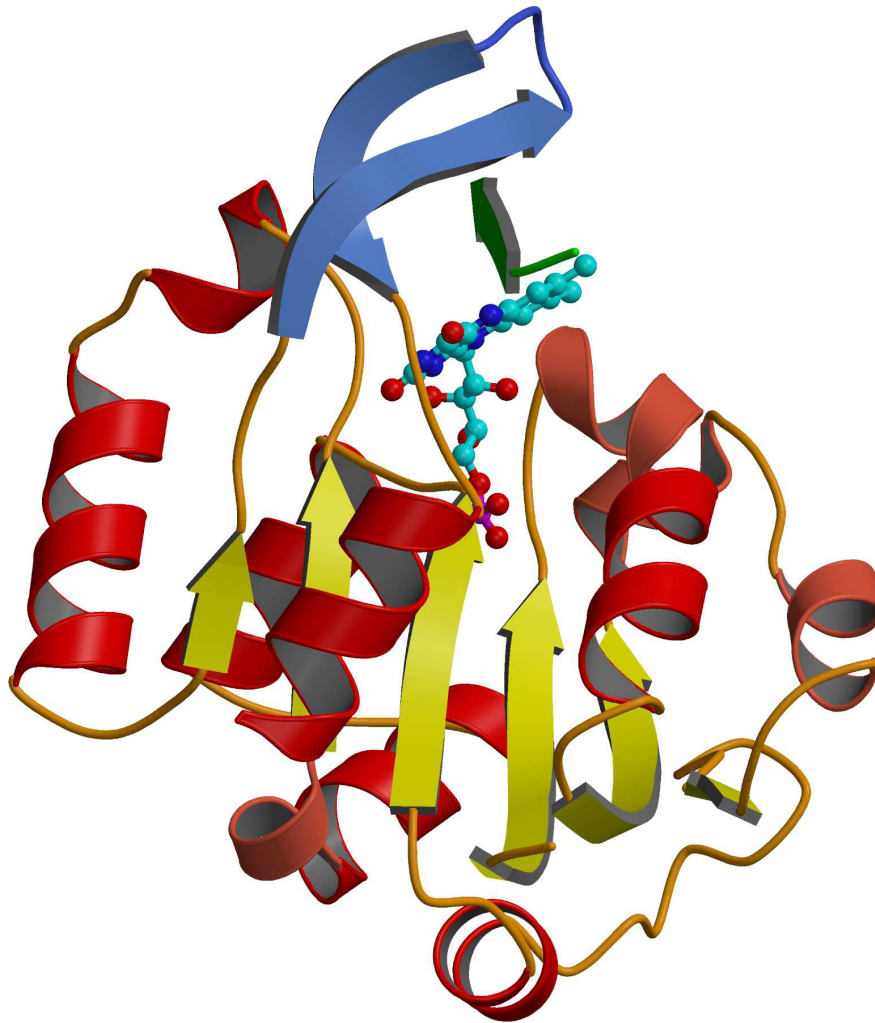


Kristallstrukturanalyse von homooligomeren, Flavin-enthaltenden Cystein-Decarboxylasen



Michael Blaesse
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Strukturforschung
D-82152 Martinsried

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Strukturforschung

Kristallstrukturanalyse von homooligomeren, Flavin-enthaltenden Cystein-Decarboxylasen

Michael Blaesse

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. Hubert Schmidbaur
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. Robert Huber
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher

Die Dissertation wurde am 06.02.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 21.02.2002 angenommen.

Meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 1998 bis Januar 2002 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Leitung von Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, die stete Diskussionsbereitschaft und seine großzügige Förderung dieser Arbeit danken. Vorallem die große Freiheit bei der Arbeit und seine wertvollen Anregungen haben zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Stefan Steinbacher danke ich für seine gute Betreuung, die Einführung in die Proteinkristallisation und die Methoden der Röntgenkristallographie sowie seine Hilfe bei der Lösung des Phasenproblems beim EpiD und MrsD. Ich habe vorallem am Anfang dieser Arbeit viel von ihm gelernt und viele hilfreiche Ratschläge erhalten.

Herrn PD Dr. Thomas Kupke möchte ich für die Überlassung der Expressionsclone und die hervorragenden biochemischen Arbeiten zur Charakterisierung der Proteine der Familie der homooligomeren, Flavin-enthaltenden Cystein-Decarboxylasen und den ständigen Informationsaustausch danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Hans-Georg Beisel für seine Einführungen in einige kristallographische Programme und die vielen fruchtvollen Diskussionen. Hier seien auch alle „X-People“ erwähnt, die für die Installation und Konfiguration der kristallographischen Software in der Abteilung zuständig sind und ohne deren Engagement die Durchführung kristallographischer Arbeiten nicht möglich wäre.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Saulius Grazulis für die Überlassung vieler äußerst hilfreicher Skripte, die viele Computerarbeiten deutlich vereinfacht und automatisiert haben, und die Einführung in die Perl-Programmierung, die es mir ermöglichte einige Skripte selbst zu schreiben. Außerdem trugen auch die Diskussionen mit ihm und Herrn Dr. Matthias Bochtler beim gemeinsamen Mittagessen viel zum Gelingen dieser Arbeit bei. Ich habe von ihnen auch sehr viel über die physikalischen Hintergründe der Proteinkristallographie, über Informatik und Programmierung gelernt.

Die Herren Martin Augustin, Michael Engel, Rainer Friedrich, Dr. Pablo Fuentes-Prior, Dr. Michael Groll, Norman Kairies, John Richardson, Dr. Tobias Ullrich und Rasso Willkomm sowie Frau Sozanne Solmaz sorgten als Kollegen im Büro, dem „Kinderzimmer“, für so manche heitere Stunden und eine angenehme Arbeitsatmosphäre. Herrn Rainer Friedrich möchte ich besonders für das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskriptes danken.

Den Laborkollegen Frau Dr. Heike Krupka, Frau Dr. Anja Dorowski, Frau Andrea Papendorf, Frau Hyunja Cha, Herrn Dr. Stefan Steinbacher und Herrn Dr. Stefan Gerhard möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre im Labor, ihren fachkundigen Rat und die vielen Anregungen danken.

Den Sekretärinnen Frau Renate Rüller, Frau Gina Beckmann und Frau Monika Bumann danke ich für ihre immerwährend freundliche Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten. Den Herren Werner Dersch, Herbert Fischer und Ottmar Paul danke ich für die Wartung und Reparatur der technischen Geräte in der Arbeitsgruppe und ihre Hilfe in praktischen und technischen Fragen. Ohne ihren Einsatz wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Hans Bartunik und Herrn Dr. Gleb Bourenkow für die gute Unterstützung bei einem Aufenthalt am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg.

Auch die Mitarbeiter des Institutsrechenzentrums, insbesondere Herrn Günther Franz, möchte ich hier noch erwähnen, die für die Bereitstellung und Wartung der Infrastruktur zur elektronischen Datenverarbeitung zuständig sind.

Ein besonders herzliches Dankeschön gilt meinen Eltern für ihre Liebe, den starken Rückhalt und für die finanzielle Unterstützung während des Studiums.

Ferner möchte ich noch Ines danken, für ihr Verständnis und die vielen wunderschönen Stunden, die ich in den letzten Jahren mit ihr verbringen durfte.

Teile dieser Arbeit wurden oder werden veröffentlicht in:

Michael Blaesse, Thomas Kupke, Robert Huber und Stefan Steinbacher (2000) Crystal structure of the peptidyl-cysteine decarboxylase EpiD complexed with a pentapeptide substrate. *EMBO J.*, **19**, 6299-6310.

Michael Blaesse, Thomas Kupke, Robert Huber und Stefan Steinbacher. Crystal structure of MrsD, a FAD containing member of the homooligomeric flavin containing cystein decarboxylases (HFCDs) *Manuskript in Vorbereitung.*

Weitere Publikationen an denen während der Promotion mitgearbeitet wurde:

Thomas Kupke, Michael Uebele, Dietmar Schmid, Günther Jung, Michael Blaesse und Stefan Steinbacher (2000) Molecular Characterization of Lantibiotic-synthesizing Enzyme EpiD Reveals a Function for Bacterial Dfp Proteins in Coenzyme Biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **275**, 31838-31846.

Tobias C. Ullrich, Michael Blaesse und Robert Huber (2001) Crystal structure of ATP sulfurylase from *Saccharomyces cerevisiae*, a key enzyme in sulfate activation. *EMBO J.* **20**, 316-329.

Kongressberichte:

Michael Blaesse, Thomas Kupke, Robert Huber, and Stefan Steinbacher (2000) Crystal structure of the peptidyl-cysteine decarboxylase EpiD, an enzyme of epidermin biosynthesis, with and without substrate. Posterpräsentation beim 2. Münchner Kongress für Biowissenschaften, Biolog 2000, 20. November 2000 in München.

Michael Blaesse, Thomas Kupke, Robert Huber, and Stefan Steinbacher (2001) Crystal Structure of the Peptidyl-Cysteine Decarboxylase EpiD. Vortrag bei der 9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kristallographie, March 12-15 März, 2001 in Bayreuth. Eine Zusammenfassung ist abgedruckt in: *Zeitschrift für Kristallographie*, **Suppl. 16**, 32.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1. Angeborene Immunantwort	2
2.2. Antimikrobielle Peptide und Peptidantibiotika	2
2.3. Lantibiotika	3
2.3.1. Epidermin	6
2.3.2. Mersacidin	8
2.4. Flavoproteine	9
2.5. Homooligomere flavin-enthaltende Cystein-Decarboxylasen	14
2.5.1. LanD-Proteine	15
2.5.1.1. EpiD	15
2.5.1.2. MrsD	17
2.5.2. Proteine der CoenzymA-Biosynthese	17
2.5.2.1. Dfp	18
2.5.2.2. AtHAL3	18
3. Materialien und Methoden	20
3.1. Materialien	20
3.1.1. Stämme	20
3.1.2. Chemikalien und Geräte	20
3.2. Arbeiten mit Bakterien	21
3.2.1. Flüssigkulturen	21
3.2.2. Lagerung	21
3.3. Arbeiten mit Proteinen	21
3.3.1. Charakterisierung von Proteinen	21
3.3.1.1. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	21
3.3.1.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
3.3.1.3. Färben von Proteingelen	23
3.3.1.4. Bestimmung der Proteinkonzentration	23
3.3.2. Reinigung von Proteinen	24
3.3.2.1. Reinigung von EpiD	24
3.3.2.2. Reinigung von MrsD	25
3.3.2.3. Reinigung von AtHAL3-H90N-His	25

3.4. Kristallographische Methoden	26
3.4.1. Erzeugung von Röntgenstrahlen	27
3.4.2. Kristallisation	28
3.4.3. Aufbau von Kristallen	31
3.4.4. Beugung von Röntgenstrahlen an Einkristallen	32
3.4.5. Datensammlung und Datenauswertung	35
3.4.5.1. Datensammlung	36
3.4.5.2. Datenauswertung	37
3.4.6. Lösung des Phasenproblems	38
3.4.6.1. Phasierung mittels isomorphem Ersatz	39
3.4.6.2. Multiple Anomale Dispersion	41
3.4.6.3. Phasierung mittels Molekularem Ersatz	43
3.4.7. Dichtemodifikation	45
3.4.7.1. „Solvent Flattening“	45
3.4.7.2. Mitteln der Elektronendichte	45
3.4.7.3. „Histogram Matching“	45
3.4.8. Phasenkombination	46
3.4.9. Modellbau	46
3.4.10. Verfeinerung	47
3.4.10.1. „Rigid Body“-Verfeinerung	47
3.4.10.2. „Positional Refinement“	48
3.4.10.3. „Simulated Annealing“	48
3.4.10.4. B-Faktor-Verfeinerung	48
3.4.11. Analyse des Modells	49
3.4.12. Graphische Darstellung	49
4. Ergebnisse	50
4.1. Reinigung	50
4.1.1. EpiD und EpiD-H67N	50
4.1.2. MrsD	50
4.1.3. AtHAL3-H90N	50
4.2. Kristallisation	51
4.2.1. EpiD	51
4.2.2. Komplex von EpiD-H67N mit DSYTC	51
4.2.3. MrsD	52

4.2.4. AtHAL3-H90N mit PPC	53
4.3. Strukturlösung	53
4.3.1. EpiD	53
4.3.2. Komplex	55
4.3.3. MrsD	56
4.4. Struktur von EpiD und MrsD	58
4.4.1. Partikel	58
4.4.2. Monomere	62
4.4.3. Charakteristische Sequenzmotive und Kofaktor-Bindung	62
4.5. Substratkomplex	66
4.5.1. Substraterkennungsklammer und Substratspezifität	67
4.5.2. Aufbau des reaktiven Zentrums	70
4.5.3. Theoretisches Modell eines Komplexes von MrsD mit dem Pentapeptid AECIC	72
5. Diskussion	74
5.1. Vergleich mit anderen Flavoproteinen	74
5.2. Bindung des Kofaktors	77
5.3. Substratbindung und Substratspezifität	78
5.4. Reaktionsmechanismus	79
5.5. Vergleich mit AtHAL3	81
A. Anhang	84
A.1. Kristallographische Begriffe	84
A.2. Nomenklatur der 20 proteinogenen Aminosäuren	87
A.3. Liste der Verwendeten Abkürzungen	88
Literatur	90

Abbildungsverzeichnis

1.	Biosynthese des Epidermin	7
2.	Schematische Darstellung von Mersacidin	9
3.	Natürliche Flavin-Kofaktoren	10
4.	Sequenzvergleich der Mitglieder der HFCD-Familie	16
5.	Schematische Darstellung der Löslichkeitskurve eines Proteins	30
6.	Schematische Darstellung einer Vertiefung einer CrysChem-Platte	31
7.	Die Ewaldkugel zur Konstruktion des gestreuten Röntgenstrahles	33
8.	Harker-Konstruktion der Proteinphasen beim isomorphen Ersatz	39
9.	Dodekamer des EpiD	59
10.	Trimer von MrsD	60
11.	Kontaktflächen zwischen den Protomeren	61
12.	Monomere von EpiD und MrsD	63
13.	Schematische Darstellung der Bindung von FMN und FAD	64
14.	Kofaktorbindung bei EpiD und MrsD	65
15.	Substratbindung des EpiD	68
16.	Oberflächendarstellung der Substratbindungsklammer	69
17.	Bindungstasche des Substrat-Tyrosins	70
18.	Detailansicht des aktiven Zentrums	71
19.	Theoretischer Substratkomplex von MrsD	73
20.	Vergleich mit <i>E. coli</i> -Flavodoxin und Pyruvat-Oxidase	75
21.	Überlagerung von MrsD mit Quinon-Reduktase	76
22.	Überlagerung von MrsD mit Ferredoxin:NADP ⁺ Reduktase	77
23.	Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der von EpiD katalysierten Reaktion	80
24.	Überlagerung von EpiD und AtHAL3	82
25.	Theoretischer Substratkomplex von AtHAL3	83

Tabellenverzeichnis

1.	Zusammenfassung der Peptidantibiotika	4
2.	Lantibiotika, die synthetisierenden Organismen und die Zielorganismen . . .	6
3.	Zellkonstanten	52
4.	Statistik der Datensammlung des EpiD	54
5.	Statistik der Verfeinerung des EpiD	56
6.	Statistik der Datensammlung des MrsD	57
7.	Statistik der Verfeinerung des MrsD	58

1. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine EpiD und MrsD gehören zusammen mit MutD zu den LanD-Proteinen, einer Unterfamilie der homooligomeren Flavin-enthaltenden Cystein-Decarboxylasen (HFCD). Diese katalysieren einen wichtigen Reaktionsschritt, eine oxidative Decarboxylierung eines C-terminalen Cysteins, in der Biosynthese der Lantibiotika Epidermin, Mersacidin und Mutacin III. Die beiden anderen Mitglieder der HFCD-Proteine, das bakterielle Dfp und HAL3 aus *Arabidopsis thaliana* (AtHAL3) katalysieren eine ähnliche Reaktion in der Biosynthese des bei allen Organismen sehr wichtigen Coenzym A (CoA), die nicht oxidative Decarboxylierung eines Cysteinylrestes. Die Kristallstrukturen der Proteine EpiD und MrsD sowie der inaktiven Mutante EpiD-H67N im Komplex mit dem Pentapeptid DSYTC wurden gelöst. Die Homododekamere der untersuchten Proteine bilden Partikel mit einer 23-Punktsymmetrie, die sich aus auf den Spitzen eines Tetraeders lokalisierten Trimeren zusammensetzen. Die Monomere besitzen eine Rossmann-artige Tertiärstruktur, wobei sich die Wechselwirkungen dieser Tertiärstruktur, die häufig von dinukleotidbindenden Proteinen verwendet wird, mit den Kofaktoren FMN und FAD bei den HFCD-Proteinen deutlich von denen anderer Flavoproteine unterscheidet. Die beiden charakteristischen Sequenzmotive, PASANT und PXMNXXMW, dieser Proteinfamilie sind an der Kofaktorbindung, Wechselwirkungen mit dem Substrat und wichtigen strukturellen Eigenschaften beteiligt. Die Struktur des Komplexes von EpiD-H67N mit DSYTC und ein modellierter Komplex von MrsD mit den fünf C-terminalen Aminosäuren des Vorläuferpeptides von Mersacidin (MrsA) erklären die schon länger bekannte und unüblich breite Substratspezifität von EpiD und die Unterschiede zu derjenigen von MrsD. Die von den Proteinen der HFCD-Familie katalysierte Decarboxylierung eines C-terminalen Cysteins zeigt einen neuartigen Reaktionsmechanismus, der sich deutlich von den bisher bekannten Decarboxylierungen und Dehydrierungen unterscheidet. Als ersten Reaktionsschritt kann man eine Oxidation der Thiolgruppe annehmen, da nur diese Kontakt mit dem Kofaktor hat. Die entstehende β -Thioaldehyd-Carbonsäure decarboxyliert danach analog zu den β -Keto-Carbonsäuren wahrscheinlich spontan.

Die Kristallstrukturen der Substratkomplexe von MrsD und AtHAL3, die bisher nur modelliert werden konnten, würden eine genauere Betrachtung der Unterschiede in der Substratbindung erlauben.

2. Einleitung

2.1. Angeborene Immunantwort

Mehrzellige Organismen müssen sich ständig gegen ein Eindringen von Mikroben verteidigen. Bei höheren Tieren findet der erste Kontakt von Mikroben mit ihren möglichen Wirten auf der Haut, Bindehaut oder der feuchten epithelialen Oberfläche des Atmungs-, Verdauungs-, Harn- und Fortpflanzungstraktes statt. Die Abwehrmechanismen, die in der ersten Phase einer Infektion dominieren, hängen nicht von einer spezifischen Antigenerkennung ab, sondern benutzen gemeinsame strukturelle oder funktionelle Eigenschaften der Mikroben. Einige der Eigenschaften werden von komplementären Rezeptoren des Wirtes erkannt, durch die danach die Antwort des Immunsystems ausgelöst wird. Andere strukturelle oder Stoffwechseleigenschaften machen Mikroben anfällig gegen antimikrobielle Substanzen ihres potenziellen Wirtes, wie z. B. oxidative Reagenzien (Peroxide), lytische Enzyme, Poren bildende Moleküle und Substanzen, die die Aufnahme essentieller Nährstoffe behindern. Einige dieser antimikrobiellen Substanzen sind ständig vorhanden, andere werden erst bei Bedarf synthetisiert und abgegeben. Eine dritte Gruppe wird durch bewegliche Zellen an ihren Einsatzort gebracht.

Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort ist das adaptive Immunsystem (Antikörper und antigenerkennende cytotoxische Lymphozyten) eine späte Entwicklung der Evolution, die nur in höheren Wirbeltieren gefunden wird. Diese spielt bei der ersten Immunantwort nur eine untergeordnete Rolle, ist jedoch äußerst effektiv um Mikroben zu bekämpfen, welche die ersten Abwehrmechanismen überlebt haben oder gegen Mikroben, die von früheren Infektionen bekannt sind.

2.2. Antimikrobielle Peptide und Peptidantibiotika

Antimikrobielle Peptide sind ribosomal synthetisierte, gencodierte, kleine Peptide (<100 Aminosäuren) und unterscheiden sich von den meisten Peptidantibiotika von Bakterien und Pilzen, die sich in Bezug auf ihre Biosynthese in zwei Klassen unterteilen lassen: 1) die nicht-ribosomal an Multienzymkomplexen synthetisierten Peptidantibiotika. Dabei dient die Proteinoberfläche als Matrix, wie zum Beispiel beim Gramacidin und Bacitracin (Übersicht von H. Kleinkauf und H. Döhren, 1987, sowie H. Kleinkauf und H. Döhren, 1992) und 2. zunächst an Ribosomen synthetisierte und anschließend modifizierte Peptide, zu denen zum Beispiel die Lantibiotika gehören (siehe 2.3). Antimikrobielle Peptide sind ein universeller Abwehrmechanismus und werden in mehrzelligen Organismen als Schlüsselkomponente der angeborenen Immunität gefunden. Bakterien benutzen sie, um Nahrungskonkurrenten zu behindern

(Jack *et al.*, 1995; Lehrer und Ganz, 1999). Antimikrobielle Peptide sind sowohl bei Pflanzen als auch bei Tieren weit verbreitet.

Eine grosse und wichtige Gruppe der antimikrobiellen Peptide sind die Defensine, die sowohl von Wirbel- als auch von wirbellosen Tieren produziert werden (siehe Zusammenfassung von A. L. Hughes, 1999). Es sind drei Gruppen von Defensinen bekannt: die Defensine von Insekten, α -Defensine (reifes Peptid enthält 29-35 Aminosäuren) von Säugetieren und β -Defensine (reifes Peptid enthält 38-42 Aminosäuren) von Wirbeltieren. Auch menschliche Neutrophile exprimieren eine Reihe verschiedener α -Defensine (Lehrer und Ganz, 1990). β -Defensine werden von Leukozyten und Epitelzellen, inklusive der menschlichen Haut, produziert (Bartels *et al.*, 1997). Die Cathelicidine werden von Hautzellen exprimiert und schützen zum Beispiel Mäuse vor einer nekrotischen Infektion mit Gruppe A Streptokokken (GAS) (Nizet *et al.*, 2001).

Nahezu alle antimikrobiellen Peptide sind kationisch und amphipatisch. Die einfachsten Strukturen (siehe Tab. 1), deren Wirkungsmechanismus aufgeklärt wurde, sind entweder α -Helices oder β -Haarnadelschleifen und bilden Kanäle durch Membranen. Zu diesen gehören das Magainin der Froschhaut (23 Aminosäuren)(Bechinger *et al.*, 1993; Ludtke, 1996) und das Protegrin von Schweineleukozyten (16-18 Aminosäuren)(Aumelas, 1996; Fahrner, 1996). Es wurden zwei Hypothesen darüber aufgestellt, wie die Zerstörung der Membranintegrität die Mikroben abtötet. Die Abnahme der Vitalität könnte mit dem Verlust an Energie, verursacht durch ein Abwandern von Ionen durch die zerstörte Membran, zusammenhängen. Alternativ könnten die durch die zerstörte Membran eindringenden Peptide an noch nicht identifizierte zelluläre Moleküle binden und so deren Stoffwechselfunktion inhibieren (Ganz und Lehrer, 1999).

2.3. Lantibiotika

Lantibiotika sind kleine ribosomal synthetisierte und danach modifizierte Peptide und gehören daher zur zweiten Klasse der Peptidantibiotika (siehe 2.2). Die Gene für die Vorläuferpeptide, die für die posttranslationalen Modifikationen nötigen Enzyme, Regulatoren und Transportproteine, die einen Selbstschutz der produzierenden Organismen darstellen, sind häufig in einem Gencluster auf einem Plasmid codiert (LanA, LanB-D, etc.). Es gibt jedoch auch Fälle, bei denen die Gene auf dem Chromosom liegen, z.B. Subtilin (Banerjee und Hansen, 1988) und Cinnamycin (Kaletta *et al.*, 1991), oder mit Transposons assoziiert sind, z.B. Nisin (Rauch und de Vos, 1992). Durch posttranslationale Modifikationen, die zu einer hohen strukturellen Vielfalt führen, werden die Beschränkungen durch den genetischen Code umgangen. Zu diesen Modifikationen gehören unter anderem Acylierungen, heterozyklische Ringbildung,

Tabelle 1: Zusammenfassung der Peptidantibiotika

Struktur	Vertreter	Spezies und Gewebe	Antimikrobielle Wirkung (nachgewiesen)	Entwicklung für industrielle Nutzung
4-Disulfide α -Helix + β -Faltblatt	pflanzliche Defensine	Pflanzen	Pilze	gentechnisch modifizierte Pflanzen mit erhöhter Pilzresistenz
	Drosomycin	Hämolymphe von Arthropoden		
3-Disulfide, reich an β -Faltblättern	α -Defensine β -Defensine	Neutrophile von Wirbeltieren und mammalian epithelia	Bakterien, Pilze, eingehüllte Viren	
3-Disulfide α -Helix + β -Faltblatt	Defensine von Insekten	Hämolymphe von Arthropoden, Muscheln	Gram-positive Bakterien	
3- oder 4-Disulfide, 2 α -Helices + β -Faltblatt	einige Thionine (Crambin)	Pflanzen	Bakterien, Pilze, Säugerzellen	
2-Disulfide β -Faltblatt	Protegrine, Tachyplepsine, Polyphemusine	Neutrophile von Schweinen, Hämozyten des Pfeilschwanzkrebses	Bakterien, Pilze, eingehüllte Viren	aktuelle Antibiotika
1-Disulfide, zyklisch oder teilweise zyklisch	Cyclo-Dodecapeptide (bactenecin-1)	Leukozyten	Bakterien	
	Ranalexin, Brevinin	Haut von Amphibien		
α -Helix	Cecropine	Insekten-Hämolymphe	Bakterien	aktuelle Antibiotika
	Magainin, PGLa	Haut von Amphibien	Bakterien	
	LL-37	Säugerleukozyten		
Linear, mit sich wiederholenden Motiven oder vorherrschenden Aminosäuren	Bactenecin 5 und 7, PR-39, Prophenin, Indolicidin	Säugerleukozyten	Bakterien	
	Diptericidin, Apidaecin	Insekten-Hämolymphe	Bakterien	
	Histatine	menschlicher Speichel	orale Bakterien, Pilze	aktuell gegen Parodontitis

Tabelle nach T. Ganz und R. I. Lehrer (1999).

Glykosylierung, Zyklisierung des Peptid-Rückgrates oder die Bildung von Thioetherbrücken. Die Lantibiotika werden meistens von Gram-positiven Bakterien sekretiert und wirken auch hauptsächlich gegen diese Gruppe der Bakterien. Lantibiotika hemmen die Zellwandsynthese, indem sie mit Peptidoglykan-Vorstufen interagieren, und bilden transient potentialabhängige Poren in der Cytoplasma-Membran. Nisin zum Beispiel bindet an den membrangebundenen Zellwandvorläufer Lipid II und führt dadurch zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Plasmamembran (Breukink *et al.*, 1999; Brötz *et al.*, 1998). Als charakteristische Aminosäure enthalten sie die Thioether-Aminosäuren Lanthionin und 3-Methyl-Lanthionin (**lanthionine containing antibiotic peptides**) und zusätzlich α , β -Didehydro-Aminosäuren (Sahl und Bierbaum, 1998). Manche Lantibiotika enthalten auch D-Aminosäuren, z.B. D-Alanin bei Lactocin S, das aus L-Serinen durch Dehydratisierung zu Dehydroalanin und anschließender stereospezifischer Hydrierung entsteht (Skaugen *et al.*, 1994).

Zu den Lantibiotika gehören Epidermin und Mersacidin, auf die im Folgenden noch näher eingegangen wird, sowie unter anderem Mutacin, Nisin, Gallidermin und Cytolysin. Sie können nach H.-D. Entian und C. Klein in drei Gruppen eingeteilt werden (siehe Tab. 2):

- Typ A: positiv geladen, vier Thioetherringe, länglich
- Typ B: neutral oder negativ geladen, globulär
- Zwischentyp: gleiches Ringmuster wie A, jedoch globulär

Typ B Lantibiotika enthalten nicht nur die strukturellen Varianten von Duramycin, sondern sie sind klein, globulär, tragen nur niedrige Ladungen und hemmen enzymatische Aktivitäten (Bierbaum *et al.*, 1995). Bierbaum *et al.* ordnen daher Mersacidin und das sehr ähnliche Actagardin dem Typ B zu.

Nisin ist wegen seiner Wirksamkeit gegen Staphylokokken, Streptokokken und Clostridien (Mattick und Hirsch, 1944; Mattick und Hirsch, 1947; Rayman und Hurst, 1984) das prominenteste Lantibiotikum. Es wird von *Lactococcus lactis*-Stämmen der serologischen Gruppe N produziert und seine hemmende Wirkung gegen Lactobacilli wurde schon 1928 von L. A. Rogers und E. O. Whittier beschrieben. Nisin kommt in Milchprodukten (Chevalier *et al.*, 1957) vor und verhindert das Wachstum von Clostridien in Käse und Konserven. Wegen der mutagenen Wirkung des zur Zeit eingesetzten Nitritpökelsalz besteht ein großes Interesse, dieses durch Nisin zu ersetzen. Da die Lantibiotika Epidermin und Gallidermin sehr gut gegen *Propionibacterium acnes*, Staphylokokken und Streptokokken wirken, könnten sie zur Aknetherapie verwendet werden (Entian und Klein, 1993).

Tabelle 2: Lantibiotika, die synthetisierenden Organismen und die Zielorganismen

Lantibiotikum	synthetisierende Organismen	Zielorganismen
Typ A	länglich, kationisch	
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i> Lancefield Serotyp C	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> <i>Clostridium butyricum</i>
Subtilin	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Streptococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus spec.</i>
Epidermin/ Gallidermin	<i>Staphylococcus epidermidis</i> TÜ3298/ TÜ3928	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Streptococcus spec.</i>
Pep5	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5	<i>Staphylococcus spec.</i>
gleiches Ringmuster wie Typ A, aber globulär		
Mersacidin	<i>Bacillus spec.</i>	<i>Staphylococcus spec.</i> <i>Streptococcus spec.</i>
Typ B	globulär, neutral oder negativ geladen	
Cinnamycin	<i>Streptomyces spec.</i>	inhibiert Phospholipase A2, HSV-1
Duramycine	<i>Streptomyces spec.</i>	inhibiert Phospholipase A2, HSV-1

Tabelle nach K.-D. Entian und C. Klein, 1993.

2.3.1. Epidermin

Epidermin wird von einem Staphylokokken-Stamm (*Staphylococcus epidermidis* Tü3298) synthetisiert und sekretiert und enthält vier durch Thioetherbrücken gebildete Ringe (Schnell *et al.*, 1988). Es enthält neben den für die Familie der Lantibiotika charakteristischen modifizierten Aminosäuren *S*-[(*Z*)-2-Aminovinyl]-D-Cysteine. Die Biosynthesegene *epiA*, *epiB*, *epiC*, *epiD*, *epiP* und *epiQ* liegen auf dem 54kb Plasmid pTü32 des Stammes *Staphylococcus epidermidis* Tü3298. Diese Gene sind ausreichend für eine heterologe Epiderminproduktion in *Staphylococcus carnosus* (Augustin *et al.*, 1991; Augustin *et al.*, 1992). Drei weitere Gene des Genclusters sind die Gene *epiE*, *epiF* und *epiG*. Die von diesen Genen codierten Proteine bilden einen ABC-Transporter EpiFEG. Dieser transportiert Epidermin aus der Membran in das die Zelle umgebende Medium und schützt so den Epidermin produzierenden Stamm vor der Zellwand zerstörenden Wirkung des Epidermins. Der Transporter ist sehr spezifisch für Epidermin und das sehr ähnliche Gallidermin, wie Versuche mit Nisin und Gallidermin, sowie Derivate dieser Lantibiotika zeigten (Otto *et al.*, 1998).

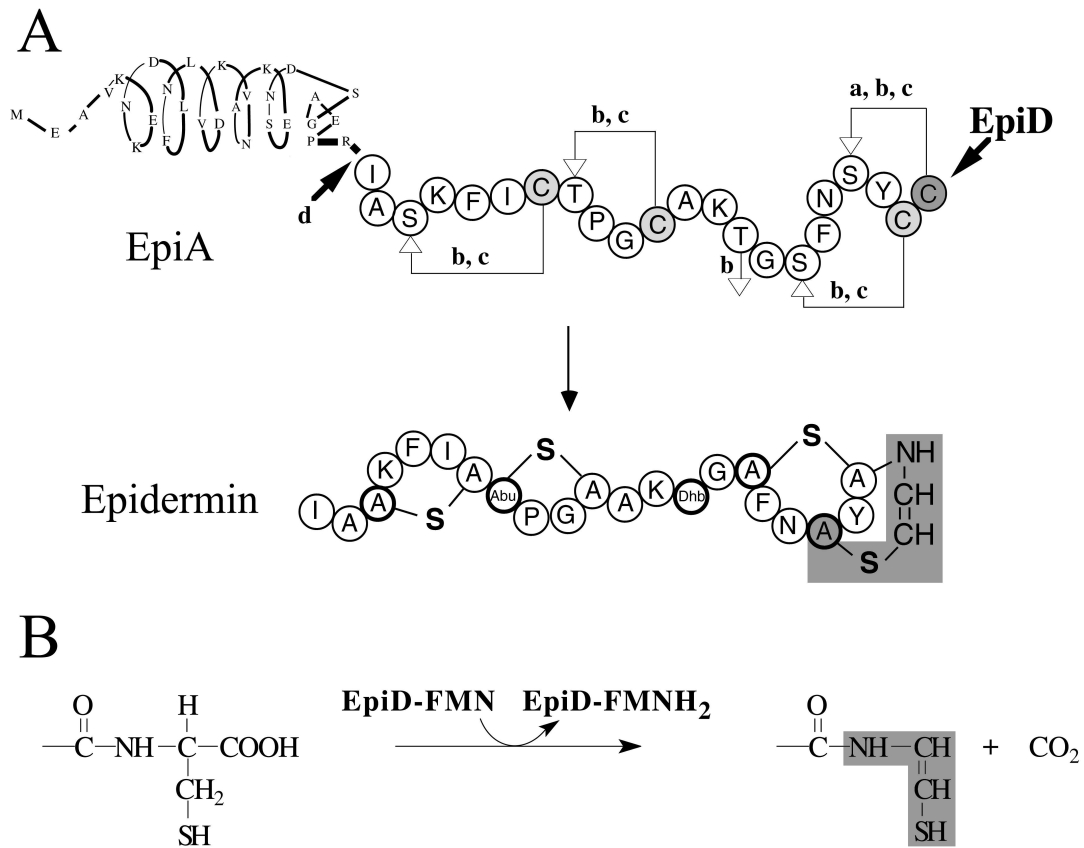


Abbildung 1: Biosynthese des Epidermin

A) Epidermin wird in einem mehrstufigen Prozess aus dem Vorläuferpeptid EpiA synthetisiert. Diese Stufen umfassen a) die oxidative Decarboxylierung des C-terminalen Cysteins, b) die Dehydratisierung aller Serin- und Threoninreste c) Bildung der Thioetherbrücken und d) die Abspaltung des Signalpeptids durch EpiP. Die seltene Aminosäure *S*-[(*Z*)-2-aminovinyl]-D-Cystein ist grau schattiert.

B) EpiD katalysiert die oxidative Decarboxylierung des C-terminalen Cysteins zu der reaktiven (*Z*)-Enthiolgruppe (grau schattiert).

Biosynthese

Die Biosynthese des Epidermin startet mit einem 52 Aminosäuren langen Vorläuferpeptid und umfasst eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen (Abb. 1), von denen speziell die Bildung der ungesättigten Aminosäure *S*-[(*Z*)-2-Aminovinyl]-D-Cystein aus Ser19 und dem C-terminalen Cys22 des Epiderminvorläufers EpiA detailliert untersucht wurde (Allgauer *et al.*, 1986). Die ersten 30 Aminosäuren bilden eine Signalsequenz, die später von einer Signalpeptidase (EpiP) abgespalten wird. Die Nummerierung startet mit dem ersten Isoleucin des reifen Epidermin. Es werden zunächst alle Serine (Ser3, 16 und 19) und Threonine (Thr8 und 14) zu Didehydroalanin bzw. Didehydrobutyrin dehydratisiert. Danach erfolgt die oxidative Decarboxylierung des C-terminalen Cysteins, die von EpiD (siehe 2.5.1) katalysiert wird, und es entsteht ein reaktives (*Z*)-Enthiol. Die Thiolgruppen dieses Enthiols und der drei verbleibenden Cysteine (Cys7, 11 und 21) werden nun stereoselektiv an die im ersten Schritt gebildeten CC-Doppelbindungen addiert, wobei das Didehydrobutyrin14, entstanden aus Thr14, unverändert erhalten bleibt. Dieser Schritt führt zu der Bildung der charakteristischen Aminosäuren *meso*-Lanthionin (Ala-*S*-Ala) und (2*S*,3*S*,6*R*)-3-Methyl-Lanthionin (Abu-*S*-Ala, Abu = Aminobutyryn) sowie der selteneren Aminosäure *S*-[(*Z*)-2-Aminovinyl]-D-Cystein (Abb. 1).

2.3.2. Mersacidin

Mersacidin wurde vom Kulturüberstand von *Bacillus spec.* HIL Y-85,54728 isoliert und ist wegen seiner signifikanten *in vivo* Wirksamkeit gegen methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) interessant (Chatterjee *et al.*, 1992a). Es ist mit 20 Aminosäuren eines der kürzesten Lantibiotika und enthält wie Epidermin 3-Methylanthionin, ein Dehydroalanin und ein *S*-Aminovinyl-2-Methylcystein (Chatterjee *et al.*, 1992b)(siehe Abb. 2).

Mersacidin trägt keine Nettoladung und ist insgesamt hydrophob. Die Wirkungsweise von Mersacidin beruht auf einer Störung der Peptidoglykan-Biosynthese (Brötz *et al.*, 1995) und nicht auf einer Depolarisierung der Cytoplasmamembran. Dies und die fehlende Ladung ordnen Mersacidin eher den Typ B Lantibiotika zu (Bierbaum *et al.*, 1995). Die Behinderung der Peptidoglykan-Biosynthese konnte von Brötz *et al.* (1997) näher spezifiziert werden. Mersacidin hemmt nicht die Synthese von Lipid II [Undecaprenyl-Diphosphoryl-N-Acetylmuramoyl-(pentapeptid)-N-Acetylglucosamine] sondern die Transglykosylierung dieses Intermediats zu entstehenden polymeren Glycansträngen.

Die seltene Aminosäure bei Mersacidin ist *S*-[(*Z*)-2-Aminovinyl]-Methyl-D-Cystein, eine Variante des *S*-[(*Z*)-2-Aminovinyl]-D-Cystein von Epidermin, die aus dem oxidativ decarboxylierten C-terminalen Cystein und einem dehydratisierten Threonin (Thr15 anstelle von

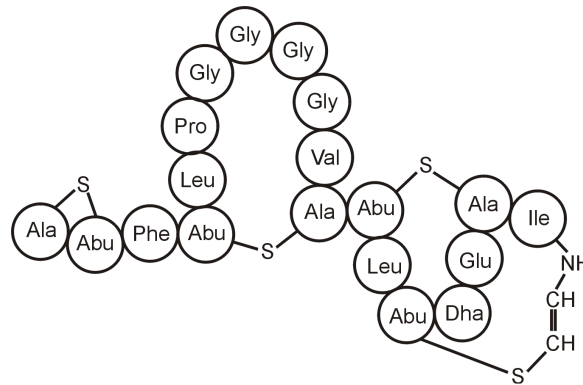


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Mersacidin

Abbildung nach H. Brötz *et al.* 1997.

Abu = Aminobutyryn, Dha = Dehydroalanin

Ser19 bei EpiD) gebildet wird.

2.4. Flavoproteine

Da alle in dieser Arbeit untersuchten Enzyme Flavoproteine sind, soll im Folgenden kurz auf diese Enzymklasse eingegangen werden. Eine detaillierte Betrachtung würde jedoch den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Daher sei auf einige Reviews verwiesen:

1. eine Serie von Übersichtsartikeln im FASEB Journal mit dem Titel "Flavoprotein structure and mechanism": **1995**, 9(7), 473-475; **1995**, 9(7), 476-483; **1995**, 9(11), 995-1003; **1995**, 9(12), 1138-1146; **1995**, 9(13), 1267-1276; **1995**, 9(14), 1411-1418; **1997**, 11(2), 133-140.
2. eine Serie von Artikeln in Biochem. Soc. Transact. **1996**, 24, 61-126.
3. eine Zusammenstellung der Geometrie der aktiven Zentren von Marco W. Fraaije und Andrea Mattevi (2000).

Flavoenzyme haben die einzigartige Eigenschaft, an vielen verschiedenen Reaktionen beteiligt zu sein, wie zum Beispiel an Dehydrierungen einer Vielzahl von Stoffwechselprodukten, an Ein- und Mehrelektronenübertragungen von und zu Redoxzentren, an der Emission von Licht, an der Reparatur von DNA-Schäden und an der Aktivierung von Sauerstoff für Oxidations- und Hydroxylierungsreaktionen. Durch die spektroskopischen Eigenschaften des Flavin-Kofaktors sind die Flavoproteine besonders für detaillierte enzymologische Studien geeignet und sind daher auch eine der am besten untersuchten Enzymfamilien.

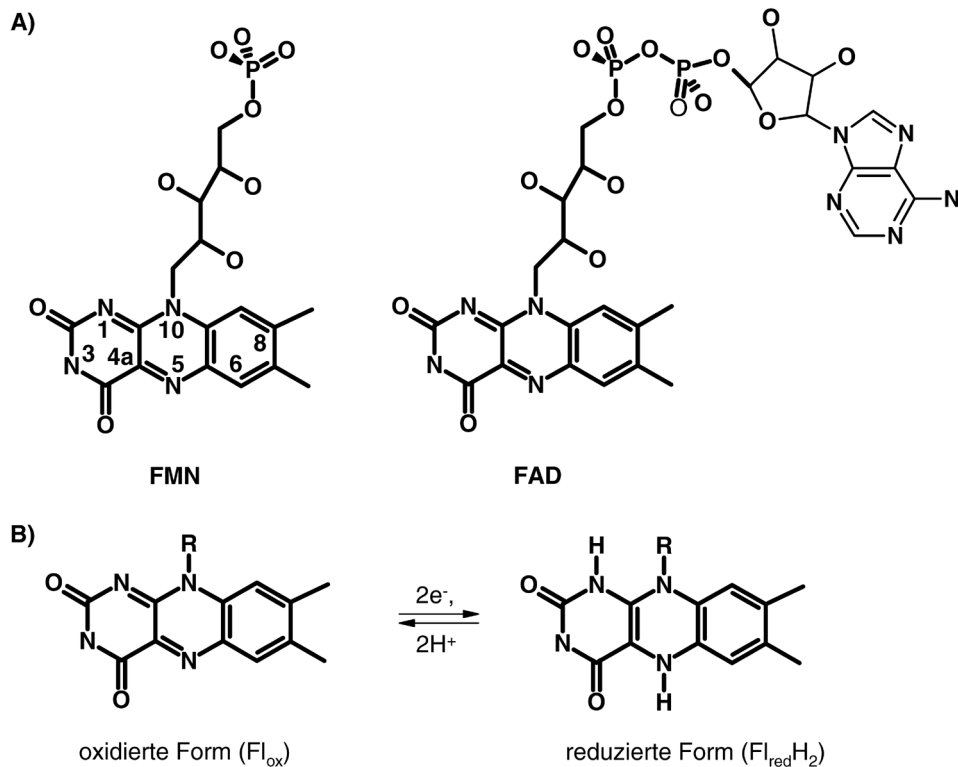


Abbildung 3: Natürliche Flavin-Kofaktoren

A) Strukturformeln der beiden in der Natur auftretenden Flavin-Kofaktoren FMN und FAD

B) Redox-Reaktion des Flavin, R = Seitenkette des Kofaktors.

Die reduzierte Form ist farblos, da das System konjugierter Elektronen bei N(5) und N(1) unterbrochen ist.

Die prosthetischen Gruppen (FMN oder FAD) der Flavoproteine stammen vom Riboflavin ab, das aus einem Isoalloxazin-Ringsystem und einer Ribityl-Seitenkette besteht, die an der zentralen N-10-Position des Pyrazinrings gebunden ist (siehe Abb. 3). Dieser Vorläufer wird an der 5'-Hydroxylgruppe der Ribitylseitenkette von der Flavokinase zum Flavinmononucleotid (FMN) phosphoryliert. In einer zweiten ATP-abhängigen Reaktion verknüpft die FAD-Pyrophosphorylase eine AMP-Einheit mit dem FMN und synthetisiert Flavinadenindinucleotid (FAD). Beide Kofaktoren sind in der Natur weit verbreitet. Die Seitenkette spielt für die Bindung des Flavins eine wichtige Rolle und die Mehrheit der Flavoproteine bevorzugt sehr stark entweder FMN oder FAD. Auf der anderen Seite spielt Riboflavin als Kofaktor nur eine untergeordnete Rolle. In einigen Fällen wird das Flavin jedoch auch kovalent über die Kohlenstoffatome C(6) oder C(8) des Isoalloxazin-Ringsystems an eine Aminosäureseitenkette gebunden. Das Isoalloxazin-Ringsystem ist auch in allen Fällen für die Katalyse zuständig und dient in vielen biologischen Prozessen als reversibler Reduktions-Oxidations-Katalysator

und ist auch die strukturelle Komponente der Flavinkofaktoren, die für die Lichtabsorption im UV- und sichtbaren Spektralbereich zuständig ist. In der oxidierten Form beobachtet man zwei Absorptionsmaxima bei ca. 360 und ca. 450 nm, die zu der gelben Farbe (lateinisch: *flavus* = gelb) führen.

Die meisten bekannten Flavoproteine können je nach Funktion in eine von sieben Klassen (Massey, 1995) oder nach ihrer Struktur in eine von vier Strukturfamilien eingeordnet werden.

1. Funktion:

a) einfache Flavoproteine: die einfachen Flavoproteine reagieren alle mehr oder weniger leicht mit molekularem Sauerstoff.

- Oxidasen:

Diese Klasse von Enzymen, wie z.B. D-Aminosäure-Oxidasen, Glucose-Oxidase, Glycolat-Oxidase etc, setzen O_2 sehr schnell zu H_2O_2 und oxidiertem Flavoprotein um. Enzyme dieser Klasse haben einige gemeinsamen Eigenschaften: sie stabilisieren alle das roteanionische Flavinradikal bei Ein-Elektronen-Übertragungen und ein Flavin N(5)-Sulfit-Addukt. Ebenso wird das Benzoquinon-Anion von 6- und 8-substituierten Hydroxy- und Mercaptoflavinen stabilisiert, bei denen die negative Ladung auf der N(1)-C(2)O-Gruppe lokalisiert stabilisiert ist (Ghisla und Massey, 1986). Diese Eigenschaften wurden mit der Anwesenheit einer positiven Ladung in der Nähe des Pyrimidinringes des Flavins interpretiert.

- Elektronentransferasen:

Diese Enzyme sind physiologisch an Ein-Elektronen-Übertragungen beteiligt, z.B. Flavodoxine, Ferredoxin-NADP- und NADPH-Cytochrom P450-Reduktasen. Sie reagieren träge mit O_2 und produzieren O_2^- und das Flavin-Semiquinon. Im Gegensatz zu den Oxidasen zeigt diese Gruppe keine Tendenz zur Bildung von Sulfit-Addukten oder zur Stabilisierung der Benzoquinonform von substituierten Flavinen. Studien in Lösung mit reaktiven Flavinen wie 8-Cl-, 8-Mercapto- oder 8-SCN-Flavinen zeigten, dass nur der Benzylring dem Lösungsmittel zugänglich ist (Ghisla und Massey, 1986). Acyl-CoA-Dehydrogenasen sind schwer einzuordnen, weil die Reaktion die Bildung einer C=C-Doppelbindung offensichtlich durch die konzertierte Abstraktion eines

Protons vom $C\alpha$ durch eine Enzybase und eine Hydridübertragung vom $C\beta$ zum Flavin-N(5) beinhaltet (Ghisla *et al.*, 1984). Der katalytische Reaktionszyklus wird jedoch physiologisch durch mehrere nacheinanderfolgende Ein-Elektronen-Übertragungen auf das Elektronentransferprotein vervollständigt.

- Flavo-Monooxygenasen:

Bei dieser dritten Klasse der einfachen Flavoproteine reagiert das reduzierte Enzym mit O_2 zu einem leicht beobachtbaren Flavin-C(4a)-Hydroperoxid Intermediat. Alle Enzyme dieser Klasse werden durch NADH oder NADPH reduziert. In Abwesenheit eines weiteren Substrates zerfällt das Flavinhydroperoxid zu H_2O_2 und oxidiertem Flavin. Ist jedoch ein weiteres Substrat vorhanden, so wird ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen und ein C(4a)-Hydroxyflavin gebildet, welches nach einer Dehydratisierung das oxidierte Flavin für den nächsten katalytischen Zyklus zurück bildet. Zwei Beispiele dieser Klasse sind p-Hydroxybenzoat-Reduktase und bakterielle Luciferase.

b) Flavoproteine mit zusätzlichen Redox-Zentren:

- Flavoprotein-Disulfid-Oxidoreduktasen:

Enzyme dieser Klasse enthalten ein Disulfid in unmittelbarer Nähe zum Flavin (in allen Fällen FAD). Die Katalyse beinhaltet eine Wechselwirkung des Flavins mit einem Pyridinnukleotid, eine Elektronenübertragung durch das Flavin zum reaktiven Disulfid/Dithiol-Paar und die Wechselwirkung des letzteren mit dem zweiten Substrat (Williams, 1992). Das zweite Substrat ist üblicherweise auch ein Disulfid/Dithiol-Paar, z.B. ein Liponsäure-Derivat bei der Liponamid-Dehydrogenase, Glutathion bei der Glutathion-Reduktase, Thioredoxin bei der Thioredoxin-Reduktase und Trypanothion bei der Trypanothion-Reduktase.

- Häm-enthaltende Flavoproteine (Flavocytochrome):

Das am besten bekannte Beispiel dieser Klasse ist Lactat-Dehydrogenase aus Hefe (Flavocytochrom b_2), die neben FMN noch eine Cytochrom-Domäne vom b-Typ enthält (Xio und Mathews, 1990; Lederer, 1992). Ein zweites interessantes Beispiel ist der Fusionskomplex von Cytochrom P-450 BM-3, bei

dem eine FMN- und FAD-enthaltende NADPH-Cytochrom P450 Reduktase eine Domäne und ein Cytochrom P450 eine andere eines einzelnen katalytisch eigenständigen Proteins bildet (Narhi und Fulco, 1986). Die NO-Synthase enthält zusätzlich zu FAD und FMN auch ein Häm mit ähnlichen Eigenschaften wie in Cytochrom P450.

- Flavoproteine mit Metallen:

Das am längsten bekannte Beispiel eines komplexen Flavoproteins ist die Xanthin-Oxidase, die, wie schon 1954 gezeigt wurde, zusätzlich zur prosthetischen Gruppe FAD noch Molybdän- und Eisen-Schwefel-Zentren enthält.

c) Flavoenzyme ohne bekannte Funktion:

Die genaue physiologische Funktion des schon lange bekannten „Old Yellow Enzyme (OYE)“ ist noch immer unbekannt, obwohl einige fest bindende Liganden wie zum Beispiel Phenole und Steroide identifiziert wurden (Meah *et al.*, 2001).

d)

2. Struktur: Typische Beispiele sind Flavodoxin, Glycolat-Oxidase, Glutathion-Reduktase und Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase (Tanner *et al.*, 1996):

- In Flavodoxinen binden die C-terminalen Enden eines 5-strängigen β -Faltblattes den Kofaktor FMN, wobei er mit dem Dimethylbenzylring dem Lösungsmittel zugewandt ist (Fukuyama *et al.*, 1990; Rao *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1983).
- Bei der Glycolat-Oxidase wird das FMN von einem 8-strängigen parallelen $\alpha\beta$ -Fass gebunden (Lindqvist, 1989).
- Die Familie der NADP⁺-Reduktasen benutzt eine Flavinbindungsdomäne, die aus einem 6-strängigen antiparallelen β -Faltblattkern mit einem „Greek key“-Motiv besteht (Karplus *et al.*, 1991). Diese Gruppe schließt sowohl FMN- als auch FAD-bindende Proteine ein.
- Glutathion-Reduktasen und ähnliche Proteine benutzen eine nach Rossmann (Rossmann *et al.*, 1974) benannte Faltung, um den ADP-Teil des FAD zu binden (Karplus und Schulz, 1987).

Die Verteilung dieser verschiedenen Faltungsarten korreliert nicht mit der Funktion der Enzyme. Topologisch sehr ähnliche Flavoenzyme auf der einen Seite katalysieren verschiedene

Reaktionen, auf der anderen Seite haben Proteine mit derselben Funktion sehr verschiedene Tertiärstrukturen. Zum Beispiel zeigen Flavocytochrom b_2 und D-Aminosäuren-Oxidase sehr verschiedene Topologien, obwohl sie eine sehr ähnliche Reaktion katalysieren (Xio und Mathews, 1990; Mattevi *et al.*, 1996; Mizutani *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu zeigen unterschiedliche Enzyme wie Oxidasen (D-Aminosäuren-Oxidase (Mattevi *et al.*, 1996; Mizutani *et al.*, 1996)) und Cholesterol-Oxidase (Yue *et al.*, 1999), Hydroxylasen (p-Hydroxybenzoat-Hydroxylase (Schreuder *et al.*, 1989)) und Oxidoreduktasen (Fumarat-Reduktase und verwandte Enzyme (Iverson *et al.*, 1999; Mattevi *et al.*, 1999)) topologisch sehr ähnliche FAD-Bindedomänen. In diesem Aspekt bestätigen Flavoenzyme die Beobachtung von Martin *et al.* (1998), dass es nur eine kleine Beziehung zwischen Faltungstopologie und Funktion gibt.

Viele Flavoproteine bilden eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen N3 des Kofaktors und einem Protonenakzeptor des Proteins. Eine Ausnahme ist die Flavocytochrom-c-Sulfid-Dehydrogenase (Chen *et al.*, 1994). Da dies auch bei strukturell sehr unterschiedlichen Flavoproteinen mit unterschiedlichen Funktionen der Fall ist, könnte dies eine wichtige Eigenschaft bei der Flavinbindung und Katalyse sein (Tanner *et al.*, 1996).

2.5. Homooligomere flavin-enthaltende Cystein-Decarboxylasen

Aufgrund der Sequenzhomologien und der katalysierten Reaktion können die Flavoproteine EpiD aus *Staphylococcus epidermidis* Tü3298, MrsD aus *Bacillus sp.* HIL-Y85/54728 (Altena *et al.*, 2000), MutD aus *Streptococcus mutans* (Qi *et al.*, 1999), Dfp, AtHAL3A und B aus *Arabidopsis thaliana* sowie Sis2/HAL3 aus *Saccharomyces cerevisiae* (katalysierte Reaktion noch unbekannt) in eine neue Proteinfamilie eingeordnet werden, die homooligomeren flavin-enthaltenden Cystein-Decarboxylasen (HFC) (Abb. 4). Bei Dfp zeigt nur die N-terminale Domäne eine starke Homologie, die jedoch ausreichend für die Decarboxylierungsreaktion ist (Kupke *et al.*, 2000). Es ist allerdings mit 430 AS auch das längste Protein dieser Familie und es besteht aus zwei Domänen. Bei Sis2 (562 AS) ist es die C-terminale Domäne (ca. 185 AS), die eine Homologie zu den anderen HFC-Decarboxylasen aufweist. Bis auf Sis2 konnten die molekularen Substrate der Proteine inzwischen aufgeklärt werden (siehe 2.5.1 und 2.5.2). Die Proteine sind zwischen 181 und 209 Aminosäuren lang (N-terminale Domäne des Dfp ca. 214 AS) und enthalten zwei charakteristische Sequenzmotive. Das sogenannte PASANT-Motiv ist das am stärksten konservierte Motiv und hat die Sequenz P-A/L-S/T-A-N/D-T/I/L. Das zweite Motiv ist weniger stark konserviert und hat die Konsensussequenz P-X-M-N-X-X-M-W. Bei zwei Mitgliedern der HFCs ist das Tryptophan gegen Tyrosin (Dfp) oder Phenylalanin (Sis2) ausgetauscht. Bei Sis2 sind zusätzlich die Aminosäuren Asparagin zu Valin und das zweite Methionin zu Threonin mutiert (Abb. 4). Ein Histidin (EpiD His67, MrsD His75, *E. coli* Dfp

His99 und AtHAL3 His90) ist bei allen Mitgliedern der HFCD-Familie streng konserviert und dessen Mutation zu Asparagin führt zu einer kompletten Inaktivierung der Enzyme (Kupke *et al.*, 2000; Kupke *et al.*, 2001b; Kupke, 2001a). Für EpiD, MrsD und Dfp konnte durch Gelfiltrationsexperimente gezeigt werden, dass sie Homododekamere bilden (Kupke *et al.*, 2000). AtHAL3 bildet, wie die Kristallstruktur und auch Gelfiltrationsexperimente zeigen, Trimere (Albert *et al.*, 2000). Das Dfp-Protein wurde in vielen Bakterien identifiziert, z. B. *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Helicobacter pylori*. Ferner werden Proteine mit einer signifikanten Sequenzähnlichkeit zu EpiD und Dfp auch von *C. elegans*, Maus, Mensch und vielen weiteren Eukaryonten exprimiert, was zeigt, dass sie ubiquitär sind.

Die Familie der HFCD kann in zwei Unterfamilien unterteilt werden, die LanD-Proteine und die Proteine der CoenzymA-Biosynthese. Diese Unterfamilien werden im Folgenden näher beschrieben. Sis2 kann noch nicht eingeordnet werden, da sein molekulares Substrat noch nicht identifiziert wurde. Es beeinflusst wie AtHAL3 (siehe 2.5.2.2) den Zellzyklus und die Salztoleranz („ion homeostasis“) der Zellen. Es wurde berichtet, Sis2 sei eine regelnde Unter-einheit der Ppz1p-Ser/Thr-Proteinphosphatase, die die Expression des ENA1-Genes reguliert, welches für eine Natrium-Extrusions-Pumpe von *Saccharomyces cerevisiae* codiert (Ferrando *et al.*, 1995; Nadal *et al.*, 1998). Die gleiche regulierende Funktion wurde jedoch zunächst auch für AtHAL3 angenommen (Albert *et al.*, 2000). Es wurde aber auch vorgeschlagen, dass Sis2 die Transkription durch eine Wechselwirkung mit Chromatin stimuliert.

2.5.1. LanD-Proteine

Diese Proteine sind das Produkt der lanD-Gene (siehe 2.3). Zu diesen gehören die in dieser Arbeit untersuchten EpiD und MrsD sowie MutD. Sie katalysieren die oxidative Decarboxylierung des C-terminalen Cysteins der Vorläuferpeptide der Lantibiotika Epidermin, Mersacidin und Mutacin III und erzeugen so die reaktive Zwischenstufe (Z)-Enthiol, die dann zu der sehr seltenen Aminosäure S-[(Z)-2-Aminovinyl]-D-Cystein weiter umgesetzt wird. Dies führt dazu, dass diese Lantibiotika am C-Terminus keine Nettoladung tragen.

2.5.1.1. EpiD

EpiD ist ein 181 Aminosäuren langes Protein und hat eine molekulare Masse von 20,8 kDa. Wie schon erwähnt, katalysiert das Flavoprotein EpiD das C-terminale Cystein von EpiA. Der Kofaktor wurde als nicht kovalent gebundenes Flavinmononukleotid (FMN) identifiziert. Das molekulare Substrat und die katalysierte Reaktion wurden mittels Massenspektrometrie auf-

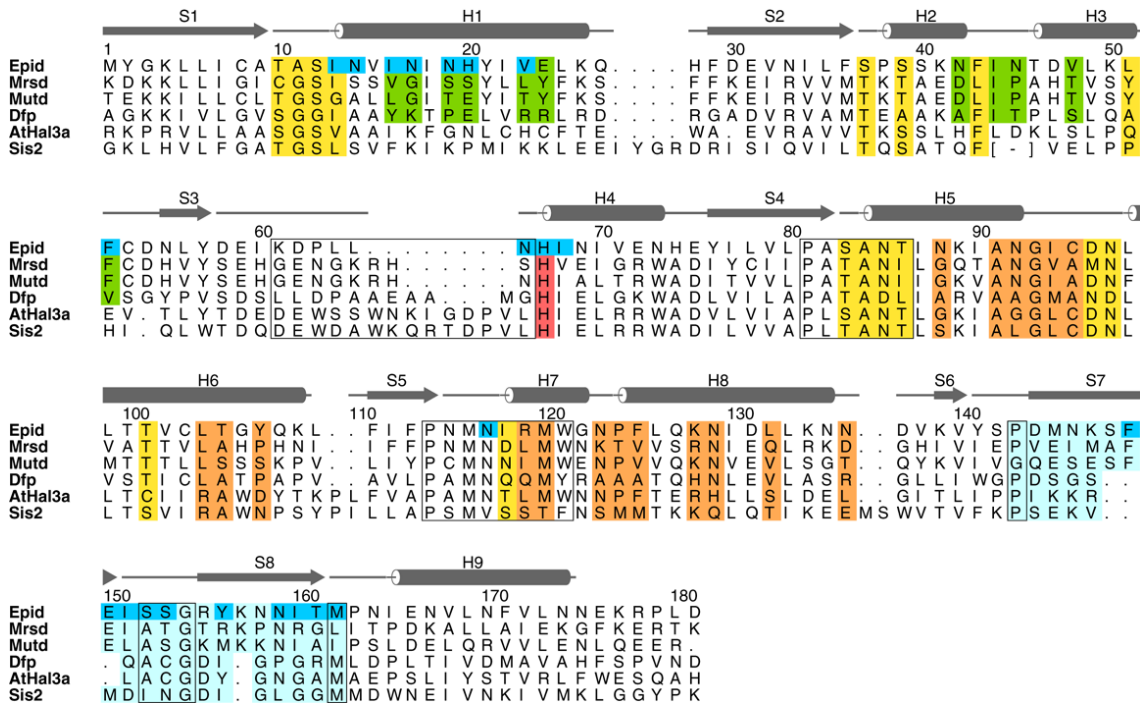


Abbildung 4: Sequenzvergleich der Mitglieder der HFCD-Familie

Vergleich der Aminosäuresequenz von EpiD mit den LanD-Proteinen MrsD und MutD, den CoA-Biosynthesenzymen *E. coli* Dfp und *Arabidopsis thaliana* AtHAL3 sowie SIS2 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Aminosäuren der Dimerkontaktflächen sind grün, die der Trimerkontaktflächen orange hinterlegt. Gelb hinterlegte Reste sind an der FMN-Bindung, dunkelblau hinterlegte direkt an der Bindung des Substrates beteiligt. Die Aminosäuren der Substratbindungsklammer (SBK) sind hellblau hinterlegt. Das PASANT- und das PXMNXXMW-Motiv sowie die konservierten Reste der SBK sind eingerahmt. Pro143 (168) und Met162 (183) haben bei EpiD und AtHAL3 konservierte Positionen und zeigen, dass die Substratbindungsklammer bei AtHAL3 um vier Aminosäuren kürzer ist als bei EpiD. Das Alignment mit AtHAL3 ist strukturbasiert (Albert *et al.*, 2000). Die größten Unterschiede werden in Helix H3 sowie zwischen β -Strang S3 und Helix H4 (eingerahmte Region) sichtbar. Die Aminosäuren dieser Region ersetzen den Dimerkontakt bei AtHAL3 und sind wahrscheinlich an der Substratbindung beteiligt (vgl. 5.5). Das streng konservierte Histidin im aktiven Zentrum ist rot markiert.

geklärt (Kupke *et al.*, 1994; Kupke und Götz, 1997b) und die Struktur des Reaktionsprodukts von EpiD mittels NMR-Spektroskopie bestätigt (Kempter *et al.*, 1996). EpiD ist essentiell für die Biosynthese von Epidermin, da eine natürliche Mutation im epiD-Gen von *Staphylococcus epidermidis* Tü3298/EMS11 dazu führt, dass dieser Stamm kein Epidermin synthetisieren kann. Die Punktmutation in diesem Stamm führt zu einem Austausch von Gly93 zu Asp und damit einer Störung der FMN-Bindung (Kupke *et al.*, 1992).

Die Substratspezifität von EpiD wurde durch massenspektrometrische Analysen der Reaktionsprodukte von einzelnen Peptiden und Peptidbibliotheken, die Variationen der C-terminalen Sequenz von EpiA (SFNSYCC) enthielten, untersucht (Kupke *et al.*, 1994; Kupke *et al.*, 1995). Die Substraterkennung von EpiD erfordert Peptide mit mindestens vier bis fünf Aminosäuren der C-terminalen Konsensussequenz V/I/L/(M)/F/Y/W-A/S/V/T/C/(I/L)-C (natürliche Aminosäuren fett gedruckt). Das Tyrosin kann durch große hydrophobe Aminosäuren und das vorletzte Cystein durch Reste mit vergleichbarer Größe ersetzt werden. Die Reste in Klammern führen zu reduzierten Reaktionsraten. Das C-terminale Cystein ist nicht austauschbar, weder durch Serin oder Homocystein noch durch Cysteinamid (Cys-NH₂) oder ein S-Ethyl-Cystein (-C(SET)). Dies zeigt, dass sowohl die freie Carboxyl- als auch die freie Thiolgruppe für die Reaktion notwendig sind.

2.5.1.2. MrsD

MrsD enthält 194 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 21,7 kDa. Es zeigt eine hohe Sequenzhomologie zu MutD (31,4 % Identität) und EpiD (25,9 % Identität) (Altena *et al.*, 2000), bindet jedoch im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern der HFCD-Familie FAD und nicht FMN. Bisher liegen noch keine Daten zur Substratspezifität vor.

2.5.2. Proteine der CoenzymA-Biosynthese

Die Enzyme Dfp und AtHAL3 bilden die zweite Unterfamilie der HFCD, die PPC-Decarboxylasen, und decarboxylieren (*R*)-4'-Phospho-N-Pantothenoylecystein (PPC) zu 4'-Phosphopantethein (PP), eine Reaktion der CoenzymA-Biosynthese (Kupke *et al.*, 2000; Kupke *et al.*, 2001b). Die Biosynthese des CoenzymA (CoA) ist ein mehrstufiger Prozess. Der erste Schritt ist eine Decarboxylierung von L-Aspartat zu β -Alanin durch das Produkt des panD-Genes, eine Aspartat-1-Decarboxylase. Danach erfolgt eine Verknüpfung mit Pantoat zu Pantothanat, welches in Bakterien in einem zweistufigen Prozess in PPC umgewandelt wird, welches dann in Bakterien von Dfp bzw. in Pflanzen von HAL3 decarboxyliert wird. Das Produkt dieser Decarboxylierung, 4'-Phosphopantethein, die im Gegensatz zu den LanD-

Proteinen redox-neutral verläuft, ist der direkte Vorläufer von CoA und die prosthetische Gruppe des Acyl-Carrier-Proteins. Es wird in zwei Stufen durch die Enzyme Phosphopantethein-Adenylyltransferase und Dephospho-CoA-Kinase in CoA umgewandelt. CoA wird für viele Synthese- und Abbaureaktionen im Stoffwechsel benötigt und ist der grundlegende Acylgruppenüberträger in allen lebenden Zellen (Abiko, 1975).

Vergleiche der Sequenzen der bakteriellen CoaC-Domänen (N-terminale Domäne von Dfp, siehe unten) mit dem eukaryontischen AtHAL3 und EpiD ergaben, neben den schon erwähnten Motiven noch ein weiteres Sequenzmotiv (G-G/S-I-A-X-Y-K), das charakteristisch für die PPC-Decarboxylasen ist (Kupke, 2001a).

2.5.2.1. Dfp

Das Dfp-Protein wurde zuerst bei einer temperaturempfindlichen *E. coli*-Mutante (dfp-707) identifiziert, und es wurde angenommen, dass es am DNA- und Pantothenat-Stoffwechsel beteiligt ist (dfp ist ein Mnemonic für DNA und Flavoprotein)(Spitzer und Weiss, 1985; Spitzer *et al.*, 1988). Diese Mutante zeigt bei 42 °C eine langsame Einstellung der DNA-Synthese und benötigt entweder Pantothenat oder β -Alanin für das Wachstum in Minimalmedium bei 30 °C. Spitzer *et al.* konnten jedoch nicht herausfinden, welche Schritte des Pantothenat-, DNA-Stoffwechsels oder der CoA-Biosynthese durch diese Mutation im dfp-Gen beeinflusst werden. Auch die Zerstörung des dfp-Genes in *Streptococcus mutans* führt zu einer Säuresensibilität und erhöhter Nährstoffanforderung (Gutierrez *et al.*, 1996).

Dfp katalysiert nicht nur die Decarboxylierung von (*R*)-4'-Phospho-N-Pantothenoylcystein (PPC) zu 4'-Phosphopantethein (PP), sondern, wie kürzlich gezeigt wurde, auch die Synthese von PPC aus 4'-Phosphopantothenat und L-Cystein (Strauss *et al.*, 2001). Damit wurden alle Enzyme der CoA-Biosynthese in *E. coli* identifiziert und das dfp-Gen von Strauss *et al.* in *coaBC* umbenannt.

2.5.2.2. AtHAL3

HAL3 kommt in *Arabidopsis thaliana* in zwei Unterformen vor (AtHAL3a: 209 AS und AtHAL3b: 201 AS) und wurde von Espinosa-Ruiz *et al.* (1999) cloniert und isoliert. Es enthält wie EpiD und Dfp ein nicht kovalent gebundenes FMN. Eine Überexpression von HAL3 in transgenen Arabidopsis-Pflanzen führt zu einer verbesserten Wachstumsrate sowie erhöhter Salz- und Dürretoleranz und zum gleichen Phänotyp, wie er schon für das Hefe-HAL3 bekannt war. Espinosa-Ruiz *et al.* konnten außerdem zeigen, dass eine Überexpression von AtHAL3 in einer Hefemutante ohne ScHAL3 den normalen Phänotyp von *Saccharomyces cerevisiae*

teilweise wieder herstellt und deren Sensitivität gegenüber Lithiumchlorid reduziert.

Kupke *et al.* (2001) konnten erst kürzlich das molekulare Substrat von AtHAL3 identifizieren. Es ist das Gleiche wie bei Dfp, PPC und es wird wie auch von Dfp nur decarboxyliert, jedoch nicht oxidiert.

Wenn nun auch das molekulare Substrat von AtHAL3 identifiziert ist, so ist jedoch noch nicht bekannt wie die Überexpression dieses Enzyms die Salztoleranz und den Zellzyklus beeinflusst. Die Antwort auf Salz- und Dürrestress durch die Umwelt beinhaltet jedoch Myriaden von zellulären und physiologischen Anpassungen, die von Signalkaskaden, durch die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP Kinase) aktiviert, über Ca^{2+} vermittelten Natrium-Transport und Kompartimentierung durch kinase-aktivierte Plasmamembraneintrittskanäle bis zur Na^+/K^+ -Extrusionpumpe reichen (Blumwald, 2000; Ichimura *et al.*, 2000; Zhu, 2000).

Die Kristallstruktur von AtHAL3 wurde von Albert *et al.* (2000) gelöst. Eine Beschreibung der Struktur und ein Vergleich mit den in dieser Arbeit gelösten Strukturen erfolgt im Kapitel Diskussion (5.5).

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Stämme

- *E. coli* M15 pREP4 pQE12-EpiD
- *E. coli* M15 pREP4 pQE12-EpiD-H67N
- *E. coli* M15 pREP4 pQE12-MrsD
- *E. coli* M15 pREP4 pQE12-MrsD-H75N

Diese Stämme wurden im Rahmen einer Zusammenarbeit von Thomas Kupke, Uni Tübingen zur Verfügung gestellt und dienten zu Expression und anschließender Reinigung der untersuchten Proteine.

- *E. coli* BL21(DE3) pET-28a(+)-His-AtHAL3-H90N

Dieser Stamm wurde von Francisco A. Culiáñez-Macià zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Chemikalien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Biomol, Difco, Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen und waren mindestens vom Reinheitsgrad *zur Analyse (p. a.)*. Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben von den Firmen Amicon, Eppendorf, Millipore, Qiagen, Stratagene und BioRad bezogen.

Benutzte Geräte und Materialien: FPLC LCC-500 (Pharmacia), Superose12 für FPLC (Pharmacia), Kolbenhubpipetten (Eppendorf), UV-VIS-Spektrophotometer Lambda 17 (Perkin Elmer), Ultrazentrifuge L7-55 mit Rotor Ti-45 (Beckman), Tischzentrifugen, Zentrifuge Avanti mit Rotor JA20 (Beckman), Zentrifugen J2-21 und J2-21M mit Rotoren JA10 und JA20 sowie J-6M/E mit Rotor JS4.2 (Beckman), Amicon-Rührzelleneinheit (Amicon), Ultrafiltrationsmembranen YM30 (Amicon), Centriprep 30 Mikrokonzentratoren (Amicon), Centricon 30 Mikrokonzentratoren (Amicon), Ultrafree 30 Mikrokonzentratoren (Millipore), Partikelfilter Millex HA 22 μm (Millipore), Image Plate-System (MarResearch), Röntgengenerator RTP300 (Rigaku)

3.2. Arbeiten mit Bakterien

3.2.1. Flüssigkulturen

Steriles LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) wurde nach Zugabe der benötigten Antibiotika, mit Bakterien von einer Glycerin-Stammkultur (siehe 3.2.2) oder einer anderen Flüssigkultur angeimpft und anschließend bei 37 °C im Schüttler inkubiert.

LB-Medium: 10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g Natriumchlorid
ad. 1000 ml dest. Wasser

Antibiotika wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen unter 55 °C in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin: 100 µg/ml
Kanamycin: 25 µg/ml

3.2.2. Lagerung

Die langfristige Aufbewahrung von Bakterien erfolgte in Glycerinkulturen bei -80 °C. Dazu wurden die Bakterien einer 50 ml Kultur sedimentiert (5000 g, 4 °C, 15 min). Das Sediment wurde in 0,5 ml sterilem LB-Medium resuspendiert und 0,5 ml steriles Glycerin zugegeben und diese Suspension dann bei -80 °C gelagert. Die Entnahme erfolgte mit einer Impföse, so dass kein Auftauen der Kultur nötig war.

3.3. Arbeiten mit Proteinen

3.3.1. Charakterisierung von Proteinen

3.3.1.1. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Proteine wurden vor der Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt, um eine höhere Konzentration zu erreichen oder um Kalium-Ionen zu entfernen, da diese mit Dodecylsulfat einen Niederschlag bilden, der die Gelelektrophorese stört. Eine Probe der Proteinlösung wurde mit 12 % (w/v) TCA versetzt, die Proteine 10 min bei 4 °C gefällt und anschließend sedimentiert (17000 g, RT, 5 min). Das Sediment wurde danach in 10-15 µl

Proteinprobenpuffer (siehe 3.3.1.2) resuspendiert. Wenn die Farbe des Bromphenolblau von blau nach gelb umschlug, wurde die Lösung mit 2 M TrisHCl pH 8,8 in 1 μ l Schritten neutralisiert. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde die Probe 5 min bei 95 °C inkubiert.

3.3.1.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dient dazu, Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Dabei werden die Proteine durch Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecylsulfat, SDS) denaturiert. Dabei lagert sich pro etwa zwei Aminosäuren ein Molekül SDS an das Protein an und sorgt so für eine zur Länge des Proteins proportionale Ladung. Die Proteine werden danach in einem elektrischen Feld gegen den Widerstand des Gels nach ihrer Länge und damit auch Molekulargewicht aufgetrennt. Die kleinen Proteine wandern dabei schneller als die großen.

In dieser Arbeit wurde die Variante nach Laemmli (1970) verwendet. Je 10 ml Gellösung werden kurz vor dem Gießen der Gele 20 μ l TEMED und 10 μ l einer Ammoniumperoxodisulfatlösung (10 % (w/v) APS in H₂O) zugegeben.

Die Proteinproben wurden 1:1 mit Proteinprobenpuffer gemischt, 5 min bei 95 °C inkubiert, um alle Proteine restlos zu denaturieren, und danach auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA und max. 250 V durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese (wenn die Bande des Farbstoffes das Gel gerade verlässt) wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blue (siehe 3.3.1.3) gefärbt.

Trenngel:	16 %	Acrylamid/Bisacrylamid (30:1)
	380 mM	TrisHCl pH 8,8
	0,1 %	SDS
		ddH ₂ O
Sammelgel:	5 %	Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)
	125 mM	TrisHCl pH 6,8
	0,1 %	SDS
		ddH ₂ O
Probenauftragspuffer (2x):	100 mM	TrisHCl pH 6,8
	200 mM	DTT
	4 % (w/v)	SDS
	20 % (w/v)	Glycerin

	0,04 % (w/v)	Bromphenolblau ddH ₂ O
Laufpuffer:	25 mM	Tris
	250 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS ddH ₂ O

3.3.1.3. Färben von Proteingelen

Zum Anfärben der Proteingele wurde die gegenüber einer Silberfärbung deutlich schnellere und einfachere Färbung mit Coomassie Brilliant Blue verwendet. Diese Färbemethode war für diese Arbeit ausreichend empfindlich und wurde zur qualitativen Identifizierung von Proteinen eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in der Färbelösung in der Mikrowelle kurz auf ca. 60 °C erhitzt und danach 20 min auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde das Gel in der Färbelösung bis zu einer vollständigen Entfärbung des Hintergrundes auf einem Schüttler inkubiert. Gegebenenfalls wurde die Färbelösung 1-2 mal erneuert.

Färbelösung:	0,25 %	Coomassie Brilliant Blue R-250
	25 %	Ethanol
	8 %	Eisessig dH ₂ O
Entfärber:	25 %	Ethanol
	8 %	Eisessig dH ₂ O

3.3.1.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteine wurde über die Extinktion bestimmt. Mit dem UV-VIS-Spektrometer von Perkin Elmer, Lambda 17, wurde die Extinktion bei 464 nm, dem Absorptionsmaximum von FMN bzw. FAD, gemessen und mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration berechnet. Mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon=11700 \frac{1}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$ und dem jeweiligen Molekulargewicht erhält man folgende Umrechnungsfaktoren:

EpiD: 1 OD = 1,94 mg/ml

MrsD: 1 OD = 1,85 mg/ml

Dies gilt allerdings nur, wenn die Kofaktorbindungsstellen vollständig besetzt sind. Wenn einzelne Stellen unbesetzt sind, ist der gemessene Wert niedriger als es der Proteinkonzentration entspricht. Die sonst übliche Methode, die Proteinkonzentration mit Hilfe der Absorption bei 280 nm zu bestimmen, ist in diesem Fall jedoch nicht genauer, da sowohl FMN als auch noch viel stärker FAD auch bei dieser Wellenlänge absorbieren. Die anderen Methoden nach Lowry oder Bradford ergaben ebenfalls keine genaueren Werte, da entweder die Kofaktoren mit dem entsprechenden Reagenz reagieren oder durch eine ungünstige Aminosäureverteilung zu einer stärkeren Reaktion mit den Reagenzien führt als bei den Eichproteinen. Für die Kristallisation kann die Konzentration jedoch durch eine Verdünnungsreihe leicht optimiert werden, so dass die ungenaue Bestimmung durch wenige zusätzliche Versuche ausgeglichen werden konnte.

3.3.2. Reinigung von Proteinen

Alle untersuchten Proteine wurden in *E. coli* überexprimiert. Dazu wurden von einer Glycerinkultur 100 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C, 180 rpm geschüttelt. Von dieser Kultur wurden dann sechs mal 800 ml LB-Medium mit je 10 ml angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nachdem die optische Dichte bei 600 nm einen Wert zwischen 0,6 und 0,8 erreichte, wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) induziert. Danach wurden die Bakterien 5h bei 37 °C, 180 rpm inkubiert und anschließend bei 5000 g, 4 °C, 30 min sedimentiert. Das Sediment wurde in 100 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und diese Suspension bei -20 °C bis zur Reinigung gelagert.

3.3.2.1. Reinigung von EpiD

Als Aufschlusspuffer wurde Puffer A (20 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) verwendet und der Zellsuspension 1 mg/ml DNase I zugesetzt. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen. Das Zellysate wurde in der Ultrazentrifuge bei 38000 rpm, 4 °C, 45 min zentrifugiert. Der klare gelbe Überstand wurde dekantiert und auf eine mit 150 mM NaCl in Puffer A äquilibrierte Q-Sepharose-Säule (100 ml Q-Sepharose fast flow) bei 4 °C aufgetragen. Nach dem Waschen bis zum Erreichen der Anfangsextinktion mit 150 mM NaCl in Puffer A, wurden die auf der Säule gebundenen Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten (150-450 mM NaCl in Puffer A, Gradientenvolumen: 1 l) eluiert. Es wurden 10 ml-Fractionen gesammelt, die anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert wurden. Fractionen, die EpiD enthielten, wurden vereinigt, KCl bis zu einer Konzentration von 2 mol/l zugegeben

und diese Lösung dann auf eine mit 2 M KCl in Puffer A äquilibrierte Phenylsepharose-Säule (60 ml Phenylsepharose, fast flow, low sub) aufgetragen. Für diese Säule musste frisches Säulenmaterial verwendet werden. Nach dem Waschen mit 2 M KCl in Puffer A wurden die auf der Säule gebundenen Proteine mit einem KCl-Gradienten (2-0 M in Puffer A) eluiert. Die Fraktionsgröße und das weitere Vorgehen war analog zu oben. Die vereinigten Fraktionen wurden gegen Puffer B (20 mM TrisHCl, pH 8,0) dialysiert. Danach erfolgte ein dritter Chromatographieschritt über Q-Sepharose, bei dem im Vergleich zum ersten Puffer A durch Puffer B ersetzt wurde. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug bei allen Chromatographieschritten 2 ml/min. Die vereinigten Fraktionen des letzten Chromatographieschrittes wurden gegen Puffer B dialysiert, dann zuerst in der Rührzelle und danach mit Centriprep- und Centricon-Mikrokonzentratoren bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml konzentriert.

3.3.2.2. Reinigung von MrsD

Der Aufschluss wurde analog zu 3.3.2.1 durchgeführt. Der Rohextrakt wurde dann auf eine mit 20 mM NaCl in Puffer B äquilibrierte Q-Sepharose-Säule aufgetragen, mit dem gleichen Puffer gewaschen und dann mit 60 mM NaCl in Puffer B eluiert. Das Eluat wurde nach Zusatz von 20 mM K_2HPO_4 auf eine mit 20 mM K_2HPO_4 in Puffer C (20 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 8,0) äquilibrierte Hydroxylapatit-Säule (50 ml, BioRad) aufgetragen. Nach dem Waschen mit dem gleichen Puffer, wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Phosphat-Gradienten (20-500 mM K_2HPO_4 in Puffer C) eluiert. Die vereinigten Fraktionen wurden gegen Puffer C dialysiert, auf etwa 20 mg/ml konzentriert und in Aliquots zu 0,3-0,5 ml auf eine Superose12-Säule (Pharmacia, HR30/10) aufgetragen und mit Puffer C bei einer Flussrate von 0,3-0,4 ml/min eluiert. Die vereinigten Fraktionen (jeweils 0,5 ml) wurden gegen Puffer D (20 mM TrisHCl, 50 mM NaCl, pH 8,0) dialysiert und bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml konzentriert.

3.3.2.3. Reinigung von AtHAL3-H90N-His

Da dem Gen für die AtHAL3-Mutante H90N die Codons für sechs Histidine angefügt wurden, kann dieses Protein durch Adsorption an ein Säulenmaterial gereinigt werden, an das Nickel-Ionen gebunden sind. Als Aufschlusspuffer diente Puffer B. Vor dem Auftragen auf eine mit 20 mM Imidazol in Puffer E (20 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol) äquilibrierte Ni-NTA-Säule (Quiagen, 30 ml) wurden 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol und 5 mM β -Mercaptoethanol zugegeben. Nach dem Waschen mit 20 mM Imidazol in Puffer E wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Imidazol-Gradienten

(20-500 mM Imidazol in Puffer E, 500 ml) eluiert und 10 ml Fraktionen gesammelt. Die vereinigten Fraktionen wurden auf etwa 20 mg/ml konzentriert und analog zur MrsD-Reinigung über eine Superose12-Säule gereinigt. Es wurde nur Puffer D durch Puffer E ersetzt. Nach dem Vereinigen der Fraktionen wurde die Proteinlösung gegen 20 mM TrisHCl, 100 mM Imidazol und 5 mM β -Mercaptoethanol dialysiert und anschließend auf 7,5 mg/ml konzentriert.

3.4. Kristallographische Methoden

Wilhelm Conrad Röntgen entdeckte 1895 bei Kathodenstrahlversuchen eine neuartige Strahlung, die später nach ihm benannt wurde und schuf damit die Grundlagen für die Röntgenkristallographie. Röntgenstrahlen sind aufgrund ihrer Wellenlänge besonders geeignet um die atomare Struktur von Proteinen zu untersuchen, was mit Lichtmikroskopen wegen deren mangelnder Auflösung nicht möglich ist. Allerdings gibt es für diese Strahlen keine Linsen, so dass keine direkten Abbildungen möglich sind. Dies kann man jedoch durch die Methoden der Kristallographie umgehen. W. Friedrich, P. Knipping und M. v. Laue ([Friedrich et al., 1912](#)) entdeckten die Diffraktion von Röntgenstrahlen, die dann von W. L. Bragg ([Bragg, 1913](#)) zu den ersten Strukturbestimmungen an Natrium- und Kaliumchloridkristallen ausgenutzt wurde. Im Folgenden entwickelten viele Forscher die Theorie zur Interpretation der Diffraktion von Röntgenstrahlen an einem Einzelkristall. Es sei hier noch P. P. Ewald ([Ewald, 1921](#)) erwähnt, der mit dem mathematischen Modell des reziproken Gitters ein bequemes Hilfsmittel zur Konstruktion der beobachteten Reflexe lieferte.

Die ersten Röntgendiffraktionsbilder von Proteinkristallen, die schon von Hünefeld 1840 beschrieben wurden, veröffentlichten J. D. Bernal und D. Crowford ([Bernal und Crowford, 1934](#); [Crowford, 1935](#)). Dadurch wurde gezeigt, dass sich auch Makromoleküle in Kristallgittern periodisch anordnen können. Da das Montieren an der Luft die Kristalle regelmäßig durch Austrocknen zerstörte, montierten Bernal und Crowford sie in einer Glaskapillare und beließen sie in der Mutterlauge. 1960 konnten dann als erste Proteinstrukturen die Strukturen von Myoglobin ([Kendrew et al., 1960](#)) und Hämoglobin ([Perutz et al., 1960](#)) und bald darauf als erste Struktur in Deutschland die des Erythrocyruorin ([Huber et al., 1969](#)) gelöst werden.

Am Anfang gelang es nur selten die Struktur eines Proteins aufzuklären. Mittlerweile hat sich diese Methode jedoch neben der Elektronenmikroskopie (EM) und NMR-Methoden (nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz-Spektroskopie) zunehmend zu einer Standardanalyse für biologisch interessante Makromoleküle entwickelt, die viele Felder in der Medizin und Biologie und das Verständnis für Struktur und Funktionen von Proteinen revolutioniert hat. In zunehmendem Maße dient sie auch als Werkzeug zur Entwicklung pharmakologisch wichtiger und interessanter Moleküle und Strukturen und damit dem medizinischen

Fortschritt.

Für die Lösung einer Proteinstruktur sind folgende Schritte nötig:

- die Bereitstellung von reinem Protein
- das Finden einer geeigneten Kristallisationsbedingung
- die Datensammlung und -auswertung
- die Lösung des Phasenproblems
- die Interpretation der Elektronendichtekarte
- die Verfeinerung dieses Modells

Neue Methoden und empirische Erfahrungen sowie die Steigerung der Leistungsfähigkeit der Computer haben eine rasante Zunahme an gelösten Proteinstrukturen ermöglicht, wie die nahezu exponentiell wachsende Anzahl der in der „Protein Data Base“ (PDB) hinterlegten Strukturen zeigt. Außerdem hat sich auch die Größe und Komplexität der mit Hilfe der Röntgenkristallographie strukturell aufgeklärten Proteine erhöht.

Im Folgenden werden die verwendeten Methoden der Kristallisation und Strukturlösung, sowie jeweils die zugrunde liegende Theorie der Proteinkristallographie kurz dargestellt. Da dieses Gebiet sehr umfangreich ist und eine ausführliche Darstellung der Theorie der Röntgenkristallographie den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würde, sei auf die Lehrbücher verwiesen: Messerschmidt und Huber, 2000; Drenth, 1994; Giacovazzo *et al.*, 1992 und Blundell und Johnson, 1976 .

Verwendete Abkürzungen und kristallographische Begriffe sind im Anhang aufgelistet und erklärt.

3.4.1. Erzeugung von Röntgenstrahlen

Für die Aufklärung der atomaren Struktur von Proteinen benötigt man Strahlung, deren Wellenlänge im Bereich der aufzulösenden Abstände liegt (ca. 2 Å und darunter). Der entsprechende Bereich des elektromagnetischen Spektrums (1000-0,1 Å) ist die Röntgenstrahlung. Da die Wechselwirkung von Strahlung mit Materie mit abnehmender Wellenlänge abnimmt und damit die Detektion der gebeugten Röntgenstrahlen zunehmend erschwert wird, benutzt man zur Röntgenkristallographie bevorzugt Strahlung mit einer Wellenlänge von 0,6-2,0 Å.

Diese Röntgenstrahlen werden im Labor meistens mit Hilfe eines Drehanodengenerators erzeugt. Hierbei wird ausgenutzt, dass Elektronen, die auf ein Metall geschossen werden,

Elektronen von den Metallatomen herausschlagen. Die Fehlstellen werden durch Elektronen einer höheren Schale aufgefüllt. Bei diesem Übergang wird Strahlung einer diskreten Energie, die charakteristische Röntgenstrahlung, emittiert. Im Fall des häufig verwendeten Kupfer, sind dies Übergänge von der L- zur K-Schale und die Wellenlänge der emittierten Strahlung ist eine Mischung aus $K_{\alpha 1}$ (1,54051 Å) und $K_{\alpha 2}$ (1,54433 Å). Neben der charakteristischen Röntgenstrahlung entsteht noch die Bremsstrahlung durch das Abbremsen der Elektronen beim Auftreffen auf die Anode. Diese Strahlung, die einen großen Wellenlängenbereich abdeckt, wird jedoch bei der Röntgenkristallographie durch Monochromatoren herausgefiltert. Ein Nachteil dieser Methode Röntgenstrahlen zu erzeugen, ist die abhängig vom Anodenmaterial durch die Energieniveaus festgelegte Wellenlänge.

An Synchrotronen befinden sich Ladungen auf einer Kreisbahn und werden daher ständig beschleunigt. Dadurch wird Bremsstrahlung von deutlich höherer Intensität als beim Drehanodengenerator freigesetzt. Neben den für die Einhaltung der Kreisbahn nötigen Magnetfeldern können zusätzliche Magnete die Röntgenstrahlung noch verstärken. Diese Magnete, die Teil des Synchrotron sind und als Undulatoren und Wiggler bezeichnet werden, zwingen die Ladungen auf eine zusätzliche, räumlich begrenzte Zickzack-Bahn. Die von Synchrotronen emittierte Bremsstrahlung erstreckt sich über einen breiten Wellenlängenbereich, aus dem die für das Experiment gewünschte Wellenlänge mit Hilfe eines durchstimmbaren Monochromators herausgefiltert werden kann. Dies ist neben der höheren Intensität und der geringeren Strahlverbreiterung der entscheidende Vorteil, der Experimente ermöglicht, bei denen die Wellenlänge der Röntgenstrahlung frei wählbar sein muss (siehe auch 3.4.6.2).

3.4.2. Kristallisation

Eine essentielle Voraussetzung für die Strukturbestimmung eines Proteins durch Röntgenkristallographie ist die Existenz von Einkristallen des gewünschten Proteins. Die Kristallbildung von Proteinen ist allerdings noch nicht vollständig verstanden. Jedoch geht man in Analogie zur Kristallbildung bei Kleinmolekülen davon aus, dass die Proteinlösung für die Keimbildung deutlich in den Bereich der Übersättigung gebracht werden muss. Geschieht dies zu schnell oder wird das System bei diesem Vorgang gestört (z.B. durch Vibration oder Temperaturschwankungen) erhält man häufig nur Präzipitat oder Mikrokristalle. Das weitere Wachstum der Kristalle erfolgt dann in einem Bereich geringerer Übersättigung (Abb. 5). Die praktische Umsetzung dieses weithin anerkannten grundsätzlichen Prinzips der Kristallisation hängt von vielen Parametern ab und stellt somit eine Suche in einer mehrdimensionalen Matrix voneinander abhängiger Parameter dar. Die Löslichkeit der Proteine wird beeinflusst von:

- der Art und Konzentration des/der Fällungsmittel(s). Dies sind zum Beispiel Ethanol,

Isopropanol, 2,5-Methylpentan-diol (MPD), Polyethylenglycole (PEG) verschiedener Kettenlänge oder verschiedene Salze, die die Löslichkeit des Proteins erniedrigen.

- der verwendeten Puffersubstanz
- dem pH-Wert, der durch einen geeigneten Puffer eingestellt wird und durch die unterschiedlichen Protonierungs- und damit Ladungszustände von Aminosäuren an der Oberfläche des Proteins die Löslichkeit aller Proteine beeinflusst. An seinem isoelektrischen Punkt (pI) besitzt ein Protein seine niedrigste Oberflächen-Nettoladung und damit auch seine niedrigste Löslichkeit.
- der Temperatur, die einen entscheidenden Einfluss auf die Kristallisation hat, da sie einerseits den Dampfdruck im geschlossenen System und damit den Konzentrationsausgleich bestimmt, andererseits aber auch die Löslichkeit des Proteins beeinflusst.
- der Art und Konzentration von optionalen Additiven, wie zum Beispiel Detergenzien, die zwar die Löslichkeit erhöhen, aber auf der anderen Seite durch Wechselwirkung mit hydrophoben Bereichen ein unspezifisches Zusammenlagern verhindern und somit ein geordnetes Kristallwachstum ermöglichen. Auch Salze dienen als Additive, die über die Ionenstärke der Lösung die Löslichkeit erhöhen oder erniedrigen. Bifunktionale Reagenzien bilden häufig Brücken zwischen Proteinmolekülen („cross linker“) und erhöhen so die Kristallpackungskräfte. Als weitere Additive kann man Kofaktoren und Nukleotide ausprobieren.

Zusätzliche Parameter sind die Konzentration der zur Kristallisation verwendeten Proteinlösung sowie das Tropfenvolumen und das Verhältnis von Proteinlösung zu Präzipitanzlösung. Meistens wird für diese Suche ein statistischer Ansatz mit faktoriellen Kristallisationsbedingungen nach dem Prinzip des „sparse matrix screens“ (Carter und Carter, 1979; Jancarik und Kim, 1991) gewählt.

Es gibt mehrere Methoden für die Durchführung von Kristallisationsexperimenten, z. B. das sogenannte „Batch“-Verfahren, die Flüssigkeit-Flüssigkeit-Diffusions-, die Dampfdiffusions- und die Dialyse-Methode. Das „Batch“-Verfahren ist die älteste und einfachste Methode, bei der das Fällungsmittel direkt zur Proteinlösung gegeben und die Lösung auf diese Weise plötzlich in einen Zustand der Übersättigung gebracht wird. Mit etwas Glück wachsen daraus Kristalle, ohne dass eine weitere Manipulation nötig ist. Bei der Flüssigkeit-Flüssigkeit-Diffusion werden Proteinlösung und Präzipitanzlösung in einer Kapillare übereinander geschichtet, die Lösung mit der höheren Dichte nach unten. Durch langsame Diffusion findet ein Konzentrationsausgleich statt und der Zustand der Übersättigung wird erreicht. Die am

häufigsten verwendete Methode ist die Dampfdiffusionsmethode. Dabei nutzt man die Tatsache aus, dass sich in einem geschlossenen System die Konzentrationen zweier getrennter Lösungen langsam durch Diffusion des Lösungsmittels ausgleichen. Im Falle von Kristallisationsexperimenten wird eine bestimmte Menge Proteinlösung mit einer gewissen Menge Präzipitantlösung gemischt und in einem geschlossenen Gefäß über einem größeren Volumen der Präzipitantlösung („Reservoir“) äquilibriert. Die Konzentration sowohl des Proteins als auch des Fällungsmittels und der anderen Komponenten erhöht sich dabei gleichmäßig durch die Diffusion von Lösungsmittel (meistens Wasser) vom Tropfen zum „Reservoir“. Der Tropfen kann entweder in einer Vertiefung erhöht über dem Reservoir sitzen („sitting drop“) oder hängend über der Lösung platziert werden („hanging drop“). Bei der Dialyse-Methode wird die Proteinlösung gegen eine Lösung des Fällungsmittels dialysiert und somit der Konzentrationsausgleich hergestellt. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Lösung, gegen die dialysiert wird, einfach ausgetauscht werden kann. Es gibt inzwischen einige Varianten, bei denen auch kleine Mengen Proteinlösung (einige Mikroliter) eingesetzt werden können.

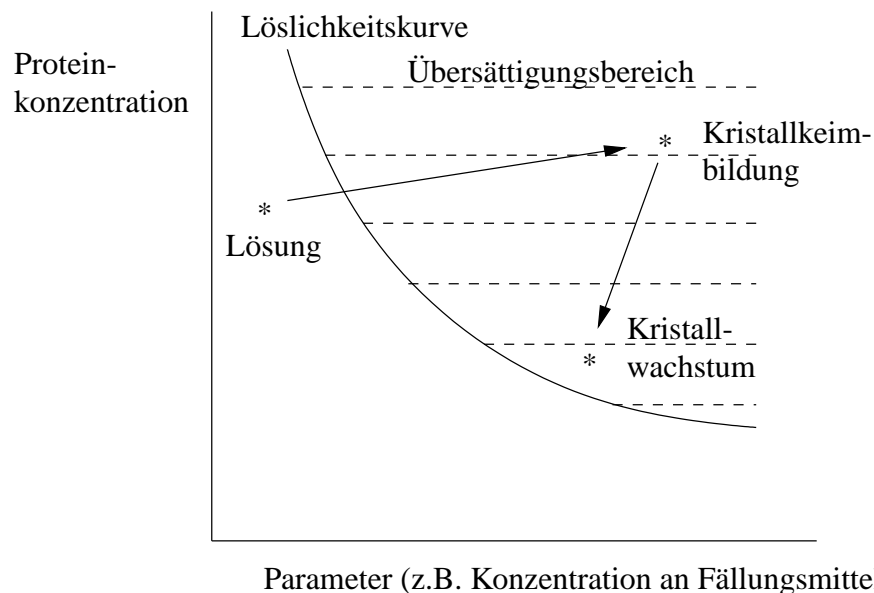


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Löslichkeitskurve eines Proteins

Der Sättigungspunkt des Proteins ist in Abhängigkeit von Proteinkonzentration und Fällungsparameter (z.B. Konzentration des Fällungsmittels) aufgetragen. Bevor sich Kristallkeime bilden, muss das System aus dem Bereich der Lösung langsam aber deutlich in den Bereich der Übersättigung gebracht werden. Das Wachstum der Kristalle erfolgt dann bei geringerer Übersättigung.

Zur Kristallisation wurde die Methode der Dampfdiffusion im sitzenden Tropfen angewandt. Die Kristallisationsexperimente wurden in CrysChem-Platten (Hampton Research,

Laguna Niguel, DA, USA) bei 18 °C durchgeführt. Alle Kristallisationslösungen wurden durch Ultrafiltration von Schwebstoffen befreit. Das Reservoirvolumen betrug bei „Screens“ 300 μl und bei den anderen Ansätzen 500 μl . In die Vertiefung der Säule wurden 2 bzw. 5 μl Proteinlösung und 2 μl Fällungslösung pipettiert, gemischt und danach die Vertiefungen der Platten mit CrystalClear-Klebestreifen verschlossen (Abb. 6).

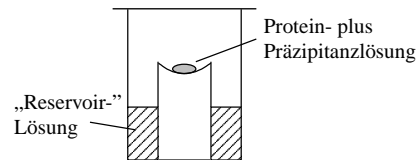


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Vertiefung einer CrysChem-Platte

3.4.3. Aufbau von Kristallen

Kristalle haben meistens glatte Oberflächen und zeigen Anisotropie, d.h. einige ihrer physikalischen Eigenschaften sind von der Richtung der Messung innerhalb des Kristalls abhängig. Einkristalle zeichnen sich durch eine regelmäßige dreidimensionale Anordnung identischer Bausteine aus. Diese Elementar- oder Einheitszellen bauen den Kristall nur durch translatorische Verschiebung um ganzzahlige Vielfache der Einheitsvektoren a, b, c auf. Durch dieses mathematische Modell wird ein Kristall so in identische Einheiten aufgeteilt, 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, die drei Kantenlängen a, b und c sowie die drei von ihnen aufgespannten Winkel α, β und γ . Enthält ein Kristall andere Symmetrieelemente als die Translation (z.B. Rotations- und Schraubenachsen, Spiegelebenen oder Inversionszentren), so setzt sich die Einheitszelle ihrerseits aus mehreren asymmetrischen Einheiten zusammen, die durch Symmetrieoperationen innerhalb der Elementarzelle aufeinander abgebildet werden können. Alle möglichen Kombinationen dieser Symmetrieelemente ergeben 32 mögliche Punktgruppen und durch zusätzliche Translationen innerhalb der Elementarzelle ergeben sich 230 Raumgruppen, die sich in sieben Kristallsysteme (Bravais-Gitter) einordnen lassen (triklin, monoklin, orthorhombisch, tetragonal, trigonal, hexagonal, kubisch). Da in Proteinen fast ausschließlich L-Aminosäuren vorkommen, treten in Proteinkristallen keine Spiegelebenen oder Inversionszentren auf und die Zahl der möglichen Raumgruppen reduziert sich dadurch auf 65. Sind mehrere gleiche Proteinmoleküle in einer asymmetrischen Einheit vorhanden, so spricht man von nicht-kristallographischer Symmetrie („non crystallographic symmetry“, NCS), da diese Moleküle nicht durch die Sym-

metrieoperatoren der Raumgruppe, sondern durch lokale Symmetrieoperatoren aufeinander abgebildet werden.

In der Realität bestehen Proteinkristalle allerdings nicht aus einem einheitlichen, idealen Gitter, sondern aus einer Vielzahl kleiner Blöcke mit idealer Ordnung, die im Kristall zueinander geringfügig verschoben oder verkippt sind. Diese "Verkipfung" wird als Mosaikbreite bezeichnet und beträgt bei realen Kristallen zwischen einem zehntel und mehreren Grad.

Im Unterschied zu Salz- oder Kleinmolekülkristallen enthalten Proteinkristalle einen relativ hohen Anteil an ungeordnetem Lösungsmittel (ca. 30-70 %). Dies bedeutet, dass die Proteinmoleküle locker gepackt und die Kristallpackungskräfte deutlich schwächer sind. Dies führt zu einer deutlich geringeren Stabilität der Kristalle gegen Strahlenschäden, mechanischen Beanspruchungen und Verlust von Lösungsmittel. Andererseits sind dadurch aber auch chemische Reaktionen im Kristall möglich. So können biologisch relevante Reaktionen im Kristall durchgeführt oder Schweratomderivate durch Inkubieren der Kristalle mit geeigneten Schwermetallverbindungen hergestellt werden.

3.4.4. Beugung von Röntgenstrahlen an Einkristallen

Die bei einem Röntgenbeugungsexperiment auf einen Kristall treffenden Röntgenstrahlen regen die Elektronen der im Gitter angeordneten Atome zu Schwingungen mit der Frequenz der einfallenden elektromagnetischen Welle an. Die Elektronen emittieren als oszillierende Dipole Strahlung mit der gleichen Frequenz, jedoch mit einer Phasenverschiebung von 180° (elastische oder Thomson-Streuung). In ausgezeichneten Richtungen kommt es zur positiven Interferenz dieser emittierten Wellen, d.h. es entsteht eine Streustrahlung, in den anderen Richtungen jedoch summieren sie sich zu Null. Bei den leichten Atomen, wie den in Aminosäuren hauptsächlich vorkommenden Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff, stimmt die einfallende Röntgenstrahlung nicht mit diskreten energetischen Übergängen innerhalb der Atome und Moleküle überein, und man kann daher die beobachteten Streueffekte als Beugung an freien Elektronen behandeln.

Das Auftreten von Streustrahlen kann analog zur Beugung von sichtbarem Licht mit der Bragg'schen Gleichung erklärt werden:

$$2d_{hkl} \sin \theta_{hkl} = n\lambda \quad (1)$$

Positive Interferenz tritt unter dem Glanzwinkel θ_{hkl} auf, wenn der Gangunterschied des an einer Gitterebenschar hkl mit einem Abstand von d_{hkl} gebeugten Strahls ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge λ ist. Die Gitterebene mit den Millerschen Indizes hkl schneidet

die x-Achse in a/h , die y-Achse in b/k und die z-Achse in c/l . Ist einer der Indizes gleich Null, so wird die entsprechende Achse nicht geschnitten, d.h. die Ebene verläuft parallel zu dieser Achse. Die Interferenzen höherer Ordnung ($n > 1$) besitzen eine vernachlässigbare Intensität und werden daher im Folgenden nicht berücksichtigt.

Sowohl aus dieser als auch der folgenden Betrachtung der Ewald-Konstruktion wird deutlich, dass die Punkte des reziproken Gitters und dadurch das Streubild eines Kristalls nur von der Einheitszelle, jedoch nicht von deren Inhalt abhängen. Die Information über den Inhalt der Einheitszelle und somit über das Protein ist in den Intensitäten und Phasen der Reflexe enthalten.

Das von P. P. Ewald entworfene Gedankenkonzept des reziproken Gitters und die Ewald-Kugel liefern eine wesentlich einfachere Methode zur Konstruktion der gestreuten Strahlen (Abb. 7). Das reziproke und das reale Gitter sind wie folgt verknüpft: Jedem Reflex hkl wird

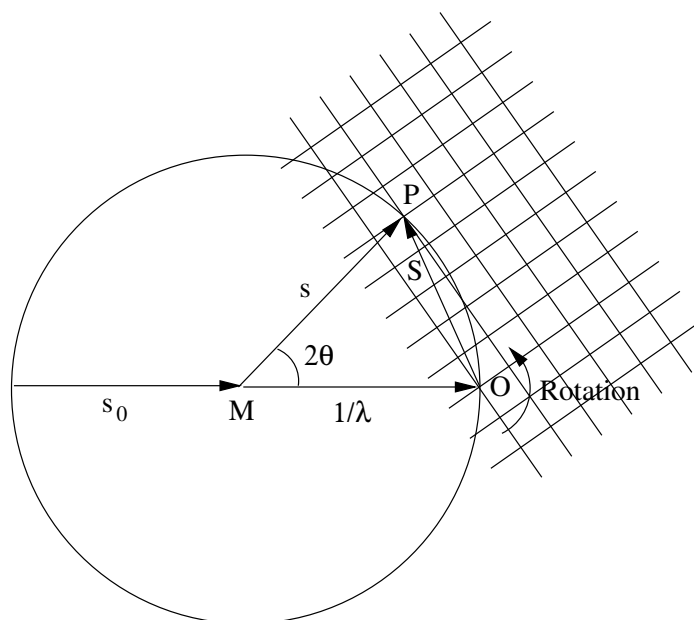


Abbildung 7: Die Ewaldkugel zur Konstruktion des gestreuten Röntgenstrahles

Der Radius der Kugel um den Mittelpunkt M beträgt $1/\lambda$ und das Zentrum des reziproken Gitters liegt auf der Kugeloberfläche bei O. Das reziproke Gitter dreht sich mit dem Kristall (dem realen Gitter) um den Punkt O. Der eintretende Strahl s_0 wird im Winkel 2θ als Strahl s gestreut.

ein Punkt im reziproken Gitter mit den Indizes hkl zugeordnet. Jeder dieser Punkte bildet den Endpunkt des Vektors \mathbf{S}^1 , der senkrecht auf der Gitterebene hkl steht und die Länge $1/d_{hkl}$ hat. Die reziproke Zelle lässt sich definieren als eine Zelle mit den Achsen a^* , b^* und c^* , die

¹Im Folgenden werden Vektoren durch Fettdruck gekennzeichnet.

jeweils senkrecht auf der Ebene steht, die von den beiden anderen realen Achsen aufgespannt wird (z.B. steht \mathbf{a}^* senkrecht auf der Ebene, die von \mathbf{b} und \mathbf{c} aufgespannt wird) und als Länge den Reziprokwert der entsprechenden realen Achse haben (z.B. $1/a$). In Vektorschreibweise lassen sich die Punkte des reziproken Gitters auch schreiben als $\mathbf{S} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*$. Es lässt sich zeigen, dass die oben beschriebene Bedingung für eine konstruktive Interferenz immer dann erfüllt ist, wenn ein Punkt des reziproken Gitters die Ewald-Kugel schneidet. Während sich das reziproke Gitter mit dem Kristall dreht, kommen die verschiedenen Punkte des reziproken Gitters in Streuposition. Der gestreute Strahl zeigt in Richtung des Vektors \mathbf{MP} . Eine Fouriertransformation verknüpft das reale Gitter, d.h. den Kristall mit dem darin enthaltenen Protein, eindeutig mit dem reziproken Gitter. Dies ist letztendlich eine Voraussetzung für die Bestimmung der räumlichen Struktur der Proteine mit Hilfe der Röntgenkristallographie. Die wichtigsten Gleichungen, die diese Verknüpfung wiedergeben, werden nun kurz dargestellt.

Ein Strukturfaktor F_{hkl} ist eine Kombination von N Wellen in der Richtung hkl , die bei einem Beugungsexperiment von den N Atomen in der Elementarzelle ausgehen. Diese Wellen haben die Amplitude f_i (atomarer Streufaktor) und die Phase α_i , die ein Ausdruck der räumlichen Anordnung des Atoms i in der Elementarzelle ist. Der Strukturfaktor F_{hkl} kann als Summe der atomaren Streufaktoren dargestellt werden:

$$F_{hkl} = A_{hkl} + B_{hkl} \quad (2)$$

mit:

$$A_{hkl} = \sum_N f_i \cos 2\pi(hx_i + ky_i + lz_i) \quad (3)$$

$$B_{hkl} = \sum_N f_i \sin 2\pi(hx_i + ky_i + lz_i) \quad (4)$$

Da die Elektronenwolke um ein Atom eine räumliche Ausdehnung besitzt, hängt der atomare Streufaktor f_i von der Auflösung ($2 \sin \theta / \lambda$) ab. Dabei nimmt mit zunehmendem Streuwinkel der Gangunterschied zwischen Elementarwellen, die an verschiedenen Elektronen eines Atoms gestreut wurden, zu. Aufgrund der im Vergleich zu den Abständen der Gitterebenen d_{hkl} deutlich kleineren inneratomaren Distanzen und des somit kleinen Gangunterschiedes beobachtet man keine vollständige Auslöschung (destruktive Interferenz), sondern nur eine Abschwächung der Intensität des gestreuten Strahles mit zunehmender Auflösung. Neben der statischen Ausdehnung der Atome muss auch die dynamische Beweglichkeit der Atome berücksichtigt werden. Dies geschieht im einfachsten Fall der isotropen Bewegung durch die

Einführung des Temperaturfaktors B :

$$f_{i,dynamisch} = f_{i,statisch} \exp\left(B_i \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}\right) \quad (5)$$

Der Temperaturfaktor B hängt von der mittleren quadratischen Auslenkung $\overline{u^2}$ des Atoms ab:

$$B = 8\pi^2 \overline{u^2} \quad (6)$$

Bei einem Beugungsexperiment kann nur die Strukturfaktoramplitude:

$$|F_{hkl}| = \sqrt{A_{hkl}^2 + B_{hkl}^2} \quad (7)$$

bestimmt werden. Die Phase α des jeweiligen Reflexes ist gegeben durch:

$$\alpha_{hkl} = \arctan \frac{B_{hkl}}{A_{hkl}} \quad (8)$$

Die Elektronendichte in der Elementarzelle am Ort (x, y, z) kann in der umgekehrten Richtung mit folgender Fouriersumme berechnet werden:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{hkl}| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{hkl}] \quad (9)$$

Die Elektronendichteverteilung ist die primäre Information, die man mit Hilfe der Methoden der Röntgenkristallographie erhält. Da die beugenden Elektronen zu den Atomen gehören, erhält man damit auch die Information über die räumliche Anordnung der Atome.

Bei den bisherigen Betrachtungen wurde vorausgesetzt, dass die Elektronen frei sind und die Phase des gestreuten Strahles exakt um 180° gegenüber dem einfallenden Strahl verschoben ist. In diesem Fall gilt das Friedelsche Gesetz: $F_{hkl} = F_{-h-k-l}$. Dies gilt nicht mehr, wenn die verwendete Röntgenstrahlung energetisch in die Nähe einer Absorptionskante eines im Kristall vorhandenen Atoms kommt und dabei Elektronen der inneren Schalen angeregt oder aus ihrer Schale herausgeschlagen werden. Dies führt zu einer Phasenverschiebung ungleich 180° . Durch diese anomale Dispersion sind dann F_{hkl} und F_{-h-k-l} nicht mehr gleich und man spricht von einer anomalen Differenz. Bei der häufig verwendeten Kupfer- $K\alpha$ -Strahlung und den Atomen der natürlichen Aminosäuren ist dieser Effekt nicht signifikant messbar.

3.4.5. Datensammlung und Datenauswertung

Früher wurden photographische Filme für die Aufnahme der Beugungsbilder von Kristallen benutzt. Da diese Art der Detektion jedoch sehr zeitaufwendig und die Schwärzung der Filme

nur in einem kleinen Bereich proportional zur eingefallenen Strahlung ist, wurden sie immer mehr durch Detektoren ersetzt, die empfindlicher sind, einen größeren dynamischen Bereich besitzen und ein direktes, digitales Bild liefern. Zu diesen Detektoren gehören die proportionalen Flächenzähler („multiwire proportional counter“), Video-Systeme, die im Moment meist verbreiteten „image plates“ und die immer mehr eingesetzten CCD-Detektoren („charge coupled devices“). Die „image plates“ haben gegenüber dem Film einige Vorteile. Sie bestehen aus einer Platte, die mit einem röntgensensitiven Material beschichtet ist. Röntgenphotonen regen Elektronen in diesem Material in einen erhöhten Zustand an. Ein Teil dieser Energie wird sofort als Fluoreszenz abgegeben, der Rest jedoch wird nur sehr langsam (innerhalb mehrerer Tage) abgegeben. Durch einen roten Laser werden orts aufgelöst die in so genannten „color centers“ gefangenen Elektronen weiter angeregt und fallen dann in den Grundzustand zurück. Bei diesem Übergang wird blaues Licht emittiert, das mit Photomultipliern detektiert wird. In einem gewissen Rahmen ist das emittierte Licht proportional zur Anzahl der Photonen, die an dieser Stelle auf die Platte aufgetroffen sind. Die Empfindlichkeit der „image plates“ ist mindestens zehnmal höher als bei Filmen und der dynamische Bereich ist viel breiter ($1 : 10^4 - 10^5$). CCD-Detektoren haben einen breiten dynamischen Bereich mit einer sehr guten Ortsauflösung, niedriges Rauschen und eine hohe maximale Zählrate. Außerdem ist die Auslesezeit mit einigen Sekunden deutlich niedriger als bei „image plates“ mit mehreren Minuten. Diese Tatsache beschleunigt vor allem bei Messungen mit Synchrotronstrahlung die Aufnahme eines Datensatzes deutlich, da hier die Auslesezeit einer „image plate“ in der gleichen Größenordnung wie die Belichtungszeit liegt. CCD-Detektoren werden daher auch hauptsächlich an den Strahlführungen („beamlines“) der Synchrotrons eingesetzt, da sich der deutlich höhere Preis bei einer Messung an einem Drehanodengenerator, an dem die Belichtungszeit deutlich höher als die Auslesezeit einer „image plate“ ist, nicht bezahlt macht.

Im Normalfall wird monochromatische Strahlung für die Aufnahme von Diffraktionsbildern eines Proteinkristalls verwendet. Der Kristall wird während der Messung pro Bild um einen bestimmten Winkel, üblicherweise zwischen $0,2^\circ$ und $2,0^\circ$ gedreht. Je nach Raumgruppe muss dabei ein Gesamtwinkel von 20° bis 180° überstrichen werden, um einen hinreichenden Bereich des reziproken Raumes zu erfassen.

3.4.5.1. Datensammlung

Bei Raumtemperatur (16°C)

Die Kristalle wurden in eine Glaskapillare überführt und die umgebende Mutterlauge entfernt. Auf beiden Seiten des Kristalls wurde die Kapillare im Abstand von etwa 1cm mit

je einem Tropfen Mutterlauge und am Ende mit Wachs verschlossen. Die Kapillare wurde mit Wachs auf dem Goniometerkopf befestigt. Die Daten von sowohl nativen als auch derivatisierten Kristallen wurden mit einer Image-Plate (MarResearch, Hamburg) mit Kupfer-K α -Strahlung (1,5418 Å) gesammelt, die mit einer Drehanode (Rigaku, Japan) erzeugt wurde. Der Abstand zwischen Detektor und Kristall variierte je nach erreichter Auflösung zwischen 200 und 350mm. Die Datensammlung erfolgte mit Winkelinkrementen zwischen 0,2 und 1,5°.

Bei 100K

Die Kristalle wurden entweder direkt aus dem Tropfen (EpiD Kristallform I und Substratkomplex) oder nach dem Überführen in einen geeigneten Frierpuffer (MrsD und AtHAL3) mit einer Nylonschleife aus ihrem Tropfen gehoben und in einem Stickstoffstrom bei 100K schockgefroren. Die Datensammlung erfolgte entweder wie oben beschrieben mit Kupfer-K α -Strahlung oder mit Synchrotronstrahlung am DESY (Deutsches Elektronensynchrotron, HASYLAB) an der Strahlführung BW6 (*Wiggler Beamline*) mit einem CCD-Detektor (MarResearch, Hamburg). Die Wellenlänge betrug 1,00 Å und der Kristall-Detektor-Abstand zwischen 80 und 150mm.

3.4.5.2. Datenauswertung

Der erste Schritt der Datenauswertung ist die Indizierung der Streubilder, d.h. die Zuordnung des Kristallgitters zu einem der Bravais-Gitter und der Indizes hkl zu den einzelnen gemessenen Reflexen. Da die Kristalle heutzutage in willkürlicher Orientierung montiert werden, ist die der Indizierung zugrunde liegende Theorie ziemlich komplex, daher sei hier wieder auf die Lehrbücher verwiesen. Ist das Bravais-Gitter identifiziert und die Orientierung sowie die Parameter der Einheitszelle bestimmt, so können die Positionen der einzelnen Reflexe vorhergesagt und deren Intensität innerhalb einer Begrenzung integriert werden. Nach der Integration erfolgt die Skalierung der einzelnen Bilder eines Datensatzes. Dabei werden die Intensitäten mit einem Skalierungsfaktor multipliziert, der so bestimmt wird, dass symmetrieverwandte Reflexe die gleiche Intensität aufweisen. Befinden sich Reflexe auf mehreren aufeinander folgenden Bildern, werden die Intensitäten der einzelnen Teile addiert und danach aus den Intensitäten I_{hkl} die Strukturfaktoramplituden F_{hkl} berechnet. Als Maß für eine korrekte Indizierung und Datenreduktion dient der R-Faktor $R_{sym,I}$. Dieser gibt an, wie gut die Intensitäten der symmetrieverwandten Reflexe übereinstimmen und wird berechnet nach:

$$R_{sym,I} = \frac{\sum_{hkl} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |I_{hkl} - I_{hkl}(j)|}{\sum_{hkl} I_{hkl}} \quad (10)$$

Alternativ kann man auch den $R_{\text{sym},F}$ verwenden, bei dem die Intensitäten I_{hkl} durch die Strukturfaktoramplituden F_{hkl} ersetzt wird. Bei falsch gewählter Raumgruppe ist der R-Faktor schon bei niedriger Auflösung sehr hoch ($>15\%$).

Nach der Wahl der Raumgruppe und der Bestimmung der Zellkonstanten kann der Matthews-Koeffizient berechnet werden (Matthews, 1968):

$$V_M = \frac{V_{\text{Zelle}}}{M_{\text{Zelle}}} = \frac{V_{\text{Zelle}}}{n * M_{\text{asym}}} \quad (11)$$

Wobei V_{Zelle} das Volumen der Einheitszelle, n die Anzahl der asymmetrischen Einheiten der Zelle (= Anzahl der Symmetrieeoperatoren der Raumgruppe) und M_{Zelle} bzw. M_{asym} das Molekulargewicht des sich in der Einheitszelle bzw. asymmetrischen Einheit befindlichen Proteins ist. Letzteres hängt davon ab, wieviele Moleküle des untersuchten Proteins sich in der Einheitszelle befinden. Der Matthews-Koeffizient liegt bei Proteinkristallen in der Regel zwischen $1,7$ und $3,5 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ und meistens um $2,15 \text{ \AA}^3/\text{Da}$. Auf diese Weise kann man abschätzen wieviele Moleküle sich in der asymmetrischen Einheit befinden und dann auch den Lösungs-mittelgehalt V_{LM} des Kristalls berechnen:

$$V_{LM} = 1 - V_{\text{Protein}} = 1 - \frac{1,23}{V_M} \quad (12)$$

Die aufgenommenen Diffraktionsbilder wurden mit MOSFLM (Leslie, 1991) indiziert und integriert. Die Datenreduktion erfolgte mit den Programmen SCALA und TRUNCATE der CCP4-Programmsammlung (CCP4, 1994).

3.4.6. Lösung des Phasenproblems

Mit Hilfe der Beugung von Röntgenstrahlen an einem nativen Proteinkristall können nur die Amplituden der Streufaktoren aus den Intensitäten der Reflexe berechnet werden, nicht aber die zugehörigen Phasenwinkel, die jedoch zur Berechnung der Elektronendichteverteilung nach Gleichung 9 im Kristall nötig sind. In der Proteinkristallographie werden die Methoden der Multiplen Anomalen Dispersion (MAD), des Singulären oder Multiplen Isomorphen Ersatzes („singular or multiple isomorphous replacement“, SIR o. MIR), des Molekularen Ersatzes („molecular replacement“, MR) und in seltenen Fällen direkte Methoden (*ab initio*) verwendet. Diese Methoden werden im Folgenden kurz dargestellt.

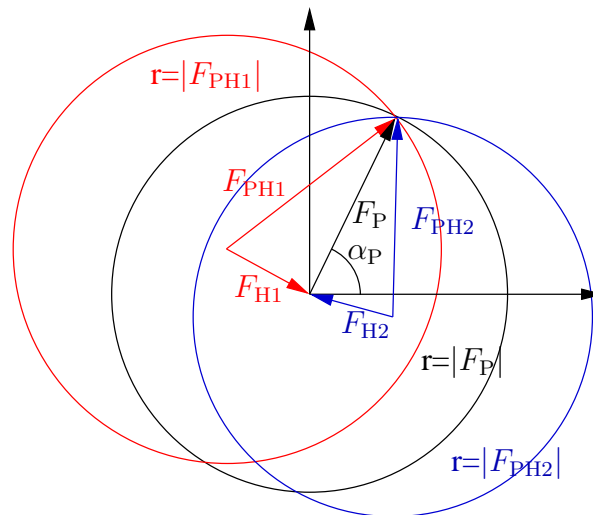


Abbildung 8: Harker-Konstruktion der Proteinphasen beim isomorphen Ersatz

Die Vektoren F_{H1} und F_{H2} sind die Darstellung der Strukturfaktoren der bekannten Schweratom-Teilmodelle der Derivate 1 und 2. Die Radien der Kreise entsprechen den Strukturfaktoramplituden des nativen Datensatzes ($|F_P|$) bzw. der Derivatdatensätze ($|F_{PH1}|$ und $|F_{PH2}|$) und ihre Mittelpunkte liegen an den Enden der Vektoren F_{H1} bzw. F_{H2} . Idealerweise entsteht nur ein Schnittpunkt aller Kreise, der das Ende des Vektors des gesuchten Protein-Strukturfaktors markiert und damit die Phase α_P bestimmt. Die bei nur einem Derivat entstehende Ambiguität (zwei Schnittpunkte) kann anstelle eines zweiten Derivates auch mit Hilfe der anomalen Streubeiträge gelöst werden.

3.4.6.1. Phasierung mittels isomorphem Ersatz

Der Isomorphe Ersatz ([Green et al., 1954](#)) bezeichnet ein Verfahren, das eine lokale Änderung in der Elektronendichteverteilung eines Kristalls, verursacht durch die Anwesenheit eines Schweratoms, ausnutzt. Diese Änderung wird durch das Einführen eines Schweratoms herbeigeführt. Jedoch darf dabei die dreidimensionale Struktur des Proteins und damit die Symmetrie des Kristalls nicht verändert werden (Isomorphie). Es gibt verschiedene Methoden, Schweratome in einen Kristall einzuführen. Kristalle können in eine Schwermetallsalzlösung eingelegt („soaking“), Aminosäuren (häufig Methionin) können durch Varianten mit einem schwereren Atom (meistens Selenomethionin) ausgetauscht oder sich bereits im Kristall befindliche Metallionen herausgelöst bzw. durch schwerere Ionen ersetzt werden. Mit Hilfe der Teilstruktur dieser Veränderungen, z.B. der Koordinaten der zusätzlichen Schweratome, und der gemessenen Strukturfaktoramplituden eines nativen $|F_P|$ und eines oder mehrerer derivatisierter Kristalle $|F_{PH}|$ können erste Phasenwinkel berechnet werden (Abb. 8).

Grundlage dieser Konstruktion ([Harker, 1956](#)) ist die vektorielle Summe der Strukturfaktoren der einzelnen Atome, die auch als Summe der Strukturfaktoren des Protein- und

Schweratomteilmodelles dargestellt werden, kann:

$$F_{gesamt,hkl} = \sum_i F_{i,hkl} = F_{P,hkl} + F_{H,hkl} \quad (13)$$

Zunächst muss die Teilstruktur der Schweratome gelöst werden, deren Strukturfaktoramplituden sich nach:

$$|F_H| = |F_{PH}| - |F_P| + \Delta \quad (14)$$

berechnen. Der Parameter Δ beinhaltet Messfehler, Fehler durch Anisomorphie und systematische Fehler, da diese Gleichung eigentlich nur bei vektorieller Betrachtung gilt. Diese Fehler tragen bei den weiteren Betrachtungen zum Rauschen bei. Das Schweratom-Teilmodell lässt sich mit Hilfe von direkten oder Pattersonmethoden (siehe auch 3.4.6.3) lösen. Für die Pattersonmethode wird eine Fouriersumation mit den Koeffizienten $(|F_{PH}| - |F_P|)^2$ und einem Phasenwinkel von null, eine sogenannte Differenz-Pattersonfunktion berechnet. Die Maxima dieser Funktion entsprechen den Vektoren zwischen den Schweratomen. Unter Beachtung der Raumgruppensymmetrie lassen sich die Koordinaten x,y,z des Teilmodells bestimmen. Durch die Zentrosymmetrie der Pattersonfunktion lassen sich die Koordinaten x,y,z und $-x,-y,-z$ nicht unterscheiden. Daher werden die Phasen und Elektronendichtekarten für beide Koordinatensätze berechnet. Die korrekten Koordinaten liefern die wahre Elektronendichtekarte und die falschen das Spiegelbild. Durch visuelle Betrachtung der Elektronendichtekarten kann man z.B. mit Hilfe der Gängigkeit der Helices eine Entscheidung fällen. Mit Hilfe der ersten Proteinphasen lässt sich eine Differenzfourier-Elektronendichtekarte als Fouriersumation mit den Koeffizienten $|F_{PH}| - |F_P|$ und den Phasenwinkeln α_P berechnen. Maxima in diesen Elektronendichtekarten treten an den Positionen der Schweratome auf. Mit Hilfe dieser Karten lassen sich zusätzliche Schweratomlagen oder bei neuen Derivaten die Positionen der Schweratome bestimmen. Diese Elektronendichtekarten zeigen einen höheren Kontrast als die Pattersonfunktion und liefern die Positionen der Schweratome in Bezug auf den gleichen Ursprung wie das Derivat, das zur Berechnung der ersten Phasen benutzt wurde.

Die Phasenambiguität, die entsteht, wenn nur ein Derivat zur Berechnung der Proteinphasen eingesetzt wird (zwei Schnittpunkte der Kreise mit Radius $|F_P|$ und z.B. $|F_{PH1}|$ in Abb. 8), kann alternativ zu einem zweiten Derivat auch mit Hilfe der anomalen Streubeiträge (siehe 3.4.4) gelöst werden. Es lassen sich mit ihnen zusätzliche Beziehungen in die Harker-Konstruktion einbringen. Die anomalen Differenzen lassen sich auch, obwohl sie sehr klein sind, zur Bestimmung des Schweratom-Teilmodelles einsetzen, da sie innerhalb eines Datensatzes gemessen werden und somit keine Fehler durch Anisomorphie beinhalten. Man

spricht dann von der Methode des Singulären Isomorphen Ersatzes mit anomaler Streuung („Single isomorphous replacement, with anomalous scattering“, SIRAS). Falls mehrere gleiche Moleküle in der asymmetrischen Einheit vorhanden sind, kann man die Ambiguität auch durch Mitteln der Elektronendichte lösen. Dazu wird zunächst für jeden Reflex zufällig einer der beiden möglichen Phasenwinkel gewählt und damit eine Elektronendichtekarte berechnet. Die korrekt ausgewählten Phasenwinkel ergeben die wahre Elektronendichteverteilung, die falschen tragen zum Rauschen bei. Lassen sich in dieser Dichtekarte die Bereiche mit Protein von dem Lösungsmittelbereich unterscheiden, kann man mit Hilfe einer Maske und den Symmetrieeoperatoren die Elektronendichte mitteln (siehe 3.4.7). Die Symmetrieeoperatoren, die ein Molekül auf ein anderes abbilden, können aus dem Schweratom-Teilmodell abgeleitet werden.

Die Struktur von EpiD wurde mit der Methode des Isomorphen Ersatzes (IR) gelöst. Dazu wurden Kristalle der Kristallform II in Präzipitanzlösung, in der 1 bis 10 mM einer Schweratomverbindung (AuCl₃, HgCl₂, K₄OsCl₆, PbCl₄, Thiomersal etc.) gelöst wurden, überführt und die Daten nach einer Inkubationszeit zwischen einer Stunde und einer Woche bei 16 °C gesammelt.

Nach der Datenreduktion wurden die isomorphen Differenzen mit dem Programm SCALEIT (CCP4, 1994) berechnet und die Lagen der Schweratome mit SHELXS (Sheldrick *et al.*, 1993) bestimmt. Die Phasen wurden mit dem Programm MLPHARE (CCP4, 1994) berechnet. Aus der Lage der Schweratome wurden die lokalen Symmetrieeoperatoren berechnet und mit dem Programm IMP optimiert und die Elektronendichte mit dem Programm RAVE in einer Maske gemittelt, die mit dem Programm MAMA (Kleywegt und Jones, 1993) erzeugt wurde.

3.4.6.2. Multiple Anomale Dispersion

Die Phasierung mit Hilfe der Multiplen Anomalen Dispersion (MAD) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet werden, da kein geeignetes Schweratomderivat hergestellt werden konnte. Da diese Methode jedoch immer größere Bedeutung erlangt, soll sie hier der Vollständigkeit halber erwähnt und kurz beschrieben werden.

Diese Methode kann als besondere Form des isomorphen Ersatzes betrachtet werden, deren Prinzip schon lange bekannt ist, jedoch erst durch die Einführung der durchstimmbaren Synchrotronstrahlung für die Anwendung in der Proteinkristallographie geeignet wurde. Sie wurde von Hendrickson und Kollegen (Hendrickson *et al.*, 1988; Krishna Murthey *et al.*, 1988) zum ersten Mal zur Lösung einer Proteinstruktur eingesetzt. Wichtiger als die Anzahl der Elektronen, die durch ein Atom zusätzlich in den Kristall eingeführt werden, ist hierbei

jedoch die Lage einer Absorptionskante des Atoms. Die Energie einer solchen Kante muss im Bereich der verwendeten Strahlung liegen. Es können für MAD Atome verwendet werden, die für den Isomorphen Ersatz zu wenige Elektronen besitzen, wie zum Beispiel Zn oder natürlich im Protein vorhandene Metalle, die eine geeignete Absorptionskante besitzen (Fe in Häm oder Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenden Proteinen). Häufig wird auch Selenomethionin anstelle der natürlich vorkommenden Methionine durch Expression in Methionin-auxotrophen Bakterienstämmen in selenomethioninhaltigem Medium eingebaut (Doublé, 1997). So kann häufig auf die oft sehr langwierige Suche nach einem Schweratomderivat verzichtet werden.

Bei dieser Methode wird sowohl die dispersive Differenz, die analog zur isomorphen Differenz, eine Änderung des realen Streubeitrages darstellt, als auch die anomale Differenz, die durch die Phasenverschiebung entsteht, für die Phasierung ausgenutzt. Diese Differenzen werden durch die Messung bei verschiedenen Wellenlängen optimiert. Der atomare Streufaktor eines anomal streuenden Atoms $f_{anom.}$ lässt sich als Summe der von der Wellenlängen unabhängigen f_0 und abhängigen $f(\lambda)$ Anteile darstellen:

$$f_{anom.} = f_0 + f(\lambda) = f_0 + f'(\lambda) + i f''(\lambda) \quad (15)$$

Die von der Wellenlänge abhängigen Anteile führen aufgrund von Absorptionseffekten sowohl zu einer Verringerung der Streukraft ($f'(\lambda) < 0$), als auch zu der schon beschriebenen Phasenverschiebung ($i f''(\lambda)$) (siehe 3.4.4). Die dispersive Differenz beruht auf den unterschiedlichen Werten von $f'(\lambda)$, und die anomale Differenz hebt in Abhängigkeit von der Größe $i f''(\lambda)$ die Friedel-Symmetrie innerhalb eines Datensatzes auf. Beide Differenzen sind proportional zu den Strukturfaktoramplituden des Schweratomteilmodells und da beide Terme voneinander unabhängig sind, kann man mit ihnen auch das Phasenproblem eindeutig lösen. Theoretisch würde es genügen zwei Datensätze bei verschiedenen Wellenlängen zu messen, praktisch werden jedoch wenn möglich drei Datensätze gemessen, einer bei maximalem f'' , einer bei minimalem f' und, um die dispersiven Differenzen zu maximieren, der dritte bei einer weit von der Absorptionskante entfernten Wellenlänge („remote point“), bei der f' nahe null ist.

Ein großer Vorteil der MAD ist, dass keine Fehler durch Nicht-Isomorphie auftreten, da alle Datensätze vom gleichen Kristall gemessen werden. Dies führt häufig zu einer ausgezeichneten Bestimmung der Phasen, obwohl die Differenzen in der Größenordnung des Messfehlers für die Strukturfaktoramplituden liegen.

Außerdem ist die Auflösung, bis zu der Phasen berechnet werden können nur durch die maximale Auflösung der Datensätze begrenzt. Dies liegt daran, dass die von der Wellenlänge abhängigen Terme im Gegensatz zu dem wellenlängenunabhängigen Term f_0 , der eine „normale“ Abnahme der Streukraft mit der Auflösung zeigt, unabhängig von der Auflösung

sind, da zu diesen Termen nur die inneren Elektronen des anomalen Streuers beitragen. Beim isomorphen Ersatz lassen sich wegen der Ausdehnung der Elektronenwolke sinnvolle Phasen häufig nur bis zu einer Auflösung von 3 Å berechnen.

Der Nachteil, dass eine Röntgenquelle mit durchstimmbarer Wellenlänge benötigt wird, verschwindet durch den rasch zunehmenden Aufbau von Synchrotron-Messstationen („beamlines“) immer mehr. Da die Kristalle bei der Verwendung von Synchrotronstrahlung sehr schnell innerhalb weniger Bilder zerstört werden benötigt man jedoch für eine Tieftemperaturmessung geeignete Kristalle, die für MAD-Messungen geeignete Atome enthalten.

3.4.6.3. Phasierung mittels Molekularem Ersatz

Steht ein Proteinmodell mit hinreichender Ähnlichkeit zur gesuchten Struktur zur Verfügung, so kann versucht werden, das Phasenproblem mit Hilfe der Methode des Molekularen Ersatzes zu lösen. Dazu muss zunächst das Proteinmodell entsprechend dem nativen Proteindatensatz korrekt in der asymmetrischen Einheit positioniert werden und danach können aus den Koordinaten des positionierten Modells Phasen berechnet werden. Eine Elektronendichtekarte, berechnet mit den gemessenen Strukturfaktoramplituden und den berechneten Phasen, sollte dann die Lösung der gesuchten Struktur ermöglichen. Ob die nötige Ähnlichkeit gegeben ist, kann nur durch Ausprobieren herausgefunden werden. Erfahrungen zeigen jedoch, dass die Standardabweichung der $C\alpha$ -Atome nicht größer als 1 Å sein sollte. Diese strukturelle Ähnlichkeit wird meistens bei Protein-Komplexen mit dem Substrat oder einem Inhibitor im Vergleich zum freien Protein oder oft bei Proteinen mit einer hohen Identität der Primärstruktur (> 20-30 %, z.B. bei homologen Proteinen aus verschiedenen Organismen) erfüllt.

Die Positionierung des Suchmodells kann entweder mit Hilfe von Überlegungen zur möglichen Kristallpackung oder durch eine Suche im mehrdimensionalen Raum erfolgen. Die erste Variante ist vor allem dann möglich, wenn die Quartärstruktur eines multimeren Proteins durch die kristallographischen Symmetrieachsen aufgebaut wird. Für eine Positionierung ergeben sich im allgemeinen 3 Rotations- und 3 Translations-, also insgesamt 6 Freiheitsgrade. Da die Suche im 6-dimensionalen Raum theoretisch möglich ist, in der Praxis jedoch einen hohen Rechenaufwand erfordert, werden die Rotations- und Translationsfreiheitsgrade unter Zuhilfenahme der Pattersonfunktion (Patterson, 1934) getrennt abgesucht. Dies resultiert in zwei dreidimensionalen Suchen und verringert damit den Rechenaufwand.

Die Pattersonfunktion $P(u)$ enthält als Selbstfaltung der Elektronendichteverteilung $\rho(r)$ in der Elementarzelle Informationen über alle Vektoren $u=(u,v,w)$, die einen interatomaren Abstand von einem Atom an Position $r=(x,y,z)$ zu einem Atom an Position $r+u$ beschreiben und lässt sich ohne Phaseninformation berechnen. Für die korrekte Positionierung des

Suchmodells ist hierbei wichtig, dass Vektoren, die intramolekulare Abstände beschreiben, nur von den Rotationsfreiheitsgraden eines Moleküls abhängen, während die intermolekularen Vektoren sowohl von der Orientierung als auch Lage der Moleküle in der Einheitszelle (Translationsfreiheitsgrade) abhängen.

$$P(u) = \int_r \rho(r)\rho(r+u)dr \quad (16)$$

$$P(u) = P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}|^2 \cos 2\pi(hu - kv - lw) \quad (17)$$

Für die Positionierung wird das Suchmodell in der Rotationssuche um bestimmte Inkremente gedreht, Strukturfaktoren F_{calc} und daraus die Pattersonfunktion berechnet. Diese wird mit der Pattersonfunktion des gemessenen Datensatzes verglichen und die Übereinstimmung mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten $C(|F_{obs}|^2, |F_{calc}|^2)$ überprüft:

$$C(P_{obs}, P_{calc}) = \int_u P(|F_{obs}|^2, u) \times P(|F_{calc}|^2, u) du \quad (18)$$

Bei einer Übereinstimmung der aktuellen Orientierung des Suchmodells mit der Orientierung des Proteinmoleküls in der Einheitszelle erhält man ein Maximum des Korrelationskoeffizienten. Bei der Translationssuche wird danach das korrekt orientierte Modell durch die Einheitszelle geschoben. Hierbei kann eine Übereinstimmung sowohl mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten, als auch mit Hilfe des kristallographischen R-Faktors (siehe 3.4.10) überprüft werden. Manchmal können durch Symmetrieüberlegungen die Freiheitsgrade so eingeschränkt werden, dass die Aufteilung in Rotations- und Translationssuchen nicht mehr nötig ist. In der Suche über die verbleibenden Dimensionen können mit Hilfe des kristallographischen R-Faktors als Bewertungsfaktor oft Lösungen noch gefunden werden, die mit der Patterson-Methode nicht gefunden wurden.

Die Struktur des Substratkomplexes und von MrsD wurde mit Hilfe der Methode des Molekularen Ersatzes gelöst. Im Falle von EpiD-H67N mit dem Pentapeptid DSYTC wurde eine Patterson-Suche mit dem Programm AMoRe (Navaza, 1987) und einem Suchmodell, das aus der verfeinerten Struktur von EpiD erzeugt wurde, durchgeführt. Im Falle von MrsD wurde das Modell mit Hilfe von Überlegungen zur möglichen Kristallpackung positioniert. Mit Hilfe der Modellkoordinaten wurden dann mit dem Programmpaket CNS (Brünger *et al.*, 1998) Elektronendichtekarten berechnet und die Modelle danach in die Elektronendichte eingepasst sowie die Primärstruktur korrigiert.

3.4.7. Dichtemodifikation

Wenn die Qualität der Elektronendichtekarten nach der Phasierung noch nicht für eine Interpretation ausreicht, kann man mit verschiedenen Methoden versuchen sie zu verbessern. Es wird bei allen Methoden zusätzliche Information in die vorhandene Elektronendichte eingebracht. Nach einer Rücktransformation der modifizierten Elektronendichteverteilung erhält man verbesserte Phasenwinkel α_{mod} , die dann zusammen mit den gemessenen Strukturfaktoramplituden $|F_{obs}|$ zur Berechnung einer verbesserten Elektronendichtekarte eingesetzt werden. Die angewandten Modifikationen beruhen auf verschiedenen Beobachtungen und theoretischen Überlegungen.

3.4.7.1. „Solvent Flattening“

Beim „solvent flattening“ nutzt man die Tatsache aus, dass es im Proteinkristall getrennte Bereiche mit Protein und Lösungsmittel gibt. Da sich die Lösungsmittelmoleküle während der Messung sehr schnell bewegen, kann bei den langen Belichtungszeiten nur ein statistisches Mittel gemessen werden und die Elektronendichte zeigt im Bereich des Lösungsmittel einen konstanten und niedrigen Wert. Nachdem der Bereich des Lösungsmittel z.B. mit einem Algorithmus von Wang (Wang, 1985) bestimmt wurde, wird die Elektronendichte in diesem Bereich auf einen niedrigen konstanten Wert gesetzt. Zur Bestimmung der Proteingrenzen ist es erforderlich, den Lösungsmittelgehalt des Kristalls zu kennen. Dieser kann mit Hilfe des so genannten Matthews-Koeffizienten (Matthews, 1968) (siehe 3.4.5.2) abgeschätzt werden. Eine Erweiterung des „solvent flattening“ stellt das „solvent flipping“ dar (Bricogne, 1974).

3.4.7.2. Mitteln der Elektronendichte

Sind von einem Protein mehrere Moleküle in der asymmetrischen Einheit oder existieren mehrere Kristallformen, so kann man die Werte der Elektronendichte an den Stellen mitteln, an denen sie aufgrund der vergleichbaren Position im Protein gleich sein sollte (Kleywegt und Read, 1997). Für das Mitteln der Elektronendichte benötigt man neben der Kenntnis der Proteingrenzen noch die lokalen Symmetrieoperatoren, die ein Molekül auf ein anderes abbilden.

3.4.7.3. „Histogram Matching“

Zhang und Main (1990) konnten zeigen, dass die relative Anzahl der Gitterpunkte in der Elektronendichtekarte, die einen bestimmten Wert aufweisen, nur von der Auflösung des Datensatzes, aber nicht vom Protein selbst abhängt. Das Histogramm der experimentellen

Elektronendichte kann an das optimale Histogramm angepasst werden. Das „histogram matching“ ist nicht so mächtig wie das „solvent flattening“, jedoch kann es, wenn es zusammen mit diesem eingesetzt wird, den Unterschied zwischen einer interpretierbaren oder nicht interpretierbaren Elektronendichtekarte ausmachen.

Weitere Methoden, um die experimentelle Elektronendichtekarte zu verbessern, sind z.B. das Skeletonisieren (Baker *et al.*, 1993; Swanson, 1994) und die Anwendung der Sayreschen Gleichung (Sayre, 1974).

Häufig werden mehrere dieser Methoden nacheinander oder gleichzeitig angewandt. Dies führt meistens zu einer deutlich besseren Qualität der Elektronendichtekarten, als wenn man jedes Verfahren einzeln anwenden würde. Diese Methoden werden auch zur Phasenexpansion eingesetzt, wenn zum Beispiel nach einer MIR-Phasierung die Phasen nur bis zu einer Auflösung von 3 Å bestimmt werden konnten, der native Datensatz aber eine deutlich bessere Auflösung aufweist. Dazu wird bei der Rücktransformation der modifizierten Elektronendichte schrittweise die Auflösung erhöht, für die Phasenwinkel berechnet werden.

3.4.8. Phasenkombination

Wenn die initiale Elektronendichte von ausreichender Qualität ist, um Sekundärstrukturelemente zu identifizieren und sie als Polyalanin-Teilmodell einzupassen, kann man eventuell nach einer Verfeinerung der Koordinaten (siehe 3.4.10) danach die aus den Koordinaten dieses Teilmodells berechneten Phasen mit den experimentellen Phasen kombinieren. Dies führt häufig zu einer deutlich besseren Elektronendichtekarte, in der auch die Seitenketten der Aminosäuren identifiziert und dadurch die Sequenz verankert werden kann. Auch fehlende Konnektivitäten können danach oftmals identifiziert werden.

3.4.9. Modellbau

Die aus den Messdaten berechneten Elektronendichtekarten werden mit Hilfe von Computern mit der Möglichkeit zu Stereodarstellung als Gitternetz dargestellt. Dabei werden Punkte mit gleicher Elektronendichte durch Linien verbunden. Es entstehen so „schlauchförmige Käfige“, in deren Inneren eine höhere und Äußerer eine geringere Elektronendichte vorliegt. Die Aminosäuren, die von den Programmen meistens in der Strichdarstellung („wireframe“) dargestellt werden, können sowohl verschoben und gedreht, als auch die Torsionswinkel der Seitenketten verändert und so in die Elektronendichtekarten eingepasst werden.

Atomare Modelle wurden entweder mit einer Grafikworkstation ESV (Evans & Sutherland) und dem Programm FRODO (Jones, 1978), mit einer Octane (Silicon Graphics Inc.)

und den Programmen MAIN (Turk, 1992) und O (Jones *et al.*, 1991) oder einem PC und dem Programm O in die Elektronendichte eingepasst.

3.4.10. Verfeinerung

Nach einer manuellen Änderung des Modells durch Einpassen von Aminosäuren, einzelnen Molekülen (Wasser, Kofaktoren) oder Atomen (Metallionen) in die Elektronendichtekarten, erfolgt eine rechnerische Optimierung der freien Parameter (Koordinaten und B-Faktor der Atome) an die gemessenen Strukturfaktoramplituden. Ziel dieses Verfahrens ist es, die aus den Koordinaten berechneten Strukturfaktoramplituden $|F_{calc}|$ so gut wie möglich mit den gemessenen $|F_{obs}|$ in Einklang zu bringen. Ein Maß dafür ist der kristallographische R-Faktor:

$$R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum_{hkl} |F_{obs}|} \quad (19)$$

wobei k ein Skalierungsfaktor ist um die gemessenen und die berechneten Strukturfaktoramplituden auf eine einheitliche Skala zu bringen. Um eine Überverfeinerung, d.h. eine bessere „Modellierung“ des Rauschens und der Messfehler zu vermeiden, wird ein gewisser Anteil der Reflexe ausgewählt und als „test set“ nicht in die Verfeinerungsrechnung einbezogen (Brünger *et al.*, 1992). Der aus diesen Reflexen berechnete freie R-Faktor (R_{free}) ist im allgemeinen bis zu 8 % höher als der kristallographische R-Faktor (R_{cryst}) und sollte im Verlauf einer Verfeinerung genau wie dieser sinken. Die Formel für den freien R-Faktor ist bis auf den unterschiedlichen Satz von Reflexen ($hkl \subset$ „test set“) identisch mit der für den kristallographischen R-Faktor. Der R-Faktor einer bis zur Konvergenz verfeinerten Proteinstruktur sollte je nach Auflösung 20-30 % betragen.

In der Proteinkristallographie übersteigt die Anzahl der Messwerte (kristallographisch unabhängige Reflexe) die Anzahl der freien Parameter (drei Koordinaten plus B-Faktor pro Atom) aufgrund der niedrigen Auflösung nicht ausreichend, um nur die Übereinstimmung von $|F_{calc}|$ und $|F_{obs}|$ in die Verfeinerung einzubeziehen. Daher werden zusätzliche geometrische Parameter, die auf den deutlich besser bestimmten Kleinmolekülstrukturen der einzelnen Aminosäuren beruhen, als Kraftfelder während der Verfeinerung verwendet (Engl und Huber, 1991).

3.4.10.1. „Rigid Body“-Verfeinerung

Bei der „Rigid Body“-Verfeinerung werden ganze Moleküle oder einzelne Domänen als starre Körper („rigid bodies“) betrachtet und nur die Position und Orientierung dieser Körper in der Einheitszelle optimiert. Dieses Verfahren wird hauptsächlich nach einem molekularen

Ersatz angewendet, um das Suchmodell besser zu positionieren. Da die Anzahl der freien Parameter je nach Anzahl der gewählten starren Einheiten deutlich niedriger ist als bei einem „positional refinement“ (siehe nächsten Abschnitt), kann diese Methode auch bei niedriger Auflösung und damit geringer Anzahl unabhängiger Reflexe (Messdaten) verwendet werden.

3.4.10.2. „Positional Refinement“

Beim „Positional Refinement“ wird die Position aller Atome im Rahmen der Engh-Huber-Parameter in die Verfeinerung einbezogen. Dieses Verfahren dient hauptsächlich dazu, nach leichten Änderungen am Modell oder nach einem „Simulated Annealing“ (siehe nächsten Abschnitt) die korrekte Geometrie der Aminosäuren wieder herzustellen. Das „Positional Refinement“ hat jedoch einen relativ kleinen Konvergenzradius, d.h. ist ein Atom zu weit von seiner korrekten Position entfernt, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass es in einem lokalen Minimum gefangen wird und nicht in das globale Minimum gelangt.

3.4.10.3. „Simulated Annealing“

Bei dieser Methode wird das Modell rechnerisch im Rahmen einer molekulardynamischen Simulation auf 3000-5000K erhitzt und danach langsam abgekühlt. Die Bewegungen der Atome und ihre Positionen werden dabei nach der Newtonschen Dynamik unter Berücksichtigung der Engh-Huber-Parameter berechnet. Die Atome bewegen sich am Anfang stark und beim Abkühlen immer schwächer um ihre Gleichgewichtsposition herum. Durch die starke Bewegung kann der Verfeinerungsprozess aus lokalen Minima herausgehoben und auf diese Weise der Konvergenzradius erhöht werden.

3.4.10.4. B-Faktor-Verfeinerung

Die B-Faktoren sind ein Maß für die thermische Bewegung der Atome, die zu einer Verbreiterung der Elektronendichte führt. Bei einer hohen Auflösung können die B-Faktoren der Atome unabhängig verfeinert werden. Sind jedoch zu wenige Messdaten vorhanden, so werden zusätzliche Beschränkungen eingeführt. Je nachdem kann der B-Faktor für alle Atome einer kompletten Aminosäure oder sogar noch größere Einheiten bis zu ganzen Domänen auf den gleichen Wert gesetzt werden. Aber auch bei der individuellen B-Faktor-Verfeinerung sollten die B-Faktoren benachbarter Atome nicht allzu sehr voneinander abweichen.

Die Verfeinerungen der Atomkoordinaten und Temperaturfaktoren wurden mit den Programmen X-PLOR (Brünger, 1993) und CNS (Brünger *et al.*, 1998) durchgeführt. Als Ziel-

funktion diene bei CNS das „maximum-likelihood target“. Außerdem wurde vor jeder Verfeinerung eine „bulk solvent“-Korrektur der gemessenen Strukturfaktoramplituden durchgeführt und immer die Reflexe über den gesamten gemessenen Auflösungsbereich für die Verfeinerung verwendet. Beim „simulated annealing“ wurde als Starttemperatur 5000K gewählt und das „slow cool“-Protokoll verwendet.

3.4.11. Analyse des Modells

Fehler im Modell, die vor allem nach einem molekularen Ersatz durch einen hohen Modellbeitrag der aus den Koordinaten berechneten Phasen, entstehen können, kann man durch sogenannte „omit maps“ erkennen. Diese Elektronendichtekarten werden mit Phasen berechnet, bei deren Berechnung Teile des Modells nicht berücksichtigt wurden und somit deren Modellbeitrag reduziert. Es sollte so eher die „wirkliche“ Elektronendichte als diejenige, die dem Modell folgt, sichtbar werden.

Nach der Verfeinerung wurde die Qualität der Modelle mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) kontrolliert. Falls in den verschiedenen Statistiken und Grafiken, die dieses Programm ausgibt, für eine bestimmte Aminosäure ungewöhnliche Phi-/Psi-Winkel, Torsionswinkel der Seitenkette oder sonstige geometrische Auffälligkeiten auftraten, so wurden diese noch einmal überprüft.

Die Sekundärstruktur der komplett verfeinerten Modelle wurden mit dem Programm DSSP (Kabsch und Sander, 1983) analysiert und zu den grafischen Darstellungen verwendet. Überlagerungen mit anderen Proteinen wurden mit dem Programm TOP (Lu, 2000) durchgeführt.

3.4.12. Graphische Darstellung

Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm PILEUP (Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) erzeugt, manuell an die Strukturdaten angepasst und mit ALSRIPT (Barton, 1993) dargestellt.

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), BOBSCRIPT (durch Esnouf modifiziertes MOLSCRIPT (Esnouf, 1997)) und RASTER3D (Merritt und Murphy, 1994) verwendet. Oberflächen wurden mit dem WebLab-Viewer Pro (<http://www.msi.com>) erzeugt und dargestellt.

Zur Nachbearbeitung von Bildern wurde das Programm PHOTOSHOP Version 5.0 (Adobe Systems Inc., USA) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Reinigung

Die Proteine EpiD, EpiD-H67N, MrsD und AtHAL3-H90N konnten mit den in 3.3.2 beschriebenen Methoden in elektrophoretischer Reinheit isoliert werden. Für präparative Reinigungen wurden die Zellen von 5-Liter Kulturen verwendet. Die Ausbeuten schwankten zwischen 5 und 20 mg Protein.

4.1.1. EpiD und EpiD-H67N

EpiD und EpiD-H67N eluierten bei ca. 250 mM NaCl von der Q-Sepharose. Bei der Phenylsepharose gab es größere Schwankungen. Bei manchen Präparationen eluierten die beiden Proteine erst beim Waschen mit 2 mM TrisHCl pH 8,0. Dies führte zu einer stärkeren Verunreinigung mit Fremdproteinen. Da selbst elektrophoretisch reines EpiD nach der Phenylsepharose nicht kristallisierte, wurde die Reinigung über eine Q-Sepharose-Säule wiederholt.

4.1.2. MrsD

MrsD bindet nur sehr schlecht an eine Q-Sepharose-Matrix und eluierte schon bei 50 mM NaCl. Der nachfolgende Chromatographieschritt über eine Hydroxylapatit-Säule entfernte auch DNA-Verunreinigungen. Mit Hilfe einer Superose 12-Säule wurden noch letzte Reste an Fremdproteinen entfernt.

4.1.3. AtHAL3-H90N

Nach der ersten Affinitätschromatographie mit einer Nickelsäule waren noch mehrere Fremdproteine in den Fraktionen, die AtHAL3-H90N enthielten, vorhanden. Bei einem Versuch, diese mittels einer Q-Sepharose-Säule abzutrennen, ist ein großer Teil des Proteins auf der Säule präzipitiert und konnte nur noch unter stark denaturierenden Bedingungen (6 M Guanidiniumchlorid) von der Säule gewaschen werden. Mit Hilfe einer Molekularsiebsäule (Superose-12) konnten die verbleibenden Fremdproteine abgetrennt werden. Die Ausbeute lag bei 10-20 mg aus fünf Liter *E. coli*-Kultur.

4.2. Kristallisation

4.2.1. EpiD

EpiD konnte in zwei verwandten monoklinen Kristallformen der Raumgruppe C2 mit zwölf Molekülen in der asymmetrischen Einheit kristallisiert werden (Tab. 3). Kristalle der ersten Form wurden innerhalb von ein bis drei Tagen erhalten durch Mischen von 5 μ l Proteinlösung (10 mg/ml, 20 mM TrisHCl pH 8,0) mit 2 μ l Präzipitanzlösung (30 % MPD, 100 mM MES/NaOH pH 6,5) und anschließendes Äquilibrieren bei 18 °C gegen 0,5 ml Präzipitanzlösung. Diese Kristalle waren jedoch nicht isomorph zueinander, daher konnten sie nicht zum Derivatisieren und anschließender Phasierung mittels MIR verwendet werden. Sie hatten jedoch gegenüber der zweiten Form den Vorteil, dass sie direkt aus der Mutterlauge im Stickstoffstrom bei 100K schockgefroren werden konnten. Kristalle der zweiten Form wurden analog zur ersten mit einer anderen Präzipitanzlösung (13 % MPD, 10 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 8,0) erhalten. Diese Kristalle bildeten sich jedoch reproduzierbar nur, wenn der frisch gemischte Tropfen mit Kristallen angeimpft wurde. Beide Kristallformen hatten ähnliche Zellkonstanten (Tab. 3). Manchmal wurden von dieser Kristallisationsbedingung auch tetragonale Kristalle der Raumgruppe P4(3)2(1)2 erhalten. Diese konnten durch Animpfen mit solchen Kristallen reproduziert werden und nach schrittweiser Erhöhung der MPD-Konzentration auf 25 % schockgefroren werden. Für die Suche einer Derivatisierungsbedingung hatten sie jedoch keinen Vorteil gegenüber der zweiten monoklinen Form. Da die c-Achse mit 280 Å relativ lang war (Tab. 3), konnten nur kleine Winkelinkremente (0,2-0,5°) bei der Datensammlung verwendet werden. Ferner zeigte die kumulative Intensitätsstatistik nach der Datenreduktion eine deutliche sigmoide Abweichung von den theoretischen Werten. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Kristalle eine merohedrische Verzwillingung zeigen. Auch die R-Faktoren einer Verfeinerung eines nahezu kompletten Modells gegen einen Datensatz eines tetragonalen Kristalls sanken nur bis ca. 35 %.

4.2.2. Komplex von EpiD-H67N mit DSYTC

Versuche EpiD-Kristalle der beiden monoklinen und der tetragonalen Kristallformen mit den Pentapeptiden DSYTC, DSYTS und DSYTA zu „soaken“ schlugen allesamt fehl. Entweder wurden die Kristalle zerstört oder es wurde keine zusätzliche Elektronendichte sichtbar. Daher wurde versucht das Pentapeptid DSYTC mit der Mutante EpiD-H67N mit dem Peptid DSYTC zusammen zu kristallisieren. Dazu wurden der Proteinlösung 3 mM DTT zugesetzt, um Disulfidbildung zwischen zwei Peptidmolekülen und zwischen Protein- und Peptidmolekülen zu verhindern. Anschließend wurde festes Peptid bis zu einer Konzentration von 10 mM zuge-

Tabelle 3: Zellkonstanten

Kristallform	Raumgruppe	Asymmetr. Monomere	Lösungsmittelgehalt	Zellkonstanten
EpiD1	C2	12	52 %	a = 164.7 Å, b = 110.0 Å, c = 152.9 Å $\beta = 90.4^\circ$
EpiD2	C2	12	58 %	a = 176.5 Å, b = 110.5 Å, c = 154.2 Å $\beta = 94.3^\circ$
AuCl ₃	C2	12		a = 175.0 Å, b = 110.3 Å, c = 153.9 Å $\beta = 94.3^\circ$
EpiD3	P4(3)2(1)2	12	54 %	a = b = 134.78 Å, c = 280.17 Å
DSYTC	I2(1)3	4	79 %	a = b = c = 223.6 Å
MrsD1	F432	1	67 %	a = b = c = 192.6 Å
MrsD2	F432	1	67 %	a = b = c = 191.8 Å

Ein Kristall der Form EpiD1 wurde für den hochaufgelösten Datensatz verwendet, Kristalle der Form EpiD2 wurden für die Derivatisierung verwendet und AuCl₃ gibt die Zellkonstanten nach dem „soaken“ mit Gold-(III)-chlorid an. Mit DSYTC sind die Kokristalle von EpiD-H67N mit Peptid bezeichnet. Diese Kristalle haben einen ungewöhnlich hohen Lösungsmittelgehalt und Matthews-Koeffizient (5.8). MrsD1 sind Kristalle, die mit Phosphat, MrsD2 mit Tartrat als Präzipitanz erhalten wurden.

setzt. Dabei trat manchmal reversible, vor allem bei älteren Proteinlösungen (Aliquots wurden bei -80 °C gelagert) jedoch auch irreversible Präzipitation des Proteins auf. Bei einigen Präparationen der Mutante EpiD-H67N konnte ein Zusatz von 2-4 % MPD zur Proteinlösung dies verhindern. Mit der gleichen Präzipitanzlösung wie bei der ersten monoklinen Kristallform wurden kubische Kristalle erhalten (Tab. 3), die zuerst jedoch zu klein waren, um mittels Röntgenstrahlen untersucht zu werden. Der Zusatz von 0,7 μ l 1,2 M Glycin zum Tropfen ergab Kristalle von ca. 0,1 mm in allen drei Raumrichtungen. Die Kristalle wuchsen innerhalb von 2-3 Tagen, lösten sich aber innerhalb der nächsten drei Tage wieder auf. Es konnte kein Erntepuffer gefunden werden, in welchem die Kristalle stabil sind.

4.2.3. MrsD

Um eine erste Kristallisationsbedingung zu finden, wurden sowohl die „Crystal Screens I, II und Cryo“ von Hampton Research sowie ein faktorieller Satz von Präzipitanzlösungen verwendet, der in der Abteilung zusammengestellt wurde. Ausreichend große Kristalle konnten von verschiedenen Bedingungen erhalten werden, jedoch beugten nur Kristalle von 1,6 M KNaH₂PO₄, 100 mM HEPES pH 7,5 oder 1,2 M KNaTartrat, 0,1 M TrisHCl pH 9,1, 0,02 % NaN₃ die Röntgenstrahlen bis zu einer verwertbaren Auflösung. Kristalle aus der Phosphatbedingung zeigten jedoch eine schlecht definierte Elektronendichte für den Kofaktor. Auch

zusätzliches FAD bis zu einer Konzentration von 0,5 mM führte zu keiner Verbesserung. Höhere FAD-Konzentrationen führten zu sehr kleinen und verwachsenen Kristallen. Die hohe Phosphat-Konzentration scheint das FAD aus seiner Bindungsstelle zu verdrängen. Die besten Kristalle wurden aus der Tartratbedingung erhalten, wenn 2 mM FAD der Proteinlösung zugesetzt wurde. Aus beiden Bedingungen wurden kubische Kristalle erhalten (Tab. 3).

4.2.4. AtHAL3-H90N mit PPC

Der Komplex von AtHAL3-H90N mit PPC wurde analog dem Komplex von EpiD mit DSYTC (siehe 4.2.2) zu kristallisieren versucht. Dabei wurde bei ersten Versuchen die publizierte Bedingung: 0,1 mM TrisHCl pH 7,0, 2,5 M Ammoniumsulfat, Tropfenverhältnis 2:1 (Albert *et al.*, 2000) und das Protein ohne Substrat verwendet. Nachdem nur Büschel sehr kleiner Nadeln gewachsen waren, wurde versucht, die Bedingung durch Variation der Konzentration des Fällungsmittels und Proteins, Änderung des pH-Wertes und Verwendung von Additiven zu optimieren. Bei einer Proteinkonzentration von 7,5 mg/ml und einer Ammoniumsulfatkonzentration von 1,8 M wurden die Kristalle größer und es konnten auf einem Drehanodengenerator Datensätze bis ca. 4 Å aufgenommen werden. Erste Versuche mit dem Substrat ergaben keine Änderung in der Morphologie der Kristalle. Die nadelförmigen Kristalle können nach kurzem Eintauchen in Frierpuffer (Präzipitanzlösung mit 25 % Glycerin) schockgefroren werden. Ein Datensatz von einem solchen Kristall, welcher bis zu einer Auflösung von 2,5 Å am DESY aufgenommen werden konnte, zeigte jedoch ebenso wie die anderen Datensätze keine zusätzliche Elektronendichte in der Nähe des Kofaktors. Versuche, vor einer Messung das Substrat in fester Form dem Tropfen mit den Kristallen zuzugeben, ergaben auch keine Verbesserung.

4.3. Strukturlösung

4.3.1. EpiD

Von der zweiten monoklinen Kristallform konnte ein nativer Datensatz (NATI2) an einem Drehanodengenerator (Rigaku, Japan) mit einem „Image Plate“-Detektor (Marresearch, Hamburg) bei 18° C mit einer Auflösung von 3,7 Å und einem R_{sym} von 10,2 % aufgenommen werden (Tab. 4). Dieser diente als Referenz für die Suche von Derivaten.

Versuche, Selenomethionin in EpiD zu inkorporieren, schlugen fehl. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass zwei Methionine in der Nachbarschaft des FMN liegen und das im Vergleich zum Schwefel größere Selen den Kofaktor verdrängt. Ohne FMN scheint das Partikel jedoch nicht stabil zu sein, da es auch nicht gelang, das Apoenzym zu generieren. Eine Erklärung dafür sind die Kontakte, die durch das FMN zwischen den Untereinheiten des Partikels

Tabelle 4: Statistik der Datensammlung des EpiD

	Datensätze			
	NATI1	NATI2	AuCl ₃	DSYTC
Datensammlung				
Raumgruppe	C2	C2	C2	I2(1)3
Auflösung [Å]	2.5	3.7	4.3	2.57
letzte Schale [Å]	2.50-2.56	3.71-3.91	4.30-4.53	2.68-2.57
Anzahl der unabhängigen Reflexe	81936	28987	14935	56352
Multiplizität	2.6 (2.4)	2.1 (2.8)	2.9 (2.1)	2.7 (2.1)
Vollständigkeit [%]	87.1 (73.3)	92.4 (82.1)	75.0 (57.5)	93.2 (59.4)
R _{sym} [%]	5.8 (24.8)	10.2 (27.3)	14.4 (32.2)	6.8 (34.9)
„mean“ I/σI	10.2 (2.8)	5.8 (2.4)	2.9 (2.1)	12.2 (2.0)
Phasierung				
R _{iso} [%]			25.9	
Anzahl Schweratompositionen			12	
R _{Cullis} [%]			76	
„phasing power“			1.43	

Der native Datensatz NATI1 wurde zur Verfeinerung, NATI2 zur SIR-Phasierung und zum Bauen des ersten Polyalanin-Modells verwendet und DSYTC ist ein Datensatz des Komplexes.

$$R_{\text{sym}} = \sum |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum \langle I(h) \rangle$$

$$R_{\text{iso}} = \sum |F_{\text{PH}} - F_{\text{P}}| / \sum F_{\text{P}}$$

$$R_{\text{Cullis}} = (\text{r.m.s. „lack of closure“}) / (\text{r.m.s. isomorphe Differenz})$$

vermittelt werden (siehe 4.4.1 und 4.4.3).

Da die Lösung des Phasenproblems nicht durch die Inkorporation von Selenomethionin und anschließender MAD-Messung gelöst werden konnte, mussten Schweratomderivate gesucht werden. Dazu wurde hauptsächlich die zweite monokline Kristallform verwendet. Trotz vieler Versuche mit Quecksilber-, Blei-, Platin- und anderen Schwermetallverbindungen konnte nur ein Derivat identifiziert und zum Phasieren benutzt werden. Dieses wurde erhalten, indem die Kristalle über Nacht in Präzipitanzlösung mit 1 mM AuCl₃ gelegt wurden. Der Datensatz hatte eine Auflösung von 4,3 Å, einen R_{sym} von 14,4 % und eine isomorphe Differenz zum nativen Datensatz von 25,9 % (R_{iso}, siehe Tab. 4). Zunächst konnten vier Schweratompositionen mit SHELXS (Sheldrick *et al.*, 1993) identifiziert werden. Weitere acht Positionen wurden danach durch das Berechnen und Betrachten von Differenz-Fourier-Dichtekarten gefunden. Mit dem Programm MLPHARE (CCP4, 1994) konnten danach erste Phasen in einem Auflösungsbereich von 15,0-4,3 Å mit einer mittleren „figure of merit“ (FOM) von

0,3 berechnet werden. Mit den Positionen der Schweratome konnten außerdem die Symmetrioperatoren für das Mitteln der Elektronendichte berechnet werden. Diese wurden mit dem Programm IMP (Kleywegt und Read, 1997) optimiert und die Dichte damit innerhalb einer mit MAMA (Kleywegt und Jones, 1993) erzeugten Maske mit dem Programm RAVE (Kleywegt und Read, 1997) cyclisch zwölfmal gemittelt. Dies führte zu einem Rücktransformations-R-Faktor von 18,1 %, und die Qualität der Elektronendichtekarte erlaubte danach den Einbau eines Poly-Alanin-Modelles und des FMN-Kofaktors.

Von Kristallen der ersten monoklinen Kristallform konnte am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg ein Datensatz bis zu einer Auflösung von 2,5 Å und einem R_{sym} von 5,8 % gemessen werden. Eine Patterson-Suche mit dem Poly-Alanin-Modell ergab eine Lösung. Die mit dieser Lösung und dem nativen Datensatz NATI1 berechnete Elektronendichtekarte erlaubte den Einbau der Seitenketten der Reste 1-147 und 158-174. Die Aminosäuren 148-157 sind in der Elektronendichte nicht sichtbar, d.h. sie sind sehr beweglich. Mehrere Zyklen Verfeinerung mit den Programmen XPLOR (Brünger, 1993) und CNS (Brünger *et al.*, 1998) und manuellem Anpassen des Modells an die Elektronendichtekarten, sowie das Einfügen der definierten Wassermoleküle mit den Programmen ARP/WARP (Perakis *et al.*, 1999) und CNS führten zu einem R-Faktor von 22,1 % und einem freien R-Faktor von 25,5 % (Tab. 5). Für die Verfeinerungen wurden Protokolle für das simulierte „Annealing“, für die Optimierung der Position der Atome unter Berücksichtigung der Huber-Engh-Parameter (Engh und Huber, 1991) und für die individuelle B-Faktor-Verfeinerung verwendet. Bei allen Verfeinerungen wurde die nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) berücksichtigt.

4.3.2. Komplex

Ein erster Datensatz konnte auf einem Drehanodengenerator bis zu einer Auflösung von 5,5 Å von einem Kristall, der noch ohne Glycin erhalten wurde, gemessen werden. Mit Hilfe des Matthews-Koeffizienten und der Selbstrotationsfunktion konnte man darauf schließen, dass vier Untereinheiten in der asymmetrischen Einheit enthalten sind und das Partikel durch eine dreizählige kristallographische Rotationsachse aufgebaut wird. Daher wurden für ein Suchmodell vier Untereinheiten des EpiD-Partikels so ausgewählt, dass sie nicht über eine lokale dreizählige Achse aufeinander abgebildet werden können. Mit Hilfe der Programme AMORE und MOLREP wurden damit Patterson-Suchen durchgeführt, die allerdings zu keiner Lösung führten. Erst als die Kristalle durch die Zugabe von Glycin zum Kristallisationsansatz verbessert werden konnten und ein Datensatz bis zu einer Auflösung von 4,2 Å aufgenommen werden konnte, wurde eine Lösung gefunden. Eine erste Elektronendichtekarte zeigte zusätz-

Tabelle 5: Statistik der Verfeinerung des EpiD

	EpiD	EpiD-H67N-DSYTC
Auflösung [\AA]	2.5	2.57
Reflexe im Arbeitsset	77526	53471
Reflexe im Testset	4087 (5 %)	2881 (5 %)
R_{cryst} (%)	22.1	20.9
R_{free} (%)	25.5	22.6
Anzahl der Atome (nicht Wasserstoff)		
Protein	15994	5608
Lösungsmittel	416	136
Kofaktor	372	124
Peptid		160
durchschnittlicher B-Faktor (\AA^2)	37.7	49.5
RMS ΔB (\AA^2)	1.5	1.7
RMS Abweichung von Idealwerten		
Bindungslängen (\AA)	0.008	0.008
Bindungswinkel ($^\circ$)	1.29	1.29

liche Elektronendichte in der Furche, die vom Kofaktor eines Trimers über die zweizählige Symmetrieachse zu einem Kofaktor des benachbarten Trimers verläuft. Außerdem war schon erkennbar, dass die Reste 148-157 im Komplex fixiert und damit in der Elektronendichte definiert sind. Am DESY konnte ein Datensatz bis zu einer Auflösung von 2,5 \AA und einem R_{sym} von 6,8 % gemessen werden (Tab. 4). Mit Hilfe der mit diesem Datensatz berechneten Elektronendichtekarte konnten die fünf Aminosäuren des Peptides sowie die fehlenden Reste des Enzyms dem Modell hinzugefügt werden. Mehrere Zyklen Verfeinerung und manuelles Anpassen des Modells an die neuen Elektronendichtekarten sowie der Einbau der definierten Wassermoleküle führten zu einem R_{cryst} von 20,9 % und einem R_{free} von 22,6 % (Tab. 5). Hierbei wurde jedoch die NCS bei den Atomen des Peptides und der Reste 148-157 nicht berücksichtigt. Dies war nötig, da sich die Positionen dieser Reste von Untereinheit zu Untereinheit bedingt durch unterschiedliche Kristallkontakte unterscheiden.

4.3.3. MrsD

Von einem Kristall aus der Phosphatbedingung konnte ein erster Datensatz bis zu einer Auflösung von 3,7 \AA gemessen werden (Tab. 6). Der Matthews-Koeffizient, und die Selbstrotationsfunktion deuteten darauf hin, dass sich nur ein Molekül in der asymmetrischen Einheit befindet. Die Patterson-Suche mit einem Molekül des EpiD als Modell ergab jedoch keine

Tabelle 6: Statistik der Datensammlung des MrsD

	Datensätze	
	MrsD1	MrsD2
Datensammlung		
Raumgruppe	F432	F432
Auflösung [Å]	3.50	2.54
letzte Schale [Å]	3.50-3.69	2.54-2.68
Anzahl der unabhängigen Reflexe	3971	10384
Multiplizität	6.3 (6.5)	6.7 (6.8)
Vollständigkeit [%]	95.8 (96.4)	99.4 (99.5)
R _{sym} [%]	13.1 (35.2)	4.8 (32.5)
„mean“ I/σI	15.7 (5.0)	24.2 (5.4)

Der Datensatz MrsD1 ist von einem Kristall aus der Phosphat- auf einem Drehanodengenerator, MrsD2 von einem Kristall aus der Tartratbedingung an der BW6, DESY, Hamburg gemessen.

$$R_{\text{sym}} = \sum |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum \langle I(h) \rangle$$

Lösung. Da die Raumgruppe F432 jedoch eine spezielle Position mit der gleichen Symmetrie wie das Partikel des EpiD besitzt, wurde das Partikel an dieser Stelle positioniert und so gedreht, dass die Symmetrieachsen des Partikels mit den kristallographischen Achsen übereinstimmen. Eine mit einem Poly-Alanin-Modell berechnete Elektronendichtekarte zeigte die meisten Seitenketten und die Sequenz konnte auch mit Hilfe der Sequenzüberlagerung mit der Sequenz des EpiD lokalisiert werden. Die meisten Seitenketten konnten schon in diese Dichtekarte eingepasst werden. Nach einer Runde Verfeinerung mit Protokollen zur Optimierung der Atomposition und „simulated annealing“ und anschließendem manuellen Überarbeiten des Modells wurde eine „composite omit“ Elektronendichtekarte (siehe 3.4.11) berechnet. Allerdings zeigte auch diese Dichtekarte keine deutliche Elektronendichte im Bereich des Adenosinteiles des Kofaktors und auch die Dichte für den Isoalloxazinteil war nicht deutlich. Diese Bereiche wurden besser sichtbar, als ein Datensatz eines Kristalls von der Tartratbedingung mit zusätzlichem FAD am DESY bis zu einer Auflösung von 2,54 Å gemessen werden konnte. Weitere Runden Verfeinerung und anschließendes manuelles Einpassen des Modells in die neu berechneten Elektronendichtekarten sowie der Einbau der definierten Wassermoleküle senkten den kristallographischen R-Faktor auf 23,0 % und den freien auf 26,0 % (Tab. 7). Das Modell enthält die Reste 3-155 und 168-185, die Reste 156-167 sind wie beim EpiD in der Elektronendichtekarte nicht definiert.

Tabelle 7: Statistik der Verfeinerung des MrsD

	MrsD
Auflösung [\AA]	2.54
Reflexe im Arbeitsset	9815
Reflexe im Testset	529 (5 %)
R_{cryst} (%)	23.0
R_{free} (%)	26.0
Anzahl der Atome (nicht Wasserstoff)	
Protein	1345
Lösungsmittel	69
Kofaktor	53
durchschnittlicher B-Faktor (\AA^2)	56.4
RMS ΔB (\AA^2)	1.74
RMS Abweichung von Idealwerten	
Bindungslängen (\AA)	0.008
Bindungswinkel ($^\circ$)	1.14

4.4. Struktur von EpiD und MrsD

Da die Strukturen von EpiD und MrsD nahezu identisch sind, werden die beiden Proteine im Folgenden gemeinsam beschrieben, wobei die genannten Eigenschaften in der Form EpiD/MrsD angegeben werden. Ein wesentlicher Unterschied besteht im gebundenen Kofaktor, FMN bei EpiD und FAD bei MrsD. Eine Insertion von 2 Resten vor α -Helix H4 kann auch im Sequenzvergleich identifiziert werden, ebenso die sechs zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus und die fünf am C-Terminus. Die Aminosäuren 3-7 des MrsD formen eine kleine α -Helix (H0) vor β -Strang S1, die sich an der Proteinoberfläche befindet, jedoch keinen Kontakt zu benachbarten Molekülen hat, auch nicht zu symmetrieverwandten im Kristall.

4.4.1. Partikel

Beide Proteine bilden sowohl im Kristall als auch in Lösung, wie durch Gelfiltrationsexperimente bestätigt (Kupke *et al.*, 2000), Homododekamere, deren zwölf Moleküle ein Tetramer von Trimeren formen. Die Mittelpunkte der Trimere liegen jeweils auf einer Spitze eines Tetraeders, die Ebene der Trimere ist parallel zur gegenüber liegenden Seite (Abb. 9). Daraus resultiert eine 23-Punktsymmetrie des Partikels, welches einen Durchmesser von ca. 100 \AA hat und einen Hohlraum von ca. 35 \AA im Durchmesser einschließt. Die Trimere bilden ein Prisma mit einer Seitenlänge von etwa 65 \AA und einer Höhe von 35 \AA (Abb. 10). Innerhalb

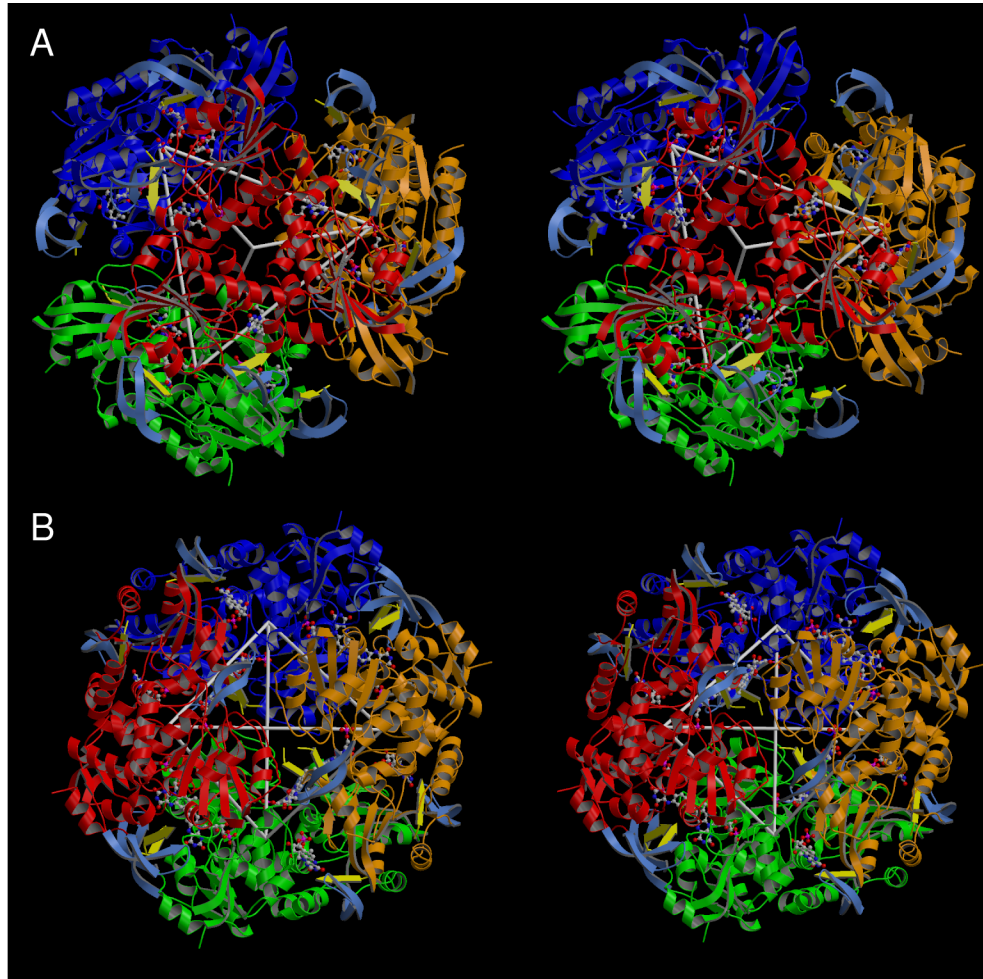


Abbildung 9: Dodekamer des EpiD

A) Stereoabbildung des Partikels entlang der dreizähligen Symmetrieachse. Jedes Trimer ist in einer eigenen Farbe dargestellt. Die Substratbindungskammern sind in hellblau, die Substratpeptide in gelb und die FMN-Kofaktoren als "ball and sticks" dargestellt. Die Spitzen des Tetraeders entsprechen den Schwerpunkten der Trimere.

B) Stereoabbildung des Partikels entlang der zweizähligen Symmetrieachse

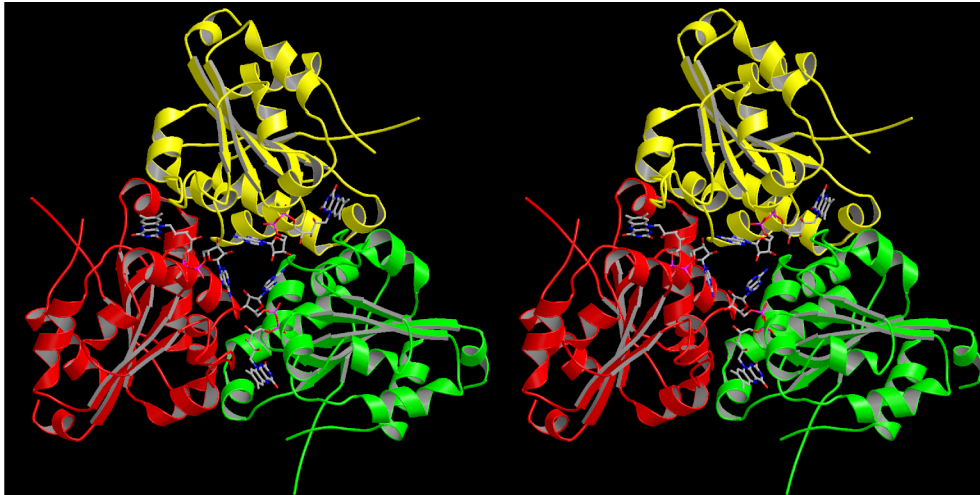


Abbildung 10: Trimer von MrsD

Stereoabbildung eines Trimers von MrsD entlang der dreizähligen Drehachse mit Blickrichtung aus dem Innern des Partikels. Der Kofaktor FAD ist als „sticks“ dargestellt.

des Dodekamers hat jede Untereinheit Kontakt zu zwei benachbarten Molekülen innerhalb des Trimers und einem Molekül des benachbarten Trimers. Die Trimerkontaktflächen werden von Resten der α -Helices H5, H7 und des N-terminalen Endes von H8 gebildet. Letztere haben Kontakt zum N-terminalen Ende von α -Helix H5, C-terminalen Ende von H6 und der Verbindung der beiden Helices. Der N-Terminus von H4 trägt indirekt über den Kofaktor FMN, der im Zentrum der Kontaktfläche signifikant zu den Wechselwirkungen beiträgt, und direkt durch Seitenketten zu den Trimerkontakten bei. Die Dimerkontaktflächen werden von der α -Helix H1, der 3_{10} -Helices H2 und H3 und der verbindenden „coil“-Region gebildet. Das C-terminale Ende von H2 kontaktiert H3 des benachbarten Moleküls und umgekehrt, wie es die zweifache Symmetrie bedingt. Diese Kontaktfläche enthält außerdem fünf Wassermoleküle. Durch die Oligomerbildung sind 28,3 % der Oberfläche eines Monomers verdeckt. Die Kontaktflächen innerhalb der Trimere sind mit 1864 \AA^2 (22,4 %) deutlich größer als die zwischen den Trimeren mit 475 \AA^2 (5,9 %). Erstere setzen sich aus 68 % hydrophilen und 32 % hydrophoben Wechselwirkungen zusammen, letztere aus 69 % und 31 %. Die Wechselwirkungen sind in Abb. 11 detailliert dargestellt. Zu den Wechselwirkungen innerhalb eines Trimers tragen hauptsächlich die α -Helices H6 und H7, sowie der diese verbindende „loop“ bei, die sich zwischen den β -Strängen S4 und S5 befinden. Zusätzliche Kontakte werden von den α -Helices H7 und H8 am oberen Rand des Trimers gebildet. Das benachbarte Protomer ist außerdem an der Bindung des Dimethylbenzylringes und der Phosphoribosylgruppe des FMN beteiligt. Die Kontaktfläche zwischen den Trimeren ist symmetrisch zur zweifachen Rotationsachse und beinhaltet neben einigen hydrophilen Aminosäuren fünf Wassermoleküle.

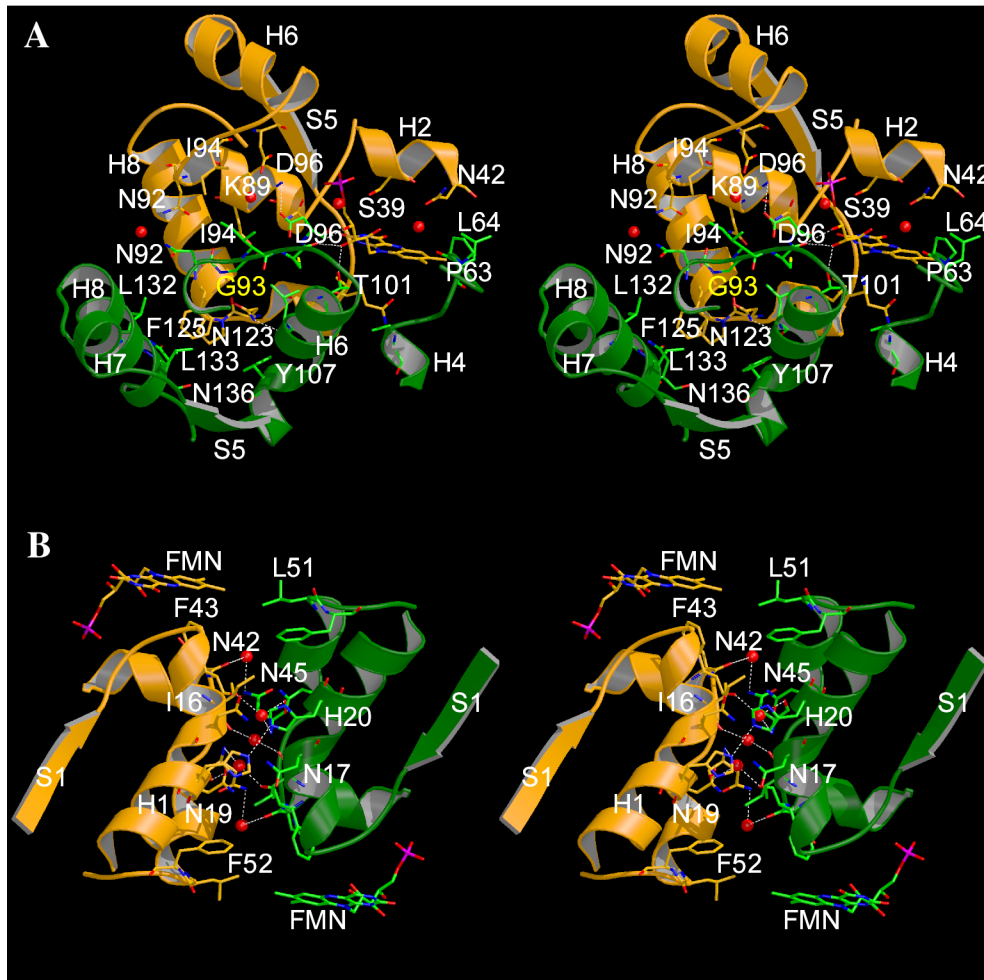


Abbildung 11: Kontaktflächen zwischen den Protomeren

Die an den Wechselwirkungen beteiligten Aminosäure sind als „sticks“ und Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt. Die Kohlenstoffatome der FMN-Moleküle sind mit den gleichen Farben dargestellt, wie das Protomer, dem es zugeordnet werden kann.

A) Wechselwirkungen zwischen zwei Protomeren eines Trimers. Das Gly93, welches bei einer natürlichen Mutante gegen Asp ausgetauscht ist, ist gelb markiert.

B) Wechselwirkungen zwischen zwei Trimeren.

Sie bildet einen grossen Teil der Substratbindungsstelle, welche vom Kofaktor in Richtung auf die zweifache Rotationsachse verläuft (Abb. 9B). Der Abstand zwischen den Stickstoffatomen N5 der beiden FMN-Moleküle beträgt 29 Å.

4.4.2. Monomere

Die Monomere bestehen aus einer einzelnen Domäne mit einer Rossmann-artigen Faltung (Rossmann *et al.*, 1974), die aus drei Schichten besteht (Abb. 12B). Die beiden äusseren werden von α -Helices, die mittlere von einem sechssträngigen parallelen β -Faltblatt gebildet. Die Ebene des Faltblattes ist parallel, die β -Stränge jedoch laufen im rechten Winkel zur dreizähligen Achse der Trimere (Abb. 10). Die Anordnung der Faltblattstränge in einer 3-2-1-4-5-6 Topologie führt zu einer 2-fachen topologischen Symmetrie. Diese wird auch durch die auf S1, S2, S4 und S5 folgenden Helices eingehalten, die ersten beiden zeigen nach vorne, die anderen zwei nach hinten (Abb. 12 A).

4.4.3. Charakteristische Sequenzmotive und Kofaktor-Bindung

Die Kofaktoren FMN und FAD sind in der Trimerkontaktfläche verborgen (Abb. 11 A) und von drei Untereinheiten umgeben, können jedoch aufgrund der Mehrheit der Wechselwirkungen vor allem mit den Aminosäuren des PASANT-Motives klar einem Molekül zugeordnet werden. Der Isoalloxazinring ist am C-terminalen Ende, zwischen den beiden Hälften des β -Faltblattes lokalisiert und steht senkrecht auf dessen Ebene. Die „loop“-Regionen, die die β -Stränge und α -Helices S1/H1, S2/H2, S4/H5 und S5/H7 verbinden, tragen zur Bindung des Kofaktors bei (Abb. 12). Zwei dieser Regionen werden von den Aminosäuren der zwei für die Familie der HFCD-Proteine charakteristischen Sequenzmotive gebildet (Kupke *et al.*, 2000). Die Region S4/H5 enthält das am stärksten konservierte Motif PAS/TANT/I (Reste 81-86/89-94), das den Pyrimidinteil des Isoalloxazinringes durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Peptid-Stickstoff von Ala84/92 und Sauerstoff O3 des Kofaktors stützt. Die Reste Ser83/Thr91, Asn85/93 und Thr86 von EpiD binden mit ihren hydrophilen Seitenketten die Phosphatgruppe. MrsD besitzt anstelle von Thr86 ein Isoleucin, welches keine Wechselwirkung mit der Phosphatgruppe eingehen kann. Pro81/89 und Ala82/90 haben keinen direkten Kontakt zum Kofaktor, aber Pro81/89 nimmt eine unübliche cis-Konformation ein, die in einem scharfen Knick nach S4 resultiert. Diese Geometrie scheint für die Bindung nötig zu sein, da die EpiD-Mutante Pro81Ala kein FMN mehr binden kann (Kupke *et al.*, 2000). Das Sequenzmotiv PnMNirMW (114-121) bzw. PnMNdlMW (122-129) bildet die Verbindung zwischen S5 und H7 und hat nur wenige Kontakte zum Pyrimidinteil

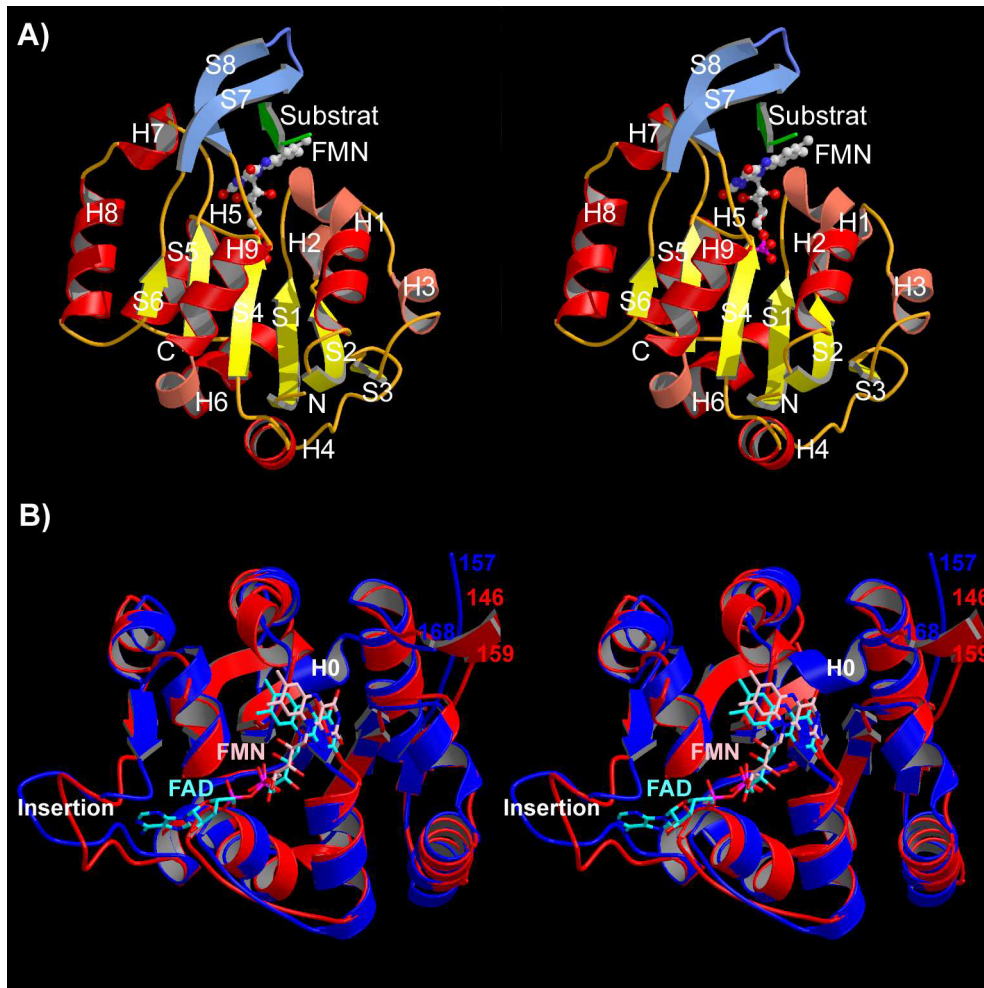


Abbildung 12: Monomere von EpiD und MrsD

A) Stereoabbildung eines Protomers des Komplexes von EpiD mit DSYTC. Der Kofaktor ist als „balls and sticks“ dargestellt. β -Stränge sind gelb, α -Helices rot, 3_{10} -Helices hellrot und „coil“-Regionen orange gefärbt. Das Substrat (grün) wird von der Substratbindekammer (hellblau) eingeschlossen.

B) Stereoabbildung einer Überlagerung von Monomeren von EpiD und MrsD. MrsD ist blau und EpiD rot gefärbt. Die Kofaktoren FMN (pink) und FAD (cyan) sind als „sticks“ dargestellt. Der jeweils letzte Rest vor und erste nach dem undefinierten Bereich ist nummeriert. Die zusätzliche Helix von MrsD am N-Terminus ist mit H0 gekennzeichnet. Deutlich zu sehen sind auch die drei Schichten der Rossmann-artigen Tertiärstruktur, α -Helices oben und unten sowie das zentrale β -Faltblatt in der Mitte.

des Kofaktors. Nur Asn115/123 bildet mit seinem Peptidcarbonylsauerstoff eine Wasserstoffbrücke zu FMN/FAD-N3 (2,5/2,9 Å) und seiner Amidgruppe eine polare Wechselwirkung zu FMN/FAD-O4 (3,5/3,2 Å). Met120/128 befindet sich oberhalb des Pyrimidinsystems mit einem Abstand von 4,2/3,7 Å von C2 und ist Teil eines hydrophoben „Clusters“, der außerdem aus den Resten Pro114/122, Met116/124 und Trp121/129 besteht. Letzteres stützt Pro143/151, am Anfang der Substratbindungsklammer, an der Außenseite des Moleküls. Das konservierte Asn117/125 ist an der Substratbindung beteiligt (Abb. 13 und 14).

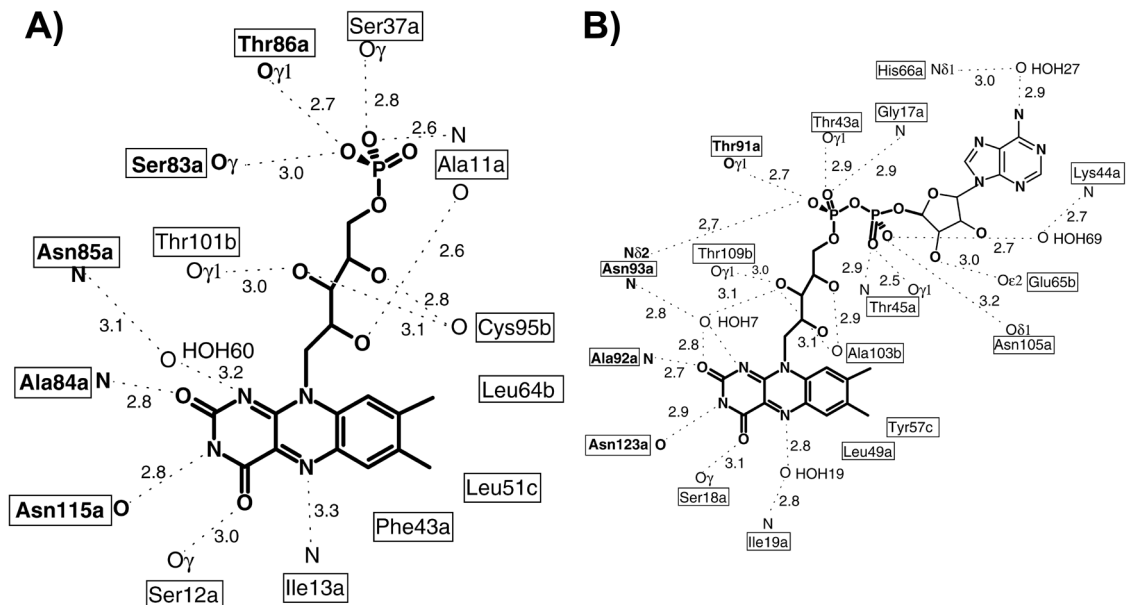


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Bindung von FMN und FAD

Die Aminosäuren der charakteristischen Sequenzmotive sind fett dargestellt. Reste des Protomers, zu dem der Cofaktor gerechnet wird, sind mit a, die des benachbarten Protomers mit b und die des Protomers vom benachbarten Trimer mit c gekennzeichnet. A) FMN und die Aminosäuren des EpiD, die Wechselwirkungen mit dem Cofaktor eingehen. Die Reste Phe43a, Leu64b und Leu51c haben van-der-Waals-Kontakte zum Dimethylbenzolring des FMN. Weitere hydrophobe Wechselwirkungen bestehen zwischen dem Pyrimidinring und Ser12a, Ile13a und Ser83a, sowie der Ribitylkette und Asn85a und Thr101b.

B) FAD und die Aminosäuren des MrsD. Hydrophobe Kontakte bestehen zwischen dem Dimethylbenzolring und den Resten Leu49a und Tyr57c, sowie zwischen dem Pyrimidinring und den Resten Ser18a und Ile19a, der Ribitylgruppe und Asn93a und Thr109b, sowie der Adenosylgruppe und Lys44a.

Da die Adenosylgruppe des FAD an die dreizählige kristallographische Drehachse herantreibt (Abb. 10), ergaben sich zwei Möglichkeiten, diese in die Elektronendichte einzupassen. Bei der gestreckteren und energetisch bevorzugten Konformation war jedoch die Elektronendichte um die Base nach einer erneuten Phasierung schlechter als bei der zweiten. Bei der zweiten Möglichkeit steht das C5 der Ribosyleinheit nahezu axial zum Ring. In dieser Kon-

formation passen jedoch auch die beiden Hydroxylgruppen der Ribose besser in die Elektrodichte (Abb. 14B). Dieser Teil des Kofaktors wird vom N-Terminus von H2 (Lys44 und Thr45), den „loop“-Regionen nach S3 (Glu65 und His66) und zwischen H5 und H6 (Ala103) sowie H6 (Thr109) gebunden.

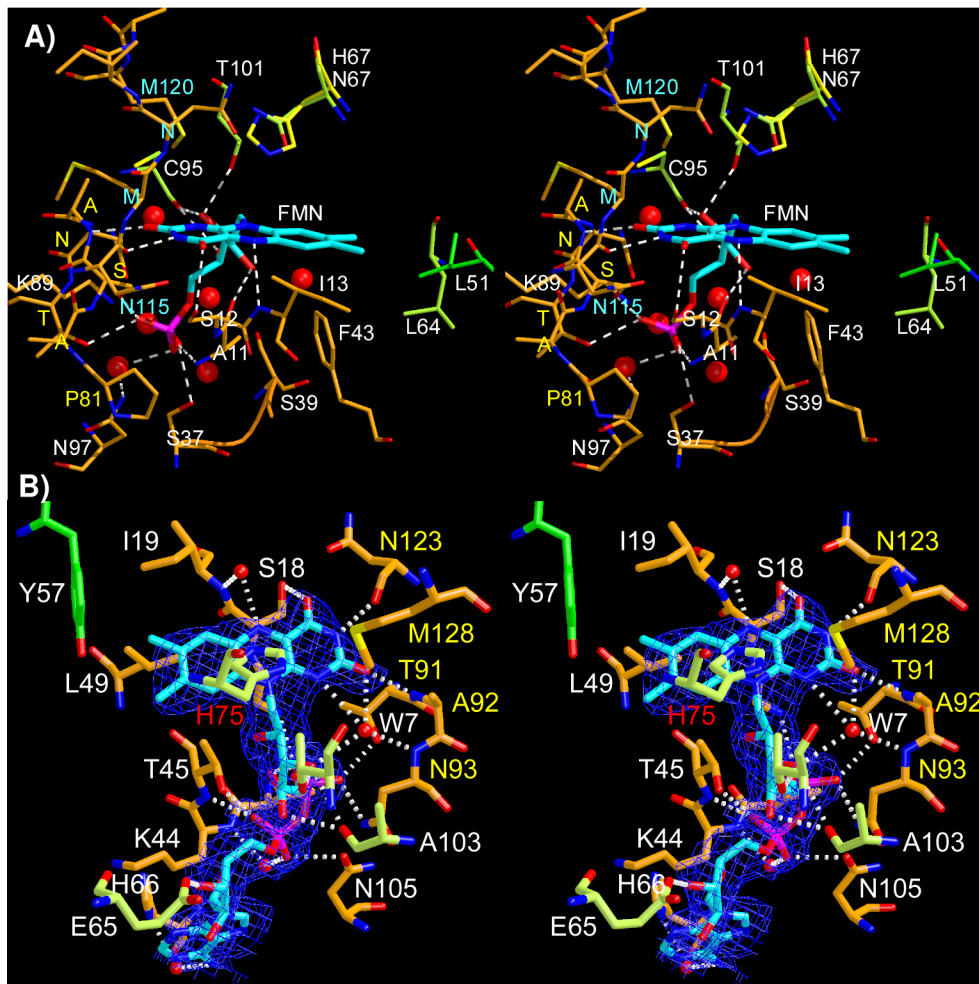


Abbildung 14: Kofaktorbindung bei EpiD und MrsD

Die Kohlenstoffe der Aminosäuren des Protomers, dem der jeweilige Kofaktor zugeordnet wurde, sind orange, diejenigen des benachbarten Protomers gelbgrün und des benachbarten Trimers grün gefärbt. Die Reste der charakteristischen Sequenzmotive sind mit gelber Schrift gekennzeichnet. A) Stereoabbildung der FMN-Bindestelle des EpiD.

B) Stereoabbildung der FAD-Bindestelle des MrsD. Das hochkonservierte Histidin ist mit roter Schrift gekennzeichnet. Das Thr109b wurde wegen der besseren Übersichtlichkeit nicht gekennzeichnet. Die dargestellte Elektronendichtekarte ist eine „simulated annealing omit map“, d.h. bei der Berechnung wurden die Atome des FAD und diejenigen mit einem Abstand von weniger als 5 Å zum FAD nicht berücksichtigt. Außerdem wurde vorher ein „simulated annealing“ (siehe 3.4.10.3) mit einer Starttemperatur von 1000K und einer Abkühlrate von 25K/Zyklus durchgeführt. Die Elektronendichte ist bei 1σ kontouriert.

Innerhalb des Trimers tragen beim EpiD die Reste 64-67, die sich vor der α -Helix H4 befinden und die katalytisch aktive Aminosäure His67 enthalten, zur Kofaktorbindung bei. Beim MrsD hat nur die katalytische Base His75 am Anfang der Helix H4 Kontakt zum FAD, das Äquivalent zu EpiD-Leu64 geht jedoch keine Wechselwirkung mit dem Kofaktor ein. Die Phosphoribosyl-Gruppe wird hauptsächlich von Aminosäuren einer Untereinheit in einer hydrophilen Vertiefung, die sich ins Innere des Partikels öffnet, verankert. Das benachbarte Trimer hat nur mit dem C γ 1 von Leu51 bzw. mit Tyr57 Kontakt zur C7-Methylgruppe des Kofaktors.

Das oxidierte Isoalloxazinsystem ist planar und die *re*-Seite ist dem Substrat zugewandt. Die Einheit N1-C2=O2 des Pyrimidinteils bildet mit O2 eine Wasserstoffbrücke zum Amidstickstoff von Ala84/92(2,8/2,7 Å). Es befinden sich jedoch keine positiv geladenen Aminosäuren oder Wasserstoffbrückendonoren in der Nähe von N1, die eine im Verlauf der Reaktion auftretende negative Ladung stabilisieren könnten. N ϵ von His67/75 (4,6/4,2 Å) und O3 der Ribosylgruppe (4,1/4,3 Å) sind zu weit entfernt, jedoch bildet ein Wassermolekül, das an gleicher Position auch in AtHal3 gefunden wurde (Albert *et al.*, 2000), Wasserstoffbrücken zu N1 (3,2/3,3 Å), O2 (3,0/2,9 Å) des Isoalloxazinringes und O3 (2,8/3,1 Å) der Ribosylgruppe. Beim EpiD bildet der Peptid-Stickstoff von Ile13, der in der Ebene durch N5 und N10 liegt, eine Wasserstoffbrücke zu N5 (substratfrei 3,4 Å, im Komplex 3,2 Å) und schließt mit ersteren Atomen einen Winkel von 126° ein. Sowohl die Distanz als auch der Winkel liegen in den bei anderen Flavoproteinen gefundenen Bereichen von 2,8-3,3 Å bzw. 116-170° (Fraaije und Mattevi, 2000). Beim MrsD ist die Distanz von 3,9 Å zwischen dem Peptid-Stickstoff von Ile19 und N5 zu groß für eine Wasserstoffbrücke, der Winkel würde mit 146° im üblichen Bereich liegen. Ohne Substrat findet man jedoch ein Wassermolekül, welches Wasserstoffbrücken zu den beiden Atomen bildet. N3 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonyl-Gruppe von Asn115/123 (2,8/2,9 Å). N ϵ der katalytisch aktiven Aminosäure His67/75 ist auf der *re*-Seite, 3,5/3,3 Å oberhalb des Isoalloxazinringes, in einer Entfernung von 4,5/4,3 Å von N5 und mit einem Winkel von 86°/89° zwischen N5, N10 und N ϵ lokalisiert.

4.5. Substratkomplex

Ein Substratkomplex konnte leider bisher nur von der EpiD-Mutante H67N mit dem Pentapeptid DSYTC kristallisiert werden. Entsprechende Versuche mit MrsD-H75N und AtHAL3-H90N mit PPC schlugen fehl, letzteres wahrscheinlich aufgrund der geringen Löslichkeit von PPC in der Proteinlösung und im Kristallisationstropfen. Ebenso schlugen Versuche mit nativem EpiD und den Pentapeptiden DSYTC, DSYTS und DSYTA fehl. DSYTC wird wahr-

scheinlich umgesetzt, das Produkt hat eine niedrigere Affinität und diffundiert wieder weg.

4.5.1. Substraterkennungsklammer und Substratspezifität

Um die Substratbindung von EpiD zu untersuchen, wurde die inaktive Mutante EpiD-H67N mit dem Pentapeptid DSYTC kokristallisiert. Dieses Peptid wurde ausgewählt, da es eine höhere Löslichkeit gegenüber dem natürlichen C-Terminus von EpiA, NSYCC oder SYCC, welches das kürzeste Substrat von EpiD ist, besitzt. Das vorletzte Cystein wurde durch Threonine ersetzt, um intramolekulare Disulfidbrücken zu vermeiden. Diese Änderungen haben keine Auswirkung auf die Substraterkennung (Kupke *et al.*, 1995). Die Mutante, bei der die reaktive Base His67 gegen Asn ausgetauscht wurde, verhindert eine Umsetzung des Substrates, da dieser Austausch zu einem totalen Verlust der enzymatischen Aktivität führt. Das Pentapeptid wird analog zu EpiA nummeriert, d.h. P-Asp18 bis P-Cys22.

Das Pentapeptid ist in einem Kanal gebunden, der die zweifache Symmetrieachse des Partikels mit dem Kofaktor verbindet und nimmt eine gestreckte Konformation ein (siehe Abb. 9B). Die Elektronendichte ist gut definiert (Abb. 15). Es wird dort von einer Substratbindungsklammer (SBK) eingeschlossen (Abb. 16), die von den Resten Pro143 bis Met162 gebildet wird und aus zwei stark verdrehten antiparallelen β -Strängen (S7 und S8, Abb. 12) besteht. Diese Verdrehung führt zu einer rechtsgedrehten doppelhelikalen Tertiärstruktur mit einem nahezu 90° Knick bei den Resten Lys147 und Asn158. Die Aminosäuren Ser152, Ser153 und G154 bilden die Haarnadelschleife zwischen den beiden β -Strängen, die zusammen mit dem Substratpeptid ein dreisträngiges β -Faltblatt formen, wobei das Peptid parallel zu S7 verläuft. Die anderen Seiten des Substrates sind dem N-Terminus der α -Helix H1 und dem „Loop“ zwischen S5 und H7 (PXMNXXMW-Motiv) zugewandt. Die erste Aminosäure der Klammer, Pro143, ist durch eine hydrophobe Wechselwirkung zu Trp121 fixiert, wohingegen die letzte, Met162, Kontakt zu Pro81 des PASANT-Motives hat. Die Klammer ist ferner durch die C-terminale α -Helix H9 an der Proteinoberfläche verankert. Die leicht unterschiedlichen Konformationen, die die Klammer und das Peptid in den vier kristallographisch unabhängigen Untereinheiten einnimmt, zeigt die Anpassungsfähigkeit der Klammer an das Substrat mit einer ungewöhnlich breiten Spezifität. Diese leicht verschiedenen Geometrien kommen durch unterschiedlich starke Kristallkontakte der vier Untereinheiten zustande. Trotzdem nehmen die Substrat-Cysteine und die sowohl in der apo- wie auch Komplexstruktur geordneten Reste praktisch identische Positionen ein.

Des Weiteren tragen Aminosäuren von zwei weiteren Untereinheiten zur Substratbindung bei. Eine davon ist Ile68 von der benachbarten Untereinheit des gleichen Trimers. Es fixiert das Substrat-Cystein P-Cys22 in seiner Position relativ zum FMN mittels hydrophober Wech-

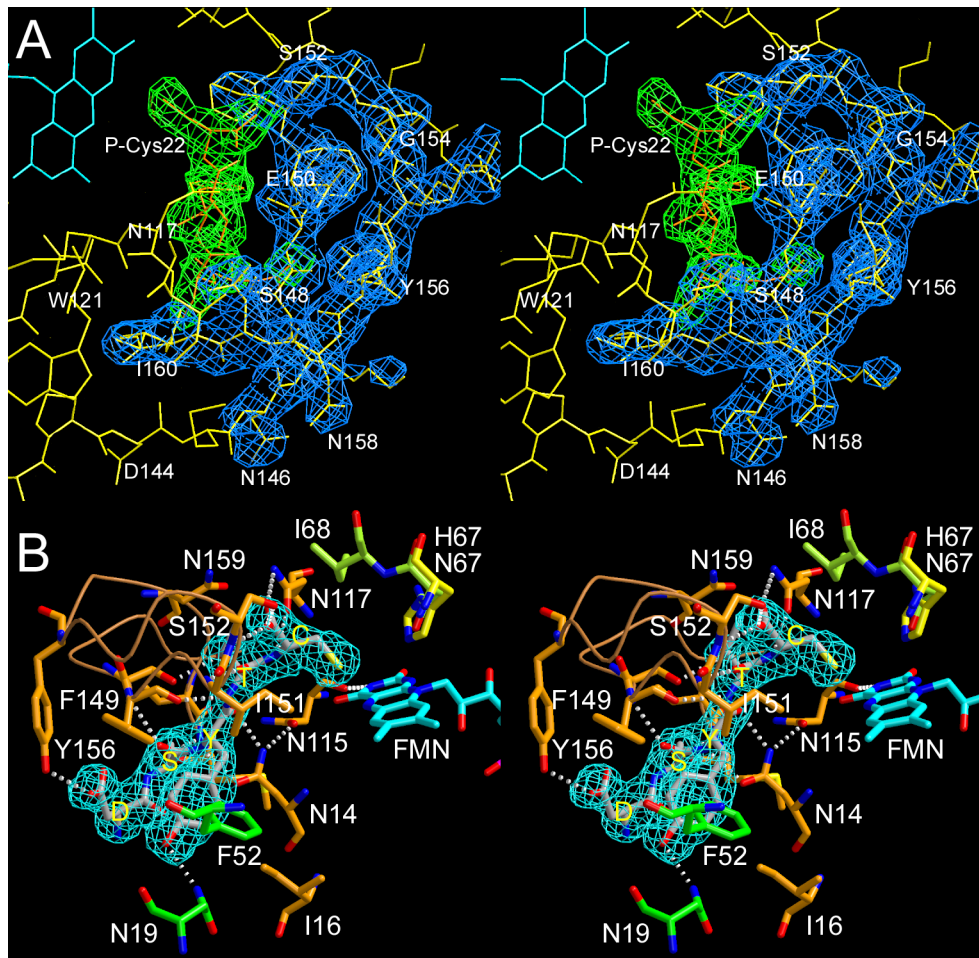


Abbildung 15: Substratbindung des EpiD

A) Stereoabbildung der Elektronendichten des Substratpeptides und der Substraterkennungsklammer. Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarten sind bei 1σ konturiert. Die Dichte um das Peptid ist in grün, diejenige um die SBK in blau dargestellt.

B) Detaillierte Stereoabbildung der Substratbindestelle. Die Reste der Untereinheit des dargestellten Kofaktors (Kohlenstoffatome hellblau) sind mit orangenen Kohlenstoffatomen dargestellt, die Reste der benachbarten Untereinheit in gelbgrün und des benachbarten Trimers in grün. Die Position von His67 (gelbe Kohlenstoffe) wurde durch Überlagerung des FMN der substratfreien Struktur mit dem Komplex erhalten. Der Verlauf der Substraterkennungsklammer ist in der „coil“-Darstellung hervorgehoben.

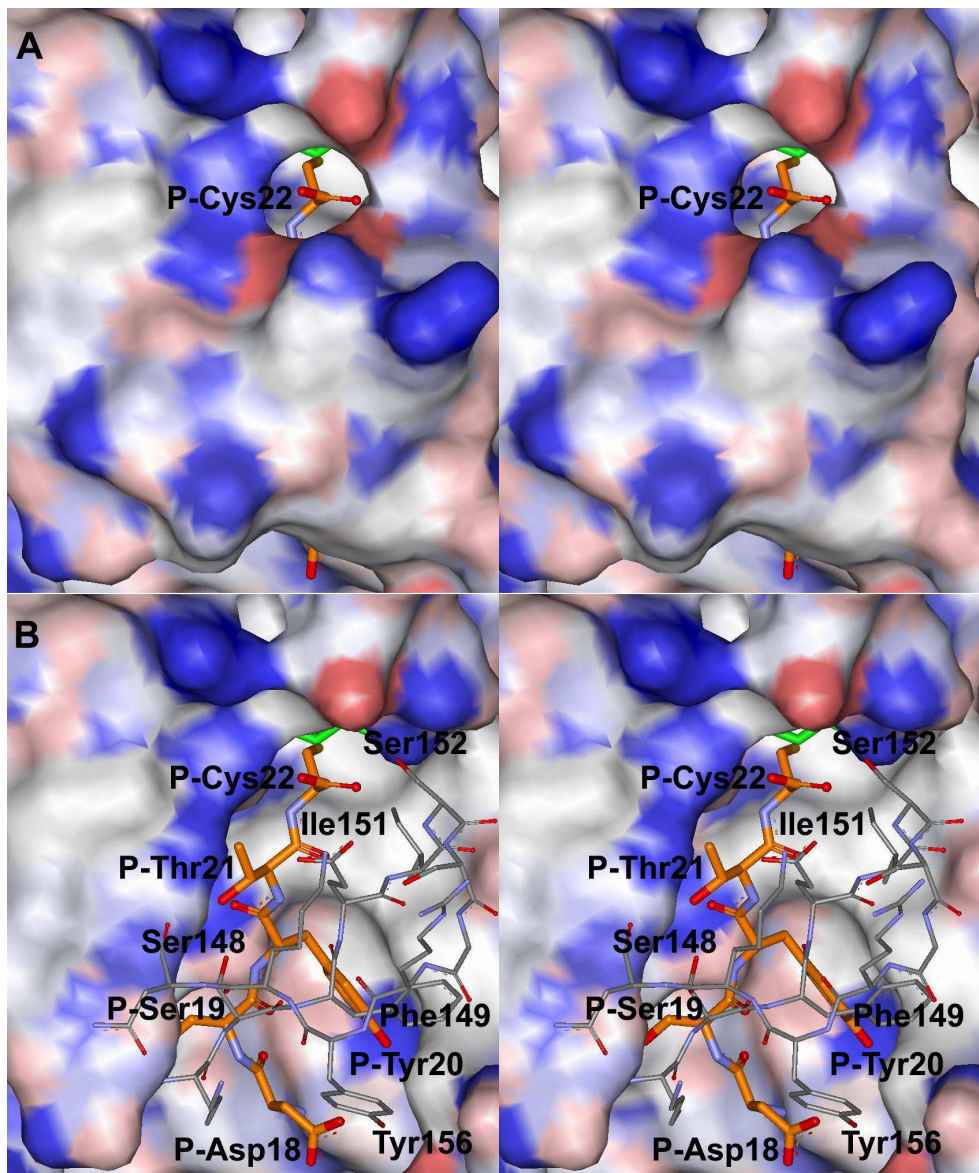


Abbildung 16: Oberflächendarstellung der Substratbindungsklammer

A) Stereoabbildung der Oberfläche der Substratbindungsklammer. Das Substrat, in A) ist nur das C-terminale Cystein sichtbar, ist mit orangenen Kohlenstoffatomen als „Sticks“ dargestellt. Das $S\gamma$ -Atom zeigt vom Betrachter weg, wobei dessen gelbe Farbe nur schlecht zu sehen ist. Vom Kofaktor FMN ist nur das C6-Atom des Dimethylbenzylringes zu sehen (grün dargestellt). Deutlich ist auch die Öffnung zu sehen, durch die das entstehende CO_2 entweichen kann.

B) Stereoabbildung mit der gleichen Orientierung wie A), wobei bei der Berechnung der Oberfläche die Aminosäuren Lys147-Asn158 der Substratbindungsklammer nicht berücksichtigt wurden. Diese sind mit grauen Kohlenstoffatomen in der „stick“-Darstellung hervorgehoben.

selwirkungen zur Methylengruppe. Reste des benachbarten Trimers tragen ausschließlich zur Bindungstasche für die Seitenkette des P-Tyr20 bei, die sich aus zwei Teilen zusammensetzt. Der erste Teil setzt sich aus unbeweglichen Resten an der Proteinoberfläche zusammen, z. B. Ile13-Asn17 und Asn115 der gleichen Untereinheit, sowie Asn19, His20, Val23 und Phe52 vom benachbarten Trimer. Den zweiten Teil bilden die Aminosäuren Phe149 und Ile151 der SBK (Abb. 17). Die Bindung des großen aromatischen Restes enthält also einen „induced fit“-Mechanismus.

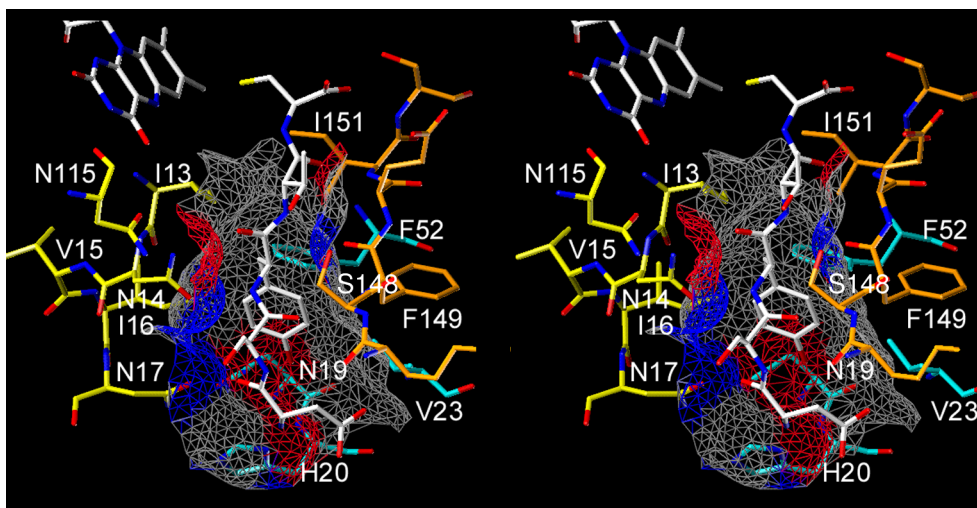


Abbildung 17: Bindungstasche des Substrat-Tyrosins

Stereodarstellung der Oberfläche der Bindungstasche für das Tyrosin des Substratpeptides. Die Oberfläche in der Netzdarstellung ist nach den Wasserstoffbrückenbindungseigenschaften der beitragenden Reste gefärbt: blau Wasserstoffbrückendonoren, rot Wasserstoffakzeptoren

4.5.2. Aufbau des reaktiven Zentrums

Das C-terminale P-Cys22 wird durch polare und unpolare Wechselwirkungen in der Nähe der *re*-Seite des Isoalloxazinringes festgehalten (Abb. 18). Die Carboxylatgruppe wird durch Wasserstoffbrücken zu Ser152 der SBK und Asn117 des PXMNXXMW-Motifs, welches auch die Peptidbindung von P-Cys22 fixiert, gebunden. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Ile151 und $C\alpha$, sowie zwischen Ile68 und $C\beta$ und Van-der-Waals Kontakte zwischen $S\gamma$ und dem Isoalloxazinring tragen dazu bei, eine präzise Bindungsgeometrie zu definieren. Die Atome der Carboxylatgruppe sind die einzigen von P-Cys22, die teilweise Kontakt zum Lösungsmittel haben, so dass das freiwerdende Kohlendioxid ungehindert das reaktive Zentrum verlassen kann. Die Abstände zwischen Substrat- und Kofaktor-Atomen betragen

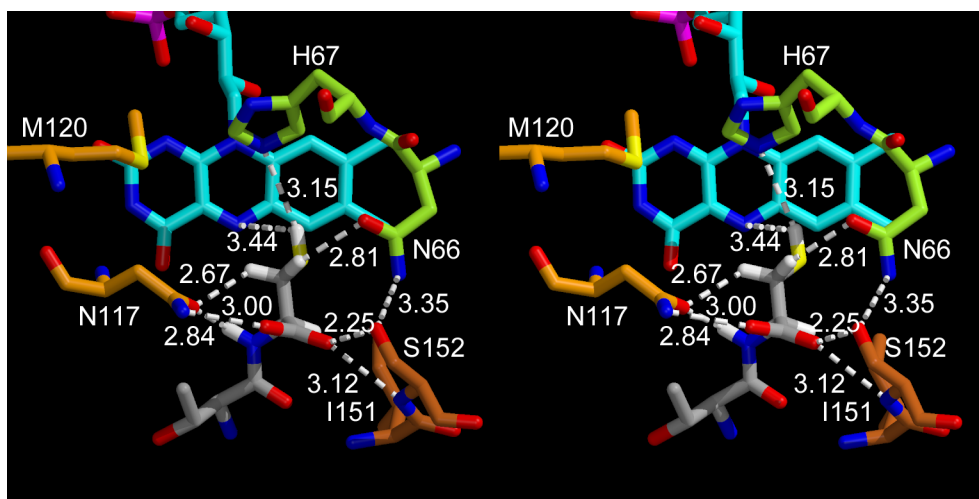


Abbildung 18: Detailansicht des aktiven Zentrums

Die reaktive Base His67 wurde nach Überlagerung der Kofaktoren der Kristallstrukturen mit und ohne Substrat in das Modell des Substratkomplexes übertragen und die Wasserstoffatome in der bevorzugten Konformation eingefügt. Das Isoleucin 68, welches zwischen His67 und P-Cys22 lokalisiert ist, wurde entfernt, da es die Sicht auf P-Cys22 verdecken würde (vgl. Abb. 15 B). Die $C\beta$ -Wasserstoffe befinden sich in einer hydrophilen Umgebung, das $C\alpha$ -Wasserstoffatom jedoch wird durch eine hydrophobe Wechselwirkung mit Ile151 abgeschirmt. Die cis-Konfiguration des Enthiol-Produktes deuten auf eine Bewegung des Schwefelatoms $S\gamma$ in Richtung N5 hin. Die Carboxylatgruppe wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Asn117 und Ser152 fixiert.

3,7 Å zwischen $S\gamma$ und N5, bzw. 3,4 Å zwischen N5 und dem Thiol-Wasserstoffatom, das in der bevorzugten Konformation eingefügt wurde. Die Atome $C\alpha$ und $C\beta$ sind 5,0 Å und 5,9 Å von N5 entfernt.

4.5.3. Theoretisches Modell eines Komplexes von MrsD mit dem Pentapeptid AECIC

Nach einer Überlagerung von MrsD mit einem Protomer des Substratkomplexes von EpiD wurden die Koordinaten des Pentapeptides DSYTC und der SBK übernommen und anschließend die Aminosäuren entsprechend der Primärsequenz von MrsD und des C-terminalen Endes von MrsA ausgetauscht. Unter Verwendung der Eingabedatei „model_anneal.inp“ des CNS-Programmpaketes wurden danach die Koordinaten ohne experimentelle Daten energie-minimiert. Als Starttemperatur für das „Annealing“ wurden 500K gewählt und die Minimierung dreimal mit verschiedenen Startwerten des Zufallgenerators durchgeführt. Die Ergebnisse unterscheiden sich nur geringfügig voneinander. Eine Überprüfung der Geometrien der Ergebnisse mit dem Programm PROCHECK ergab keine auffälligen Abweichungen von den Standardwerten. Dieses Modell kann nur als qualitative Abschätzung der Verhältnisse in einem Komplex von MrsD mit einem Pentapeptid AECIC betrachtet werden. Daher werden nun auch nur die signifikanten Änderungen, vor allem die unterschiedlichen Aminosäuren, und keine Abstände diskutiert. Die auffälligste Änderung ist der Austausch von Ser148 durch Ala155 (Abb. 25). Ersteres bildet beim EpiD eine Wasserstoffbrückenbindung zu P-Thr21 (Abb. 16B und 17) und somit wahrscheinlich auch zum nativen P-Cys21. Das Alanin ist etwas kleiner und hydrophober als Serin und erlaubt so das größere und hydrophobe Isoleucin an dieser Stelle im Substratpeptid. Das Cystein, das in MrsA die Stelle von P-Tyr20 einnimmt, wird ebenso wie dieses in einer hydrophoben Tasche gebunden, die von den Resten Leu29 und F48 gebildet wird. Leu29 ersetzt Val23 von EpiD und könnte durch seine längere Seitenkette die Bindung eines größeren Aromaten an dieser Stelle verhindern. Zusätzlich kann Ser25 nach einer einfachen Drehung seiner Seitenkette eine Wasserstoffbrücke zum Cystein bilden. Weitere Unterschiede betreffen die Bindung der Carboxylatgruppe des C-terminalen Cysteins. Da Ser152 durch Ala160 ersetzt ist, fällt eine Wasserstoffbrückenbindung weg. Es kommen jedoch Wechselwirkungen mit Arg80 hinzu, das sich in Helix H4 des benachbarten Protomers befindet. Die Wechselwirkungen mit Asn125, das EpiD-Asn117 entspricht, sollten nach einer Drehung der Seitenkette in ähnlicher Weise wie beim EpiD möglich sein.

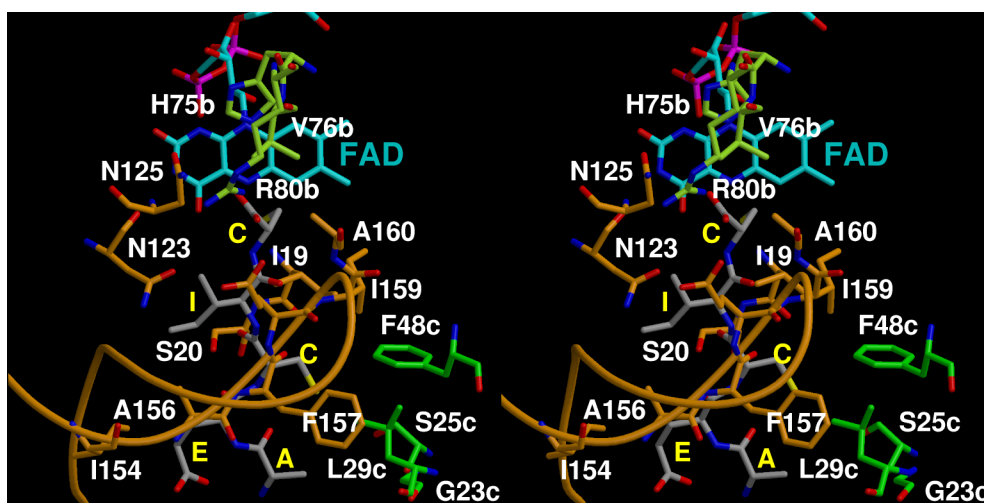


Abbildung 19: Theoretischer Substratkomplex von MrsD

Stereoabbildung eines Modelles des Komplexes von MrsD mit dem Pentapeptid AECIC. Das Peptid, FAD und die Aminosäuren, die wahrscheinlich an der Substratbindung beteiligt sind, sind als „sticks“ dargestellt. Die Farben der Kohlenstoffatome sind cyan beim FAD, grau beim Peptid, orange bei Aminosäuren des FAD bindenden Protomers und grün bei Resten des benachbarten Trimers. Der Verlauf der SBK ist als „coil“ dargestellt.

5. Diskussion

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine EpiD und MrsD sind strukturell nahezu identisch. Dies wurde schon aufgrund der hohen Sequenzhomologie erwartet. Zu AtHAL3 gibt es nur zwei signifikante Unterschiede. Erstens ist AtHAL3 ein Trimer (Albert *et al.*, 2000) und kein Dodekamer, wie es auch von der sehr kleinen Dimerkontaktfläche (4.4.1) widerspiegelt wird, und zweitens zeigt schon der Sequenzvergleich eine Insertion im „Loop“ vor der α -Helix H4. Im Folgenden werden die Gemeinsamkeiten und Unterschiede innerhalb der Familie der HFCD und mit anderen Flavoproteinen detailliert geschildert.

5.1. Vergleich mit anderen Flavoproteinen

Von allen bekannten Flavoproteinen mit einer Rossmann-artigen Tertiärstruktur wurden für die folgenden Vergleiche jeweils ein Vertreter aus der Proteindatenbank („protein data bank“, PDB) ausgewählt (Bernstein *et al.*, 1977).

Flavodoxine Die Mitglieder der HFCD-Familie sind strukturell mit den flavodoxinähnlichen Proteinen verwandt, obwohl sie keinerlei Sequenzverwandtschaft zeigen. Diese besitzen ebenso eine Rossmann-artige Tertiärstruktur, wobei das zentrale β -Faltblatt nur aus fünf β -Strängen mit der Topologie 2-1-3-4-5 gebildet wird. Die Flavodoxine sind jedoch alle Monomere im Gegensatz zu den homooligomeren HFCD-Proteinen. Die Aminosäuren der HFCD-Proteine, die sich am besten mit denen der Flavodoxine überlagern lassen, sind folglich auch nicht an der Oligomerisierung beteiligt. Obwohl die Position der Flavinbindungsstelle identisch ist, unterscheidet sich die Orientierung des Kofaktors deutlich. Bei Flavodoxinen ist die *si*-Seite, bei den HFCD-Proteinen die *re*-Seite dem Substrat zugewandt. Der deutlichste Unterschied besteht in der Position der Phosphoribityl-Kette, die auf gegensätzlichen Seiten des zentralen β -Faltblattes liegt (Fig. 20A).

Pyruvat-Oxidase Alle Proteine der HFCD-Familie, deren Strukturen bisher bekannt sind, benutzen die Polarität einer kleinen α -Helix, um die Phosphatgruppe des FMN-Teils der Kofaktoren zu binden. Auch bei der Pyruvat-Oxidase findet man diese kleine Helix, das FAD ist jedoch in der entgegengesetzten Richtung gebunden. Der Adeninteil ist an der Position des Flavins bei den HFC-Decarboxylasen und der Flavinteil an der Position des Adenin bei MrsD gebunden. Die Phosphatgruppe des FMN-Teils kommt jedoch an der gleichen Position zu liegen (Abb. 20B). Das β -Faltblatt der Pyruvat-Oxidase kann sehr gut mit dem des

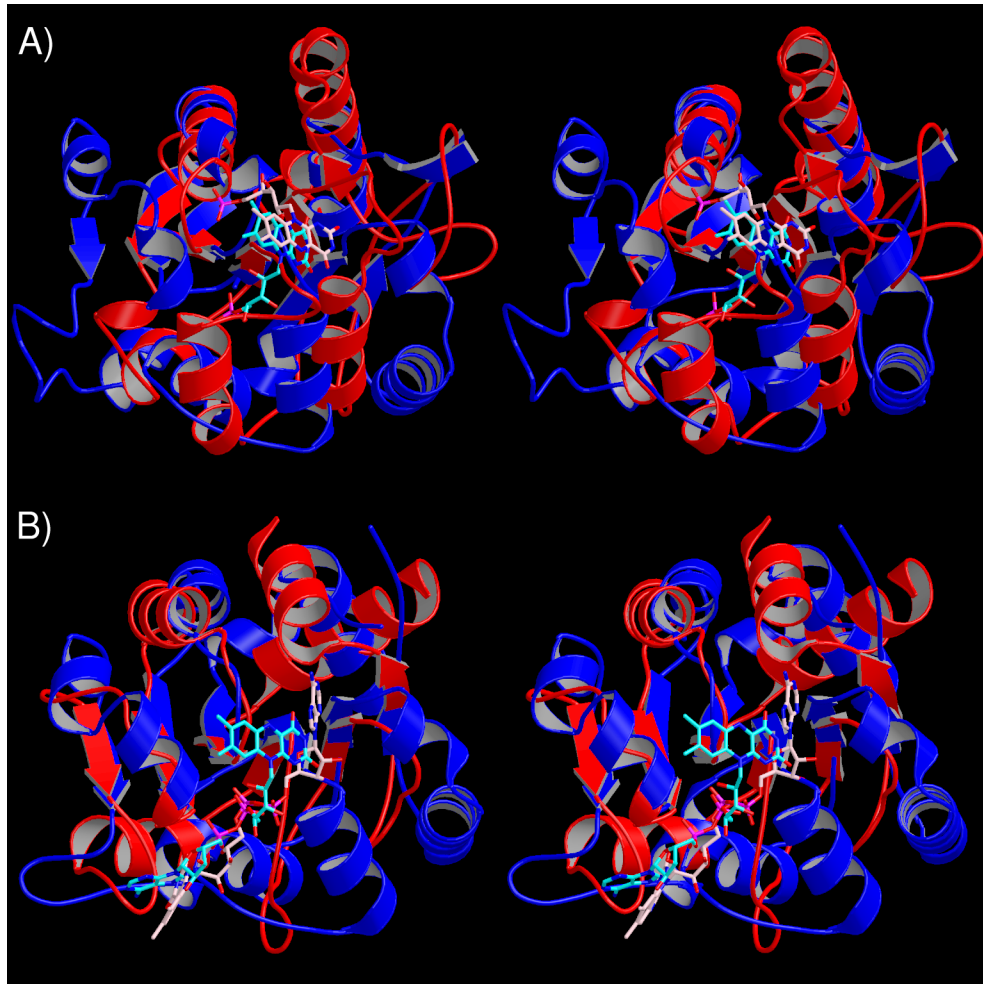


Abbildung 20: Vergleich mit *E. coli*-Flavodoxin und Pyruvat-Oxidase

A) Stereoabbildung einer Überlagerung von EpiD mit Flavodoxin aus *E. coli* (Hoover und Ludwig, 1997). EpiD ist blau, Flavodoxin rot und die zugehörigen Kofaktoren entsprechend mit cyan und pink gefärbten Kohlenstoffatomen dargestellt.

B) Stereoabbildung einer Überlagerung von MrsD mit der FAD bindenden Domäne von Pyruvat-Oxidase (Muller *et al.*, 1994). MrsD ist blau, die Pyruvat-Oxidase rot dargestellt. Die Kohlenstoffatome des FAD von MrsD sind cyan und der Pyruvat-Oxidase pink gefärbt.

MrsD überlagert werden, bei den Helices gibt es aber größere Unterschiede. Vor allem die äquivalenten Helices zu H5, H6, H7 und H8 fehlen.

Quinon-Reduktase Auch die menschliche Quinon-Reduktase benutzt eine Rossmann-artige Tertiärstruktur, um FAD zu binden. Wie bei den Flavodoxinen fehlt jedoch das strukturelle Äquivalent zu S3 und somit auch zu den Helices H2 und H3, so dass sich eine 2-1-3-4-5-Topologie ergibt. Das zentrale Faltblatt ist auch in die entgegengesetzte Richtung gebogen, so dass sich S5 und S6 nicht mehr mit ihren Äquivalenten überlagern. Der Kofaktor ist wie bei den Flavodoxinen auf unterschiedlichen Seiten des β -Faltblattes gebunden (Abb. 21).

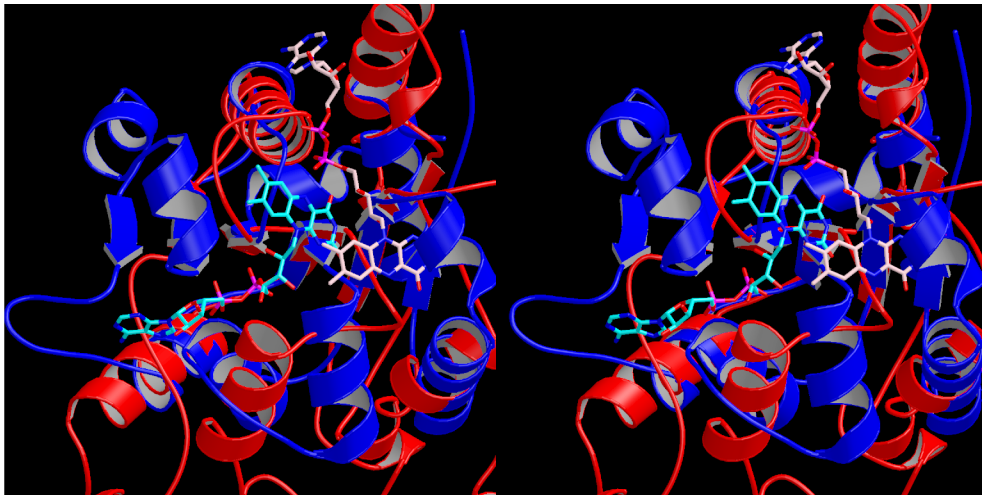


Abbildung 21: Überlagerung von MrsD mit Quinon-Reduktase

Stereovision einer Überlagerung von MrsD mit der menschlichen Quinon-Reduktase (Faig *et al.*, 2000). MrsD ist blau, die Quinon-Reduktase rot dargestellt. Die Kohlenstoffatome des FAD von MrsD sind cyan und die der Quinon-Reduktase pink gefärbt.

Ferredoxin:NADP⁺-Reduktase Bei der Ferredoxin:NADP⁺-Reduktase (FNR) zeigt die NADP-bindende Domäne eine ähnliche Tertiärstruktur. Das zentrale β -Faltblatt hat jedoch eine 3-2-1-4-5-Topologie, d. h. das strukturelle Äquivalent zu S6 fehlt. Der Adenosylteil der Dinukleotide ist auf der gleichen Seite des Faltblattes gebunden, zeigt jedoch jeweils in eine andere Richtung. Bei der FNR ist dieser Teil dichter am Faltblatt gebunden und somit die Phosphatgruppe des Adenosylteils in der Ebene des Faltblattes, während bei MrsD die Ribosylgruppe des FMN-Teils an dieser Position liegt (Abb. 22).

Diese Vergleiche zeigen, dass die Wechselwirkungen der Rossmann-artigen Tertiärstruktur mit den Kofaktoren in der HFCD-Familie mit keinem bisher bekannten Protein identisch sind.

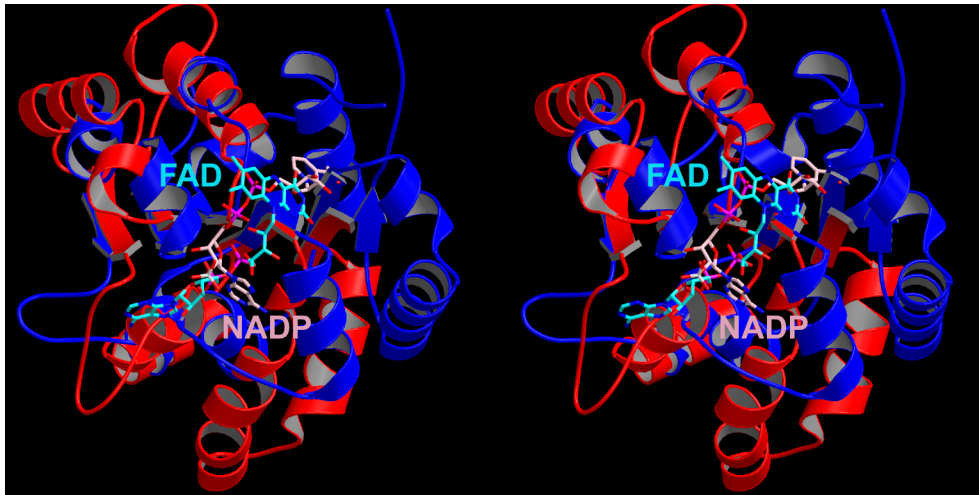


Abbildung 22: Überlagerung von MrsD mit Ferredoxin:NADP⁺ Reduktase
 Stereoabbildung einer Überlagerung von MrsD mit der NADP- bindenden Domäne von Ferredoxin:NADP⁺ Reduktase (Deng *et al.*, 1999). MrsD ist blau, die Ferredoxin:NADP⁺ Reduktase rot, FAD mit cyan und NADPH mit pink gefärbten Kohlenstoffatomen dargestellt.

Trotz der teilweisen Übereinstimmungen kann man auch aufgrund der fehlenden Sequenzmotive die HFCD-Proteine in keine der von O. Vallon (2000) vorgestellten Familien einordnen.

Dieser neuartige Bindungsmodus der Flavinkofaktoren durch eine Rossmann-artige Tertiärstruktur ist repräsentativ für diese Proteinfamilie, da er mit den charakteristischen Sequenzmotiven (PASANT und PXMNXXMW) verbunden ist.

Flavocytochrom b₂ (L-Lactat-Dehydrogenase) gehört strukturell gesehen zu der Familie der Glycolat-Oxidase (siehe 2.4 Seite 13). Die Geometrie des aktiven Zentrums ist jedoch sehr ähnlich zu der von EpiD. Allerdings hat in diesem Fall das aktive Histidin Kontakt zu einem Proton an C α und abstrahiert dieses als ersten Reaktionsschritt (Xio und Mathews, 1990; Lederer, 1992).

5.2. Bindung des Kofaktors

Verschiedene Flavoproteine, die eine Dehydrierung katalysieren, haben einige gemeinsame Eigenschaften (Fraaije und Mattevi, 2000). In den meisten Fällen ist das oxidierte Isoalloxazinsystem wie auch bei den HFCD planar, aber sowohl die *re*- als auch *si*-Seite kann dem Substrat zugewandt sein. Im Gegensatz zu vielen Flavoproteinen hat die Einheit N1-C2=O2 des Pyrimidinteils keinen Kontakt mit einem positiv geladenen Rest oder dem N-Terminus einer α -Helix, die eine im Verlauf der Reaktion auftretende negative Ladung stabilisieren könnten, jedoch bildet ein Wassermolekül in allen drei bekannten Strukturen der HFCD eine

Wasserstoffbrücke zu N1.

Auch einen Wasserstoffbrückendonator in der Nähe von N5, dem direkt an der Reaktion beteiligten Atom, findet man in allen drei Proteinen. Dieser moduliert das Reduktions-Oxidations-Potential des Flavin-Kofaktors. Die Abstände und Winkel liegen in den von Fraaije und Mattevi genannten Bereichen (4.4.3). Bei AtHAL3 ist der Abstand des Peptidstickstoffes von Val30 mit 3,7 Å etwas größer als bei EpiD (3,2 Å), der Winkel von 126° mit den Atomen N5 und N10 ist jedoch identisch. Die Distanz liegt etwas außerhalb des üblichen Bereiches zwischen 2,8 und 3,3 Å (Fraaije und Mattevi, 2000). Dies könnte daran liegen, dass die Distanz bei AtHAL3 ohne Substrat gemessen ist und diese bei EpiD ohne Substrat auch etwas größer ist als im Komplex.

Bei AtHAL3 ist der Kontakt zu Leu51 des benachbarten Trimers durch eine hydrophobe Wechselwirkung zu Trp81 ersetzt und der Dimethylbenzolring wird zusätzlich von Trp78 gestützt.

Interessanterweise findet man bei MrsD ein Leucin an der Stelle von EpiD-Phe43, welches den Dimethylbenzolring des Kofaktors stützt. Ein Austausch des Phe43 zu Leu43 führt allerdings bei EpiD zu einer signifikanten Verringerung der Aktivität (Kupke *et al.*, 2000). Da der Benzolring des Phenylalanins senkrecht auf der Ebene des Isoalloxazinsystems steht, lässt sich dieser Effekt jedoch nicht durch eine Veränderung des Redox-Potentials durch eine Wechselwirkung der zwei π -Elektronensysteme, dem sogenannten „Aromaten-stacking“, erklären.

5.3. Substratbindung und Substratspezifität

Die Substrate von Flavoproteinen werden häufig unter der Proteinoberfläche gebunden und von beweglichen „loops“, Seitenketten oder flexiblen Domänen dorthin dirigiert, was zu einem Ausschluss des Lösungsmittels führt. Alternativ wird von manchen Flavoproteinen auch eine exakt an das Substrat angepasste enge Substratbindetasche verwendet (Fraaije und Mattevi, 2000). Die SBK trägt in EpiD nur zur Substratbindung bei, liefert jedoch keinen Beitrag zum Ausschluss des Lösungsmittels am reaktiven Zentrum. Dies wird durch die Komplementarität von P-Cys22 und starren Resten an der Proteinoberfläche erreicht. EpiD kombiniert also beide Strategien zu Substratbindung.

Die Struktur liefert eine Erklärung für die schon längere Zeit bekannte ungewöhnlich breite Substratspezifität (siehe 2.5.1.1, Kupke *et al.*, 1994, 1995). Die Bindungsstelle liegt zwischen dem Kofaktor FMN und der zweifachen Symmetrieachse und bietet Platz für ungefähr fünf Aminosäuren. Längere Peptide würden wahrscheinlich keine zusätzlichen Kontakte eingehen, da sie über die Achse hinaus reichen würden. Kürzere Peptide (weniger als fünf AS) können

einige der notwendigen Wechselwirkungen mit der SBK nicht eingehen und werden deshalb nicht oder nur sehr schlecht (SYCC) umgesetzt. Die Kontakte zu den ersten beiden Aminosäuren des Pentapeptides sind unspezifische Wechselwirkungen mit den Peptidbindungen, d.h. es ist egal, welche Aminosäuren an dieser Stelle vorhanden sind. Etwas spezifischer ist die Bindung des P-Tyr20, an dessen Stelle große hydrophobe Aminosäuren für die Substratbindung nötig sind. An der vorletzten Stelle werden alle Aminosäuren mit einer ähnlichen Größe wie Cystein akzeptiert. Größere Reste führen zu einem sterischen Konflikt mit Asn159 der SBK, welches zwischen den Seitenketten von P-Ser19 und P-Thr21 liegt.

Die Substratbindungsklammer ist bei den CoaBC-Proteinen (16 AS) kürzer als bei den LanD-Proteinen (20 AS). Die Haarnadelschleife zwischen den beiden β -Strängen besteht in allen bekannten Fällen aus drei Aminosäuren, wobei die dritte bei allen Mitgliedern der HFCD-Familie ein Glycin ist. Bei den LanD-Proteinen sind die ersten zwei Aminosäuren A-S/T, wobei bei EpiD das Alanin durch ein Serin (Ser152) ersetzt ist. Dieses bildet eine Wasserstoffbrücke zur Carboxyl-Gruppe des C-terminalen Cysteins (siehe Abb. 18) und hilft somit, das Cystein in der nötigen Orientierung zu fixieren. Bei MrsD könnte Thr161 diese Funktion erfüllen. Dazu müsste sich jedoch der „turn“ zwischen S7 und S8 drehen, damit sich die Seitenkette des Thr161, die in Abb. 25 zum Betrachter gerichtet wäre, nach links in Richtung Carboxylatgruppe bewegen würde. Bei den CoaBC-Proteine besteht der „Turn“ aus den Aminosäuren Alanin, Cystein und Glycin. Der modellierte Komplex von AtHAL3 mit PPC (Kupke *et al.*, 2001b) zeigt eine Wasserstoffbrücke vom $S\gamma$ des Cysteins zum Carbonyl-O des PPC. Da die SBK bei diesen Proteinen kürzer als bei den LanD-Proteinen ist, reicht sie nicht an die Cysteiny-Gruppe des Substrates heran. Die Carboxylgruppe wird beim AtHAL3 wahrscheinlich von einem Arg-Rest (Arg95) gebunden (siehe 5.5).

5.4. Reaktionsmechanismus

Aus den bisherigen Ergebnissen kann man nicht mit letzter Sicherheit sagen, ob die Reaktion radikalisch, über einen Hydridtransfer oder über eine Thiolatzwischenstufe verläuft. Jedoch läßt die Anordnung der Atome im Komplex vermuten, dass die Oxidation mit der Thiolgruppe von P-Cys22 beginnt, da sie als einziger Kontakt zum FMN hat (4.5.2). Dies spricht deutlich gegen eine direkte $C\alpha$ - $C\beta$ -Dehydrierung, wie es zuerst analog zu der Reaktion der Acyl-CoA-Dehydrogenasen (Ghisla und Mattevi, 1989) angenommen wurde. Die essentielle Notwendigkeit der reaktiven Base His67 weist darauf hin, dass die Reaktion über eine Thiolatzwischenstufe verläuft und liefert ein Argument gegen eine direkte Hydridübertragung. Dieses Histidin ist bei allen Mitgliedern der HFCD streng konserviert und dessen Mutation zu Asparagin inaktiviert das Enzym komplett. Die Thiolgruppe ist essentiell für die Reaktion notwendig,

wie der Austausch des C-terminalen Cysteins gegen Serin zeigt (Kupke *et al.*, 1995). Dieser Austausch führt weniger zu einer sterischen Hinderung, viel wahrscheinlicher ist, dass die Hydroxylgruppe ein ungünstigeres Redoxpotential als die Thiolgruppe hat. Ein weiterer Hinweis auf den Angriff am Schwefelatom ist die Tatsache, dass das Schwefelatom 3,7 Å von N5 entfernt ist und dies mit den üblichen Abständen von etwa 3,5 Å übereinstimmt. Auch der Winkel zwischen N10, N5 und diesem Atom liegt mit 106° in dem engen Bereich zwischen 96-117° (Fraaije und Mattevi, 2000). Diese geometrischen Beschränkungen können wahrscheinlich bei Homocystein nicht eingehalten werden und führen somit dazu, dass dieses nicht umgesetzt wird (vgl. 2.5.1.1). Der für die Orotidin-5'-Monophosphat-Decarboxylase vorgeschlagene Mechanismus (Appleby *et al.*, 2000), eine direkte Decarboxylierung von P-Cys22, erscheint unwahrscheinlich, da ein entstehendes Carbanion in einem sp³-Orbital nicht resonanz-stabilisiert werden kann und sich auch keine Aminosäure in unmittelbarer Nähe befindet, die dieses protonieren könnte. Daher lässt sich ein Mechanismus, wie in Abb. 23 dargestellt, ableiten, bei dem zunächst die Thiolgruppe deprotoniert und danach durch eine Übertragung von zwei Elektronen auf das FMN oxidiert wird und eine Abstraktion eines Protons von C_β führt danach zu einem Thioaldehyd. Diese sind gut bekannte aber instabile Verbindungen, die jedoch mit einer großen Seitenkette, wie zum Beispiel t-Butyl, mehrere Stunden existieren (Duus, 1979).

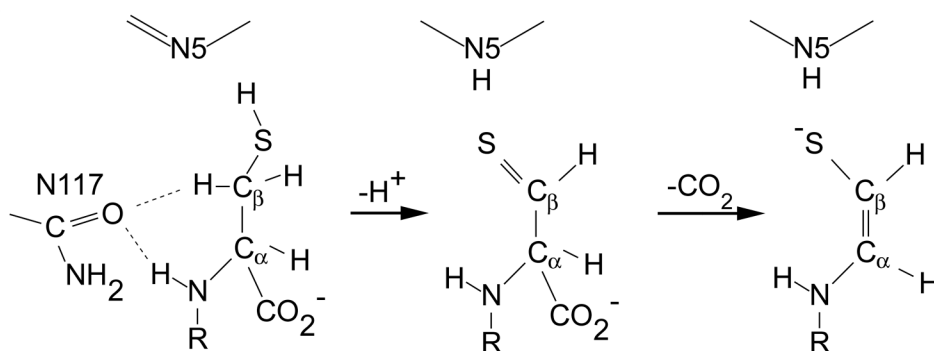


Abbildung 23: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der von EpiD katalysierten Reaktion

Die Startgeometrie ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Reaktion mit einer Oxidation des Schwefelatoms beginnt und das entstehende Thioaldehyd spontan decarboxyliert. Letzteres führt zu einer C-C-Doppelbindung und Rückbildung der Thiolgruppe.

Eine spontane Decarboxylierung dieses Thioaldehyds, analog zu den β -Ketocarbonsäuren, würde wieder zu einer Thiolgruppe und gleichzeitiger Bildung einer C_α-C_β-Doppelbindung führen. Ob die Elektronenübertragung in einem Schritt statt findet oder ob eine radikalische Zwischenstufe decarboxyliert, ist noch unbekannt. Die Tatsache, dass Dfp und AtHAL3 ih-

re Substrate nicht oxidieren, sondern nur eine Decarboxylierung katalysieren (Kupke *et al.*, 2000; Kupke *et al.*, 2001b), kann als Hinweis auf eine Einzel-Elektronen-Reaktion („single electron transfer, SET“) mit einer Radikalzwischenstufe in dieser Proteinfamilie gesehen werden. Die Abstraktion eines Protons von C β wird durch eine auftretende positive Ladung am Schwefelatom und dessen Elektronegativität ermöglicht und wird häufig bei C-H-Oxidase beobachtet. Die Wasserstoffatome an C β haben Kontakt zu Asn66 (3,9 Å) und Asn117 (3,4 Å). Beide Distanzen liegen in dem von Wahl und Sundaraling für C-H...O-Wasserstoffbrückenbindungen zusammengestellten Bereich von 3,0-4,0 Å (Wahl und Sundaralingam, 1997). Diese polaren Wechselwirkungen können weiter zu einer Abstraktion eines der beiden Protonen beitragen, da sie die C-H-Bindung verlängern, wie Hochpräzisions-Neutronendiffraktionsmessungen und theoretische Studien belegen. Während Asn66 in seiner Position streng fixiert ist, könnte Asn117 das Proton durch eine leichte Konformationsänderung seiner Seitenkette das Proton an das Lösungsmittel weiterleiten. Außerdem ist dieses Asparagin bei allen Mitgliedern der HFCD-Familie konserviert und ein modellierter Komplex des AtHAL3 mit seinem Substrat PPC zeigt, dass es auch hier Kontakt zu dem gleichen Wasserstoffatom an C β der Cysteinylgruppe hat (Kupke *et al.*, 2000; Kupke *et al.*, 2001b). Asn66 hingegen ist nur noch bei MutD vorhanden, bei MrsD ist es durch ein Ser und bei AtHAL3 durch ein Leu ersetzt. Auch die Stereochemie der Reaktion kann erklärt werden, wenn das C β -Wasserstoffatom in der Nähe des Asn117 deprotoniert wird und sich P-Cys22-S γ in Richtung N5 dreht. Dies führt zu einer cis-Konfiguration der Thiolgruppe und des Amidstickstoffes. In dieser Richtung befindet sich eine Kavität, die von Met120 begrenzt wird, welches auch essentiell für die Reaktion ist, da seine Mutation zu Leu zu einem inaktiven Enzym führt (Kupke *et al.*, 2000). Diese Kavität oberhalb des Pyrimidinringes, deren Form komplementär zu einem Cystein ist, wurde auch in AtHAL3 beobachtet.

Die N-terminale Domäne von Dfp und AtHAL3 katalysieren die Decarboxylierung der terminalen Cysteinylgruppe von (R)-4'-Phospho-N-Pantothenoacylcystein zu 4'-Phosphopantethein.

5.5. Vergleich mit AtHAL3

Die Struktur von HAL3 aus *Arabidopsis thaliana* wurde von A. Albert *et al.* (2000) aufgeklärt. Die Monomere besitzen bis auf eine Insertion vor Helix H4 die gleiche Tertiärstruktur (Abb. 24). Die Trimere, die im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der HFCD nicht weiter oligomerisieren, sind gleich aufgebaut, wobei die Aminosäuren der Insertion eine ähnliche Position einnehmen, wie die an der Substratbindung beteiligten Reste des benachbarten Trimers beim EpiD.

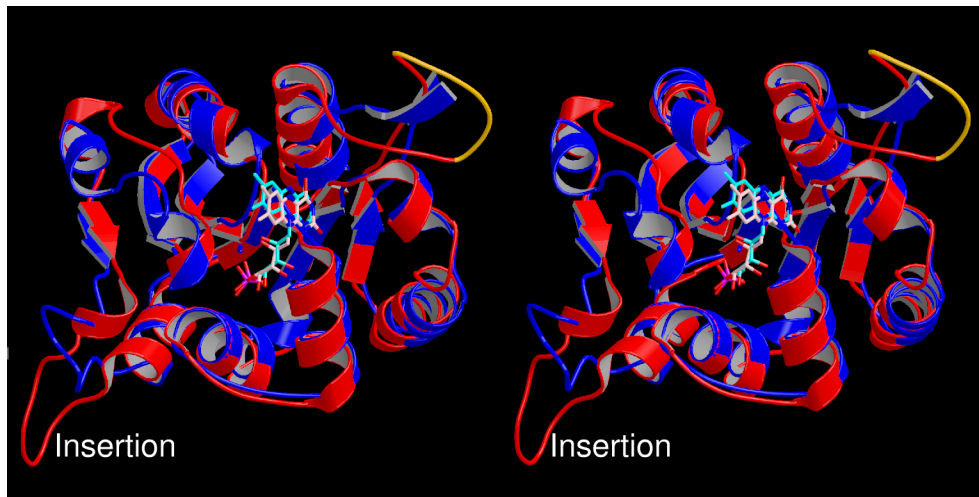


Abbildung 24: Überlagerung von EpiD und AtHAL3

Stereoabbildung einer Überlagerung von EpiD mit AtHAL3 (Albert *et al.*, 2000). EpiD ist blau, die Kohlenstoffatome des zugehörigen FMN cyan, AtHAL3 rot und die Kohlenstoffatome des zugehörigen FMN pink gefärbt. Die in der Dichte nicht definierten Reste 173-179 sind als orangefarbener „coil“ dargestellt.

T. Kupke *et al.* (2001) modellierten den Komplex von AtHAL3 mit PPC mit Hilfe der Koordinaten des EpiD-Komplexes. Sie benutzten das Program SYBYL (Version 6.4, Tripos, Inc.; St. Louis, MO) für die Optimierung der Geometrie und Energieminimierung des Modells. Der Cysteinylnrest ist wie bei EpiD durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Val88 und Ile91 fixiert (Abb. 24). Die Carboxylatgruppe könnte hydrophile Wechselwirkungen mit dem Amidstickstoff von Val88, der Guanidinogruppe des Arg95 und zu Asn142, das Asn117 beim EpiD entspricht, eingehen. Die Wechselwirkung mit Arg95 findet sich auch beim MrsD wieder (Abb. 25), während sich beim EpiD an dieser Position ein Glu befindet, dessen Seitenkette zu kurz für eine Wechselwirkung mit der Carboxylatgruppe ist. Der Pantothenanteil des PPC wird abwechselnd durch hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen gebunden, wobei der Abstand der hydrophilen Aminosäuren größer als bei den peptidbindenden HFC-Decarboxylasen ist und genau dem Abstand der hydrophilen Gruppen des PPC entspricht. Auf diese Weise wird bei der Substratbindung zwischen Polypeptiden und PPC unterschieden. Die Phosphatgruppe des PPC wird wahrscheinlich von den positiv geladenen Resten Lys34 und Lys171 gebunden. Diese Wechselwirkungen könnten dafür sorgen, dass PPC und nicht Pantothenylcystein (PC) das Substrat von AtHAL3 ist.

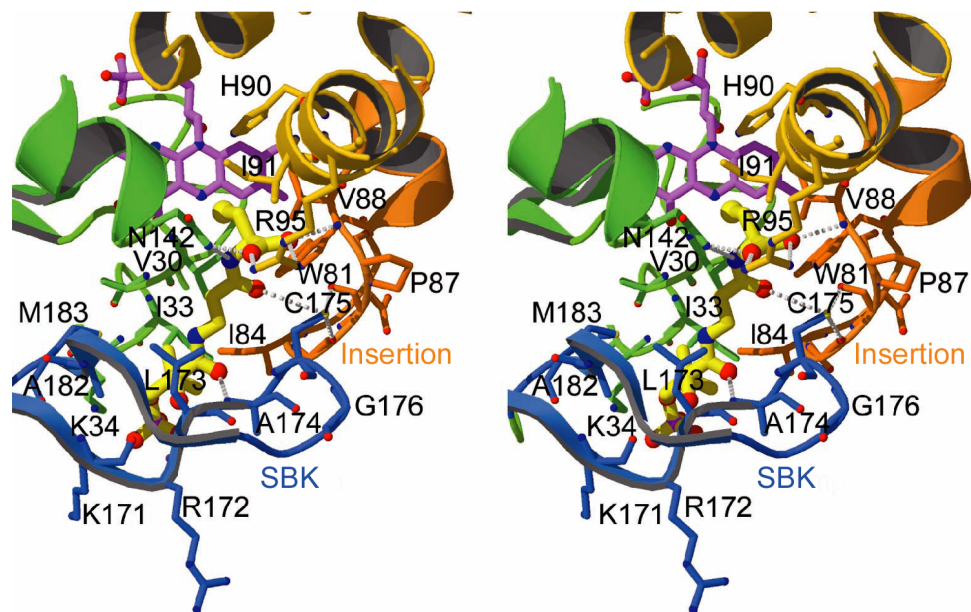


Abbildung 25: Theoretischer Substratkomplex von AtHAL3

Stereoabbildung eines Modells des Komplexes von AtHAL3 mit PPC. Das Protomer, dem das FMN (violette Kohlenstoffatome) zugeordnet wurde, ist grün, die Substratbindeklammer blau, das benachbarte Protomer golden und orange sowie das PPC als „balls and sticks“ mit gelben Kohlenstoffatomen dargestellt. (Abbildung nach T. Kupke *et al.* (2001b))

A. Anhang

A.1. Kristallographische Begriffe

Auflösung	Abstand der Gitterebenen gemäß Gleichung 1, siehe 3.4.4
Datensatz	Ergebnis der Auswertung einer Serie von Diffraktionsbildern, welches die gemessenen Reflexe in Form von numerischen Werten der Strukturfaktoramplituden ($ F_{hkl} $) darstellt, siehe 2,4
Derivat-Datensatz	Datensatz von einem Proteinkristall, der durch die Reaktion mit einer Schwermetallverbindung eine lokale Änderung der Elektronendichteverteilung aufweist, siehe 3.4.6.1
Differenz-Fourier	Fouriersummation, bei der Differenzen zwischen Strukturfaktoramplituden als Koeffizienten benutzt werden: die resultierende Elektronendichtekarte gibt die molekularen Unterschiede wieder, welche die Differenzen in den Strukturfaktoramplituden erzeugen.
Differenz-Patterson	Pattersonfunktion bei der Differenzen zwischen Strukturfaktoramplituden als Koeffizienten benutzt werden
F_{calc}	Strukturfaktoren, die aus den Koordinaten eines Modelles berechnet wurden, die sich aus den Strukturfaktoramplituden $ F_{calc} $ (kürzer F_c) und den Phasenwinkeln α_{calc} zusammensetzen.
F_{obs}	experimentelle Strukturfaktoren, die sich aus den Strukturfaktoramplituden $ F_{obs} $ (kürzer F_o) und falls experimentell bestimmt, den Phasenwinkeln α_{obs} zusammensetzen.

Figure of Merit Maß für die Qualität der experimentell ermittelten Phasenwinkel als Kosinus des mittleren Phasenfehlers: für einen Strukturfaktor F_{hkl} ergibt sich die Figure of Merit (FOM) zu:

$$m = \int_{\alpha} (P_{hkl}(\alpha) \exp[i\alpha]) d\alpha ; \text{ wobei } 0 \leq m \leq 1.$$

P_{hkl} wird während der Phasierung berechnet und gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass für F_{hkl} der Phasenwinkel α beträgt

Freier R-Faktor	siehe R_{free}
Multiplizität	Mittelwert des Verhältnisses aus Anzahl der gemessenen Reflexe und der kristallographisch unabhängigen Reflexe
Nativer Datensatz	Datensatz von einem unveränderten Proteinkristall, d.h. nicht mit einer Schwermetallverbindung behandelt
R-Faktoren	R-Faktoren werden in der Kristallographie dazu verwendet, um die Übereinstimmung von zwei Messwerten oder der Messwerte mit dem Modell zu beschreiben
R_{cryst}	Beschreibung der Qualität einer verfeinerten Kristallstruktur als Funktion der Übereinstimmung von $ F_{\text{calc}} $ und $ F_{\text{obs}} $, siehe Gleichung (19) in 3.4.10
R_{free}	wird analog zu R_{cryst} mit einem bestimmten Anteil der Reflexe berechnet, die nicht bei der Verfeinerung berücksichtigt wurden, dies soll eine Überanpassung des Modells verhindern
R_{sym}	Beschreibung der Qualität eines Datensatzes als Funktion der Übereinstimmung von symmetrieverwandten Reflexen, siehe Gleichung (10) in 3.4.5.2
Rigid Body	Bezeichnung für die Verfeinerung von ganzen Molekülen (oder Molekülteilen) als starre Körper, siehe 3.4.10.1

r.m.s, bzw. RMS Quadratisches Mittel („root mean square“), das in der Regel zur Angabe von Abweichungen verwendet wird, im Gegensatz zum Geometrischen Mittelwert werden hohe Differenzen stärker gewichtet:

$$\text{RMS-Abweichung} = \frac{1}{n} \sqrt{\sum_n (x_n - \bar{x})^2}$$

n: Anzahl der Messwerte, x_n : n-ter Messwert, \bar{x} : Mittelwert oder Standardwert

Simulated Annealing Verfeinerungsalgorithmus in XPLOR und CNS bei dem im Rahmen einer Moleküldynamikrechnung die Temperatur des Systems virtuell erhöht wird, um so den Konvergenzradius der Verfeinerung zu verbessern, siehe [3.4.10.3](#)

Solvensbereich Zusammenhängender Bereich in Proteinkristallen, der mit Lösungsmittel gefüllt ist

Solvensgehalt Anteil des Solvensbereich am Gesamtvolumen

Test Set Teil der Strukturfaktoren eines Datensatzes, der nur zur Berechnung von R_{free} benutzt und nicht zur Verfeinerung herangezogen wird (in der Regel ca. 5% der gemessenen Strukturfaktoramplituden)

Vollständigkeit Prozentualer Anteil der gemessenen unabhängigen Reflexen im Vergleich zu den theoretisch möglichen Strukturfaktoren

Working Set Strukturfaktoren, die nicht zum „Test Set“ gehören und zur Verfeinerung benutzt werden

Zahl d. Reflexe Anzahl der unabhängigen Reflexe, bzw. Strukturfaktoramplituden, die nicht über eine kristallographische Symmetrie verwandt sind

A.2. Nomenklatur der 20 proteinogenen Aminosäuren

Name	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure (Aspartat)	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure (Glutamat)	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

A.3. Liste der Verwendeten Abkürzungen

%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gewichtsprozent
aa	amino acid (Aminosäure)
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
DA	Dalton
dH ₂ O	H ₂ O dest. (destilliertes Wasser)
ddH ₂ O	H ₂ O bidest. (zweifach entionisiertes Wasser)
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD	Flavinadenindinucleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	fast protein liquid chromatography
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HASYLAB	Hamburger Synchrotron-Strahlungslabor
IEC	ion exchange chromatography (Ionenaustauschchromatographie)
Kap.	Kapitel
LM	Lösungsmittel
μ	Mikro (10^{-6})
m	Milli (10^{-3})
M	Molar (mol/l)
MAD	Multiple Anomalous Diffraction
MIR	Multiple Isomorphous Replacement
min	Minute
MR	Molecular Replacement
Mw	Molekulargewicht
ncs	nicht-kristallographische Symmetrie
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
p. A.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PEG	Polyethylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt
rms	root-mean-square (quadratisch)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SBK	Substratbindeklammer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIS	sichtbar

Literatur

- Abiko, Y. (1975). In Greenburg, D. M., Editor, *Metabolic Pathways*, Seiten 1–25. Academic Press, Inc., New York.
- Albert, A., Martinez-Ripoll, M., Espinosa-Ruiz, A., Yenush, L., Culiáñez-Macià, F. A. und Serrano, R. (2000). The X-ray structure of the FMN-binding protein AtHal3 provides the structural basis for the activity of a regulatory subunit involved in signal transduction. *Structure Fold Des*, **8**(9), 961–9.
- Allgaier, H., Jung, G., Werner, R. G., Schneider, U. und Zähler, H. (1986). Epidermin: sequencing of a heterodetic tetracyclic 21-peptide amide antibiotic. *Eur J Biochem*, **160**(1), 9–22. Kopie.
- Altena, K., Guder, A., Cramer, C. und Bierbaum, G. (2000). Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol*, **66**, 2565–2571. genbank, AJ250862.
- Appleby, T. C., Kinsland, C., Begley, T. P. und Ealick, S. E. (2000). The crystal structure and mechanism of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**(5), 2005–10.
- Augustin, J., Rosenstein, R., Kupke, T., Schneider, U., Schnell, N., Engelke, G., Entian, K.-D. und Götz, F. (1991). Identification of epidermin biosynthetic genes by complementation studies and heterologous expression. In Jung, G. und Sahl, H.-G., Editoren, *Nisin and novel lantibiotics*, Seiten 277–286. Escom, Leiden.
- Augustin, J., Rosenstein, R., Wieland, B., Schneider, U., Schnell, N., Engelke, G., Entian, K. D. und Götz, F. (1992). Genetic analysis of epidermin biosynthetic genes and epidermin-negative mutants of *Staphylococcus epidermidis*. *European Journal of Biochemistry*, **204**(3), 1149–54.
- Aumelas, A. (1996). Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur. J. Biochem.*, **237**, 575–583.
- Baker, D., Bystroff, C., Fletterick, R. J. und Agard, D. A. (1993). PRISM: Topologically constrained phase refinement for macromolecular crystallography. *Acta Cryst*, **D49**(429-439).

- Banerjee, S. und Hansen, J. N. (1988). Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.*, **263**, 9508–9514.
- Bartels, J. H. J., E., C. und M., S. J. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, **387**, 861.
- Barton, G. (1993). An efficient algorithm to locate all locally optimal alignments between two sequences allowing for gaps. *Comput. Appl. Biosci.*, **9**, 729–734.
- Bechinger, B., Zasloff, M. und Opella, S. J. (1993). Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci.*, **2**, 2077–2084.
- Bernal, J. D. und Crowford, D. (1934). X-ray Photographs of Crystalline Pepsin. *Nature (London)*, **133**(794-795).
- Bernstein, F. C., Kötzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E. F. J., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. und Tasumi, M. (1977). The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.*, **112**, 7523–7527.
- Bierbaum, G., Brötz, H., Koller, K.-P. und Sahl, H.-G. (1995). Cloning, sequencing and production of the lantibiotic mersacidin. *FEMS Microbiol. Lett.*, **127**, 121–126.
- Blumwald, E. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**(4), 431–434.
- Blundell, T. L. und Johnson, L. N. (1976). *Protein Crystallography*. Academic Press, London.
- Bragg, W. L. (1913). The structure of some crystals as indicated by their diffraction of X-rays. *Proc. Roy. Soc.*, **A89**, 248–277.
- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H. und de Kruijff, B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, **286**, 2361–2364.
- Bricogne, G. (1974). Geometric sources of redundancy in intensity data and their use for phase determination. *Acta Cryst*, **A30**, 395–405.
- Brötz, H., Bierbaum, G., Markus, A., Molitor, E. und Sahl, H.-G. (1995). Mode of action of mersacidin - inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism? *Antimikrob. Agents Chemother.*, **39**, in press.

- Brötz, H., Bierbaum, G., Reynolds, P. E. und Sahl, H.-G. (1997). The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *Eur. J. Biochem.*, **246**, 193–199.
- Brötz, H., Josten, M., Wiedmann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G. und Sahl, H.-G. (1998). Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.*, **30**, 317–327.
- Brünger, A. T. (1993). *XPLOR (version 3.1) A system for X-ray crystallography and NMR*. Yale University Press, New Haven, CT.
- Brünger, 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. und Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.*, **D54**, 905–921.
- Brünger, A. T., Krukowski, A. und Erickson, J. (1992). The Free R Value: a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures. *Nature*, **355**(462-474).
- Carter, C. und Carter, C. (1979). Protein Crystallography using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.*, **254**(23), 12219–12223.
- Chatterjee, S., Chatterjee, D. K., Jani, R. H., Blumbach, J., Ganguli, B. N., Klesel, N., Limbert, M. und Seibert, G. (1992a). Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. In vitro and in vivo antibacterial activity. *J. Antibiotics*, **45**, 839–845.
- Chatterjee, S., Chatterjee, D. K., Lad, S. J., Phansalkar, M. S., Rupp, R. H., Ganguli, B. N., Fehlhaber, H.-W. und Kogler, H. (1992b). Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization. *J. Antibiotics*, **45**, 832–838.
- Chen, Z.-w., Koh, M., Driessche, G. V., Beeumen, J. J. V., Bartsch, R. G., Meyer, T. E., cusanovich, M. A. und Mathews, F. S. (1994). The Structure of Flavocytochrome c Sulfide Dehydrogenase from a Purple Phototrophic Bacterium. *Science*, **266**, 430–432.
- Chevalier, R. J., Hournaud, J., Levebre, E. und Mocquot, G. (1957). *Ann. Technol. Agric.*, **2**, 117.
- Collaborative Computational Project Number 4 (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst.*, **D50**, 760–763.

- Crowford, D. (1935). X-ray single Crystal Photographs of Insulin. *Nature (London)*, **135**, 591–592.
- Deng, Z., Aliverti, A., Zanetti, G., Arakaki, A. K., Ottado, J., Orellano, E. G., Calcaterra, N. B., Ceccarelli, E. A., Carrillo, N. und Karplus, P. A. (1999). Productive NADP⁺-binding mode of Ferredoxin-NADP⁺ reductase revealed by protein engineering and cry-stallographic studies. *Nat. Struct. Biol.*, **6**(9), 847–853.
- Doublé, S. (1997). Preparation of Selenomethionyl proteins for phase determination. *Meth. Enzymol.*, **276**, 523–530.
- Drenth, J. (1994). *Principles of Protein X-ray Crystallography*. Springer-Verlag, New York.
- Duus, F. (1979). Sulphur, Selenium, Silicon, Boron, Organometallic Compounds. In Barton, D. und Ollis, W. D., Editoren, *Comprehensive organic chemistry: the synthesis and reactions of organic compounds.*, volume 3, Seiten 373–487. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sidney, Paris, Frankfurt.
- Engh, R. A. und Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure and refinement. *Acta Cryst.*, **A47**, 392–400.
- Entian, K.-D. und Klein, C. (1993). Lantibiotika, eine Klasse ribosomal synthetisierter Peptid-Antibiotika. *Naturwissenschaften*, **80**, 454–460.
- Esnouf, R. (1997). An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graph.*, **15**, 132–134.
- Espinosa-Ruiz, A., Bellés, J. M., Serrano, R. und Culiáñez-Macià, F. A. (1999). Arabidopsis thaliana AtHAL3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. *The Plant Journal*, **20**(5), 529–539.
- Ewald, P. P. (1921). Das „reziproke Gitter“ in der Strukturtheorie. *Z. Kristallogr.*, **65**, 129–156.
- Fahrner, R. I. (1996). Solution structure of protegrin-1, a broadspectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chem. Biol.*, **3**, 543–550.
- Faig, M., Bianchet, M. A., Talalay, P., Chen, S., Winski, S., Ross, D. und Amzel, L. M. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**(7), 3177–3182.
- Ferrando, A., Kron, S. J., Rios, G., Fink, G. R. und Serrano, R. (1995). Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene HAL3. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 5470–5481.

- Fraaije, M. W. und Mattevi, A. (2000). Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem. Sci.*, **25**(3), 126–32.
- Friedrich, W., Knipping, P. und Laue, M. (1912). Interferenz-Erscheinungen bei Röntgenstrahlen. *Sitzungsberichte der mathematisch-physikalischen Klasse der königlichen Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München*, 303–322.
- Fukuyama, K., Wakabayashi, S., Matsubara, H. und Rogers, L. J. (1990). Tertiary Structure of Oxidized Flavodoxin from an Eukaryotic Red Alga *Condrus crispus* at 2.35-Å Resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**(26), 15804–15812.
- Ganz, T. und Lehrer, R. I. (1999). Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol. Med. Today*, **5**, 292–297.
- Ghisla, S. und Massey, V. (1986). New flavins for old: artificial flavins as active site probes of flavoproteins. *Biochem. J.*, **209**, 1–12.
- Ghisla, S. und Mattevi, A. (1989). Mechanism of flavoprotein-catalyzed reactions. *Eur. J. Biochem.*, **181**, 1–17.
- Ghisla, S., Thorpe, C. und Massey, V. (1984). Mechanistic studies with general acyl-CoA dehydrogenase and butyryl-CoA dehydrogenase by acyl-CoA derivatives. *Biochemistry*, **23**, 3154–3161.
- 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.
- Green, D., Ingram, V. und Perutz, M. (1954). The structure of the hemoglobin IV. Sign determination by isomorphous replacement method. *Proc. Roy. Soc. Sect. A*, **225**, 287–307.
- Gutierrez, J. A., Crowley, P. J., Brown, D. P., Hillman, J. D., Youngman, P. und Bleiweis, A. S. (1996). Insertional mutagenesis and recovery of interrupted genes of *Streptococcus mutans* by using transposon Tn917: preliminary characterization of mutants displaying acid sensitivity and nutritional requirements. *J. Bacteriol.*, **178**(14), 4166–4175.
- 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.

- Hendrickson, W. A., Smith, J. L., Phizackerley, R. P. und Merritt, E. A. (1988). Crystallographic structure analysis of lamprey hemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation. *Proteins*, **4**(2), 77–88.
- Hoover, D. M. und Ludwig, M. L. (1997). A flavodoxin that is required for enzyme activation: the structure of oxidized flavodoxin from *Escherichia coli* at 1.8 Å resolution. *Prot. Sci.*, **6**(12), 2525–2537.
- Huber, R., Formanek, H. und Epp, O. (1969). Die Kristallstruktur von Erythrocyruorin (*Chironomus Thummi*). *Naturwiss.*, **55**, 75–77.
- Hünefeld, F. (1840). Die Chemismus in der thierischen Organization. Leipzig.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T. und Shinozaki, K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.*, **24**(5), 655–665.
- Iverson, T. M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G. und Rees, D. C. (1999). Structure of *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science*, **284**(5422), 1961–1966.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. und Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, **59**, 171–200.
- Jancarik, J. und Kim, S. H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.*, **24**, 409–411.
- Jones, T. A. (1978). A graphics model building and refinement system for macromolecules. *J. Appl. Crystallogr.*, **11**, 268–272.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. und Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.*, **A47**, 110–119.
- Kabsch, W. und Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577–2637.
- Kaletta, C., Ention, K.-D. und Jung, G. (1991). Prepeptide sequence of cinnamycin (Ro 09-0198): the first structural gene of a duramycin-type lantibiotic. *Eur. J. Biochem.*, **199**, 411–415.

- Karplus, P. A., Daniels, M. J. und Herriott, J. R. (1991). Atomic Structure of Ferredoxin-NADP+ Reductase: Prototype for a Structurally Novel Flavoenzyme Family. *Science*, **251**, 60–66.
- Karplus, P. A. und Schulz, G. E. (1987). Refined Structure of Glutathione Reductase at 1.54Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, **195**, 701–729.
- Kempter, C., Kupke, T., Kaiser, D., Metzger, J. W. und Jung, G. (1996). Thioenols from peptidyl cysteines: Oxidative decarboxylation of C-13-labeled substrate. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **35**, 2104–2107.
- Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strandberg, B. E., Hart, R. C. und Davies, D. R. (1960). Structure of myoglobin; a three-dimensional fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, **185**, 422–427.
- Kleinkauf, H., van Liempt, H., Palissa, H. und von Döhren, H. (1992). *Naturwissenschaften*, **79**(4), 153–162.
- Kleinkauf, H. und von Döhren, H. (1987). Biosynthesis of peptide antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.*, **41**, 259–289.
- Kleywegt, G. J. und Jones, T. A. (1993). Masks made easy. *ESF/CCP4 Newsletter*, **28**, 56–59.
- Kleywegt, G. J. und Read, R. J. (1997). Not your average density. *Structure*, **5**, 1557–1569.
- Kraulis, P. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.*, **24**, 946–950.
- Krishna Murthey, H. M., Hendrickson, W. A., Orme-Johnson, W. H., Merritt, E. A. und Phizackerley, R. P. (1988). Crystal structure of *Clostridium acidurici* ferredoxin at 5 Å resolution based on measurements of anomalous X-ray scattering at multiple wavelengths. *J. Biol. Chem.*, **263**(34), 18430–18436.
- Kupke, T. (2001a). Molecular characterization of the 4'-phosphopantothienoylcysteine decarboxylase domain of bacterial Dfp flavoproteins. *J. Biol. Chem.*, **276**(29), 27597–27604.
- Kupke, T. und Götz, F. (1997b). The enethiolate anion reaction products of EpiD. pKa value of the enethiol side chain is lower than that of the thiol side chain of peptides. *J. Biol. Chem.*, **272**(8), 4759–62.

- Kupke, T., Hernández-Acosta, P., Steinbacher, S. und Culiáñez-Macià, F. A. (2001b). *Arabidopsis thaliana* Flavoprotein AtHAL3a Catalyzes the Decarboxylation of 4'-Phosphopantotenoyleysteine to 4'-Phosphopantetheine, a Key Step in Coenzyme A Biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **276**(22), 19190–19196.
- Kupke, T., Kempter, C., Gnau, V., Jung, G. und Gd Götz, F. (1994). Mass spectroscopic analysis of a novel enzymatic reaction. Oxidative decarboxylation of the lantibiotic precursor peptide EpiA catalyzed by the flavoprotein EpiD. *J Biol Chem*, **269**(8), 5653–5659. Kopie.
- Kupke, T., Kempter, C., Jung, G. und Götz, F. (1995). Oxidative decarboxylation of peptides catalyzed by flavoprotein EpiD. Determination of substrate specificity using peptide libraries and neutral loss mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, **270**(19), 11282–11289. Kopie.
- Kupke, T., Stevanovic, S., Sahl, H.-G. und Götz, F. (1992). Purification and characterization of EpiD, a flavoprotein involved in the biosynthesis of the lantibiotic epidermin. *J Bacteriol*, **174**(16), 5354–5361. Kopie.
- Kupke, T., Uebele, M., Schmid, D., Jung, G., Blaesse, M. und Steinbacher, S. (2000). Molecular Characterization of Lantibiotic-synthesizing Enzyme EpiD Reveals a Function for Bacterial Dfp Proteins in Coenzyme A Biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **275**(41), 31838–46.
- L., H. A. (1999). Evolutionary diversification of the mammalian defensins. *Cell. Mol. Life Sci.*, **56**, 94–103.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Laskowski, R., MacArthur, M., Moss, D., und Thornton, J. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283–291.
- Lederer, F. (1992). Flavocytochrome b₂. In Müller, F., Editor, *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, volume III, Seiten 153–242. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Lehrer, R. I. und Ganz, T. (1990). Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood*, **76**, 2169–2181.
- Lehrer, R. I. und Ganz, T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Current Opin. Imm.*, **11**, 23–27.

- Leslie, A. (1991). Macromolecular Data Processing. In Moras, D., Podjarny, A. D. und Thierry, J. C., Editoren, *Crystallographic Computing V*, Seiten 27–38. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Lindqvist, Y. (1989). Refined Structure of Spinach Glycolate Oxidase at 2 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, **209**, 151–166.
- Lu, G. (2000). TOP: A new method for protein structure comparisons and similarity searches. *J. Appl. Cryst.*, **33**, 176–183.
- Ludtke, S. J. (1996). Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*, **35**, 13723–13728.
- Martin, A. C. R. *et al.* (1998). Protein folds and functions. *Structure*, **6**, 875–756.
- Massey, V. (1995). Introduction: Flavoprotein structure and mechanism. *FASEB J.*, **9**(7), 473–475.
- Mattevi, A., Tedeschi, G., Bacchella, L., Coda, A., Negri, A. und Ronchi, S. (1999). Structure of L-aspartate oxidase: implications for the succinate dehydrogenase/fumarate reductase oxidoreductase family. *Structure*, **7**, 745–756.
- Mattevi, A., Vanoni, M. A., Todone, F., Rizzi, M., Teplyakov, A., Coda, A., Bolognesi, M. und Curti, B. (1996). Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome b₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**(15), 7496–7501.
- Matthews, B. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.*, **33**, 491–497.
- Mattick, A. T. R. und Hirsch, A. (1947). *Lancet*, **II**, 5.
- Mattik, A. T. R. und Hirsch, A. (1944). *Nature*, **154**, 551.
- Meah, Y., Brown, B. J., Chakraborty, S. und Massey, V. (2001.). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**(15), 8560–8565.
- Merritt, E. und Murphy, M. (1994). Raster3D Version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics. *Acta. Cryst.*, **50**, 869–873.
- Messerschmidt, A. und Huber, R. (2000). X-ray crystallography of Biological Macromolecules. In Meyers, R., Editor, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Seiten 6061–6107. Wiley, Chichester.

- Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., Nishina, Y., Shiga, K., Setoyama, C. und Miura, R. (1996). Three-dimensional structure of porcine kidney D-amino acid oxidase at 3 Å. *J. Biochem.*, **120**(1), 14–17.
- Muller, Y. A., Schumacher, G., Rudolph, R. und Schulz, G. E. (1994). *J. Mol. Biol.*, **237**(3), 315–335.
- Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gómez, N. und Ariño, J. (1998). Regulation of salt tolerance by HAL3p is mediated through the PPZ1 Ser/Thr protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7357–7362.
- Narhi, L. O. und Fulco, A. J. (1986). Characterization of a self-sufficient 119000 dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megatherium*. *J. Biol. Chem.*, **261**, 7160–7169.
- Navaza, J. (1987). On the fast rotation function. *Acta Crystallogr.*, **43**, 645–653.
- Nizet, V., Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., A., D. R., Pestonjamas, V., Piraino, J., Huttner, K. und Gallo, R. L. (2001). Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature*, **414**(22), 454–457.
- Otto, M., Peschel, A. und Götz, F. (1998). Producer self-protection against the lantibiotic epidermin by the ABC transporter EpiFEG of *Staphylococcus epidermidis* Tü3298. *FEMS Microbiol. Letters*, **166**, 203–211.
- Patterson, A. L. (1934). A Fourier Series Method for the Determination of the Components of Interatomic Distances in Crystals. *Phys. Rev.*, **46**, 372–376.
- Perrakis, A., Morris, R. J. H. und Lamzin, V. S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Struct. Biol.*, **6**, 458–463.
- Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G. und North, A. (1960). Structure of haemoglobin; a three dimensional fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, **185**, 416–422.
- Qi, F., Chen, P. und Caufield, P. (1999). Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. *Appl. Environm. Microbiol.*, **65**, 3880–3887.

- Rao, S. T., Shaffie, F., Yu, C., Satyshur, K. A., Stockman, B. J., Markley, J. L. und Sundaralingam, M. (1992). Structure of the oxidized long-chain flavodoxin from *Anaabaena* 7120 at 2Å resolution. *Protein Science*, **1**, 1413–1427.
- Rauch, P. J. G. und de Vos, W. M. (1992). Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, **174**, 1280–1287.
- Rayman, K. und Hurst, A. (1984). In Vandamme, E. J., Editor, *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, Seite 607. Dekker, New York.
- Rogers, L. A. und Whittier, E. O. (1928). *J. Bacteriol.*, **16**, 321.
- Röntgen, W. C. (1895). Über eine neue Art von Strahlen. *Sitzungsberichte der Physikalisch-Medizinischen Gesellschaft zu Würzburg*, 132–141.
- Rossmann, M. G., Moras, D. und Olsen, K. (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature*, **250**, 194–199.
- Sahl, H.-G. und Bierbaum, G. (1998). Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **52**, 41–79.
- Sayre, D. (1974). Least-Squares refinement. II: High resolution phasing of a small protein. *Acta Cryst.*, **A30**(180-184).
- Schnell, N., Entian, K.-D., Schneider, U., Götz, F., Zähner, H., Kellner, R. und Jung, G. (1988). Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature*, **333**, 276–278.
- Schreuder, H. A., Prick, P. A., Wierenga, R. K., Vriend, G., Wilson, K. S., Hol, W. G. und Drenth, J. (1989). Crystal structure of the p-hydroxybenzoate-substrate complex refined at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **208**(4), 679–696.
- Sheldrick, G. M., Dauter, Z., Wilson, K. S., Hope, H. und Sieker, L. C. (1993). The application of direct methods of patterson interpretation to high-resolution native protein data. *Acta Crystallogr.*, **49**, 18–23.
- Skaugen, M., Nissen-Meyer, J., Jung, G., Stevanovic, S., Sletten, K., Abildgaard, C. I. M. und Nes, I. F. (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**(44), 27183–27185.

- Smith, W. W., Pattridge, K. A. und Ludwig, M. L. (1983). Structure of Oxidized Flavodoxin from *Anacystis nidulans*. *Journal of Molecular Biology*, **165**, 737–755.
- Spitzer, E. D., Jimenez-Billine, H. E. und Weiss, B. (1988). b-alanine auxotrophy associated with *dfp*, a locus affecting DNA synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**, 872–876.
- Spitzer, E. D. und Weiss, B. (1985). *dfp* gene of *Escherichia coli* K-12, a locus affecting DNA synthesis, codes for a flavoprotein. *J. Bacteriol.*, **164**, 994–1003.
- Strauss, E., Kinsland, C., Ge, Y., McLafferty, F. E. und Begley, T. P. (2001). Phosphopantothienoylcysteine Synthase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **276**(17), 13513–13516.
- Swanson, S. M. (1994). Core tracing: Depicting connections between features in electron density. *Acta Cryst.*, **D50**, 695–708.
- Tanner, J. T., Lei, B., Tu, S.-C. und Krause, K. L. (1996). Flavin Reductase P: Structure of a Dimeric Enzyme That Reduces Flavin. *Biochemistry*, **35**, 13531–13539.
- Turk, D. (1992). Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen. Doktorarbeit, Technische Universität, München.
- Vallon, O. (2000). New Sequence Motifs in Flavoproteins: Evidence for Common Ancestry and Tools to Predict Structure. *Proteins*, **38**, 95–114.
- Wahl, M. C. und Sundaralingam, M. (1997). C-H...O hydrogenbonding in biology. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 97–102.
- Wang, B.-C. (1985). Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography. *Meth. Enzymol.*, **115**, 90–112.
- Williams, X. H., J. (1992). Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxins reductase and mercuric ion reductase - a family of flavoenzyme transhydrogenases. In Müller, F., Editor, *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, volume III, Seiten 121–211. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Xio, Z. X. und Mathews, F. S. (1990). Molecular structure of flavocytochrome b_2 at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **212**, 837–863.

- Yue, Q. K., Kass, I. J., Sampson, N. S. und Vrielink, A. (1999). Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants. *Biochemistry*, **38**(14), 4277–4286.
- Zhang, K. Y. J. und Main, P. (1990). The use of Sayre's equation with solvent flattening and histogram matching for phase extension and refinement of protein structures. *Acta Cryst.*, **A46**, 377–381.
- Zhu, J. K. (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **124**(3), 941–948.