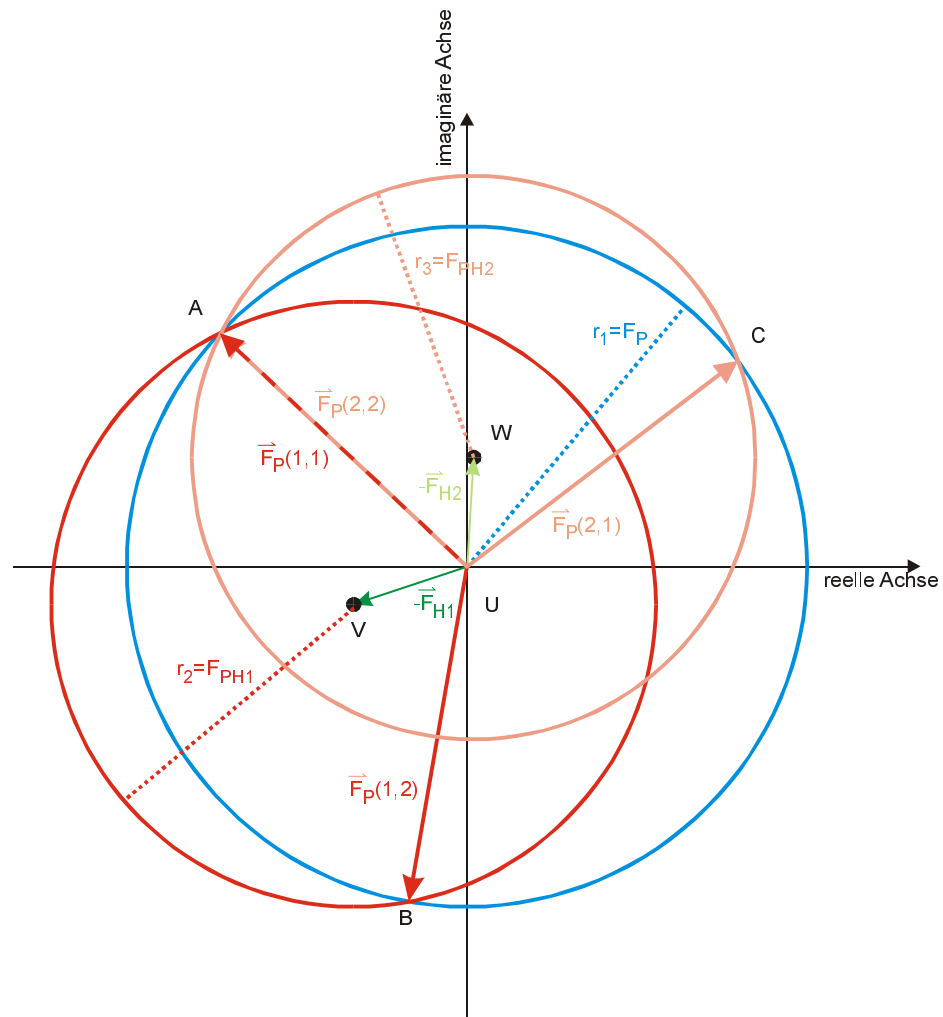


Abbildung 7: Harker-Konstruktion (Harker, 1956). Für jeden Reflex wird um den Ursprung ein Kreis mit dem Radius $|F_p|$ gezeichnet (blau). Um $-\bar{F}_{H1}$ versetzt wird ein weiter Kreis mit dem Radius $|F_{PH1}|$ gezeichnet (rot). Die beiden Schnittpunkte A und B ergeben zwei Möglichkeiten für \bar{F}_p . Erst ein weiteres unabhängiges Derivat löst über eine ähnliche Konstruktion (orange) diese Doppeldeutigkeit auf. Am gemeinsamen Schnittpunkt (A) ergibt sich die Proteinphase eindeutig.

2.4.5.2 Multiple anomale Dispersion

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung von Proteinphasen nutzt das Phänomen der anomalen Streuung aus. Wie unter 2.4.3 erwähnt, werden die Diffraktionsphänomene normalerweise durch Streuung an freien Elektronen beschrieben, wobei die gestreute Welle der einfallenden gegenüber um 180° phasenverschoben ist. In der Nähe einer Absorptionskante eines Elementes gilt diese Näherung nicht mehr, und der Atomformfaktor ist nicht mehr länger eine reelle, sondern eine komplexwertige Zahl. In Abbildung 8 ist dieser Sachverhalt exemplarisch an einem Strukturfaktorpaar dargestellt.

Weil dadurch bedingt F_{hkl} und F_{-h-k-l} weder betragsmäßig noch in ihren Phasenwinkeln identisch sind, kann aus den Amplitudendifferenzen dieser Reflexe

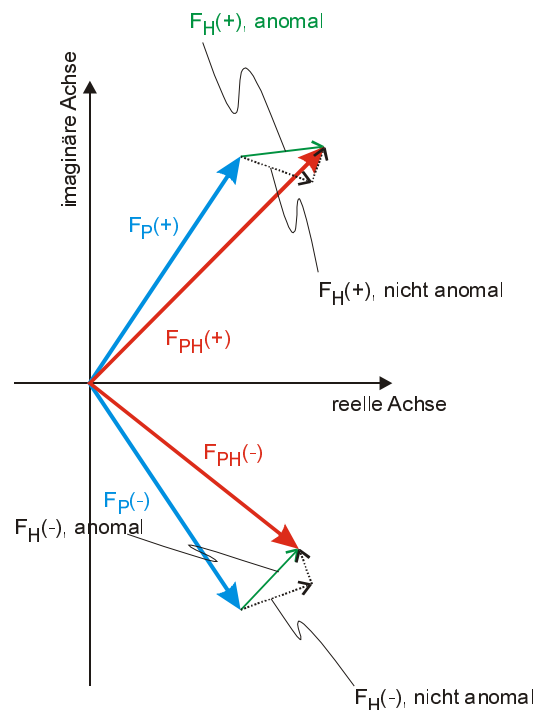


Abbildung 8: Ursache der Verletzung des FRIEDEL'schen Gesetzes bei anomaler Streuung. Im Falle der elastischen Streuung wären $F_{PH}(+)$ und $F_{PH}(-)$ identisch. Das Streuen in der Nähe einer Absorptionskante führt jedoch zu einer Phasenverschiebung, ausgedrückt durch if' für den Schweratomformfaktor, der den BIJVOET-Paaren verschiedene Länge und unterschiedlichen Phasenbetrag verleiht.

eine PATTERSONDichte errechnet werden, aus der sich ein Modell der Substruktur aller bei einer bestimmten Wellenlänge anomal streuenden Atome erstellen läßt.

Analog zum MIR-Fall können nun durch eine HARKER-Konstruktion initiale Proteinphasenwinkel bestimmt werden.

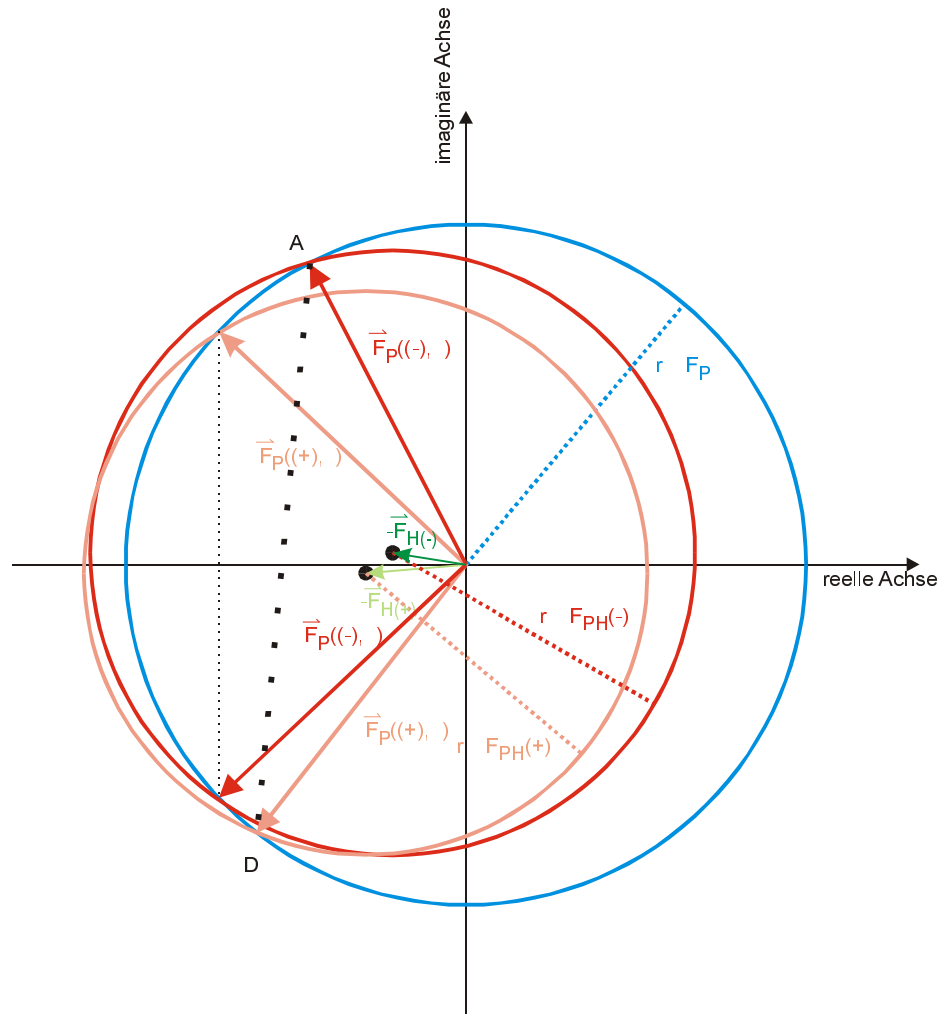


Abbildung 9: HARKER-Konstruktion für den MAD-Fall. Analog zum MIR-Fall wird ein Kreis mit Radius F_p um den Ursprung gezeichnet. Um $-F_H(-)$ versetzt, zeichnet man den Kreis $F_{pH}(-)$ und erhält an den Schnittpunkten zwei Möglichkeiten für $F_p(-)$. Die Ambiguität wird aufgelöst, wenn man um $-F_H(+)$ versetzt den Kreis $F_{pH}(+)$ zur Konstruktion von zwei Möglichen $F_p(+)$ zeichnet. Das bezüglich der x-Achse spiegelsymmetrische Paar von möglichen F_p gibt die korrekte Proteinphase für diesen Reflex.

2.4.5.3 Molekularer Ersatz

Da die Methode des Molekularen Ersatzes (Hoppe, 1957a; Hoppe, 1957b; Huber, 1965; Rossmann & Blow, 1962) in der vorliegenden Arbeit nicht von großer Bedeutung ist, sei hier nur eine sehr knappe Beschreibung gegeben.

Bei der Methode des Molekularen Ersatzes (*Molecular Replacement*, MR) ist man darauf angewiesen, ein Strukturmodell mit hinreichend hoher Homologie zu dem untersuchten Protein zu haben. Aus dem Modell berechnete Patterson-Dichten können dann mit experimentellen verglichen werden und bei maximaler Überlappung von intramolekularen Differenzvektoren (hauptsächlich Patterson-Vektoren im Bereich der erwarteten Molekülgröße) kann von einer korrekten Orientierung des Modells bezüglich der untersuchten Zelle ausgegangen werden. Die Positionierung des orientierten Modells kann dann über eine Realraumsuche der Translation, über eine Analyse der HARKERebenen oder durch Korrelationsuchen von intermolekularen Pattersonvektoren (hauptsächlich Vektoren mit größerer Länge als die erwartete Molekülgröße) erfolgen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt wurden Chemikalien von den Firmen Fluka, Aldrich, Sigma, Merck, Serva und Biomol bezogen und waren mindestens von analytischem Reinheitsgrad.

3.1.2 Biologisches Material

Zellen von *A. vinelandii* DSMZ85 und *T. maritima* wurden von der DSMZ Braunschweig bezogen. Gereinigtes C-DES Protein sowie Plasmide zur Expression von C-DES wurden von Frau Dr. Dorothea Kessler zur Verfügung gestellt. Folgende *E. coli* Zelllinien wurden verwendet:

DH5 α Genotyp:	(Stratagene GmbH, Heidelberg) <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> , D(<i>lacZYA-argF</i>), <i>f80lacZDM15Fl</i> .
BL21(DE3) Genotyp:	(Novagene, INC. Madison Wisconsin) F1, <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , ($r_B^- m_B^-$), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)
B843(DE3) Genotyp:	F1, <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , ($r_B^- m_B^-$), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3), <i>met</i>

Folgende Plasmide wurden verwendet:

pET22b(+) (Novagen)

pUC18 (Novagen)

Folgende Oligonukleotide (GenZentrum, LMU München) wurden verwendet:

avnifs1:5p: 5'-forward-Primer, BfaI-Schnittstelle unterstrichen

5'-CCA CCA CCA CCA GCT AGC CAT GGC TGA CGT CTA TCT CGA
TAA CAA CGC CAC CAC CCG GG-3'

avnifs1:3: 3'-reverse-Primer, HindIII-Schnittstelle unterstrichen

5'-CCA CCA CCA CCA AAG CTT ATC AGC CGT AGA CCG GAG CGA
AGG CCT TGC CCG GGT CCT C-3'

TmNifS51: 5'-revers-Primer

5'-TTA CGT TTC AAC CTC A-3'

TmNifS31: 3'-forward-Primer

5'-CGC TCA GCT CTT CA-3'

TmNifS5: 5'-forward-Primer, NdeI-Schnittstelle unterstrichen

5'-ACC AAG GTC CAT ATG AGG GTT TAT TTT GAC-3'

TmNifS3: 3'-revers-Primer, BamHI-Schnittstelle unterstrichen

5'-TAT CGG ATC CAA GCA GGA GCA ATC TG-3'

3.1.3 Geräte

Zentrifugen waren von den Firmen Beckmann, Sorvall, Hettich und Eppendorf, Pipetten der Marke Gilson. PCR wurden auf einem Gradient Robocycler (Stratagene) durchgeführt. Chromatographiert wurde auf FPLC oder AEKTA (Pharmacia). Röntgendiffraktion wurde auf Drehanoden RU200 (RIGAKU) mit MARRESEARCH Image-plate Detektoren oder mit Synchrotronstrahlung am DESY/Hamburg, Beamline BW6 mit einem MAR CCD-Detektor durchgeführt. Verwendete Computer waren entweder IBM-kompatible *personal computer* (Windows-NT), digital ALPHA-stations (OSF) oder Silicon Graphics *work-stations* und *compute server* (IRIX).

3.2 Methoden

3.2.1 Gentechnische und mikrobiologische Methoden

Alle Geräte zum Arbeiten mit Bakterien wurden vor und nach Benutzung autoklaviert oder mit 70% Ethanol sterilisiert, alle Lösungen wurden entweder autoklaviert oder sterilfiltriert.

3.2.1.1 Sequenzanalysen, –vergleiche und Datenbanksuchen

DNA-Sequenzen wurden aus der EMBL Datenbank (www.ebi.ac.uk) und aus der NCBI Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) erhalten. Partialsequenzen des *T. maritima* Genomprojektes wurden über www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/Tigr.html erhalten. Sequenzen wurden mit PILEUP aus dem GCG Programmpaket (GCG, 1998) verglichen und mit dem Sequenzeditor desselben Paketes assembliert.

3.2.1.2 Aufzucht von *E. coli* Zellen

E. coli Zellen wurden auf LB-Medium, oder zur Selenomethioninsubstitutions-Expression auf NMM/SeMet (Budisa *et al.*, 1995) bei 37°C unter Schütteln mit 150Upm angezogen. Zur Selektion von plasmidtragenden Zellen waren diese gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Zur Selektion einzelner Klone wurden *E. coli* Zellen auf LB/Agar-Platten über Nacht bei 37°C kultiviert. Falls erforderlich, waren LB-Platten ebenfalls mit Antibiotikum versetzt, welches dem autoklavierten Agar-Medium nach Abkühlen auf 45°C zugegeben wurde.

LB:	Trypton (Gibco)	10g
	Hefe Extrakt (Gibco)	5g
	NaCl	10g
	ATD	ad 1000mL

LB/Agar:	LB mit 1.5% Agar
NMM/SeMet:	siehe (Budisa et al., 1995)
AMP 500x:	Ampicilin, Natriumsalz (Sigma), 100mg/mL in Wasser

3.2.1.3 *Aufzucht von A. vinelandii Zellen*

A. vinelandii Zellen wurden in 50mL *Azotobacter* Medium bei 30°C unter Schütteln mit 150Upm kultiviert. Zellen wurden durch Zentrifugation (5min., 4000xg) geerntet.

Azotobacter Medium:

Zucker:	Glucose	5.00g
	Mannitol	5.00g
	ATD	50.00mL
Salze:	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.10g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.10g
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	5.00mg
	K ₂ HPO ₄	0.90g
	KH ₂ PO ₄	0.10g
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.01g
	CaCO ₃	5.00g
	ATD	950.00mL

Glucose und Mannose wurden getrennt autoklaviert und dem Medium nachträglich beigefügt um ein Karamellisieren der Zucker zu vermeiden. Die Salzmischung wurde vor dem Autoklavieren auf pH 6.5 eingestellt.

3.2.1.4 *Aufzucht von T. maritima Zellen*

T. maritima Zellen wurden in einem 10L Sprudelreaktor bei 80°C im Wasserbad unter einem Stickstoffstrom 3d kultiviert. Zellen zur DNA-Präparation wurden durch 30 minütige Zentrifugation bei 4000xg unter aeroben Bedingungen geerntet.

Spurenelemente Mix:	EDTA	1.500g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3.000g
	MnSO ₄ x 2 H ₂ O	0.500g
	NaCl	1.000g
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.100g
	CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0.180g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.100g
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.180g
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.010g
	KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0.020g
	H ₃ BO ₃	0.010g
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.010g
	NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0.025g
	Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0.300mg
	ATD	1000.000ml
Künstliches Seewasser:	NaCl	27.70g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7.00g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5.50g
	KCl	0.65g
	NaBr	0.10g
	H ₃ BO ₃	30.00mg
	SrCl ₂ x 6 H ₂ O	15.00mg
	Zitronensäure	10.00mg
	KI	0.05mg
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2.25g
	ATD	1000.00ml
	Thermotoga Medium:	Lösliche Stärke
KH ₂ PO ₄		0.5g
Spurenelementlösung		15.0ml
NiCl ₂ x 6 H ₂ O		2.0mg
NaCl		20.0g
Künstliches Seewasser		250.0ml
ATD		750.0ml
Hefe Extrakt		0.5g
Resazurin		1.0mg

Der pH-Wert wurde auf 6.5 eingestellt und autoklaviert. Nach der Zugabe einer sterilfiltrierten Lösung von 0.5g Na₂S x 9 H₂O in 5mL ATD wurde mit 100% sterilfiltriertem Stickstoff in einem Sprudelreaktor begast, bevor die Kultur angeimpft wurde.

3.2.1.5 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*

3.2.1.5.1 Chemisch kompetente Zellen

30mL LB-Medium wurden mit 0,2mL einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 geschüttelt. Die Kultur wurde 5min auf Eis gekühlt und dann abzentrifugiert (5min, 4000xg, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 10mL

TFBI resuspendiert und erneut 1h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nochmals wie oben abzentrifugiert und in 2mL TFBII aufgenommen. Die Suspension wurde 15min auf Eis inkubiert, in Aliquots von je 100 μ L in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TFBI:	Kaliumacetat pH 6.8	30mM
	CaCl ₂	10mM
	RbCl	100mM
	MnCl ₂	50mM
	Glycerin	15%(v/v)
TFBII:	MOPS pH 5.8	10mM
	RbCl	10mM
	CaCl ₂	15mM
	Glycerin	15%(v/v)

3.2.1.5.2 *Elektrokompetente Zellen*

E. coli Zellen wurden auf LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000xg geerntet und drei mal mit 20%Glycerin gewaschen. Danach wurden sie in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.1.6 *Präparation von genomischer DNA*

Zur Isolation von genomischer DNA wurden je 1.5mL durch Zentrifugation sedimentiert, in 567 μ L TE resuspendiert und mit 30 μ L SDS und 3 μ L PK 1h bei 37°C inkubiert. Dann wurden 100 μ L 5M NaCl und 80 μ L NaCl/CTAB zugegeben und nach kurzem Mischen wurde 10min. bei 65°C inkubiert und mit 700 μ L Chloroform/Isoamlyalkohol durch Mischen und anschließendes Zentrifugieren extrahiert. Die wäßrige Phase wurde einer dreifachen PheOH/Chloroform-Extraktion unterzogen, 30min. mit DNase freier RNase inkubiert und durch Zugabe von 500 μ L Isopropanol, einstündiges Inkubieren bei 4°C und anschließendes Zentrifugieren gefällt. Der Rückstand wird mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in EB resuspendiert.

TE:	TRIS/HCl, pH8.0 EDTA	10mM 2mM
SDS:	SDS	10%(w/v)
PK:	Proteinase K	20mg/mL
NaCl/CTAB:	NaCl Cetyltrimethylammoniumbromid	700mM 10%(w/v)
CHCl ₃ /Isoamylalkohol:	Chloroform Isoamylalkohol	96%(v/v) 4%(v/v)
PheOH/Isoamylalkohol:	Chloroform Phenol Isoamylalkohol	50%(v/v) 48%(v/v) 2%(v/v)
EB:	TRIS/HCl, pH 8.0	10mM

3.2.1.7 Präparation von plasmidischer DNA

3.2.1.7.1 Schnellisolation von Plasmid-DNA durch Koch-Lyse

Je 1.5mL Bakterienkultur wurden durch 30-sekündige Zentrifugation bei 14,000xg sedimentiert. Bakterienpellets wurde in 200µL STET resuspendiert. Nach Zugabe von 4µL Lysozymbösung wurde 5min. bei RT inkubiert und 45sec. auf 100°C erhitzt. Nach 10min. Zentrifugation bei 14,000xg wurden entstandene Pellets entfernt und der Überstand mit 8µL CTAB versetzt. Nach intensivem Mischen und erneutem 5-minütigem Zentrifugieren bei 14,000xg wurde der Überstand verworfen und der Rückstand in 150µL 1.2M NaCl resuspendiert. Nach 2min. Zentrifugation bei 14,000xg wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt, mit Ethanol gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Der luftgetrocknete Rückstand wurde in EB aufgenommen.

STET:	TRIS/HCl, pH 8.0 Saccharose Triton X-100 EDTA	50.0mM 8.0%(w/v) 0.1%(v/v) 50.0mM
Lysozymbösung:	Lysozym in STET	100.0mg/mL

CTAB:	Cetyltrimethylammoniumbromid NaCl	5.0%(w/v) 0.5M
EB:	TRIS/HCl, pH8.0	5.0mM

3.2.1.7.2 MIDI-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Reinigung von Plasmid-DNA bis 100µg wurde der Plasmid Midi Kit (Qiagen) verwendet. 100mL Bakterienkultur wurden abzentrifugiert (4000xg, 10min, 4°C) und das Pellet in 4mL P1 resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde das gleiche Volumen P2 dazugegeben, der Ansatz durch Invertieren gemischt und für 5min. bei RT inkubiert. Nach Hinzufügen von 4mL P3 wurde erneut gemischt und präzipitiertes Protein und genomische DNA abzentrifugiert (20000xg, 30min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert (20000xg, 15min, 4°C). Der geklärte Überstand wurde nun auf eine mit QBT equilibrierte QiaTip 100 Säule aufgetragen. Nach dem Einsinken der Probe wurde die Säule mit 2 x 10mL QC gewaschen und die DNA mit 5mL QF eluiert. Nach 2-Propanolfällung wurde die plasmidische DNA in 100µL TB resuspendiert.

P1:	TRIS/HCl, pH 8.0 EDTA RNase A	50mM 10mM 100µg/mL
P2:	NaOH SDS	200mM 1%(w/v)
P3:	Kaliumacetat, pH 5.5	3M
QBT:	NaCl MOPS/NaOH, pH7.0 Ethanol Triton X-100	750mM 50mM 15%(v/v) 0.15%(v/v)
QC:	NaCl MOPS/NaOH, pH 7.0 Ethanol	1M 50mM 15%(v/v)
QF:	NaCl MOPS/NaOH, pH8.5 Ethanol	1.25M 50mM 15%(v/v)
TB:	TRIS/HCl, pH 7.5	10mM

3.2.1.8 Verdau von DNA

Plasmidische oder genomische DNA wurde mit 1-2U des entsprechenden Restriktionsenzymes pro μg DNA in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 1-8 Stunden umgesetzt. Alle verwendeten Restriktionsenzyme waren von der Firma New England Biolabs.

3.2.1.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA wurde die Polymerase Kettenreaktion (PCR) angewandt. Dabei wurde der folgende Standard-Reaktionsansatz verwendet:

DNA	0.01-0.1 μg
ThermoPol Puffer, 10x (NEB)	5 μL
DNTP-MIX (25mM je Nukleotid)	1 μL
3'-Primer (100pmol/ μL)	1 μL
5'-Primer (100pmol/ μL)	1 μL
ATD	ad 50 μL
Vent-Polymerase (15U/ μL , NEB)	1 μL

Die Reaktion wurde in einem *Hot-Top Thermocycler* durchgeführt, wodurch die Überschichtung mit Mineralöl entfiel. Temperaturprogramme waren üblicherweise wie folgt:

94°C	5min.
<i>loop</i> (25-50)	
42-58°C	1min.
72°C	1-3min.
94°C	1min.
<i>endloop</i>	
72°C	10min.

3.2.1.10 Agarose Gelelektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in Agarosegelen. Als Laufpuffer wurde TAE verwendet. Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 0.5-2.0% Agarose (w/v) (Biozym) in

Laufpuffer aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Die gelöste Agarose wurde mit H₂O wieder auf das Ausgangsvolumen gebracht. Die Agarose wurde nun in vorbereitete Gelkammern gegossen und nach dem Erstarren mit Laufpuffer überschichtet. Die zu trennenden Proben wurden mit je einem Viertel ihres Volumens 6x Probenpuffer und 6x CYBR green-Stammlösung (Stratagene) vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 8-10mA/cm Gellänge für 45-120min. Die aufgetrennte DNA wurde unter UV-Licht ($\lambda=254\text{nm}$) detektiert.

TAE :	Tris	40mM
	Essigsäure	20mM
	EDTA gelöst bei pH 8,0	1mM
6x Probenpuffer :	Glycerin	30%(v/v)
	Bromphenolblau	0,25%(w/v)

3.2.1.11 Reinigung von DNA-Fragmenten

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die weiteren Schritte wurden unter Verwendung des Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) durchgeführt. Das Agarosestück wurde in 1 μ L Puffer QX1 pro mg Gelgewicht aufgenommen und 10min bei 50-60°C bis zur vollständigen Auflösung der Agarose erwärmt. Die Lösung wurde auf eine Qiaquick Spin Säule gegeben und 1min bei 14000 Upm in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Es wurde hintereinander mit je 750 μ l Puffer QX1 und PE gewaschen. Zur Entfernung etwaiger Reste des Puffers PE wurde die eluierte Säule erneut wie oben zentrifugiert. Die DNA wurde in einem Volumen von 50 μ L TB durch eine weitere Zentrifugation eluiert.

QX1:	NaI	3M
	NaClO ₄	4M
	Na ₂ SO ₃	10mM
	TRIS/HCl pH7.0	10mM
PE:	keine Herstellerangaben	

TB: TRIS/HCl pH 8,5 10mM

3.2.1.12 Konzentrationsbestimmung von DNA

DNA-Mengen im Agarose-Gel wurden anhand der Bandenstärke und des Molekulargewichtes grob abgeschätzt. Zur genaueren Bestimmung wurde eine entsprechende Verdünnung UV-spektrometrisch bei 260nm vermessen.

3.2.1.13 Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Verdaute Plasmide wurden mit alkalischer Phosphatase (CIP, NEB) behandelt, um eine Religation partiell verdauter Plasmide zu minimieren. Nach dem Restriktionsverdau wurden 0.2U alkalische Phosphatase pro μg DNA eingesetzt und in dem vom Hersteller gelieferten Puffer 30min. bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der dephosphorylierten DNA-Fragmente geschah über ein Agarose-Gel.

3.2.1.14 Ligation von DNA

Verdaute DNA wurde mit 400-4000U T7 DNA-Ligase je μg DNA in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.2.1.15 Transformation von E. coli

3.2.1.15.1 Transformation über Hitzeschock

100 μL chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-2 μg plasmidischer DNA versetzt. Nach 15min. Inkubation auf Eis wurden die Zellen 45sec. auf 42°C erhitzt und wiederum 5min. auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 800 μL Antibiotika freiem LB versetzt und 60min. bei 37 geschüttelt. Anschließend wurden entweder 10-200 μL der Kultur auf LB-Agar-Platten, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert

oder es wurden als Expressionsvorkultur komplette Transformationsansätze in 35mL LB, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, über Nacht kultiviert.

3.2.1.15.2 Transformation über Elektroporation

50 μ L elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in einer auf 4°C gekühlten Elektroporationsküvette (1mm) mit 1 μ L Ligationsansatz oder plasmidischer DNA versetzt. Elektroporation erfolgte bei 1600V mit einem BioRad BioPulse. Die Zellen wurden mit LB-Medium aus der Küvette gespült und 1h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte entweder Platten- oder Flüssigkultivierung wie unter 3.2.1.15.1.

3.2.1.16 Aufbewahrung von Bakterienkulturen

Plattenkulturen wurden mit Parafilm verschlossen bei 4°C bis zu 4w aufbewahrt, Flüssigkulturen bei 4°C maximal 2d.

Zur längeren Lagerung von Bakterien wurden Flüssigkulturen mit OD₆₀₀ von 0.4-1.2 mit 30%(v/v) 87% Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C oder -80°C aufbewahrt.

3.2.1.17 Sequenzierung von DNA

1 μ g DNA wurde mit 3.2pmol Sequenzierprimer und 8 μ L ABI PRISM ready reaction DyeDeoxy terminator cycle sequencing kit (T-mix) versetzt und mit Wasser auf 20 μ L Endvolumen gebracht. Der Ansatz wurde mit 30 μ L Mineralöl überschichtet und ein standardisiertes Temperaturprogramm angewandt. Die Reaktionsprodukte wurden mit micro-spin S-200-Säulen (Pharmacia) gereinigt, mit Ethanol gefällt und für die Sequenzgelelektrophorese auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese, Detektion der Fluoreszenzsignale und deren Auswertung wurden mit einem DNA-Sequenator (Modell 373, Applied Biosystems) durchgeführt.

T-mix:	dNTP's	keine Angaben
	ddNTP's, markiert	keine Angaben
	TRIS/HCl, pH 9.0	168.4mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	4.2mM
	MgCl ₂	42.1mM
	AmpliTaq Polymerase	0.42U/mL

3.2.1.18 Rekombinante Expression von Proteinen in *E. coli*

Je 5mL einer 35mL Übernachtskultur nach 3.2.1.2 eines *E. coli* Stammes, der ein entsprechendes Expressionsplasmid trug, wurden benutzt um je 800mL LB-Medium, im Falle der SeMet-Expression NMM/SeMet, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, anzuimpfen. Kulturen wurden bei 150U/min. und 37°C in Schikanekolben geschüttelt bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.8. Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1mM und wurde 4h-16h durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen durch 20-minütige Zentrifugation bei 4800xg geerntet und in Aufschlußpuffer resuspendiert. Nicht sofort weiterverarbeitete Zellen wurden bei -80°C eingefroren und bis zum Gebrauch gelagert.

Aufschlußpuffer:	MOPS/NaOH, pH 7.8	100mM
	Pyridoxal-5'-Phospat	2µM
	NaN ₃	0.05%(w/v)

3.2.1.19 Aufschluß von *E. coli* Zellen

In Aufschlußpuffer suspendierte Zellen wurden in einem Rosettengefäß unter Eiskühlung durch Ultraschall aufgeschlossen (Branson, Sonifier 250). Es wurde mit dem MacroTip 3 x 5min. auf Stufe 10 bei 50% Puls-Zyklus gearbeitet. Das Zelllysate wurde durch Zentrifugation geklärt (30min, 48.000xg) und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.2.2 Proteinchemische Methoden

3.2.2.1 Sequenzanalyse und –vergleich

Protein-Sequenzen wurden aus der EMBL Datenbank (www.ebi.ac.uk) und aus der Swissprot Datenbank (expasy.hcuge.ch, jetzt www.expasy.ch) erhalten. Sequenzen wurden mit dem GCG Programmpaket (GCG, 1998) analysiert.

3.2.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Reinheit eines Proteins und der Fortschritt der Reinigung wurden mit der diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmt. Die Elektrophorese erfolgte mit 4%igen Sammelgelen und 12-17%igen Trenngelen. Es wurden jeweils neun 8.5 x 8 cm² große Gele in einer Gelgießkammer (Eigenbau, MPI Martinsried) gegossen. Es wurden folgende Stammlösungen verwendet:

AA:	Acrylamid	40.0%(w/v)
	Bisacrylamid	0.8%(w/v)
Trenngelpuffer, 8x:	TRIS/HCl, pH 8.8	3M
	SDS	0.8%(w/v)
Sammelgelpuffer, 8x:	TRIS/HCl, pH 6.3	1.1M
	SDS	0.8%(w/v)
APS:	Ammoniumperoxodisulfat	10%(w/v)

Zum Gießen von neun Gelen wurden 80mL Trenngellösung gemischt (10mL Trenngelpuffer, die gewünschte Menge Lösung AA, ATD ad 80mL) und mit 130µL APS sowie 40µL N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) versetzt und nach dem Gießen mit 250µL ATD je Gel überschichtet. Nach dem Aushärten wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel (6mL Sammelgelpuffer, 2.4mL AA, 15.6mL ATD versetzt mit 130µL APS und 40µL TEMED) gegossen und die Kämme eingesetzt. Die ausgehärteten Gele wurden in Frischhaltefolie verpackt bis zu drei Wochen bei 4°C luftdicht verschlossen gelagert.

Proteinproben wurden mit 1/9 ihres Volumens an 10x Auftragspuffer gemischt und 5min. bei 96°C inkubiert. Nach dem Auftragen der Proben in die Geltaschen erfolgte die Trennung bei konstantem Strom von 15mA je Minigel in SDS-Laufpuffer.

Auftragspuffer, 10x:	TRIS/HCl, pH 6.8	100mM
	Dithiothreitol	200mM
	Bromphenolblau	0.2%(w/v)
	Glycerin	20%(w/v)
Laufpuffer:	TRIS	25mM
	Glycin	200mM
	SDS	0.1%(w/v)
	pH 8.3	

Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese mit Coomassie-Blue gefärbt. Dazu wurden die Gele in Färbelösung in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt und 10min. bei RT geschüttelt. Anschließend wurden sie in Entfärbelösung überführt, welche alle 2h gewechselt wurde, bis der Hintergrund entfärbt war.

Färbelösung:	Coomassie Brillant Blue R-250	4.0g/L
	Ethanol	25.0%(v/v)
	Essigsäure	12.5%(v/v)
Entfärbelösung:	Ethanol	25.0%(v/v)
	Essigsäure	12.5%(v/v)

3.2.2.3 Aktivitätsmessung von NifS

Die Aktivität von NifS-Proteinen wurde über die Bestimmung von Sulfid als H₂S nach (Siegel, 1965) durchgeführt. Die Mikrobestimmung beruht auf der Bildung von Metylenblau, welches UV-spektroskopisch nachgewiesen wird. Das Volumen der Reaktionsansätze betrug 0.5mL. Folgende Stammlösungen wurden benutzt:

DTT, 100x:	Dithiothreitol	100	mM
CYS, 100x:	Cysteinhydrochlorid pH7.0 mit NaOH	50	mM

PDP:	N,N-Dimethyl- <i>p</i> -phenylendiamin	0.02	mM
	HCl	7.2	M
FECL:	FeCl ₃	0.02	mM
	HCl	1.2	M

Protein wurde in Konzentrationen von 0.002-0.2mg/mL eingesetzt. Gepuffert wurde mit 50mM MOPS/NaOH. Standardmäßig wurde das in 5mM MOPS/NaOH, pH 7.5 gepufferte Protein in einem Volumen von 490µL mit je 5µL 100xCYS und 100xDTT versetzt, das Reaktionsgefäß dicht verschlossen und die Reaktion nach 5-30 min. durch Zugabe von 0.1mL PDP gestoppt. Danach wurden 0.1mL FECL zugegen und dicht verschlossen 20min. bei RT inkubiert. Über die Absorption bei 650nm wurde anhand der publizierten Eichkurve die Konzentration von Sulfid bestimmt.

3.2.2.4 Säulenchromatographie

Ionentauscher und hydrophobe Interaktionschromatographie wurden in 20cm langen Säulen mit 3cm Durchmesser durchgeführt. Als Materialien dienten DEAE-Sepharose, Q-Sepharose, Phenylsepharose HigSub (alle Pharmacia) und DE52 Zellulose (Whatman). Gelpermeationschromatographie wurde an einer 1m langen Säule mit 4cm Innendurchmesser an Sephadex S-200 (Pharmacia) durchgeführt. Chromatographiert wurde entweder über Peristaltikpumpen (Gilson) mit Gradientenmischern (MPI Martinsried, Eigenbau) und SuperFrac Fraktionssammlern (Pharmacia) unter Detektion der Absorption bei 280nm mit einem Durchflußdetektor (Kontron) bei 4°C oder an einer FPLC-Anlage (Pharmacia) bei 25°C.

3.2.2.5 Ammoniumsulfatfällung

Ammoniumsulfatfällungen zu Reinigungszwecken wurden durch Zugabe von 4M AS-Lösung zu der Proteinlösung bis zum Erreichen der gewünschten AS-Konzentration und anschließendem Rühren bei 4°C für 2h durchgeführt. Dadurch

werden lokale Konzentrationsgradienten vermieden, die eventuell zu einem vorzeitigen Präzipitieren bestimmter Proteine führen.

Ammoniumsulfatfällung zu Konzentrationszwecken wurde durch Zugabe von festem, gemörsertem AS zu der Proteinlösung und anschließendem Rühren bei 4°C für 2h durchgeführt.

In beiden Fällen wurde anschließend 10min. bei 30.000xg zentrifugiert und der Überstand (im Falle der Hochsalzfällung) oder das Pellet (im Falle der Niedersalzfällung) verworfen.

3.2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen wurde grob anhand der Bandenintensität auf dem Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel abgeschätzt. Genauere Proteinbestimmung erfolgte UV-VIS-spektroskopisch bei 280nm mit Hilfe der berechneten Absorptionskoeffizienten über das LAMBERT-BEER'sche Gesetz.

3.2.2.7 Konzentrierung von Proteinen

Proteine wurden entweder durch Ammoniumsulfatfällung (3.2.2.5) und anschließendes Entsalzen über Gelfiltration (NAP-Säulen, Pharmacia) oder durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Ultrafiltriert wurde in Zentrifugationskonzentratoren des Typs Centriprep und Centricon (Amicon, jetzt Milipore) an YM30 Membranen durch 30 minütige Zentrifugation bei 3000-5000xg.

3.2.2.8 Reduktion der co-Faktor-Protein SCHIFF'schen Base

1mL einer Lösung von tmNifS in ATD wurde mit 100µL einer 100mM NaBH₄-Lösung versetzt und bis zur völligen Entfärbung 5min. inkubiert. Nach Zentrifugation wurden 100µL 50mM Cysteinhydrochlorid/NaOH Lösung, pH 7.0

zugegeben und über eine Entsalzungssäule (NAP-Säule, Pharmacia) in 100mM MOPS, pH 7.8, 0.8M AS umgepuffert.

3.2.2.9 UV-VIS Spektroskopie

Eine Lösung von 20mg/mL tmNifS in ATD wurde durch 1:1 Verdünnung mit 100mM HEPES/NaOH auf pH-Werte zwischen 6.5 und 9.0 eingestellt. Spektren wurden an einem Kontron UVIKON 943 im Bereich von 250-520nm aufgenommen. Als Referenz diente 50mM HEPES/NaOH desselben pH-Wertes.

Für die pH-Wert abhängigen Enzym-Substrat-Spektren wurde wie oben verfahren, jedoch auf 10mM Endkonzentration Cystein eingestellt. Die Spektren wurden innerhalb von 1min. nach Zugabe des Cysteins aufgenommen, um eine Störung durch präzipitierten Schwefel zu verhindern.

3.2.3 Kristallographische Methoden

3.2.3.1 Kristallisation

Die Kristallisation im sitzenden Tropfen wurde entweder in CrysChem Platten (Charles Supper Company) verschlossen mit transparenter Klebefolie oder in gasdicht verschlossenen Polystyroidosen von 3cm Höhe und 7.5cm Durchmesser auf 1.5cm hohen Kunststoffbänkchen durchgeführt. Die Kristallisation im hängenden Tropfen erfolgte in Linbro Zellkulturplatten (ICN) verschlossen mit ölgedichteten, silanisierten Deckgläsern.

Zum Austesten einer größeren Zahl von Bedingungen wurde das Prinzip des *sparse matrix sampling* angewandt (Carter & Carter, 1979; Jancarik & Kim, 1991). Es wurden jeweils 2 μ L Proteinlösung der Konzentration 10mg/mL gegen 250 μ L Reservoirlösung equilibriert. Weitere Versuche waren Rastersuchen von verschiedenen Präzipitanden (PEG 400, 1000, 4000, 8000, 12000, MPD, i-Propanol, AS, NaCl, LiSO₄, PEGOMe 550, PEGOMe2500) gegen verschiedene pH-Werte.

Reduktionsmittel (DTT, DTE, GSH, β -ME), elektrostatische (verschiedene Verbindungen mit Amin- und/oder Säure-Funktionalität, verbrückt über verschieden lange Alkylreste) und kovalente Vernetzer (Glutaraldehyd, Formaldehyd) sowie divalente Metallionen wurden als Additive eingesetzt.

3.2.3.2 Datensammlung und -reduktion

Kristalle wurden zur Messung von Raumtemperaturdaten in silanisierte Glaskapillaren von 0.7mm Durchmesser gesaugt und mit Löschpapierstreifen oder dünn ausgezogenen Glaskapillaren vollständig von Lösungsmittel befreit. Um ein Austrocknen zu verhindern wurden beide Seiten der Kapillare mit Reservoirlösung gefüllt und mit Dentalwachs (Richter&Hoffmann Harvard Dental GmbH) verschlossen. Die Kapillaren wurden auf einem Goniometerkopf fixiert und mit Drehwinkeln von $0.5-3^\circ$ auf der Drehanode (Rigaku RU-200, 50kV, 100mA) vermessen. Detektiert wurde mit einer MAR345 Image-plate (MAR research).

Zur Messung der MAD-Daten wurden tmNifS-SeMet-Kristalle in Schlaufen aus Zahnseide (Hampton Research) geangelt, 2min. in Cryopuffer (1.8M AS, 33mM MOPS/NaOH, pH7.8, 28%(v/v) Glycerin) eingelegt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Detektiert wurde mit einem 135mm MAR CCD-Detektor.

Die Bestimmung der Zellparameter und der Kristallorientierung sowie die Integration der Reflexintensitäten geschah mit MOSFLM, v6.01 (Leslie, 1998). Die Datenreduktion wurde mit den Programmen SCALA und mit TRUNCATE durchgeführt (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER 4, 1994).

3.2.3.3 Phasierung

Mögliche Positionen von Schweratomen wurden einerseits über Vektorverifizierung in Differenz-PATTERSON-Dichten mit dem Programm RSPS (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER 4, 1994) identifiziert, andererseits in

Differenz-FOURIER-Dichten lokalisiert. Verfeinerung der Schweratomparameter sowie Berechnungen von Proteinphasen geschah mit den Programmen MLPHARE und SHARP (Fortelle & Bricogne, 1997). Nach Inspektion von Differenz-Fourier-Dichten und Residual-Dichten wurden Schweratommodelle bis zur Konsistenz modifiziert. Neben den Qualitätsindikatoren ‚Phasing-Power‘ und ‚Figure of Merit‘ war in jedem Stadium die visuelle Inspektion der Elektronendichte ausschlaggebendes Kriterium.

Proteinphasen wurden durch Dichtemodifikation (‚solvens-flattening‘) mit SOLOMON (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER 4, 1994) verbessert.

3.2.3.4 Modellbau und Verfeinerung

Atommodelle wurden mit dem Programm MAIN (Turk, 1996) in die Elektronendichtekarten eingepaßt. Hierbei wurde die Realraum-Verfeinerungsoption benutzt, um eine möglichst gute Anpassung an die Elektronendichte zu erhalten. Verfeinert wurde mit CNS (Brunger *et al.*, 1998) unter Anwendung des Maximum-Likelihood-Targets unter Berücksichtigung der experimentellen Hendrickson-Lattman-Koeffizienten gegen beobachtete Strukturaktoren, wobei 5% als TEST-Satz zur Ermittlung des freien R-Faktors dienten. Es wurde eine Lösungsmittelkorrektur sowie eine globale, anisotrope B-Faktor Korrektur angewandt. Positionelle Verfeinerung und *simulated-annealing* (SA) alternierten mit visueller Inspektion der Elektronendichte und manueller Intervention bis zu einem Absinken des R-Faktors auf 30%. Danach wurde Lösungsmittel automatisch mit CNS eingebaut. Individuelle B-Faktor Verfeinerung, SA und positionelle Verfeinerung ergaben schließlich die finalen Modelle.

3.2.3.5 Modellanalyse und graphische Darstellung

Die erstellten Modelle wurden mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) auf Datenkonsistenz überprüft und geometrisch analysiert. Überlagerungen und *least-square-fits* von Koordinaten wurden mit MAIN (Turk, 1996) und mit

TOP3D (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER 4, 1994) durchgeführt.

Die Darstellung von Modellen geschah mit den Programmen MOLSCRIPT (Kraulis, 1993), BOBSCRIPT (Esnouf, 1997), und RASTER3D (Merritt & Murphy, 1994). Die graphische Darstellung von Sequenzvergleichen geschah mit dem Programm ALSRIPT (Barton, 1993). Schemazeichnungen wurden mit CorelDraw! erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 *NifS* aus *Azotobacter vinelandii*

4.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung

Die Ableitung von Klonierungsprimern für NifS aus *A. vinelandii* (avNifS) geschah anhand der bekannten DNA-Sequenz (acc-code EMBL M17349). Da sich in dem Gen eine interne NdeI-Schnittstelle befindet, wurde das über PCR amplifizierte DNA-Fragment mit BfaI verdaut und in NdeI-verdauten pET22b(+) ligiert. Die damit verbundene Verschiebung des Start-ATG relativ zu der Ribosomenbindungsstelle (rbs) in pET22b(+) stellte bei der Expression des Proteins kein Problem dar.

Nach Versuchen der Reinigung entsprechend (Zheng et al., 1993) wurde schließlich ein Protokoll entwickelt, in dem nach initialer DEAE-Chromatographie (50mM TRIS/HCl, pH8.3, 10 μ M PLP, 0.05% NaN₃ auf 50mM TRIS/HCl, pH 7.8, 10 μ M PLP, 0.05% NaN₃ und 500mM AS), wobei ca. 80% sauberes Protein erhalten wurde und anschließender Hydrophober-Interaktions-Chromatographie (HIC) (20mM MOPS/KOH, pH 7.0, 10 μ M PLP, 0.05% NaN₃ 500mM AS auf 20mM MOPS/KOH, pH 7.0, 10 μ M PLP, 0.05% NaN₃). Es stellte sich heraus, daß die HIC bei einem pH-Wert von 7.8 keinen Reinigungseffekt brachte, bei pH 7.0 jedoch zu einer Proteinpräparation führte, welche nach SDS-Gel zu über 99% rein war. Zum

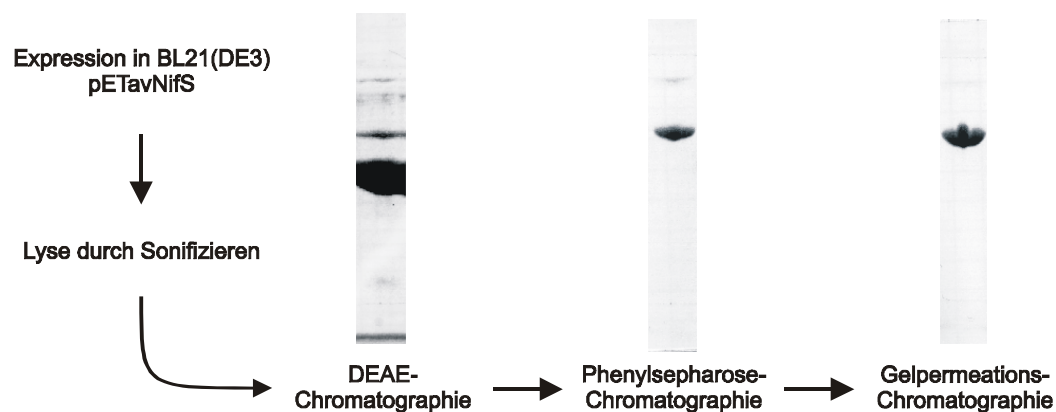


Abbildung 10: Fließschema der Reinigung für avNifS.

Pufferwechsel zwischen den beiden Reinigungsschritten wurde das Protein mit Ammoniumsulfat gefällt, in dem neu zu verwendenden Puffer resuspendiert und über eine Entsalzungssäule (NAP-Säule) umgepuffert. Abschließend wurde eine Gelpermeationschromatographie durchgeführt, um höhere Aggregate des Proteins abzutrennen und den Puffer auf 5mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 0.05% NaN₃ zu wechseln. Es konnten aus 5L Bakterienkultur 200mg reines Protein gewonnen werden. Das Protein wurde in Konzentrationen von 5-20mg/mL bei 4°C gelagert, da Lagerung bei -20°C und -80°C zu irreversiblen Präzipitieren führte. Ein Fließschema der Reinigung ist in Abbildung 10 dargestellt.

4.1.2 Aktivität des Proteins

Die Aktivitätsbestimmung von avNifS geschah nach (Siegel, 1965). Proteinpräparationen hatten typischerweise bei pH 7.5 eine spezifische Aktivität von $3.6\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$, und sind demnach ähnlich aktiv wie die bereits von (Zheng et al., 1993) beschriebene. Die Aktivität von avNifS war stark pH-Wert-abhängig, wobei unter pH6.5 nahezu keine Aktivität meßbar war, diese zwischen pH 7.0 und 7.7 anstieg und dann bis pH8.5 konstant blieb.

4.2 *NifS* aus *Thermotoga maritima*

4.2.1 Identifikation des Gens

In der Datenbank der Rohsequenzen des *T. maritima* Genomprojektes (Nelson *et al.*, 1999) wurde über www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/tigrbl.html eine Sequenzsuche mit dem tblastn Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) durchgeführt. Homologe Fragmente wurden mit Hilfe eines DNA-Sequenzvergleichs zur Überlappung gebracht und zu möglichst langen offenen Leserahmen (ORF) assembliert. Es zeigte sich, daß Fragmente von höchstwahrscheinlich zwei verschiedenen NifS-ähnlichen Proteinen vorlagen. Das kodierende Segment, dessen Translation das Protein mit der höchsten Homologie zu avNifS lieferte, wurde benutzt um zwei Primer für die inverse PCR abzuleiten. Die Sequenzierung des PCR-Produktes lieferte einen offenen Leserahmen von 1155 Nukleotiden, dessen Translation ein Protein von 385 Aminosäuren Länge mit einer Sequenzidentität zu avNifS von 40% lieferte.

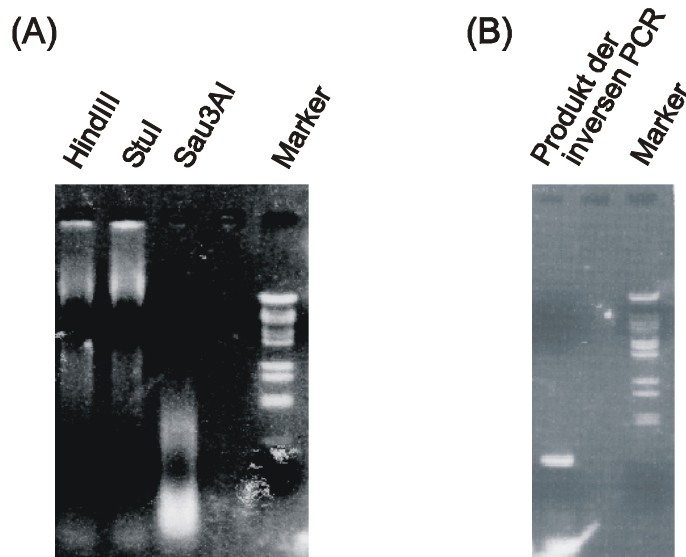


Abbildung 11: (A) Verdau von genomischer DNA aus *T. maritima* mit verschiedenen Restriktasen. (B) Produkt der inversen PCR mit den Primern tmnifs51 und tmnifs31 auf den religierten Sau3AI-Verdau.

4.2.2 Klonierung, Expression, Reinigung und Kristallisation

Nach Klonierung des Fragmentes in pET22b(+) und Expression in BL21(DE3) zeigten die Zellen nach dem Abzentrifugieren eine deutlich gelbe Färbung, was auf die Expression eines PLP-abhängigen Enzyms hindeutete.

Da es sich bei tmNifS um ein thermostabiles Protein handelt, wurde die Hitzedenaturierung von *E. coli*-eigenen Proteinen als Hauptreinigungsschritt eingesetzt. Nach der Lyse der Zellen und dem Entfernen von Zellwandbestandteilen durch Zentrifugation wurde der klare Überstand einem Hitzeschritt bei 80°C

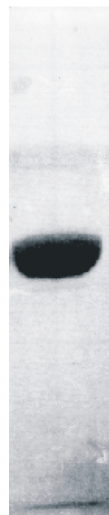


Abbildung 12: tmNifS nach der Hitzedenaturierung von *E. coli* Proteinen.

unterzogen. Nachdem hitzedenaturierte Proteine durch Zentrifugation entfernt waren, lag tmNifS nach Abschätzen aus dem SDS-Gel in 99% reiner Form vor, jedoch zeigte das UV-VIS-Spektrum ein Abs_{260}/Abs_{280} -Verhältnis von über 10, was auf starke Kontamination mit Nukleinsäuren hinwies. Wiederholte Ammoniumsulfat-Präzipitation und Hydroxylapatit-Chromatographie lieferten schließlich eine Proteinpräparation, die als frei von Nukleinsäuren gelten konnte. Abschließende Gel-filtration lieferte das Protein in kristallisierbarer Form.

Das Auffinden von Kristallisationsbedingungen mit Hilfe von *Sparse-Matrix*-Methoden (Carter & Carter, 1979; Jancarik & Kim, 1991) und über systematische Variation von pH-Werten, Präzipitandarten und Präzipitandkonzentrationen war erfolglos. Mit Ammoniumsulfat als Präzipitand und NaOH/HEPES-Puffersystem konnte jedoch eine deutliche Löslichkeitskurve in Abhängigkeit von AS-Konzentration und pH-Wert erstellt werden. Im Bereich der Löslichkeitsgrenzen wurde zunächst versucht, durch Zusatz von Reduktionsmitteln, Vernetzern und Detergentien eine Kristallisation zu erreichen. Diese Versuche waren erst nach Vorinkubation des Proteins mit DTT bei 45°C für 15min. erfolgreich. Auf diese

Weise konnten reproduzierbar Kristalle bei 0.8-1.4M AS und bei pH-Werten zwischen 6.8 und 8.5 erhalten werden.

Es zeigte sich auch, daß der Reinigungsschritt über Hydroxylapatit das Kristallisationsverhalten nicht beeinflußt, weshalb dieser auch bei folgenden Proteinpräparationen unterlassen wurde. Das Reinigungsschema zur Präparation von reinem, DNA-freiem tmNifS ist in Abbildung 13 als Flußdiagramm dargestellt.

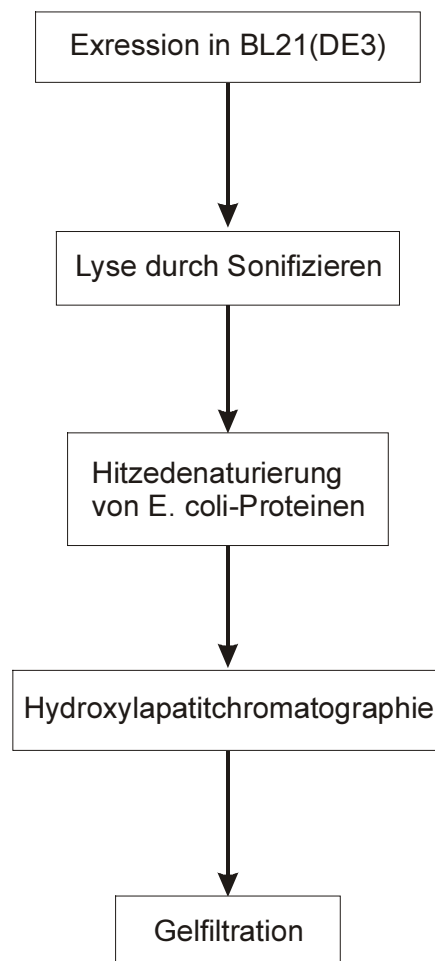


Abbildung 13: Reinigungsschema von tmNifS

4.2.3 Aktivität des Proteins

Die Aktivität von tmNifS wurde quantitativ über die Produktion von Sulfid aus Cystein unter reduzierenden Bedingungen und anschließenden colorimetrischen Nachweis von Metylenblau bestimmt (Siegel, 1965). Qualitativ konnte die

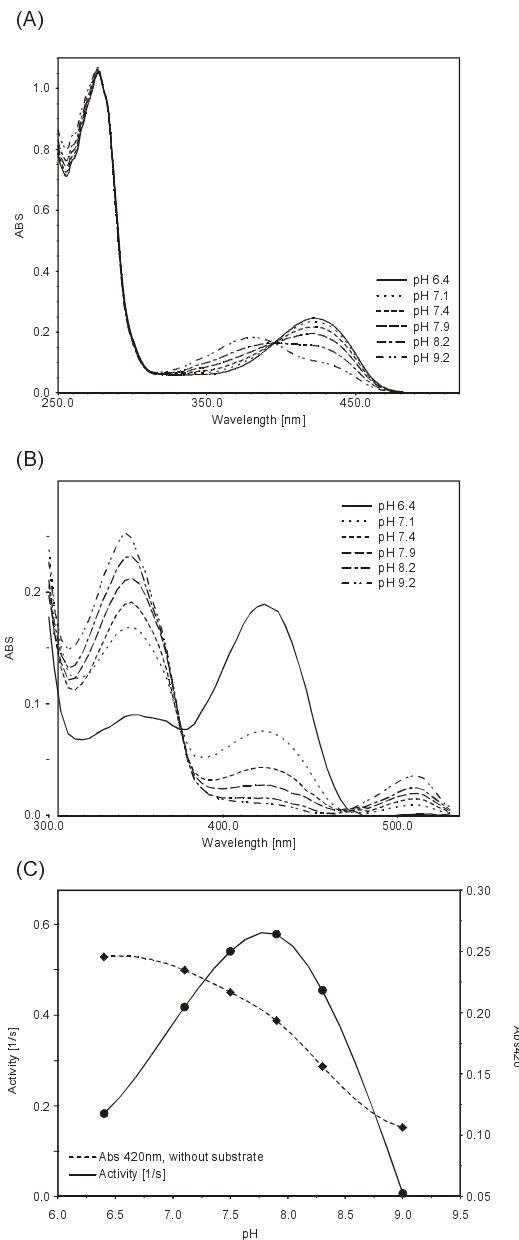


Abbildung 14: (A) Spektren von tmNifS bei verschiedenen pH-Werten. (B) Spektren von tmNifS und Cystein bei verschiedenen pH-Werten. Alle Spektren sind maximal 30sec. nach Mischung der Ausgangskomponenten mit maximaler Aufnahmegeschwindigkeit aufgenommen. Nach 2min. präzipitiert elementarer Schwefel und stört die Messung durch diffuse Streuung. (C) Aktivität von tmNifS bei verschiedenen pH-Werten.

Aktivität schon anhand der H₂S-Entwicklung nach Inkubation mit Cystein und Dithiothreitol (DTT) bestimmt werden. Die Aktivität von tmNifS in Abhängigkeit des pH-Wertes ist in Abbildung 14C gezeigt. Am pH-Optimum liegt die Aktivität von tmNifS bei Raumtemperatur in derselben Größenordnung wie die von avNifS. Die UV-VIS-Spektren von tmNifS mit und ohne Substrat bei verschiedenen pH-Werten sind in Abbildung 14 dargestellt.

4.2.4 Strukturlösung

Zunächst wurde versucht mit der Methode des molekularen Ersatzes (MR) mit Hilfe verschiedener Modelle von Proteinen der PLP- α -Familie, eine Strukturlösung herbeizuführen. Da diese Versuche scheiterten, wurde durch Ersatz der Methionine durch Selenomethionin (SeMet) mit Hilfe der *Selective Pressure Incorporation* Methode (Budisa et al., 1995) eine Proteinpräparation mit der Möglichkeit zur MAD-Messung hergestellt.

	Peak	Edge	Remote	AMA	AG	CYS
Wellenlänge [Å]	0.97643	0.97725	1.2500	1.54179	1.54179	1.54179
Auflösung [Å]	2.4	2.4	2.0	3.7	3.3	2.7
Vollständigkeit [%]	97.1	96.8	95.7	93.2	92.0	94.4
R _{sym} [%]	6.9	6.8	8.1	15.0	15.1	10.2

Tabelle 1: Datensammlungsstatistiken verschiedener tmNifS-Datensätze. Peak, Edge, Remote: MAD-Messung, AMA: Hg-Derivat-Datensatz, AG: Allylglycin inaktiviertes tmNifS, CYS: NaBH₄-reduziertes, Cystein-komplexiertes tmNifS.

In Abbildung 15 ist exemplarisch eine Diffraktionsbild von tmNifS-SeMet, ein tmNifS-Kristall und der Fluoreszenzscan an der Selen-Kante gezeigt. Selenpositionen konnten jedoch durch PATTERSON-Methoden weder in anomalen PATTERSON-Dichten noch in dispersiven identifiziert werden. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren, wurden PATTERSON-Dichten bei verschiedenen Auflösungen und verschiedener Art (anomale und dispersive Differenzen von

verschiedenen Wellenlängen) miteinander gemittelt. Keine Kombination lieferte jedoch einen konsistenten Satz von Selenpositionen.

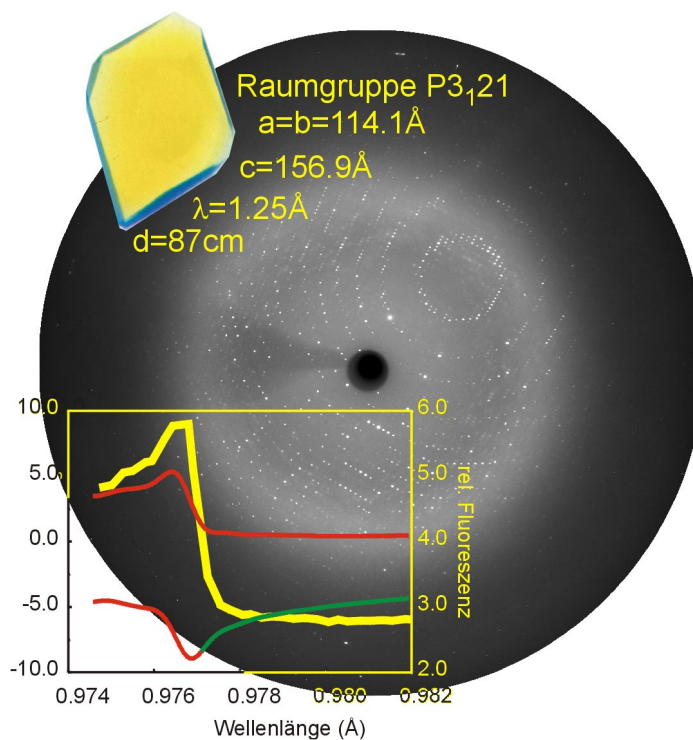


Abbildung 15: Diffractionsbild der MAD-Messung von tmNifS-SeMet. Gezeigt ist eine 0.3° Rotationsaufnahme bei 2.0Å Auflösung. Oben links ein Kristall von tmNifS. Unten links das Fluoreszenzspektrum in der Nähe der Selenabsorptionskante.

Es wurde deshalb versucht, ein isomorphes Derivat zu erhalten, was im Falle von 2-Amino-4-methoxy-5-methylmercuripentansäure (AMA) gelang. Die aus dem SIR erhaltenen Phasen waren von hinreichender Qualität um 19 potentielle Selenpositionen zu bestimmen. Im Verlaufe von drei Iterationen von Phasieren und Differenz-FOURIER-Rechnungen konnten davon 13 falsche Positionen eliminiert und 11 korrekte neu identifiziert werden. Abschließende MAD-Phasierung mit diesen 17 Positionen und allen drei gemessenen Wellenlängen lieferte eine klar interpretierbare Elektronendichtekarte, in der nach Dichtemodifikation („*solvent-flattening*“) die Orientierung von Carbonylgruppen und die meisten Seitenketten sichtbar waren.

Die modifizierte Dichte erlaubte den Einbau des Proteinmodelles bestehend aus den Aminosäuren 1-321 und 333-376 und wurde bis zu einem R-Faktor von 20.9% (freier R-Faktor 22.8%) bei einer maximalen Auflösung von 2.0Å verfeinert. Die

Aminosäuren 322-332 sowie die C-terminalen Aminosäuren 377-385 zeigten keine interpretierbare Dichte.

Die Strukturen des Substratkomplexes (2.8Å, $R_{\text{cryst}}=20.8\%$, $R_{\text{free}}=25.8\%$) und des Komplexes mit Allylglycin (3.8Å, $R_{\text{cryst}}=23.6\%$, $R_{\text{free}}=28.4\%$), einem irreversiblen Inhibitor, wurden durch die Methode des molekularen Ersatzes gelöst. In Tabelle 1 sind die Datensammlungsstatistiken und in Tabelle 2 die Phasierungsstatistiken der verschiedenen tmNifS-Datensätze angegeben, in Tabelle 3 die Verfeinerungsstatistiken und die Qualität der Ramachandrandiagramme der Strukturen.

		Peak	Edge	Remote	AMA
Phasing power	Iso	1.05	2.05	---	1.15
	Ano	1.90	0.58	0.65	---
R_{cullis}^b	Iso	0.75	0.59	---	0.82

Tabelle 2: Phasierungsstatistiken für tmNifS

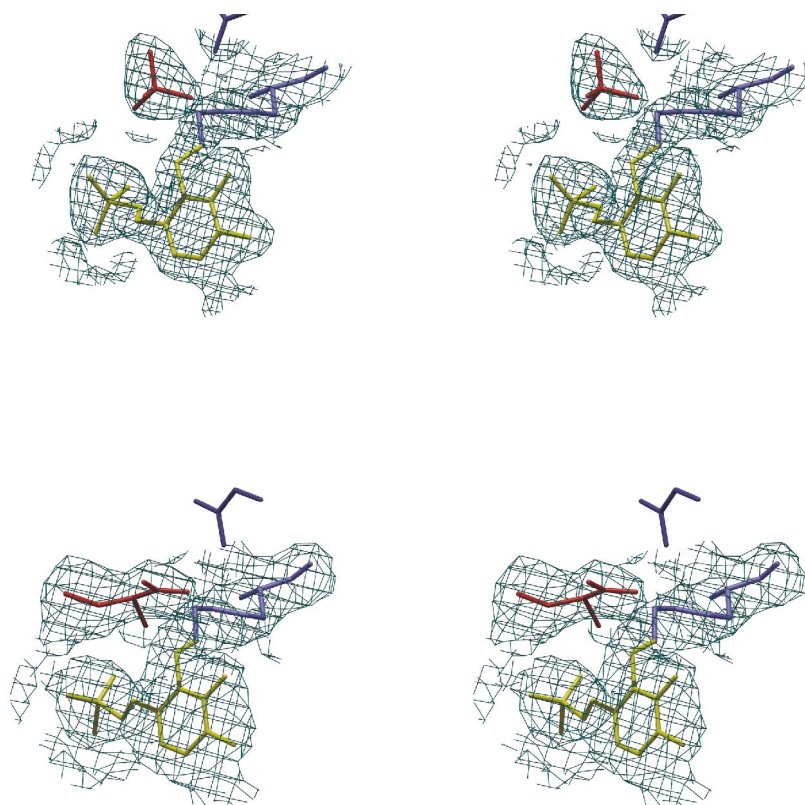


Abbildung 16: Darstellung der verfeinerten $2F_o-F_c$ -Elektronendichteverteilungen im Bereich des Aktivzentrums. Überlagert sind die jeweiligen verfeinerten Strukturmodelle. (A) Natives tmNifS. (B) Reduziertes, Substrat-Cystein-komplexiertes tmNifS.

	Remote	AG	CYS
$R_{\text{cryst}} (R_{\text{free}}^{\circ}) [\%]$	20.8 (22.9)	23.6 (28.2)	20.84 (25.81)
Unabhängige Reflexe	80,563	15,393	28,435
Bindungs-rmsd [\AA]	0.011	0.009	0.009
Winkel-rmsd [$^{\circ}$]	1.37	1.3	1.39
Rmsd verbundener B-Faktoren [\AA^2]	3.99	---	1.26
Ramachandrandigrammqualität			
Bevorzugt	91.0	86.5	89.8
Erlaubt	8.9	13.2	10.2
Mit Einschränkung erlaubt	0.2	0.3	0.0
Anzahl der Atome			
Protein	5719	5719	5719
Wasser	255	---	179
Ligand	40	---	44

Tabelle 3: Verfeinerungsstatistiken der tmNifS-Datensätze

4.2.5 Strukturbeschreibung

Tabelle 3 zeigt die Verfeinerungsstatistiken der im folgenden beschriebenen tmNifS Strukturen. In Abbildung 16 sind exemplarische Elektronendichteverteilungen im Bereich des Aktivzentrums dargestellt. Superpositioniert ist jeweils das verfeinerte Strukturmodell.

4.2.5.1 Natives Protein

tmNifS liegt als Homodimer (Abbildung 18) vor und zeigt, wie schon anhand von Sequenzvergleichen zu erwarten (Mehta & Christen, 1993), eine für diese Proteinfamilie typische Faltung (Abbildung 17). Eine Untereinheit kann in zwei Domänen aufgeteilt werden, eine kleine Domäne, die hauptsächlich C-terminal ist, jedoch auch einen kleinen Bereich des N-Terminus beinhaltet, und eine große, PLP-bindende Domäne. Die innerhalb der PLP- α -Familie am besten konservierte große Domäne (Reste 7-256) wird im folgenden zuerst beschrieben.

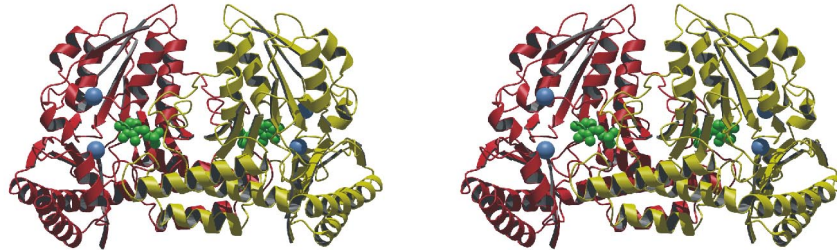


Abbildung 18: Schematische Darstellung des tmNifS-Dimeren. Die beiden Untereinheiten sind verschieden eingefärbt. Der *co*-Faktor PLP ist als grünes Kalottenmodell dargestellt, die blauen Kugeln repräsentieren die beiden letzten geordneten Reste vor und nach dem fehlgeordneten Cys324-Loop, der das reaktive NifS-typische Cystein trägt.

Kernstück der PLP-Bindungsdomäne ist ein zentrales 7-strängiges Faltblatt mit der Topologie +S2, -S9, +S8, +S7, +S5, +S3, +S4. Ein zentrales Faltblatt dieser Topologie ist in allen bisher bekannten Strukturen der α - und der γ -Familie PLP-bindender Enzyme vorhanden (Mehta & Christen, 1993; Ouzounis & Sander, 1993; Sandmeier *et al.*, 1994). Dieses Faltblatt wird von den Helices H5 (Reste 128-135) und H6 (Reste 158-168) gegen das Solvens hin und von den Helices H3 (Reste 70-85) und H4 (Reste 100-112) gegen die Dimerisierungsfläche hin eingeklemmt. Der

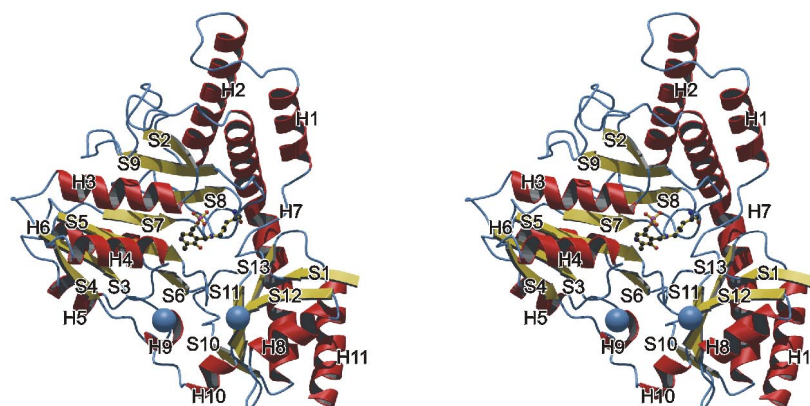


Abbildung 17: Eine Untereinheit von tmNifS mit Benennung der Sekundärstrukturelemente.

einzig antiparallele Strang des zentralen Faltblattes, S9, folgt direkt auf den *Turn*, der das PLP-bindende Lysin 203 enthält, und führt über eine *Coil*-Struktur zu der Helix H7 (241-278), welche die große mit der kleinen Domäne verbindet. H7 ist ungefähr in der Mitte bei E257 um ca. 90° geknickt und liegt auf der solvensexponierten Seite des Monomers. Hier kann die Grenze zwischen kleiner und großer Domäne gezogen werden. Die beiden N-terminalen Helices H1 und H2 (Reste 14-27 bzw. 36-58) bilden mit dem N-terminalen Teil von H7 ein Drei-Helix-Bündel.

Die kleine Domäne ist mit einer offenen $\alpha\beta$ -Faltung zu beschreiben. Das β -Faltblatt besteht aus zwei Teilen, einem viersträngigen antiparallelen (+S10, -S13, +S11, -S12) und einem zweisträngigen parallelen (+S1, +S12) Faltblatt. Die Verbindung zwischen den beiden Teilen wird durch Strang S12 vermittelt, welcher geknickt ist und an beiden Faltblattstrukturen teilhat. Die äußere Seite dieser $\alpha\beta$ -Struktur wird von Helices H8 (Reste 304-313), H11 (Reste 359-376) und dem C-terminalen Teil von H7 gebildet. Der offene Teil ist direkt an der Bildung der Wände des Aktivzentrums beteiligt. Die 12 Aminosäuren S321-R332, welche S12 mit dem Helix-Loop-Helix-Modul (H9-L-H10) verbinden, sind in der Elektronendichte nicht sichtbar. Dieser *Loop* beherbergt auch das reaktive Cystein 324.

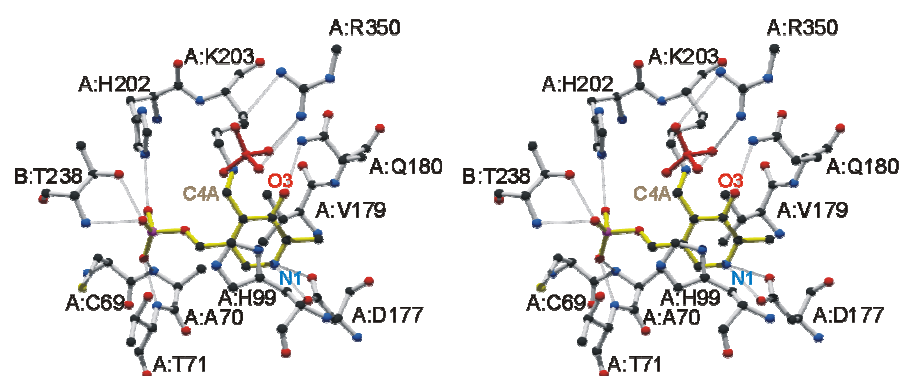


Abbildung 19: Architektur des Aktivzentrums von tmNifS. Wasserstoffbrückenbindungen sind als transparente Stäbe dargestellt, ein Sulfation, welches substratanalog bindet, ist rot dargestellt.

Das Aktivzentrum ist am Boden einer Furche, welche von der großen Domäne der einen und der kleinen Domäne der anderen Untereinheit gebildet wird. Abbildung 19 zeigt die Architektur des Aktivzentrums in Kugel-Stab-Darstellung. Der PLP-Ring bildet einen Aromatenstapel mit His99 und wird auf der anderen Seite von Val179 gestützt. Weiterhin bindet Asp177 den Pyridin-Stickstoff N1 und Gln180 den Phenolatsauerstoff O3 durch ionische Interaktion. Die Reste 177-180 sind Teil der Verbindung zwischen S7 und S8. Die Phosphatgruppe des *co*-Faktors wird zwischen den beiden Untereinheiten durch insgesamt sechs Wasserstoffbrückenbindungen fixiert. Diese werden ausgebildet zu O γ und NH von Thr71, N ϵ von His202, O γ von Ser200 und O γ und NH von Thr238 der anderen Untereinheit. His202 und Ser200 sind in enger Nachbarschaft zu Lys203, welcher die aktive SCHIFF'sche-Base-Bindung mit dem *co*-Faktor bildet. Arg350 bildet zwei Salzbrücken zu einem Sulfation aus dem Kristallisationspuffer, welches in einer für die Carboxylatgruppe des Substrates erwarteten Weise in das Aktivzentrum bindet.

4.2.5.2 Reduziertes *tmNifS* im Komplex mit Cystein

Das NaBH₄-reduzierte Protein zeigt keine konformationelle Änderung gegenüber der nativen Form. Im Aktivzentrum ist deutlich Elektronendichte zu erkennen, die durch ein Cysteinmolekül interpretiert werden kann. Das Substratcystein (sCys) wird - analog zu dem Sulfation in der substratfreien Struktur - durch Salzbrücken zu Arg350 und zu N δ von Asn150 fixiert. Asn31-N δ bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu sCys-S γ mit einer Länge von 3.8Å. N ϵ und N δ von His99 besitzen Abstände zu der sCys-Aminogruppe von 3.4Å bzw. 3.2Å. Der Cys324-Loop ist auch in dieser Struktur nicht lokalisierbar.

4.2.5.3 Allylglycin-inaktiviertes Protein

Da NifS-Proteine von Allylglycin (AG) durch Alkylierung von Cys324 irreversibel gehemmt werden, wurde versucht, die Struktur des inaktivierten Proteins zu bestimmen. Es wurde erwartet, daß AG das externe Aldimin mit dem *co*-Faktor bildet und gleichzeitig an Cys324 kovalent gebunden ist. Damit wäre eine dem Übergangszustand analoge Struktur vorhanden, in der der Cys324-Loop geordnet

sein müßte. Die Struktur des inhibierten Proteins zeigte jedoch eine dem freien Protein ähnliche Struktur (rms-Abweichung für alle 364 C α -Atome von 0.27Å), und es konnte keine zusätzliche Elektronendichte, weder für den Inhibitor noch für den Cys324-Loop ermittelt werden.

4.3 C-DES aus *Synechocystis PCC6714*

4.3.1 Strukturlösung

C-DES aus *Synechocystis* wurde von Frau Dr. D. Kessler zur Verfügung gestellt. Klonierung von C-DES in pET22b(+) und nachfolgende Versuche der Expression auf NMM waren erfolglos.

Kristalle von C-DES und C-DES-Mutanten wurden von Frau Dr. D. Kessler und von Herrn Dr. T. Clausen bereitgestellt.

Es wurde versucht C-DES mit Hilfe der Methode des molekularen Ersatzes zu lösen. Hierzu wurden verschiedene Modelle von tmNifS verwendet (Poly-Alaninmodell, Komplet-Modell, Poly-Alanin mit intakten konservierten Resten). Es zeigte sich in

	Peak	Edge	Remote	NATI	EP	K223A	K223AS
Wellenlänge [Å]	1.0728	1.0722	0.8900	0.89	0.89	1.05	1.05
Auflösung [Å]	2.35	2.35	2.35	1.80	1.55	2.0	2.2
Vollständigkeit [%]	93.5	99.0	95.8	93.8	93.7	96.5	95.3
R _{sym} [%]	3.0	2.9	2.7	4.7	5.2	7.4	6.2

Tabelle 4: Datensammlungsstatistiken verschiedener C-DES-Datensätze. Peak, Edge, Remote: Pt-MAD-Messung, NATI: Freies Enzym, EP: Enzym/Produktkomplex, K223A: Lys223Ala Mutante, K223AS: Lys223Ala-Mutante mit Substrat.

keinem Fall eine klar abgehobene Lösung und keine der probeweise berechneten Dichten war von zufriedenstellender Qualität. Da die Expression auf Minimalmedium und somit der Ersatz von Met durch SeMet nicht möglich war, schied die Phasierung durch Se-MAD aus. Deshalb wurden *soaking* und *co*-Kristallisations-Versuche mit verschiedenen Schwermetallverbindungen durchgeführt.

K₂PtCl₄ zeigte in der isomorphen Differenz-PATTERSON eine klare Lösung und wurde zur Messung eines MAD-Datensatzes verwendet. Die Strukturen des Produktkomplexes, der K224A Mutanten und des K224A-Substrat-Komplexes

wurden durch molekularen Ersatz oder direkte Phasierung mit dem Wildtyp-Modell bestimmt.

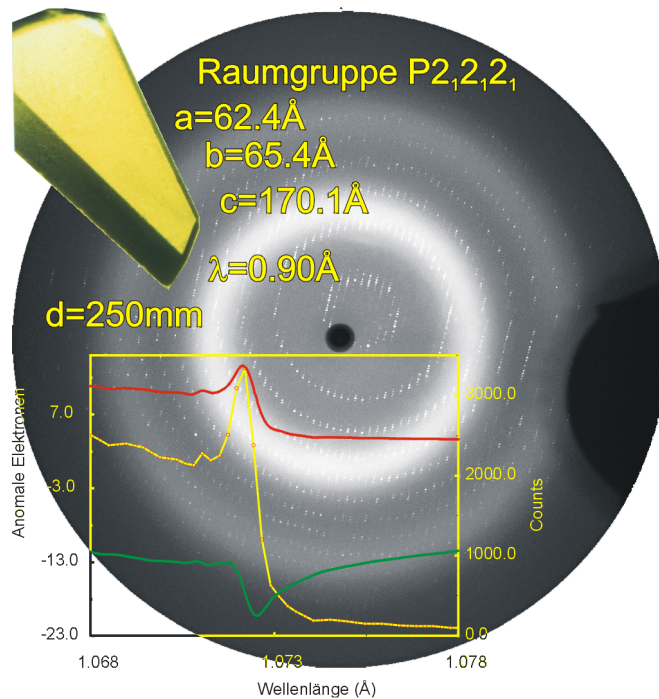


Abbildung 20: Diffraktionsbild eines C-DES/Cys-Kristalles. Gezeigt ist eine 0.5° Rotationsaufnahme bei 1.55\AA Auflösung. Oben links ein Kristall von C-DES. Unten links das Fluoreszenzspektrum in der Nähe der Platinabsorptionskante.

		Peak	Edge	Remote
Phasing power	Iso	1.72	1.21	--
	Ano	1.86	3.03	2.90
R_{cullis}	Iso	0.68	0.75	--

Tabelle 5: Phasierungsstatistiken für C-DES

4.3.2 Strukturen

In Tabelle 6 sind die Verfeinerungsstatistiken für die Strukturen von C-DES angegeben. Abbildung 21 zeigt Elektronendichtekarten der Strukturen.

	NATI	EP	K223A	K223AS
$R_{\text{cryst}} (R_{\text{free}})$ [%]	19.8 (24.9)	21.4 (25.9)	21.8 (26.8)	20.65 (27.13)
Unabhängige Reflexe	61,410	95,716	47,830	35,389
Bindungs-rmsd [Å]	0.012	0.011	0.009	0.009
Winkel-rmsd [°]	1.60	1.58	1.38	1.46
Rmsd verbundener B-Faktoren [Å ²]	2.43	2.46	1.55	1.45
Ramachandrandiagrammqualität				
Bevorzugt	91.8	92.2	91.0	91.0
Erlaubt	8.0	7.5	8.7	8.6
Mit Einschränkung erlaubt	0.2	0.3	0.3	0.4
Anzahl der Atome				
Protein und Ligand	5884	5938	5938	5985
Wasser	781	767	640	756

Tabelle 6: Verfeinerungsstatistiken der C-DES-Modelle

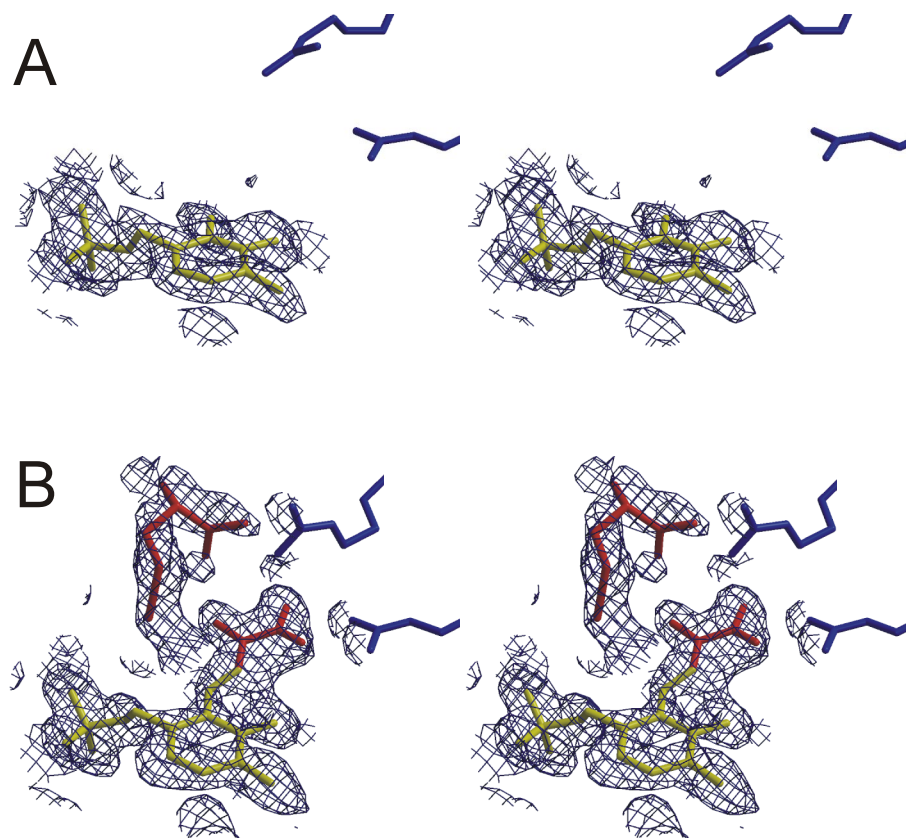


Abbildung 21: Fortgeführt auf nächster Seite

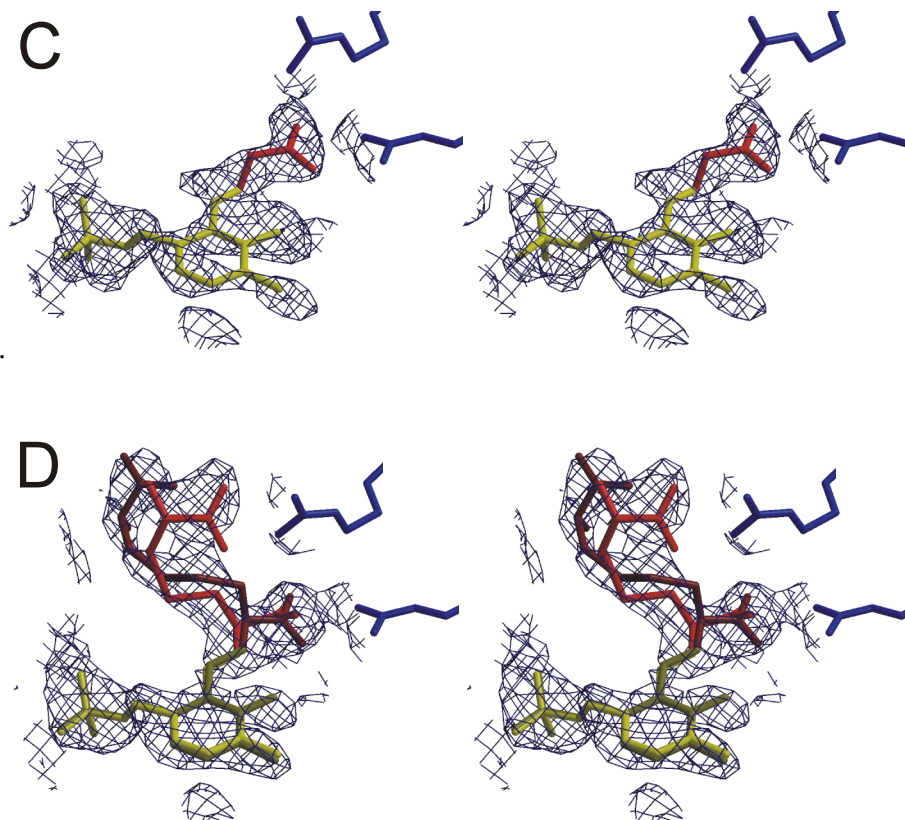


Abbildung 21: Elektronendichteverteilung der verfeinerten C-DES-Strukturen. Dargestellt sind die $2F_o-F_c$ -Dichten, überlagert mit den final verfeinerten Atommodellen, im Bereich des Aktivzentrums. (A) NATI, (B) Enzym-Produkt-Komplex (EP), (C) Lys223Ala-Mutante, (D) Lys223Ala-Mutante mit Edukt.

4.3.2.1 Natives Protein

Wie tmNifS ist auch C-DES ein Dimer (Abbildung 23) und zeigt die für die PLP- α -Familie typische Faltung (Abbildung 22). Eine detaillierte Strukturbeschreibung wird beim Vergleich der Strukturen von tmNifS, C-DES und CSDB (unter 5.3) gegeben.

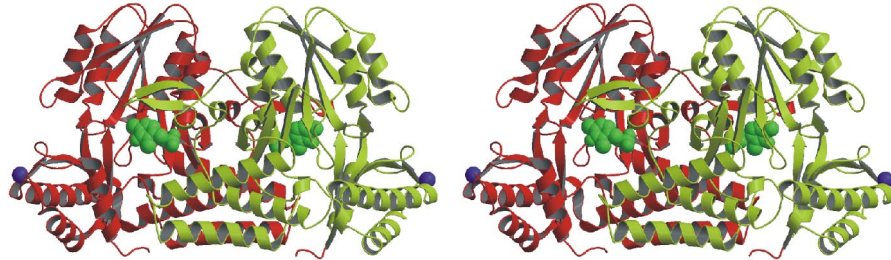


Abbildung 23: Stereodarstellung des C-DES-Dimeren. Die beiden Untereinheiten sind rot bzw. gelbgrün gefärbt. Der *co*-Faktor ist als grünes Kalottenmodell dargestellt. Zwei Kaliumionen sind als violette Bälle gezeigt.

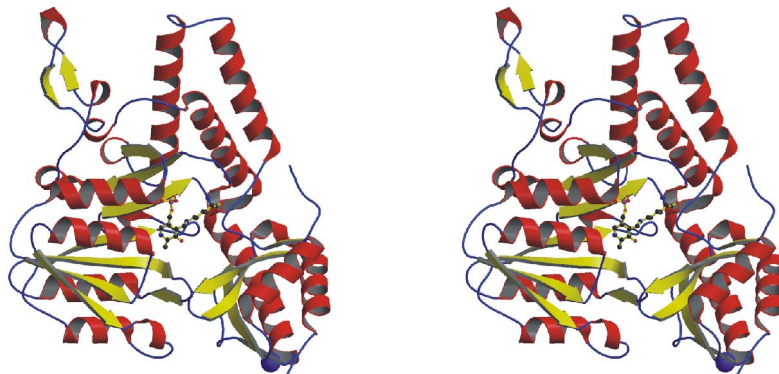


Abbildung 22: Stereodarstellung eines C-DES-Monomeren. Helices sind rot, β -Stränge gelb und *Loop*- oder *Turn*-Strukturen blau dargestellt. Der *co*-Faktor sowie das kovalent gebundene Lys223 sind als Kugel-Stab-Modelle dargestellt.

Das Aktivzentrum von C-DES besteht aus einer großen hydrophoben Tasche, welche $18\text{\AA} \times 15\text{\AA}$ groß und 10\AA tief ist. Die Wände werden gebildet von den Resten Asn57, Gln61, Arg68, Arg252, Lys270, Thr276 und Tyr279 der benachbarten Untereinheit und sowie von Phe25, Gly26, Gly27, Gln28, Arg360 und Arg369 der kleinen Domäne. Den Boden formen His114 und Pro115 sowie Phe52, Trp251 und Tyr256 der benachbarten Untereinheit.

4.3.2.2 Produktkomplex

Kristalle des produktkomplexierten C-DES wurden durch *co*-Kristallisation von C-DES mit Cystein unter aeroben Bedingungen bei pH6.1 erhalten. Überraschenderweise zeigte sich während der Verfeinerung, daß es sich hier um einen Produkt- und nicht um einen Eduktkomplex handelte. Es wurden keine großen Änderungen des Proteinrückgrates beobachtet, lediglich einzelne Seitenketten im Aktivzentrum ändern ihre Konformation, um die Produkte zu binden. Auf diese Änderungen wird bei der Diskussion möglicher Mechanismen unter 5.4 eingegangen.

4.3.2.3 K223A-Mutante

Lysin 223 bildet in C-DES die SCHIFF'sche Base-Bindung zu PLP. Diese Mutante diente als Kontrolle für die unter 4.3.2.4 bestimmte Struktur. Es wurden keine Änderungen im Proteinrückgrat beobachtet, jedoch war Elektronendichte über die Position von C4A des *co*-Faktors PLP hinaus vorhanden. Diese wurde in Form eines als externes Aldimin gebundenes Glycin interpretiert (siehe auch Abbildung 21C).

4.3.2.4 K223A-Mutante mit Substrat

Die Elektronendichten im Aktivzentrum wurden für den Substratkomplex durch multiple Konformationen des Substrates interpretiert. In der einen Konformation wird das Substrat analog den beiden Produkten gebunden: Die beiden Carboxylatgruppen bilden Salzbrücken zu Arg360 bzw. Arg369. In der anderen Konformation ist das Substratcystin in einer gestreckten Konformation gebunden und wird auf der einen Seite durch Salzbrückenbindung zu Arg360, auf der anderen Seite durch hydrophobe Interaktion mit Trp251 gebunden.

5 Diskussion

5.1 Struktur von NifS aus *T. maritima*

Die Struktur von tmNifS besitzt die für die PLP- α -Familie typische Faltung. Die in vielen Proteinen dieser Familie beobachtete kleine N-terminale Domäne fehlt jedoch vollständig, wodurch das tmNifS-Monomer kompakter erscheint. Einzigartig ist der fehlgeordnete *Loop* in der kleinen Domäne, der das aktive Cys324 trägt. Dieser *Loop* muß während des Reaktionszyklus eine Disulfidbrücke zu dem Substratcystein bilden und somit das Aktivzentrum verschließen. Hierdurch wird Wasser aus dem Aktivzentrum ausgeschlossen. Nach vollendeter β -Lyse tritt eine Transaldiminierung ein, bevor der Cys324-*Loop* das Aktivzentrum öffnet. Dadurch bedingt, ist das Produkt der Reaktion Alanin und nicht das Produkt der Hydrolyse des externen Aldimins, Pyruvat und Ammonium. Das langsame Öffnen des aktiven Zentrums ist notwendig, um das gewünschte Reaktionsprodukt, das enzymgebundene Persulfid, vor einer Hydrolyse durch umgebendes Solvens zu schützen. Die in der NifS-Familie konservierte, lange und flexible *Loop*-Struktur gibt Anlaß zu weitergehender Spekulation über deren biologische Notwendigkeit. Es ist äußerst wahrscheinlich, daß der gebildete aktive Schwefel zum Aufbau von Fe/S-Clustern in Kavitäten anderer Proteine weitergereicht wird. Dies erscheint sogar sinnvoll, da alle Komponenten, die zum Aufbau der Cluster notwendig sind, entweder in biologischem Milieu labil oder für die Zelle schädlich sind. Auf diesen Aspekt wird unter 5.5 näher eingegangen.

Implikationen für den Reaktionsmechanismus ergeben sich aus der Architektur des Aktivzentrums. Mehrere Mechanismen wurden bisher für den Reaktionszyklus von NifS-ähnlichen Proteinen vorgeschlagen (Hester *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 1994). In 5.4 sind diese nebeneinandergestellt. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in der Natur des Protonenabstraktors während der Aktivierung des Substrates. Im Gegensatz zu beiden Mechanismen macht die Aktivzentrumsarchitektur es sehr wahrscheinlich, daß weder Lys203 - wie von Zheng vorgeschlagen - noch His45 - wie bei Hester - sondern His99 die Rolle eines Säure-Base-Katalysators spielt. Die

Orientierung des Substrates macht eine Deprotonierung der Aminogruppe durch His99 sehr wahrscheinlich. Im Zuge des Katalysezyklus können sich der redox-Katalysator PLP und der Säure-Base-Katalysator His99 gegenseitig durch elektrostatische Wechselwirkung beeinflussen, wodurch die Reaktion gelenkt wird. Hierauf, sowie auf andere Unterschiede des hier entwickelten Mechanismus zu den Vorgeschlagenen, wird unter 5.4 näher eingegangen.

5.2 Struktur von C-DES aus *Synechocystis*

Ähnlich der Struktur von tmNifS ist auch die C-DES-Faltung homolog zu anderen PLP- α -Familie-Proteinen. Außergewöhnlich bei C-DES ist die lange Erweiterung vor Helix H7. Diese bilden die distale Wand der Aktivzentrumstasche und wirken maßgeblich bei der Stabilisierung des Produktes der Reaktion, dem Cysteinpersulfid, mit.

C-DES benutzt – im Gegensatz zu NifS – einen anderen Mechanismus der Cysteinpersulfidstabilisierung (CysS). Da C-DES freies und nicht proteingebundenes CysS produziert, fehlt ihm der *Cys324-Loop*. Eigentliches Substrat ist Cystin und nicht Cystein. Da das aktive Zentrum nicht durch den *Cys324-Loop* verschlossen wird, kann die Hydrolyse des Acrylsäureamins durch Solvens stattfinden und es bildet sich Pyruvat und Ammoniak. Dennoch muß das gewünschte Produkt, Cysteinpersulfid (CysS), vor Hydrolyse geschützt werden. Dies geschieht durch Bindung des distalen Schwefels an His114, wodurch CysS in einer hydrophoben Tasche – gebildet aus Trp251*, Tyr256* und Pro115 - vor Wasserangriff geschützt wird (mit einem Stern gekennzeichnete Reste sind in der benachbarten Untereinheit lokalisiert). Der Transport von CysS zu der Stelle der Fe/S-Cluster-Synthese muß auch nach anderen Prinzipien als bei tmNifS erfolgen. Denkbar ist eine Diffusion des CysS aus dem Aktivzentrum von C-DES durch umgebendes Medium zu dem Ort der Clustersynthese. Hierbei würde allerdings ein Großteil des CysS zersetzt, was den Mechanismus äußerst unproduktiv machen würde. Die große und tiefe Tasche des aktiven Zentrums legt die Vermutung nahe, daß andere Proteine an C-DES binden und das Produkt direkt von His114 übernehmen. Dies würde eine

komplementäre Geometrie im Vergleich zu NifS implizieren: während NifS mit dem Cys324-Loop den Schwefel an die Stelle der Clustersynthese ‚übergibt‘, wird im Falle von C-DES der Schwefel ‚abgeholt‘. Mögliche Erklärungen und weitere Schlußfolgerungen aus diesen Unterschieden sind unter 5.5 näher ausgeführt.

5.3 Vergleich der Strukturen von *tmNifS*, *C-DES* und *ecCsdB*

NifS und C-DES sowie CsdB, ein Protein dessen Struktur im Verlaufe dieser Arbeit von einer japanischen Gruppe bestimmt wurde (Fujii *et al.*, 2000), werden alle zur Gruppe der NifS-ähnlichen Proteine gerechnet. Diese Klassifizierung ist zum größten Teil auf Sequenzinformationen gestützt. Diese drei Enzyme katalysieren jedoch auch sehr ähnliche Reaktionen *in vivo*. Für CsdB wurde jedoch gezeigt, daß eine deutliche Präferenz für Selenocystein (SeC) gegenüber Cystein als Substrat vorliegt (Mihara *et al.*, 1999). Es konnte auch gezeigt werden, daß die SeC-Lyase-Aktivität durch Cystein-alkylierende Agenzien nicht inhibiert wird (Mihara *et al.*, 2000). C-DES besitzt, wie erwähnt, kein dem *Cys324-Loop* entsprechendes Strukturmotiv und setzt Cystin – nicht Cystein – zu Cysteinpersulfid um.

Alle drei Proteine besitzen eine hohe Übereinstimmung des Proteinrückgrates (Abbildung 24). Der augenscheinlichste Unterschied zwischen NifS auf der einen und C-DES sowie CsdB auf der anderen Seite ist die lange Insertion vor Helix H7. Dieser *Loop* mit partieller Faltblattstruktur bildet bei C-DES und CsdB die distale Wand des Aktivzentrums der benachbarten Untereinheit. Dies kann jedoch bei dem jetzigen Kenntnisstand nicht in funktionellen Zusammenhang gestellt werden, deutet aber auf eine nähere evolutionäre Verwandtschaft von CsdB und C-DES hin.

Auffällig ist weiter, daß der *Cys324-Loop* bei *tmNifS* am längsten ist, und zudem in der Elektronendichte nicht sichtbar ist, also eine hohe Mobilität besitzt. Diese Tatsache spiegelt sich in der Aminosäurezusammensetzung dieses Strukturmerkmals wider: während bei *tmNifS* hauptsächlich kleine, hydrophile Reste in diesem Loop zu finden sind, wird er in CsdB von großen, teilweise hydrophoben Resten gebildet. Dies kann zum einen darauf hindeuten, daß in *tmNifS* die funktionelle Notwendigkeit besteht, die *Cys324-Umgebung* flexibel zu gestalten, z.B. um eine Bewegung des *Loops* vom Aktivzentrum des Enzymes an eine andere Stelle zu ermöglichen. Andererseits kann vor dem Hintergrund der Tatsache, daß in CsdB ein *Cys324-Analoges* nicht notwendig für die Deselenierungsreaktion ist, auch spekuliert werden, daß der in diesem Protein vorhandene *Loop* ein evolutionäres

Artefakt ist. Dagegen spricht jedoch die Positionierung des Cys324-homologen Cysteins in CsdB direkt über dem Aktivzentrum.

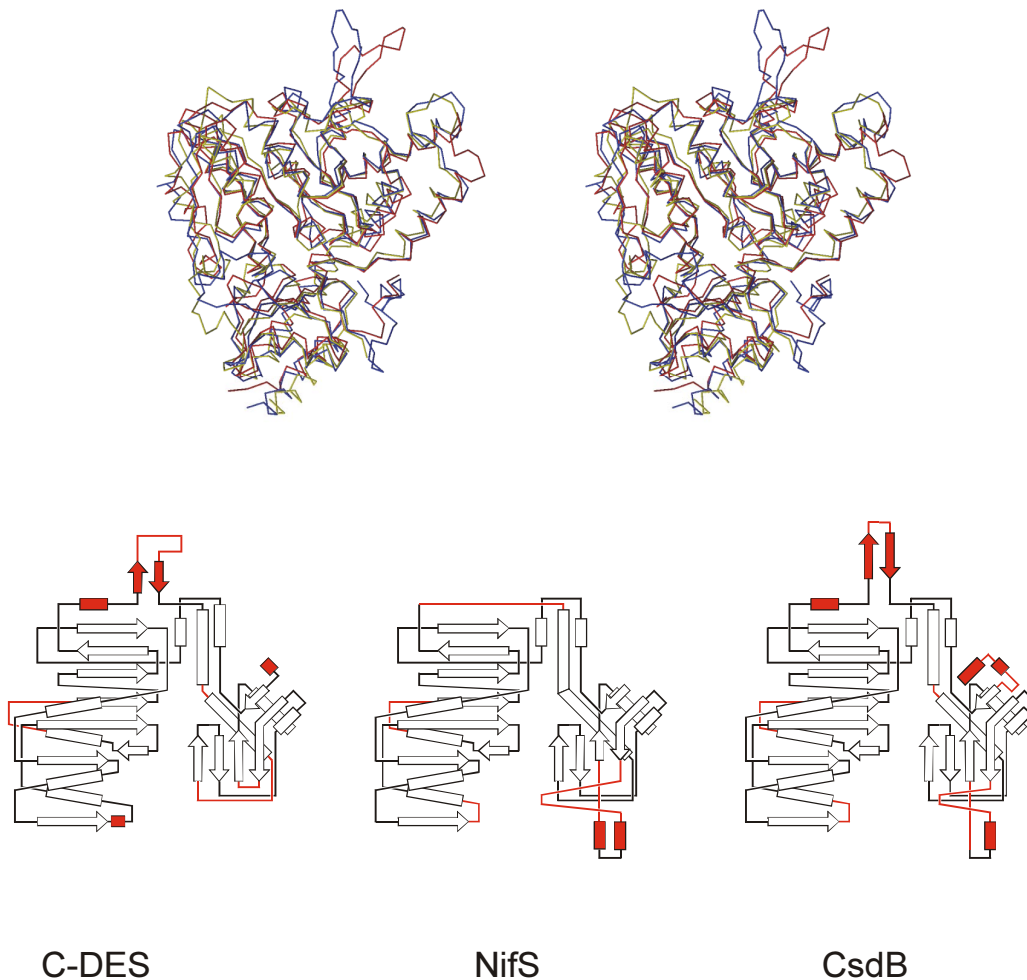


Abbildung 24: Strukturvergleich von NifS, C-DES und CsdB. Oben: Überlagerung der drei Proteine (NifS gelb, C-DES rot und CsdB blau). Unten: Topologiediagramme der drei Proteine. Unterschiedliche Strukturmerkmale sind rot eingefärbt.

Bei dem Vergleich der Aktivzentrumsarchitektur (Abbildung 25, Seite 68) zwischen den drei Enzymen ist am auffälligsten, daß in allen Fällen ein Histidin (NifS:H99, C-DES:H114, CsdB:H123) mit dem *co*-Faktor einen Aromatenstapel bildet. Diesem Rest wird eine kritische Bedeutung im Katalysezyklus zugeschrieben (siehe 5.4). Eine weitere Gemeinsamkeit aller drei Proteine ist der analoge Rest zu R350 in tmNifS (C-DES:R369, CsdB:R379). Die Arginin-Guanidino-Gruppe fixiert die Substratcarboxylatgruppe durch eine bidentale Salzbrücke. C-DES besitzt im Aktivzentrum einen weiteren Argininrest, R360, welcher die in Cystin vorhandene

zweite Carboxylatgruppe bindet und das Substrat in einer für die Stabilisierung des Produktes optimalen Geometrie vororientiert. Interessanterweise ist auch im Aktivzentrum von CsdB in ähnlicher sterischer Anordnung eine zweite Argininseitenkette vorhanden (R359), so daß spekuliert werden kann, ob hier nicht auch ein zu Cystin analoges Substrat umgesetzt wird. Für dieses Protein fehlen jedoch sowohl ausreichende biochemische Daten als auch ein Substratkomplex.

Es fällt weiterhin auf, daß in C-DES die distale Wand des Aktivzentrums von den hydrophoben Aminosäuren W251 und Y256 gebildet wird. Zusammen mit P115 sind diese für die Stabilisierung des Cysteinpersulfides verantwortlich. Weder NifS noch CsdB zeigen eine solch ausgeprägte Präferenz für hydrophobe Aminosäuren im Aktivzentrum. In tmNifS ist es sehr wahrscheinlich, daß das gebildete Persulfid durch den das Aktivzentrum verschließenden *Loop* vor Solvensangriff geschützt wird. Über den Mechanismus der Selenstabilisierung in CsdB kann nur spekuliert werden, da hier der *Loop* zu kurz scheint, um das Aktivzentrum vollständig zu verschließen.

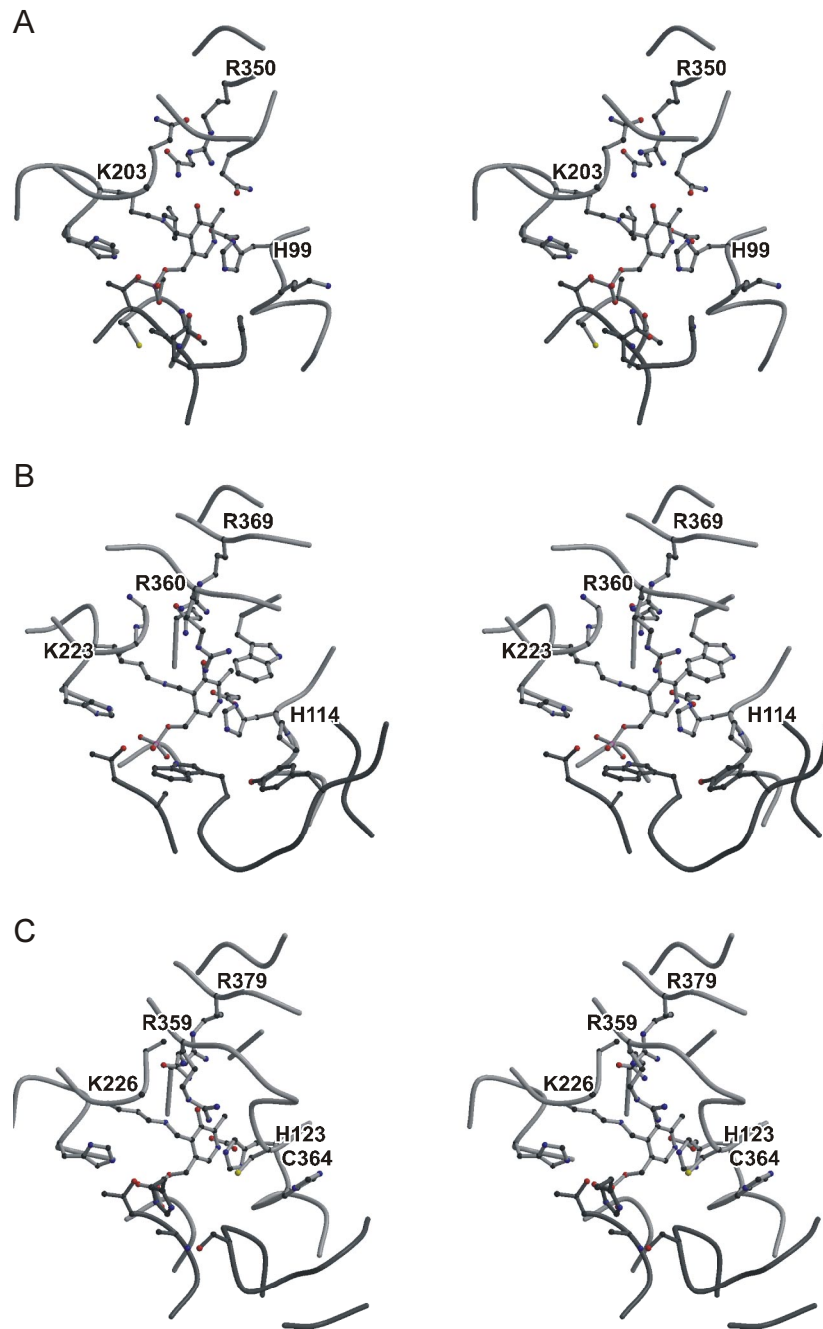


Abbildung 25: Vergleich der Aktivzentrumsarchitektur zwischen (A) NifS (B)C-DES und (C) CsdB. Wichtige Reste sind beschriftet. Dunkelgrau dargestellt sind Reste der benachbarten Untereinheit. Atome sind nach Atomtypen eingefärbt.

5.4 Reaktionsmechanismen

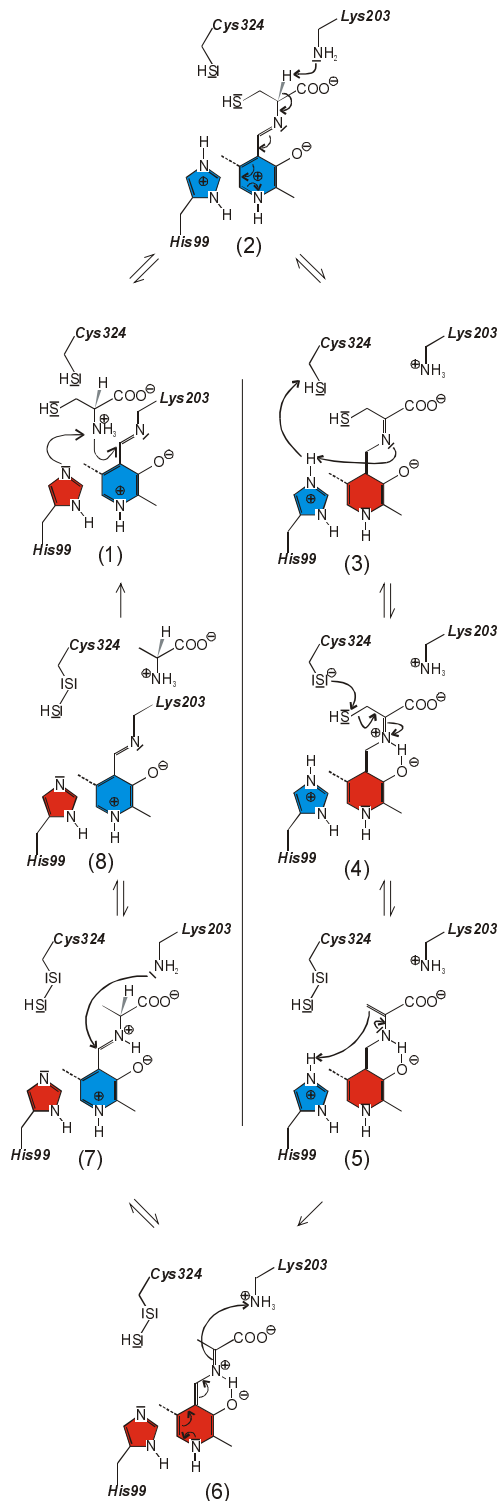


Abbildung 26: Postulierter Reaktionsmechanismus von NifS-ähnlichen Enzymen. Erklärungen siehe Text.

Für NifS wurden bereits zwei verschiedene Reaktionsmechanismen postuliert (Hester et al., 1999; Zheng et al., 1994). Beiden gemeinsam ist ein Mechanismus, der einen 1,3-prototropischen *shift* einschließt, was zu mindestens einem Zeitpunkt im Reaktionsweg ein quartäres C4A bedingt. Der Mechanismus von Zheng *et al.* unterscheidet sich von dem von Hester *et al.* im wesentlichen in der Natur des Restes, welcher C324 deprotoniert und damit für einen Angriff auf das Substratcystein aktiviert. Zheng schrieben diese Funktion K203 zu, wohingegen Hester *et al.* auf der Basis einer homologen Struktur H45 für den C324-deprotonierenden Rest hielten. Die in dieser Arbeit gewonnenen spektroskopischen Ergebnisse machen jedoch ein Intermediat mit quartärem C4A äußerst unwahrscheinlich, da keine Absorption bei 335nm beobachtet werden konnte (vergleiche Abbildung 5). Statt dessen wird ein alternativer Mechanismus postuliert, in dem H99 als Säure-Base-Katalysator wirkt und die meisten Protonierungen und Deprotonierungen durchführt. H99 und PLP beeinflussen

sich hierbei gegenseitig durch elektrostatische Wechselwirkung. Ist H99 protoniert, trägt es eine positive Ladung und verstärkt so den Elektronenzug von PLP; ist es deprotoniert, so ist die elektronenärmere Form des *co*-Faktors favorisiert. Andererseits ist aus derselben Überlegung heraus die Azidität von H99 erhöht, wenn PLP in der protonierten aromatischen Form mit positiver Ladung vorliegt, die Basizität von H99 erhöht, wenn das elektronenreiche chinonoide System vorliegt. Durch diese gegenseitige Feinsteuerung kann zum einen H99 als Protonenshuttle fungieren, zum anderen kann PLP zwischen der Reduktions- und der Oxidationshalbreaktion des Katalysezyklus wechseln.

Das Ausmaß dieser elektrostatischen Wechselbeziehung kann jedoch anhand der momentanen Daten nicht festgestellt werden, auch kann nicht ausgeschlossen werden, daß andere Teilschritte eine wichtige Rolle spielen.

Für C-DES liegen noch keine UV-VIS-spektroskopischen Daten vor, weshalb eine genaue mechanistische Modellierung der Cystin-Lyase Reaktion nicht gegeben werden kann. Aufgrund der gelösten Strukturen kann jedoch eine zeitlich grob aufgelöste Reaktionssequenz vorgestellt werden. Das Substrat Cystin wird im Aktivzentrum von C-DES zunächst von R369 gebunden und es kommt zur Transaldiminierung. Cystin liegt zunächst in einer gestreckten Konformation vor, wobei das distale Cystein in hydrophober Interaktion mit W251 steht. Es kommt nun zu einer Konformationsänderung des Substrates, wobei die distale Carboxylatgruppe von R360 gebunden wird. Nach Spaltung der C β -S γ -Bindung wird das gebildete CysS in der hydrophoben Tasche aus W251*, Y256* und P115 sowie durch eine Wasserstoffbrückenbindung zu H114 stabilisiert. Das am PLP verbleibende Acrylsäureimin wird nach Transaldiminierung durch Solvens zu Pyruvat und Ammonium hydrolysiert. Eine Darstellung dieses Zyklus auf der Basis der in dieser Arbeit gelösten Strukturen ist in Abbildung 27 gegeben.

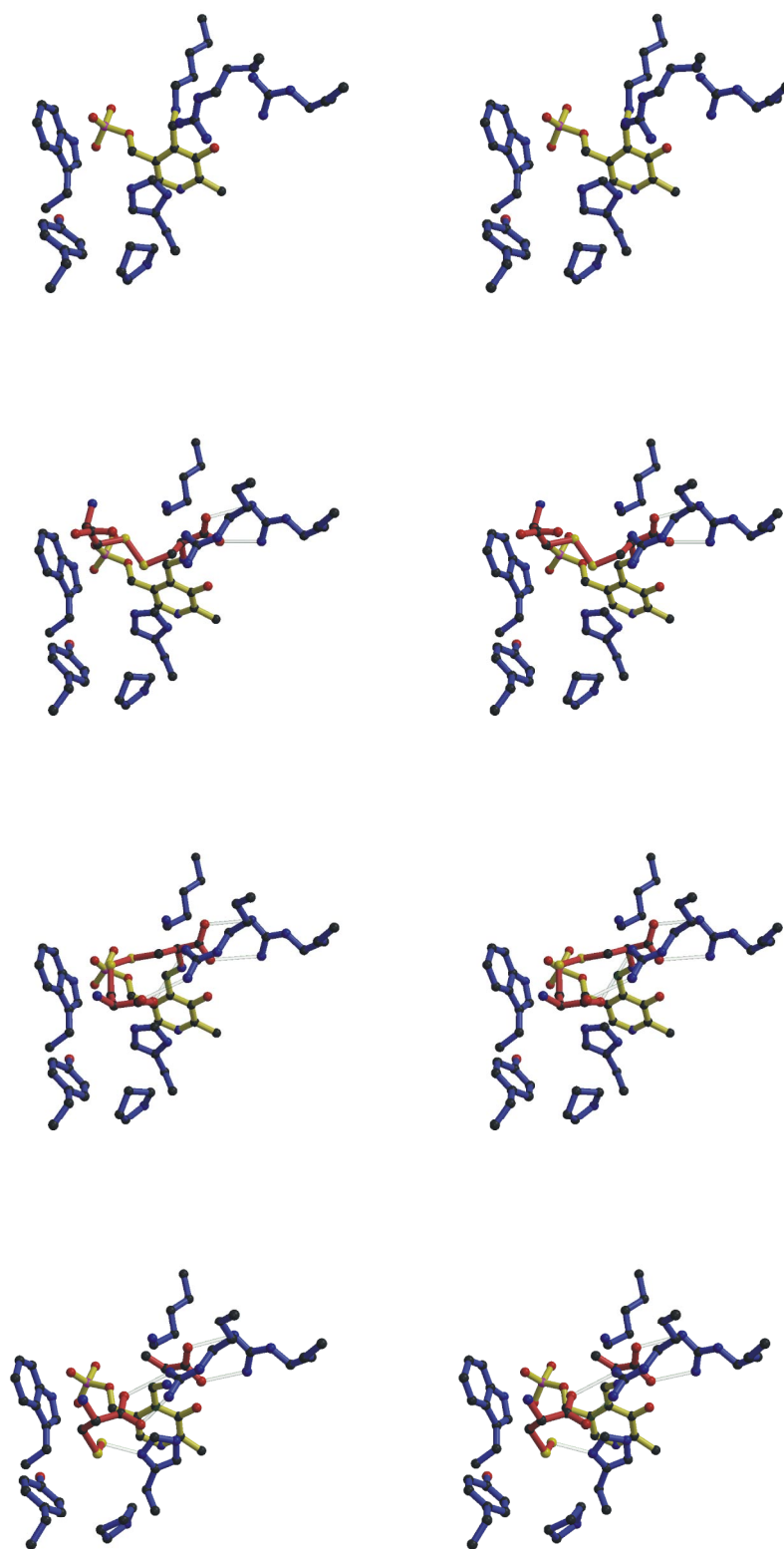


Abbildung 27: Stereodarstellung der Aktivzentrumsumgebung verschiedener C-DES-Strukturen. Von oben nach unten: Freies Protein, Bindung des Substrates in gestreckter Konformation, Umlagerung des Substrates und β -Lyse.

5.5 **Biologische Implikationen**

Die Tatsache, daß in tmNifS das schwefelakzeptierende Cys324 in einer hochflexiblen *Loop*struktur lokalisiert ist, legt den Schluß nahe, daß die produzierte Schwefelspezies an andere Proteine zum Fe/S-Cluster Aufbau weitergereicht wird. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß das Cys324 in Kavitäten anderer Proteine geschleust wird, wobei das Persulfid weiterhin vor Solvensangriff geschützt bleibt. In der Tat wurde in neuesten Arbeiten eine starke Interaktion zwischen NifS und NifU beobachtet, und es konnte gezeigt werden, daß mit Hilfe von NifS in NifU ein transienter 2Fe2S⁻-Cluster aufgebaut wird (Agar *et al.*, 2000a; Agar *et al.*, 2000b; Yuvaniyama *et al.*, 2000). Es wurde postuliert, daß dieser die Vorstufe auch für höhere Fe/S-Cluster darstellt. Diese Ergebnisse stehen in sehr gutem Einklang mit dem hier abgeleiteten Modell, jedoch kann eine vollständige Klärung erst durch eine strukturelle Untersuchung des NifS/NifU-Komplexes erfolgen.

C-DES ist insofern einzigartig, als daß es im Gegensatz zu allen anderen bekannten schwefelliefernden NifS-Homologen kein an der Reaktion beteiligtes Cystein besitzt. C-DES wurde in einem Holoferredoxin-Rekonstitutionsassay in *Synechocystis*- Zellextrakten entdeckt. Interessanterweise zeigte hierbei keines der anderen NifS-ähnlichen Proteine aus diesem Organismus eine deutliche Aktivität. Dies legt den Schluß nahe, daß C-DES kein universeller Lieferant von S⁰ für die Fe/S-Cluster Synthese ist, sondern höchstwahrscheinlich die Bildung von Ferredoxin-Fe/S-Clustern in *Synechocystis* katalysiert. Bei Ferredoxinen ist die Ausbildung einer geordneten molekularen Struktur mit der Bildung des Fe/S-Clusters gekoppelt, so daß es durchaus möglich ist, daß entfaltete Ferredoxine in der großen Aktivitätszentrumsfurche von C-DES binden und dort mit S⁰ beladen werden. Die Paralogen NifS-Proteine in *Synechocystis* wären dann für die Synthese der anderen Fe/S-Cluster zuständig.

6 Abkürzungen

AS	Ammoniumsulfat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
SeMet	Selenomethionin
SeCys	Selenocystein
CysS	Cysteinpersulfid
sCys	Substratcystein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
SA	<i>simulated annealing</i>
Fe/S	Eisen-Schwefel
FOM	<i>figure of merit</i>
ATD	<i>aqua tridestillata</i> (hier Millipore-Qualität)
%(w/v)	Gewichtsprozent
%(v/v)	Volumenprozent
Å	Ångström
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
h	Stunde(n)
w	Woche(n)
d	Tag(e)
min.	Minute(n)
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
MAD	<i>multiple anomalous dispersion</i>
SIR	<i>single isomorphous replacement</i>
MIR	<i>multiple isomorphous replacement</i>
MR	<i>molecular replacement</i>

U/min.	Umdrehungen pro Minute
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat

7 Literatur

- Agar, J. N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B. H., Dean, D. R. & Johnson, M. K. (2000a). IscU is a Scaffold for Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis: Sequential Assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] Clusters in IscU. *Biochemistry* **39**, 7856-7862.
- Agar, J. N., Zheng, L., Cash, V. L., Dean, D. R. & Johnson, M. K. (2000b). Role of the IscU Protein in Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis: IscS -mediated Assembly of a [Fe₂S₂] Cluster in IscU. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2136-2137.
- Akhtar, M., Emery, V. C. & Robinson, J. A. (1984). Pyridoxal phosphate-dependent enzymic reactions: mechanism and stereochemistry. In *New Comprehensive Biochemistry* (Neuberger, A., Deenen, L.M.M., ed.), Vol. 6, pp. 303-372. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, New York, Oxford.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Barton, G. J. (1993). ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments. *Protein. Eng.* **6**, 37-40.
- Beinert, H., Holm, R. H. & Münck, E. (1997). Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures. *Science* **277**, 653-659.
- Beinert, H. & Kiley, P. J. (1999). Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**(2), 152-157.
- Benci, S., Vaccari, S., Mozzarelli, A. & Cook, P. F. (1999). Time-resolved fluorescence of *O*-acetylserine sulfhydrylase. *Biochem. Biophys. Acta* **1429**, 317-330.
- Blundell, T. L. & Johnson, L. N. (1976). *Protein Crystallography*, Academic Press, London.
- Brunger, 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. & Warren, G. L. (1998). Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* **D54**, 905-921.
- Budisa, N., B., S., P., D., C., E., J., K. & R., H. (1995). High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **230**(2), 788-796.
- Carter, C. W. & Carter, C. W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.* **254**, 12219-12223.
- Chen, S., Zheng, L., Dean, D. R. & Zalkin, H. (1997). Role of NifS in Maturation of Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate Amidotransferase. *J. Bacteriol* **179**(23), 7587-7590.
- COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER 4. (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst. D* **50**, 760-763.
- Drenth, J. (1994). *Principles of protein X-ray crystallography*, Springer Verlag, New York.
- Esnouf, R. M. (1997). An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graph. Model.* **15**(2), 132-134, 112-113.
- Ewald, P. P. (1921). Das "reziproke Gitter" in der Strukturtheorie. *Z. Kristallogr.* **56**, 491-500.
- Flint, D. H. (1996). *Escherichia coli* Contains a Protein That Is Homologous in Function and N-terminal Sequence to the Protein Encoded by the *nifS* Gene of *Azotobacter vinelandii* and That Can Participate in the Synthesis of the Fe-S Cluster of Dihydroxy-acid Dehydratase. *J. Biol. Chem.* **271**(27), 16068-16074.
- Fortelle, E. d. L. & Bricogne, G. (1997). Maximum-Likelihood Heavy-Atom Parameter Refinement for the Multiple Isomorphous Replacement and

- Multiwavelength Anomalous Diffraction Methods. *Meth. Enzymol.* **276**, 472-494.
- Fujii, T., Maeda, M., Mihara, H., Kurihara, T., Esaki, N. & Hata, Y. (2000). Structure of a NifS homologue: X-ray structure analysis of CsdB, an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase. *Biochemistry* **39**, 1263.
- GCG. (1998). Wisconsin Package 10.0 edit. Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.
- Green, J., Bennett, B., Jordan, P., Ralph, E. T., Thomson, A. J. & Guest, J. R. (1996). Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch *in vitro*. *Biochem. J.* **316**, 887-892.
- György, P. (1934). Vitamin B₂ and the pellagra-like dermatitis of rats. *Nature* **133**, 448-449.
- György, P. (1964). History of vitamin B₆. Introductory remarks. *Vitamines & Hormones* **22**, 361-365.
- Hagen, K. S., Reynolds, J. G. & Holm, R. H. (1981). Definition of Reaction Sequences Resulting in Self-Assembly of [Fe₄S₄(SR₄)]²⁻ Clusters from Simple Reactants. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 4054-4063.
- Hagen, K. S., Watson, A. D. & Holm, R. H. (1983). Synthetic Routes to Fe₂S₂, Fe₃S₄, Fe₄S₄ and Fe₆S₉ Clusters from the Common Precursor [Fe(SC₂H₅)₄]²⁻: Structures and Properties of [Fe₃S₄(SR)₄]³⁻ and [Fe₆S₉(SC₂H₅)₂]⁴⁻, Examples of the Newest Types of Fe-S-SR Clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3905-3913.
- 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.
- Hester, G., Stark, W., Moser, M., Kallen, J., Markovic-Housley, Z. & Jansonius, J. N. (1999). Crystal Structure of Phosphoserine Aminotransferase from

- Escherichia coli* at 2.3Å Resolution: Comparison of the Unligated Enzyme and a Complex with α -Methyl-L-Glutamate. *J. Mol. Biol.* **286**, 829-850.
- Hidalgo, E. & Demple, B. (1994). An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. *EMBO J.* **13**(1), 138-146.
- Hidalgo, E. & Demple, B. (1996). Activation of SoxR-dependent Transcription *in Vitro* by Nuncatalytic or NifS-mediated Assembly of [2Fe-2S] Clusters into Apo-SoxR. *J. Biol. Chem.* **271**(13), 7269-7272.
- 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**(353-356).
- Ibers, J. A. & Holm, R. H. (1980). Modeling Coordination Sites in Metallobiomolecules. *Science* **209**, 223-235.
- Jacobson, M. R., Cash, V. L., Weiss, M. C., Laird, N. F., Newton, W. E. & Dean, D. R. (1989). Biochemical and genetic-analysis of the *nifUSVWZM* clusters from *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Gen.* **219**(1-2), 49-57.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411.
- John, R. A. (1995). Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochem. Biophys. Acta* **1248**, 81-96.
- Johnson, M. K. (1998). Iron-sulfur proteins: new roles for old clusters. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 173-181.
- Kirby, J., Wright, F. & Flint, H. J. (1998). A cysteine desulphurase gene from the cellulolytic rumen anaerobe *Ruminococcus flavefaciens*. *Biochem. Biophys. Acta* **1386**, 233-237.

- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. & Lill, R. (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* **18**(14), 3981-3989.
- Kraulis, P. J. (1993). MOLSCRIPT - A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Scientist* **7**(2), 16-16.
- Lacourciere, G. M. & Stadtman, T. C. (1998). The NIFS Protein Can Function as a Selenide Delivery Protein in the Biosynthesis of Selenophosphate. *J. Biol. Chem.* **273**(47), 30921-30926.
- Land, T. & Rouault, T. A. (1998). Targeting of a Human Iron-Sulfur Cluster Assembly Enzyme, *nifs*, to Different Subcellular Compartments Is Regulated through Alternative AUG Utilization. *Mol. Cell* **2**, 807-825.
- Lang, T. & Kessler, D. (1999). Evidence for Cysteine Persulfide as Reaction Product of L-Cyst(e)ine C-S-Lyase (C-DES) from *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* **274**(1), 189-195.
- Laskowski, R. A., McArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK - A Programm to che check the stereochemical Quality of Protein Structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291.
- Leibrecht, I. & Kessler, D. (1997). A Novel L-Cysteine/Cystine C-S-Lyase Directing [2Fe-2S] Cluster Formation of *Synechocystis* Ferredoxin. *J. Biol. Chem.* **272**(16), 10442-10447.
- Leong-Morghenthaler, P., Oliver, S. G., Hottinger, H. & Söll, D. (1994). A *Lactobacillus nifs*-like gene suppresses an Escherichia coli transaminase B mutation. *Biochimie* **76**, 45-49.
- Leslie, A. G. W. (1998). MOSFLM 6.0 edit., Cambridge, U.K.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.* **189**, 1-23.
- Mehta, P. K. & Christen, P. (1993). Homology of pyridoxal-5'-phosphate-dependent aminotransferases with the *cobC* (cobalamin synthesis), *nifs* (nitrogen fixation), *papC* (p-aminobenzoate synthesis) and *malY* (abolishing

- endogenous induction of the maltose system) gene products. *Eur. J. Biochem.* **211**, 373-376.
- Merchant, S. & Dreyfuss, B. W. (1998). Posttranslational assembly of photosynthetic metalloproteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 25-51.
- Merritt, E. A. & Murphy, M. E. P. (1994). Raster3D Version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics. *Acta Cryst.* **D50**, 869-873.
- Mihara, H., Hurihara, T., Yoshimura, T. & Esaki, N. (2000). Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from *Escherichia coli*: Mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reaction. *J. Biochem.* **127**, 559-567.
- Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., Soda, K. & Esaki, N. (1997). Cysteine Sulfinate Desulfurase, a NIFS-like Protein of *Escherichia coli* with Selenocysteine Lyase and Cysteine Desulfurase Activities. *J. Biol. Chem.* **272**(36), 22417-22424.
- Mihara, H., Maeda, M., Fujii, T., Kurihara, T., Hata, Y. & Esaki, N. (1999). A *nifS*-like Gene, *csdB*, Encodes an *Escherichia coli* Counterpart of Mammalian Selenocysteine Lyase. *J. Biol. Chem.* **274**(21), 14768-14772.
- Nakai, Y., Yoshihara, Y., Hayashi, H. & Kagamiyama, H. (1998). cDNA cloning and characterization of mouse *nifS*-like protein, m-Nfs1: mitochondrial localization of eucaryotic NifS-like proteins. *FEBS Lett.* **433**, 143-148.
- Nelson, K. E., R.A., C. & Gill, S. R. e. a. F., C.M. (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**, 323-329.
- Ouzounis, C. & Sander, C. (1993). Homology of the NifS family of proteins to a new class of pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *FEBS Lett.* **322**(2), 159-164.

- Patzner, S. I. & Hantke, K. (1999). SufS Is a NifS-Like Protein, and SufD Is Necessary for Stability of the [2Fe-2S] FhuF Protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**(10), 3307-3309.
- Rossman, M. G. & Blow, D. M. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.* **15**, 24-31.
- Sandmeier, E., Hale, T. I. & Christen, P. (1994). Multiple evolutionary origin of pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid decarboxylases. *Eur. J. Biochem.* **221**, 997-1002.
- Schnackerz, K. D., Tai, C.-H., Simmons, J. W. I., Jacobson, T. M., Rao, G. S. J. & Cook, P. F. (1995). Identification and Spectral Characterization of the External Aldimine of the O-Acetylserine Sulfhydrylase Reaction. *Biochemistry* **34**, 12152-12160.
- Siegel, L. M. (1965). A Direct Microdetermination for Sulfide. *Analyt. Biochem.* **11**, 126-132.
- Stout, G. H. & Jensen, L. H. (1989). *X-ray structure determination*, John Wiley, New York.
- Turk, D. (1996). *Proceedings from the 1996 meeting of the International Union of Crystallography Macromolecular Macromolecular Computing School*.
- Yuvaniyama, P., Agar, J. N., Cash, V. L., Johnson, M. K. & Dean, D. R. (2000). NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(2), 599-604.
- Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H. & Dean, D. R. (1998). Assembly of Iron-Sulfur Clusters. *J. Biol. Chem.* **273**(21), 13264-13272.
- Zheng, L. & Dean, D. R. (1994). Catalytic Formation of a Nitrogenase Iron-Sulfur Cluster. *J. Biol. Chem.* **269**(29), 18723-18726.
- Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L. & Dean, D. R. (1994). Mechanism for the Desulfurization of L-Cysteine Catalyzed by the *nifS* Gene Product. *Biochemistry* **33**, 4714-4720.

- Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F. & Dean, D. R. (1993). Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2754-2758.
- Zhou, J., Hu, Z., Münck, E. & Holm, R. H. (1996). The Cuboidal Fe₃S₄ Cluster: Synthesis, Stability and Geometric and Electronic Structures in a Non-Protein Environment. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 1966-1980.