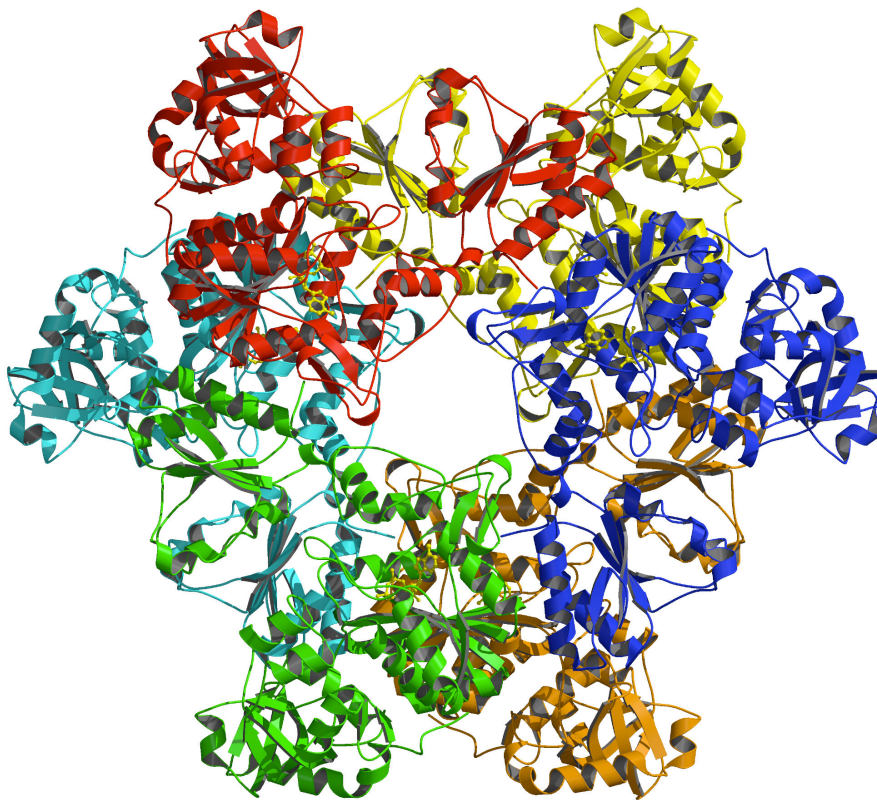


**Isolierung, Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse
der ATP-Sulfurylase aus *Saccharomyces cerevisiae***



Tobias Ullrich

Max-Planck-Institut für Biochemie

Abteilung Strukturforschung

D-82152 Martinsried

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

**Isolierung, Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse
der ATP-Sulfurylase aus *Saccharomyces cerevisiae***

Tobias Ullrich

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. Prof. Dr. H. Schmidbaur

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huber
2. Univ. Prof. Dr. J. Buchner
3. Univ. Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Die Dissertation wurde am 20.09.2001 bei der
Technischen Universität München eingereicht und durch
die Fakultät für Chemie am 13.11.2001 angenommen.

*Meiner Familie, mit
Chilja und Dweena*

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1998 bis November 2001 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Robert Huber in der Abteilung Strukturforschung des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried bei München durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Robert Huber für die großzügige Förderung dieser Arbeit und sein fortwährendes Interesse am Fortschritt dieses Projekts. Sein Vertrauen und die wissenschaftliche Freiheit, die er mir während der Zeit hier gewährt hat, haben sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Michael Groll danke ich für die intensive Betreuung und seine stete Diskussionsbereitschaft, die mir in der Anfangsphase dieser Doktorarbeit mehrmals die Höhen und Tiefen des wissenschaftlichen Arbeitens gezeigt haben, wobei ich aber – nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht – sehr viel gelernt habe. Die Zeit damals war oft nicht sehr einfach, aber auch sehr spannend und lehrreich.

Herrn Michael Blaesse gilt mein spezieller Dank für seine großzügige Unterstützung und seinen Beistand in allen computertechnischen und vor allem kristallographischen Fragen, als es an die nicht einfache Strukturlösung der ATP-Sulfurylase ging. Nicht nur durch seine außerordentliche Hilfsbereitschaft, sondern auch durch viele fruchtbare und anregende Diskussionen hat er wesentlich zum Gelingen dieses Projekts beigetragen.

Herrn Dr. Jens Kaiser möchte ich für seine exzellente Einführung in die ersten Schritte der Kristallographie und bei ersten Phasierungsversuchen danken, ebenso Herrn Dr. Hans-Georg Beisel, der nicht nur als großer Meister von SHARP beim MAD-Phasieren seine Dienste anbot, sondern auch versiert bei der Modellierung des Substratkomplexes assistierte.

Für die außerordentliche Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung aller Kollegen in der Arbeitsgruppe möchte ich an dieser Stelle meinen Dank äußern. Sie geht weit über die übliche Kollegialität hinaus und beeindruckt mich nach mehr als drei Jahren immer noch sehr und macht für mich einen großen Teil der exzellenten Arbeitsatmosphäre aus.

Mein Dank gilt vor allem der „Besatzung des Kinderzimmers“, den werten Herren Rainer Friedrich, John Richardson, Martin Augustin, Michael Blaesse, Pablo Fuentes-Prior, Rasso Willkomm, Michael Engel, Michael Groll, und Norman Kairies sowie Frau Sozanne Solmaz, mit denen ich manch heitere Stunde in diesem ehrenwerten Haus verbringen durfte.

Weiterhin danke den Laborkollegen Matthias Bochtler, Traudl Wenger, Thomas Steiner, Claudia Hartmann, Iris Fritze, Ravishankar Ramachandran, Hyun Kyu Song, Pablo Fuentes-Prior, Petra Birle, Tatjana Krywcun, Marina Rubini, Erich Fritsche und Arne Ramsberger für die meistens sehr positive und motivierende Laboratmosphäre, die die Stunden im Labor K302/303 sehr kurzweilig erscheinen ließen.

Frau Renate Rüller und Frau Gina Beckmann danke ich für ihre immerwährend freundliche Hilfe im Sekretariat. Sie haben manche bürokratische Hürde aus dem Weg geräumt und waren die „guten Seelen“ des Instituts bei vielen Fragen und Anliegen.

Den Herren Werner Dersch und Ottmar Paul danke ich für ihre Hilfe in praktischen und technischen Fragen, ihr Einsatz bewahrte oft genug das Institut in technischer Hinsicht vor dem Stillstand.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. Hans Bartunik und Herrn Dr. Gleb Bourenkow für die gute Unterstützung bei den Aufenthalten am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg.

Schließlich gilt mein Dank allen hier ungenannten Arbeitskollegen und vor allem den Freunden, die ich hier gewonnen habe, durch die diese Arbeit und die gesamte Zeit hier in München zu einer besonderen Erfahrung in meinem Leben wurde.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Bedeutung des Schwefels in lebenden Organismen	3
2.2. Sulfataktivierung und Transsulfuration	4
2.3. ATP-Sulfurylase	6
2.4. ATP-Sulfurylase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
2.5. Biologische Bedeutung der bifunktionellen PAPS-Synthetase	13
2.6. Zielsetzung der Arbeit	16
3. Materialien und Methoden	17
3.1. Materialien und Geräte	17
3.1.1. Chemikalien	17
3.1.2. Geräte	17
3.2. Mikrobiologische Methoden	18
3.2.1. Arbeiten mit Hefezellen	18
3.2.1.1. Fermentation von <i>S. cerevisiae</i>	18
3.2.1.2. Zellernte	18
3.3. Isolierung und Charakterisierung der ATP-Sulfurylase	19
3.3.1. Aufschluß der Hefezellen	19
3.3.2. Proteinpräparation mittels Säulenchromatographie	19
3.3.2.1. Q-Sepharose FF – Ionenaustauschchromatographie	19
3.3.2.2. Hydroxylapatit (HA) – Affinitätschromatographie	19
3.3.2.3. Red Agarose – Affinitätschromatographie	20
3.3.2.4. Superose 6-FPLC – Gelfiltrationschromatographie	21
3.3.3. Proteinnachweis durch Gelelektrophorese	21
3.3.3.1. Proteinfällung	21
3.3.3.2. PAGE unter denaturierenden Bedingungen	22
3.3.3.3. PAGE unter nativen Bedingungen	23
3.3.4. Blotting	23
3.3.5. Proteinfärbung	24
3.3.5.1. Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	24
3.3.5.2. Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen	24
3.3.6. Bestimmung der Proteinkonzentration	25
3.3.6.1. nach Lowry	25
3.3.6.2. nach Bradford	25
3.3.6.3. durch Absorptionsmessung	26
3.3.7. Sequenzanalyse	26

3.4. Kristallisation und Strukturlösung	27
3.4.1. Proteinkristallisation	27
3.4.1.1. Proteinkristallisation durch Dampfdiffusion	28
3.4.1.2. Durchführung	29
3.4.1.3. <i>Soaking</i> -Experimente	29
3.4.2. Kristallaufbau	30
3.4.3. Beugung von Röntgenstrahlen an Proteinkristallen	31
3.4.4. Montieren von Proteinkristallen	34
3.4.5. Röntgenbeugungsexperimente	35
3.4.6. Datensammlung und Datenreduktion	35
3.4.7. Bestimmung des Lösungsmittelgehalts von Proteinkristallen	37
3.4.8. Die Lösung des Phasenproblems	37
3.4.9. Strukturlösung mittels Multiplen Isomorphen Ersatzes (MIR)	38
3.4.9.1. Derivat-Suche	38
3.4.9.2. Differenz-Patterson-Analyse und MIR-Phasierung	38
3.4.10. Strukturlösung mittels Multipler Anomaler Dispersion (MAD)	40
3.4.11. Strukturlösung durch Molekularen Ersatz	41
3.4.11.1. Grundlagen des Molekularen Ersatzes	41
3.4.11.2. Durchführung	42
3.4.12. Modifikation der Elektronendichte	42
3.4.13. Modellbau und Verfeinerung	43
3.4.13.1. Modellbau – Erstellung des Strukturmodells	43
3.4.13.2. Phasenkombination	43
3.4.13.3. Verfeinerung	44
3.5. <i>Molecular Modelling</i>	45
3.6. Graphische Darstellungen	45
4. Ergebnisse	47
4.1. Proteinreinigung	47
4.2. Kristallisation	49
4.3. Datensammlung	50
4.4. Strukturlösung mittels Multipler Anomaler Dispersion	52
4.5. Strukturlösung mittels Multiplen Isomorphen Ersatzes	53
4.6. Strukturlösung mittels Molekularen Ersatzes	53
4.7. Modellbau und Verfeinerung	54
4.8. Strukturanalyse der ATP-Sulfonylase	55
4.8.1. Architektur des Komplexes	55
4.8.2. Struktur des Protomers	57
4.8.2.1. N-terminale Domäne	57
4.8.2.2. <i>Active site</i> -Domäne	58
4.8.2.3. Intermediäre Domäne	59
4.8.2.4. C-terminale Domäne	60

4.8.2.5. Intra- und Interringkontakte/Metallbindungsstellen	61
4.9. Das aktive Zentrum und Nukleotidbindung	65
4.9.1. Native Struktur	65
4.9.2. Nukleotidbindung – Der binäre Produktkomplex	67
4.9.3. Ternärer Produktkomplex	69
4.9.4. „ <i>induced fit</i> “ – der <i>displacement</i> Mechanismus	70
4.9.5. Konservierte Motive	73
4.9.6. Modellierter Substratkomplex	75
4.9.7. Katalytischer Mechanismus und Stereoselektivität	77
4.10. Inhibitor Komplexe	79
4.10.1. Komplex mit Thiosulfat	79
4.10.2. Komplex mit ADP	81
4.10.3. Komplex mit Chlorat	84
5. Diskussion	88
5.1. Proteinpräparation und Strukturlösung	88
5.1.1. Fermentation, Isolierung und Charakterisierung	88
5.1.2. Kristallisation	89
5.1.3. Strukturlösung durch MIR	90
5.1.4. Strukturlösung durch Molekularen Ersatz	90
5.2. Vergleich mit verwandten Nukleotidyltransferasen	91
5.2.1. Vergleich mit GCT, Glutaminyl-tRNA-Synthetase, PPAT und NMNAT	92
5.2.2. Aktives Zentrum, Nukleotidbindung und katalytischer Mechanismus	95
5.3. Vergleich mit ATP-Sulfurylase aus <i>P. chrysogenum</i>	97
5.3.1. Gesamtstruktur	97
5.3.2. Nukleotidbindung und aktives Zentrum	100
5.3.3. Komplexarchitektur und Bifunktionalität	101
5.4. Produkt- und Inhibitor Komplexe verdeutlichen den Katalysezyklus	103
5.5. Ausblick	105
6. Literaturverzeichnis	106
7. Anhang	114
10.1. Abkürzungen	114

1. Zusammenfassung

ATP-Sulfurylase ist das erste in einer Kaskade von Enzymen, die im Stoffwechselweg der Sulfataktivierung die intrazelluläre Aktivierung und den Einbau von Sulfat in organische Komponenten katalysieren. Nach der Aufnahme von Sulfat in die Zelle wird dieses durch die ATP-Sulfurylase mit ATP zu Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) und Pyrophosphat umgesetzt. Dieses „aktivierte Sulfat“ wird dann nach enzymatischer 3'-Phosphorylierung durch die APS-Kinase zu PAPS stufenweise zu Sulfid reduziert und in organische Moleküle eingebaut oder zur enzymatischen Sulfatisierung einer Vielzahl von Biomolekülen verwendet. In vielen chemotropen und prototrophen Mikroorganismen dient die ATP-Sulfurylase zur Herstellung des lebensnotwendigen ATP. Damit spielt die ATP-Sulfurylase in vielen Organismen vom anaeroben Bakterium bis zum Mensch nicht nur in der Biosynthese von schwefelhaltigen Molekülen wie z.B. Aminosäuren, Kohlehydraten oder Hormonen, sondern auch im gesamten Schwefelstoffwechsel eine wichtige Rolle.

Die in dieser Arbeit ermittelte dreidimensionale, atomare Struktur der ATP-Sulfurylase aus *Saccharomyces cerevisiae* ist die erste Kristallstruktur eines Vertreters der Familie der ATP-Sulfurylasen überhaupt. Das Enzym wurde nativ aus Bäckerhefe isoliert, charakterisiert und mit den erhaltenen trigonalen Kristallen die Struktur des Apoenzyms bei einer Auflösung von 1,95 Å unter Verwendung der Methode des Multiplen Isomorphen Ersatzes (MIR) gelöst. ATP-Sulfurylase ist ein scheibenförmiger Enzymkomplex aus sechs identischen Untereinheiten, die in zwei Trimerenringen gegeneinander angeordnet und durch die D₃-Symmetrie der Raumgruppe R₃₂ miteinander verwandt sind. Das Protomer zeigt eine U-förmige Silhouette und läßt sich in vier Domänen einteilen, von denen drei charakteristische Faltungstypen aufweisen. Neben der ein β -barrel beinhaltenen Domäne I und der Kinase-ähnlichen Faltung der C-terminalen Domäne IV zeigt die Domäne II den typischen Dinukleotid-Faltungstyp der Superfamilie der Nukleotidyltransferasen. Bei einer starken strukturellen Übereinstimmung mit diesen verwandten α/β -Phosphodiesterasen beherbergt Domäne II auch das aktive Zentrum des Enzyms, das trotz der analogen Architektur der Domäne einen vollkommen neuen und einzigartigen Nukleotidbindungsmodus mit eigenständigen und hoch konservierten Bindungsmotiven aufweist. Die Aufklärung des binären und des ternären Enzym-Produktkomplexes E•APS und E•APS•PP_i erbrachte Hinweise auf einen mit den Nukleotidyltransferasen vergleichbaren Reaktionsmechanismus, der nukleophilen Substitution mit stereochemischer Inversion am α -Phosphor des ATP. Die Bindungsart von ATP wurde durch Vergleich mit strukturell eng verwandten Nukleotidyltransferasen durch Modellierungsex-

perimente abgeleitet. Mit Hilfe von Enzym-Inhibitor-Komplexen, z.B. mit ADP oder Chlorat, konnte dabei das schon bei den Produktkomplexen beobachtete Auftreten eines mit einem *induced fit* kombinierten *displacement*-Mechanismus' bestätigt werden, der bei Nukleotidbindung drastische Konformationsänderungen von einigen wenigen Aminosäuren im aktiven Zentrum auslöst und zu strukturellen Verschiebungen ganzer Domänen innerhalb des Protomers führt. Dieser Substraterkennungs- und aktivierungsmechanismus scheint ein essentielles Element für den Katalysezyklus der ATP-Sulfurylase zu sein und ist in homologen Enzymen z.B. aus *P. chrysogenum* erhalten. Untersuchungen an diesen verwandten Enzymen zeigen, daß er möglicherweise im Zusammenhang mit weitreichenderen, allosterischen Effekten zur Regulation der Enzymaktivität steht.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

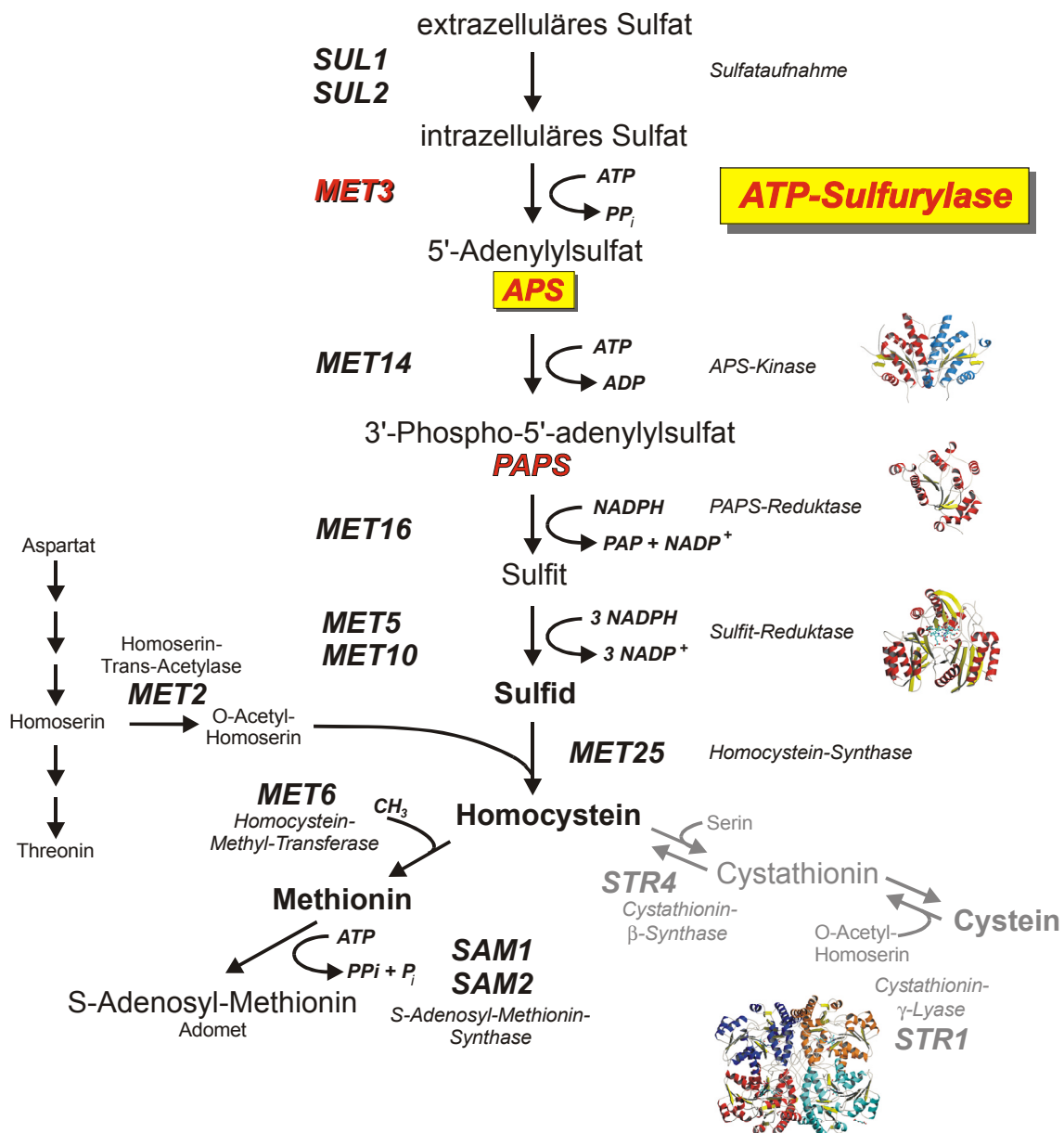
Ullrich, T.C., Blaesse, M. and Huber, R. (2001) Crystal structure of ATP sulfurylase from *Saccharomyces cerevisiae*, a key enzyme in sulfate activation. *EMBO J.*, **20**, 316-29.

Ullrich, T.C. and Huber, R. (2001) The complex structures of ATP sulfurylase with thiosulfate, ADP and chlorate reveal new insights in inhibitory effects and the catalytic cycle. *J. Mol. Biol.*, **313**, 1117-1125.

Je nach Organismus spielt der Schwefel in verschiedenen Stoffwechselwegen (Schema 1) in einer Vielzahl von Verbindungen und Oxidationsstufen eine wichtige Rolle. Er tritt dabei frei entweder als gelöstes Sulfat, Thiosulfat oder als Sulfid, oder in gebundener Form als Sulfates-ter (z.B. Heparansulfat oder Östrogensulfat) oder Sulfonate, in Cofaktoren wie Biotin oder Thiamin, in den Coenzymen A und M, in Liponsäure oder in anderen schwefelhaltigen organischen Molekülen (z.B. Homocystein) in Erscheinung. Auch für die Biosynthese der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin ist Schwefel ein wichtiger Baustein. Im Cystein zum Beispiel dient die freie Sulfhydrylgruppe zum Aufbau der Tertiärstruktur von Proteinen durch Bildung von kovalenten Verbrückungen (Cystin-Brücken) oder zur Komple- xierung von Metallen (z.B. Zink, Nickel, Cobalt, Kupfer, Molybdän). Methionin, das für Menschen und andere Säugetiere essentiell ist, ist vor allem als N-terminale Aminosäure für die Initiation der Proteinbiosynthese von entscheidender Bedeutung. Darüber hinaus ist es die Vorstufe für S-Adenosyl-Methionin (SAM/Adomet), das als universeller Methylgruppen- Donor eine zentrale Schlüsselrolle im Methylzyklus und im Methylthioadenosinzyklus ein- nimmt. Daneben dient Schwefel zum Aufbau von Eisen-Schwefel-Clustern in Enzymen, die im Elektronentransport oder in Redox-Prozessen beteiligt sind.

2.2. Sulfataktivierung und Transsulfuration

Bis auf eine geringe Anzahl von Mikroorganismen können Lebewesen elementaren Schwefel nicht aufnehmen und metabolisch umsetzen. Die primäre Quelle für biologisch zugänglichen Schwefel ist deshalb für fast alle lebenden Organismen das zweifach negativ geladene Sulfat- Ion. Mit einer Oxidationsstufe von +6 am Schwefel ist dieses Molekül allerdings sehr stabil und reaktionsträge, so daß die direkte Reaktion von in Wasser gelöstem Sulfat mit anderen Substraten in der Zelle nicht möglich ist. Der Schwefel muß erst „aktiviert“, d.h. in eine redu- zierte und damit reaktivere Form überführt werden, damit er zur weiteren metabolischen Um- setzung geeignet ist. Dies geschieht im Stoffwechselweg der Sulfataktivierung, der in den assimilatorischen Organismen ein wichtiger Bestandteil der Methionin/Cystein-Biosynthese ist. Die assimilatorische Sulfataktivierung als Quelle von reduziertem Schwefel für die Syn- these von Methionin, Cystein und weiteren schwefelhaltigen Metaboliten ist im folgenden Schema am Beispiel der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* exemplarisch dargestellt (Schema 2).



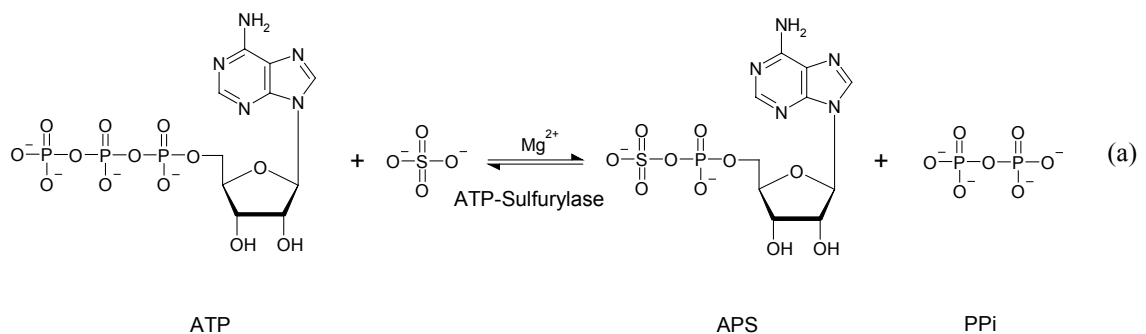
Schema 2: Stoffwechselwege der Schwefelaktivierung und der Methionin/Cystein-Biosynthese in *S. cerevisiae* (Thomas and Surdin-Kerjan, 1997), mit *ribbon*-Modellen der bis heute bekannten Strukturen. Als erstes katalytisch aktives Enzym nimmt die ATP-Sulfurylase eine Schlüsselposition ein. Der Stoffwechselweg der Transsulfuration ist in grau dargestellt.

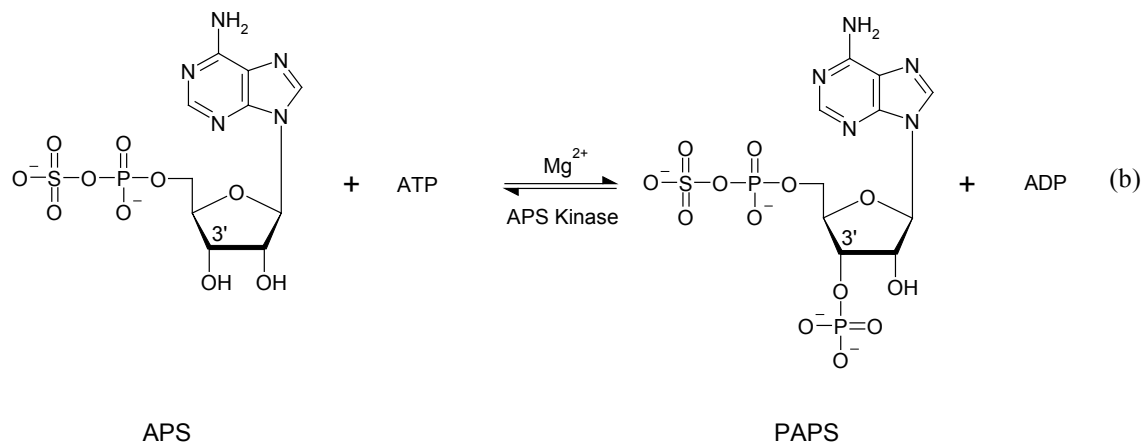
Die Aufnahme in die Zelle erfolgt durch in der Zellmembran lokalisierte Transporterenzyme, sogenannte Sulfatpermeasen (*SUL*). In der darauffolgenden Kaskade wird das Sulfat erst durch ATP-Sulfurylase und APS-Kinase (MacRae *et al.*, 2000b) aktiviert und dann schrittweise durch PAPS-Reduktase (Savage *et al.*, 1997) und Sulfite Reduktase (Crane *et al.*, 1995) zum zweifach negativen Sulfid reduziert. Die Aktivierung und Expression dieser unabhängig

katalytisch aktiven Enzyme wird in der Zelle über ein kompliziertes System von Genen auf Transkriptionsebene reguliert (Übersichtsartikel siehe: Marzluf, 1997; Thomas and Surdin-Kerjan, 1997). Erst das Sulfid ist dann ausreichend reaktiv und nukleophil, um mit O-Acetylserin enzymatisch zu Homocystein umgesetzt zu werden. Homocystein schließlich stellt die zentrale Vorstufe für die enzymkatalysierte Synthese der Aminosäuren Methionin und Cystein sowie des Methylierungs-Agens S-Adenosyl-Methionin (SAM/Adomet) dar. Der biologische Prozeß der Schwefelübertragung von Homocystein über Cystathionin auf Cystein wird Transsulfuration (Schema 2) genannt. In Pflanzen und Bakterien wird dagegen das meiste APS direkt durch APS-Reduktase und Sulfid Reduktase zu Sulfid reduziert. Die Synthese von Methionin verläuft hier über Cystein, das durch Kondensation von O-Acetylserin mit freiem Sulfid hergestellt wird. Cystein ist hier der wichtigste Vorläufer aller organischen, schwefelhaltigen Moleküle, z.B. von Peptiden wie Glutathion oder Phytochelatine, von Proteinen, Vitaminen, Kofaktoren und Hormonen, und wird erst dann weiter zu Cystathionin, Homocystein und schließlich zu Methionin und SAM umgesetzt (Hesse *et al.*, 2001; Hofgen *et al.*, 2001).

2.3. ATP-Sulfurylase

Die ubiquitär verbreitete ATP-Sulfurylase (Adenylylsulfuryltransferase/ ATP:Sulfat-Adenylyltransferase; E.C. 2.7.7.4) nimmt eine zentrale Rolle in dieser Aufeinanderfolge von Proteinen ein, die zur Aktivierung und metabolischen Umsetzung von Sulfat in der Zelle dienen. ATP-Sulfurylase katalysiert den ersten Schritt der Sulfataktivierung, die Synthese von Adenylylsulfat. Eine vereinfachte Darstellung dieser Reaktion ist in Schema 3a gegeben. ATP reagiert in einer Substitutionsreaktion mit einem Sulfatmolekül zu Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) und anorganischem Pyrophosphat (PP_i).





Schema 3: Das Reaktionsschema zeigt vereinfacht: (a) die von der ATP-Sulfurylase katalysierte Substitutionsreaktion, die Bildung von APS aus ATP und Sulfat mit PP_i als Austrittsgruppe und in (b) die von der APS-Kinase katalysierte Folgereaktion, die Bildung von PAPS aus einem Äquivalent APS und ATP.

APS ist aufgrund seiner reaktiven, gemischten Phosphor-/Schwefelsäureanhydrid-Bindung ($\Delta G = -19 \text{ kcal/mol}$) ein relativ instabiles Molekül. Es wird in einem zweiten Reaktionsschritt (Schema 3b) nochmals umgesetzt. Es wird durch die im Stoffwechselweg direkt auf die ATP-Sulfurylase folgende APS-Kinase weiter mit ATP zu PAPS (3'-Phosphoadenosyl-3'-phosphosulfat) umgesetzt. Diese 3'-Phosphorylierung der Ribosyleinheit des APS führt zu einer weiteren Aktivierung des Schwefels. Während in Pilzen, Hefen und den meisten Bakterien nur PAPS das Substrat für die NADPH-abhängige Reduktion zu Sulfid ist, spielt es in höheren Organismen wie Pflanzen und Säugetieren in der Sulfatester-Biosynthese eine weit umfassendere Rolle, die mit der von ATP in der Aktivierung von Biomolekülen durch Phosphorylierung verglichen werden kann. In dissimilatorischen, sulfatreduzierenden Bakterien wie z.B. der Spezies *Desulfovibrio* oder *Archäoglobus fulgidus* (Gavel *et al.*, 1998; Sperling *et al.*, 1998) hingegen erfüllt die ATP-Sulfurylase neben der Aminosäurebiosynthese eine zweite wichtige Aufgabe in der anaeroben Atmungskette: Das gebildete APS wird direkt durch die APS-Reduktase zu AMP und Sulfid und durch die Sulfid Reduktase zu Sulfid reduziert. In einigen chemoautotrophen und prototrophen Bakterien andererseits katalysiert die ATP-Sulfurylase mit der Synthese des für die Zellen lebensnotwendigen ATP auch die Rückreaktion der Sulfataktivierung (Renosto *et al.*, 1991).

Neben verschiedenen bakteriellen sind in den letzten Jahren auch ATP-Sulfurylasen aus höheren Organismen wie Hefe, Pilzen, Pflanzen (Renosto *et al.*, 1993) Würmern (Rosenthal and Leustek, 1995) und Säugetieren (Li *et al.*, 1995; Venkatachalam *et al.*, 1998) molekularbiolo-

gisch und biochemisch untersucht und näher charakterisiert worden. Gemeinsame Merkmale konnten nur in bestimmten Sequenzbereichen, nicht aber in ihrem dreidimensionalen Aufbau und ihrer Funktionalität festgestellt werden. In Bakterien wie *E. coli* K-12 ist die ATP-Sulfurylase ein Tetramer aus Heterodimeren mit einem Molekulargewicht von 390 kDa. Jedes Heterodimer des Enzyms besteht aus zwei Untereinheiten unterschiedlicher Sequenz und Größe, CysD und CysN, die zusammen die Sulfataktivierung bewerkstelligen (Leyh *et al.*, 1988). Die Untereinheit CysN (53 kDa) verfügt dabei über GTPase-Aktivität und reguliert die Aktivität der katalytischen Untereinheit CysD (23 kDa) durch allosterische Wechselwirkungen (Wei and Leyh, 1998; Wei and Leyh, 1999; Wei *et al.*, 2000). In den oben angeführten sulfatreduzierenden Bakterien wird die ATP-Sulfurylase hingegen als homodimeres (Sperling *et al.*, 1998) oder homotrimeres (Gavel *et al.*, 1998) Partikel beschrieben, das wie bei Hefen, Pilzen und höheren Organismen kein GTP zur Aktivierung benötigt.

Während bei diesen Organismen die ATP-Sulfurylase vor allem proteinchemisch und auf ihre biologische Funktion und Bedeutung hin untersucht worden war, ist vor allem das Enzym aus *P. chrysogenum* das Ziel extensiver biochemischer und funktioneller Untersuchungen gewesen (Farley *et al.*, 1976; Seubert *et al.*, 1979). Neben der proteinchemischen Bestimmung des Molekulargewichts und des Oligomerisierungsgrads wurde durch vielfältige kinetische Studien hier nicht nur versucht, Substratbindemotive und den Mechanismus der Sulfurylierungsreaktion aufzuklären, sondern auch die Wirkung und Effizienz von kovalenten und kompetitiven Inhibitoren zu analysieren. Auf diese Weise wurde bei dem Enzym eine allosterische PAPS-Bindestelle gefunden, die durch die Koordination von PAPS, einem allosterischen Inhibitor, die ATP-Sulfurylase-Aktivität reduziert (MacRae *et al.*, 2000a; Renosto *et al.*, 1987). Zudem haben diese Untersuchungen gezeigt, daß auch im Hefeenzym sowohl APS als auch Pyrophosphat kompetitiv mit ATP und Sulfat die Reaktivität der ATP-Sulfurylase herabsetzen und damit bei größeren Umsätzen eine nicht unwesentliche Produktinhibition stattfindet.

2.4. ATP-Sulfurylase aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die ATP-Sulfurylase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird durch das Gen *MET3* auf Chromosom X kodiert und hat pro Monomer 511 Reste und damit ein Molekulargewicht von ca. 58 kDa (Cherest *et al.*, 1987). Das Hefeenzym wurde erst vor kurzem als homooktameres Partikel beschrieben (Karamohamed *et al.*, 1999), obwohl biochemische Untersuchungen am Homologen der ATP-Sulfurylase aus *P. chrysogenum* bereits früher auf einen hexameren

Komplex hingedeutet hatten (Foster *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu den Nukleotidkinasen, die die Abspaltung des γ -Phosphats vom Nukleotid und dessen Transfer auf andere Substrate katalysieren, und den ATPasen wie z.B. der Familie der Chaperone, die durch Hydrolyse des γ -Phosphats von ATP Konformationsänderungen im Protein hervorrufen, besitzt die ATP-Sulfurylase α/β -Pyrophosphorylaseaktivität (Schema 3a) und läßt sich deshalb in die Superfamilie der α/β -Phosphodiesterasen (Pyrophosphorylasen, ATP-PPasen) einordnen. Die zusätzlich damit verbundene Adenylyltransferaseaktivität und das typische *HXXH*-Motiv in ihrer Aminosäuresequenz bringen sie in die familiäre Nähe zu den Nukleotidyltransferasen, deren typische Vertreter die Cytidylyltransferasen, z.B. aus *B. subtilis* (Park *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1999) und die Klasse I Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sind (Übersichtsartikel siehe: Cusack, 1997; Reshetnikova *et al.*, 1999). Diese Enzyme sind funktionell ausführlich charakterisiert und von vielen ist die dreidimensionale atomare Struktur bekannt. Sie spalten alle die α/β -Phosphodiesterbindung des Nukleotids und übertragen dabei gleichzeitig das Mononukleotid auf ein zweites Substrat.

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der ATP-Sulfurylasen aus verschiedenen pro- und eukaryontischen Spezies, so fällt zuerst auf, daß es in der Sulfurylase-Domäne keine signifikanten Gemeinsamkeiten zwischen *S. cerevisiae* und dem bakteriellen Homologen aus *E. coli* gibt, so daß die Anpassung funktionell äquivalenter Reste nicht gelingt. Ein Sequenzvergleich mit den Vertretern aus *S. cerevisiae*, dem Fadenpilz *P. chrysogenum*, aus der Maispflanze *Z. mays* (489 AS), den beiden Isoformen der PAPS-Synthetasen aus Mensch (624 AS) und Maus (614 AS) und dem Archebakterium *A. fulgidus* (456 AS) zeigt jedoch starke Übereinstimmungen über einen breiten Sequenzbereich (Abbildung 1). Die starke Homologie zum Fadenpilz ist aufgrund des nahen evolutionären Verwandtschaftsgrades nicht verwunderlich, doch ist deutlich erkennbar, daß diese nur für die ersten 400 Aminosäuren gilt. Denn trotz insgesamt 269 (63 %) identischer Reste sind beide Enzyme im C-terminalen Bereich sehr unterschiedlich, wobei diese Region im Pilzenzym nicht nur die Fähigkeit zur Bindung von PAPS, sondern auch noch 61 zusätzliche Reste besitzt. Damit weist diese Domäne eine beträchtliche Homologie zur im Stoffwechselweg nachfolgenden APS-Kinase auf (MacRae and Segel, 1997) und zu den APS-Kinase-Domänen der bifunktionellen PAPS-Synthetasen auf, ist aber katalytisch inaktiv. Die deutliche Homologie in der Primärsequenz beider Enzyme deutet auf gemeinsame Vorläufer in der Evolution hin bzw darauf hin, daß sich die Kinase-ähnlichen Domänen der ATP-Sulfurylasen aus der APS-Kinase entwickelt haben und aus einer gemeinsamen Urform eine divergente Entwicklung genommen haben könnten.

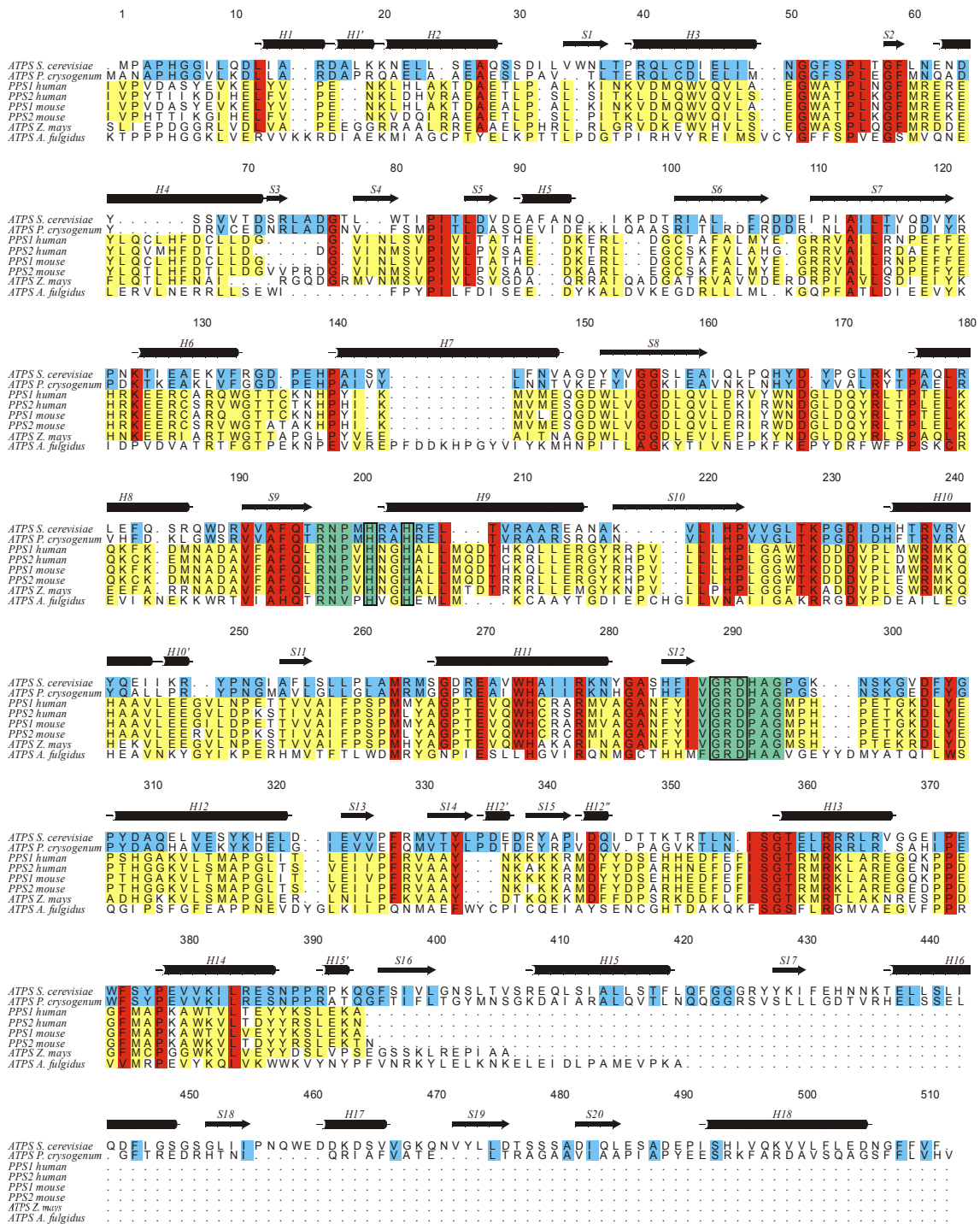


Abbildung 1: Sequenzvergleich der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* mit Homologen aus *P. chrysogenum*, *Z. mays*, *A. fulgidus* und den ATP-Sulfurylase-Domänen der zwei Isoformen der PAPS-Synthetase aus Maus und Mensch. Übereinstimmungen zwischen Hefe- und Fadenpilzsequenz sind blau, die zwischen Hefe und allen anderen Spezies in rot gekennzeichnet. Weniger konservierte Regionen sind gelb markiert. Die hoch konservierten RNP- und GRD-Motive sind grün hervorgehoben, die Histidine der HXXH-Box sind zusätzlich schwarz markiert. Die Sekundärstrukturelemente sind nach der in dieser Arbeit präsentierten Struktur abgeleitet.

Die Ähnlichkeit des Hefeenzym mit dem Homologen aus *Z. mays* und mit den bifunktionalen PAPS-Synthetasen ist mit bis zu 70 % sehr ausgeprägt, doch beschränkt sie sich auf die gemeinsame ATP-Sulfurylase-Domäne (Abbildung 1). Doch im Gegensatz zu den Fadenpilzen und den Hefen hat die Evolution bei den höheren Eukaryonten wie z.B. Maus und Mensch einen anderen Verlauf genommen und in einer Genfusion zwischen ATP-Sulfurylase und APS-Kinase gemündet, so daß diese Organismen keine separate APS-Kinase mehr besitzen. Doch im Gegensatz zu der C-terminalen, Kinase-ähnlichen Domäne der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* und *P. chrysogenum* verfügen diese bifunktionalen PAPS-Synthetasen neben der ATP-Sulfurylase-Domäne über eine weitere Domäne an deren N-Terminus, der echte APS-Kinase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Venkatachalam *et al.*, 1999). In Abbildung 2 ist der funktionelle Aufbau einiger bakterieller und eukaryontischer Enzyme mit ihrer katalytischen Aktivität und ihren regulatorischen Eigenschaften dargestellt.

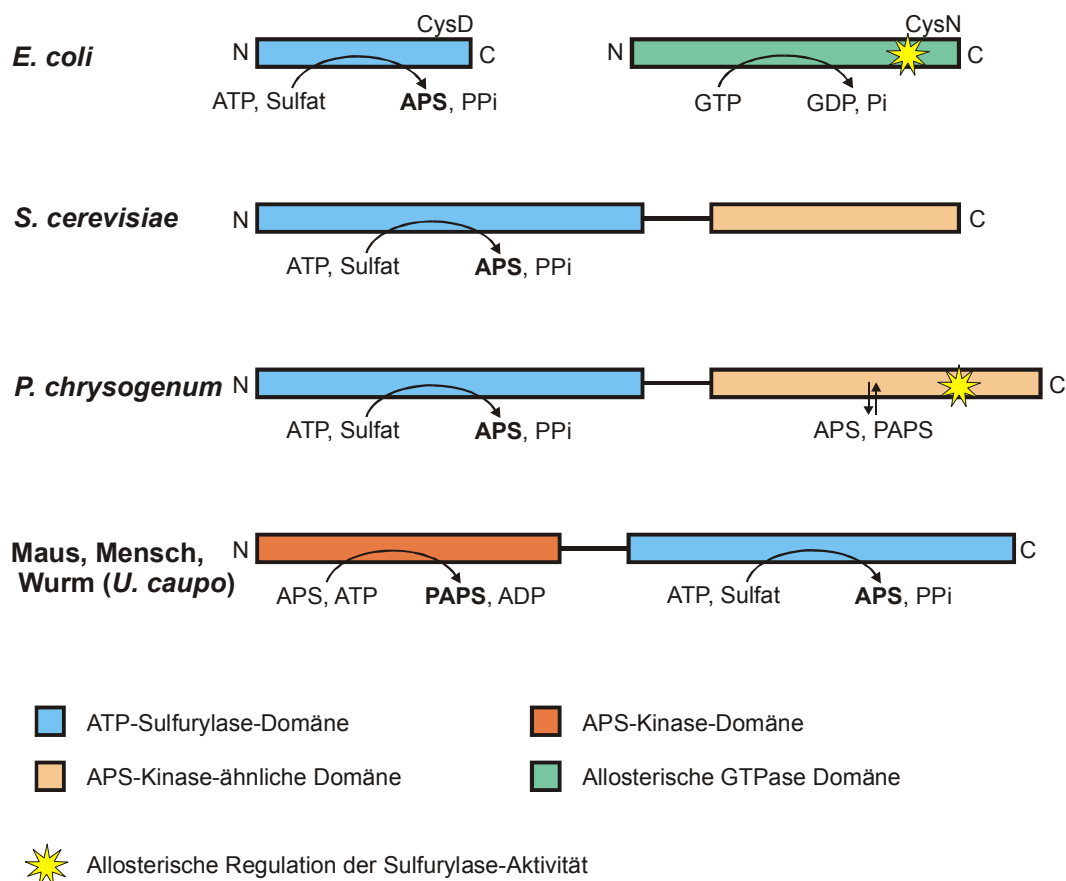


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Domänenorganisation in ATP-Sulfurylasen und PAPS-Synthetasen verschiedener prokaryontischer und eukaryontischer Spezies. Gezeigt ist auch die jeweilige enzymatische Aktivität und die möglichen allosterischen Regulationszentren.

Die C-terminalen Domäne der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* zeigt jedoch nur sehr geringe Sequenzhomologie zu den Kinase-Domänen der PAPS-Synthetasen. Die strikte Identität im überlagerten Bereich mit den beiden Isoformen dieser PAPS-Synthetasen von Maus und Mensch ist in beiden Fällen jeweils ca. 28 % und mit dem weniger nahe verwandten bakteriellen Enzym aus *A. fulgidus* immer noch 25 %. Trotz der unterschiedlich ausgeprägten Homologien verfügen die gezeigten Enzyme über einige Aminosäuremotive, die als Konsensussequenzen erhalten sind. Zum einen handelt es sich dabei um das schon erwähnte *HXXH*-Motiv der Nukleotidyltransferasen, das bei ATP-Sulfurylasen und bei PAPS-Synthetasen als HX(A)/GHXXL auftritt und zusätzlich noch ein konserviertes Leucin enthält (Leu207). Zudem geht bei allen Vertretern der *HXXH*-Box das streng konservierte ¹⁹¹VXAFQXRNP-, im folgenden auch *RNP-loop* genanntes, Motiv voraus. Ihm wird, ebenso wie dem zweiten Konsensusmotiv ²⁸⁸VGRDHAG (*GRD-loop*), einer glycinreichen Region ähnlich dem *PP-loop* anderer Nukleotidyltransferasen, eine wichtige Rolle in der Substratbindung zugesprochen. Dies konnte durch eine reduzierte Enzymaktivität beim Austausch von einzelnen Aminosäuren innerhalb dieser Motive gezeigt werden (Deyrup *et al.*, 1999). Positionsgerichtete Mutagenesestudien am *HXXH*-Motiv von Cytidyltransferasen (Park *et al.*, 1997) sowie Alanin-Austauschmutanten beider konservierter Histidine in PAPS-Synthetasen führten dagegen zur kompletten Inaktivierung des Enzyms (Deyrup *et al.*, 1999; Venkatachalam *et al.*, 1999) und deuteten damit schon die essentielle Bedeutung dieser Reste für den Reaktionsmechanismus an. Diese Feststellung wurde durch chemische Modifikationen durch kovalente Inhibitoren wie z.B. Diethylpyrocarbonat oder Phenylglyoxal, die an Histidine und Arginine binden und deren biologische Funktion blockieren, bestätigt (Deyrup *et al.*, 1999). Zusätzlich zu den bisher angeführten Motiven kann durch den Sequenzvergleich eine weitere hoch konservierte Region hervorgehoben werden. Das ³⁵⁶ISGTXXR-Motiv am Ende der Sulfurylase-Domäne fand bei den bisher durchgeführten biochemischen Studien und Sequenzvergleichen noch keine Beachtung. Da es sich aber nicht nur in den aufgeführten, sondern auch in den Sequenzen fast aller anderen bekannten ATP-Sulfurylasen ohne Abweichung wiederfindet, scheint ihm eine besondere Bedeutung zuzukommen, die aus den bisherigen Untersuchungen noch nicht ersichtlich ist.

2.5. Biologische Bedeutung der bifunktionellen PAPS-Synthetase

In höheren Eukaryonten wie z.B. Säugetieren, die ein Immunsystem, eine Blutgerinnungskaskade, einen Hormonstoffwechsel und einen vielseitig geregelten metabolischen Kreislauf besitzen, spielt PAPS eine wesentlich umfangreichere und wichtigere Rolle als in Bakterien oder einzelligen eukaryontischen Organismen (Abbildung 3A). PAPS dient in diesen Organismen nicht nur als endogenes Substrat für die Herstellung von Sulfid zur Biosynthese von Aminosäuren und deren metabolische Derivate, sondern wird hauptsächlich als universeller Sulfat-Donor verwendet. Die Sulfatisierung (O-Sulfonierung) von endogenen Biomolekülen nimmt eine Schlüsselrolle im Stoffwechsel ein. Sie dient der Biosynthese und Regulierung der Aktivität einer Vielzahl von Proteinen, Neurotransmittern (Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin), Proteoglycanen, Kohlenhydraten, Fetten und Hormonen (Steroide wie Testosteron, Östrogen und andere Corticoide).

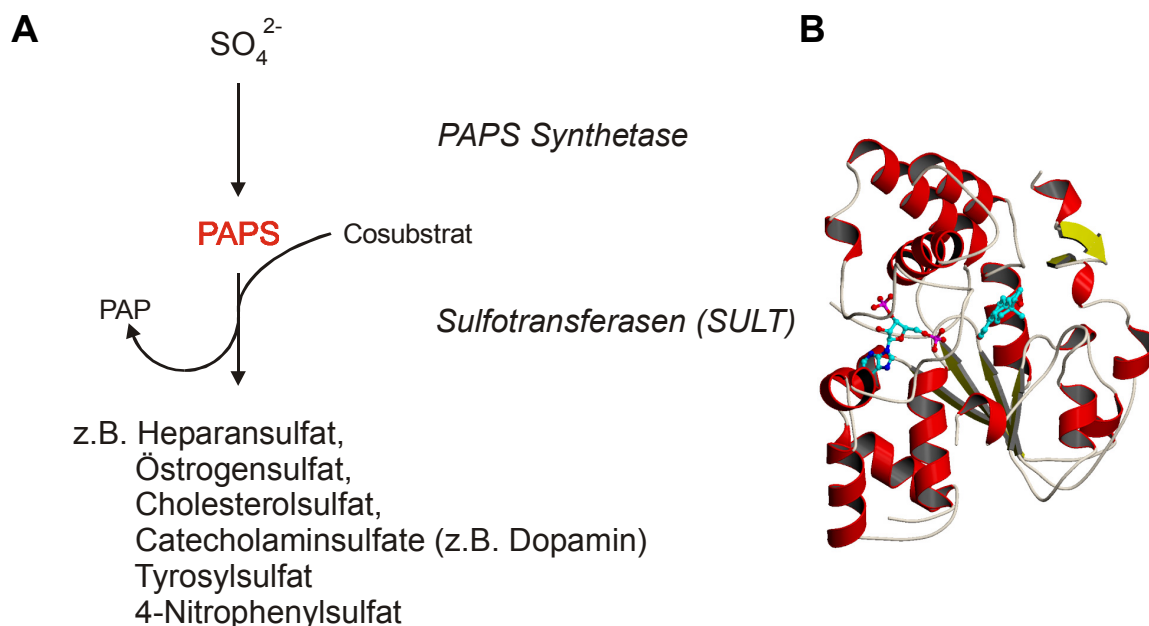


Abbildung 3: (A) Das System der Sulfatisierung. Nach der Aktivierung des Sulfats durch die PAPS-Synthetase wird die Synthese (und Hydrolyse) der Sulfatkonjugate durch die Sulfotransferasen (*SULT*) katalysiert. Diese treten entweder cytosolisch oder membrangebunden auf und lassen sich in zwei übergeordnete Familien (*SULT*1: Phenolsulfotransferasen; *SULT*2: Steroidsulfotransferasen) aufteilen. Die Abbildung (B) zeigt die Östrogensulfotransferase, einen typischen Vertreter der cytosolischen Sulfotransferasen (Kakuta, 1997).

So moduliert z.B. Heparansulfat, ein Proteoglycan auf der Oberfläche von Zellen, die Wirkung einer großen Anzahl von extrazellulären Liganden, die die Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen steuern, wirkt aber auch als Korezeptor für die Erkennung von mikrobiellen Pathogenen (Bernfield *et al.*, 1999). Die Sulfatisierung hat darüber hinaus wesentliche Bedeutung für die Deaktivierung und Detoxifizierung von xenobiotischen Substanzen wie z.B. Medikamenten, Umweltgiften und kanzerogenen Stoffen (Coughtrie *et al.*, 1998; Glatt, 2000). So werden viele karzinogene Moleküle, wie z.B. Benzpyrene, aromatische Amine und Amide, durch Sulfatisierung in weitaus besser wasserlösliche Produkte umgewandelt, so daß sie Zellmembranen nicht mehr durchdringen und besser ausgeschieden werden können (Glatt *et al.*, 2000). Das durch die bifunktionelle PAPS-Synthetase generierte PAPS wird durch verschiedene Sulfotransferasen (*SULT*), von denen bis heute 44 identifiziert werden konnten, mit dem jeweiligen Kosubstrat zu einem Sulfatester umgesetzt (O-Sulfonierung, Abbildung 3A). Cytosolische Sulfotransferasen (*SULT1A*) zeigen alle einen übereinstimmenden Aufbau. Sie bestehen aus zwei Domänen, von denen die größere aus einem parallelen, fünfsträngigen β -Faltblatt, das von Helices umgeben ist, und die kleinere, am C-Terminus gelegene nur aus zwei Helices besteht (Abbildung 3B).

Bis heute ist eine Anzahl von genetisch bedingten Erbkrankheiten bekannt, die auf Defekten in der Sulfatisierung beruhen (Glatt, 2000). Diese Effekte können einerseits in Zusammenhang mit genetischen Defekten stehen, die zu einer fehlerhaften Expression oder Aktivität von Sulfotransferasen führen, haben andererseits aber auch ihren Ursprung in ungenügender Versorgung mit PAPS. Dies ist dann auf eine Inaktivierung der PAPS-Synthetase zurückzuführen. So gibt es bei Mäusen den sog. *Brachymorphismus*, einer autosomal rezessiven Erbkrankheit, die auf einer Punktmutation im Gen der PAPS-Synthetase 2 beruht (Kurima *et al.*, 1998). Mäuse mit diesem Defekt haben eine normale Lebensspanne, jedoch zeigen sie abnormale Detoxifizierung, langsamere Blutgerinnung und postnatales Wachstum. Dieser Defekt im Knochenwachstum wird durch mangelhafte Zelladhäsion wegen zu geringer Produktion von Heparansulfat bedingt. Defekte Sulfatisierung betrifft weiterhin viele andere biologische Prozesse in der Zelle, so wie z.B. die Regulierung des Medikamentenstoffwechsels und der hormonellen Aktivität (Übersichtsartikel siehe: Coughtrie *et al.*, 1998; Rosen *et al.*, 1997).

In mehreren biochemischen Untersuchungen mit ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* und *P. chrysogenum* (Farley *et al.*, 1979; Farley *et al.*, 1976; Foster *et al.*, 1994) konnte gezeigt werden, daß die Bildung von APS aus ATP und anorganischem Sulfat sowohl *in vitro* als auch in

der Zelle durch eine Reihe von einfachen Molekülen inhibiert werden kann. Auf der einen Seite sind dies die schon oben erwähnten kovalenten Inhibitoren, wie z.B. Phenylglyoxal und Diethylpyrocarbonat, die selektiv an bestimmte Reste binden und deren Funktion in der Substratbindung und im Katalysemechanismus behindern. Andererseits gibt es Substanzen, die in der Lage sind, die physikalischen Eigenschaften der Substrate nachzuahmen, chemisch jedoch inaktiv sind. Sie binden an das Enzym und inhibieren die ATP-Sulfurylase-Aktivität im Wettstreit mit dem eigentlichen Substrat. Dies sind auf der einen Seite Analoga des ATP, z.B. ADP, AMP oder auch NADH, sowie anorganische Kleinmoleküle wie z.B. Thiosulfat, Vanadat, Nitrat, Chlorat oder Perchlorat, die mit Sulfat um einen Platz in der Bindetasche des Enzyms im Wettstreit stehen. In Säugern konnte beobachtet werden, daß der inhibierende Effekt z.B. von Chlorat zu einer wesentlich reduzierten PAPS-Synthese führt und so zur Unterdrückung der Proliferation und Replikation der Zelle durch eine Blockierung der Sulfatisierung von Proteoglycanen und Kohlenhydraten beiträgt (Greve *et al.*, 1988; Schriever *et al.*, 1997). Dieses Beispiel verdeutlicht den engen Zusammenhang zwischen der Kontrolle des Zellzyklus und der Regulation der ATP-Sulfurylase-Aktivität.

2.6. Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren gewannen ATP-Sulfurylasen aus den verschiedensten pro- und eukaryontischen Organismen in der Erforschung des biologischen Schwefelstoffwechsels zunehmend an Bedeutung. Sowohl das bakterielle Enzym aus *E. coli* als auch die eukaryontischen Homologen aus *P. chrysogenum* und *S. cerevisiae* sind seit Jahrzehnten Zielobjekt extensiver Untersuchungen. An ihnen wurden Eigenschaften wie Oligomerisierungsgrad, Substratspezifität, Reaktionskinetik und -mechanismus analysiert. Jedoch beschränkten sich diese Studien auf molekularbiologische und proteinchemische Methoden, so daß die Kenntnisse über Aufbau und Funktionsweise der ATP-Sulfurylase nur auf diesen indirekten Charakterisierungen beruhen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Isolierung, Kristallisation sowie die röntgenkristallographische Bestimmung der atomaren, dreidimensionalen Struktur der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae*. Da bisher kein Vertreter der Enzymfamilie strukturell charakterisiert worden war, sollte diese erste Struktur einer ATP-Sulfurylase durch Methoden der Multiplen Anomalen Dispersion gelöst werden. Der Ursprungsorganismus Hefe wurde deshalb gewählt, weil das Hefeenzym wegen seiner evolutionären Schlüsselstellung zwischen bakteriellen Organismen und höheren Eukaryonten als ein Modellsystem für den Aufbau und die generelle Funktionalität der ATP-Sulfurylasen, aber auch der nahe verwandten PAPS-Synthetasen dienen kann. Anhand von Substrat- und Produktkomplexen mit ATP-Sulfurylase sollten neue Erkenntnisse über Substratbindung und Spezifität, als auch über den Reaktionsmechanismus der ATP-Sulfurylase gewonnen werden. Da bestimmte Konsensusmotive, die offensichtlich im oder um das Reaktionszentrum lokalisiert sind, in allen ATP-Sulfurylasen und PAPS-Synthetasen vorkommen, können die gewonnenen Resultate leicht auf Homologe anderer Organismen übertragen werden. Nicht nur in der Erforschung des pflanzlichen Stoffwechsels, sondern auch in der medizinischen und klinischen Forschung rückt die ATP-Sulfurylase und insbesondere die humane PAPS-Synthetase immer stärker in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Da sich Inhibitoren für die ATP-Sulfurylase-Aktivität als wirkungsvolles Instrument zur Untersuchung der Regulation verschiedenster Zellvorgänge wie z.B. Wachstum und Proliferation eignen, werden sie zunehmend in der Erforschung von Knochen- und Brustkrebskrankungen eingesetzt. Deshalb sollten zusätzlich verschiedene Inhibitor Komplexe mit der ATP-Sulfurylase strukturell untersucht werden. Die Analyse der Röntgenstruktur solcher Komplexe wäre für ein grundlegendes Verständnis der Wirkungsweise der Inhibitoren außerordentlich hilfreich.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien und Geräte

3.1.1. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.A. Qualität von den Firmen FLUKA (Buchs, Schweiz), SIGMA (Deisenhofen), MERCK (Darmstadt) oder RIEDEL-DE-HAËN (Hannover) bezogen. Weitere verwendete Chemikalien und Gebrauchsmittel:

BioRad (München)	Keramisches Hydroxylapatit für Affinitätschromatographie Bradford-Reagenz
CalBiochem (La Jolla, USA)	ATP γ S, ATP α S
Difco (Michigan, USA)	<i>Bacto</i> [®] Trypton Hefeextrakt
Pharmacia (Freiburg)	Superose 6 (Säulenmaterial für HPLC-Gelfiltration)
Roth (Karlsruhe)	D-Glucose
Sigma (Deisenhofen)	ATP, ADP Molekulargewichtsmarker für Proteingele Q-Sepharose FF (Säulenmaterial für IA-Chromatographie) Reactive Red 120 Agarose (Säulenmaterial für Affinitätschromatographie)

3.1.2. Geräte

Amicon (Hellsdorf)	Rührzelleneinheit 180 ml <i>Centricon 10</i> Mikrokonzentratoren <i>Centrprep 10</i> Mikrokonzentratoren Ultrafiltrationsmembran YM100
Beckman (München)	Ultrazentrifuge L7-55 mit Rotor Ti-55,2 Zentrifuge Avanti (Rotor JA-10)
Biomatik (Hellhofen)	Desintegrator S Glaskugeln mit \varnothing 0,5-0,7 mm
Hampton (CA, USA)	Kristallisations-Kits <i>I + II</i> , <i>Cryo</i> , <i>Natrix</i> , <i>Membfac</i> <i>VDX-Plates</i> Kristallisierplatten <i>Siliconized Circle Cover Slides</i> Deckplättchen 22 mm <i>Cryo-Loops</i> in verschiedenen Größen (0,1-1,5 mm)
ICN (Aurora, USA)	<i>Linbro-Plates</i> Kristallisierplatten
MARresearch (Hamburg)	<i>Image Plate</i> 345
Perkin Elmer (Vaterstetten)	UV/VIS-Spektrometer Lambda 17
Pharmacia (Freiburg)	Säulenkörper Fraktionssammler 211 Multirack Schreiber REC1
Rigaku (Tokyo, Japan)	RU-H3R Röntgenerators
Sigma (Deisenhofen)	Tischzentrifuge 2K15
Sartorius (Göttingen)	Polysulfonmembran 10 μ m Labor-Feinwaage LC 2200 S
Zeiss (Oberkochen)	Mikroskope

3.2. Mikrobiologische Methoden

3.2.1. Arbeiten mit Hefezellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* wurden entweder bei der Firma Hefe-Mayr (München) als Trocken-Press-Hefe kommerziell bezogen (Wildtyp-Stamm S288C/FY1679), oder Zellen des Stammes WCG4a- Δ mcb1 (Genotyp *MATa his3-11, leu2-3,112 ura3, Can^S GAL2 mcb1 Δ ::Can^R*) selbst fermentiert.

3.2.1.1. Fermentation von *S. cerevisiae*

Zur Herstellung einer Vorkultur wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen 5 ml YPD-Vollmedium mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder mit Zellen aus einer Dauerkultur angeimpft. Anschließend wurde die Vorkultur bis zum Erreichen der gewünschten optischen Dichte (OD_{600}) inkubiert (30 °C, 220 upm, 48h) und daraus eine 200 ml Zwischenkultur mit YPD-Medium im Verhältnis 1:50 angeimpft. Diese wurde ebenfalls bei 30 °C unter Schütteln (165 upm) bis zum Erreichen der stationären Phase inkubiert. Die optische Dichte wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm in einer Kunststoff-Küvette bestimmt.

Die Zwischenkultur diente vollständig zum Animpfen einer auf 30 °C vorgewärmten und gut belüfteten 10 l Hauptkultur mit YPD-Medium. Nach Erreichen der stationären Phase (30°C, 165 upm, 72h) wurden die Hefezellen geerntet.

YPD-Vollmedium pH 5,5:

1,0 %(w/v)	Hefeextrakt
2,0 %(w/v)	Bacto-Trypton
2,0 %(w/v)	D-Glucose

3.2.1.2. Zellernte

Nach Beenden der Fermentation wurden die Zellen eines präparativen 10 l-Ansatzes vom Medium abzentrifugiert (4000 upm, 10 min., 4 °C), zweimal mit Puffer A gewaschen und bis zum Zellaufschluß als Pellet bei 4 °C gelagert.

Puffer A (TEN-Puffer):

20 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
1 mM	EDTA
1 mM	Natriumazid

3.3. Isolierung und Charakterisierung der ATP-Sulfurylase

3.3.1. Aufschluß der Hefezellen

Preßhefe oder fermentierte Hefezellen wurden in 40 % (w/v) Puffer A resuspendiert und kontinuierlich bei Raumtemperatur gerührt. 50 ml-Aliquots der Suspension wurden mit 70 ml Glasperlen (Durchmesser 0,5-0,7 mm) in einem Zell-Desintegrator (Glasperlenmühle) vermischt und unter Eiskühlung aufgeschlossen (5000 upm, 10 min.). Das Zellysate wurde vereinigt, abzentrifugiert (10000 upm, 30 min., 4 °C) und der gelblich trübe Überstand (Rohlysate) nochmals ultrazentrifugiert (35000 upm, 45 min., 4 °C). Der nun klare, gelbe Überstand wurde abdekantiert, vereinigt und bei 4 °C verschiedenen Chromatographie-Schritten unterworfen.

3.3.2. Proteinpräparation mittels Säulenchromatographie

3.3.2.1. Q-Sepharose FF – Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie (IEC) werden Proteine mit positiver oder negativer Nettoladung adsorptiv an die Matrix gebunden. Dabei verdrängt das Protein das freie Gegenion der Matrix (Anionen- oder Kationenaustauschersäule) und kann durch Erhöhen der Ionenstärke oder Änderung des pH-Wertes wieder von der Säule eluiert werden. Bei der Elution mit einem Natriumchlorid-Gradienten verlassen zuerst Proteine mit geringer Nettoladung die Säule.

Das ultrazentrifugierte Hefe-Zellysate wurde bei 4 °C auf eine mit 250 mM NaCl in Puffer A voräquilibrierte Q-Sepharose-FF-Säule (Säulenvolumen 300 ml) aufgetragen (Flußrate 8 ml/min.). Nach einem Waschschriff mit 250 mM NaCl in Puffer A bis zum Erreichen der Basislinie wurden alle noch auf der Säule gebundenen Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten (250-800 mM) in 1,6 l Puffer A eluiert und in 10 ml-Frakfionen gesammelt. Jede vierte Fraktion wurde mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese analysiert und die ATP-Sulfurylase enthaltenden Fraktionen vereinigt.

3.3.2.2. Hydroxylapatit (HA) – Affinitätschromatographie

Bei der Hydroxylapatit-Chromatographie bestimmen im Gegensatz zur reinen Ionenaustauschchromatographie mehrere unterschiedliche Effekte die Adsorption und Elution von Proteinen. Das Trennprinzip beruht auf der unterschiedlichen Wechselwirkung von Amino-

und Carboxygruppen des Proteins mit der kristallinen Oberfläche des keramischen Hydroxylapatits. Außer rein ionischen Wechselwirkungen der Aminogruppen spielt die Komplexbildung des Calciums durch die Carboxy-Gruppen eine wesentliche Rolle.

Nachdem die vereinigten Fraktionen zum Abfangen des EDTA mit einer 1 M CaCl₂-Lösung (CaCl₂-Endkonzentration 1 mM) versetzt wurden, wurde die Lösung bei 4 °C auf eine mit 10 mM Kaliumphosphat-Puffer voräquilibrierten keramischen HA-Säule (Säulenvolumen 100 ml, Flußrate 4 ml/min.) aufgetragen. Bis zum erneuten Erreichen der Basislinie wurde anschließend mit 10 mM Kaliumphosphat-Puffer gewaschen und dann die noch gebundenen Proteine mit Hilfe eines linearen Kaliumphosphat-Gradienten (10-350 mM in 1 l) eluiert. Wiederum wurde jede vierte der 10 ml-Fraktion mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese analysiert, die ATP-Sulfurylase enthaltenden Fraktionen vereinigt und mit einer Amicon-Zelle aufkonzentriert (100 kDa Membran, 1 bar N₂-Druck). Das Einengen auf ein Volumen von ca. 20 ml wurde mit schrittweisem Umpuffern in Puffer C verbunden, da Phosphat die anschließende Affinitätschromatographie mit Reactive Red 120 Agarose stören würde.

Puffer B pH 7,5:1 M KH₂PO₄ (Stammlösung)1 M K₂HPO₄ (Stammlösung)

→ durch Mischen gewünschtem pH einstellen

Puffer C (TN-Puffer) pH 7,5:

20 mM Tris/HCl

1 mM Natriumazid

3.3.2.3. Red Agarose – Affinitätschromatographie

Die in diesem Reinigungsschritt verwendete Trennmethode beruht auf der bevorzugten Adsorption von Proteinen mit hohem Tryptophangehalt oder einer ATP-Bindungsstelle an den auf einem Agarose-Trägermaterial gekoppelten Reactive Red 120 Farbstoff. Die Desorption erfolgt durch Erhöhung der Ionenstärke mit einem Salzgradienten.

Die Reactive Red 120 Agarose-Säule (Säulenvolumen 30 ml, Flußrate 0,5-1 ml/min.) wurde bei 4 °C mit Puffer C voräquilibriert und die zuvor eingeeingte Proteinlösung aufgetragen. Durch Waschen mit Puffer C wurden unspezifisch bindende Proteine entfernt und anschließend die noch gebundenen Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-500 mM in 400 ml) eluiert. Die ATP-Sulfurylase enthaltenden 10 ml-Fraktion wurden mittels SDS-Gelelektrophorese identifiziert, vereinigt und mit einer Amicon-Zelle aufkonzentriert (10 kDa Membran, 1 bar N₂-Druck). Die verbleibenden 20 ml Proteinlösung wurde mit durch Ultrafiltration mit Centripreps-10 (10 kDa-Ausschlußgrenze, 2500 upm, 4 °C) und Centricon-10 (10

kDa-Ausschlußgrenze, 5000g, 4 °C) auf Puffer A umgepuffert und bis auf eine Endkonzentration von ca. 15-20 mg/ml eingeeengt.

3.3.2.4. Superose 6-FPLC – Gelfiltrationschromatographie

Bei der auch Ausschlußchromatographie genannten Gelfiltrationschromatographie werden Proteine nach der Partikelgröße aufgetrennt. Kleine Moleküle können in die Hohl- und Zwischenräume der Matrix eindringen und wandern dadurch langsamer. Verbunden mit dem FPLC-Verfahren ist sie eine sehr leistungsfähige Trennmethode zur Endreinigung von Proteinen.

Es wurden bei Raumtemperatur jeweils 500 µl eingeengte Proteinlösung (Gesamtkonzentration 15-20 mg/ml) auf die mit sterilfiltriertem und entgastem Puffer A voräquilibrierte Superose 6-Säule aufgetragen (Flußrate 0,5 ml/min.). Die Elution der ATP-Sulfurylase wurde durch den Verlauf des Elutionsprofils (Absorption bei 280 nm, OD₂₈₀) am Monitor verfolgt und das Protein manuell gesammelt.

3.3.3. Proteinnachweis durch Gelelektrophorese

3.3.3.1. Proteinfällung

Die Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA) für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird durchgeführt, um geringe Proteinmengen aufzukonzentrieren und um Kalium-Ionen aus der Pufferlösung zu entfernen, da diese sonst aus dem Gel und dem Laufpuffer als Kaliumdodecylsulfat präzipitieren. Dies kann die Denaturierung und die SDS-Komplexierung des Proteins empfindlich stören und damit die Ergebnisse für die Analyse untauglich machen.

Bei der TCA-Fällung wurde eine Probe der Proteinlösung mit 72 % (w/v) TCA bis zu einer Endkonzentration von 12 % (w/v) TCA gemischt und das Protein für 10 min. bei 4 °C gefällt. Anschließend wurde abzentrifugiert (14000 upm, 2 min., RT) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde solange mit 100 µl eines 25 %igen mit Bromphenolblau angefärbten Neutralisationspuffers gewaschen, bis kein Farbumschlag von blau nach gelb mehr zu beobachten war. Das Pellet wurde in 10 ml Probenauftragspuffer resuspendiert und kurz auf 95 °C erhitzt.

Neutralisationspuffer:
50 mM Tris/HCl (pH 6,9)
70 % (v/v) Ethanol
Spur Bromphenolblau

3.3.3.2. PAGE unter denaturierenden Bedingungen

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Dabei bindet ein SDS-Molekül an 2 Aminosäuren, so daß die negative Ladung proportional zur Masse und Größe des Proteins wird. Im elektrischen Feld wird so nach Ionenbeweglichkeit aufgetrennt. Kleine SDS-Proteinkomplexe wandern schneller als größere. Mit folgender Vorschrift konnten neun Gele (8,5 cm × 9 cm × 1 mm; 12 % Trenngel, 5 % Sammelgel) gegossen werden.

Trenngel (12 %):

- 17 ml 2 M TRIS/HCl (pH 8,8)
- 36 ml Acrylamidlösung (30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid)
- 26 ml ddH₂O
- 0,9 ml SDS-Lösung (10 % (w/v) SDS in H₂O)
- 200 µl Ammoniumperoxodisulfatlösung (10% (w/v) APS in H₂O)
- 70 µl TEMED

Sammelgel (5 %):

- 5,6 ml 1 M TRIS/HCl (pH 6,8)
- 7,5 ml Acrylamidlösung (30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid)
- 31,2 ml ddH₂O
- 0,45 ml SDS-Lösung (10 % (w/v) SDS in H₂O)
- 200 µl Ammoniumperoxodisulfatlösung (10% (w/v) APS in H₂O)
- 70 µl TEMED

Probenauftragspuffer (2x):

- 100 mM Tris/HCl (pH 6,8)
- 200 mM DTT
- 4 % (w/v) SDS
- 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
- 20 % (w/v) Glycerin

Der tiefgefrorene Probenauftragspuffer wurde kurz auf 96 °C erhitzt, dann die Proteinproben mit einem Volumenäquivalent Probenauftragspuffer vermischt, wiederum bei 3 min bei 96°C inkubiert, um alle Proteine restlos zu denaturieren, und dann das Gemisch auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele mit *Coomassie Brilliant Blue* (Kap. 3.3.5.1.) gefärbt.

Laufpuffer:

- 25 mM TRIS/HCl
- 250 mM Glycin
- 0,1 % (w/v) SDS

3.3.3.3. PAGE unter nativen Bedingungen

Sollte die Reinheit eines Proteinkomplexes bzw. dessen Molekulargewicht abgeschätzt werden, wurde eine native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Das Polyacrylamid-Gel wurde als 8 %iges Trenngel gegossen. Als Puffersystem wurde Tris/Borat mit Saccharose verwendet, da diese Komponenten Proteinkomplexe stabilisieren sollen.

Gellösung (8 %):	100 mM Tris/HCl (pH 8,6)
	73 mM Borsäure
	7 % Saccharose
	6 % (w/v) Acrylamidlösung
	0,8 % (w/v) Bisacrylamid
	180 µl Ammoniumperoxodisulfatlösung (10% (w/v) APS in H ₂ O)
	60 µl TEMED

Die Proteinproben wurden mit einem fünftel Volumenäquivalent Probenauftragspuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde dem Gel noch ein Proteinlängenstandard beigefügt und dann die Elektrophorese bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA durchgeführt. Das Anfärben des Gels erfolgte mit *Coomassie Brilliant Blue* (Kap. 3.3.5.1.).

Laufpuffer:	100 mM Tris/HCl (pH 8,6)
	73 mM Borsäure
	7 % Saccharose

Probenauftragspuffer (5x):	70 % Saccharose
	0,2 % (w/v) Bromphenolblau

3.3.4. Blotting

Zur N-terminalen Sequenzierung von Proteinen durch Edman-Abbau müssen diese zuvor aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine zugängliche Matrix überführt werden. Dieser Vorgang wird als Blotting bezeichnet. Wie bei der Gelelektrophorese wird auch hier die Bewegung negativ geladener Moleküle (Protein assembliert mit SDS-Molekülen) zur Anode in einem elektrischen Feld ausgenutzt. Der sog. *Semi-Dry-Blot* erlaubt einen sehr schnellen Transfer der Proteine bei sehr geringen Puffermengen. Die PVDF-Membran, zugeschnitten in derselben Größe wie das zu blottende Gel, wurde vor Gebrauch zunächst kurz in Methanol und dann in Transferpuffer eingelegt. 8 Lagen Whatman-Papier wurde mit Transferpuffer durchtränkt und auf die Anode der Blotkammer gelegt. Darauf wurde die Membran, das Polyacrylamid-Gel und abschließend ein zweiter Stapel aus acht Lagen pufferdurchtränktem Whatman-Papier

aufgelegt. Vorhandene Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten des Stapels wurden vor dem Start des Blotvorgangs mit Hilfe einer Walze oder eines Glasstabes entfernt. Der Blot wurde bei konstanter Stromstärke von 65 mA für 3 h durchgeführt. Nach Beenden des Blotvorgangs wurde die Membran mit *Coomassie Brilliant Blue* (Kap. 3.3.5.2.) angefärbt und an der Luft getrocknet.

Transferpuffer:

39 mM	Glycin
0,037 %(w/v)	SDS
20 %(v/v)	Methanol
48 mM	Tris/HCl (pH 8,3)

3.3.5. Proteinfärbung

3.3.5.1. Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Die heute weitverbreitete Methode der Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen ist weit weniger aufwendig als die Silberfärbung, außerdem werden die Proteine gleichmäßiger angefärbt. Auch wenn sie weit weniger empfindlich ist als die Silberfärbung, genügt sie doch zur qualitativen und semi-quantitativen Identifizierung von Proteinen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Glasplatten und die Spacer entfernt, das Gel in Färbelösung eingelegt und kurz für eine optimale Anfärbung in der Mikrowelle auf ca. 90°C erhitzt. Darauf wurde für ca. 20 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgegossen und das Gel mit 20 ml einer Entfärbelösung versetzt und unter Schütteln so lange inkubiert, bis das Gel nahezu entfärbt war und die einzelnen Proteinbanden gut sichtbar wurden.

Färbelösung:

2,5 g	<i>Coomassie Brilliant Blue</i> R-250
250 ml	Ethanol
80 ml	Eisessig
	ddH ₂ O ad 1000 ml

Entfärber:

250 ml	Ethanol
80 ml	Eisessig
670 ml	H ₂ O

3.3.5.2. Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen

Ethanol stört die Sequenzierung durch Edman-Abbau. Daher wurde die PVDF-Membran mit Farbe- und Entwicklerlösungen versetzt, die entsprechend Methanol anstatt Ethanol enthalten.

Zudem wurde das wasserlösliche *Coomassie Brilliant Blue G-250* anstelle des wasserunlöslichen R-250 verwendet. Nach Inkubation der Membran von ca. 30 Sekunden wurde diese gut mit H₂O gewaschen und mit 20 ml Entfärber versetzt, der so oft gewechselt wurde, bis die Proteinbanden gut identifiziert werden konnten.

Färbelösung: 0,1 %(w/v) *Coomassie Brilliant Blue G-250*
 50 %(v/v) Methanol
 10 %(v/v) Eisessig

Entfärber: 250 ml Ethanol
 80 ml Eisessig
 670 ml H₂O

3.3.6. Bestimmung der Proteinkonzentration

3.3.6.1. nach Lowry

Die Gesamt-Proteinkonzentration kann mit der Methode nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951) photometrisch bestimmt werden. Sie eignet sich für Proteinmengen zwischen 5 und 50 µg Protein in 300 µl Probenvolumen.

Lösungen:

A:	2 %(w/v)	Natriumcarbonat, 0,1 M NaOH, 0,16 %(w/v) Natriumtartrat
B:	0,5 %(w/v)	Kupfersulfat
C:	400 ml	Lösung B + 20 ml Lösung A (<i>in situ</i> mischen)
D:	50 %	Folin-Ciocalteus Reagenz
E:	20 mM	Dithiothreitol (3,1 mg/ml)
F:	0,1 mg/ml	BSA Stammlösung
G:	1,0 mg/ml	BSA Stammlösung

Nach Erstellen einer geeigneten Eichreihe wird in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß 300 µl Probenlösung mit 1 ml Lösung C versetzt, gut geschüttelt und 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Lösung D wird für 3 min. inkubiert und anschließend mit 100 µl Lösung D versetzt und für 2 min. inkubiert. Die nun blau gefärbten Proben werden bei $\lambda = 740$ nm spektralphotometrisch analysiert und per Eichgerade die Konzentration bestimmt.

3.3.6.2. nach Bradford

Die Gesamt-Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford ermittelt (Bradford, 1976). Der Bradford-Test bietet gegenüber dem Lowry-Test zwei wesentliche Vorteile: Erstens ist er schneller und einfach durchzuführen und zweitens stört die Anwesenheit von ATP die Reaktion nicht. 200 µl Bradford-Reagenz wurden mit 1-20 µl Proteinlösung versetzt und

das Gemisch auf 1 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Die Probe wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, ihre Extinktion bei $\lambda=595$ nm gemessen und die Proteinkonzentration durch Abgleich mit einer Eichreihe mit BSA bestimmt.

3.3.6.3. durch Absorptionsmessung

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde über deren Extinktion im UV-Bereich bestimmt. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei $\lambda = 280$ nm. Bei dieser Wellenlänge hängt der Extinktionskoeffizient in erster Näherung nur von der Proteinkonzentration und damit der Anzahl der Tryptophane und Tyrosine ab. Es gilt in erster Näherung:

$$\epsilon_{280nm} = (5540 \cdot W + 1480 \cdot Y) \cdot \frac{1}{M \cdot cm} \quad (3-1)$$

Für eine 1 cm dicke Küvette ergibt sich für die OD_{280} (W bezeichnet die Anzahl der Tryptophane, Y die Anzahl der Tyrosine, c die Konzentration und m das Molekulargewicht):

$$\frac{c}{mg/ml} = OD_{280} \cdot \frac{m/kDa}{5,54 \cdot W + 1,48 \cdot Y} \quad (3-2)$$

3.3.7. Sequenzanalyse

Zur Identifizierung können Proteine über den automatisierten Edman-Abbau sequenziert werden. Die jeweils N-terminale Aminosäure wird dabei nach Reaktion mit Phenylisothiocyanat (PITC) als Phenylthiohydantoin-Derivat (PTH-Derivat) abgespalten und kann nach einer HPLC-Auftrennung durch den Vergleich mit einem Standard-Aminosäuregemisch identifiziert werden. Die N-terminale Proteinsequenzierung wurde durch Dr. Karl-Heinz Mann am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried auf einem Applied Biosystems Sequenzierer 470A durchgeführt. Für das Ansequenzieren eines bestimmten Proteins aus einem Gemisch wurde die Proteinprobe mittels SDS-PAGE (Kap. 3.3.3.2.) elektrophoretisch aufgetrennt, durch Blotting (Kap. 3.3.4.) auf einer PVDF-Membran fixiert und die zu sequenzierende Proteinbande aus dem gefärbten Blot (Kap. 3.3.5.2.) ausgeschnitten. Für das Ansequenzieren homogener Proteinlösungen wurden 20 ml einer 1 mg/ml Proteinlösung in Puffer A ohne vorheriges Fixieren auf PVDF-Membran sequenziert.

3.4. Kristallisation und Strukturlösung

Im Folgenden werden einige Aspekte der Kristallisation und der Bestimmung der dreidimensionalen, atomaren Struktur von Proteinen mit Hilfe der Röntgenkristallographie kurz dargestellt und einige Grundprinzipien der Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen beschrieben. Die Theorie der Röntgenkristallographie ist jedoch für eine komplette Präsentation an dieser Stelle zu komplex, so daß für eine detaillierte Ausführung und Literaturangaben auf folgende Artikel und Textbücher verwiesen sei: Messerschmidt und Huber, 2000; Blundell und Johnson, 1976; Giacovazzo *et al.*, 1992; Drenth *et al.*, 1994; Massa 1994; Glusker *et al.*, 1994.

3.4.1. Proteinkristallisation

Die Röntgenstrukturanalyse von Proteinen und Nukleinsäuren und anderen Makromolekülen hat viele Felder in der Medizin und Biologie und das Verständnis für Struktur und Funktionen von Proteinen revolutioniert. Da durch Lichtmikroskope die zur Visualisierung von atomaren Details notwendige Auflösung nicht erzielt werden kann und es keine geeigneten Linsensysteme für die dafür aufgrund ihres Wellenlängenbereichs geeignete Röntgenstrahlung gibt, wurde mit der Röntgenkristallographie eine „indirekte“ Methode geschaffen, um über die Detektion von Wechselwirkungen des Proteins mit elektromagnetischen Wellen ein Abbild zu generieren, das Aussagen über die atomaren Details der Proteinstruktur zuläßt.

Die Grundlage der Röntgenkristallographie wurde durch Wilhelm Conrad Röntgen 1895 mit der Entdeckung der nach ihm benannten Strahlen bei Kathodenstrahlenversuchen geschaffen. Während in den frühen Jahren der Proteinkristallographie erst nur sehr wenige Strukturen aufgeklärt werden konnten, hat sich diese Methode in der heutigen Zeit neben der Elektronenmikroskopie (*EM*) und NMR-Methoden (*nuclear magnetic resonance*, Kernspinresonanz-Spektroskopie) als weitverbreitete Standardanalyse-Methode für biologisch interessante Makromoleküle entwickelt, die auch in zunehmendem Maße als Werkzeug zur Entwicklung pharmakologisch wichtiger und interessanter Moleküle und Strukturen und damit dem medizinischen Fortschritt dient. Nicht nur die Anzahl der in der Proteindatenbank (PDB, Brookhaven) hinterlegten Strukturen, sondern auch die Größe und Komplexität der Biomoleküle hat sich mit der Verbesserung und Automatisierung der experimentellen Methoden und der zunehmend computerisierten Datenverarbeitung nahezu exponentiell gesteigert.

3.4.1.1. Proteinkristallisation durch Dampfdiffusion

Die röntgenkristallographische Untersuchung eines Proteins erfordert zuallererst die Bereitstellung Proteins hoher Reinheit und Homogenität, das dann zur Kristallisation angesetzt wird. Die Kristallisation von Proteinen ist ein vieldimensionales Problem mit vielen variierbaren Parametern. Meistens wird zu Beginn von Kristallisationsversuchen ein statistischer Ansatz mit faktoriellen Präzipitationsbedingungen nach dem Prinzip des *sparse matrix screens* (Carter und Carter, 1979; Jancarik und Kim, 1991) gewählt. Bei der häufig und mit dem meisten Erfolg angewandten Dampfdiffusions-Methode (Übersichtsartikel: McPherson, 1982) erfolgt die Kristallisation durch langsame Konzentrationsänderungen der Präzipitanz- Salz- oder Proteinlösungen („Aussalzen“) bei konstantem pH-Wert und Temperatur.

Zur Kristallisation wird hierbei über ein Reservoir mit definierter Pufferkonzentration ein proteinhaltiger Tropfen mit geringerer Pufferkonzentration positioniert. Im geschlossenen System gleicht sich durch Dampfdiffusion die Konzentration der einzelnen Komponenten in dem vorgelegten, proteinhaltigen Tropfen der des Reservoirs an. Durch den Pufferkonzentrationsausgleich konzentriert sich die Proteinlösung im Tropfen bis deutlich in den Übersättigungsbereich auf und es kann zur Kristallkeimbildung kommen. In der ersten Phase, der *Keimbildung*, bilden sich erste geordnete Proteinaggregate, an die sich in der Phase des *Wachstums* weitere Moleküle anlagern können. Die Keimbildung ist generell energetisch aufwendig, während das folgende Wachstum des Kristalls ein exergonischer Prozeß ist. Um eine geeignete Umgebung für die Kristallisation zu schaffen, werden verschiedene Arten von Additiven zugegeben sowie der pH-Wert und die Temperatur variiert.

- *Präzipitanzen* erniedrigen die Löslichkeit eines Proteins. Es werden Ethanol, Isopropanol, 2,5-Methylpentan-diol (MPD), Polyethylenglycole (PEG) verschiedener Kettenlänge oder verschiedene Salze verwendet.
- Der *pH-Wert* der Lösung wird durch einen geeigneten Puffer eingestellt. Die Löslichkeit aller Proteine hängt vom pH-Wert ab. An seinem *isoelektrischen Punkt* besitzt ein Protein seine niedrigste Oberflächen-Nettoladung und damit auch seine niedrigste Löslichkeit.
- Die *Temperatur* beeinflusst die Kristallisation auf entscheidende Weise, da sie den Dampfdruck im geschlossenen System und damit den Konzentrationsausgleich bestimmt.
- *Detergenzien* erhöhen die Löslichkeit eines Proteins, können aber aufgrund von Wechselwirkungen mit Proteinbereichen mit besonders hohen hydrophoben Anteilen ein geordnetes Kristallwachstum bewirken.
- *Weitere Additive* decken zusätzliche Parameter ab: Durch Salzzugabe kann die Ionenstärke der Lösung erhöht und somit die Löslichkeit der Proteine vermindert oder erhöht wer-

den. Vernetzende Reagenzien (*crosslinker*) können unter bestimmten Bedingungen das Kristallwachstum positiv beeinflussen.

Zur Kristallbildung durch Dampfdiffusion aus konzentrierter Proteinlösung gibt es zwei prinzipielle Methoden. Der Tropfen der proteinhaltigen Lösung kann entweder in einer Vertiefung überhöht über der Reservoirlösung sitzen (*sitting drop*), oder hängend über dem Reservoir platziert werden (*hanging drop*).

3.4.1.2. Durchführung

Zur Kristallisation wurde in dieser Arbeit ausschließlich die Dampfdiffusions-Methode nach dem *hanging drop*-Verfahren angewandt. Zur Kristallbildung von ATP-Sulfurylase geeignete Pufferlösungen wurden mit dem hauseigenen Satz an Kristallisierpuffern (*house factorials*) als auch mit den kommerziell erhältlichen *Screens I, II, Cryo, Natrix* und *Membfac* der Firma *Hampton Research* ermittelt. Dabei wurden zuerst 500 µl der Kristallisationspufferlösung in die Reservoirkammer der *Linbro*- oder *VDX*-Platten pipettiert und dann auf einem silikonisierten Deckgläschen 2 µl dieser Reservoirlösung mit 2 µl der auf 20 mg/ml aufkonzentrierten Proteinlösung vorsichtig vermischt. Das Deckglas wurde über dem Reservoir platziert und die Platte für wenigstens 24 h bei 18 °C erschütterungsfrei gelagert. Die erhaltene initiale Kristallbedingung wurde mit Hilfe weiterer Feinabstimmung durch systematische Variation der pH- und Präzipitanz-Bedingungen und schließlich der Tropfenverhältnisse (2:1, 3:2 und 4:2 µl Protein- zu Präzipitanzlösung) optimiert.

3.4.1.3. Soaking-Experimente

Zur Suche von Schweratomderivaten (Kap. 3.4.9.1.) von ATP-Sulfurylase als auch zur Darstellung von Substrat- und Inhibitor-komplexen wurden die Kristalle einem speziellen *Soaking*-Verfahren unterworfen. Dabei wurde zuerst die Komponente, die an das Protein binden sollte (Schwermetallsalz, Substrate, Inhibitoren), in bestimmter Konzentration im bereits vorbereiteten *Cryo*-Puffer (Kap 3.4.3.) bei Raumtemperatur gelöst. Dann wurde der Kristall mit einer Haarschleife (*Loop*, Durchmesser 0,1-1,5 mm) aus dem Kristallisationstropfen entnommen und in einen Tropfen *Soaking*-Puffers eingelegt. Nach einer Inkubationszeit von mehreren Stunden wurde der Kristall wieder in einem *Loop* aufgenommen, auf einen Goniometerkopf im Stickstoffstrom montiert und im Gang des Röntgenstrahls justiert. Weitere Details zu Konzentrationen und *Soaking*-Zeiten sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

3.4.2. Kristallaufbau

Kristalle sind anisotrope, homogene Körper, die aus einer regelmäßigen dreidimensionalen Anordnung gleicher Bausteine bestehen (Einkristall). Der kleinste sich wiederholende Baustein innerhalb eines Kristalls ist die Elementar- oder Einheitszelle, welche den gesamten Kristall nur durch translatorische Verschiebungen um ganzzahlige Vielfache der Einheitsvektoren a, b, c aufzubauen vermag. Das Konzept der Einheitszelle stellt ein mathematisches Modell dar, das den Kristall in identische Einheiten unterteilt, so daß nur wenige Parameter nötig sind, um die Anordnung der Atome zu beschreiben. Somit reduzieren sich die für einen Kristall charakteristischen Elemente auf die Parameter der Einheitszelle. Enthält ein Kristall andere Symmetrieelemente als die Translation, so setzt sich die Einheitszelle ihrerseits aus mehreren asymmetrischen Einheiten zusammen, die durch Symmetrieeoperationen (z.B. Rotations- und Schraubenachsen, Spiegelebenen, Inversionszentren) innerhalb der Elementarzelle aufeinander abgebildet werden können. Aus den möglichen Kombinationen der Symmetrieeoperationen ergeben sich die 32 Punktgruppen und durch zusätzliche Translationssymmetrien in Kristallen die 230 kristallographischen Raumgruppen, die sich in 7 Kristallsystemen einordnen lassen (triklin, monoklin, orthorhombisch, tetragonal, trigonal, hexagonal, kubisch). Jedoch sind bei Proteinkristallen durch die fehlende Spiegelsymmetrie aufgrund der L-Aminosäuren nicht alle Raumgruppen enantiomorph, so daß sich hier die Anzahl der Raumgruppen auf 65 reduziert. Liegen mehrere Proteinmoleküle in einer asymmetrischen Einheit vor, gilt für sie eine nichtkristallographische Symmetrie (*non-crystallographic symmetry, ncs*), da diese Moleküle nicht mehr exakt identisch sind. Proteinkristalle bestehen in der Realität allerdings nicht aus einem einheitlich idealen Gitter, sondern nur aus einer Vielzahl kleiner Blöcke mit idealer Anordnung, die zueinander geringfügig verschoben oder verkippt sind. Diese „Verkipfung“ wird als Mosaikbreite bezeichnet und beträgt bei realen Kristallen zwischen einem zehntel und mehreren Grad. Weiterhin enthalten Proteinkristalle im Gegensatz zu Salz- oder Kleinmolekülkristallen einen relativ hohen Anteil an ungeordnetem Lösungsmittel (30-70 %). Die Moleküle sind somit recht locker gepackt und Kleinmoleküle als auch Lösungsmittel können durch Freiräume und Kanäle hindurch diffundieren. Somit sind Proteinkristalle relativ labile Gebilde, bei denen sowohl molekulare Konformationsänderungen als auch chemische Reaktionen möglich sind, so daß biologisch relevante Reaktionen auch im kristallinen Zustand des zu untersuchenden Proteins durchgeführt werden können (siehe auch Kap. 3.4.1.3. *Soaking*-Experimente).

3.4.3. Beugung von Röntgenstrahlen an Proteinkristallen

Die bei einem Röntgenbeugungsexperiment auf einen Kristall treffenden Röntgenstrahlen werden an den Elektronen der einzelnen Atome gebeugt und erzeugen dadurch, je nach Protein und Kristallsymmetrie, ein individuelles Beugungsmuster aus diskreten Reflexen. Die Elektronen werden dabei durch die Wechselwirkung mit der Strahlung zum Schwingen angeregt und emittieren als oszillierende Dipole diese wieder mit gleicher Wellenlänge, aber um 180° phasenverschoben (elastische oder *Thomson-Streuung*). Jeder gestreute Strahl verhält sich so, als ob er an den Gitterebenen hkl (*Millersche Indizes*) des Kristalls reflektiert worden wäre. Hierbei schneidet die Gitterebene hkl die x-Achse in a/h , die y-Achse in b/k und die z-Achse in c/l . Die Strahlen können auch als einzelne gebeugte elektromagnetische Wellen beschrieben werden, welche ihrerseits miteinander interferieren können, wodurch es in Abhängigkeit ihrer Phasendifferenz zu Auslöschungen (negative Interferenz) oder Verstärkungen (positive Interferenz) kommt. Für die positive Interferenz an einer Netzebenenschar eines Gitters kohärent gebeugter Röntgenstrahlen gilt das *Braggsche Gesetz* (Gleichung 3-3):

$$n \cdot \lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin \theta_{hkl} \quad (3-3)$$

Ein unter dem Glanzwinkel θ_{hkl} einfallender Röntgenstrahl der Wellenlänge λ wird an den Gitterebenen des Kristallgitters mit dem Abstand d_{hkl} zueinander gestreut. Erfüllt der Glanzwinkel θ die *Braggsche* Gleichung, so ist der Gangunterschied ($2d_{hkl} \cdot \sin \theta_{hkl}$) ein Vielfaches der Wellenlänge $n\lambda$ (n ist dabei die Reflexordnung) und es tritt positive Interferenz auf, die als diskreter Reflex detektiert werden kann. Das Reflexmuster beim Auftreffen eines Röntgenstrahls auf einen Proteinkristall wird dabei nur durch die Gittersymmetrie, die Intensität der einzelnen Reflexe aber durch die Anordnung der Streuzentren, d.h. die Zusammensetzung der asymmetrischen Einheit, in der Elementarzelle bestimmt. Diese Punkte mit positiver Interferenz bauen dabei ein *reziprokes Gitter* auf, dessen geometrische Eigenschaften invers zum realen Kristallgitter sind. Die Länge der Gittervektoren entspricht dabei den reziproken Abständen der Ebenen einer Netzebenenschar, deren Schnittpunkte mit den Achsen der Elementarzelle durch die *Millerschen Indizes* hkl definiert wird. Das reale Kristallgitter und das reziproke Gitter sind dabei über eine Fouriertransformation miteinander verknüpft.

Durch die bereits erwähnte Fehlordnung im Kristallgitter beugen Proteinkristalle Röntgenstrahlen nur bis zu einem bestimmten Winkel θ_{max} . Nach dem *Braggschen Gesetz* entspricht

der Streuwinkel θ_{max} dem kleinsten beobachtbaren Netzebenenabstand d_{min} , der als Auflösung einer Kristallstruktur bezeichnet wird.

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta_{max}} \quad (3-4)$$

Mit Hilfe der Ewald-Konstruktion (Ewald, 1921) ist es möglich, unter Verwendung des Gedankenkonzepts des reziproken Gitters das *Bragg'sche Gesetz* als Vektordiagramm (vereinfacht im zweidimensionalen Raum) mit dem Kristall im Zentrum einer Kugel mit Radius $1/\lambda$ darzustellen, deren Ursprung M $1/\lambda$ vom Ursprung O des reziprokes Gitters entfernt ist (Ewald-Kugel, Abbildung 4). Jedem Reflex hkl ist ein Gitterpunkt im reziproken Gitter mit den Indizes hkl zugeordnet. Jeder dieser Punkte bildet den Endpunkt des Vektors S, der senkrecht auf der Gitterebene hkl steht.

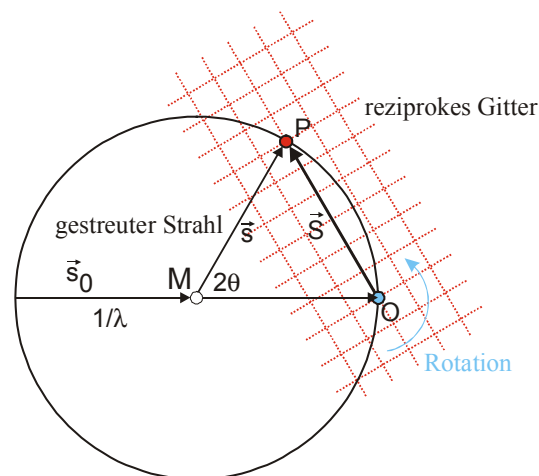


Abbildung 4: Die Ewald-Konstruktion: Der Radius der Kugel um den Mittelpunkt M beträgt $1/\lambda$, das Zentrum des reziproken Gitters liegt auf der Kugeloberfläche in O. Das reziproke Gitter dreht sich mit dem Kristall (dem realen Gitter) um O. Der einfallende Primärstrahl s_0 wird im Winkel von 2θ als Wellenvektor s gebeugt. S ist hierbei der reziproke Gittervektor.

Das *Bragg'sche Gesetz* ist dabei für jeden reziproken Gitterpunkt erfüllt, der die Oberfläche der Kugel schneidet. Die Rotation des Kristalls und damit des reziproken Gitters senkrecht zum Röntgenstrahl bringt nacheinander alle Gitterpunkte in Streuposition. Die Ewald-Konstruktion zeigt, daß die Punkte des reziproken Gitters und somit das Streubild eines Kristalls nur von der Einheitszelle, nicht aber vom Inhalt der Zelle abhängen. Somit lassen sich aus den Positionen der Reflexe Rückschlüsse auf die Geometrie und damit auf die Raum-

gruppe des Kristalls ziehen. Die Information über den Zellinhalt allerdings wird über die Intensitäten und Phasen der Reflexe vermittelt.

Ein Röntgenstrahl wird an der Elektronenwolke eines Atoms in Abhängigkeit von der Anzahl der Elektronen und ihrer Position in der Elektronenwolke gestreut. Die an einem Atom gestreute Gesamtwellenfunktion errechnet sich somit unter Annahme von sphärischer Ladungsverteilung in Abwesenheit von anomaler Streuung durch Aufsummieren aller individuellen Beträge innerhalb des Atomvolumens zum atomaren Formfaktor f (Gleichung 3-5):

$$f = \int_r \rho(r) e^{2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}} dr \quad (3-5)$$

wobei $\rho(r)$ die Elektronendichte am Ort r der Elektronenwolke bezeichnet. Die Streuintensität nimmt jedoch mit zunehmender Auflösung ab, was sich einerseits auf die endliche Ausdehnung der Elektronenhülle zurückführen läßt, andererseits aber auch eine Folge der thermischen Bewegung der Atome um ihre Gleichgewichtslage ist. Weiterhin tragen die Mosaikbreite, Skalierungsfehler und Absorption zu einem Abnehmen der Intensität bei. Daher muß der atomare Formfaktor f der Atome mit einem temperaturabhängigen Korrekturfaktor T_{iso} (Gleichung 3-6) multipliziert werden.

$$f_i = f_{io} \cdot T_{iso} = f_{io} \cdot e^{-B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}} \quad (3-6)$$

Der Temperaturfaktor B (Gleichung 3-7) ist mit der mittleren quadratischen Auslenkung der Atomschwingung verknüpft:

$$B = 8\pi^2 \cdot \overline{u^2} \quad (3-7)$$

Für jeden Reflex ergibt sich der Strukturfaktor $F(\mathbf{S})$ damit als Summation aller atomarer Formfaktoren f in der asymmetrischen Einheit mit n Atomen auf den Positionen \mathbf{r}_j ($j= 1, 2, \dots, n$) bezüglich des Ursprungs der Einheitszelle unter Multiplikation mit ihrem jeweiligen Phasenwinkel (Gleichung 3-8) zu:

$$F(\vec{s}) = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i \vec{p}_j \cdot \vec{s}} \quad (3-8)$$

Jeder Strukturfaktor F_{hkl} kann dabei als Wellenfunktion beschrieben werden, die sowohl über eine Amplitude f_i als auch über einen Phasenwinkel α_{hkl} verfügt. Strukturfaktoren und Elektronendichteverteilung im Kristall am Ort (x, y, z) lassen sich durch eine *Fouriertransformation* (Fourier-Synthese) ineinander überführen (Gleichung 3-9):

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{-2\pi i (hx + ky + lz) + i\alpha_{hkl}} \quad (3-9)$$

Die Elektronendichteverteilung kann man also als die inverse “Fouriertransformierte” der Strukturfaktoren betrachten, während umgekehrt die Strukturfaktoren die “Fouriertransformierte” der Elektronendichteverteilung darstellen.

Durch Röntgenbeugungsexperimente an Proteinkristallen erhält man durch die Intensität der Reflexe im Diffraktionsbild lediglich die Amplituden der Strukturfaktoren $|F_{hkl}|$, wobei diese proportional zur Quadratwurzel der gemessenen Intensitäten $I_{(hkl)}$ sind. Der Phasenwinkel α_{hkl} eines Reflexes ist hierbei durch direkte Messung nicht zugänglich, da aus den integrierten Reflexintensitäten lediglich die Strukturamplituden bestimmt werden können. Dieses Problem der Unbestimmbarkeit der Phasen wird als *Phasenproblem der Kristallographie* bezeichnet.

3.4.4. Montieren von Proteinkristallen

Die Wechselwirkung von Proteinkristallen mit Röntgenstrahlen verursacht in vielen Fällen irreparable Schäden am Kristall, so daß innerhalb kürzester Zeit die Streuqualität des Kristalls und die erzielbare Auflösung nachlassen. Dies ist vor allem bei Röntgenexperimenten an der Wiggler-Beamline am Deutschen Elektronensynchrotron DESY/Hamburg der Fall, wo die erzielbare Intensität des Röntgenstrahls um ein Vielfaches größer ist als bei Messungen mit einer Kupferanode. Hier halten Proteinkristalle der auftreffenden Strahlung nur wenige Sekunden oder Minuten stand. Um diese Strahlenschäden zu minimieren, wurde die sogenannte Kryokristallographie (Rodgers, 1997) angewendet. Bei diesem Verfahren werden die Kristalle

im Stickstoffstrom eines Oxford Cryo Systems bei 100 K, der Verdampfungstemperatur von flüssigem Stickstoff, schockgefroren. Dazu wurde der Kristall mit einer Haarschleife (*Cryo-Loop*, Durchmesser 0,1-1,5 mm) aus dem Kristallisationstropfen entnommen und in einen Tropfen desselben Puffers überführt, der aber 20 %(v/v) Glycerin als Zusatz enthielt. Diese Zusätze, sogenannte Cryo-Protetantien, zu denen neben Glycerin auch andere Polyalkohole wie 1,4-Butandiol, 2,5-Methylpentandiol, verschiedene Monosaccharide wie Glucose oder auch niedere Polyethylenglycole wie PEG400 gehören, stören den Aufbau von Eiskristallkeimen im und um den Proteinkristall und verhindern so die Eisbildung, die zur Zerstörung des Kristalls führt. Nach einer Inkubationszeit von einigen Sekunden bis hin zu mehreren Stunden wurde der Kristall wieder in einem *Cryo-Loop* aufgenommen, auf einen Goniometerkopf im Stickstoffstrom montiert und im Gang des Röntgenstrahls justiert.

3.4.5. Röntgenbeugungsexperimente

Die Röntgenbeugungsexperimente mit ATP-Sulfurylase-Kristallen wurden sowohl am MPI für Biochemie, Abteilung Strukturforschung (*in house*), als auch an der Wiggler Beamline BW6 (HASYLAB) an der MPG-Außenstelle am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY), Hamburg durchgeführt. *In house* wurde ein Rigaku RU-H3R Drehanoden-Röntgengenerator (Leistung: 50 kV, 100 mA) und monochromatischer Cu-K α -Strahlung ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$) und mit einer 345 MARresearch *Image Plate* als Detektor verwendet. An der Beamline BW6 diente neben dem in seiner Wellenlänge variierbaren Röntgenstrahl ein CCD-Detektor der Firma MARresearch als Detektor-System.

3.4.6. Datensammlung und Datenreduktion

Die Beugungsbilder wurden als Rotationsaufnahmen gesammelt. Dazu wurden die Kristalle während der Aufnahme kontinuierlich um die Spindelachse gedreht und in einer Serie von Rotationsaufnahmen *in house* in Winkelinkrementen von 1° und an der Beamline BW6 von 0,5° vermessen.

Die Datensätze der gemessenen Reflexe wurden mit einer Abfolge von Computerprogrammen ausgewertet. Die Bestimmung der Kristallorientierung, der Raumgruppe und der Parameter der Elementarzelle erfolgte mit dem Programm MOSFLM Version 6.01 (Leslie, 1991), das folgende Subroutinen enthält:

- **IMSTILLS:** liest die Rotationsaufnahmen ein, indiziert die Reflexe, d.h. ordnet jedem Reflex die Indizes hkl zu und berechnet für jede Aufnahme einen radialen Hintergrund. Beugungsreflexe werden dann als Serien von Bildpunkten erkannt, wobei Reflexe mit stark abweichender Größe nicht berücksichtigt werden. Die Koordinaten und die Intensitäten der gefundenen Reflexe werden dann in eine Datei geschrieben, die als Eingabe für das Programm REFIX gilt.
- **REFIX:** bestimmt in einem ersten Durchlauf aus einer Reihe von starken Reflexen die reduzierte Elementarzelle (Raumgruppe) durch einen Vergleich mit 14 gegebenen Bravais-Gittertypen. In einem zweiten Durchlauf wird nun mit dem am besten passenden Gittertyp eine Verfeinerung der Zellparameter, des Kristall-Detektor-Abstandes und der Koordinaten nach dem Prinzip der Fehlerquadratminimierung durchgeführt. Schließlich wird eine Orientierungsmatrix des Kristalls relativ zur Spindelposition erstellt.
- **MOSFLM:** selbst wird dazu verwendet, um mit Hilfe der ermittelten Raumgruppe die theoretischen Positionen der Reflexe im reziproken Raum zu berechnen und diese mit den tatsächlichen Reflexen einer Aufnahme zu vergleichen. Die symmetrieunabhängigen Reflexe werden zu Reflexintensitäten integriert (Datenreduktion). Nach einer erneuten Optimierung der Orientierungsmatrix, der Zellparameter, der Primärstrahlkoordinaten und der Detektorparameter erfolgt eine Anpassung der Reflexpositionen an den vorhergesagten Gittertyp. Aus den Reflexintensitäten I_{hkl} können die Strukturfaktoramplituden $|F_{hkl}|$ (Gleichung 3-8) ermittelt und zusammen mit den noch zu bestimmenden Phasen die Elektronendichtekarte des Proteinmoleküls berechnet werden. Die absolute Skalierung und Reduktion der Daten sowie die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm **SCALA** aus dem CCP4-Programmpaket.

Als Hauptkriterium für die Übereinstimmung symmetrieäquivalenter Reflexe innerhalb eines Datensatzes und damit für die Qualität eines Datensatzes gilt der R_{merge} (*residual factor*) (Gleichung 3-10), wobei $I(h,i)$ die Intensität der i -ten Messung des Reflexes (h,k,l) und $\langle I(h) \rangle$ der korrespondierende Mittelwert des Reflexes (h,k,l) über alle Messungen i einer Punktgruppe ist (Gleichung 3-10):

$$R_{merge} = \frac{\sum_h \sum_i \left| I(h,i) - \langle I(h) \rangle \right|}{\sum_h \sum_i I(h,i)} \quad \text{mit} \quad \rho = \begin{pmatrix} h \\ k \\ l \end{pmatrix} \quad (3-10)$$

3.4.7. Bestimmung des Lösungsmittelgehalts von Proteinkristallen

Zur Bestimmung des Lösungsmittelgehalts eines Proteinkristalls wurde die Methode nach Matthews (Matthews, 1968) angewendet. Nach der Gleichung (3-11)

$$V_M = \frac{V_{EZ}}{M_r \cdot z \cdot n} \quad (3-11)$$

berechnet sich der Packungsparameter V_M (Matthews-Koeffizient) aus dem Volumen der Einheitszelle V_{EZ} dividiert durch die Molekularmasse M_r des Proteins in der Einheitszelle, der Zahl der Moleküle n in der Einheitszelle und der Zähligkeit z der Punktlage. Bei Kenntnis von V_M kann der Lösungsmittelgehalt nach Gleichung (3-12) näherungsweise berechnet werden:

$$\chi = \left(1 - \frac{1,23}{V_M} \right) \cdot 100 \quad (3-12)$$

In der Praxis wird der Matthews-Koeffizient mit empirisch bestimmten Werten verglichen und einer bestimmten Anzahl von Molekülen in der asymmetrischen Einheit zugewiesen, bei der der Solvensgehalt in einem für Proteinkristalle vernünftigen Rahmen liegt (V_M 1,6-3,5 $\text{\AA}^3/\text{Da}$ bei 40-75 % Solvensgehalt).

3.4.8. Die Lösung des Phasenproblems

Aus einem Röntgenbeugungsexperiment an einem nativen Proteinkristall können über die Reflexintensitäten nur die Amplituden der Strukturaktoren $F_{(hkl)}$ bestimmt werden, die Information über die zugehörigen Phasenwinkel α_{hkl} aber, die zur Berechnung einer Elektronendichteverteilung in einem Proteinkristall benötigt werden, geht verloren. Zu deren Bestimmung werden in der Proteinkristallographie die Methoden der Multiplen Anomalen Dispersion (MAD) des Multiplen Isomorphen Ersatzes (MIR), des Molekularen Ersatzes (*Molecular Replacement*, MR) und auch in seltenen Fällen direkte Methoden (*ab initio*) herangezogen. Da im Rahmen dieser Arbeit die ersten drei Verfahren zur Strukturlösung zum Einsatz kamen, sollen sie im folgenden kurz umrissen werden, wobei auch hier für umfassendere Beschreibungen auf die oben angeführten Lehrbücher und Artikel verwiesen sei.

3.4.9. Strukturlösung mittels Multiplen Isomorphen Ersatzes (MIR)

Der isomorphe Ersatz (Green *et al.*, 1954) bezeichnet ein Verfahren, bei dem eine lokale Änderung in der Elektronendichteverteilung eines Kristalls durch die Anwesenheit eines Schweratoms herbeigeführt wird, ohne daß sich dabei die dreidimensionale Struktur des Proteins und damit die Symmetrie des Kristalls verändert (Isomorphie).

3.4.9.1. Derivat-Suche

Viele Proteine enthalten von Natur aus Schwermetalle als Liganden oder als Bestandteile von Kofaktoren, z.B. Metallo-Proteasen Nickel oder Zink, Molybdoenzyme Molybdän, Oxidoreduktasen und Charge-Transfer-Komplexe Eisen-Schwefel-Cluster. Enthält ein Protein keine natürlichen Schweratome, können Schweratom-Derivate von Proteinen dadurch erzeugt werden, daß die nativen Proteinkristalle in Puffer einlegt werden, in denen zuvor Schwermetallsalze in definierter Konzentration gelöst wurden (*Soaking*, siehe Kap. 3.4.1.3.). Die Schweratome binden dann an das Protein an definierten Positionen durch ionische Wechselwirkungen z.B. mit Carboxyl-Gruppen von sauren Aminosäuren, indem sie z.B. mit Cystein-Seitenketten (Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+}) kovalent reagieren, oder sie werden als metallorganische Komplexe oder große anorganische Cluster an der Proteinoberfläche adsorbiert (z.B. Tantalbromid). Eine weitere häufig angewendete Möglichkeit besteht in der Erzeugung eines Seleno-Methionin-Derivats des gewünschten Proteins, indem in Methionin-auxotrophen Bakterienstämmen durch Zugabe von Seleno-Methionin dessen Einbau in die Aminosäurekette erzwungen wird und somit das Derivat exprimiert, isoliert und zur Kristallisation gebracht werden kann.

3.4.9.2. Differenz-Patterson-Analyse und MIR-Phasierung

Durch die lokale Änderung der Struktur um eine bestimmte Anzahl streuender Elektronen ändert sich der Strukturfaktor des nativen Proteins F_P um den Strukturfaktor des Schwermetallatoms F_H (Gleichung 3-13):

$$F_{PH} = F_P + F_H \quad (3-13)$$

Die Positionen der Schweratome, die zur Berechnung von deren Strukturfaktoren notwendig sind, werden über eine *Differenz-Patterson-Funktion* (siehe Gleichung 3-13) aus dem nativen Proteinkristall und dem Schweratomderivat bestimmt. Diese stellt eine Fouriertransformation mit den Koeffizienten $(|F_{PH}| - |F_P|)^2$ und einem Phasenwinkel von Null dar. Ihre Maxima (Pe-

Lagen sowie die Berechnung initialer Proteinphasen mit dem Programm MLPHARE (CCP4, 1994) durchgeführt.

3.4.10. Strukturlösung mittels Multipler Anomaler Dispersion (MAD)

Die MAD-Technik hat sich in den letzten Jahren aufgrund ihrer schnellen und einfachen Durchführbarkeit und der zunehmenden Verfügbarkeit von Synchrotron-Stahlung zu einer sehr leistungsfähigen Standardmethode in der Röntgenkristallographie entwickelt. Man benutzt hierbei den Effekt, daß durch Wechselwirkungen der Röntgenstrahlung mit dem Kern eines Schweratoms im Proteinkristall zu den realen (*dispersiven*) Streubeiträgen zusätzliche Phasenverschiebungen entstehen. Da die Beträge der *anormalen* Streubeiträge abhängig von der Wellenlänge der einfallenden Röntgenstrahlung sind, mißt man drei Datensätze desselben Kristalls an der Absorptionskante bei unterschiedlichen Wellenlängen, um sowohl die Beträge der *dispersiven* als auch der *anormalen* Differenzen zu maximieren: bei minimalem f' , maximalem f'' sowie *remote*, weit weg von der Absorptionskante, wo die anomalen Effekte sehr klein sind. Da sowohl *dispersive* als auch *anomale* Differenzen proportional zu den Strukturfaktoramplituden des Schweratoms im Protein sind, kann man sie dazu benutzen, die Positionen der Schweratome zu bestimmen.

Neben dem praktisch nicht vorhandenen Phasenfehler durch Nicht-Isomorphie (es werden alle Datensätze an nur einem einzigem Kristall aufgenommen, was zu ausgezeichneten Phasen führt), bietet die MAD-Technik den Vorteil, daß nur die Streukraft des Kristalls der begrenzende Faktor für die Auflösung der gewonnenen Phasen ist, da die Beiträge der *anormalen* Dispersion im gesamten Auflösungsbereich praktisch konstant sind.

Die für MAD-Messungen benötigten derivatisierten Kristalle wurden wie oben beschrieben (Kap 3.4.1.3.) durch Einlegen in eine Tantalbromid-Cryopufferlösung (5 mM, 3h, 16 °C) präpariert. Die Messungen wurden an der BW6/HASYLAB des DESY/Hamburg durchgeführt, die Datensätze wie oben beschrieben ausgewertet und danach mit den Programmen SCALA und CAD (CCP4, 1994) skaliert. Die Identifizierung und Verifizierung von Schweratompositionen wurde mit dem Programm RSPS (CCP4, 1994), die Verfeinerung der Lagen sowie die Berechnung initialer Proteinphasen und Elektronendichtekarten mit dem Programm SHARP (de la Fortelle und Bricogne, 1997) durchgeführt.

3.4.11. Strukturlösung durch Molekularen Ersatz

3.4.11.1. Grundlagen des Molekularen Ersatzes

Bei der Methode des Molekularen Ersatzes („*Molecular Replacement*“, MR) wird die notwendige Phaseninformation dadurch erhalten, daß ein hinreichend ähnliches Atommodell einer bekannten Kristallstruktur (Standardabweichung weniger als 1 Å für die C α -Atome) in einer *Patterson*-Suche eingesetzt wird. Nach korrekter Positionierung des Suchmodells können die Phasen α_{calc} aus den Koordinaten des Suchmodells berechnet werden. Mit diesen sogenannten Modellphasen und den experimentell erhaltenen Strukturfaktoramplituden F_{obs} wird eine Elektronendichtekarte (*Patterson*-Dichte) $P(uvw)$ für die zu bestimmende Kristallstruktur errechnet. Zur Positionierung des Suchmodells innerhalb der Einheitszelle wird die *Pattersonfunktion* benutzt (Gleichung 3-14):

$$P(u) = P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}|^2 \cos(2\pi[hu + kv + lw]) \quad (3-14)$$

Die *Pattersonfunktion* enthält die Information über alle intramolekularen Vektoren $u=(u, v, w)$, die einem interatomaren Abstand von einem Atom an der Position $r=(x, y, z)$ zu einem Atom an der Position $r+u$ innerhalb eines Moleküls beschreiben. Da sich im Normalfall Raumgruppe und Orientierung des Suchmodells in der Einheitszelle von der gesuchten Struktur unterscheiden, muß das bekannte Atommodell korrekt in der Einheitszelle der unbekanntes Struktur plziert und orientiert werden. Im allgemeinen ergeben sich dabei drei Freiheitsgrade der Translation und drei Freiheitsgrade der Rotation, also insgesamt eine Suche im sechsdimensionalen Raum. Die ist zwar prinzipiell rechnerisch möglich, erfordert aber einen immensen Rechenaufwand, so daß in der Praxis die Suche nach Rotations- und Translationslösungen getrennt erfolgt, und so das Problem auf drei Freiheitsgrade reduziert wird.

Das Prinzip der Pattersonsuche beruht darauf, daß das Suchmodell in einer dreidimensionalen Suche jeweils um kleine Winkelinkremente gedreht wird und von jeder der resultierenden Orientierungen Strukturfaktoren F_{calc} und daraus eine *Patterson*-Dichte bzw. *Patterson*-Vektoren gerechnet werden. Diese werden mit der *Patterson*-Dichte/-Vektoren des gemessenen Datensatzes $|F_{obs}|$ verglichen und die Übereinstimmung mit Hilfe des *Korrelationskoeffizienten* $C_{|F_{obs}|^2, |F_{calc}|^2}$ quantisiert.

Mit den besten Lösungen aus der Rotationssuche (die höchsten Peaks für *C*) wird die Translationsuche gestartet. Hierbei wird das Suchmodell wieder in Inkrementen in allen drei Raumrichtungen durch die Einheitszelle des gemessenen Datensatzes geschoben, wobei die Kreuzvektoren zwischen den verschiedenen Molekülen herangezogen werden. Die Bewertung der gefundenen Lösungen erfolgt hier sowohl durch den Korrelationskoeffizienten als auch durch den kristallographischen *R*-Faktor.

3.4.11.2. Durchführung

Für die Strukturlösung der Produkt- und Inhibitor-Komplexe von ATP-Sulfurylase mittels *molecular replacement* wurden von den Koordinaten der nativen ATP-Sulfurylase-Struktur die Aminosäuren 2-330 als Suchmodell verwendet und damit mit dem Programm MOLREP (CCP4, 1994) in einem Auflösungsbereich von 15,0-5,0 Å zuerst die Rotationsfunktion und dann mit der besten Lösung daraus die Translationsfunktion berechnet. Die finale Lösung aus Rotations- und Translationsuche wurde mit einer *rigid-body*-Verfeinerung verbessert, manuell mit den Aminosäuren 331-511 vervollständigt und anschließend mit dem Programm *refine* aus dem CNS V1.0-Programmpaket einem *simulated annealing*, *positional refinement* und *B-factor refinement* (siehe auch Kapitel 3.4.13.3) unterworfen.

3.4.12. Modifikation der Elektronendichte

In vielen Fällen sind die experimentell gewonnenen Phasen für die Interpretation der Elektronendichte nicht hinreichend gut, so daß zu rechnerischen Mitteln der Phasenverbesserung gegriffen werden muß. Diese Methoden sind sehr zahlreich, lassen sich oftmals miteinander kombinieren und sind häufig zyklisch anwendbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf Dichtemodifikation durch *Solvent flattening* und Phasenkombination mit Modellphasen zurückgegriffen. Beim *Solvent flattening* kann durch zyklisches Mitteln der Elektronendichte und Abschneiden des Lösungsmittelbereichs um das Protein das Signal-Rausch-Verhältnis und damit die Qualität der experimentellen MIR-Dichte erheblich verbessert werden. Eine Erweiterung des *Solvent flattening* ist das *Solvent flipping*, das mit dem Programm SOLOMON (CCP4, 1994) in jeweils 30 Zyklen durchgeführt wurde.

3.4.13. Modellbau und Verfeinerung

3.4.13.1. Modellbau – Erstellung des Strukturmodells

Aus den Strukturfaktoramplituden $|F_{hkl}|$ des nativen Datensatzes und den Phasen der MIR-Phasierung wird durch die Fouriertransformation (Gleichung 3-9) eine Elektronendichtekarte berechnet. Sind die Phasen gut genug, um in der Elektronendichte Sekundärstrukturelemente des Proteins oder den Verlauf der Hauptkette zu erkennen, wird das Strukturmodell unter Verwendung des Programms MAIN (Turk, 1992) in die Elektronendichtekarte manuell eingepaßt und anschließend verfeinert.

Wird wie z.B. im Falle der Produktkomplexe von ATP-Sulfurylase eine *Replacement*-Lösung verwendet, so werden mit Hilfe der verfeinerten Koordinaten des aus der *Patterson*-Suche gewonnenen Modells die Phasen und anschließend durch Fouriertransformation eine Elektronendichtekarte berechnet. Damit läßt sich die restliche, noch nicht durch das Suchmodell definierte Proteinkette vervollständigen und die im Vergleich zum Suchmodell veränderten Haupt- und Seitenketten neu positionieren. Abschließend werden nach computergestützter Verfeinerung des Proteinmodells (Kap. 3.4.13.3.) Lösungsmittel- und andere Kleinmoleküle (Produkt-/Inhibitormoleküle) eingebaut.

3.4.13.2. Phasenkombination

Zu Beginn des Modellbaus in die durch *Solvent flipping* modifizierte MIR-Elektronendichte der nativen ATP-Sulfurylase wurden zunächst erste Sekundärstrukturelemente als kürzere Poly-Alanin-Fragmente eingebaut, die im weiteren Verlauf zu der vollständigen Peptidkette mit der richtigen Aminosäuresequenz vervollständigt wurden. Dies war allerdings mit der initialen Dichte aufgrund deren mangelhaften Qualität nicht möglich. Mit Hilfe des bereits eingebauten Poly-Alanin-Teilmodells und der Strukturfaktoramplituden des nativen Datensatzes konnten mit den CCP4-Programmen SFALL Modellphasen errechnet und mit CAD und SIGMAA mit den experimentell gewonnenen Phasen kombiniert werden. Unter Phasenexpansion auf die Auflösung des nativen Datensatzes wurde so unter zyklischem *Solvent flipping* mit SOLOMON die Phasen verbessert und eine optimierte Elektronendichtekarte erstellt. Damit gelang es erstmals, signifikante Seitenketten (Tryptophane, Tyrosine, Phenylalanine) bestimmten Aminosäuren zuzuordnen und so die Primärstruktur in der Elektronendichte zu identifizieren und zu fixieren. Modellbau, Verfeinerung des Modells gegen die experimentellen Strukturfaktoramplituden und Phasenkombination wurden in dieser Phase des ‚Bau‘-Prozesses alternierend durchgeführt, so daß die korrekten Seitenketten schrittweise eingebaut und das Strukturmodell auf diese Weise vervollständigt werden konnte.

3.4.13.3. Verfeinerung

Modellbau und Verfeinerung des Strukturmodells gegen die experimentellen Strukturfaktoramplituden erfolgt in der Regel in einem zyklisch alternierenden Prozeß, der normalerweise bis zur Konvergenz durchgeführt wird. Unter Berücksichtigung der erlaubten Geometrien und deren Kraftfelder (Engh und Huber-Parameter für Bindungswinkel und -längen, Engh and Huber, 1991) wird dabei versucht, die Differenz zwischen den aus dem atomaren Modell berechneten Strukturfaktoramplituden $|F_{calc}|$ und den experimentell bestimmten Strukturfaktoramplituden $|F_{obs}|$ zu minimieren. Dabei werden sowohl die Positionen der einzelnen Atome optimiert (*positional refinement*) als auch die *B*-Faktoren angepaßt (*B-factor refinement*). Häufig wird auch ein sogenanntes *simulated annealing* durchgeführt, bei dem das Proteinmolekül virtuell auf 5000 K erhitzt und dann langsam abgekühlt wird, so daß die Atome aus lokalen Minima in eine optimierte Gleichgewichtsposition fallen. Als Zielfunktion wird bei allen Verfeinerungsschritten der kristallographische *R*-Faktor minimiert (Gleichung 3-15):

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{obs,hkl}| - k |F_{calc,hkl}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{obs,hkl}|} \quad (3-15)$$

k ist hierbei ein Skalierungsfaktor zwischen Modell- und experimentellen Strukturfaktoramplituden. Bei sinnvoller Geometrie (statistisch analysiert durch Programme wie PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993)) werden in der Proteinkristallographie *R*-Faktoren nahe bei oder unter 20 % als optimal erachtet. Neben dem kristallographischen *R*-Faktor R_{cryst} als wesentliches Kriterium für die Qualität gilt der freie *R*-Faktor R_{free} (Brünger, 1991) zur Beurteilung des „realen“ Charakters des Modells. Zur Berechnung des R_{free} wird nur ein Prozentsatz von 5 % der beobachteten Reflexe zufällig aus dem Datensatz ausgewählt und als *test set* verwendet. Der so berechnete freie *R*-Faktor liegt im Regelfall ca. 5 % höher als der kristallographische *R*-Faktor und warnt dabei vor einer Überanpassung der Daten. Mit den optimierten Atomkoordinaten des Strukturmodells wurde dann eine neue, verbesserte Elektronendichtekarte berechnet.

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Verfeinerungs- und Minimierungsschritte wurden Programme des CNS V1.0-Pakets (Brunger *et al.*, 1998) benutzt. In allen analysierten Strukturmodellen wurden im finalen Stadium der Strukturanalyse iterativ Lösungsmittelmoleküle (Wasser, Acetat, Sulfat) und Metallionen in die Elektronendichte eingebaut und zusammen

mit dem Proteinmodell erneut verfeinert. Wassermoleküle wurden dabei erst vollautomatisch unter Beachtung von Abstands- und *B*-Faktor-Kriterien durch CNS-Programme eingefügt und dann am Graphikdisplay anhand der Differenz-Fourier-Elektronendichtekarte $F_{obs}-F_{calc}$ bei einer positiven Konturierung von 2σ von Hand überprüft. Homologiesuchen, Überlagerungen und *least-square-fits* von Koordinaten wurden mit TOP (Lu, 2000) durchgeführt.

3.5. Molecular Modelling

Mit Hilfe der Methode des *Molecular Modelling* konnte in dieser Arbeit das Strukturmodell für den Substratkomplex der ATP-Sulfurylase mit ATP und Sulfat erstellt werden. Dazu wurden aus dem nativen Datensatz die Koordinaten für das Sulfatmolekül entnommen und an derselben Position mit derselben Orientierung im aktiven Zentrum des Proteinmodells des binären Produktkomplexes plaziert. Ein mit Hilfe des Programms SYBYL (Tripos Inc., St. Louis, MO) erstelltes ATP-Molekül wurde anschließend in der Bindetasche anstelle des Produktmoleküls APS eingebaut. Nach Berechnung der Partiaalladungen der Atome in einem Umkreis von 12 Å um das ATP-Molekül wurde mit den geeigneten Topologien und Parametern für die Bindungslängen und -winkel unter Beachtung der elektrostatischen, sterischen und *Van-der-Waals*-Wechselwirkungen mit den Aminosäuren die Atomkoordinaten energie-minimiert. Diese Minimierung erfolgte in 1000 Zyklen und erlaubte Freiheitsgrade für mögliche Konformationswechsel der Seitenketten und *rigid body*-Bewegungen der einzelnen Protein-Domänen.

3.6. Graphische Darstellungen

Aminosäuresequenzen wurden in der SWISSPROT/TREMBL-Suchmaschine aus der EMBL-Datenbank und der Genbank entnommen und Sequenzvergleiche mit dem CGC-Programmpaket (GCG, 1994) durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mit ALSCRIPT (Barton, 1993) und CorelDRAW (Corel Corporation Limited, 1998). Zeichnungen und graphische Darstellung von Strukturmodellen wurden mit den Programmen BOBSCRIPT (Esnouf, 1997), MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), Raster3D (Merritt and Murphy, 1994), CorelDRAW (Corel Corporation Limited, 1998) und LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995) benutzt. Oberflächen wurden mit den Programmen WEBLABVIEWER (www.msi.com) erzeugt. Zur

Nachbearbeitung von Bildern, sowie zu deren Konvertierung kamen die Programme PHOTOSHOP (Adobe Systems Inc., USA) und CORELDRAW zur Anwendung.

4. Ergebnisse

4.1. Proteinreinigung

Die Isolierung der ATP-Sulfurylase aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte nach einem mehrstufigen Protokoll mit vier Säulenchromatographieschritten, das auf einem bereits beschriebenen Verfahren (Groll *et al.*, 1997) aufgebaut ist, für die Präparation von ATP-Sulfurylase aber weiterentwickelt wurde. Aus einer 10 l-Batch-Fermentation konnten nach 72 h im Durchschnitt ca. 300 g Hefezellen gewonnen werden, die analog einem 500 g-Block Preßhefe für eine Aufreinigung verwendet wurden. Aus einer Präparation konnten durchschnittlich 5-10 mg zu Homogenität gereinigtes Enzym isoliert werden. Nach der Zellyse und anschließender Zentrifugation und Ultrazentrifugation des Rohlysats wurde der klare, gelbe Überstand auf eine Q-Sepharose-FF-Anionenaustauschersäule aufgetragen. Die Elution der ATP-Sulfurylase erfolgte bei ca. 300 mM eines 250-800 mM NaCl-Gradienten. Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die ATP-Sulfurylase enthaltenden Fraktionen identifiziert (Abbildung 6) und danach vereinigt:

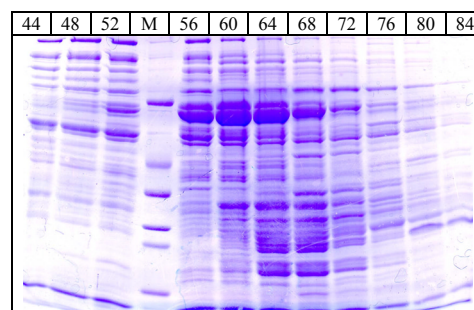


Abbildung 6: 12 %iges, *Coomassie*-gefärbtes SDS-Gel von den Fraktionen 44 bis 84 nach der Elution von der Q-Sepharose-FF-Anionenaustauschersäule. Starke ATP-Sulfurylase-Banden sind in den Fraktionen 56-68 bei ca. 58 kDa zu erkennen (M Protein-Standardmarker: 66, 45, 36, 29, 24,14 kDa).

Die anschließend durchgeführte Affinitätschromatographie mit einer keramischen Hydroxylapatit-Säule funktionierte im wesentlichen als Ausschlußchromatographie, da die ATP-Sulfurylase schon kurz nach Anlegen des Kaliumphosphat-Gradienten (10-350 mM) bei 20 mM Kaliumphosphat pH 7,5 von der Säule eluierte und so der gewünschte Trennungseffekt erzielt wurde. Aus dem SDS-Gel (Abbildung 7) ist ersichtlich, daß dieser zweite Trennungsschritt schon zu hohem Reinheitsgrad der ATP-Sulfurylase führte und nur eine verbleibende,

zweite starke Bande oberhalb der ATP-Sulfurylase bei ca. 60 kDa noch abgetrennt werden mußte.

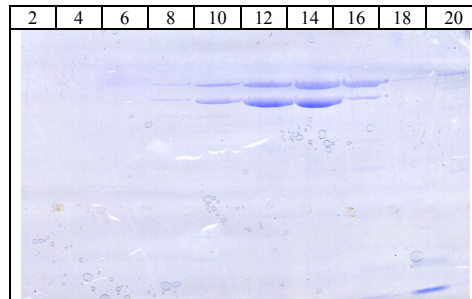


Abbildung 7: Das 12 %ige, *Coomassie*-gefärbte SDS-Gel zeigt die charakteristische „Doppelbande“ von Hsp60 und ATP-Sulfurylase, die beim Eluieren von der keramischen Hydroxylapatit-säule auftrat.

Dazu wurde nach Umpuffern und Einengen der vereinigten Fraktionen die Proteinlösung einem weiteren Chromatographieschritt mit *Reactive Red* Agarose 120 und Puffer C unterworfen. Der *Reactive Red*-Farbstoff ist in der Lage, mit nukleotidbindenden Enzymen zu wechselwirken, so daß diese an der Matrix reversibel adsorbiert und mit einem Salzgradienten wieder eluiert werden können. Nach der Elution bei ca. 450 mM eines 0-1000 mM NaCl-Gradienten in Puffer C, lag die ATP-Sulfurylase bereits in hoher Reinheit vor.

Abschließend wurde die Enzymlösung zur Endreinigung nach Umpuffern auf Puffer A und erneutem Einengen einem präparativen Gelfiltrationsschritt mit Hilfe einer Superose-6-Säule und einer FPLC-Anlage unterworfen, der die ATP-Sulfurylase in nahezu vollständiger Reinheit lieferte (Abbildung 8).

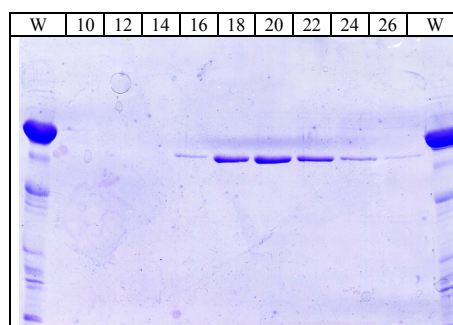


Abbildung 8: Das 12 %ige, *Coomassie*-gefärbte SDS-Gel nach der Affinitätschromatographie mit *Reactive Red* Agarose 120. ATP-Sulfurylase liegt schon sehr homogen als einzelne Bande vor. (Laufspuren W: Pool der Hochsalz-Elution. Die dicke Bande bei 60 kDa ist Hsp60).

Während die SDS-Gele im Verlauf der Reinigung schon ein Molekulargewicht von ca. 58 kDa für das Protomer der ATP-Sulfurylase zeigten (Literaturwert aus der EMBL-Datenbank 59,1 kDa), ergab eine analytisch durchgeführte Gelfiltration mit der Superose-6-Säule und geringerer Proteinkonzentration ein Partikelgröße von ca. 350-400 kDa. Dieses Molekulargewicht deutete bereits darauf hin, daß das Enzym als homohexamerer Komplex vorliegt, was durch die Beobachtung hexamerer Partikel bereits in früheren Arbeiten vorgeschlagen wurde (Foster *et al.*, 1994). Eine N-terminale Sequenzanalyse aus einem Blot des Rohlysats als auch abschließend aus einer Proteinprobe der Gelfiltration stimmte mit der in der EMBL-Datenbank hinterlegten Sequenz des Hefestammes S288C/FY1679 (de Haan *et al.*, 1995) überein und bestätigte damit endgültig das Vorliegen von ATP-Sulfurylase in der Präparation.

4.2. Kristallisation

Die Kristallisationsexperimente mit gereinigter ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* wurden nach der Dampfdiffusionsmethode im *hanging drop*-Verfahren durchgeführt und führten nach Optimierung der Parameter zu einer finalen Kristallisationsbedingung (Abbildung 9A). Nach Vermischen von Proteinlösung mit einer Konzentration von 20 mg/ml mit der Präzipitanslösung (500 mM Natriumacetat, 50 mM HEPES/HCl pH 7,5, 25 mM Cadmiumsulfat) im Verhältnis 2:1 wurden nach zwei Tagen trigonale Kristalle mit einer maximalen Größe von $0,5 \times 0,5 \times 0,3 \text{ mm}^3$ erhalten (Abbildung 9B und C).

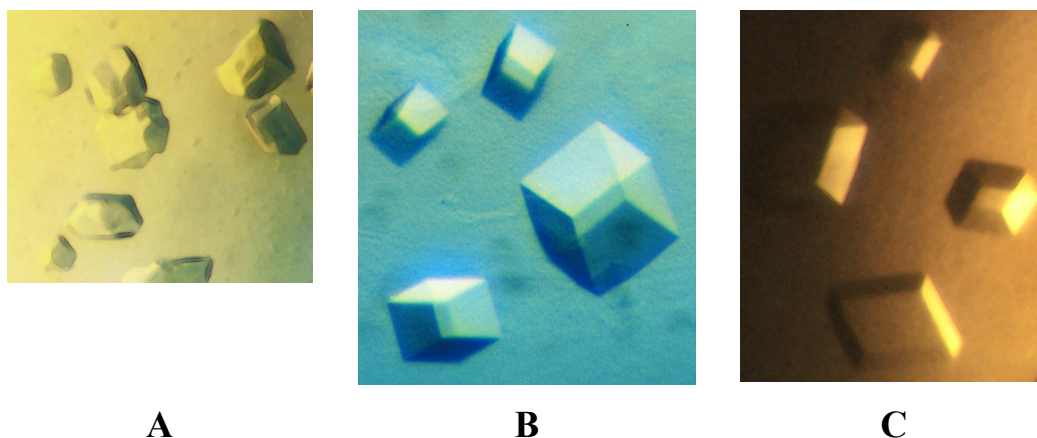


Abbildung 9: Abbildung (A) zeigt die aus den ersten *Screens* erhaltenen trigonalen Kristalle mit Dimensionen von ca. 0,2 mm in alle drei Raumrichtungen. Die Kristalle in (B) und (C) sind mit der verfeinerten, finalen Kristallbedingung gezüchtet worden und zeigen Dimensionen von $0,5 \times 0,5 \times 0,3 \text{ mm}^3$.

Diese Kristalle gehörten zu der Raumgruppe R32 und streuten *in house* maximal bis 2,5 Å und Synchrotronstrahlung bis maximal 1,95 Å. Mit den erhaltenen Zellparametern und dem Molekulargewicht von 58 kDa konnte für die nativen Kristalle eine Untereinheit der ATP-Sulfurylase pro asymmetrische Einheit berechnet werden, während die Produktkomplexe und der ADP-Komplex mit einer nahezu verdoppelten c-Achse zwei Protomere pro asymmetrischer Einheit bei einem Matthews-Koeffizient (Matthews, 1968) von 3,38 Å³/Da und einem Lösungsmittelgehalt des Kristalls von 64 % enthielten.

4.3. Datensammlung

Erste Beugungsbilder mit schockgefrorenen Kristallen und ein erster nativer Datensatz mit einer Auflösung von 2,6 Å wurde *in house* am Max-Planck-Institut mit einem Drehanodengenerator und einem *Image Plate* Detektor unter Benutzung der Cryo-Technik aufgenommen. Der mit 1,95 Å höchstauflöste, native Datensatz *NATIV* (Abbildung 10) wurde zusammen mit den MAD-Datensätzen des Tantalbromid-Derivats an der Wiggler Beamline BW6 (HASYLAB) am DESY/Hamburg unter Verwendung eines CCD Detektors aufgenommen. Alle weiteren Datensätze (Schweratomderivate, Produkt- und Inhibitorkomplexe) wurden wiederum am Max-Planck-Institut aufgenommen. Die Diffraktionsbilder wurden mit dem Programm MOSFLM V6.01 (Leslie, 1991) prozessiert und mit dem Programmen SCALA und TRUNCATE (CCP4, 1994) skaliert und reduziert. Die Statistiken aller Datensätze sind in den Tabellen I, II und III zusammengefaßt.

Tabelle I : Statistik der Datensammlung für die Datensätze zur Strukturlösung sowie für den binären und ternären Produktkomplex (APS und PP_i). In Klammern stehen jeweils die Werte für die äußerste Schale.

	<i>NATIV</i>	<i>TABRI</i>	<i>HGI</i>	<i>URA</i>	<i>E•APS</i>	<i>E•APS•PP_i</i>
Substanz		Ta ₁₂ Br ₁₄	Thiomersal	UO ₂ Ac ₂	MgATPγs	MgATPγs/ KClO ₃
Konzentration (mM)		5	10	5	5	5/10
<i>Soaking</i> Zeit (h)		12	12	3	3	3
Ass. Monomere	1	1	1	1	2	2
Wellenlänge (Å)	1,04	1,2539	1,54	1,54	1,54	1,54
Begrenzende Auflösung (Å)	1,95	2,2	2,5	2,7	2,6	2,8
Unabhängige Reflexe	55315	35064	26716	21297	45486	35298
Äußerste Schale (Å)	1,95-2,07	2,2-2,37	2,5-2,64	2,7-2,85	2,6-2,76	2,8-2,98
Vollständigkeit (%)	98,3 (98,6)	96,3 (96,3)	98,8 (98,8)	99,6 (99,9)	99,5 (97,3)	95,5 (97,1)
Redundanz	3,8 (3,7)	8,5 (8,3)	3,8 (3,7)	5,3 (5,3)	6,0 (5,6)	4,1 (3,8)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	9,3 (2,7)	7,4 (1,5)	6,5 (1,1)	5,6 (1,8)	6,4 (1,8)	5,8 (1,6)
R _{merge}	5,1 (28,0)	6,8 (40,2)	9,6 (64,6)	12,2 (40,5)	11,0 (41,3)	12,8 (42,8)
Phasing power	-	1,04	0,32	0,89	-	-
Schweratompositionen	-	1	1	1	-	-

Tabelle II: Verfeinerungsstatistik für die Strukturmodelle des Apoenzyms, des binären und des ternären Produktkomplexes

	<i>Apoenzym</i>	<i>E•APS</i>	<i>E•APS•PP_i</i>
Raumgruppe	R32	R32	R32
Auflösungsbereich (Å)	20,0 – 1,95	25,0 – 2,6	25,0 – 2,8
Reflexe im <i>working set</i>	55 315	45 468	35298
Reflexe im <i>test set</i>	2835	2337	1801
R_{cryst} (%)	19,7	17,6	19,3
R_{free} (%)	23,2	22,7	24,4
Proteinatome (ohne Wasserstoffe)	4077	8154	8154
Nucleotidatome	-	54	63
Sonstige Atome	73	120	120
Wassermoleküle	566	763	600
Mittlerer <i>B</i> -Faktor (Å ²)	35,4	35,1	35,9
RMS-Abweichungen			
Bindungslängen (Å)	0,0104	0,0097	0,0068
Bindungswinkel (°)	1,49	1,56	1,32

Die Raumgruppe für alle Kristalle ist R32 mit $a=b=90^\circ$ und $c=120^\circ$. Zellkonstanten: Apoenzym: $a=b=187,1 \text{ \AA}$, $c=115,90 \text{ \AA}$; *E•APS*: $a=b=185,9 \text{ \AA}$, $c=223,7 \text{ \AA}$; *E•APS•PP_i*: $a=b=186,0 \text{ \AA}$, $c=223,7 \text{ \AA}$;

Table III: Statistik zur Datensammlung und Verfeinerung für die Datensätze der Inhibitor Komplexe von ATP-Sulfurylase. In Klammern stehen jeweils die Werte für die äußerste Schale.

<i>Inhibitor Komplex mit</i>	<i>Thiosulfat</i>	<i>ADP</i>	<i>Chlorat</i>
Datensammlung			
Substanzen	Thiosulfate	MgADP	MgATP γ S/KClO ₃
Konzentration (mM)	25	5	5/10
<i>Soaking</i> Zeit (h)	3	3	3
Ass. Monomere	1	2	2
Begrenzende Auflösung (Å)	2,5	2,95	2,8
Unabhängige Reflexe	26794	31442	35268
Äußerste Schale (Å)	2,5 – 2,66	2,95 – 3,13	2,8 – 2,95
Vollständigkeit (%)	99,8 (99,5)	99,8 (99,9)	98,5 (97,3)
Redundanz	5,5 (5,5)	5,5 (5,4)	4,1 (3,8)
$I/\sigma I$	7,6 (1,7)	4,2 (1,7)	6,2 (1,8)
R_{merge}	9,0 (43,7)	15,2 (40,2)	11,1 (42,0)
Verfeinerungsstatistik			
Raumgruppe	R32	R32	R32
Auflösungsbereich (Å)	25,0 – 2,5	25,0 – 2,95	25,0 – 2,8
Reflexe im <i>working set</i>	25410	29765	33184
Reflexe im <i>test set</i>	1384	1616	1800
R_{cryst} (%)	17,8	19,2	18,4
R_{free} (%)	23,6	22,7	23,2
Proteinatome (ohne Wasserstoffe)	4075	8150	8150
Nucleotidatome	-	54	72
Sonstige Atome	72	109	115
Wassermoleküle	438	564	570
Mittlerer <i>B</i> -Faktor (Å ²)	34,8	30,2	34,7
RMS-Abweichungen			
Bindungslängen (Å)	0,0103	0,0095	0,0103
Bindungswinkel	1,53	1,54	1,52

Die Raumgruppe für alle Kristalle ist R32 mit $a=b=90^\circ$ und $c=120^\circ$. Zellkonstanten: Thiosulfat $a=b=186,69 \text{ \AA}$, $c=115,90 \text{ \AA}$; ADP: $a=b=186,14 \text{ \AA}$, $c=223,14 \text{ \AA}$; Chlorat: $a=b=185,94 \text{ \AA}$, $c=223,82 \text{ \AA}$;

$$R_{\text{sym}} = \sum |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum \langle I(h) \rangle, R_{\text{cryst, free}} = \sum (|F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|) / \sum |F_{\text{obs}}|$$

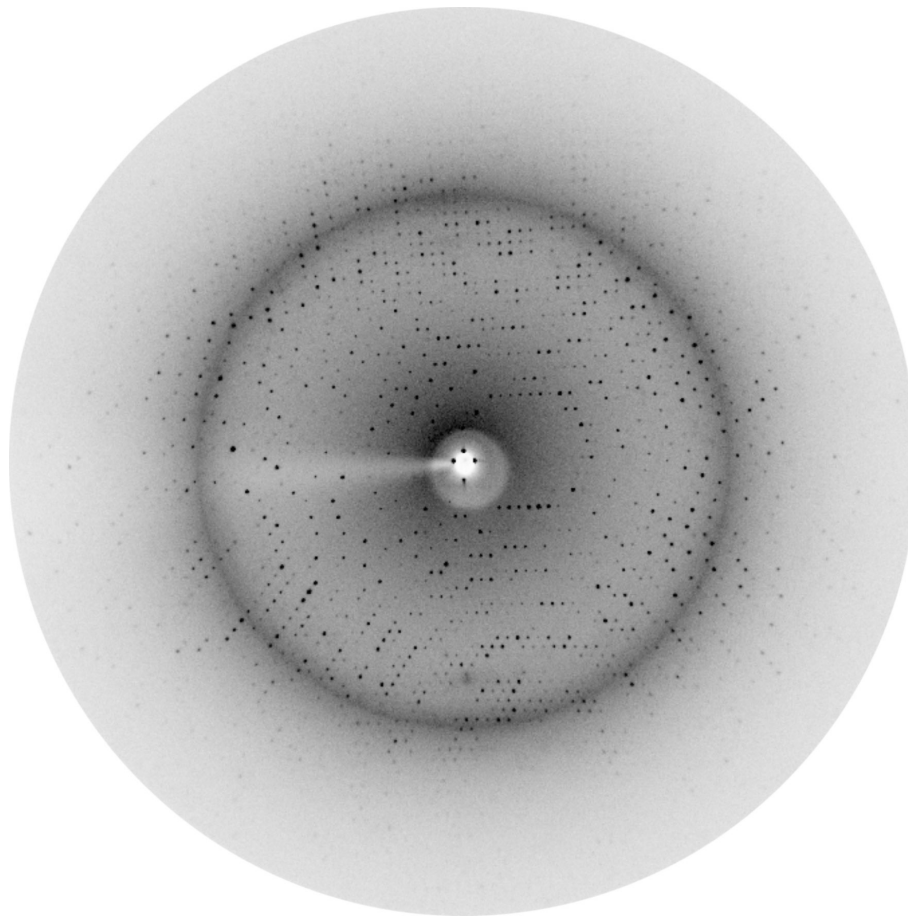


Abbildung 10: Diffractionsbild eines nativen ATP-Sulfurylase-Kristalls, aufgenommen an der Wiggler-Beamline am DESY in Hamburg. Maximale Auflösung am Plattenrand: 1,95 Å. Wellenlänge: $\lambda = 1,04$ Å.

4.4. Strukturlösung mittels Multipler Anomaler Dispersion

Zuerst wurde versucht, mittels der Methode der Multiplen Anomalen Dispersion (MAD) Phaseninformation zur Lösung der dreidimensionalen, atomaren Struktur von ATP-Sulfurylase zu erhalten. Das dazu benötigte Schweratomderivat des Proteins wurde durch dreistündiges Einlegen eines Kristalls in einen mit Tantalbromid ($\text{Ta}_6\text{Br}_{14}$) gesättigten Cryo-Puffer erhalten. Tantalbromid eignet sich besonders gut für die MAD-Phasierung, da der $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}^{2+}$ -Cluster eine sehr hohe Anzahl an Elektronen auf geringem Raum enthält und sich aufgrund seiner hoch geordneten 18 Atome durch Differenz-Patterson-Analyse sehr gut im Gitter des Proteinkristalls lokalisieren und orientieren läßt. Durch die auffällige, tiefgrüne Färbung des Kristalls konnte eine Wechselwirkung des Proteins bereits vor dem Messen festgestellt und mit einem *in house* gemessenen Datensatz bei 4 Å die Position des Massenschwerpunktes des Tantal-

bromid-Clusters identifiziert werden. Höher aufgelöste MAD-Datensätze wurden schließlich an einem derivatisierten Kristall mit Synchrotronstrahlung aufgenommen. Bei einer anfänglichen Auflösung von 2,2 Å beim Datensatz *TABR1* an der ersten Wellenlänge an f' ließ sich jedoch beobachten, daß mit zunehmender Meßdauer die Streukraft des Kristalls nachließ und zudem alle drei Zellachsen kontinuierlich anwuchsen. Diese Instabilität des Kristalls nahm beim zweiten Datensatz *TABR2* an f'' so stark zu (Differenz der Zellachsen zu Beginn und am Ende von *TABR2* ca. 1 %), so daß auf die Aufnahme eines *remote*-Datensatzes verzichtet und das Experiment abgebrochen wurde, weil offensichtlich war, daß die für MAD-Phasierung notwendige Isomorphie zwischen den einzelnen Datensätzen nicht mehr gegeben war.

4.5. Strukturlösung mittels Multiplen Isomorphen Ersatzes

Die Struktur der nativen ATP-Sulfurylase wurde durch Anwendung der Methode des Multiplen Isomorphen Ersatzes gelöst. Die Suche mit einer Vielzahl von Schwermetallverbindungen führte schließlich mit Thiomersal (Ethylmercurythiosalicylat) und Uranylacetat (UO_2Ac_2) zu zwei Derivaten. Die Quecksilber- als auch die Uranlage wurden durch Differenz-Patterson-Analyse bestimmt und durch Vektorverifizierung und Kreuzphasierung verifiziert. Dazu wurde auch als drittes Derivat die Lage des Massenschwerpunkts des Tantalbromid-Clusters bei 4 Å aus dem Datensatz *TABR1* verwendet. Die Schweratompositionen aller Derivate wurden zusammen mit den Besetzungszahlen und den *B*-Faktoren unter Verwendung der anomalen Streubeiträge aller Schweratome zyklisch verfeinert. Nach der Phasenverbesserung durch *Solvent flipping* wurde eine initiale Elektronendichtekarte bei 2,7 Å berechnet. Die Statistiken der verwendeten Derivate-Datensätze sind in Tabelle I zusammengefaßt.

4.6. Strukturlösung mittels Molekularen Ersatzes

Die Struktur des binären Produktkomplexes der ATP-Sulfurylase wurde durch Molekularen Ersatz gelöst. Bei der Indizierung der Diffraktionsdaten des mit $\text{MgATP}\gamma\text{S}$ gesoakten Kristalls wurde innerhalb der Raumgruppe R32 eine neue Kristallform festgestellt, in der sich durch eine nahezu Verdopplung der *c*-Achse von 187,1 Å auf 223,7 Å nun zwei Moleküle des ATP-Sulfurylase-Protomers pro asymmetrischer Einheit befinden, die kristallographisch nicht verwandt sind. Für die Pattersonsuche wurde ein Teilmodell der nativen Struktur der ATP-

Sulfurylase (Aminosäuren 2-330) als Suchmodell verwendet. Die Rotationsfunktion ergab eine Lösung mit $26,9\sigma$ über dem Mittelwert, die sich deutlich vom zweiten Peak ($13,9\sigma$) absetzte. Mit einem Korrelationskoeffizient von 22,3 % und einem R -Faktor von 54,4 % wurde das erste Monomer in der asymmetrischen Einheit erhalten. Die Translationsfunktion ergab daraufhin die Position des zweiten Protomers in der asymmetrischen Einheit und einen finalen Korrelationskoeffizienten von 39,5 % und einen R -Faktor von 49,9 %.

4.7. Modellbau und Verfeinerung

Die durch *Solvent flipping* phasenverbesserte initiale MIR-Elektronendichtekarte bei 2,7 Å wurde zur Interpretation durch ein atomares Strukturmodell verwendet. Zunächst gelang es jedoch nur, einige Sekundärstrukturelemente wie α -Helices und β -Faltblattstrukturen zu identifizieren und darin kürzere Poly-Alanin-Ketten einzupassen. Als dieses Poly-Alanin-Teilmodell ca. 460 Aminosäuren in mehreren nicht zusammenhängenden Segmenten enthielt, wurden mit dessen Koordinaten bei 2,7 Å Modellphasen berechnet und diese mit den experimentell gewonnenen Phasen kombiniert. Mit diesen kombinierten Phasen konnte eine wesentlich verbesserte Elektronendichte erzeugt werden, die es erstmals erlaubte, Seitenketten wie Tryptophane, Phenylalanine und Tyrosine einzubauen und damit die Primärstruktur in der Elektronendichtekarte zu identifizieren und zu fixieren. In einem zyklisch alternierenden Prozeß des manuellen Modellbaus und der Phasenkombination von MIR- und Modellphasen, verbunden mit Phasenexpansion auf 1,95 Å, konnte so das erste vollständige Modell des ATP-Sulfurylase-Protomers erstellt werden. Dieses Modell wurde als Startmodell für die Verfeinerung und zur Modifikation der $2F_o-F_c$ - und F_o-F_c -Dichten bei einer Auflösung von 1,95 Å verwendet. Manuelles Überbauen des Modells wurde dabei mit Verfeinerung der Atomkoordinaten, Bindungslängen und -geometrien sowie der individuellen Temperaturfaktoren unter Beachtung der Parameter von Engh & Huber (Engh and Huber, 1991) zyklisch abgewechselt. Nachdem das Proteinmodell erstellt war, wurde es mit Lösungsmittelmolekülen, Liganden und Metallionen vervollständigt. Die Verfeinerung beinhaltete eine *bulk solvent* Korrektur sowie die Optimierung der Gewichtungsfaktoren und führte zu einem finalen R -Faktor von 19,6 % bei einem freien R -Faktor von 23,1 %. Die Verfeinerungsstatistik ist in Tabelle II zusammengefaßt.

Das finale Strukturmodell der nativen ATP-Sulfurylase beinhaltet 510 Aminosäuren ohne das initiale Startmethionin, das in der Elektronendichtekarte nicht definiert war, 11 Metall- wie

auch zwei Sulfat-Ionen, 11 Acetate und ein Tris-Molekül als Liganden. Die Analyse der Stereochemie mit PROCHECK ergab, daß sich 91,2% der dihedralen $\phi\psi$ -Winkel in den Kernbereichen des Ramachandranplots, 8,4% in den zusätzlich erlaubten Regionen und 0,5 % in den erweitert erlaubten Regionen befinden.

Zur Interpretation der Elektronendichtekarte der *Molecular Replacement*-Lösung des binären Produktkomplexes wurden die beiden Teilmodelle in der asymmetrischen Einheit, die aus der Pattersonsuche erhalten wurden, manuell durch Einfügen der Domänen III und IV vervollständigt und durch eine *rigid body*-Verfeinerung in die anschließend berechnete $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte bei 2,6 Å Auflösung eingepaßt. Das Modell des Produktmoleküls APS wurde mit MAIN (Turk, 1992) manuell eingebaut. Iterative Zyklen von Überbauen, Vervollständigen des Modells mit Liganden, Metallionen und Lösungsmittelmolekülen und Verfeinerung mit zweifachen Mitteln mit *ncs-restraints* über die beiden kristallographisch nicht verwandten Protomere pro asymmetrischer Einheit führten zu einem finalen kristallographischen *R*-Faktor von 17,6 % (freier *R*-Faktor 22,7 %).

Zur Analyse aller weiteren Produkt- und Inhibitor Komplexe der ATP-Sulfurylase wurden jeweils die verfeinerten Koordinaten des nativen Proteinmodells oder des binären Produktkomplexes gegen die entsprechenden Datensätze verfeinert und zur Berechnung einer $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte verwendet. In diese wurden die Kleinmoleküle manuell eingepaßt und das Modell wie oben beschrieben verfeinert. Die Verfeinerungsstatistiken aller Strukturmodelle von Produkt- und Inhibitor Komplexen sind in den Tabellen II und III aufgeführt.

4.8. Strukturanalyse der ATP-Sulfurylase

4.8.1. Architektur des Komplexes

Die ATP-Sulfurylase ist ein Proteinkomplex aus sechs identischen Untereinheiten, der über die D3-Punktsymmetrie der Raumgruppe R32 aufgebaut ist. Diese homohexamere Anordnung der Protomere entspricht einem Molekulargewicht des Gesamtpartikels von ca. 350 kDa, das durch Gelfiltrationsanalyse und durch frühere Studien für das homologe Enzym aus *P. chrysogenum* bereits angedeutet wurde. Drei Untereinheiten sind über die kristallographische dreizählige Achse symmetrieverwandt und bilden jeweils einen Ring. Zwei dieser Trimerenringe lassen sich durch eine Drehung um die senkrecht zur dreizähligen Achse stehen-

den zweizähligen kristallographischen Achsen ineinander überführen. Sie sitzen um 60° verdreht *back-to-back* aufeinander und geben dem Partikel die charakteristische Form eines abgeflachten Doppelrings mit den Dimensionen $150.6 \times 133.3 \times 81.6 \text{ \AA}^3$ (Abbildung 11). Durch den ringförmigen Aufbau umschließt das Partikel einen zentralen Hohlraum mit einem Durchmesser von $14,8 \text{ \AA}$ an den Ausgängen und einer Ausdehnung von mehr als 45 \AA im Zentrum an den Kontaktpunkten der beiden Trimerenringe.

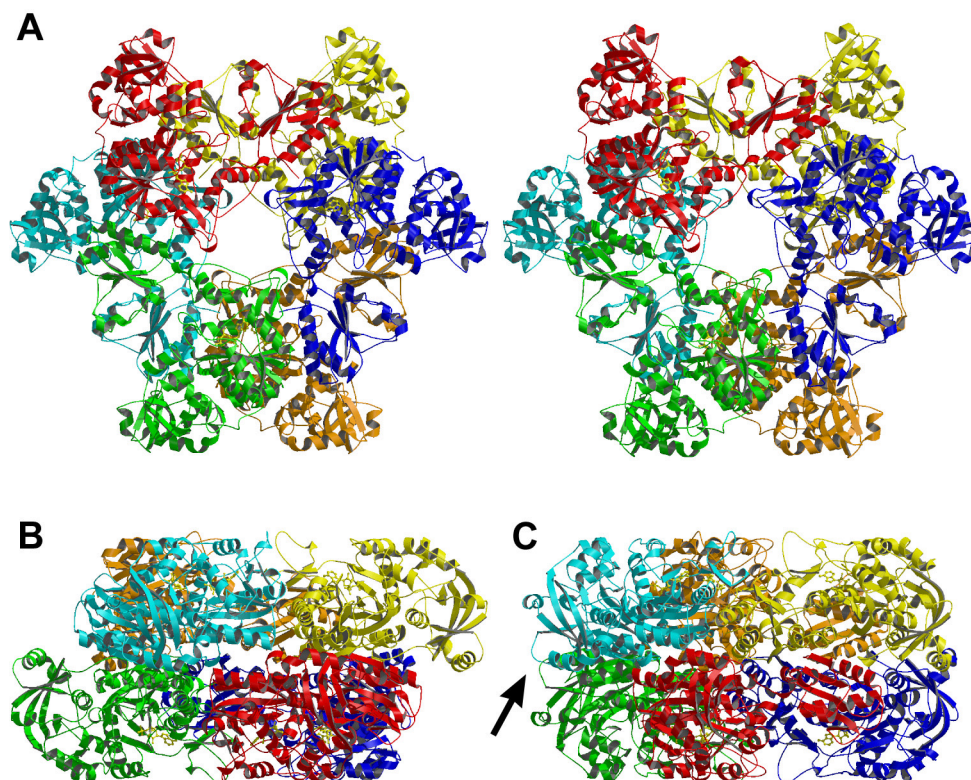


Abbildung 11: (A) zeigt in Stereodarstellung das hexamere Partikel der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* in der Draufsicht entlang der dreizähligen kristallographischen Achse. Die Monomere sind in verschiedenen Farben gekennzeichnet. (B) (und um 60° nach links gedreht) (C) sind Seitenansichten des Enzymkomplexes entlang der beiden zweizähligen kristallographischen Achsen. Der schwarze Pfeil zeigt einen *loop*-Bereich an, an dem man erkennen kann, daß die Protomere der zwei Trimerenringe des Produktkomplexes kristallographisch nicht verwandt sind.

4.8.2. Struktur des Protomers

Abbildung 12 zeigt die Polypeptidkette der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae*. Das Protomer besteht aus vier eindeutig unterscheidbaren Domänen mit drei verschiedenen Faltungstypen und einer hohen Anzahl an Sekundärstrukturelementen.

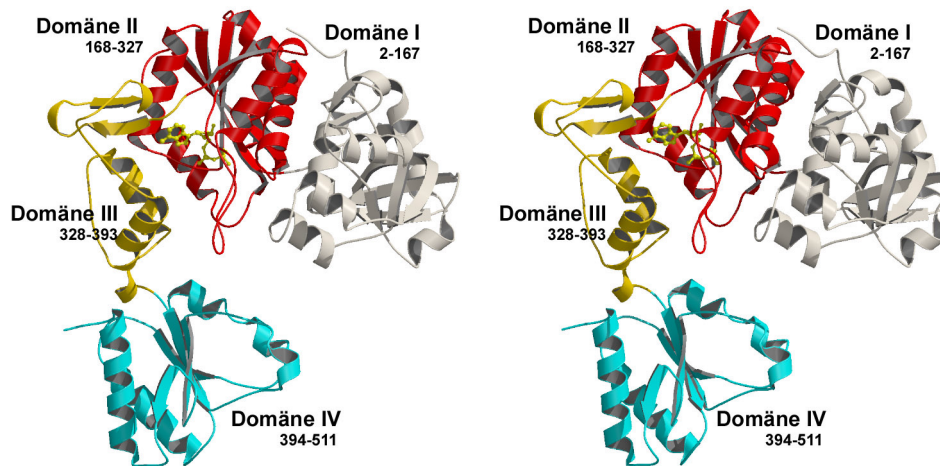


Abbildung 12: Stereodarstellung des Protomers der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* in der Draufsicht. Die einzelnen Domänen sind in verschiedenen Farben gekennzeichnet (beige: Domäne I, rot: Domäne II, gold: Domäne III und cyan: Domäne IV).

4.8.2.1. N-terminale Domäne

Die N-terminale Domäne I der ATP-Sulfurylase besteht aus den Aminosäuren 2-167 und enthält als Hauptstrukturmotiv ein β -barrel, das durch fünf antiparallele Stränge mit einer charakteristischen 1-3-4-5-2-Topologie (S1,S6,S7,S8,S2) gebildet wird und der β -barrel-Domäne der Pyruvatkinase (Abbildung 13) sehr ähnlich ist. Während aber die Pyruvatkinase-Domäne nur aus diesem Strukturmotiv besteht, ist es bei der ATP-Sulfurylase dagegen das Kernmotiv der Domäne, die einen viel komplexeren Aufbau zeigt und damit mehr einem α/β -Protein ähnelt. Mehrere helikale Insertionen, wie z.B. ein α -turn- α -Modul bei Helix H6 und H7, und ein zusätzliches kurzes β -Haarnadelmotiv, das von den Strängen S3 und S4 gebildet wird, unterbrechen die strenge β -Faltblatt-Konformation. Das β -barrel ist zudem leicht gegen die Domäne II geöffnet. Während die α -Helix H3 diese Öffnung nach vorne abschließt, bilden die α -Helix H1 und die 3_{10} -Helix H5 den Deckel und den Boden des *barrels*. Der innere Bereich des *barrels* ist komplett mit hydrophoben Resten gefüllt (Leu27, Trp35, Leu37, Ile45,

Phe59, Leu86, Leu104, Ile112, Leu115 und Leu158), die zusammen ein die gesamte Domäne stabilisierendes Netzwerk bilden.

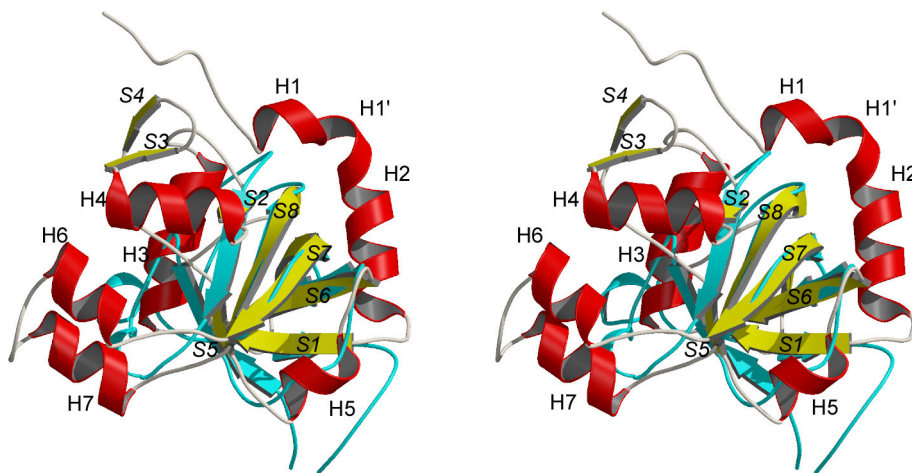


Abbildung 13: Stereoabbildung der Domäne I (α -Helices rot, β -Faltblätter gelb), überlagert mit der β -barrel-Domäne der Pyruvatkinase (cyan). Die Kennzeichnung der Sekundärstrukturelemente ist für die ATP-Sulfurylase gegeben.

Domäne I grenzt an die benachbarte Domäne II mit einer ausgedehnten, planaren Oberfläche aus hauptsächlich geladenen oder polaren Resten. Die Wechselwirkungen zwischen dem α -turn- α -Modul (H6/H7) und der amphiphilen Helix H12 werden so vor allem von Wasserstoff- und Salzbrücken vermittelt, wohingegen die Kontakte zwischen H3 und H11 eher von hydrophobem Charakter sind.

4.8.2.2. Active site-Domäne

Domäne II setzt sich aus den Aminosäuren 168-327 zusammen und enthält das katalytische Zentrum (*active site*) und die Substratbindetaschen. Sie ist aus einer rechtshändig verdrehten Dinukleotid-Faltung nach dem Rossmann-Typ (Rossmann and Argos, 1976; Rossmann *et al.*, 1974) aufgebaut. Dieser Faltungstyp mit α - und β -Sekundärstrukturelementen in drei Ebenen ist ein gemeinsames Kennzeichen von vielen Mitgliedern der Superfamilien der Adenin-Nukleotid- α -Hydrolasen und der Nukleotidyltransferasen, wie z.B. die GMP-Synthetase, die Vertreter der Klasse I Aminoacyl-tRNA-Synthetasen oder die Cytidyltransferasen. Im Detail baut sich die katalytische Domäne aus einem zentralen fünfsträngigen, parallelen β -Faltblatt mit einer 3-2-1-4-5-Topologie auf (S9-S13), das sandwichartig von jeweils zwei antiparallel verlaufenden α -Helices flankiert wird. Abbildung 14 zeigt eine Überlagerung der Domäne II mit der Struktur eines typischen Vertreters der Superfamilie der α/β -

Phosphodiesterasen, der CTP:Glycerin-3'-Phosphat-Cytidyltransferase (GCT) aus *B. subtilis* (Weber *et al.*, 1999). Mit einer RMS-Abweichung von 1,57 Å für 32 übereinstimmende Atome wurde die GCT bei einer Homologiesuche mit TOP als das ähnlichste Strukturhomologe der Domäne II ermittelt.

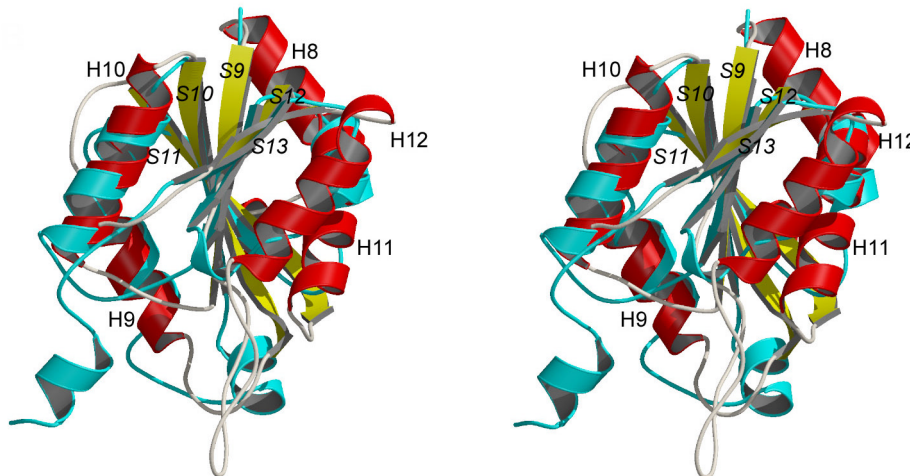


Abbildung 14: Stereoabbildung der Domäne II (α -Helices rot, β -Faltblätter gelb) mit gekennzeichneten Sekundärstrukturelementen, überlagert mit der CTP:Glycerin-3'-Phosphat-Cytidyltransferase (GCT) aus *B. subtilis* β -barrel (cyan). Dabei ist die Dinukleotid-Faltung mit α - und β -Sekundärstrukturelementen in drei Ebenen gut zu erkennen.

Während alle anderen Nukleotidyltransferasen nur aus den oben beschriebenen Kernelementen bestehen, besitzt die ATP-Sulfonylase zusätzlich ein ausgeprägtes *loop*-Motiv zwischen dem β -Strang S12 und der Helix H12 als Insertion (Aminosäuren 288-306), die in allen anderen Strukturhomologen nicht beobachtet wurden. Die Domäne II ist gegen die Domäne III hauptsächlich durch die Wechselwirkungen geladener und hydrophiler Reste der Helices H13 und H14 mit H9 und H10 gepackt.

4.8.2.3. Intermediäre Domäne

Mit 65 Aminosäuren (328-393) ist Domäne III relativ kurz und verbindet die C-terminale Domäne IV mit der katalytischen Domäne II. Die Aminosäuren 327-331 des hoch konservierten ³²⁷PFR-Motivs zwischen den β -Strängen S13 und S14 tragen neben Domäne II als wichtiger Bestandteil zum Aufbau der Substratbindetasche bei. Beim Binden von Adenin-Nukleotid-Molekülen spielen diese Reste zudem eine essentielle Rolle bei der Substraterkennung (*induced fit*) und als Drehpunkte bei der dadurch ausgelösten Domänenbewegung (*displacement*-Mechanismus), (siehe Kap 4.9.4.). Einen Hinweis auf eine gewisse Beweglichkeit

dieser Domäne gibt v.a. im Strukturmodell des Apoenzyms der *coil*-Bereich bei den Aminosäuren 347-352 zwischen den antiparallelen Strängen S14 und S15, die eine relativ schlecht definierte Elektronendichte für die Seitenketten und erhöhte B -Faktoren von bis zu 75 \AA^2 für die Hauptkette aufweisen. In den Produkt- und Inhibitor-komplexen hingegen sind diese Bereiche sehr gut definiert und die B -Faktoren liegen nur wenig über dem Mittelwert von 35 \AA^2 .

4.8.2.4. C-terminale Domäne

Die C-terminale Domäne IV (Aminosäuren 394-511) besitzt ebenso wie Domäne II einen typischen $\alpha/\beta/\alpha$ -Rossmann-Faltungstyp mit fünf parallel verlaufenden β -Strängen (S16-S20). Die 2-3-1-4-5-Topologie des rechtshändigen β -Faltblatts, das sandwichartig von vier Helices (H15 und H18, H16 und H18) flankiert wird, ist allerdings ein typisches Merkmal der Mitglieder der Familie der einen P -loop enthaltenden Nukleotidkinasen. Diese strukturelle Ähnlichkeit deutet auf eine enge evolutionäre Verwandtschaft der Domäne IV der ATP-Sulfurylase mit der APS-Kinase hin, die trotz einer wenig übereinstimmenden Aminosäuresequenz beinahe dieselbe Anordnung der Sekundärstrukturelemente aufweist. Typische Vertreter dieser Familie sind außerdem die Guanylat- und Uridylatkinase, die in einer Homologiesuche mit einer RMS-Abweichung von $1,70 \text{ \AA}$ und $1,45 \text{ \AA}$ (für alle übereinstimmenden Atome) die besten Strukturhomologieergebnisse zu Domäne IV ergaben.

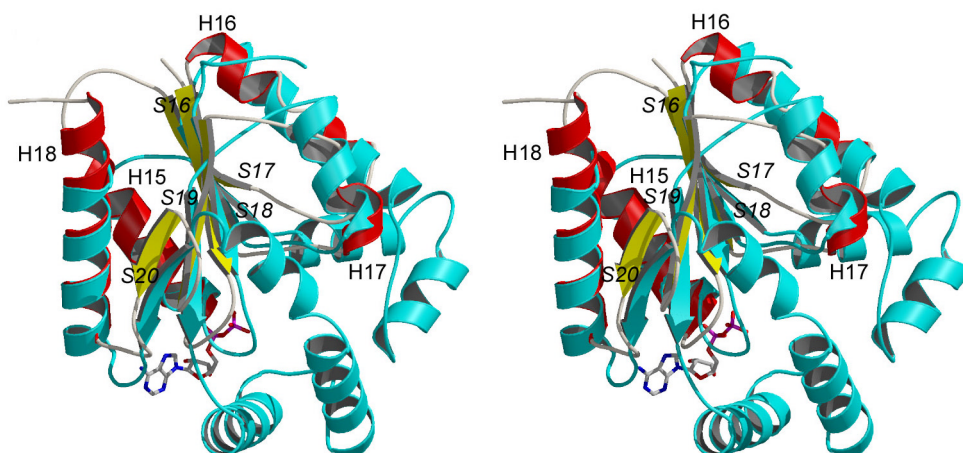


Abbildung 15: Stereodarstellung der Domäne IV (α -Helices rot, β -Faltblätter gelb) mit gekennzeichneten Sekundärstrukturelementen, überlagert mit Uridylatkinase aus *S. cerevisiae* (cyan). Neben dem Kinase-ähnlichen Faltungstyp der C-terminalen Domäne mit α - und β -Sekundärstrukturelementen mit einer 2-3-1-4-5-Topologie erkennt man die zusätzlichen Subdomänen und das ADP in der katalytisch aktiven Kinase.

Trotz der gemeinsamen Faltungstopologie zeigt die Überlagerung des Modells der Domäne IV mit der Struktur der Uridylatkinase aus *S. cerevisiae* (Abbildung 15), daß die funktionsfähigen Kinasen zwei zusätzliche Insertionen enthalten. Zum einen handelt es sich dabei um ein α -turn- α -Motiv nach Helix H16 und um einen umfangreichen Bereich aus drei α -Helices zwischen den Strängen S19 und S20. Diese beiden Regionen sind bei der Uridylatkinase wesentlich an der Ausformung der ATP-Bindestelle und des Reaktionszentrums beteiligt. Bei dem Homologen der ATP-Sulfurylase aus *P. chrysogenum* sind sie in ähnlicher Form und Ausdehnung (Abbildung 34) vorhanden und bilden eine Bindetasche für PAPS, das Produkt der APS-Kinasereaktion, obwohl das Enzym keine nachweisbare APS-Kinase-Aktivität besitzt. Da die Domäne IV der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* keines dieser Module hat, fehlt ihr sowohl die APS-Kinase-Aktivität als auch die Fähigkeit PAPS zu binden. Der C-Terminus des Protomers schließlich ist durch Wechselwirkungen der Seitenkette von Phe511 mit Pro250 und der terminalen Carboxylgruppe mit Arg248-Ne an das benachbarte Protomer desselben Trimerenringes gebunden.

4.8.2.5. Intra- und Interringkontakte/Metallbindungsstellen

Das Oligomer der ATP-Sulfurylase hatte sich bei der Isolierung als äußerst stabiles Partikel erwiesen und während der Aufreinigung keinerlei Dissoziationstendenzen gezeigt. Dennoch sind die Untereinheiten optisch eher locker gepackt, da der Komplex, auch bedingt durch die charakteristische U-Form der Protomere, einige unregelmäßig geformte Lücken, Mulden und Spalten zwischen Molekülen des oberen und des unteren Ringes im Komplex aufweist (Abbildung 16).

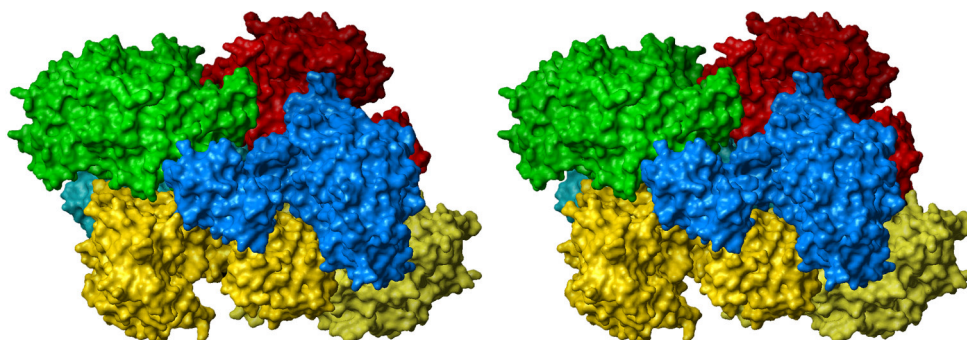


Abbildung 16: Oberflächendarstellung des ATP-Sulfurylase-Partikels mit den einzelnen Protomeren in unterschiedlichen Farben. Deutlich zu erkennen ist deren loser Verband mit Lücken, Mulden und Spalten zwischen Molekülen des oberen und des unteren Ringes, als auch die prägnante Furche in der Mitte des U-förmigen Protomers, die sich zwischen den Domänen I und II und der C-terminalen Domäne IV öffnet. Das goldene und blaue Protomer bilden ein allosterisches Dimer, das goldene und grüne ein katalytisches Dimer.

Jedes Protomer besitzt eine Oberfläche von 23219 \AA^2 und berührt dabei mit seiner katalytischen Domäne das im selben Ring benachbarte an dessen C-terminaler Domäne (618 \AA^2 Kontaktfläche). Es zeigt insgesamt Wechselwirkungen zu vier der fünf anderen Untereinheiten des Komplexes, da es ebenfalls zu zwei Untereinheiten des anderen Rings im Komplex Interaktionen bildet. Diese Interringkontakte sind in zwei Formen von symmetrisch verwandten Dimeren möglich: Erstens über die C-terminale Domäne zweier über die zweizählige Achse verwandter Untereinheiten (*allosterisches* Dimer, 1623 \AA^2 Kontaktfläche), als auch verknüpft über die *active site*-Domänen (katalytisches Dimer, 469 \AA^2 Kontaktfläche). Besonders auffallend ist dabei die Ausbildung einer charakteristischen Spalte durch die „auf Lücke“ stehenden C-Termini zweier Protomere (Abbildungen 16 und 17). Diese grabenförmige Rinne mißt an ihrer größten Ausbreitung $39,2 \times 20,5 \times 24,8 \text{ \AA}^3$.

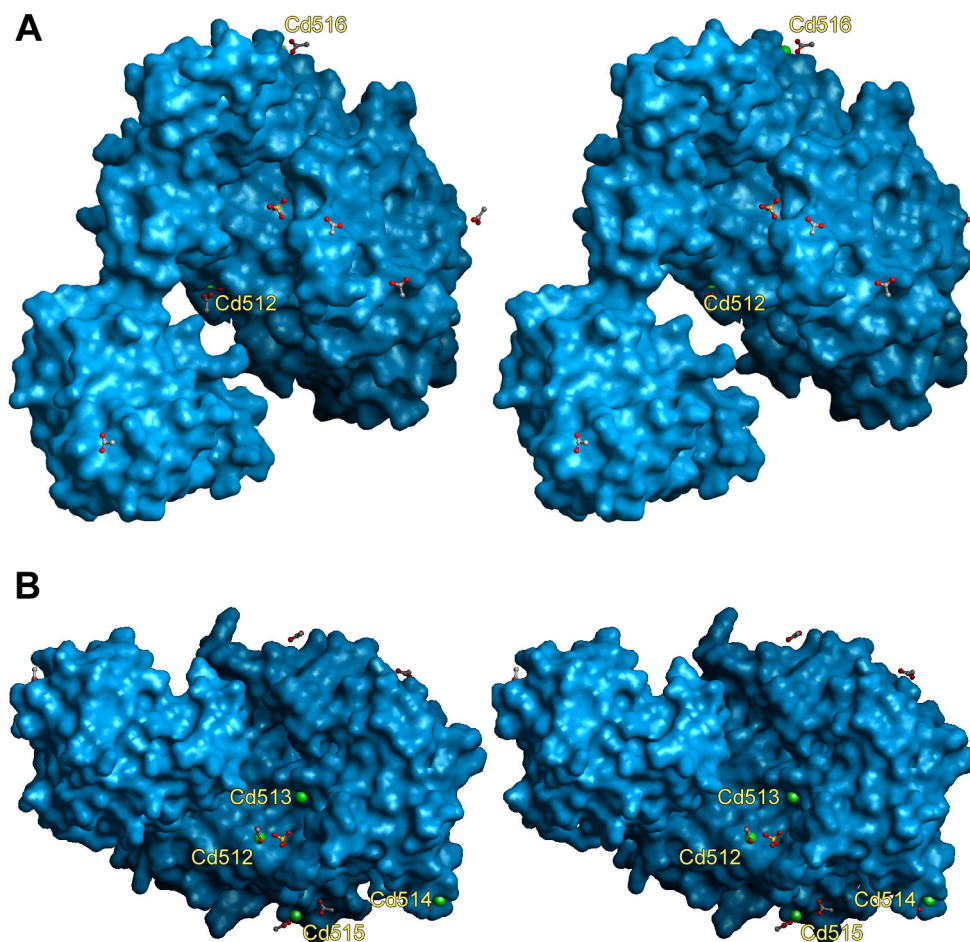


Abbildung 17: (A) Stereodarstellung der Cadmiumbindestellen (hellgrün) im Protomer der ATP-Sulfurylase. In *ball-and-stick*-Darstellung sind dabei die Liganden Sulfat und Acetat dargestellt. (B) zeigt die Ansicht um 60° nach oben gedreht. Gut zu erkennen auch hier die Spalte zwischen den Domänen I und II und der C-terminalen Domäne IV.

Innerhalb des Homohexamers werden die Kontakte der einzelnen Protomere untereinander vorwiegend durch Wasserstoff- und Salzbrücken erzeugt, wobei auch ein Netzwerk von Lösungsmittelmolekülen eine wichtige Rolle spielt. Während frühere biochemische Untersuchungen keinen Hinweis auf die Existenz von Metallionen in der ATP-Sulfurylase erbrachten (Farley *et al.*, 1976), wurden bei Röntgenabsorptionsmessungen an Homologen aus *D. gigas* und *D. desulfuricans* (Gavel *et al.*, 1998) deutliche Anzeichen für die definierte Bindung von Schweratomen wie Zink oder Nickel gefunden. In allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Strukturmodellen der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* wurde eine Anzahl von Metallionen identifiziert. Da der Kristallisationspuffer 25 mM Cadmiumsulfat enthielt, wurden alle Metalle, die gut definierte und hoch konturierbare Elektronendichten, eine hohe Koordinationszahl und kurze Bindungsabstände zu den Liganden zeigten, als Cd^{2+} -Ionen interpretiert und ins Modell eingebaut (Abbildung 17A und B).

Dies gilt etwa für Cadmium Cd515 und Cd516, die Aminosäuren und assoziierte Lösungsmittelmoleküle verschiedener benachbarter Protomere als Liganden komplexieren und so einen Beitrag zur Komplexassemblierung und -stabilisierung leisten. Cd515 zum Beispiel sitzt an der Unterseite eines Protomers (Abbildung 17B) und verknüpft zwei benachbarte Protomere aus den zwei Ringen eines Partikels (Interringkontakt) durch ionische Wechselwirkungen. Es ist durch Glu182-O ϵ und Gly171-O des einen Protomers koordiniert. Gly171-O weist zudem Wasserstoffbrücken zu Lys174-N ϵ auf. Beide Reste sind an ein Acetatmolekül gebunden, das vom symmetrieäquivalenten Protomer des anderen Trimerenringes beigesteuert wird. Cd516 hingegen befindet sich hinter dem aktiven Zentrum (Abbildung 17A) an der Kontaktfläche zwischen zwei benachbarten Monomeren innerhalb eines Trimerenringes (Intraringkontakt). Es ist durch die Carboxyl-Sauerstoffatome zweier Acetate (Acy527 und Acy534), durch Asp189 und schließlich durch His494-N ϵ des benachbarten Protomers im Ring sechsfach koordiniert.

Da Röntgenfluoreszenzmessungen mit nativen Kristallen der ATP-Sulfurylase keinen Hinweis auf das Vorhandensein weiterer Metallatome lieferten, ist die natürliche Besetzung dieser Metallbindungsstellen und deren Relevanz für die Komplexstabilität nicht eindeutig zu klären. Jedoch ist es wahrscheinlich, daß sie unter physiologischen Bedingungen durch Calcium oder Magnesium besetzt sind, die während der Reinigung durch EDTA abgefangen und bei der Kristallbildung schließlich durch Cadmium ersetzt worden sind.

Zwei weitere Cadmiumbindestellen befinden sich auf der Oberfläche des Protomers ohne weitere Kontakte zu anderen Untereinheiten. Cadmium Cd512 liegt in der Furche zwischen den Domänen II und IV (Abbildung 17A und B) und wird von dem hoch konservierten Asp168 aus dem *loop*-Bereich zwischen den Domänen I und II, einem Sulfat-Ion, und von den beiden Histidinen His235-Ne (2,42 Å) und His236-Ne (2,37 Å) am N-Terminus der Helix H9 komplexiert. Bedingt durch die vergleichbaren Bindungswinkel und -geometrien kann es unter physiologischen Bedingungen durch ein Zink oder Cobalt ersetzt sein, die schon bei ATP-Sulfurylasen aus sulfatreduzierenden Bakterien als mögliche Metallzentren beschrieben worden sind (Gavel *et al.*, 1998). Da es ca. 20 Å vom katalytischen Zentrum entfernt liegend die benachbarten Domänen I und II verbindet (Abbildung 17A), scheint es hauptsächlich zur strukturellen Starrheit des Verbandes und damit zur Komplexstabilität beizutragen. In derselben Mulde befindet sich mit einem Abstand von 10,4 Å Cadmium Cd513 (Abbildung 17B), dem Cys43-S und Pro39-O zusammen mit vier Wassermolekülen als Liganden dienen und damit einen leicht verzerrten oktaedrischen Komplex bilden.

Zusätzlich wurden auch solche Metallionen identifiziert, die Kontakte zwischen den Hexameren in der Kristallpackung vermitteln. Cadmium Cd514 liegt exponiert an der N-terminalen Subdomäne (Abbildung 17B) und wird von den Carboxyl-Sauerstoffatomen von Glu22, von Leu18-N, als auch von Acetat Acy526 und einem Wassermolekül koordiniert. Vom benachbarten Hexamer vervollständigt der Imidazol-Stickstoff von His319 die oktaedrische Koordinationssphäre des Cadmiums.

Neben den eindeutig identifizierbaren Cadmium-Bindestellen gibt es eine Vielzahl wahrscheinlicher Metallbindestellen, die meistens an einzelne Aspartat- und Glutamatreste koordiniert sind, sich aber nur schwer einwandfrei einem bestimmten Atomtyp zuordnen lassen. Meistens wurden diese Peaks in der Elektronendichteverteilung als Wassermoleküle oder locker gebundenes Natrium oder Calcium interpretiert. Innerhalb der verschiedenen analysierten Komplex- und Inhibitorstrukturen der ATP-Sulfurylase sind sie allerdings nicht immer vorhanden oder einheitlich interpretiert, so daß an dieser Stelle nicht detailliert darauf eingegangen wird.

4.9. Das aktive Zentrum und Nukleotidbindung

4.9.1. Native Struktur

Das aktive Zentrum (*active site*) der ATP-Sulfurylase liegt in einer kesselförmigen Furche im Zentrum des Protomers. Sie wird hauptsächlich aus den Sekundärstrukturelementen H9, S9, S10 und S12 und den hoch konservierten *loop*-Bereichen von Phe194 bis His201 („*RNP-loop*“) und von His285 bis Gly294 („*GRD-loop*“) von Domäne II aufgebaut. Der „*PFR-loop*“ (Pro327-Val331) zwischen S13 und S14 der intermediären Domäne III bildet eine Art Deckel an der vorderen Oberseite der Mulde. Das aktive Zentrum ist ins Zentrum des U-förmigen Protomers dem Lösungsmittel zugänglich gerichtet und besitzt keinen Zugang zum zentralen Hohlraum des Doppelrings. Das zweite hoch konservierte Motiv von Domäne III, das „*ISGTXXR-Modul*“ vor Helix H13, bildet zusammen mit dem langen *loop*-Bereich zwischen den Resten 292-306 einen trichterförmigen Zugang zur Substratbindetasche, den man aufgrund seines hauptsächlich positiv polarisierten oder geladenen Charakters als „Anionen-falle“ für die negativ geladenen Substrate Sulfat und ATP bezeichnen kann (Abbildung 18).

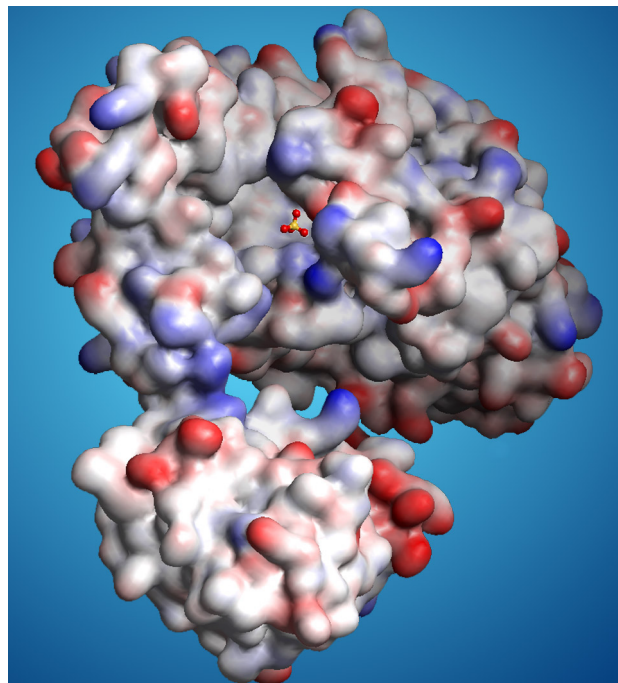


Abbildung 18: Oberflächendarstellung mit elektrostatischem Oberflächenpotential des Protomers der ATP-Sulfurylase (blau: positiv polarisiert oder geladen, rot: negativ). In *ball-and-stick*-Darstellung das Sulfat im aktiven Zentrum.

Die *active site* selbst erreicht maximale Ausmaße von 19,5 Å in der Länge und 17,5 Å in der Breite und zeigt keine Kontakte mit symmetrieverwandten Untereinheiten. Während der Boden und die Seitenwände der Substratbindetasche überwiegend durch hydrophile und positiv geladene Reste aufgebaut sind, besteht der hintere Bereich und die Rückwand vornehmlich aus den hoch konservierten, hydrophoben Resten Phe194, Leu207, Ile287, Val288, Gly289, His292, Phe328 und Met330. Diese Reste bilden zusammen mit den ungeladenen Aminosäuren Val191-Ala193 ein starres Gerüst im Inneren der Domäne, das einerseits zum Aufbau der Nukleosyl-Bindetasche aber auch insgesamt zur Statik des aktiven Zentrums beiträgt.

Anfangs wurde die ATP-Sulfurylase ohne zusätzliche Zugabe von Nukleotiden wie ATP, ADP oder APS zur Kristallisation angesetzt. Der Kristallisationspuffer enthielt aber als notwendiges Additiv 25 mM Cadmiumsulfat, so daß in der Elektronendichtekarte des Apoenzym an das Protein gebundenes Sulfat, das neben ATP eines der Substrate der ATP-Sulfurylase ist, identifiziert werden konnte. Ein Sulfat-Molekül befindet sich zusammen mit einigen Wassermolekülen in der *active site* (Abbildungen 18 und 19). Mit einem *B*-Faktor von 37 Å² zeigt es bei 1,95 Å Auflösung eine ausgezeichnet definierte Elektronendichte und ist mit Ala293-N (O2, 2,9 Å), Arg197-Nζ (O3, 3,3 Å), Gln195-Nε (O4, 2,7 Å) und mit dem Wassermolekül WAT810 (O1, 2,8 Å) verknüpft. Dieses enge Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen und ionischen Wechselwirkungen zeigt, daß die zweifach negative Ladung des Sulfats in dieser Position sehr gut ausgeglichen wird, so daß davon ausgegangen werden kann, daß es in seiner originären Substratbindetasche plaziert ist.

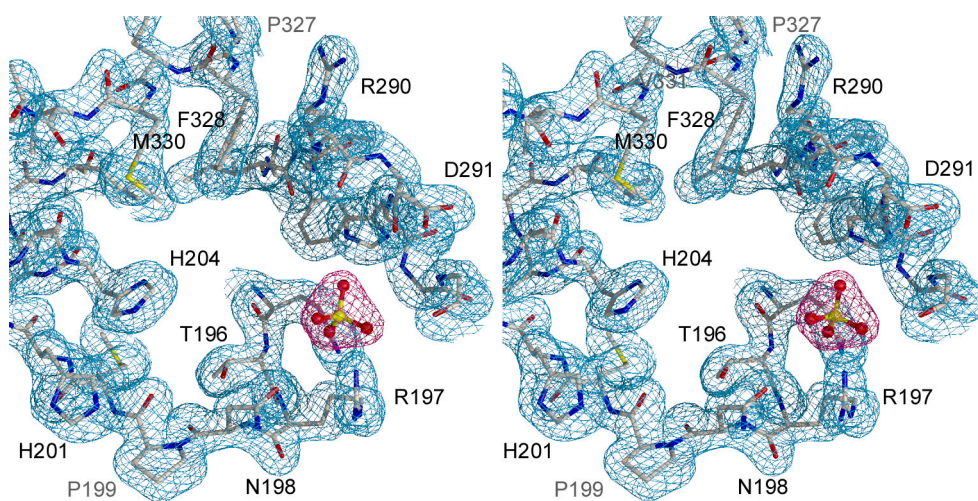


Abbildung 19: Stereodarstellung des aktiven Zentrums in Domäne II der ATP-Sulfurylase mit einem in der Substratbindetasche gebundenen Sulfatmolekül (*ball-and-stick*). Die $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte ist bei 1,95 Å bei 1σ konturiert.

4.9.2. Nukleotidbindung – Der binäre Produktkomplex

Um die Nukleotidbindung und den katalytischen Mechanismus der Sulfataktivierung zu untersuchen, wurde versucht, die Struktur der ATP-Sulfurylase im Komplex mit ihrem zweiten Substrat ATP zu erhalten. Dazu wurden *Soaking*-Experimente mit den Kristallen des Apoenzyms und mit MgATP γ S sowie mit MgATP α S durchgeführt. Im Gegensatz zu dem bei Raumtemperatur schnell zu ADP und Phosphat hydrolysierenden ATP gelten diese beiden Analoga des ATP als relativ hydrolysestabil und sind somit gut für *Soaking*-Prozesse und die Röntgenstrukturanalyse von Kristallen geeignet. Zunächst wurden dazu Kristalle in Erntepuffer eingelegt, in dem 5 mM des entsprechenden ATP-Analogons und 5 mM Magnesiumchlorid gelöst waren. Danach wurden die Kristalle schockgefroren und bei 100 K vermessen. Zur Strukturlösung mußte nach einer ersten Bestimmung der Zellparameter und der Raumgruppe die Methode des Molekularen Ersatzes angewendet werden, da eine annähernde Verdopplung der kristallographischen c-Achse eine neue Kristallform innerhalb der Raumgruppe R32 anzeigte, in der die asymmetrische Einheit nun zwei nicht kristallographisch verwandte Protomere umfaßte. Überraschenderweise wurde aus beiden Experimenten dasselbe Ergebnis erhalten: Die 2F_o-F_c-Elektronendichtekarte, die nach der Verfeinerung des Strukturmodells des nativen Enzyms gegen die entsprechenden Diffraktionsdaten erhalten wurde, zeigte eine klar konturierte Dichte in der *active site*, in die sich leicht ein Adenosindinukleotid-Molekül einpassen läßt, ohne daß sich dabei Elektronendichte für das γ -Phosphat des ATP beobachten läßt (Abbildung 20).

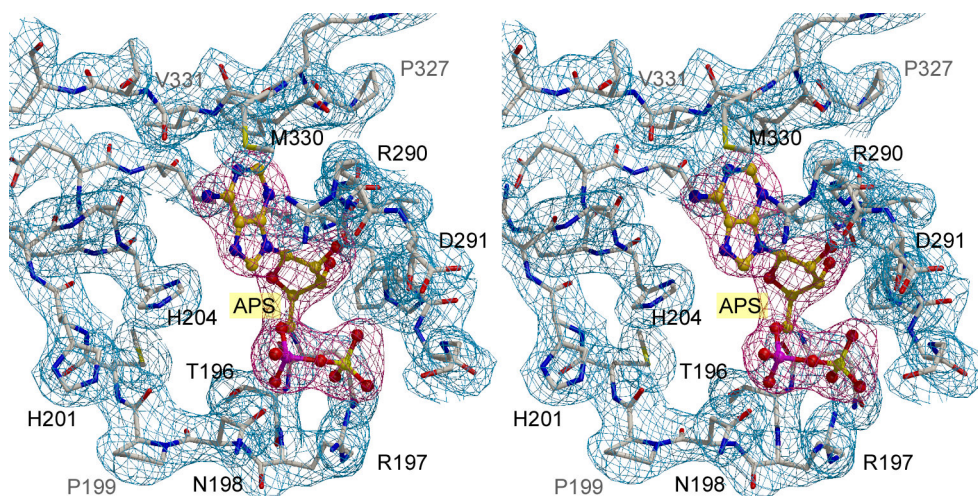
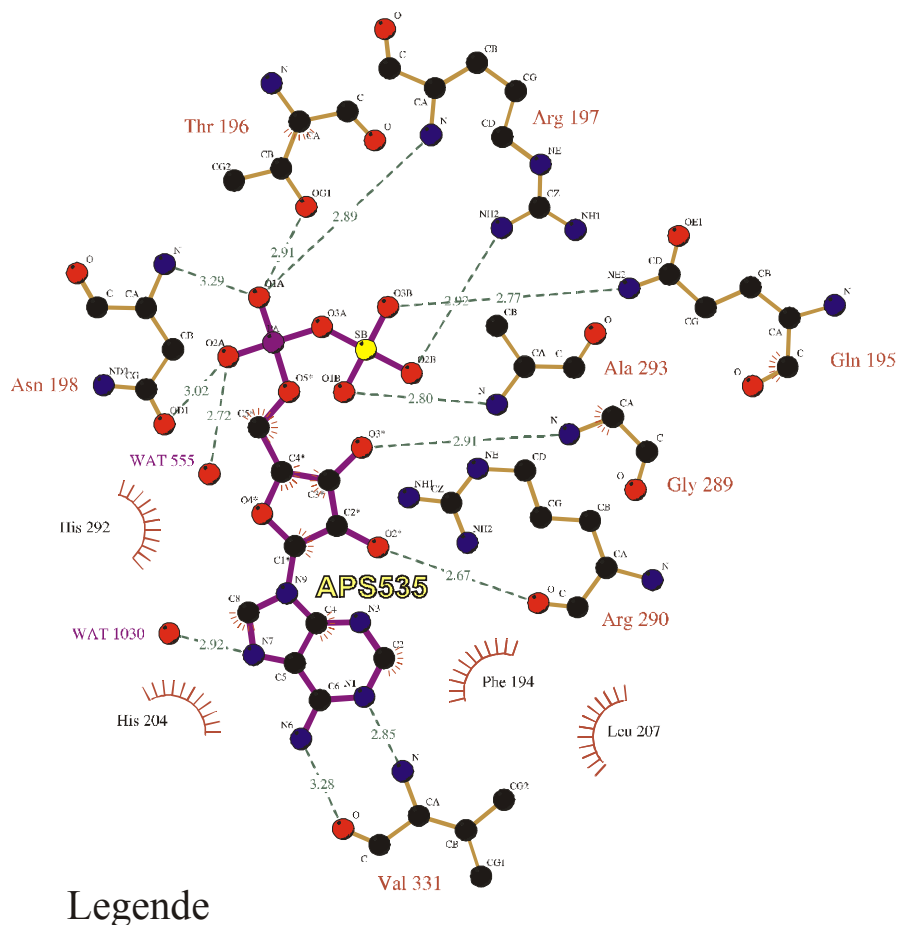


Abbildung 20: Stereodarstellung der Reste des aktiven Zentrums in Domäne II der ATP-Sulfurylase mit in der Substratbindetasche gebundenem APS (*ball-and-stick*) des binären Produktkomplexes. Die 2F_o-F_c-Elektronendichtekarte bei 2,6 Å ist bei 1 σ konturiert.

Zwei mögliche Erklärungen für diese Beobachtung könnten die spontane Hydrolyse beider ATP-Analoga während des *Soaking*-Prozesses oder ein durch Fehlordnung in der Kristallpackung in der Elektronendichtekarte nicht definiertes γ -Phosphat sein. Wie aber aus Abbildung 20 und Schema 4 ersichtlich ist, ist das Nukleotid von den Resten des Enzyms außerordentlich kompakt eingebettet und zudem vielfach koordiniert, was eine freie Rotation des γ -Phosphats eines ATP-Moleküls beinahe unmöglich macht. Andererseits ist die Hydrolyse der relativ inerten ATP-Analoga in Lösung oder durch enzymatische Katalyse zu ADP oder AMP während der kurzen Spanne des Einlegens keine plausible Erklärung, insbesondere, weil die ATP-Sulfurylase keinerlei Phosphorylase-Aktivität besitzt.



Schema 4: Schematische Darstellung der Koordination des APS in der Bindetasche von ATP-Sulfurylase. APS wechselwirkt mit den umgebenden Aminosäuren hauptsächlich durch hydrophile Kontakte und Salzbrücken. Bei pH 5,5, der physiologisch bevorzugten Umgebung der Hefe, sind die positiv polarisierten Reste Arg197, Asn198, His201, His204 und Arg290 sehr wahrscheinlich protoniert. Die Wasserstoffbrücken zu Val331 dienen dem Enzym zur Substraterkennung.

Viel wahrscheinlicher ist allerdings, daß während des *Soaking*-Prozesses bei Raumtemperatur eine enzymatische Umsetzung der Analoga *in crystallo* stattgefunden hat, und die neue Elektronendichte im aktiven Zentrum das Reaktionsprodukt APS repräsentiert. Ein *B*-Faktor von 31,3 Å² für das gesamte APS-Molekül im Vergleich zu 32,1 Å² für die Peptidkette deuten bereits eine feste Bindung des Moleküls an das Enzym an. Das APS nimmt in der Bindetasche eine offene, L-förmige Konformation ein, die es der Adenosyleinheit erlaubt, tief in den Raum zwischen Helix H9 und den β-Strängen S9 und S12 einzudringen. Die Sulfatgruppe befindet sich rechts neben dem α-Phosphat an derselben Position im aktiven Zentrum, wie oben bereits für den nativen Zustand beschrieben. Sie ist in derselben Weise mit fast identischen Bindungslängen und -winkeln von den Aminosäuren Gln195-Nε, Arg197-Nζ und Ala293-N verbrückt. Das α-Phosphat hingegen wird durch die Reste Arg197-N, Thr196-Oγ und Asn198-Oδ durch Wasserstoffbrücken koordiniert. Das konservierte Gly289 *des GRD-loops* erlaubt der Riboseeinheit des APS eine enge Annäherung an die Hauptkette, die durch Wasserstoffbrückenbindungen von Gly289-N und His292-O mit der 3'-Hydroxylgruppe und von Arg290-O mit dem 2'-Hydroxylgruppe ermöglicht wird. Zusätzlich wird die Adenyleinheit durch Wasserstoffbrücken von N6 mit Val331-N und Met330-S stabilisiert und zeigt zudem *Van-der-Waals*-Kontakte zu zahlreichen weiteren Resten.

4.9.3. Ternärer Produktkomplex

Neben dem binären Enzym-Produkt-Komplex E•APS wurde in dieser Arbeit auch die Struktur des ternären Produktkomplexes E•APS•PP_i gelöst und analysiert. Dieser wurde erhalten, indem Kristalle des Apoenzyms mit 5 mM MgATPγS und 10 mM Kaliumchlorat im Erntepuffer eingelegt wurden. Wie eingangs beschrieben, ist Chlorat ein starker Inhibitor für die ATP-Sulfurylase-Aktivität und wurde deshalb im Gemisch mit MgATPγS verwendet, um zusammen mit einem wenig reaktiven ATP-Analogen einen substratanalogen Komplex der ATP-Sulfurylase zu erhalten (Kap. 4.12.3.). Jedoch ähnelte die resultierende 2F_o-F_c-Elektronendichtekarte sehr stark der des binären Komplexes mit Ausnahme einer neuen, handtelförmigen Dichtesphäre im Zentrum der *active site* (Abbildung 21).

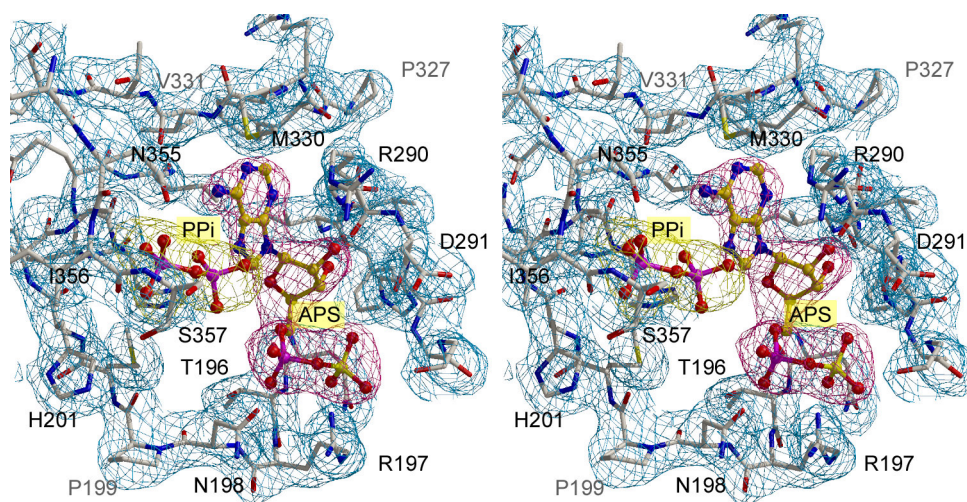


Abbildung 21: Stereodarstellung des ternären Produktkomplexes. Während APS von konservierten Resten des *GRD*- und *PFR*-loops umgeben ist, liegt das Pyrophosphat am Eingang der Substratbindetasche und zeigt Wechselwirkungen zum Asn355 und Ile356 des *ISGTXXR*-Motivs. Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichte bei 2,6 Å ist jeweils bei 1σ konturiert.

Diese Dichtesphäre ließ sich auch in der Differenz-Fourier-Elektronendichtekarte als Pyrophosphat (PP_i) interpretieren, das auch problemlos eingebaut und verfeinert werden konnte. Im ternären Produktkomplex zeigt das Pyrophosphat mit $49,4 \text{ \AA}^2$ einen im Vergleich zu den umgebenden Nukleotid- und Proteinatomen ($32,2 \text{ \AA}^2$) leicht erhöhten *B*-Faktor, es ist jedoch durch Bildung von Wasserstoffbrücken zu N6 und N7 der Adenyleinheit des APS sowie zu His204-Ne auf der einen Seite und zu Asn355-O δ und -N δ sowie zu Ile356-O definiert an das Protein gebunden. Asn355 und Ile356 gehören zum *ISGTXXR*-Motiv von Domäne III, so daß das Pyrophosphat in seiner schrägen Position leicht eingeklemmt am vorderen Rand der Mulde liegt. Der Abstand zwischen dem α - und dem β -Phosphat beträgt dabei $6,2 \text{ \AA}$.

4.9.4. „induced fit“ – der *displacement*-Mechanismus

Die Nukleotidbindung verursacht eine beträchtliche Verschiebung innerhalb der Protomere des ATP-Sulfurylase-Hexamers. Verursacht wird diese Versetzung ganzer Domänen des Protomers durch eine einzige Aminosäure des *PFR*-Motivs von Domäne III, Phe328. In der nativen Struktur reicht dieses Phe328 mit seiner Seitenkette in die hydrophobe Rückwand der Adenosylbindetasche (Abbildung 22B). Durch das Binden von ATP oder APS wird der Phenylring von seiner Position verdrängt und aus dem aktiven Zentrum an die Oberfläche des

Proteins gedrückt. Diese Umlagerung ist mit einer Drehbewegung der Aminosäure um 90° verbunden (*flipping*) und markiert so den zentralen Angelpunkt der Domänenumordnung. Sie induziert eine Konformationsänderung der Haupt- und Seitenketten der benachbarten Reste Pro327, Arg329, Met330 und Val331, wobei Met330 mit ca. 6 Å die größte Verschiebung (*displacement*) erfährt (Abbildung 22B). Gemeinsam mit Arg290 schließt sich auf diese Weise ein umschlagförmiger Deckel über der Adenosyleinheit des Nukleotids, was zusammen mit der Wasserstoffbrückenbindung von N6 zu Val331-N und Met330-S als Substraterkennungs- oder *induced fit*-Mechanismus interpretiert werden kann.

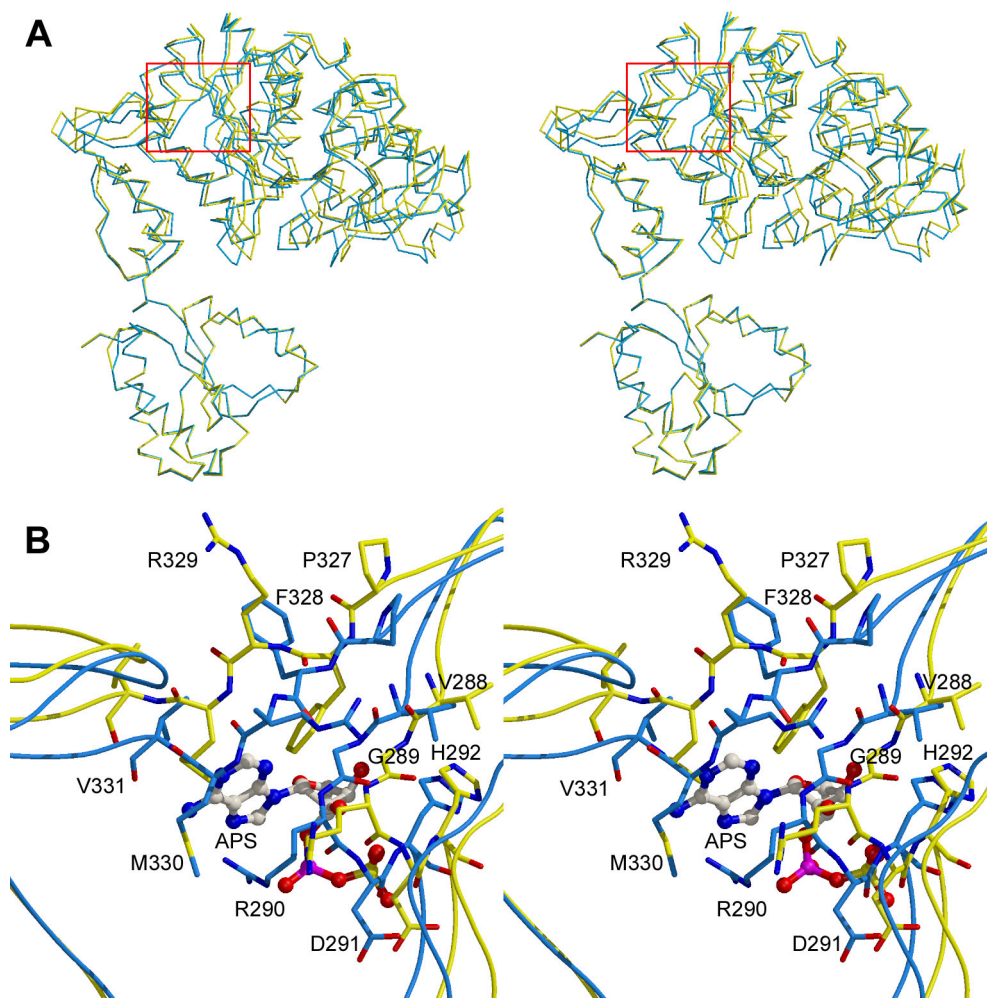


Abbildung 22: (A) Überlagerung des nativen (gelb) und des mit APS komplexierten Enzyms (blau). Durch die Nukleotidbindung wird in der ATP-Sulfurylase der *displacement*-Mechanismus ausgelöst. Darstellung (B) zeigt, wie durch ein Eindringen der Adenyleinheit des Nukleotids Phe328 aus seiner ursprünglichen Position an die Oberfläche des aktiven Zentrums gedrängt wird. Dieses „*flipping*“ um 90° löst eine Konformationsänderung der benachbarten Aminosäuren Pro327, Met330 und Val331 um bis zu 6 Å aus, die ihrerseits zur Verschiebung (*displacement*) ganzer Proteindomänen führt.

Von diesem „Epizentrum“ aus setzt sich der *displacement*-Mechanismus über Domäne II zum N-Terminus I als auch über Domäne III zur C-terminalen Domäne IV fort, die insgesamt um 2-3 Å aufeinander zu bewegt werden (Abbildung 22A). Betrachtet man die Verschiebungen innerhalb des Hexamers, so bleiben die C-terminalen Domänen (RMS-Abweichung 0,67 Å für alle Atome) und das *ISGTXXR*-Motiv von Domäne III fast unverändert. Im Gegensatz zu den beträchtlichen Konformationsänderungen im flexiblen Drehbereich bei S13 und S14 bilden H9, H10 und die β -Stränge S9, S10 sowie S11 als auch der *RNP-loop* innerhalb der katalytischen Domäne ein eher starres Gerüst und bewegen sich nur um 0,7-1,5 Å auf Domäne III zu. Der *GRD*- als auch der *292-306-loop* hingegen verengen die zentrale Kavität um das Nukleotid um 2-3 Å. Dabei ergibt sich eine RMS-Abweichung zwischen nativem und nukleotidgebundenem Zustand von 2,8 Å für alle Atome der Domänen I und II (Abbildung 22A). Bei allen untersuchten Komplex- und Inhibitorstrukturen bleiben jedoch sowohl die Intra- als auch die Interring-Kontaktpunkte erhalten, so daß es sich um rein dynamische Veränderungen handelt, die das Grundgerüst der Trimerenringe und damit des Hexamers wenig beeinflussen.

Der *displacement*-Mechanismus dient einerseits der Substraterkennung, hat aber auch eine beträchtliche Auswirkung auf die beiden Trimerenringe des Hexamers. Obwohl die Protomere in beiden Ringen Elektronendichte für APS (und Pyrophosphat) aufweisen, ist das Ausmaß der Konformationsänderung und der daraus resultierenden Verschiebung doch leicht unterschiedlich und läßt sich mit einer RMS-Abweichung von 0,97 Å für alle Atome und 0,33 Å für die $C\alpha$ -Atome messen. Das bedeutet, daß in der neuen Einheitszelle mit der beinahe verdoppelten c-Achse zwei Protomere die asymmetrische Einheit besetzen, die aber kristallographisch nicht mehr äquivalent sind, sondern über eine lokale zweizählige zur kristallographischen zweizähligen Achse parallele Achse symmetrieverwandt sind. Sind im Apoenzym die beiden Trimerenringe noch über eine kristallographische zweizählige Achse verwandt, die mitten durch das Partikel führt, so sind es nun zwei übereinanderliegende Hexamere, die durch eine zweizählige Achse außerhalb des Partikels ineinander überführt werden können. Der Grund für diese Asymmetrie kann in einer unterschiedlichen Besetzung der aktiven Zentren der beiden Ringe mit Nukleotiden liegen (*half sites activity*). Dies wurde schon bei einem funktionellen Homologen, PPAT (Izard and Geerlof, 1999) beobachtet und als ein mechanistisches Prinzip der allosterischen Wechselwirkung von aktiven und inaktiven Unterheiten im hexameren Partikel beschrieben. Jedoch ist dieser mögliche Effekt der halbseitigen Besetzung von aktiven Zentren im Falle der ATP-Sulfurylase nur sehr klein und läßt sich

neben der strukturellen Asymmetrie nur an leicht erhöhten *B*-Faktoren für die Produktmoleküle im zweiten Protomer zu dokumentieren.

4.9.5. Konservierte Motive

Wie oben schon beschrieben, verfügt die ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* mit dem charakteristischen Dinukleotid-Faltungstyp der katalytischen Domäne und der Gestaltung des aktiven Zentrums über Eigenschaften, die denen anderer Nukleotidyltransferasen sehr ähnlich sind. Eine Überlagerung des Strukturmodells der ATP-Sulfurylase mit der Struktur der TagD/GCT aus *B. subtilis* zeigt deutlich, daß vor allem der Aufbau der aktiven Zentren stark übereinstimmt, obwohl die Aminosäuresequenzen beider Enzyme sehr unterschiedlich sind.

Bedingt durch den gemeinsamen Faltungstyp nehmen besonders die Struktur motive in der Region zwischen H9 und S9 (*RNP-loop*) als auch der Bereich um das *PFR*- und das *HXXH*-Motiv eine sehr ähnliche Lage im Vergleich zu GCT ein. Aufgrund der daraus resultierenden vergleichbaren Anordnung der Reste im aktiven Zentrum besitzen die Nucleosyleinheiten der Nucleotide die gleiche Orientierung in der Bindetasche (Abbildung 23).

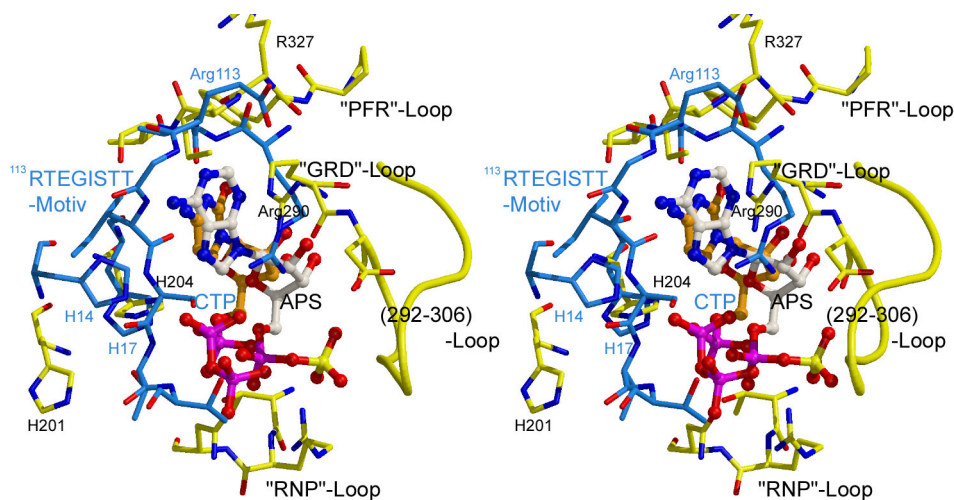


Abbildung 23: Überlagerung der funktionell wichtigen Reste aus ATP-Sulfurylase (gelb) und der TagD/GCT aus *B. subtilis* (blau) In *ball-and-stick*-Darstellung sind CTP (orange) und ATP (beige) gezeigt. Beide zeigen dieselbe Lage und Orientierung trotz unterschiedlicher Umgebung.

Obwohl alle Nukleotidyltransferasen α/β -Phosphodiesterase-Aktivität besitzen, dienen die Enzyme dieser Superfamilie für unterschiedliche biologische Zwecke und haben aus diesem Grund ein breites Spektrum an weiteren Substraten zur Umsetzung mit Nukleosidtriphosphaten. Die Substratbindetasche der ATP-Sulfurylase zeigt deshalb eine eigenständige Konzeption mit individuellen Konsensusmotiven, so ist der weitverbreitete *P-loop* *GxxGxGKT/S* der ATP-bindenden Nukleotidkinasen (Bork and Koonin, 1994; Saraste *et al.*, 1990) oder das typische *TYPKSGT*-Motiv der PAPS-bindenden Sulfotransferasen (Bidwell *et al.*, 1999; Kakuta *et al.*, 1999) nicht vorzufinden.

Außerdem zeigt die ATP-Sulfurylase trotz ähnlicher Struktur der *active site* keine Homologie zu den typischen (*footprint*-)Motiven ⁸*GTFDLL*, ⁶³*RyvDEVI* oder ¹¹³*RTEGISTT* der auch durch das *HXXH*-Motiv verwandten Cytidyltransferasen (Weber *et al.*, 1999) (Abbildung 23) oder dem *KMSKS*-Motiv der Klasse I Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (Delarue and Moras, 1993). Statt dessen verfügt die ATP-Sulfurylase neben der gemeinsamen *HXXH*-Box über ihr eigenes Ensemble von *active site*-Motiven, wie zum Beispiel die hoch konservierten ¹⁹⁷*RNP*-, ²⁸⁹*GRD*- und ³²⁷*PFR-loops* als auch das ³⁵⁶*ISGTXXR*-Modul in der prähelicalen Region der Domäne III. Diese definierte Anordnung verschiedener typischer *footprint*-Motive verleiht der Substratspezifität der ATP-Sulfurylase einen individuellen Charakter. Der bei Kinasen auftretende *P-loop* zur ATP-Bindung ist nur als *GRD-loop* in einer hoch modifizierten und degenerierten Form (IVGRDHAGPGKN) wiederzuerkennen und dient vor allem zur Bindung des Ribosyl-Anteils des Nukleotids. Darüber hinaus ist nicht nur die Bindung von Phosphat- und Sulfatgruppen gegenüber verwandten Enzymen stark verändert. So bindet sowohl bei der GCT als auch bei der ATP-Sulfurylase ein Argininrest an das jeweilige Nukleotid (Abbildung 23). Dieses Arginin ist in vielen Nukleotidyltransferasen invariant und auch bei den ATP-Sulfurylasen hoch konserviert. Während jedoch bei der CGT Arg113 aus dem ausgedehnten ¹¹³*RTEGISTT-loop* diese Aufgabe erfüllt, ist das strukturelle Pendant in der ATP-Sulfurylase Arg329, das von dem konservierten *PFR*-Motiv beigesteuert wird. Dieses jedoch ist in den Solvens-Bereich exponiert und so nicht an der Koordinierung des Nukleotids beteiligt (Abbildung 23). Seine Funktion wird von Arg290 des *GRD-loops* übernommen, das an die Nukleotidyleinheit des APS bindet und so auch zur Stabilisierung des Übergangszustandes beitragen kann, indem es weitere Wasserstoffbrücken zur β -Phosphatgruppe des ATP bildet.

Als weiteres strukturelles Charakteristikum der ATP-Sulfurylase ist der große *loop* zwischen den Aminosäuren Asp291 und Gly306 weder in GCT noch bei einem anderen Vertreter der Nukleotidyltransferasen zu finden (Abbildung 23). Er zeigt in Richtung des aktiven Zentrums und ist in allen Sulfurylasen als auch PAPS-Synthetasen stark konserviert. Mit seinem

vorwiegend positiv geladenen oder polarisierten Charakter ist er ein Bestandteil des Trichters („Anionenfalle“) in der direkten Umgebung der *active site*. Zudem ist es aber auch möglich, daß er auch eine Funktion beim Transfer des Sulfurylase-Reaktionsprodukts APS in das aktive Zentrum der APS-Kinase spielt.

4.9.6. Modellierter Substratkomplex

Die Reste Thr196, Arg197 und Asn198 sind mit der α -Phosphatgruppe des APS durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft. Jedoch sind in dem Strukturmodell des Produktkomplexes die beiden Histidine His201 und His204 des hoch konservierten HRAH-Motivs, die in anderen Nukleotidyltransferasen an die α - and β -Phosphate des Nukleotids binden, mit einer Distanz von 5,7 Å vom α -Phosphor sehr weit entfernt (Abbildung 20, 21, und 23). Diese Anordnung läßt darauf schließen, daß sie – im Gegensatz zu verwandten Nukleotidyltransferasen – nicht direkt z.B. als Protonen-Donoren in die Spaltung der α - β -Phosphodiesterbindung eingreifen, sondern eher eine Rolle in der Koordination des Pyrophosphats spielen könnten. Sie dienen so wahrscheinlich zur Stabilisierung einer produktiven Konformation des Substrates ATP als auch des Übergangszustandes während der Reaktion, wie es schon für die verwandten Klasse I Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (Leatherbarrow *et al.*, 1985; Perona *et al.*, 1993) beschrieben worden ist.

Da es im Rahmen dieser Arbeit trotz zahlreicher Experimente nicht gelungen ist, den Substratkomplex von ATP-Sulfurylase mit ATP und Sulfat darzustellen, wurde durch *Molecular Modelling* mit den Strukturdaten des binären Produktkomplexes ein solcher Komplex *in silico* erzeugt, um sowohl die Anordnung der Substratmoleküle, die Funktion der einzelnen Aminosäuren als auch den daraus resultierenden Reaktionsmechanismus ableiten zu können.

Dazu wurde in das Proteinmodell der Kristallstruktur des binären Produktkomplexes erst das Sulfat an jener Stelle eingesetzt, die es auch im Apoenzym einnimmt. Mit der Lage und Orientierung der Adenosyleinheit des APS wurde dann ein ATP-Molekül in die Bindetasche am Graphikdisplay manuell eingefügt. Die Positionen der beiden Phosphatgruppen relativ zum α -Phosphat wurden so gewählt, daß man die typische, U-förmige Konformation des Adenosyltriphosphats und maximale Wechselwirkungen mit den umgebenden Resten erhält (Abbildung 24). Dieses Modell wurde dann unter Berücksichtigung aller Parameter für Bindungslängen und -winkel und der entsprechenden Partiaalladungen und Kraftfelder energetisch minimiert.

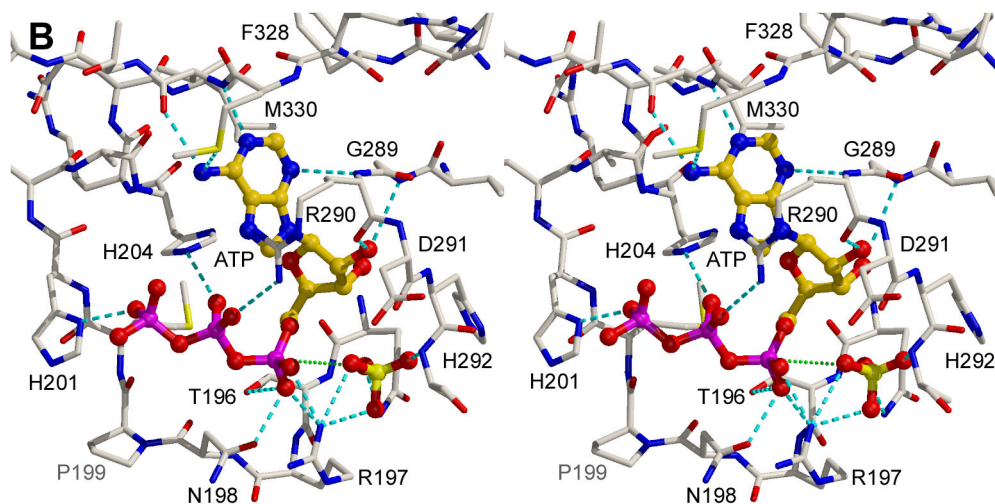


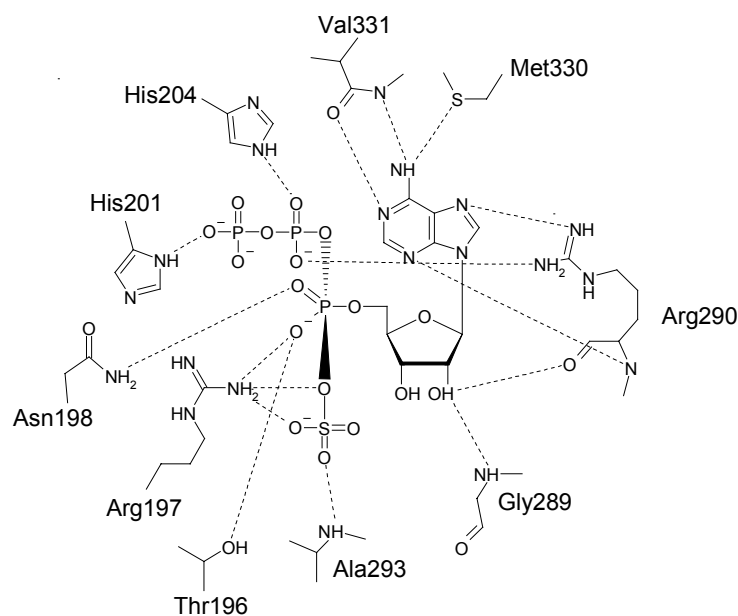
Abbildung 24: Stereodarstellung des modellierten ternären Substratkomplexes. ATP ist in der typischen, hufeisenförmigen Konformation gezeigt, die den nukleophilen Rückseitenangriff des Sauerstoffatoms des benachbarten Sulfats auf den α -Phosphor ermöglicht (grün gepunktet). Die Orientierung des Triphosphats ist so gestaltet, daß eine Koordination des weit entfernt liegenden His201 an das γ -Phosphat möglich ist. In cyan sind die Wasserstoffbrücken zu den umgebenden Resten gezeigt.

In der Struktur von GCT als typischem Vertreter der Nukleotidyltransferasen bindet Histidin His17 an das α -Phosphat sowie an die Sauerstoffbrücke zwischen den ersten beiden Phosphaten und His14 an das β -Phosphat des CTP (Abbildung 23). Das durch *Molecular Modelling* erhaltene Modell des ternären Substratkomplexes hingegen zeigt das ATP mit einer eher gestreckten Konformation des Triphosphats (Abbildung 24), in der das α -Phosphat nach wie vor durch Thr196, Arg197 und Asn198 koordiniert wird, während das β -Phosphat mit O1 Wasserstoffbrücken zu His204-N δ und mit O3 zu Arg290-N ζ bildet. Das γ -Phosphat wird über O4 nur an His201-N δ koordiniert. Die Seitenkette von Arg290 schließt sich zusammen mit Met330 wie ein Deckel über der Adenosyleinheit des ATP und schützt es damit vor Lösungsmittelzugriff, so daß das Pyrophosphat zusätzlich in der Bindetasche stabilisiert wird. Die hufeisenförmige Konformation des ATP begünstigt einen nukleophilen Rückseitenangriff (siehe Kap. 4.9.7.) des benachbarten Sulfats auf das α -Phosphat (Abbildung 24). Wie in GCT oder in vielen anderen ATPasen beobachtet, würde eine angewinkelten Konformation des Triphosphats die Komplexierung eines Mg^{2+} -Ions über die β - und γ -Phosphate begünstigen (Garcia *et al.*, 1990). Da aber auch in der Kristallstruktur des ternären Produktkomplexes mit Pyrophosphat kein Mg^{2+} identifiziert werden konnte, wurde es bei der Modellierung des Substratkomplexes ebenfalls nicht berücksichtigt.

4.9.7. Katalytischer Mechanismus und Stereoselektivität

Die kinetischen und stereochemischen Untersuchungen mit ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* von Zhang (Zhang, 1999) favorisieren eindeutig eine Umsetzung von ATP mit Sulfat zu APS unter Umkehrung der Stereochemie (Inversion). Gestützt durch diese Daten ist aus den analysierten Kristallstrukturen und dem modellierten Substratkomplex ableitbar, daß es sich bei der beobachteten enzymkatalysierten Umsetzung um einen Substitutionsmechanismus mit stereochemischer Inversion am α -Phosphor des ATP handelt (S_N2), der über einen pentavalenten Übergangszustand direkt zur Bildung von APS und Pyrophosphat führt, ohne daß es zur Formierung von kovalenten Zwischenprodukten $E\cdot AMP$ oder $E\cdot AMP\cdot SO_4$ kommt (Schema 3). Dieser Katalysemechanismus wird auch von den eng verwandten hexameren Adenylyltransferasen NMNAT und PPAT bestätigt (D'Angelo *et al.*, 2000; Izard and Geerlof, 1999).

Das Enzym stellt dazu geeignete Substratbindetaschen für ATP und Sulfat zur Verfügung, um sie nach der Aufnahme vor dem Solvens zu schützen, bringt die aktiven Gruppen in engen Kontakt zueinander. Dabei wird sowohl die Reaktivität des ATP als auch der nukleophile Charakter des Sulfats zu erhöht.



Schema 3: Schematische Darstellung des pentavalenten Übergangszustandes bei der nukleophilen Substitution mit Inversion am α -Phosphor. Das abgehende Pyrophosphat wird dabei von His201, His204 und Arg290 stabilisiert, während die anderen konservierten Reste zur Stabilisierung des Sulfats und der Adenosyleinheit und des α -Phosphats beitragen.

So wird z.B. ATP, das normalerweise in einer energetisch günstigeren, L-förmigen Konformation vorliegt, durch die Architektur der Bindetasche in eine angespannte, U-förmige Konformation gezwungen, die den nukleophilen Rückseitenangriff des Sulfats auf den α -Phosphor erlaubt. Während der Reaktion stabilisiert das Enzym den pentavalenten Übergangszustand durch Wasserstoffbrückenbindungen. Es sind aber auch stärkere, ionische Wechselwirkungen wahrscheinlich, da die komplexierenden Reste Arg197, Asn198, His201, His204 und Arg329 unter den physiologischen Lebensbedingungen der Hefezellen bei einem pH von 5,5 durchaus protoniert sein können, so daß die negativen Ladungen der Substratmoleküle noch besser ausgeglichen werden. Das modellierte Substratmodell zeigt deutlich, daß die beiden Histidine His201 und His204 dabei nur zur Stabilisierung und nicht zur direkten Hydrolyse des Pyrophosphats beitragen. Dies geschieht hier aber im Gegensatz zu den Histidinen des *HIGH*-Motivs der Klasse I Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, bei denen diese Komplexierung für den Übergangszustand beschrieben wird, auch schon vor der Reaktion. Durch die Komplexierung des β - und γ -Phosphats wird bereits eine gewisse Lockerung der Anhydridbindung zwischen α - und β -Phosphat erzielt. Nach der Umsetzung wirken sie dann bei der Entfernung der Reaktionsprodukte aus dem Reaktionszentrum mit.

4.10. Inhibitorkomplexe

Verschiedene biochemische Untersuchungen haben gezeigt (Farley *et al.*, 1976; Farley *et al.*, 1978; Foster *et al.*, 1994), daß die Bildung von APS aus ATP und anorganischem Sulfat durch ATP-Sulfurylase aus Pilzen und Hefe sowohl *in vitro* als auch in der Zelle durch eine Anzahl von einfachen chemischen Substanzen inhibiert werden kann. Dabei handelt es sich einerseits um reaktive Moleküle, die das Protein chemisch verändern, indem sie kovalent an Reste wie Histidine oder Arginine binden (z.B. Phenylglyoxal, Diethylpyrocarbonat), andererseits aber auch um Analoga der Substrate ATP (ADP, AMP, NADP⁺) und Sulfat (S₂O₃²⁻, FSO₃⁻, VO₄²⁻, NO₃⁻, ClO₃⁻). In höheren Organismen wie z.B. in Säugetieren wurde beobachtet, daß der inhibierende Effekt von z.B. Chlorat mit einer starken Reduktion der PAPS-Synthese in der Zelle verbunden ist und damit mit der Unterdrückung von Zellproliferation und -replikation durch die Blockierung der Sulfatisierung von Proteoglycanen und Kohlenhydraten in Zusammenhang gebracht werden kann (Greve *et al.*, 1988; Schriever *et al.*, 1997). Sulfatisierung betrifft auch zahlreiche andere Vorgänge in der Zelle, wie z.B. Blutgerinnung, Zelladhäsion, Knorpelbildung der Gliedmaßen und Regulation des Stoffwechsels sowie der hormonellen Aktivität (Coughtrie *et al.*, 1998; Glatt, 2000; Rosen *et al.*, 1997). Um einen detaillierteren Einblick in die Wechselwirkungen der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* mit den Substraten und den Katalysemechanismus zu bekommen, wurden zusätzliche Enzymkomplexe mit potentiellen Inhibitoren strukturell untersucht.

4.10.1. Komplex mit Thiosulfat

Thiosulfat ist ein nicht-reaktives Analogon des Sulfats, das in kompetitiver Weise die Sulfurylase-Reaktion hemmt (Renosto *et al.*, 1987; Renosto *et al.*, 1989; Renosto *et al.*, 1985). Die Inhibitorkomplexbkristalle, die durch Einlegen von Kristallen des Apoenzyms in den Erntepuffer, in dem 25 mM Natriumthiosulfat gelöst war, erhalten worden waren, zeigten die gleiche Kristallform mit ähnlichen Zellparametern wie die nativen Kristalle mit einem Protomer pro asymmetrischer Einheit (Tabelle II). Zwei Beobachtungen gaben eindeutige Hinweise auf das Vorhandensein von gebundenem Thiosulfat im Kristall: Erstens zeigte die 2F_o-F_c-Elektronendichtekarte im aktiven Zentrum eine bei 2,5 Å Auflösung gut definierte neue Dichtesphäre, in die sich leicht ein Thiosulfat-Molekül einbauen ließ (Abbildung 25).

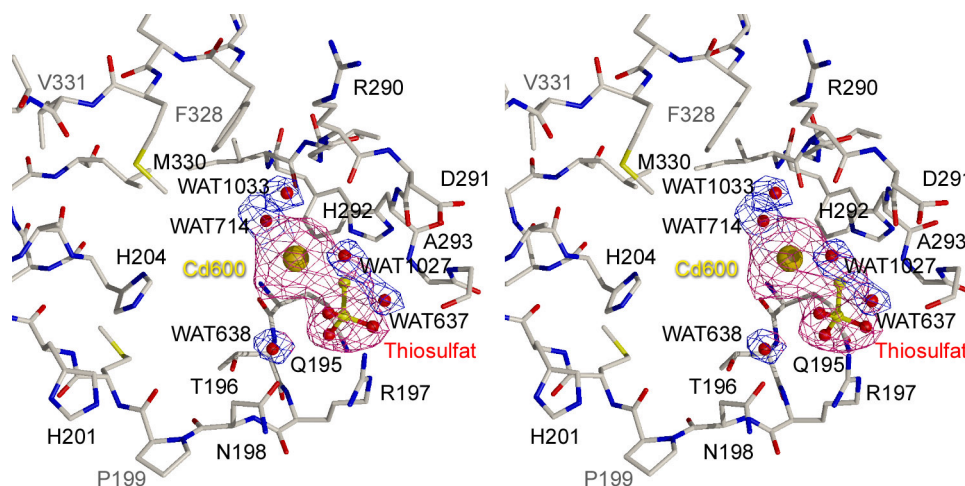


Abbildung 25: Stereodarstellung des Inhibitor-Komplexes der ATP-Sulfurylase mit Thiosulfat. Neben dem Thiosulfat-Molekül ist das Cadmium Cd600 in der *active site* gebunden. Beide sind von einer Anzahl von Wassermolekülen umgeben, die sie zusätzlich stabilisieren. Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichte um diese Moleküle bei $2,5 \text{ \AA}$ ist bei 1σ konturiert.

Bei einem B -Faktor von $28,1 \text{ \AA}^2$ für die Sulfiteinheit des Thiosulfats beträgt der B -Faktor für das zweite Schwefelatom S2 $26,7 \text{ \AA}^2$. Würde man ein Sauerstoffatom anstelle von S2 an dieselbe Position einbauen und das so erhaltene Strukturmodell gegen die Thiosulfatdaten verfeinern, so hätte dieser Sauerstoff nur $15,0 \text{ \AA}^2$ und würde zudem eine stark positive $F_o - F_c$ -Dichte aufweisen. Zweitens beinhaltet das aktive Zentrum direkt neben S2 eine zusätzliche Dichtesphäre, die in den hydrophoben Rückbereich gerichtet ist. Die $F_o - F_c$ -Elektronendichte zeigt an dieser Stelle einen Peak mit über 7σ , der wegen seiner globulären Form als weiteres Cadmium Cd600 interpretiert wurde (Abbildung 25). Diese Metallbindestelle ist in der nativen Kristallstruktur der ATP-Sulfurylase nicht vorhanden und damit ein Nachweis für die definierte Bindung von Thiosulfat, da dieses wegen des im Vergleich nukleophileren terminalen Schwefels eher für die Koordination des elektronenreichen Cadmiums geeignet ist. Das Thiosulfat nimmt in der Substratbindetasche dieselbe Position und Orientierung ein wie das originäre Sulfat. Es ist durch dieselben Aminosäuren wie das Sulfat verbrückt, zeigt aber weitere Wechselwirkungen mit dem Enzym und mit zusätzlichen Wassermolekülen. O1 ist vierfach mit WAT637 ($3,1 \text{ \AA}$), WAT638 ($3,1 \text{ \AA}$), WAT1027 ($3,2 \text{ \AA}$) sowie mit Arg197-Ne ($3,7 \text{ \AA}$) verknüpft, während die Wasserstoffbrücke zu Arg197-N ζ mit $3,8 \text{ \AA}$ nur sehr schwach ist. O2 ist durch Gln195-Ne ($3,1 \text{ \AA}$) und O3 durch WAT637 ($3,0 \text{ \AA}$) und Arg197-Ne ($3,0 \text{ \AA}$) koordiniert. Der Schwefel S2 zeigt durch Wasserstoffbrücken Kontakte zu Ala293-N ($3,2 \text{ \AA}$)

und ist zudem wahrscheinlich über eine Salzbrücke mit dem protonierten His292-Ne (3,8 Å) und mit S2, das seinerseits durch drei Wassermoleküle WAT1033 (2,7 Å), WAT714 (3,8 Å) und WAT1027 (3,7 Å) koordiniert ist, verbunden. Cd600 ist über eine Wasserbrücke mit Arg290-O (3,4 Å) verknüpft. Dieses erweiterte Netzwerk von Resten und Wassermolekülen bildet die Umgebung, die das Thiosulfat und das angelagerte Cadmium umgibt und zusätzlich stabilisiert. Dies führt zu einem *B*-Faktor von 28,0 Å² (Protein 32,9 Å²), der im Vergleich zum Sulfat durchaus niedrig ist (37,3 Å²; Protein 33,6 Å²), und erklärt zusätzlich die bevorzugte Bindung von Thiosulfat vor Sulfat in der *active site*. Um die Bindungsstärke von Thiosulfat qualitativ zu untersuchen, wurden Komplexkristalle in der Anwesenheit von 25 mM Thiosulfat mit MgATPγS inkubiert, schockgefroren und dann ein Datensatz aufgenommen. Jedoch konnte durch diese Behandlung der Kristalle keine Inkorporation von ATPγS ins Enzym beobachtet werden. Erst die Reinkubation in Thiosulfat-freiem Erntepuffer führte zur Verdrängung von Thiosulfat und zur Bindung von ATPγS in das aktive Zentrum, was durch die veränderte Kristallpackung und das Auftreten der typischen, L-förmigen Elektronendichte für APS beobachtet werden konnte. Obwohl diese Experimente nicht entworfen wurden, um die Inaktivierung der ATP-Sulfurylase quantitativ zu verfolgen und rein strukturellen Natur sind, dienen sie doch zum Nachweis des kompetitiven Charakters des Inhibitors Thiosulfat (Seubert *et al.*, 1983), und zeigen, daß die Sulfatbindetasche nicht nur für die Koordination von Inhibitoren, sondern auch durchaus für die katalytische Umsetzung ähnlicher Kleinmoleküle wie Molybdat (Molybdolyse) und Selenat geeignet ist.

4.10.2. Komplex mit ADP

Frühere Untersuchungen haben die Fähigkeit diverser Adenosylnukleotide (AMP, ADP, APS, NADP⁺) zu Tage gebracht, in kompetitiver Weise als Inhibitoren für die Sulfurylase-Aktivität zu wirken (Farley *et al.*, 1976). Um den Bindungsmodus eines typischen Vertreters dieser Substanzen und die Auswirkungen auf die Enzymkonformation zu analysieren, wurde die Kristallstruktur des Komplexes von ATP-Sulfurylase und ADP untersucht, das als Produkt der ATP-Hydrolyse in der Zelle zur Regulation der Sulfurylase-Aktivität beiträgt und in Konkurrenz zu beiden Substraten und zu APS steht.

Der Inhibitorkomplex wurde durch *Soaking*-Experimente mit Kristallen des Apoenzyms und MgADP erhalten (Tabelle III). Die Kristalle zeigten in der Raumgruppe R32 die Kristallform der Produktkomplexe mit zwei Protomeren pro asymmetrischer Einheit (siehe Kap. 4.11.2.

und 4.11.3.). Das aktive Zentrum zeigte eine gut definierte und konturierte $2F_o-F_c$ - und F_o-F_c -Elektronendichte, in die ein ADP-Molekül analog der Lage und Position des APS im Produktkomplex eingebaut werden konnte (Abbildung 26C). Es zeigt dieselbe L-förmige Konformation und einen ähnlichen Bindungsmodus wie das APS in beiden Komplexen. Jedoch können Unterschiede und zusätzliche Wechselwirkungen ausgemacht werden. Der N6-Stickstoff des Pyrimidinrings ist nicht nur an Met330-S (2,7 Å), sondern auch an Val331-N (2,0 Å) und Val331-O (3,0 Å) gebunden, während N7 des Imidazolrings eine Wasserstoffbrücke zu His204-Ne (3,4 Å) und einem Wassermolekül WAT674 (3,0 Å) bildet. O2* der Ribosyleinheit ist durch Arg290-N (3,1 Å) und Arg290-O (2,6 Å) koordiniert, während O3* Wasserstoffbrücken zu Gly289-N (3,1 Å) und His295-Nδ (2,9 Å) bildet. Die Adenosyleinheit ist so deutlich fester gebunden als im APS. Die zwei Phosphate sind durch dieselbe Gruppe von Resten (Gln195-Ne, Thr196-O, Arg197-N und -Nζ, Gln198-N sowie Ala293-N) mit sehr ähnlichen Bindungslängen wie die Phosphosulfateinheit des APS koordiniert (Abbildung 26C).

Ein weiterer Unterschied im Vergleich zu den Produktkomplexen ist eine zusätzliche Dichte nahe bei den Phosphatgruppen des ADP (Abbildung 26B und C). Während sie im binären Produktkomplex nicht zu beobachten ist, erscheint sie im ternären Komplex nur sehr schwach und wurde deshalb als Wassermolekül interpretiert. In der F_o-F_c -Elektronendichtekarte des ADP-Komplexes ist sie jedoch größer und globulär und wird durch die beiden Sauerstoffe O2A und O3A des α -Phosphats und durch O1B des β -Phosphats koordiniert. Zusätzlich wird sie auf der anderen Seite noch schwach von einem Wassermolekül WAT613 (3,7 Å) komplexiert. Obwohl die Bindungslängen von ca. 3,0 Å für reguläre Mg-O-Bindungen (2,0-2,6 Å) zu groß sind und eher für ein schwach besetztes Cadmium oder ein lose gebundenes Wassermolekül sprechen, kann nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um ein Magnesium Mg^{2+} handelt (Abbildung 26C), da Magnesiumchlorid im Puffer gelöst wurde, um eine den Produktkomplexen äquivalente Umgebung zu schaffen.

Die Annahme, daß es sich trotz der ungewöhnlichen Koordinationssphäre und Bindungslängen um ein Magnesium-Ion handelt, wird durch die Beobachtung unterstützt, daß der magnesiumfreie ADP-Enzymkomplex – ähnlich den Produktkomplexen – an dieser Position eine viel schwächer konturierte Dichte aufweist, was darauf hindeutet, daß das Magnesium in diesem Komplex entweder durch Wasser oder Natrium ersetzt ist.

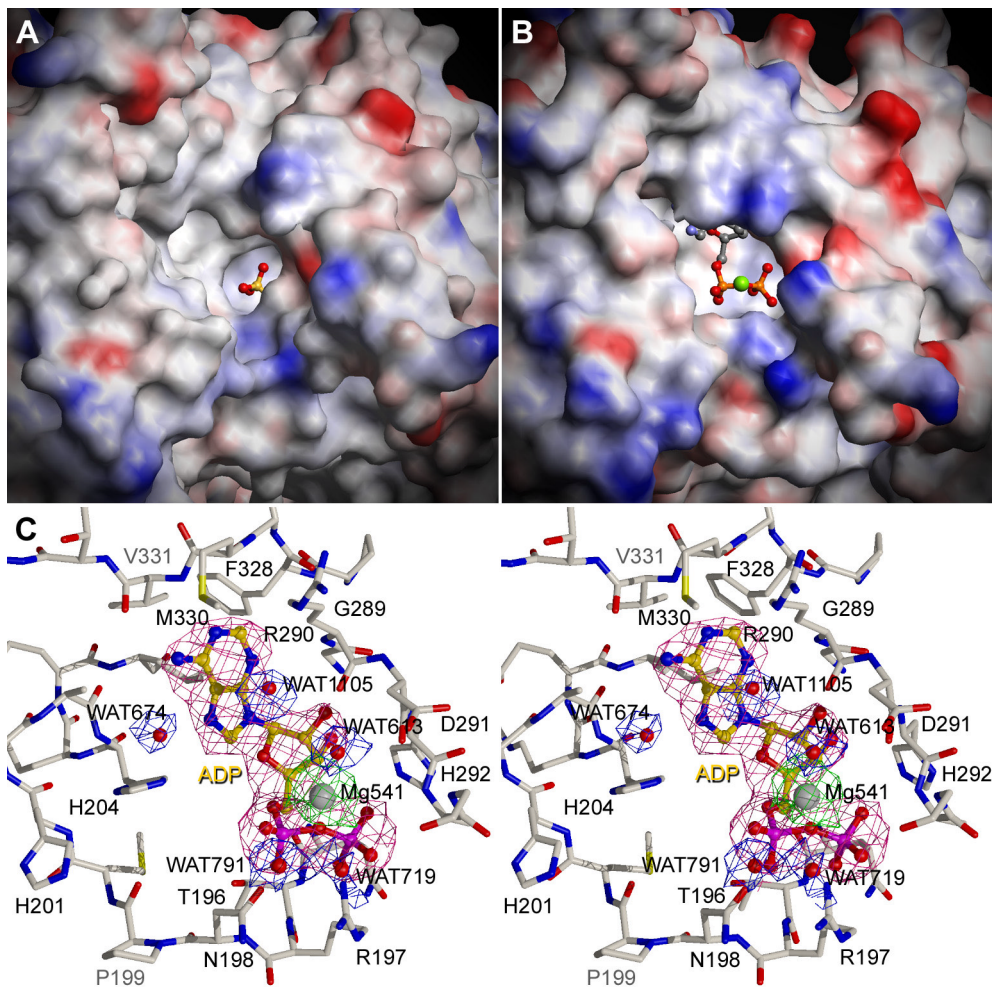


Abbildung 26: (A) Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials des Protomers der nativen ATP-Sulfurylase (blau: positiv polarisiert oder geladen, rot: negativ). Deutlich zu erkennen ist das gebundene Sulfat und die geöffnete Konformation des aktiven Zentrums. (B) zeigt den ADP-gebundenen Zustand des Protomers mit der durch den *displacement*-Mechanismus ausgelösten geschlossenen Konformation der *active site*. (C) Stereodarstellung des aktiven Zentrums aus (B) mit der 2F_o-F_c-Elektronendichtekarte bei 2,6 Å (1σ-Konturierung) am APS und den Wasserliganden sowie eine bei 2σ konturierte F_o-F_c-Elektronendichte am potentiellen Magnesium.

Analog zu den Produktkomplexen wurde beim Indizieren der Diffraktionsdaten des ADP-Komplekxkristalls eine veränderte Kristallform mit der Raumgruppe R32, ausgelöst durch eine nahezu verdoppelte c-Achse, festgestellt. Wiederum umfaßt die asymmetrische Einheit zwei Protomere, was ein deutlicher Hinweis für das Auftreten des *displacement*-Mechanismus' innerhalb des Protomers als Folge der Nukleotidbindung ist (Abbildung 26A und B). Wie bei den Produktkomplexen führt auch hier das *flipping* des Phe328 innerhalb des flexiblen *PFR-loops* zur Konformationsänderung der benachbarten Aminosäuren und zur Verschiebung ganzer Subdomänen des Enzyms. Wie Abbildung 26A zeigt, besitzt das aktive Zentrum des Apoenzyms eine „offene“ Konformation. Beim Binden von ADP wird Phe328 aus der Adenyl-Bindetasche an die Oberfläche der *active site* verdrängt und verursacht durch seine

Bindetasche an die Oberfläche der *active site* verdrängt und verursacht durch seine Drehbewegung eine Verschiebung des *PFR-loops*, der sich vor die Adenosyleinheit des Nukleotids schiebt und durch Met330 und Val331 in Wechselwirkung mit der Adenyl-Gruppe tritt (*induced fit*). Zusammen mit Arg290, das mit der Adenosyleinheit Wasserstoffbrückenbindungen aufbaut, schließt sich so die *active site* als Deckel vor und über dem gebundenen Nukleotid. Zusätzlich rückt der GRD-loop um 1,5-2 Å näher an das ADP, so daß sich die Substratbindetasche insgesamt kontrahiert. Dies führt zur Bildung der „geschlossenen“ Konformation des nukleotid-gebundenen aktiven Zentrums (Abbildung 26B). Mit einer RMS-Abweichung von 1,8 Å zum nativen Protomer fällt die Domänenbewegung beim ADP-Komplex allerdings kleiner aus als bei den beiden Produktkomplexen (2,8 Å). Dafür ist die Abweichung zwischen den beiden Protomeren, die die Auflösung der kristallographischen Symmetrie bedingt, mit 0,04 Å für die C α -Atome verschwindend gering. Dies deutet auf eine gleichmäßige und volle Besetzung der Bindetaschen mit ADP in allen sechs Protomeren hin, was zudem durch die niedrigen mittleren *B*-Faktoren von 30,5 Å² (28,1 Å²) für das ADP-Molekül im Vergleich zu einem mittleren *B*-Faktor von 29,0 Å² (28,8 Å²) für das Protein belegt wird. Die Zahlen in Klammer gelten für das zweite Protomer in der asymmetrischen Einheit, das mit seinen Symmetrieäquivalenten den unteren Ring aufbaut.

Diese Ergebnisse bestätigen außer der bevorzugten Affinität von ATP-Sulfurylase für Adenin-Nukleotide, daß ADP zudem in Konkurrenz zu beiden Substraten ATP und Sulfat sowie zu APS steht. Darüber hinaus bewirkt die Inhibitorbindung einen ähnlich ausgeprägten *displacement*-Mechanismus und den Übergang in die „geschlossene“ Konformation wie bei den Produktkomplexen, der beim ADP-Komplex aber sehr symmetrisch ausgeformt ist und eine gleichmäßige Bindung des Inhibitors in allen Protomeren des Hexamers anzeigt.

4.10.3. Komplex mit Chlorat

In kinetischen Studien wurde früher bereits gezeigt, daß Chlorat ein potenter Inhibitor für die Inaktivierung von ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* ist (Farley *et al.*, 1978). Mit einer Reduktion der enzymatischen Aktivität um 95% und einem [I]_{0.5} von 44 µM für das Hefe-Enzym (Foster *et al.*, 1994) unterbindet die Inkubation von Zellen mit Kaliumchlorat sehr effizient alle Arten von Proteinsulfatisierung (Baeuerle and Huttner, 1986; Greve *et al.*, 1988). Kaliumchlorat wird auch als Hilfsmittel in der Erforschung von Knochen- und Brustkrebskrankungen eingesetzt (Borgenstrom *et al.*, 2001; Sperinde and Nugent, 1998). Hier hat es sich als

wirkungsvolles Instrument zur Untersuchung der Bedeutung der Proteinsulfatisierung für die Regulation verschiedenster Zellvorgänge wie z.B. Wachstum und Proliferation entwickelt (Schriever *et al.*, 1997).

Chlorat wurde nach zusätzlichen Verfeinerungsschritten im ternären Produktkomplex gefunden, der durch *Soaking* von nativen Kristallen mit MgATP γ S und Kaliumchlorat erhalten wurde (Kap. 4.9.3.). In der Literatur wird Chlorat ähnlich dem Thiosulfat und anderen Homologen oft als kompetitiver Inhibitor beschrieben, der die ATP-Sulfurylase, wie oben für Thiosulfat gezeigt, scheinbar durch Besetzung des aktiven Zentrums inaktiviert. In der zu einem R-Faktor von 18,4% (R_{free} 23,3%) verfeinerten $2F_o - F_c$ -Elektronendichte des ternären Produktkomplexes E•APS•PP $_i$ allerdings konnte das Chlorat in direkter Nähe zu His201-N ϵ lokalisiert werden (Abbildungen 27 und 28).

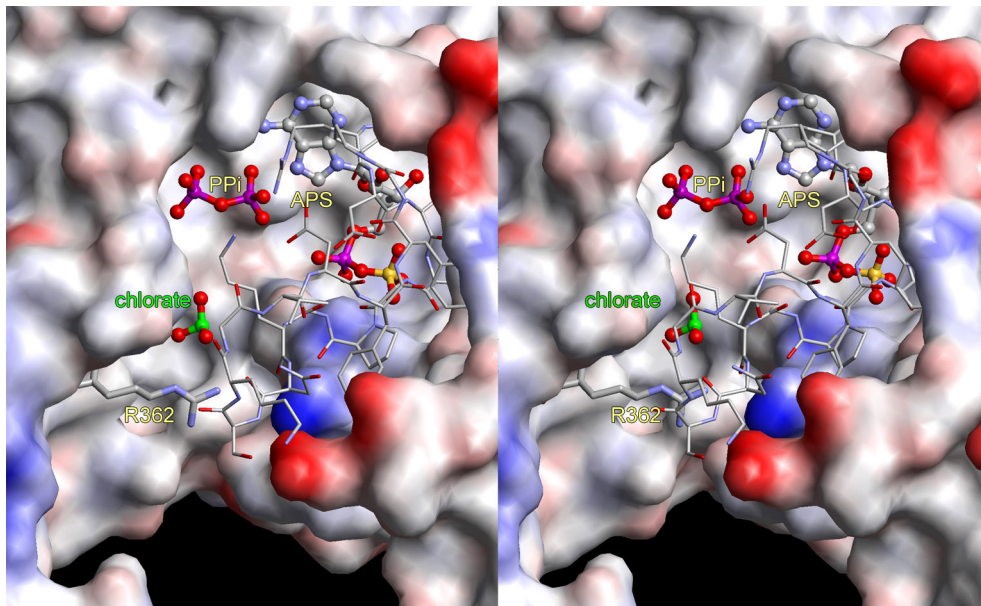


Abbildung 27: Stereodarstellung des ternären Produktkomplexes mit gebundenem Chlorat. Der *262-306-loop* ist in *stick*-Darstellung gezeigt. Chlorat steckt zwischen den Domänen II und III und verhindert ein Öffnen der geschlossenen Konformation und damit ein Entlassen der Produktmoleküle. Arg362 hat zusätzlich die Konformation geändert und wechselwirkt mit Domäne II.

Anstatt in der Sulfatbindetasche steckt es in dem Spalt zwischen den beiden Domänen II und III. Es bildet mit seinem O2 eine Wasserstoffbrücke zu His201-N ϵ (2,8 Å) und ist über ein zusätzliches Wassermolekül WAT597 an Pro199 gebunden. Während WAT597 eine Wasserstoffbrücke zum darüberliegenden Pyrophosphat (3,1 Å) aufbaut, wechselwirkt das Chlorat durch *Van-der-Waals*-Kontakte auch noch mit Leu361 (Abbildung 28) und ist mit O4 über eine Wasserstoffbrücke an Asn198-N δ (3,6 Å) gebunden. Die Seitenkette von Arg362, dem

letzten Rest des hoch konservierten, an der Bindung des Pyrophosphats beteiligten *ISGTXXR*-Motivs von Domäne III, ist vom Solvens (native Struktur) in Richtung Domäne II geklappt und schließt durch Wasserstoffbrücken zwischen N ζ und Chlorat-O4 (3,2 Å) sowie Asn198-N δ die Lücke zwischen den beiden Domänen (Abbildung 28). Der Kontakt zu Asn198 wird nur durch die Verschiebung der Domänen durch die Nukleotidbindung ermöglicht und durch eine Wasserbrücke mit WAT1182 vermittelt. Dieses engmaschige Netzwerk von Wechselwirkungen zwischen Enzym, Produkt- und Wassermolekülen sowie dem Chlorat fixiert das aktive Zentrum in seiner „geschlossenen“ Konformation. Das Chlorat wirkt dabei als ein zusätzliches *Linker*-Element (Abbildungen 27 und 28), das die Rückbewegung der Domänen in die „offene“ Konformation und dadurch die Freisetzung der Produktmoleküle nach Ablauf eines Reaktionszyklus aus dem Reaktionszentrum verhindert.

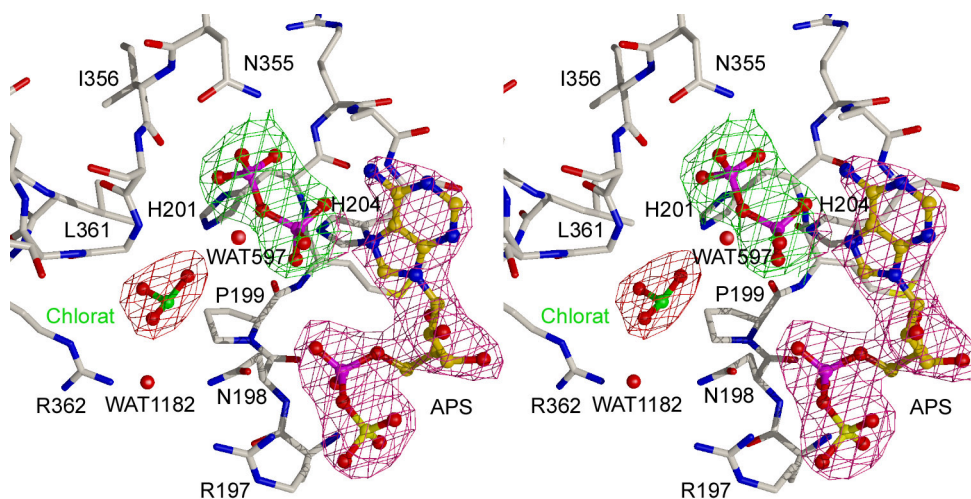


Abbildung 28: Blick von oben auf das aktive Zentrum mit APS, PP_i und Chlorat. Gezeigt ist die 2F_o-F_c-Elektronendichte um diese Moleküle sowie das Wasser WAT1182, das die Wechselwirkung zwischen Arg362 und Asn198 vermittelt. WAT597 vermittelt die Wechselwirkungen zwischen His201, Chlorat und Pyrophosphat.

Soaking-Experimente mit den nativen Kristallen und Kaliumchlorat in Anwesenheit von Sulfat, aber ohne MgATP γ S zeigten hingegen, daß Chlorat allein nicht an das Enzym bindet. Dies kann dadurch erklärt werden, daß das Enzym dem Inhibitormolekül in der „offenen“ Konformation ohne gebundenes Substrat oder Produkt keine geeignete Bindetasche zwischen den Domänen bietet, so daß es nicht genug Möglichkeiten zur Wechselwirkung gibt. Der inhibierende Effekt des Chlorats ist somit primär nicht von kompetitivem Charakter. Indem es

das Enzym im produktgebundenen Zustand gefangen hält, scheint es noch verstärkend auf die Produktinhibierung des Enzyms durch APS und PP_i zu wirken.

Neben der neu definierten Inhibitorwirkung des Chlorats zeigt diese Kristallstruktur sehr deutlich, daß der *displacement*-Mechanismus und die dadurch ausgelösten Domänenbewegungen nicht nur der Substraterkennung durch *induced fit* und Ausformung der Bindetasche dienen, sondern daß sie ein essentielles Element für den Katalysezyklus der ATP-Sulfurylase sind. Der *displacement*-Mechanismus ist erst an der Bindung von ATP und dessen Stabilisierung in einer produktiven Konformation, dann an der Stabilisierung des Übergangszustandes durch Arg290 und schließlich der gezielten Freisetzung der Produkte aus dem aktiven Zentrum beteiligt.

5. Diskussion

5.1. Proteinpräparation und Strukturlösung

5.1.1. Fermentation, Isolierung und Charakterisierung

ATP-Sulfurylase wurde anfangs aus selbst kultivierten Zellen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert. Auf eine heterologe Überexpression in Bakterienzellen wurde wegen der im Milligramm-Maßstab erhaltenen Proteinmengen, die ausreichend für die Durchführung von ersten Kristallisationsversuchen erschienen, nicht zurückgegriffen. Die Anzucht und Fermentation von Hefekulturen im 10 l-Batch-Verfahren war zwar bereits etabliert (Ullrich, Diplomarbeit), aber mit einer Gesamtdauer von 5-6 Tagen pro Anzucht sehr zeitaufwendig und lieferte zudem für breit angelegte *Screening*-Verfahren nur ungenügende Gesamtausbeuten. Aus Gründen der Zeitersparnis und der Reproduzierbarkeit wurde deshalb die kommerziell als Preßhefe erhältliche Bäckerhefe, die schon für die präparative Isolation verschiedenster Proteine, z.B. des Proteasoms (Groll *et al.*, 1997) verwendet worden war, auch zur nativen Reinigung von ATP-Sulfurylase verwendet. Die Ausbeute von 5-10 mg aus 500 g Zellen konnte nun in hinreichend kurzer Zeit reproduziert werden. Nach dem Zellaufschluß mit einer speziellen Zelmühle wurde das Protein mittels eines vierstufigen Präparationsprotokolls mit Trennschritten an Q-Sepharose-FF, keramischem Hydroxylapatit, *Reactive Red* Agarose 120 und Superose 6 in elektrophoretischer Reinheit erhalten. Schon nach der Ionenaustauschchromatographie war die Bande der ATP-Sulfurylase auf dem SDS-Gel deutlich sichtbar. Der beim zweiten Chromatographieschritt auftretende Effekt, daß die ATP-Sulfurylase bei pH 7,5 sehr schlecht mit dem Hydroxylapatit-Material wechselwirkte und deshalb sehr früh von der Hydroxylapatit-Säule eluierte, wurde bewußt zur Abtrennung des Proteins von den Verunreinigungen ausgenutzt. Die nach der Hydroxylapatit-Säule verbleibende „Doppelbande“ konnte erst nach längerem Experimentieren mit verschiedenen Säulenmaterialien und Puffern durch Einsatz des *Reactive Red* Agarose-Materials hinreichend gut aufgetrennt werden. Da der *Reactive Red*-Farbstoff als ATP-Analogon mit nukleotidbindenden Enzymen wechselwirkt, gab die Adsorption von ATP-Sulfurylase an diese Affinitätsmatrix bereits bei diesem Schritt der Präparation den strukturellen Hinweis, daß die ATP-Bindestelle der ATP-Sulfurylase gut zugänglich an der Oberfläche des Enzyms liegen muß.

Bei dem zweiten Protein in der Lösung handelte es sich, wie durch N-terminales Ansequenzieren festgestellt werden konnte, um das mitochondriale Chaperonin Hsp60/Cpn60, das Hefe-Homologe des GroEL aus *E. coli*. Da dieses zylinderförmige Partikel zwar eine ATP-Bindestelle besitzt, diese aber, wie aus der bereits bekannten GroEL-Struktur (Braig *et al.*, 1994) ersichtlich, im Innern des Hohlraums liegt und so nicht der Säulenmatrix zugänglich ist, bindet Hsp60 nicht an die Affinitätssäule und konnte beim Waschen leicht entfernt werden.

Nach dem finalen Gelfiltrationsschritt an der FPLC mit der Superose 6-Säule lag die ATP-Sulfurylase in sehr hoher Reinheit vor, was durch eine einzelne Bande auf dem SDS-Gel und durch das Auftreten eines Signals bei der analytischen Gelfiltration bestätigt wurde.

5.1.2. Kristallisation

Umfangreiche Kristallisationsexperimente mit gereinigter ATP-Sulfurylase führten zu einer finalen Kristallisationsbedingung, die 25 mM Cadmiumsulfat als essentielles Additiv enthielt. Die so erhaltenen trigonalen Kristalle gehörten zu der Raumgruppe R32 und streuten *in house* bis zu einer maximalen Auflösung von 2,5 Å und Synchrotronstrahlung bis 1,95 Å. Da wegen unzureichender Sequenzhomologien zu Proteinen mit bekannter Struktur schon bald klar war, daß die Lösung des Phasenproblems und damit der Kristallstruktur nur durch MAD- oder MIR-Methoden möglich sein würde, wurden schon für die Aufnahme erster nativer Datensätze eine geeignete *Cryo*-Bedingung gesucht und der Erntepuffer mit 20 % Glycerin später für alle *Soaking*-Experimente verwendet. Versuche, Cadmium durch Magnesium oder Zink sowie Sulfat durch andere Anionen direkt im Kristallisationspuffer zu ersetzen, führten zu keinem Ergebnis. Durch *Soaking*-Experimente mit den entsprechenden, im Erntepuffer gelösten Metallsalzen wurde die Gitterordnung und damit die Streukraft der Kristalle empfindlich gestört, so daß, unabhängig von der Verweildauer der Kristalle im Puffer, keine Diffraktion mehr zu beobachten war. Inhibitor-*Soaks* mit den Sulfat-Analoga Vanadat, Molybdat und Nitrat in Kombination mit dem verwendeten Erntepuffer lieferten ebenfalls keine streuenden Kristalle. Allerdings konnte nach *Soaking*-Experimenten mit den nativen Kristallen mit ATP-Analoga sowie mit dem Inhibitor ADP unter Erhalt der Streukraft eine Änderung der Kristallform innerhalb der Raumgruppe R32 beobachtet werden. Die Indizierung der Diffraktionsdaten ergab in allen drei Fällen bei einer nahezu verdoppelten c-Achse zwei symmetrieunabhängige Monomere pro asymmetrischer Einheit.

5.1.3. Strukturlösung durch MIR

Die anfangs favorisierte Strategie der Strukturlösung der ATP-Sulfurylase mittels MAD-Techniken und Tantalbromid als Schweratomderivat mußte aufgegeben werden, da die ungenügende Isomorphie der Datensätze bei den einzelnen Wellenlängen eine erfolgreiche Auswertung nicht zuließ. Die Ursache der Instabilität des derivatisierten Kristalls und der dadurch ausgelösten Nicht-Isomorphie der einzelnen Datensätze ist vermutlich in Meßschäden zu suchen, da der Kristall mehr als 24 Stunden der intensiven Synchrotronstrahlung ausgesetzt war und sich dabei sowohl Proteinstrukturen als auch der Tantalbromid-Cluster langsam auflösten. Ein Indiz dafür war das stete Aufhellen des anfangs durch das Tantalbromid tiefgrün gefärbten Kristalls. Unter Verwendung der ersten beiden MAD-Datensätze und des hochaufgelösten nativen Datensatzes anstelle der *remote*-Wellenlänge gelang es dann zwar, die Position des Tantalbromid-Clusters in der Einheitszelle zu bestimmen; Versuche, mittels PC-Verfeinerung die einzelnen Atome zu positionieren und den Cluster zu orientieren, scheiterten allerdings. Neben dem dann als konventionelles Schweratomderivat verwendeten ersten MAD-Datensatz konnten anschließend an der Drehanode noch zwei weitere Derivate gefunden werden, die zusammen zur Strukturlösung mittels MIR-Phasierung verwendet wurden. Die initiale, mit den MIR-Phasen aller drei Derivate bei 2,7 Å berechnete Elektronendichtekarte war nur von mäßiger Qualität und erlaubte nur die Identifizierung und den Einbau einiger Sekundärstrukturelemente als Poly-Alanin-Ketten. Der Durchbruch im Modellbau wurde erst durch Phasenkombination der experimentellen mit den Modellphasen des Poly-Alanin-Modells erzielt, wodurch die Elektronendichtekarte soweit verbessert werden konnte, daß erste Seitenketten und damit Teile der Aminosäuresequenz identifiziert werden konnten. Eine Phasenexpansion auf die Auflösung des nativen Datensatzes von 1,95 Å lieferte schließlich in einem iterativen Verfahren von Modellbau und Verfeinerung die Grundlage für das finale Proteinmodell samt aller Liganden, Metallatome und Lösungsmittelmoleküle. Mit einem finalen *R*-Faktor von 19,6 % (R_{free} 23,1 %) und ausgezeichneten Werten im Ramachandranplot besitzt das finale Strukturmodell der nativen ATP-Sulfurylase eine exzellente Qualität.

5.1.4. Strukturlösung durch Molekularen Ersatz

Zur Strukturanalyse des binären Produktkomplexes mußte aufgrund der veränderten Lage und Orientierung der zwei asymmetrischen Protomere in der neuen Einheitszelle die Methode des

Molekularen Ersatzes angewandt werden. Bei den weiteren Produkt- als auch bei den Inhibitor-komplexen traten keine weiter modifizierten Kristallformen auf, so daß deren Strukturen durch Verfeinern der Struktur-faktoren des nativen Strukturmodells oder des binären Produkt-komplexes gegen die entsprechenden Datensätze gelöst werden konnten. Die Strukturmodelle wurden schließlich nur noch durch Einbau der Produkt- oder Inhibitormoleküle als auch der Liganden, Metallionen und Lösungsmittelmoleküle in die neuen $2F_o-F_c$ -Elektronendichte-karten vervollständigt und in iterativen Zyklen manuell überbaut und verfeinert. Alle Produkt- und Inhibitor-komplexstrukturen zeigten für die jeweilige Auflösung sehr gute R -Faktoren und zeichneten sich durch zufriedenstellende Molekülgeometrien im Ramachandranplot als auch durch sehr gut definierte Elektronendichten aus.

5.2. Vergleich mit verwandten Nukleotidyltransferasen

Das 350 kDa große, homo-hexamere Partikel der ATP-Sulfurylase wird über die D3-Symmetrie der Raumgruppe R32 aufgebaut und besteht aus zwei einander zugewandten Trimerenringen. Die Aufbau des Protomers als auch die Architektur des Hexamers der ATP-Sulfurylase ist in der beobachteten Form sehr komplex und bisher einzigartig. Der Gesamtkomplex ähnelt in Aufbau und Symmetrie nur der dodecameren Aspartat-Transcarbamoylase (Honzatko *et al.*, 1982), die sich allerdings aus Dimeren von unabhängigen katalytischen und allosterischen Polypeptidketten zusammensetzt. Drei der vier Domänen des ATP-Sulfurylase-Protomers besitzen eine Tertiärstruktur, die den charakteristischen Faltungstypen bestimmter Proteinfamilien sehr ähnlich ist. Neben dem β -barrel-ähnlichen Faltungstyp der N-terminalen Domäne und der den Nukleotidkinasen verwandten Faltung der C-terminalen Domäne IV fällt besonders die typische Dinukleotid-Faltung nach dem Rossmann-Typ der *active site*-Domäne II auf. Diese α/β -Faltung ist ein gemeinsames Merkmal der Mitglieder der Superfamilien der Adenin-Nukleotid- α -Hydrolasen und der Nukleotidyltransferasen, zu denen z.B. die GMP-Synthetase (Tesmer *et al.*, 1996), Phosphopantethein-Adenylyltransferase (PPAT) und Pantothenat Synthetase (von Delft *et al.*, 2001), Nicotinamidmononucleotid-Adenylyltransferase (NMNAT: D'Angelo *et al.*, 2000; Saridakis *et al.*, 2001) und NAD Synthase (Rizzi *et al.*, 1996), aber auch vor allem die Vertreter der Klasse I Aminoacyl-tRNA-Synthetasen oder die Cytidyltransferasen (Choi *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 1999) gehören.

5.2.1. Vergleich mit GCT, Glutaminyl-tRNA-Synthetase, PPAT und NMNAT

Bei der ATP-Sulfurylase ist die Domäne II nur eine von drei mit ungefähr 170 Aminosäuren gleich großen Subdomänen mit einem α/β -Faltungstyp, stellt aber mit dem aktiven Zentrum das zentrale Kompartiment des Protomers dar. Während GlnRS wie viele andere Aminoacyl-tRNA-Synthetasen auch aus mehreren verschiedenen Domänen aufgebaut ist, bestehen viele Nukleotidyltransferasen wie z.B. GCT, PPAT oder NMNAT nur aus diesem einen strukturellen Basiselement und bilden damit Oligomere aus. Die 126 Reste kleine GCT aus *B. subtilis* formt nur ein Homodimer, die PPAT (159 Reste) und NMNAT (164 Reste) hingegen bilden dem Partikel der ATP-Sulfurylase ähnliche Homohexamere aus jeweils zwei Trimerenringen (Abbildung 29).

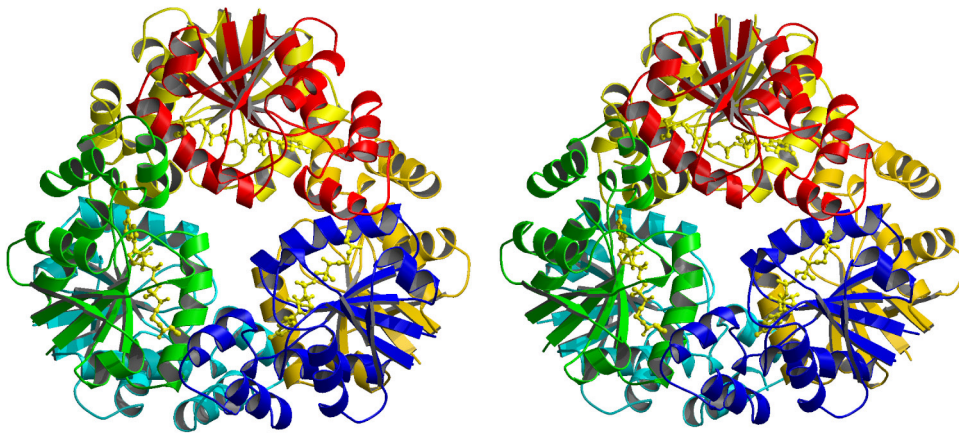


Abbildung 29: Stereoabbildung der Phosphopantethein Synthetase (PPAT) in Stereodarstellung. Sie ist als Trimer von Dimeren aufgebaut (Izard *et al.*, 1999), nur ein Ring ist mit dem Produktmolekül komplexiert (*half sides reactivity*).

Doch trotz identischem Oligomerisierungsgrad zeigen alle drei Enzyme innerhalb der Trimerenringe eine unterschiedliche Packung der Protomere. Im Hexamer der ATP-Sulfurylase berühren sich drei Protomere im Ring abwechselnd über Kontakte der Domänen II und IV, so daß beide Ringe in *back-to-back*-Manier gepackt sind. Im Komplex von PPAT unterdessen, der als Trimer von Dimeren beschrieben wird (Izard *et al.*, 1999), sind die einzelnen Protomere im Vergleich zur Domäne II um 180° verdreht orientiert, so daß die einzelnen Bausteine direkt übereinander und die Ringe *face-to-face* zueinander stehen. Die *active sites* weisen so im Gegensatz zur ATP-Sulfurylase nach innen in Richtung des zentralen Hohlraums des Hexamers. Zudem ist nur eines der beiden Dimerenprotomere mit Produktmolekülen komplexiert, während sich das andere im Apozustand befindet. Dieser Effekt der asymmetrischen

Ligation und halbbesetzten Ringe wurde in dieser Form nur in PPAT gefunden (Izard *et al.*, 1999). In NMNAT hingegen stehen die einzelnen Monomere zwar in derselben Orientierung wie bei der ATP-Sulfurylase, sind aber um 30° nach rechts verkippt, so daß sie trotz gleicher Monomerstruktur vollkommen andere Trimerenringe mit verschiedenen Intra- und Interringkontakten als bei PPAT aufbauen. Im Substratkomplex mit ATP sind deshalb auch alle sechs aktiven Zentren besetzt (Abbildung 30).

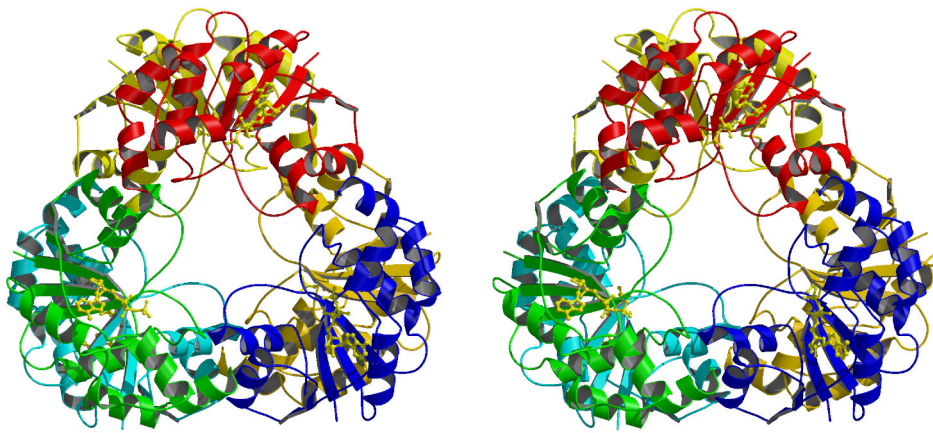


Abbildung 30: Stereodarstellung der Nikotinamidmononukleotid Adenylyltransferase (NMNAT). Sie ist ein Dimer von Trimeren und zeigt in allen aktiven Zentren gebundenes ATP (D'Angelo *et al.*, 2000; Saridakis *et al.*, 2001).

Auffällig bei den Nukleotidyltransferasen ist der lange *loop*-Bereich, der sich C-terminal an den Kernbereich der katalytischen Domänen anschließt und mit der darauffolgenden α -Helix den linken Rand der Substratbindetaschen bildet. Überlagert man die Strukturen (Abbildung 31), so sind nicht nur der hoch konservierte Faltungstyp der Domänen und die übereinstimmende Position und Orientierung der Nukleotide in den *active sites* zu beobachten, sondern auch eine gravierende strukturelle Homologie gerade in diesem *loop*-Bereich vor und bei der ersten Helix, der bei der ATP-Sulfurylase wie auch bei vielen Nukleotidyltransferasen eine gewisse Flexibilität aufweist. Während in GCT als auch bei GlnRS nach dem langen *loop* nur eine Helix vorhanden ist, weisen sowohl PPAT als auch NMNAT eine zweite antiparallele Helix auf, die sich beide auch in der ATP-Sulfurylase als Bestandteil der intermediären Domäne III wiederfinden (H13 und H14). Interessanterweise liegen bei allen Nukleotidyltransferasen in dieser Region für die jeweilige Familie charakteristische, hoch konservierte Motive, denen allen ein wichtiger Beitrag zum katalytischen Mechanismus zugesprochen wird,

z.B. das ¹¹³*RTEGISTT*-Motiv bei GCT, das ²⁷⁰*KMSKS*-Motiv bei GlnRS sowie das *ISGTXXR*-Motiv bei der ATP-Sulfurylase.

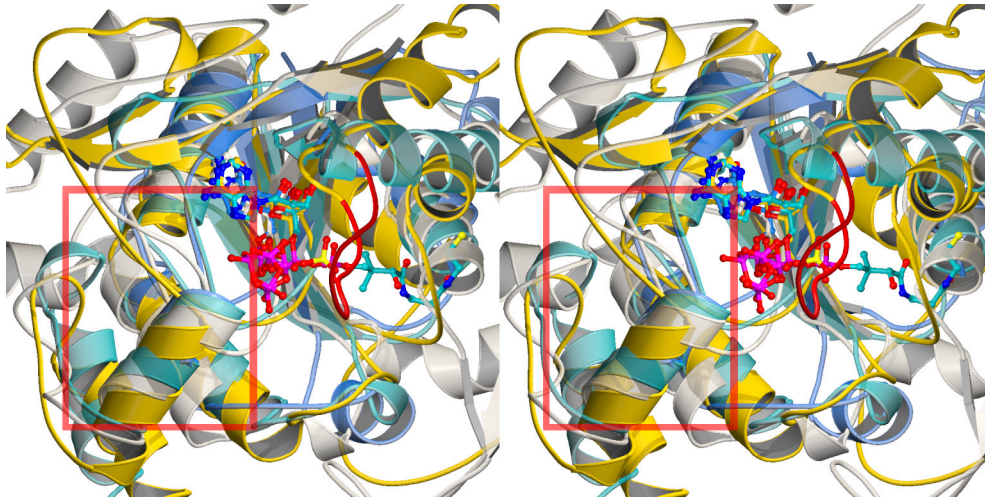


Abbildung 31: Überlagerung von ATP-Sulfurylase (gold), GCT (blau), PPAT (cyan) und GlnRS (beige) in Stereodarstellung. Deutlich zu sehen ist der *206-362-loop* (rot), der bei keiner anderen Nukleotidyltransferase zu beobachten ist, und der strukturell hoch konservierte *loop*-Bereich mit der α -Helix im Vordergrund (roter Kasten), der bei den Nukleotidyltransferasen sehr wichtige Konsensussequenzen trägt.

Wie schon in Kapitel 4.10.2.2. beschrieben, verfügt die ATP-Sulfurylase in Domäne II über einen langen *loop*-Bereich zwischen S12 und H12 (*292-306-loop*). Dieses Charakteristikum tritt bei keiner anderen Nukleotidyltransferase auf und ist in ATP-Sulfurylasen als auch in PAPS-Synthetasen auffallend stark konserviert. Mit einer Reihe dicht aufeinanderfolgender, positiv geladener Reste (His292, Lys297, Asn 298 und Lys300) formt er zusammen mit Arg290, Arg329, Asn355 und dem basischen *RRRLR*-Modul des *ISGTXXR*-Motivs einen stark positiv geladenen oder polarisierten Trichter, der als „Anionenfalle“ für die negativ geladenen Substrate ATP und Sulfat wirkt (Abbildung 18 und 31). Da der *292-306-loop* ins Zentrum des Protomers gerichtet ist und ansonsten keinerlei Wechselwirkungen mit anderen Resten oder Untereinheiten zeigt, ist es möglich, daß er entweder für den gerichteten Export des Reaktionsprodukts APS aus dem Reaktionszentrum ins Solvens verantwortlich ist oder sogar eine Art *Docking*-Funktion bei der Überleitung von APS ins katalytische Zentrum der APS-Kinase erfüllt, wenn sich diese dem Reaktionszentrum der ATP-Sulfurylase nähert.

5.2.2. Aktives Zentrum, Nukleotidbindung und katalytischer Mechanismus

Betrachtet man die aktiven Zentren der überlagerten Nukleotidyltransferasen näher (Abbildung 32), so fällt zuerst die nahezu identische Position des Nucleosidmonophosphat-Anteils der verschiedenen gebundenen Nucleotide auf.

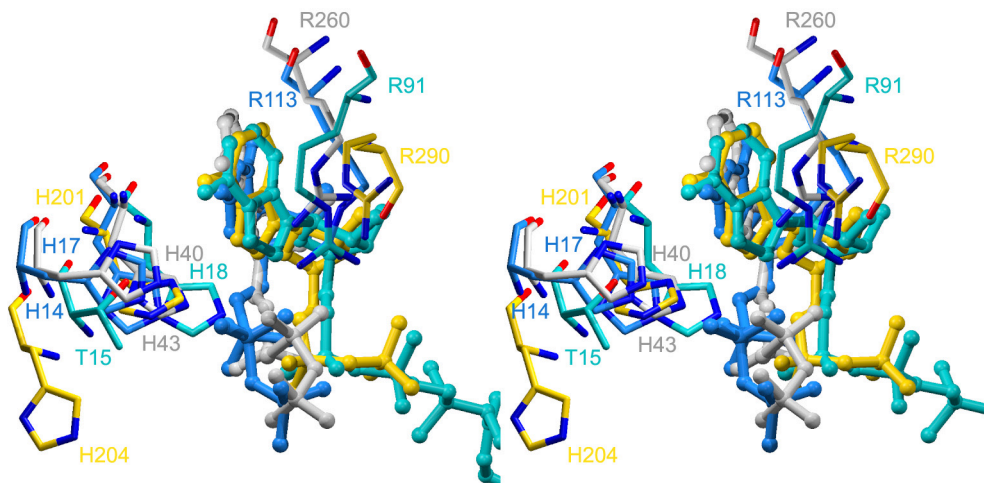


Abbildung 32: Stereodarstellung der Überlagerung der beiden Histidine His201 und His204 sowie von Arg290 der ATP-Sulfurylase (gold) mit den äquivalenten Resten aus GCT (blau), PPAT (cyan) und GlnRS (beige). Die Nucleotide haben eine annähernd identische Position und Orientierung in der Bindetasche. Während die Position von His204 bei den anderen Vertretern konserviert ist, weicht es in der ATP-Sulfurylase von der Konsensusposition ab.

Dies ist trotz der ähnlichen Architektur der verschiedenen aktiven Zentren durch die gemeinsame Rossmann-Faltung um so erstaunlicher, da die umgebenden Reste und dadurch die Nucleotid-Bindungsmuster doch sehr unterschiedlich sind. Neben dem oben erwähnten, strukturell konservierten *loop*-Bereich tritt als gemeinsames Merkmal nur das hoch konservierte und für die Katalyse wichtige *HXG/AH*-Motiv in den Vordergrund, das bei PPAT in einer Abwandlung als ¹⁵*TNGH* vorliegt. Es sitzt bei allen Nucleotidyltransferasen am N-Terminus einer ebenfalls strukturell hoch konservierten α -Helix. Während bei GCT und NMNAT die α - und β -Phosphatgruppen des NTP durch beide Histidine H14/H17 sowie H13/H16 komplexiert sind (siehe auch Kap. 4.9.5.), bindet in PPAT nur noch H18 direkt an das α -Phosphat des Phosphopantethein-Adenylats und wird dabei über Wasserstoffbrücken von T15 stabilisiert. Die GlnRS ist hinsichtlich des Katalysemechanismus' die am besten untersuchte Nucleotidyltransferase. Hier wird den *HIGH*-Histidinen (zusammen mit Lys270

des *KSMKS-loops*) ein wichtiger Beitrag zur Stabilisierung des pentavalenten Übergangszustandes durch Koordinierung der α - und β -Phosphatgruppen des ATP zugeschrieben, im Substratkomplex sind jedoch nur geringfügige Wechselwirkungen dieser beiden Reste mit ATP zu beobachten (Perona *et al.*, 1993). So wird das Pyrophosphat in der angewinkelten Konformation des Grundzustandes hauptsächlich von Asn36 (γ -Phosphat) und Lys270 (α - und γ -Phosphat) komplexiert. Asn36 steht darüber hinaus in direktem Wasserstoffbrückenkontakt zu His40. Im Grundzustand bindet His40 über eine Wasserbrücke nur locker an die β -Phosphatgruppe, und His43 zeigt nur eine schwach ausgeprägte Wechselwirkung zum α -Phosphat (3,6 Å). Die selektive Stabilisierung der Pyrophosphateinheit durch die Histidine wird erst durch eine Lageveränderung des Triphosphats am α -Phosphor beim Übergang vom tetraedrischen Grundzustand in die trigonal-bipyramidale Konformation des angeregten Zustands möglich. Die Flexibilität des *KMSKS-loops* begünstigt dabei eine derartige Umlagerung der Triphosphateinheit des ATP. Diese Region zeigt im Apozustand des Enzyms eine weit geöffnete Konformation und nähert sich erst bei Nukleotidbindung dem aktiven Zentrum und damit dem ATP. Erst in dieser geschlossenen Konformation werden Wechselwirkungen des bei allen Klasse I Aminoacyl-tRNA-Synthetasen hoch konservierten Lys270 mit dem Pyrophosphat möglich. So tragen die Reste beider *footprint*-Motive *HIGH* und *KMSKS* zur korrekten Ausrichtung der Substrate zueinander und zur Fixierung des ATP in einer produktiven Konformation bei und ermöglichen im Übergangszustand die Stabilisierung und schließlich die Abstraktion des Pyrophosphats. Bei den anderen Nukleotidyltransferasen GCT, PPAT und NMNAT sind dem Lys270 analoge konservierte Reste zur Triphosphatbindung zu Threonin oder Serin ersetzt. Das entsprechende strukturelle Gegenstück, das *ISGTXXR*-Motiv der ATP-Sulfurylase, hingegen ist vom aktiven Zentrum zu weit entfernt (Abbildung 31) und besitzt keine äquivalenten Reste, um bei einer ähnlichen Position des α -Phosphats Wechselwirkungen mit der Pyrophosphateinheit des ATP auszubilden. Zusätzlich wäre deren Stabilisierung in einer angewinkelten Konformation nur durch Asn198 des *RNP*-Motivs gesichert. Zwar verfügt die Domäne III durch den *displacement*-Mechanismus auch über eine gewisse Beweglichkeit, jedoch ist diese in den analysierten Kristallstrukturen zu wenig ausgeprägt, als daß dadurch Wechselwirkungen zu dem gebundenen ATP realistisch sind. Die durch das *Molecular Modelling* vorgeschlagene, gestreckte Konformation des Triphosphats in der Bindetasche berücksichtigt nur lokale Kraftfelder und Wechselwirkungen mit den Aminosäuren und behindert ferner auch eine mögliche Koordination eines Metallions wie Magnesium durch die β - und γ -Phosphatgruppen. Sie bietet aber wegen der großen Distanz zwischen den beiden Histidinen His201 und His204 einerseits und deren Entfernung zum α -Phosphor andererseits

die beste Koordinationssphäre. Würde His201 nicht an das γ -Phosphat binden, wäre es in der analysierten Konformation funktionslos und würde nicht zum Reaktionsmechanismus beitragen. Dies steht aber im krassem Gegensatz zu biochemischen Untersuchungen (Venkatachalam *et al.*, 1999). Es bestehen aber auch hier weitere Bewegungsspielräume für alternative Konformationen der Seitenkette des His201 in Richtung His204, die aber weder im nativen noch im produktgebundenen Zustand beobachtet werden konnten.

Trotz der unterschiedlichen Bindungsmodi der Nukleotide in den verschiedenen Enzymen und den divergenten Funktionen der *HXXH*-Motive besitzen die hier aufgeführten Nukleotidyltransferasen als weiteres gemeinsames strukturelles als auch funktionelles Charakteristikum ein hoch konserviertes Arginin (siehe Kap. 4.9.4.). Dies wird zwar von unterschiedlichen *loop*-Bereichen beigesteuert, bindet aber von derselben Position aus an das Nukleotid (Abbildung 32). Wie bei GCT ist dieses invariante Arginin auch bei PPAT und GlnRS ein Bestandteil des jeweiligen *footprint-loops*, wohingegen das strukturelle Pendant in der ATP-Sulfurylase nicht von Arg329, sondern von Arg290 des *GRD-loops* beigesteuert wird. In allen Enzymen jedoch bindet es an N1 der Nukleotidyleinheit und kann dazu auch weitere Wasserstoff- oder Salzbrücken zur β -Phosphatgruppe des NTP bilden, so daß es zusätzlich bei der Stabilisierung des Übergangszustandes mitwirkt. Auf diese Weise illustriert diese Superfamilie das Ausmaß, in dem sich Proteine auseinander entwickeln können und dabei nicht nur die Struktur, sondern auch ihre grundsätzliche Funktion beibehalten.

5.3. Vergleich mit ATP-Sulfurylase aus *P. chrysogenum*

5.3.1. Gesamtstruktur

Während die in dieser Arbeit beschriebene Kristallstruktur der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* die erste analysierte Struktur einer ATP-Sulfurylase überhaupt ist, stehen zwischenzeitlich Röntgenstrukturdaten eines nahe verwandten Homologs, der ATP-Sulfurylase aus *P. chrysogenum* zur Verfügung (MacRae *et al.*, 2001). Beide Enzyme bilden Homohexamere identischer Architektur und Symmetrie, wobei das Partikel aus *P. chrysogenum* wegen eines etwas größeren Protomers (572 Aminosäuren, 63,9 kDa) ein Molekulargewicht von annähernd 400 kDa aufweist. Eine Überlagerung beider Monomerstrukturen (Abbildung 33) zeigt deutlich die Gemeinsamkeiten, aber auch drastische Unterschiede im atomaren Aufbau beider Enzyme. Mit 280 identischen Resten und einer Sequenzhomologie von 60,2 % zeigen beide

Enzyme eine sehr geringe RMS-Abweichung von nur 0,92 Å für insgesamt 465 übereinstimmende Reste. Dies kommt einer strukturellen Übereinstimmung von 91,2 % gleich. Neben der typischen U-förmigen Silhouette verfügen beide Protomere über eine identische Anordnung der Domänen I bis IV. Wie schon durch die ähnlichen Sequenzen erwartet, sind die größten strukturellen Übereinstimmungen beider Enzyme bei den Domänen I bis III zu beobachten (Abbildung 33). In diesem Rumpfbereich des Protomers zeigen die Aminosäuren bei einem annähernd gleichen Sequenzverlauf eine nahezu identische Lage ihrer Hauptkettenatome.

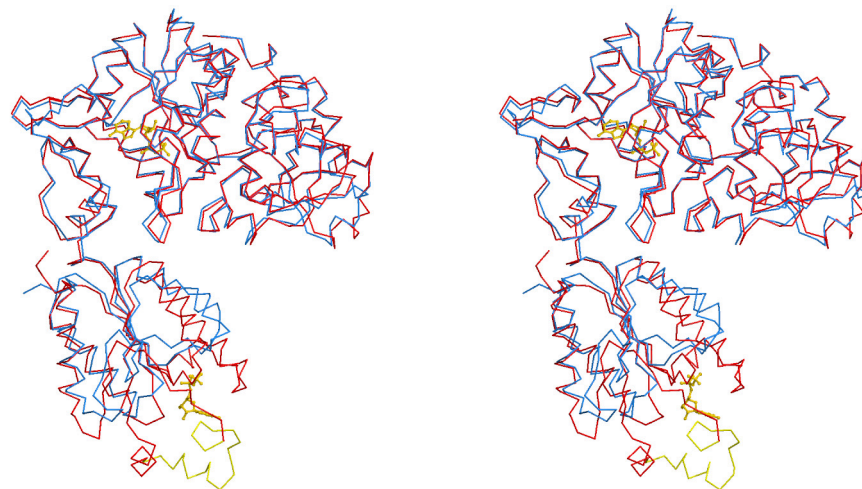


Abbildung 33: Stereoabbildung der Überlagerung der beiden Protomere der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* (blau) und *P. chrysogenum* (rotorange) in C α -Darstellung mit gebundenem APS im aktiven Zentrum und in der allosterischen Domäne von *P. chrysogenum* (gelb). Während die Sulfurylase-Domänen strukturell sehr ähnlich sind, weichen die Kinase-ähnlichen C-terminalen Domänen deutlich voneinander ab.

Geringfügige Unterschiede gibt es in diesem Rumpfsegment nur in Domäne I bei den Helices H2 und H5 und im Bereich der Haarnadelschleife bei S3 und S4. Die Kernbereiche jedoch, das β -barrel der Domäne I und das parallele β -Faltblatt der Domäne II kommen exakt aufeinander zu liegen. Auch die beiden flexiblen Domänen III überlagern einwandfrei, wobei es sich bei beiden Strukturen um die binären Produktkomplexe mit gebundenem APS handelt.

Die größten strukturellen Unterschiede sind in den C-terminalen Domänen IV beider Enzyme auszumachen, die schon in der Primärsequenz sehr wenig Homologien zeigen (siehe Abbildung 1). Wie in Kapitel 4.8.2.4. beschrieben, ist die C-terminale Domäne der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* trotz gleichen Faltungstyps und gleicher Topologie nur ein degeneriertes Rudiment einer aktiven Nukleotidkinase, da ihr zu deren Aktivität wichtige strukturelle Elemente fehlen. Die lange Insertion zwischen den β -Strängen S19 und S20 birgt in der ATP-Sulfurylase aus *P. chrysogenum* einen langen *loop*-Bereich mit zwei α -Helices, der zusammen mit einer weiteren Helix zwischen S16 und S17 die Bindetasche zur Bindung von APS oder des APS-Kinaseprodukts PAPS formt (Abbildung 34).

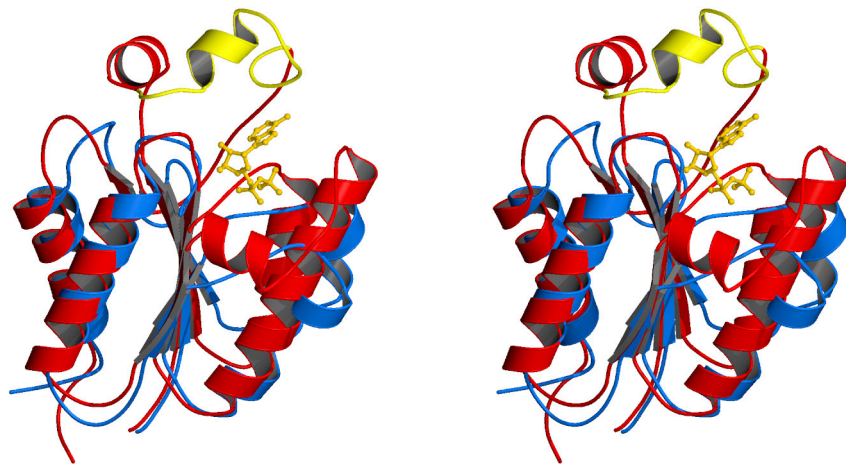


Abbildung 34: Überlagerung der beiden C-terminalen Domänen der ATP-Sulfurylasen aus *S. cerevisiae* (blau) und *P. chrysogenum* (rot/orange) in *ribbon*-Darstellung mit gebundenem APS (um 90° gedreht). Die Domäne aus *P. chrysogenum* enthält zusätzliche Sekundärstrukturelemente zur APS- und PAPS-Bindung. Gelb eingezeichnet ist der flexible Bereich, der die allosterische Feedback-Hemmung induziert (MacRae *et al.*, 2001).

Die Domäne IV aus *P. chrysogenum* zeigt in der Sequenz als auch strukturell eine hohe Übereinstimmung mit der funktionellen APS-Kinase aus *P. chrysogenum* (RMS-Abweichung 1,69 Å für 140 äquivalente C α -Atome; MacRae *et al.*, 2000b; MacRae *et al.*, 2001), so daß zumindest von einer Parallelentwicklung beider Enzyme auszugehen ist. Viel wahrscheinlicher ist jedoch, daß die nichtfunktionelle Kinase-Domäne der ATP-Sulfurylase durch Genduplikation der APS-Kinase, Rekombination und anschließender unabhängiger Entwicklung entstand und in evolutionären Vorläuferformen APS-Kinase-Aktivität besaß, ähnlich dem bifunktionellen Homologen aus *Aquifex aeolicus*. In diesem Enzym ist die APS-Kinase-Domäne ebenfalls C-

terminal zur ATP-Sulfurylase-Domäne angeordnet. Diese Entwicklung wird auch durch die sehr große Sequenzhomologie der Domäne IV der ATP-Sulfurylase aus *P. chrysogenum* zu den APS-Kinase-Domänen der bifunktionellen PAPS-Synthetasen aus höheren Eukaryonten wie Maus oder Mensch bestätigt. Auch wenn durch mutierte Reste in der Bindetasche der Domäne IV die Fähigkeit zur ATP-Bindung und damit die APS-Kinase-Aktivität verloren gegangen ist, ist durch die Möglichkeit, APS oder PAPS zu binden und dabei eine Konformationsänderung in diesem Bereich zu unterlaufen, ein allosterischer Feedback-Mechanismus zur Regulation der Enzymaktivität sehr wahrscheinlich (MacRae *et al.*, 2001). Da PAPS auf die Zellen toxisch wirkt, muß dessen latente Konzentration in der Zelle regulierbar sein. Wird durch ATP-Sulfurylase und APS-Kinase zuviel PAPS produziert, das nicht sofort weiter metabolisiert werden kann, bindet es an die allosterische Domäne und inhibiert die Aktivität der ATP-Sulfurylase, so daß der APS-Spiegel im Cytosol wieder sinkt. Diese allosterische Hemmung ist somit auch eine Erklärung für die Bildung eines hexameren Partikels mit der gezeigten Architektur, denn die Kommunikation und Beeinflussung der Protomere untereinander verläuft mit größter Wahrscheinlichkeit über die Protomere eines allosterischen Dimers (Abbildung 36), wohingegen Wechselwirkungen benachbarter Protomere eines Trimerenrings weniger in Betracht kommen. Die Sequenzeinschübe sind in der Hefestruktur nicht vorhanden, so daß ihr die Möglichkeit zur Nukleotidbindung (ATP, APS oder PAPS) und damit zur allosterischen (Selbst-)Regulation gänzlich fehlt. Die Struktur der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* gibt neben einer grundlegend strukturellen Funktion von Domäne IV zum Aufbau des Hexamers nur den Hinweis auf eine dynamische oder möglicherweise auch allosterische Interaktion der Protomere durch den *displacement*-Mechanismus.

5.3.2. Nukleotidbindung und aktives Zentrum

Eine Überlagerung der beiden katalytischen Zentren veranschaulicht die hohe strukturelle und funktionelle Homologie beider Enzyme (Abbildung 35). Wie schon durch die annähernd identische Primärsequenz im Bereich der *footprint*-Motive deutlich wird, lassen sich diese Reste annähernd deckungsgleich überlagern (RMS-Abweichung 0,38 Å für alle Atome), so daß auch die beiden Produktmoleküle in identischer Lage und Orientierung zu liegen kommen. Auch wenn das *PFR*-Motiv in der *P. chrysogenum* Sequenz zu *EFQ* mutiert ist, liegen die Hauptkettenatome in dieser Region doch weitgehend übereinander. Das in *EFQ* erhaltene und dem Phe328 analoge Phenylalanin aus *P. chrysogenum* steht zudem in der nach hinten

„geflippten“ Position. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß bei dem homologen Enzym der *displacement*-Mechanismus im Katalysezyklus ebenfalls eine zentrale Rolle spielt. Neben den konservierten *GRD*- und *RNP*-loops liegen auch die beiden *HXXH*-Histidine annähernd an derselben Position, so daß auch hinsichtlich der Lage der Substrate und damit des Reaktionsmechanismus' Übereinstimmung zu herrschen scheint. Allein das strukturell konservierte Arg290 des *GRD*-loops zeigt in der zweiten Struktur weg vom Nukleotid und bildet mit seiner Seitenkette nicht den in der Hefestruktur beobachteten Deckel über der Adenyleinheit. Dies ist insofern bemerkenswert, als daß diese Konformationsänderung nicht nur bei allen Produkt- und Inhibitor-komplexen der ATP-Sulfurylase, sondern auch bei anderen Nukleotidyltransferasen beobachtet wurde.

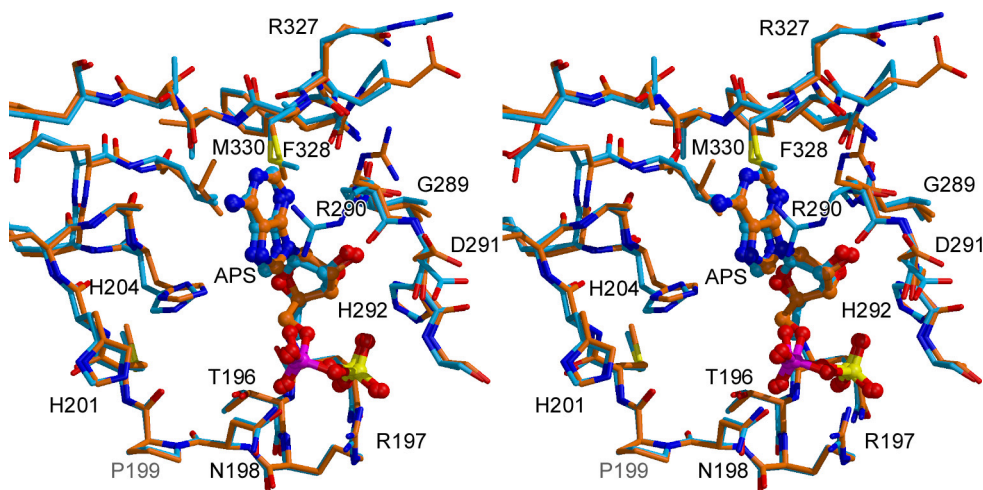


Abbildung 35: Stereoabbildung der aktiven Zentren beider Protomere aus *S. cerevisiae* (blau) und *P. chrysogenum* (rotorange) mit gebundenem APS in der geschlossenen Konformation mit „geflipptem“ Phe328. Neben der fast identischen Lage des Nukleotids fällt die ebenso übereinstimmende Architektur und Anordnung der konservierten *HRAH*-, *RNP*- und *GRD*-Motive auf.

5.3.3. Komplexarchitektur und Bifunktionalität

Wie oben schon erwähnt, ist die Funktion der im Protomer separat stehenden, inaktiven Domäne IV im Falle der Hefestruktur nicht eindeutig einzuordnen, da ihr kein aktiver Beitrag zum Katalysemechanismus oder zur Regulation der Enzymaktivität nachgewiesen werden kann. Auch die Rolle der Domäne I der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* bleibt neben der strukturellen Stabilisierung der katalytischen Domäne II weiterhin unklar. In der Struktur des

Homologen aus *P. chrysogenum* deuten zusätzliche Kontakte zwischen Domäne I und den flexiblen, Kinase-ähnlichen *loop*-Bereichen in Domäne IV im allosterischen Dimer (MacRae *et al.*, 2001) jedoch auf eine mögliche Weiterleitung von allosterischen Konformationsänderungen ins aktive Zentrum durch diese Domäne hin (Abbildung 36). Diese Wechselwirkungen erinnern stark an allosterische Mechanismen, wie sie im GTP-abhängigen Homologen der ATP-Sulfurylase aus *E. coli* oder bei der Aspartat-Transcarbamoylase auftreten (Jin *et al.*, 1999), in denen katalytische und regulatorische Aktivität allerdings auf unterschiedlichen Polypeptidketten liegen. Dieser Mechanismus kann aber erst eindeutig aufgeklärt werden, wenn weitere Strukturdaten dieses Enzyms in verschiedenen Konformationen erhältlich sind.

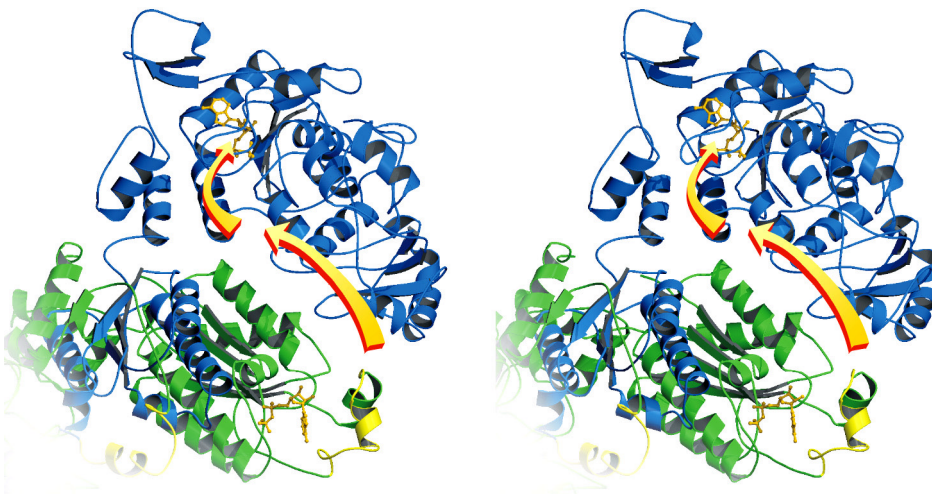


Abbildung 36: Stereoabbildung des allosterischen Dimers der ATP-Sulfurylase aus *P. chrysogenum*. Die Pfeile markieren den wahrscheinlichen Weg des allosterischen Impulses, der von dem in gelb gekennzeichneten allosterischen *loop*-Bereich über Domäne I an das katalytische Zentrum weitergeleitet wird.

Die Struktur der ATP-Sulfurylase aus *P. chrysogenum* gibt darüber hinaus einen zusätzlichen Hinweis über die Funktion der Furche zwischen Domäne II und IV des Protomers, deren Boden die allosterische Domäne des Protomers im anderen Ring bildet (Abbildung 36). Durch die der Furche zugewandte Lage des APS-Kinase-ähnlichen „katalytischen Zentrums“ wird ersichtlich, daß dieser Spalt in bifunktionellen Vorläufern als intramolekularer Kanal zur Weiterleitung des Substrats APS in das zweite Reaktionszentrum gedient haben könnte. Andererseits ist auch möglich, daß sowohl der *292-306-loop* als auch diese Spalte eine Funktion in

der Substratkanalisierung zur APS-Kinase oder in der Gegenrichtung von den membrangebundenen Sulfatpermeasen zur ATP-Sulfurylase haben.

Der Grund für die Umordnung der Kinase-Domäne vom C- an den N-Terminus der Polypeptidkette bei den bifunktionellen PAPS-Synthetasen höherer Eukaryonten ist wohl in einer höheren Effizienz der Katalyse und deren Regulation sowie des Substrattransports zwischen den aktiven Zentren zu suchen. Da zwischen dem Rumpfbereich (Domänen I, II und III) der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* und der ATP-Sulfurylase-Domäne der humanen PAPS-Synthetase I einerseits und der allosterischen Domäne des Homologen aus *P. chrysogenum* und der APS-Kinase-Domäne der PAPS-Synthetase andererseits sehr große Sequenzhomologien bestehen, sind starke strukturelle Kongruenzen innerhalb dieser Kernbereiche sehr wahrscheinlich, auch wenn die Gesamtarchitektur und der Oligomerisierungsgrad der Enzyme abweichen. Da auch die charakteristischen *footprint*-Motive der ATP-Sulfurylase in der PAPS-Synthetase erhalten sind, sind bei einem vergleichbaren Substratbindungsmodus und Reaktionsmechanismus auch hier allosterische Regulationseffekte zu erwarten. Außerdem bildet in der PAPS-Synthetase die Domäne III den C-Terminus des Proteins, wobei das Phe328 streng konserviert ist, so daß auch hier mit einem Auftreten des *displacement*-Mechanismus⁷ und Flexibilität dieser Domäne zu rechnen ist. Zur Untersuchung dieses wichtigen und äußerst interessanten, bifunktionellen Enzyms ist die Kristallstruktur der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* freilich nur ein erster Schritt, doch legt sie bereits viele bedeutende strukturelle, aber auch vor allem funktionelle Anhaltspunkte offen.

5.4. Produkt- und Inhibitor Komplexe verdeutlichen den Katalysezyklus

Der Komplex von ATP-Sulfurylase mit Thiosulfat illustriert sehr deutlich, daß dessen Substratbindetasche zwar speziell auf die Koordinierung von Sulfat eingerichtet ist, jedoch auch ähnliche Kleinmoleküle, die entweder unreaktiv sind, mit ATP instabile Verbindungen eingehen (Selenolyse, Molybdolyse) oder sogar wie Thiosulfat die Bindung von ATP verhindern und deshalb als Inhibitor wirken, Zugang zum aktiven Zentrum haben. Die Inhibition erfolgt in diesen Fällen kompetitiv, da das Enzym nicht zwischen den artverwandten Molekülen unterscheiden kann. Der ternäre Produktkomplex mit Chlorat hingegen zeigt, daß nicht alle Oxyanionen im direkten Wettstreit mit Sulfat um einen Platz in der *active site* stehen. Die Position des Chlorats zwischen den Domänen II und III scheint auf den ersten Blick sehr unge-

wöhnlich, doch sind die Wechselwirkungen mit dem Enzym durchaus definiert und zudem mit nur einem einzigen Histidin (His201) im gesamten Molekül zu beobachten. Zudem stabilisieren sich Enzym, Inhibitor und das Produktmolekül Pyrophosphat gegenseitig durch ein Netzwerk von Wasserstoff- und Salzbrücken, so daß durch die Bindung des Chlorats das Pyrophosphat in der Bindetasche festgehalten wird. Es ist zwar denkbar, daß die oben analysierte Funktion des Chlorats nur durch die durch die Kristallpackung verursachte Immobilität des Enzyms erzwungen wird. Dennoch ist dies wegen des Auftretens eines definierten ternären Produktkomplexes mit gebundenem Pyrophosphat wenig wahrscheinlich. Leider waren in dem verwendeten Erntepuffer weitere Sulfat-analoge Inhibitoren wie Vanadat oder Nitrat nicht löslich, so daß äquivalente Komplexe nicht erzeugt werden konnten. Die wichtige Rolle des *displacement-Mechanismus* für die Substratbindung und den Reaktionsmechanismus wurde durch die binären und ternären Produktkomplexe schon angedeutet und konnte mit dem Komplex aus ATP-Sulfurylase und ADP verifiziert werden. Die beobachtete Umordnung von einzelnen Resten im Bereich des aktiven Zentrums und die damit induzierte Umlagerung und Verschiebung ganzer Proteindomänen wurde in der beobachteten Form bisher bei keiner anderen Nukleotidyltransferase gefunden, obwohl auch hier, wie z.B. bei GlnRS, erhebliche Domänenbewegungen auftreten und zu verstärkten, spezifischen Wechselwirkungen mit dem Nukleotid oder anderen Substraten führen. Der bei *P. chrysogenum* gefundene, binäre Produktkomplex mit der geschlossenen Konformation des aktiven Zentrums deutet allerdings auch hier auf das Auftreten dieses charakteristischen Mechanismus hin. Auch wenn die in dieser Arbeit untersuchte ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* sehr viele Gemeinsamkeiten mit den verwandten Nukleotidyltransferasen und α/β -Pyrophosphatasen zeigt, weist sie doch sehr viele eigenständige Merkmale wie den *displacement-Mechanismus* und die charakteristischen *footprint-Motive* auf und wird noch lange Zeit Gegenstand intensiver struktureller als auch mechanistischer und funktioneller Untersuchungen bleiben.

5.5. Ausblick

Die Kristallstruktur der ATP-Sulfurylase aus *P. chrysogenum* liefert zu der in dieser Arbeit untersuchten Struktur der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* noch zusätzliche Einblicke in die Regulation der katalytischen Aktivität dieser Enzymklasse, so daß in nächster Zukunft sicherlich ein wichtiger Schwerpunkt die Untersuchung der (allosterischen) Regulation der ATP-Sulfurylase-Aktivität sein wird. Auch wenn das Hefeenzym die entsprechenden allosterischen Eigenschaften nicht besitzt, eignet es sich dennoch gut für eingehendere Studien nicht nur des Reaktionsmechanismus', sondern auch des gesamten Katalysezyklus'. So könnte z.B. über eine neue Kristallbedingung ohne das Additiv Cadmiumsulfat eine Möglichkeit geschaffen werden, den Substratkomplex mit ATP-Analoga wie z.B. AMP-CPP und darüber hinaus einen Komplex mit einem speziellen Inhibitor darzustellen, der den pentavalenten Übergangszustand simuliert (vgl. MgADP-AlF₃ für ATPasen). Mit diesen beiden Komplexen wäre eine exakte Analyse der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen und Aussagen über den Mechanismus, über die Pyrophosphat-Hydrolyse und die Entfernung des APS und das Pyrophosphats aus dem Reaktionszentrum möglich. Es ist allerdings nicht sehr vielversprechend, hierzu Mutanten des Enzyms strukturell zu untersuchen, in denen konservierte Reste im aktiven Zentrum gegen Alanin ausgetauscht worden sind. Die bereits analysierte, reduzierte oder fehlende Aktivität dieser Mutanten läßt *a priori* auf eine ebenso geringe Fähigkeit des Enzyms zur Bindung von ATP schließen.

Des weiteren kann das Strukturmodell der ATP-Sulfurylase aufgrund der großen funktionellen als auch strukturellen Homologie zu den verwandten, aber viel komplexeren, bifunktionellen PAPS-Synthetasen aus Säugern wie Mensch oder Maus als Grundlage für die Strukturlösung dieser Enzyme dienen. Da z.B. das humane Enzym mehrere Isoformen besitzt, die vor allem beim Menschen für eine Reihe von Erbkrankheiten verantwortlich sind, bringt deren strukturelle Erforschung mehr Kenntnis über deren Ursachen und kann mittelfristig für Therapien eingesetzt werden. Humane PAPS-Synthetase I wurde bereits zur Kristallisation gebracht und erste native Daten stehen zur Verfügung. Doch haben die bisher durchgeführten Pattersonsuchen mit Fragmenten aus ATP-Sulfurylase oder APS-Kinase bisher zu keinem Ergebnis geführt, so daß eine Strukturlösung nur mit Hilfe von experimentellen Phasen möglich sein wird.

6. Literaturverzeichnis

- Baeuerle, P.A. and Huttner, W.B. (1986). Chlorate - a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **141**, 870-877.
- Barton, G.J. (1993). An efficient algorithm to locate all locally optimal alignments between two sequences allowing for gaps. *Comput. Appl. Biosci.*, **9**, 729-734.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J. and Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 729-777.
- Bidwell, L.M., McManus, M.E., Gaedigk, A., Kakuta, Y., Negishi, M., Pedersen, L. and Martin, J.L. (1999). Crystal structure of human catecholamine sulfotransferase. *J. Mol. Biol.*, **293**, 521-630.
- Blundell, T.L. and Johnson, L.N., (1976). Protein Crystallography. Academic Press, London.
- Borgenstrom, M., Tienhaara, A., Spillmann, D., Salmivirta, M. and Jalkanen, M. (2001). Testosterone-induced growth of S115 mouse mammary tumor cells is dependent on heparan sulfate. *Exp. Cell. Res.*, **264**, 307-314.
- Bork, P. and Koonin, E.V. (1994). A P-loop-like motif in a widespread ATP pyrophosphatase domain: implications for the evolution of sequence motifs and enzyme activity. *Proteins*, **20**, 347-355.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L. and Sigler, P.B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature*, **371**, 578-586.
- Brünger, A.T. (1991). Crystallographic phasing and refinement of macromolecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1**, 1016-1022.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.*, **54**, 905-921.
- Carter, C.W. and Carter, C.W. (1979). Protein Crystallography using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.*, **254**, 12219-12223.
- Cherest, H., Kerjan, P. and Surdin-Kerjan, Y. (1987). The *Saccharomyces cerevisiae* MET3 gene: nucleotide sequence and relationship of the 5' non-coding region to that of MET25. *Mol. Gen. Genet.*, **210**, 307-313.
- Choi, Y.H., Lee, J.K. and Cho, S.H. (2001). Structure and expression of a CTP: phosphocholine cytidylyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cells.*, **11**, 95-9.

- Collaborative Computational Project No. 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta. Cryst.*, **D50**, 760-763.
- Coughtrie, M.W., Sharp, S., Maxwell, K. and Innes, N.P. (1998). Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chem. Biol. Interact.*, **109**, 3-27.
- Crane, B.R., Siegel, L.M. and Getzoff, E.D. (1995). Sulfite reductase structure at 1.6 Å: evolution and catalysis for reduction of inorganic anions. *Science*, **270**, 59-67.
- Cusack, S. (1997). Aminoacyl-tRNA synthetases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 881-889.
- D'Angelo, I., Raffaelli, N., Dabusti, V., Lorenzi, T., Magni, G. and Rizzi, M. (2000). Structure of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase: a key enzyme in NAD(+) biosynthesis. *Structure. Fold. Des.*, **8**, 993-1004.
- de Haan, M., Smits, P.H.M., Grivell, L.A. (1995). Direkte Hintelegung der Proteinsequenz der ATP-Sulfurylase aus *S. cerevisiae* in den EMBL- und Genebank Datenbanken.
- de la Fortelle, E. und Brigcogne, G. (1997). Maximum -likelihood heavy-atom parameter refinement in the MIR and MAD methods. *Methods Enzymol.*, **276**, 476-494.
- Delarue, M. and Moras, D. (1993). The aminoacyl-tRNA synthetase family: modules at work. *Bioessays*, **15**, 675-687.
- Deyrup, A.T., Singh, B., Krishnan, S., Lyle, S. and Schwartz, N.B. (1999). Chemical modification and site-directed mutagenesis of conserved HXXH and PP-loop motif arginines and histidines in the murine bifunctional ATP sulfurylase/adenosine 5'-phosphosulfate kinase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 28929-28936.
- Drenth, J. (1992). Principles of X-ray Crystallography. Springer-Verlag, New York, USA.
- Engh, R. and Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.*, **A47**, 392-400.
- Esnouf, R.M. (1997). An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graph.*, **15**, 132-134.
- Ewald, P.P. (1921). Das "reziproke Gitter" in der Strukturtheorie. *Z. Kristallogr.*, **65**, 129-156.
- Farley, J.R., Christie, E.A., Seubert, P.A. and Segel, I.H. (1979). Adenosine triphosphate sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*. Evidence for essential arginine, histidine, and tyrosine residues. *J. Biol. Chem.*, **254**, 3537-3542.
- Farley, J.R., Cryns, D.F., Yang, Y.H. and Segel, I.H. (1976). Adenosine triphosphate sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*. Steady state kinetics of the forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem.*, **251**, 4389-4397.
- Farley, J.R., Nakayama, G., Cryns, D. and Segel, I.H. (1978). Adenosine triphosphate sulfurylase from *Penicillium chrysogenum* equilibrium binding, substrate hydrolysis, and isotope exchange studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, **185**, 376-390.

- Foster, B.A., Thomas, S.M., Mahr, J.A., Renosto, F., Patel, H.C. and Segel, I.H. (1994). Cloning and sequencing of ATP sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*. Identification of a likely allosteric domain. *J. Biol. Chem.*, **269**, 19777-19786.
- Garcia, G.A., Leatherbarrow, R.J., Eckstein, F. and Fersht, A.R. (1990). Metal ion dependence of phosphorothioate ATP analogues in the *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase reaction. *Biochemistry*, **29**, 1643-1648.
- Gavel, O.Y., Bursakov, S.A., Calvete, J.J., George, G.N., Moura, J.J. and Moura, I. (1998). ATP sulfurylases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*. A novel metalloprotein containing cobalt and zinc. *Biochemistry*, **37**, 16225-16232.
- Giacovazzo C., Monaco, H.L., Viterbo, D. Scordari, F., Gilli, G., Zanotti, G. und Catti, M. (1992). Fundamentals of Crystallography. Oxford University Press, Oxford, UK.
- GCG: Genetics Computer Group (1994). "Program manual for the Wisconsin Package, Version 8". 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA.
- Glatt, H. (2000). Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.*, **129**, 141-170.
- Glatt, H., Engelke, C.E., Pabel, U., Teubner, W., Jones, A.L., Coughtrie, M.W., Andrae, U., Falany, C.N. and Meinel, W. (2000). Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicol. Lett.*, **112-113**, 341-348.
- Glusker, J.P., Lewis, M. and Rossi, U. (1994). Crystal structure analysis for chemists and biologists. VCH Verlagsgesellschaft mbh, Weinheim, Germany.
- Green, D.W., Ingram, V.M., und Perutz, M.F. (1954). The structure of the hemoglobin IV. Sign determination by isomorphous replacement method. *Proc. Roy. Soc. Sect. A*, **225**, 287-307.
- Greve, H., Cully, Z., Blumberg, P. and Kresse, H. (1988). Influence of chlorate on proteoglycan biosynthesis by cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **263**, 12886-12892.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, **386**, 463-471.
- 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.
- Hesse, H., Kreft, O., Maimann, S., Zeh, M., Willmitzer, L. and Hofgen, R. (2001). Approaches towards understanding methionine biosynthesis in higher plants. *Amino Acids*, **20**, 281-289.
- Hofgen, R., Kreft, O., Willmitzer, L. and Hesse, H. (2001). Manipulation of thiol contents in plants. *Amino. Acids.*, **20**, 291-299.

- Honzatko, R.B., Crawford, J.L., Monaco, H.L., Ladner, J.E., Edwards, B.F., Evans, D.R., Warren, S.G., Wiley, D.C., Ladner, R.C. and Lipscomb, W.N. (1982). Crystal and molecular structures of native and CTP-liganded aspartate carbamoyltransferase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **160**, 219-263.
- Izard, T. and Geerlof, A. (1999). The crystal structure of a novel bacterial adenylyltransferase reveals half of sites reactivity. *EMBO J.*, **18**, 2021-2030.
- Jancaric, J and Kim, S.-H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409-411.
- Jin, L., Stec, B., Lipscomb, W.N. and Kantrowitz, E.R. (1999). Insights into the mechanisms of catalysis and heterotropic regulation of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase based upon a structure of the enzyme complexed with the bisubstrate analogue N-phosphonacetyl-L-aspartate at 2.1 Å. *Proteins*, **37**, 729-742.
- Kakuta, Y., Pedersen, L.G., Carter, C.W., Negeshi, M., Pedersen, L.C. (1997). Crystal structure of estrogen sulphotransferase. *Nat. Struct. Biol.*, **11**, 904-908.
- Kakuta, Y., Sueyoshi, T., Negishi, M. and Pedersen, L.C. (1999). Crystal structure of the sulfotransferase domain of human heparan sulfate N-deacetylase/ N-sulfotransferase 1. *J Biol. Chem.*, **274**, 10673-10666.
- Karamohamed, S., Nilsson, J., Nourizad, K., Ronaghi, M., Pettersson, B. and Nyren, P. (1999). Production, purification, and luminometric analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* MET3 adenosine triphosphate sulfurylase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, **15**, 381-388.
- Kraulis, P.J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.*, **24**, 946-950.
- Kurima, K., Warman, M.L., Krishnan, S., Domowicz, M., Krueger, R.C., Deyrup, A. and Schwartz, N.B. (1998). A member of a family of sulfate-activating enzymes causes murine brachymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 8681-8685.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laskowski, R., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291.
- Leatherbarrow, R.J., Fersht, A.R. and Winter, G. (1985). Transition-state stabilization in the mechanism of tyrosyl-tRNA synthetase revealed by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **82**, 7840-7844.
- Leslie, A. (1991). Macromolecular Data Processing. In Moras, D., Podjarny, A.D. and Thierry, J.C. (eds.), *Crystal. Computing V*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 27-38.

- Leyh, T.S., Taylor, J.C. and Markham, G.D. (1988). The sulfate activation locus of *Escherichia coli* K12: cloning, genetic, and enzymatic characterization. *J. Biol. Chem.*, **263**, 2409-2416.
- Li, H., Deyrup, A., Mensch, J.R., Domowicz, M., Konstantinidis, A.K. and Schwartz, N.B. (1995). The isolation and characterization of cDNA encoding the mouse bifunctional ATP sulfurylase-adenosine 5'-phosphosulfate kinase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 29453-29459.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lu, G. (2000). TOP: a new method for protein structure comparisons and similarity searches. *J. Appl. Crystallogr.*, **33**, 176-183.
- MacRae, I. and Segel, I.H. (1997). ATP sulfurylase from filamentous fungi: which sulfonucleotide is the true allosteric effector? *Arch. Biochem. Biophys.*, **337**, 17-26.
- MacRae, I.J., Hanna, E., Ho, J.D., Fisher, A.J. and Segel, I.H. (2000a). Induction of positive cooperativity by amino acid replacements within the C-terminal domain of *Penicillium chrysogenum* ATP sulfurylase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 36303-36310.
- MacRae, I.J., Segel, I.H. and Fisher, A.J. (2000b). Crystal structure of adenosine 5'-phosphosulfate kinase from *Penicillium chrysogenum*. *Biochemistry*, **39**, 1613-1621.
- MacRae, I.J., Segel, I.H. and Fisher, A.J. (2001). Crystal Structure of ATP Sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*: Insights into the Allosteric Regulation of Sulfate Assimilation. *Biochemistry*, **40**, 6795-804.
- Marzluf, G.A. (1997). Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annu. Rev. Microbiol.*, **51**, 73-96.
- Matthews, B.W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.*, **33**, 491-497.
- Mc Pherson, A. (1982). Preparation and analysis of protein crystals. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Merritt, E.A. and Murphy, M.E.P. (1994). Raster3D Version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics. *Acta. Cryst.*, **D50**, 869-873.
- Park, Y.S., Gee, P., Sanker, S., Schurter, E.J., Zuiderweg, E.R. and Kent, C. (1997). Identification of functional conserved residues of CTP:glycerol-3-phosphate cytidyltransferase. Role of histidines in the conserved HXGH in catalysis. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15161-15166.
- Perona, J.J., Rould, M.A. and Steitz, T.A. (1993). Structural basis for transfer RNA aminoacylation by *Escherichia coli* glutaminyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, **32**, 8758-8771.

- Renosto, F., Martin, R.L., Borrell, J.L., Nelson, D.C. and Segel, I.H. (1991). ATP sulfurylase from trophosome tissue of *Riftia pachyptila* (hydrothermal vent tube worm). *Arch. Biochem. Biophys.*, **290**, 66-78.
- Renosto, F., Martin, R.L. and Segel, I.H. (1987). ATP sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*. Molecular basis of the sigmoidal velocity curves induced by sulfhydryl group modification. *J. Biol. Chem.*, **262**, 16279-88.
- Renosto, F., Martin, R.L. and Segel, I.H. (1989). Sulfate-activating enzymes of *Penicillium chrysogenum*. The ATP sulfurylase-adenosine-5'-phosphosulfate complex does not serve as a substrate for adenosine 5'-phosphosulfate kinase. *J. Biol. Chem.*, **264**, 9433-9437.
- Renosto, F., Patel, H.C., Martin, R.L., Thomassian, C., Zimmerman, G. and Segel, I.H. (1993). ATP sulfurylase from higher plants: kinetic and structural characterization of the chloroplast and cytosol enzymes from spinach leaf. *Arch. Biochem. Biophys.*, **307**, 272-285.
- Renosto, F., Seubert, P.A., Knudson, P. and Segel, I.H. (1985). Adenosine 5'-phosphosulfate kinase from *Penicillium chrysogenum*. Determining ligand dissociation constants of binary and ternary complexes from the kinetics of enzyme inactivation. *J. Biol. Chem.*, **260**, 11903-11913.
- Reshetnikova, L., Moor, N., Lavrik, O. and Vassilyev, D.G. (1999). Crystal structures of phenylalanyl-tRNA synthetase complexed with phenylalanine and a phenylalanyl-adenylate analogue. *J. Mol. Biol.*, **287**, 555-568.
- Rizzi, M., Nessi, C., Mattevi, A., Coda, A., Bolognesi, M. and Galizzi, A. (1996). Crystal structure of NH₃-dependent NAD⁺ synthetase from *Bacillus subtilis*. *EMBO J.*, **15**, 5125-5134.
- Rodgers, D.W. (1997). Practical Crystallography. *Methods Enzymol.*, **276**, 183-203.
- Rosen, F., McCabe, G., Quach, J., Solan, J., Terkeltaub, R., Seegmiller, J.E. and Lotz, M. (1997). Differential effects of aging on human chondrocyte responses to transforming growth factor beta: increased pyrophosphate production and decreased cell proliferation. *Arthritis Rheum.*, **40**, 1275-1281.
- Rosenthal, E. and Leustek, T. (1995). A multifunctional *Urechis caupo* protein, PAPS synthetase, has both ATP sulfurylase and APS kinase activities. *Gene*, **165**, 243-248.
- Rossmann, M.G. and Argos, P. (1976). Exploring structural homology of proteins. *J. Mol. Biol.*, **105**, 75-95.
- Rossmann, M.G., Moras, D. and Olsen, K.W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, **250**, 194-199.
- Saraste, M., Sibbald, P.R. and Wittinghofer, A. (1990). The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 430-434.

- Saridakis, V., Christendat, D., Kimber, M.S., Dharamsi, A., Edwards, A.M. and Pai, E.F. (2001). Insights into ligand binding and catalysis of a central step in NAD⁺ synthesis: structures of *Methanobacterium thermoautotrophicum* NMN adenylyltransferase complexes. *J. Biol. Chem.*, **276**, 7225-7232.
- Savage, H., Montoya, G., Svensson, C., Schwenn, J.D. and Sinning, I. (1997). Crystal structure of phosphoadenylyl sulphate (PAPS) reductase: a new family of adenine nucleotide alpha hydrolases. *Structure*, **5**, 895-906.
- Schriever, C., Breithardt, G. and Schmidt, A. (1997). Undersulfation of proteoglycan sulfate stimulates the expression of basic fibroblast growth factor and protein synthesis but suppresses replication of coronary smooth muscle cells. *Biol. Chem.*, **378**, 701-706.
- Seubert, P.A., Grant, P.A., Christie, E.A., Farley, J.R. and Segel, I.H. (1979). Kinetic and chemical properties of ATP sulphurylase from *Penicillium chrysogenum*. *Ciba. Found. Symp.*, **94**, 19-47.
- Seubert, P.A., Hoang, L., Renosto, F. and Segel, I.H. (1983). ATP sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*: measurements of the true specific activity of an enzyme subject to potent product inhibition and a reassessment of the kinetic mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.*, **225**, 679-691.
- Sperinde, G.V. and Nugent, M.A. (1998). Heparan sulfate proteoglycans control intracellular processing of bFGF in vascular smooth muscle cells. *Biochemistry*, **37**, 13153-13164.
- Sperling, D., Kappler, U., Wynen, A., Dahl, C. and Truper, H.G. (1998). Dissimilatory ATP sulfurylase from the hyperthermophilic sulfate reducer *Archaeoglobus fulgidus* belongs to the group of homo-oligomeric ATP sulfurylases. *FEMS Microbiol. Lett.*, **162**, 257-264.
- Tesmer, J. J., Klem, T. J., Deras, M. L., Davisson, V. J. and Smith, J. L. (1996). The crystal structure of GMP synthetase reveals a novel catalytic triad and is a structural paradigm for two enzyme families. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 74-86.
- Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y. (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 503-532.
- Turk, D. (1992). Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen. PhD Thesis, Technische Universität, München.
- Ullrich, T. (1998). Studien zur Reaktivierung der inaktiven β -Untereinheit β 6/PRE7 des 20S Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Universität Stuttgart.
- Venkatachalam, K.V., Akita, H. and Strott, C.A. (1998). Molecular cloning, expression, and characterization of human bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase and its functional domains. *J. Biol. Chem.*, **273**, 19311-19320.
- Venkatachalam, K.V., Fuda, H., Koonin, E.V. and Strott, C.A. (1999). Site-selected mutagenesis of a conserved nucleotide binding HXGH-motif located in the ATP sul-

- furylase domain of human bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 2601-2604.
- von Delft, F., Lewendon, A., Dhanaraj, V., Blundell, T.L., Abell, C. and Smith, A.G. (2001). The Crystal Structure of *E. coli* Pantothenate Synthetase Confirms It as a Member of the Cytidylyltransferase Superfamily. *Structure Fold. Des.*, **9**, 439-450.
- Wallace, A.C., Laskowski, R.A. and Thornton, J.M. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.*, **8**, 127-134.
- Weber, C.H., Park, Y.S., Sanker, S., Kent, C. and Ludwig, M.L. (1999). A prototypical cytidylyltransferase: CTP:glycerol-3-phosphate cytidylyltransferase from *Bacillus subtilis*. *Structure Fold. Des.*, **7**, 1113-1124.
- Wei, J. and Leyh, T.S. (1998). Conformational change rate-limits GTP hydrolysis: the mechanism of the ATP sulfurylase-GTPase. *Biochemistry*, **37**, 17163-17169.
- Wei, J. and Leyh, T.S. (1999). Isomerization couples chemistry in the ATP sulfurylase-GTPase system. *Biochemistry*, **38**, 6311-6316.
- Wei, J., Liu, C. and Leyh, T.S. (2000). The role of enzyme isomerization in the native catalytic cycle of the ATP sulfurylase-GTPase system. *Biochemistry*, **39**, 4704-4710.
- Zhang, H.a.L., T.S. (1999). α -Thio-ATP: A stereochemistic probe of activated sulfate synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 8692-8697.

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gewichtsprozent
aa	<i>amino acid</i> (Aminosäure)
Å	Ångström (1 Å=10 ⁻¹⁰ m)
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-diphosphat
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
ddH ₂ O	H ₂ O bidest. (zweifach entionisiertes Wasser)
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
E.C.	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung
GCT	Glycerol-3'-phosphat-cytidyltransferase
GlnRS	Glutaminyl tRNA-Synthetase
h	Stunde
HASYLAB	Hamburger Synchrotron-Strahlungslabor
IEC	<i>ion exchange chromatography</i> (Ionenaustauschchromatographie)
Kap.	Kapitel
KDa	kilo-Dalton
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
m	Milli (10 ⁻³)
M	Mol
mM	Millimol
MAD	<i>Multiple Anomalous Diffraction</i>
MIR	<i>Multiple Isomorphous Replacement</i>
min	Minute
MR	<i>Molecular Replacement</i>
M _w	Molekulargewicht
NAD	Nicotinamiddinukleotid
ncs	nicht-kristallographische Symmetrie
NMNAT	Nicotinamidmononucleotid-Adenylyltransferase
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
p. A.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PEG	Polyethylenglykol
PI	Isoelektrischer Punkt
PPAT	Phosphopantethein-Adenylyltransferase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rms	<i>root-mean-square</i> (quadratisch)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIS	sichtbar