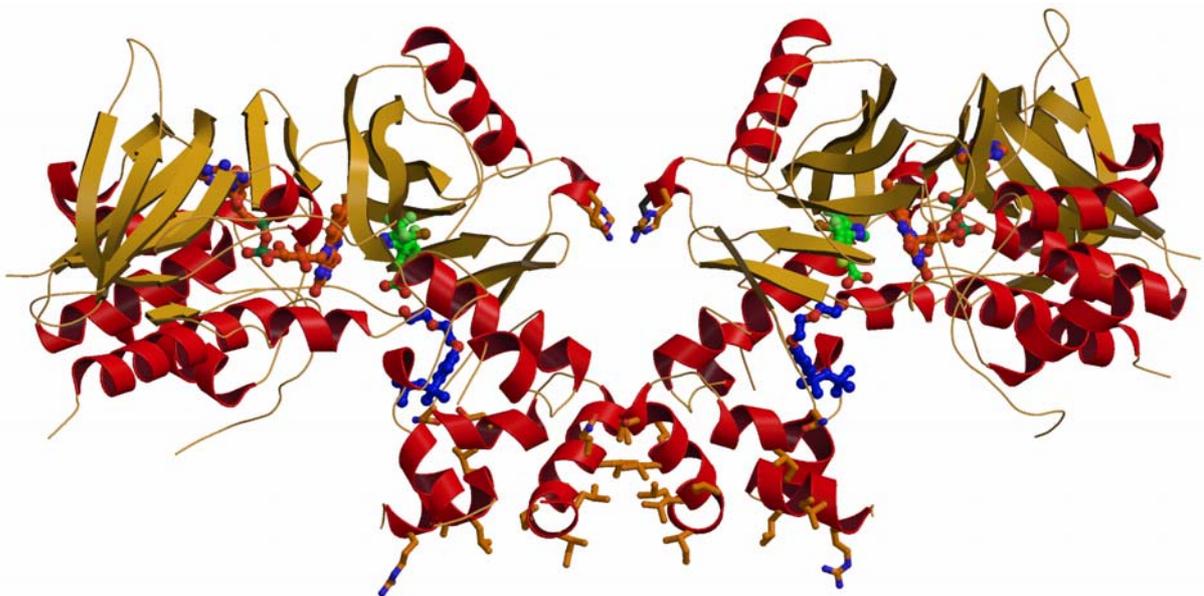
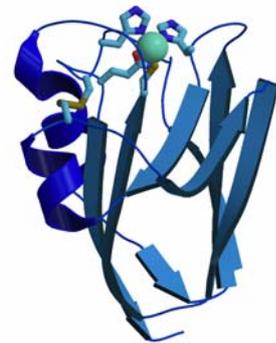
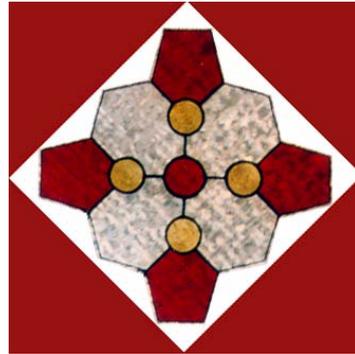
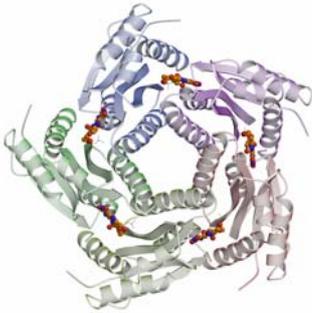


Michael Koch

Strukturanalyse der mitochondrialen
Protoporphyrinogen IX Oxidase aus *Nicotiana tabacum*
und von zwei weiteren Proteinen:

Blaues Cupredoxin Umecyanin aus Meerrettich
(*Armoracia rusticana*)

Lumazinsynthese-W27Y-Mutante aus Spaltheefe
(*Schizosaccharomyces pombe*)



Technische Universität München

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

Strukturanalyse der mitochondrialen Protoporphyrinogen IX Oxidase aus *Nicotiana tabacum* und von zwei weiteren Proteinen: Umecyanin und Lumazinsynthase-W27Y-Mutante

Michael Koch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. W. Hiller
Prüfer der Dissertation	1. apl. Prof. Dr. Dr. h. c. R. Huber
	2. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Die Dissertation wurde am 24.02.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 23.03.2004 angenommen.

Teile der Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht bzw. wurden bereits veröffentlicht in:

Koch, M., Breithaupt, C., Kiefersauer, R., Freigang, J., Huber, R., Messerschmidt, A. *Crystal Structure of Protoporphyrinogen IX Oxidase: A key enzyme in heme and chlorophyll biosynthesis (EMBO J., online veröffentlicht 1. April 2004)*

Koch, M., Breithaupt, C., Kiefersauer, R., Freigang, J., Huber, R. and Messerschmidt, A. (2004). *Crystal Structure of Protoporphyrinogen IX Oxidase. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kristallographie 2004, Jena (Vortrag)*

Koch, M., Kiefersauer, R., Huber, R. (2002) *Improvement of freezing protein crystals by accurately controlled humidity changes. Poster presentation at the XIX Congress and general assembly of the International Union of Crystallography, Geneva, Switzerland (Posterpräsentation)*

Koch, M., Velarde, M., Echt, S., Harrison, M., Dennison, C., Messerschmidt, A. *Crystal structure of blue cupredoxin Umecyanin, the first stellacyanin in oxidized and reduced form (J. Biol. Chem., in Vorbereitung)*

Koch, M., Breithaupt, C., Gerhardt, S., Haase, I., Weber, S., Cushman, M., Huber, R., Bacher, A. and Fischer, M. *Structural basis of Charge Transfer Complex Formation by Riboflavin bound to 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine Synthase (Eur. J. Biochem., abgeschickt)*

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Å	Angström
ALA	5-Aminolävulinsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
°C	Grad Celsius
CPO	Coproporphyrinogen III Oxidase
cm	Zentimeter
DAO	D-Aminosäureoxid-Oxidase
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
FAD	Flavinadenindinukleotid
Fc / FeCh	Ferrochelatase
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
HFc	Humane Ferrochelatase
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAO	L-Aminosäureoxid-Oxidase
LUSY	6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase
M	molar
MAO	Monoaminoxidase
MR	molecular replacement (Molekularer Ersatz)
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	NAD-phosphat

NCS	<i>non crystallographic symmetry</i> (Nicht kristallographische Symmetrie)
nm	Nanometer
NMM	<i>new minimal medium</i>
Od _{xxx}	optische Dichte bei xxx nm
ori	origin of replication
PAO	Polyaminoxidase
PDS	Phytoendesaturase
PEG	Polyethylenglycol
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
pmol	Picomol
PMP	Pyridoxaminphosphat
PP	Pyrophosphat
PPO	Protoporphyrinogen IX Oxidase
Rmsd	root mean square deviation
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAD	<i>Single Wavelength Anomalous Diffraction</i> (anomale Streuung bei einer Wellenlänge)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunden
tRNA	transfer- Ribonukleinsäure
UME	Umecyanin, oxidierte Form
U/min	Umdrehungen/Minute
URED	Umecyanin, reduzierte Form
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol	Volumenanteil
w/v	Masse/Volumen

DNA-Basen werden im Einbuchstabencode bezeichnet.

Zur Benennung von einzelnen Aminosäuren wurden sowohl der Einbuchstabencode als auch der Dreibuchstabencode verwendet.

Inhaltsverzeichnis

1. Danksagung	7
2. Zusammenfassung	9
3. Einleitung	12
3.1 Porphyrine und Porphyrinbiosynthesewege	12
3.2 Porphyrinbiosynthese in Eukaryonten	15
3.3 Protoporphyrinogen IX Oxidase und Porphyrinbiosynthese in Pflanzen	29
3.4. Cupredoxine	39
3.5. Riboflavinbiosynthese und Lumazinsynthase	41
4. Materialien und Methoden	44
4.1. Materialien	44
4.2. Molekularbiologische Methoden	45
4.3. Mikrobiologische Methoden	48
4.4. Proteinbiochemische Methoden	50
4.5. Kristallographische Methoden	52
5. Ergebnisse	63
5.1. Strukturbestimmung der Protoporphyrinogen IX Oxidase aus Tabak	63
5.2. Strukturbestimmung des blauen Cupredoxins Umecyanin aus Meerrettich	80
5.3. Strukturbestimmung der Lumazinsynthase-W27Y-Mutante aus Spaltheife	86
6. Diskussion	90
6.1 Protoporphyrinogen IX Oxidase	90
6.2 Umecyanin	99
6.3 Lumazinsynthase W27Y-Mutante	101
7. Literaturverzeichnis	105

1. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Robert Huber bedanken für die Möglichkeit, diese interessanten Projekte zu bearbeiten und für seine Unterstützung, weiterhin für das stete Interesse am Fortgang der PPO-Strukturlösung sowie für jegliche wissenschaftliche Freiheit bei der Wahl der weiteren Projekte und deren Durchführung.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Prof. Dr. Albrecht Messerschmidt und Constanze Breithaupt, die mir durch ihre ausserordentlich engagierte und zeitintensive Betreuung den Einstieg in die Kristallographie ermöglicht haben. Dr. Reiner Kiefersauer möchte ich für die Transformation der PPO-Kristalle danken, die damit erst zur Strukturlösung getaugt haben.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Jörg Freigang und Christian Krebs bei BayerCropScience, die mir in den vergangenen drei Jahren jede nur denkbare materielle Unterstützung bei der Bearbeitung der PPO haben zukommen lassen und für die vielen Ratschläge am Anfang. Des weiteren möchte ich mich bei Dr. Klaus Stenzel, Dr. Günther Auerbach, Dr. Oliver Boscheinen und Dr. Christoph Haussmann (damals noch Bayer AG, Pflanzenschutz) bedanken für das äußerst interessante Thema PPO und die Einführung in die bereits gemachten Arbeiten.

Stefanie Echt, Dr. Stefan Gerhardt, Lars Schelte und Dr. Markus Fischer von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher an der Technischen Universität München sowie Prof. Dr. Dr. Bacher selbst möchte ich danken für die stete Hilfsbereitschaft bei labortechnischen, insbesondere molekularbiologischen, Problemen. Dr. Markus Fischer möchte ich insbesondere danken für die Hilfe beim Umklonieren der PPO und der Geranyl-Geranyltransferase, sowie für die LUSY-W27Y-Mutante. Stefanie Echt möchte ich herzlich danken für ihre Unterstützung bei der Umecyanin-Kristallisation.

Danke sagen möchte ich auch meinen Kollegen in Labor und Büro, die mir immer hilfreich zur Seite standen: Dr. Martin Augustin, Michael Engel, Dr. Iris Fritze, Dr. Peter Göttig, Dr. Claudia Hartmann, Stefan Henrich, Ioannis Ioannidis, Tobias Krojer, Dr. Sofia Macieira, Dr. Klaus

Maskos, Dr. Ulf Marquart, Olga Pipitone, Kerstin Rohr, Emina Savarese, Dr. Manuel Than, Milko Velarde, Katja Wenig, Rasso Willkomm und Dr. Michael Worbs.

Bedanken moechte ich mich herzlich bei den „guten Geistern“ der Abteilung, ohne die ein geregeltes Arbeiten nicht oder nur sehr schwer möglich wäre: Gina Beckmann, Monika Bumann, „P&T“ Petra Birle und Tatjana Krywcun, Werner Dersch, Marion Heinze, „C. P.“ Kaerlein, Andrea Papendorf, Ottmar Paul, Renate Rüller, Monika Schneider, Charlotte Ungewickell, Traudl Wenger und „last but not least“ bei Snezan Marinkovic.

Mein größter Dank geht an meine Eltern, die mich in den vergangenen Jahren stets moralisch und auch finanziell unterstützt haben.

Abschließend möchte ich mich noch bei all jenen Kollegen bedanken, die ich nicht explizit erwähnt habe, und die auch zu dem ausgezeichneten (Arbeits-)Klima in der Abteilung Huber beigetragen haben.

2. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die röntgenkristallographische Untersuchung und Strukturlösung der Protoporphyrinogen IX Oxidase aus *Nicotiana tabacum* (Tabak), des blauen Cupredoxins Umecyanin aus *Armoracia rusticana* (Meerrettich) und dreier Ligandenkomplexe der Lumazinsynthase-Mutante W27Y aus *Schizosaccharomyces pombe* (Spaltheife).

Protoporphyrinogen IX Oxidase

Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO), das letzte gemeinsame Enzym der Häm- und der Chlorophyllbiosynthese, katalysiert die Oxidation von Protoporphyrinogen IX zum vollständig konjugierten Protoporphyrin IX. Das membrangebundene Flavoprotein ist das Target der grossen Klasse der peroxidierenden Herbizide, die PPO mit hoher Effizienz und Spezifität inhibieren, indem sie die Pflanzen durch schädliche Sauerstoffradikale, die durch Photosensibilisierung des angehäuften Protoporphyrin IX entstehen, stark schädigen. Bei Menschen ist ein Defekt der PPO verantwortlich für die dominant vererbte Krankheit Porphyria Variegata. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Kristallstruktur der mitochondrialen PPO aus Tabak (*Nicotiana tabacum*) bei einer Auflösung von 2,9 Å im Komplex mit einem Phenylpyrazol-Inhibitor vorgestellt und beschrieben. Die Struktur wurde mittels *Single Wavelength Anomalous Diffraction* (SAD) gelöst, die Kristalle konnten nur mit Hilfe des Free-mounting System so verbessert werden, dass eine Strukturlösung möglich war. Die PPO bildet ein locker assoziiertes Dimer und faltet in eine FAD-Bindedomäne der *p*-Hydroxybenzoathydroxylase-Faltung und eine Substratbindedomäne, die eine enge Öffnung für das aktive Zentrum unterhalb des FAD umschliessen, und eine α -helikale Membranbindedomäne. Die Architektur des aktiven Zentrums erlaubt eine spezifische Bindung des Substrats, die mit der ungewöhnlichen Sechs-Elektronenoxidation einhergeht, und ermöglicht das rationale Design von maßgeschneiderten Herbiziden. Interessanterweise lässt sich die Membranbindedomäne auf die dimere Struktur der humanen Ferrochelatase docken, dem nächsten Enzym in der Hämbiosynthese, das in die gegenüberliegende Seite der Membran gebunden ist. Der resultierende modellierte Transmembrankomplex hat zwei lange Kanäle, die die aktiven Zentren der PPO und der Ferrochelatase miteinander verbinden und erlauben eine strukturelle Erklärung für die Entkopplung der Hämbiosynthese, die sowohl bei Porphyria Variegata Patienten als auch bei PPO-inhibierten Pflanzen beobachtet wird.

Umecyanin

Cupredoxine sind kleine, blaue kupferhaltige Proteine, die Kupfer des Typ 1 gebunden haben, und ermöglichen Elektronentransfer sowohl in Prokaryonten wie in Eukaryonten. Stellacyanine stellen eine Unterklasse der pflanzlichen Cupredoxine (Phytocyanine) dar und zeichnen sich

aus durch einen axialen Gln-Liganden, wie die Struktur des Stellacyanin aus Gurke (*Cucumis sativus*) zeigt. Sie tragen weiterhin Kohlenhydrate und sind chimere Proteine, die aus einer kupferbindenden Domäne (Cupredoxin) und einer Zellwandankerdomäne bestehen. Eine interessante Eigenschaft aller bisher untersuchten Phytocyanine ist ein Farbübergang, der bei hohen pH-Werten im oxidierten Protein stattfindet und der sich dadurch bemerkbar macht, dass das Protein die Farbe von blau nach violett wechselt. Obwohl zahlreiche Untersuchungen über den alkalischen Übergang von Phytocyaninen angestellt worden sind, wurde die genaue Ursache für diesen Effekt bisher nicht gefunden. Daher wurde die Kristallstruktur des Umecyanin, einem bisher wenig untersuchten Phytocyanin, das aus Meerrettich-Wurzeln (*Armoracia rusticana*) isoliert wurde, bestimmt. Beschrieben werden die oxidierte Form und die reduzierte Form des Umecyanin bei niedrigem pH-Wert, die Auflösungen sind nahezu atomar und betragen 1,9 und 1,8 Å. Dies erlaubt eine genaue Beschreibung der Kupferkoordination und der Unterschiede zwischen oxidiertem und reduziertem Form. Die Struktur des reduzierten Umecyanin ist die bisher einzige Struktur eines reduzierten Stellacyanins, der Gln-Ligand befindet sich deutlich weiter entfernt vom Kupferzentrum als in der oxidierten Form, wodurch die Koordination des Kupfers von tetraedrisch zu trigonal pyramidal wechselt. Der beschriebene Farbübergang bei sehr hohem pH-Wert konnte zwar in den Umecyaninkristallen beobachtet werden, eine Strukturbestimmung war bisher leider noch nicht möglich, da die Kristalle bedingt durch den hohen pH-Wert nicht mehr streuen.

Lumzinsynthasemutante W27Y

Riboflavin (Vitamin B₂) ist einer der wichtigsten Cofaktoren und seine Biosynthese erfolgt in den letzten beiden Schritten über das Zwischenprodukt 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Das Enzym aus der Spaltheefe, *Schizosaccharomyces pombe*, die 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase, die dieses Molekül synthetisiert, enthält überraschenderweise ein gebundenes Riboflavinmolekül im aktiven Zentrum, wenn es aus *E. coli* rekombinant isoliert wird. Der Aminosäurerest Trp27 der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase aus der Spaltheefe, der für das Stacking mit den Liganden verantwortlich ist, wurde durch ein Tyrosin und ein Phenylalanin ausgetauscht. Die Struktur der W27Y-Mutante komplexiert mit Riboflavin, dem Substratanalogon 5-Nitroso-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidinedion (NORAP), und dem Produktanalogon, 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazine (CEOL), wurde mittels Röntgenkristallographie bei Auflösungen von 2,7 Å – 2,8 Å bestimmt. Das Indolsystem des Trp27 bildet einen koplanaren π -Komplex mit Riboflavin, dahingegen bildet der entsprechende Phenylring in der W27Y-Mutante lediglich einen periferen Kontakt mit dem heterozyklischen Ringsystem des gebundenen Riboflavin aus. Dies erklärt das Ausbleiben des langen

Wellenlängenshifts des Riboflavins, das an das Wildtypenzym gebunden ist. Die Strukturen der Mutanten sind wichtige Hilfsmittel, um die ungewöhnlichen physikalischen Eigenschaften des Riboflavin im Komplex mit der Lumazinsynthase zu erklären.

3. Einleitung

3.1 Porphyrine und Porphyrinbiosynthesewege

Nahezu alle Organismen der Erde benötigen Tetrapyrrole als integrale Bestandteile ihres zellulären Metabolismus. So besitzen Tetrapyrrole sowohl zentrale Funktion im Rahmen der elektronentransportabhängigen Energiekonservierung als auch als prosthetische Gruppen verschiedener Enzyme. Man kennt heute sieben verschiedene biologisch relevante Tetrapyrrolklassen: Häme, Chlorophylle, Bacteriochlorophylle, Sirohäm, Corrinoide (z.B. Vitamin B₁₂), Coenzym F₄₃₀, und offenkettige Tetrapyrrole (z.B. Gallenfarbstoffe, Phytochrome). Die zyklischen Tetrapyrrole leiten sich vom Porphyringrundgerüst ab, das aus vier Pyrrolderivaten besteht (Abb.1). Die Pyrrolderivate sind meistens durch vier Brückenkohlenstoffe über Methinbrücken verbunden, eine Ausnahme bilden die Corrinoide, in denen der vierte Brückenkohlenstoff (C₂₀) fehlt (Abb.2e). Im Zentrum des Ringsystems lokalisierte Stickstoffatome können Metallionen wie Eisen, Magnesium, Kobalt oder Nickel komplexieren (Abb.2). Die verschiedenen Reduktionszustände der einzelnen Porphyrine sowie die Diversität der Ringsubstituenten und der komplexierten Metallionen sind für den spezifischen Charakter dieser Makromoleküle verantwortlich. Man findet eisenhaltiges Häm als prosthetische Gruppe von Cytochromen, Hämoglobin und Myoglobin, aber auch von Peroxidasen und Katalasen. Die verschiedenen Magnesiumporphyrine der Chlorophyll- und Bacteriochlorophyllklassen dienen als Photorezeptoren im Rahmen der Photosynthese. Chlorophylle wurden außer in den Chloroplasten von Pflanzen auch in Cyanobakterien und Prochlorophyta nachgewiesen. Bacteriochlorophylle sind auf die verschiedenen Mitglieder der Bacteria beschränkt. Das Eisenporphyrin Sirohäm ist der Cofaktor von assimilatorischen Sulfid- und Nitritreduktasen. Die kobalthaltigen Corrinoide sind in Form von Cobalamin Coenzym von Methyltransferasen. Das erst vor einigen Jahren entdeckte Nickeltetrapyrrol, Cofaktor F₄₃₀, dient als prosthetische Gruppe der Methyl-Coenzym-M-Reduktase, dem letzten Enzym der Methanbildung der methanogenen Archaea (Abb.2). Während Häme und Sirohäm (nicht im Tierreich) ubiquitär in fast allen Organismen zu finden sind, werden Corrinoide und F₄₃₀ fast ausschließlich von Bakterien und Archaea gebildet (Jahn et al., 1996).

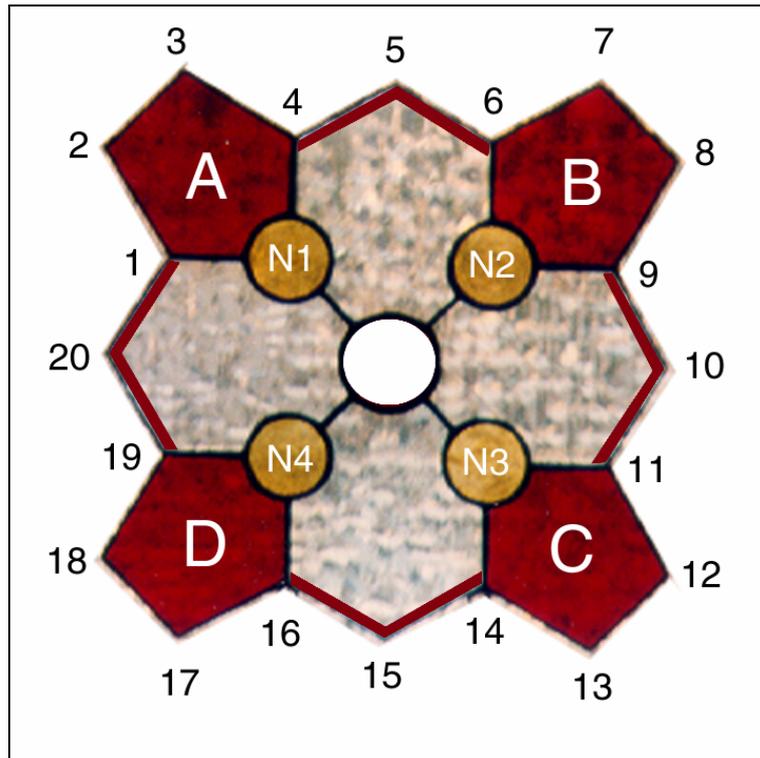


Abbildung1: Allgemeine Porphyrinstruktur mit Benennung der Pyrrolringe (von A bis D) und der Nummerierung der Kohlenstoff- (C₁ bis C₂₀) und der Stickstoffatome (N₁ bis N₄). Alle Kohlenstoffatome der Pyrrolringe, die eine Bindung zu einem Stickstoffatom ausbilden, werden α-Kohlenstoffe (z.B. C₁ und C₄), die zwei verbleibenden β-Kohlenstoffe (z.B. C₂ und C₃) genannt. Die Pyrrole sind über Methinbrücken durch Brückenkohlenstoffe oder *meso*-Kohlenstoffe (z.B. C₅) verbunden (Jahn et al., 1996).

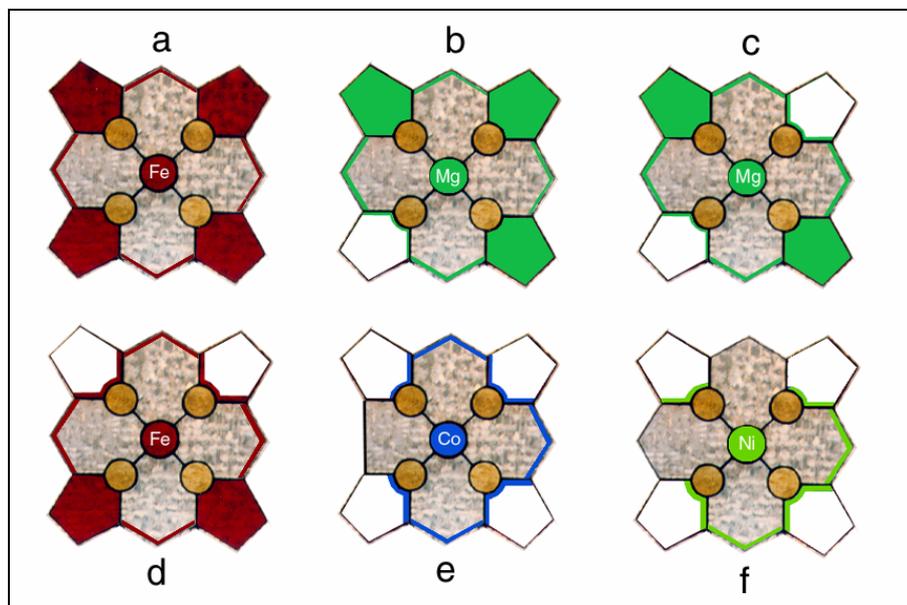


Abbildung2: Grundstrukturen der verschiedenen Porphyrine mit gebundenem Metallion und dem unterschiedlichen Reduktionszustand des Ringsystems. Die Chromophorsysteme sind farbig hinterlegt abhängig vom gebundenen Metall (Fe²⁺ - rot, Mg²⁺ - grün, Co²⁺ - kobaltblau, Ni²⁺ - gelbgrün). (a) Häme ohne Häm d₁, (b) Chlorophylle und Bacteriochlorophylle c, d und e, (c) Bacteriochlorophylle a, b und g, (d) Sirohäm und Häm d₁, (e) Corrinoide, (f) Faktor F₄₃₀ (Jahn et al., 1996).

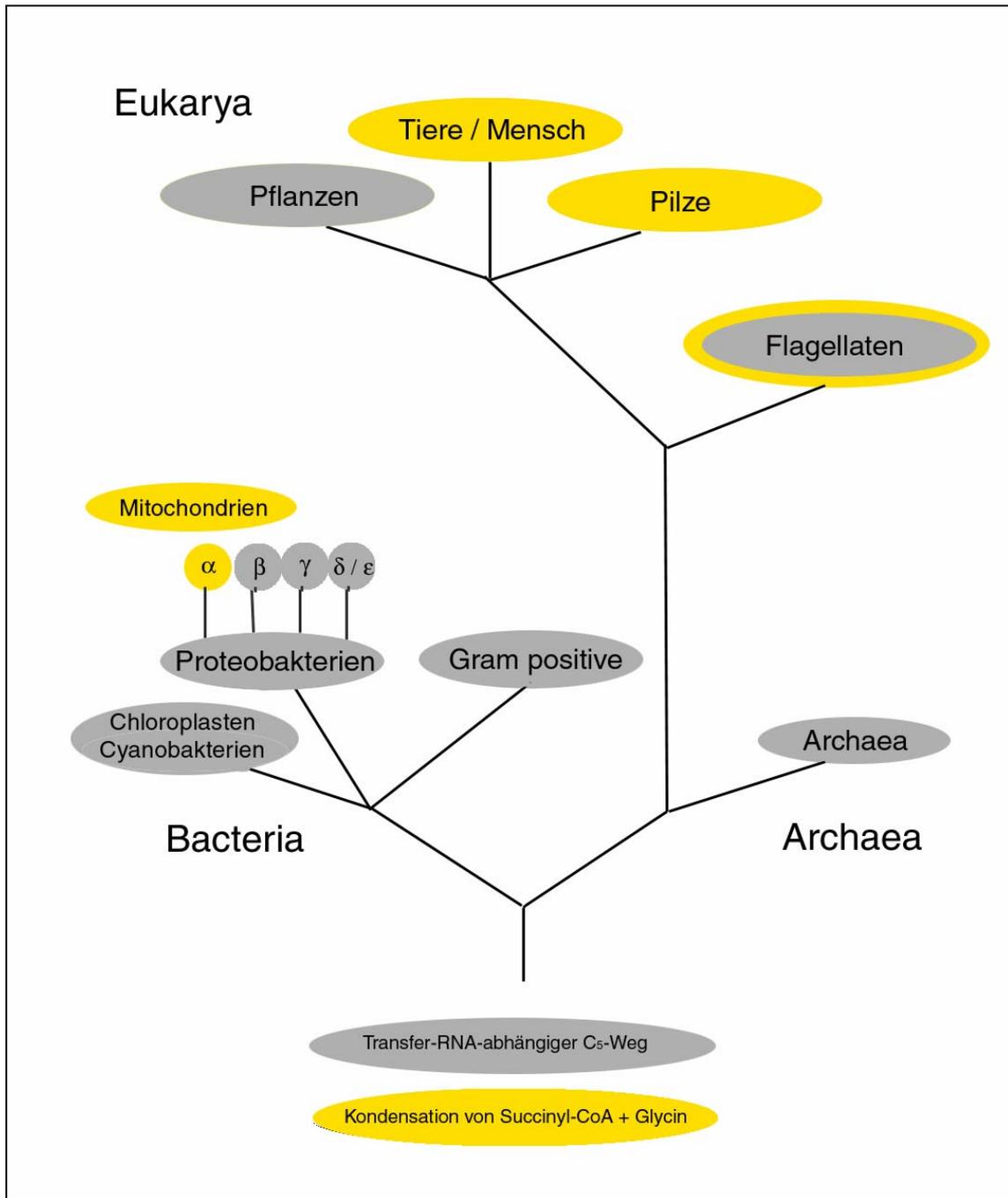


Abbildung3: ALA-Synthese in den Organismen. Die Porphyrinbiosynthese aller Organismen beginnt mit der Synthese des für alle gemeinsamen Vorläufermoleküls 5-Aminolävulinsäure (ALA). Diese läuft in zwei verschiedenen, getrennten Wegen ab je nach Organismus. Pflanzen, Archaea und fast alle Bakterien beginnen mit der Reduktion der Glutamyl-tRNA^{Glu} ausgehend vom Glutamat (C₅-Weg). Nur die α -Gruppe der Proteobakterien als einzige Bakteriengruppe synthetisiert ALA aus Glycin und Succinyl-CoA. Die Mitochondrien, die phylogenetisch von dieser Bakteriengruppe abzuleiten sind, bedienen sich ebenfalls dieses als Shemin-Pfad (C₄-Weg) bekannten Weges. Deshalb synthetisieren Pilze und Tiere und damit auch der Mensch ALA nach dem Shemin-Weg. Für *Euglena gracilis* (Flagellat) sind beide Wege nachgewiesen worden (Jahn et al., 1996).

3.2 Porphyrinbiosynthese in Eukaryonten

5-Aminolävulinsäuresynthese auf zwei Wegen

Für alle Tetrapyrrole ist 5-Aminolävulinsäure (ALA) das gemeinsame Vorläufermolekül. Zunächst wurde in den 1950er Jahren für Vogelerythrozyten und für das phototrophe Bakterium *Rhodobacter sphaeroides* die Biosynthese von ALA durch die Kondensation von Glycin und Succinyl-Coenzym A unter Freisetzung von CO₂ und Coenzym A (CoA) von Shemin nachgewiesen, deshalb wird diese Synthese oft auch Shemin-Weg genannt.

In den 1970er Jahren wurde dann in Pflanzen ein alternativer Weg der ALA-Synthese beschrieben, der vom C₅-Gerüst des Glutamats (C₅-Weg) ausgeht. Eine große Überraschung war dann Mitte der 1980er Jahre der Befund, dass eine Transfer-RNA an der Reduktion des Glutamats zu Glutamat-1-Semialdehyd beteiligt ist. Der Aldehyd wird dann im zweiten Schritt des Syntheseweges durch eine Transaminierung zu ALA umgesetzt. Heute weiß man, dass Pflanzen, Archaea und fast alle Bakterien diesen Weg nutzen. Die einzige Ausnahme für das Reich der Bakterien bildet die α -Gruppe der Proteobakterien. Nur diese Bakteriengruppe, zu der *Rhodobacter sphaeroides* gehört, und in die phylogenetisch auch die Mitochondrien einzuordnen sind, besitzt wie Tiere (z.B. Säuger und Vögel) und Pilze (z.B. Hefen) den Shemin-Syntheseweg (Abb.3). Für *Euglena gracilis* (Flagellat) sind beide Wege nachgewiesen worden (Jahn et al., 1996).

ALA-Synthase

Die Kondensation von Succinyl-Coenzym A und Glycin wird durch die ALA-Synthase (ALAS, EC 2.3.1.37) katalysiert. In Säugetieren existieren zwei ALAS Isoformen, eine nichtgewebespezifische ALAS (ALAS1) und eine erythroid-spezifische Form (ALAS2).

Der geordnete Pyridoxalphosphat(PLP)-abhängige Mechanismus des dimeren Enzyms ist weitgehend aufgeklärt. Zuerst wird Glycin gebunden, gefolgt von Succinyl-CoA unter Abspaltung der CoA-Gruppe. Nach Dissoziation von CO₂ werden schließlich ALA und das Holoenzym freigesetzt. ALAS funktioniert als Homodimer, Reste von beiden Untereinheiten gehören zum aktiven Zentrum.

Die Struktur der ALA-Synthase ist noch nicht aufgeklärt. ALAS gehört zur α -Oxamin-Synthase-Unterfamilie der PLP-abhängigen Enzyme, die die Kondensation einer Aminosäure mit einem Carbonsäure-CoA-Thioester unter Decarboxylierung der Aminosäure katalysieren. ALAS soll in zwei Konformationen existieren, einer offenen, in der die Substrate binden, und in einer geschlossenen nach Bindung des Succinyl-CoA (Zhang and Ferreira, 2002).

Glutamyl-tRNA-Reduktase

Pflanzen, Archaea und die meisten Bakterien nutzen Glutamyl-tRNA^{Glu}, die auch in die Proteinbiosynthese eingeht, als Ausgangsmolekül zur ALA-Synthese. Es wurden Komplexe zwischen der Glutamyl-tRNA-Synthase und der Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR, EC 6.1.1.17), dem ersten Enzym der Tetrapyrrolbiosynthese, nachgewiesen. Diese Komplexe erlauben ein Einschleusen der Aminoacyl-tRNA in die Tetrapyrrolbiosynthese (Jahn et al., 1996).

Die erste und bisher einzige bekannte Struktur einer Glutamyl-tRNA-Reduktase ist die der GluTR aus *Methanopyrus kandleri* (HEM A, PDB-Eintrag 1GPJ). GluTR liegt als Dimer vor. Jedes Monomer besteht aus drei Domänen, die linear entlang einer gemeinsamen Achse angeordnet sind. Die erste Domäne besteht aus einem $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Motiv mit anschließendem antiparallelem „four-helix-bundle“. Domäne II hat eine klassische Nukleotidbindefaltung und besteht aus einem zentralen sechssträngigen β -Faltblatt, charakteristischen $\beta\alpha\beta$ -Motiven und einem konservierten Glycin-reichen Loop. Domäne III besteht aus drei Helices, die zusammen mit den drei Helices des benachbarten anderen Monomers ein ungewöhnliches „six-helix-bundle“ um die zweizählige NCS-Achse und damit die Dimerisierungsdomäne bilden (Abb. 4a).

Das aktive Zentrum befindet sich in einer tiefen Substratbindetasche in der ersten Domäne der GluTR, die sich durch eine Reihe strikt konservierter Reste auszeichnet. Domäne II bindet den NADPH-Cofaktor in einer Tasche zwischen Domäne I und II (Moser et al., 2001).



Abbildung 4a: Monomer der Glutamyl-tRNA-Reduktase HEM A aus *Methanopyrus kandleri* mit gebundenem Inhibitor Glutamycin und NADPH-Cofaktor (PDB-Eintrag 1GPJ; (Moser et al., 2001)).

Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase

Im zweiten Schritt der tRNA-abhängigen ALA-Bildung wird Glutamat-1-semialdehyd in einer PLP-abhängigen Reaktion durch die Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase (GSAM, EC 5.4.3.8) zu ALA transaminiert (Abb. 4). Die Pyridoxalphosphat-Form des Enzyms kann über das Zwischenprodukt 4,5-Dioxovaleriansäure Glutamat-1-Semialdehyd zu ALA umsetzen. (Jahn et al., 1996).

Bekannt ist die Struktur der dimeren GSAM aus *Synechococcus* (HEM L, PDB-Eintrag 2GSA). Die GSAM-Faltung kann in drei Domänen unterteilt werden. Die N-terminale Domäne besteht aus einer α -Helix, die von einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt gefolgt wird. Die Hauptdomäne, die den Cofaktor bindet, enthält ein siebensträngiges β -Faltblatt mit sechs parallelen Strängen. Dieses Faltblatt ist umgeben von einigen α -Helices verschiedener Länge. Die C-terminale Domäne faltet in ein dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt, das auf der Außenseite mit vier Helices bedeckt ist. Diese Topologie entspricht der anderer Enzyme aus der Untergruppe II der α -Familie der PLP-Enzyme (Abb.4b).

Die GSAM-Dimerstruktur ist asymmetrisch, der Cofaktor liegt in einem Monomer als PLP, in dem anderen als PMP vor. Die Substrat-Bindestelle wurde identifiziert durch Gabaculin (3-Amino-2,3-Dihydrobenzoesäure), einem GSAM-Inhibitor. Dieses Molekül bindet in eine Tasche, die anders liegt als bei allen anderen Mitgliedern der α -Familie der Aminotransferasen. In der Kristallstruktur bindet Gabaculin wider Erwarten in die PMP-haltige Untereinheit, in der PLP-Untereinheit ist dagegen nur wenig Elektronendichte für Gabaculin zu sehen. Der Grund für die Asymmetrie des Dimers ist im katalytischen Mechanismus zu finden. Liegen beide Untereinheiten in der PLP-Form vor, ist das Enzym inaktiv. Die Asymmetrie liefert nun einen Mechanismus, diese Begebenheit dadurch zu verhindern, dass erstens wenn eine Untereinheit geöffnet (PMP-Form) ist, die andere geschlossen (PLP-Form) vorliegt und dass zweitens wenn eine Untereinheit sich in der PLP-Form befindet, die andere Untereinheit sich nicht öffnen kann (Hennig et al., 1997).

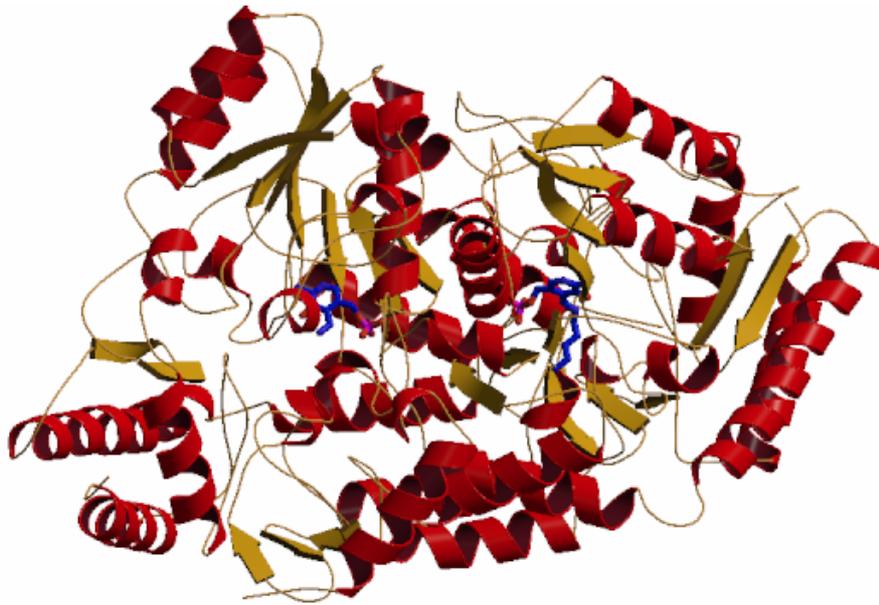


Abbildung 4b: Dimere Struktur der Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase HEM L aus *Synechococcus* mit gebundenem Cofaktor PLP und PMP (Vitamin B₆) (PDB-Eintrag 2GSA ; (Hennig et al., 1997)).

Porphobilinogen-Synthase

Die Porphobilinogen-Synthase oder ALA-Dehydratase (PBGS, EC 4.2.1.24) katalysiert die asymmetrische Kondensation von zwei Molekülen ALA zu dem Pyrrolderivat Porphobilinogen unter Abspaltung von zwei Molekülen Wasser. Das Enzym kommt in allen untersuchten Organismen als Homooktamer vor. Jedes Oktamer besitzt vier aktive Zentren mit jeweils einem Zn²⁺-Ion und bindet bis zu acht Substratmoleküle. Vier weitere an der Katalyse beteiligte Metallzentren sind entweder mit Zn²⁺ (Tiere, Hefe, *E. coli*, *B. subtilis*) oder Mg²⁺ (Pflanzen, und *B. japonicum*, *P. aeruginosa*) besetzt. Die konservierten Aminosäuremotive dieser zweiten Metallbindestelle enthalten entsprechende Cysteinreste für die Zn²⁺- bzw. Aspartatreste für die Mg²⁺-Bindung. Ein drittes Mg²⁺-enthaltendes Metallzentrum zur Koordination der acht Untereinheiten findet man nur in Pflanzen und in allen Bakterien.

Das aktive Zentrum des Enzyms enthält zwei ALA-Bindungsstellen, die A-Stelle und P-Stelle genannt werden, je nachdem, ob aus dem gebundenen ALA die Acetat- oder die Propionat-Seitenkette im Porphobilinogen hervorgeht. Ein Modell der Enzymfunktion beginnt mit der Bildung einer Substrat-Enzym-Schiffschen-Base zwischen der C₄-Gruppe des ALA in der P-Stelle mit einem Lysin im aktiven Zentrum. Das Zn²⁺ im aktiven Zentrum polarisiert die C₄-Carbonylgruppe des in der A-Stelle gebundenen ALAs, um einen nucleophilen Angriff des einsamen Elektronenpaars des Stickstoffs von dem ALA-Molekül in der P-Stelle zu erleichtern. Es entsteht eine zweifache Schiffsche Base, die sich dann in das Endprodukt Porphobilinogen umlagert (Jahn et al., 1996).

Bekannt sind die Strukturen einiger Organismen, darunter eine Zn^{2+} -abhängige aus Mensch (PDB-Eintrag 1E51) und die hochaufgelöste Struktur des Mg^{2+} -abhängigen *Pseudomonas aeruginosa* Enzyms (PDB-Eintrag 1B4K). Das Monomer faltet als $(\alpha\beta)_8$ -Barrel (TIM-Barrel) (Abb.4c). In Monomer A wird das aktive Zentrum durch eine gut-definierte Klappe, die aus zwei kurzen α -Helices besteht, vom umgebenden Solvens abgeschirmt, das aktive Zentrum in Monomer B ist sehr viel größer und besser von außen zugänglich. Es wird vermutet, dass die geordnete Klappe im Monomer A die Funktion hat, die Tasche des aktiven Zentrums vom Solvens zu trennen und ein zur Katalyse fähiges Enzym zu erhalten (Frankenberg et al., 1999).

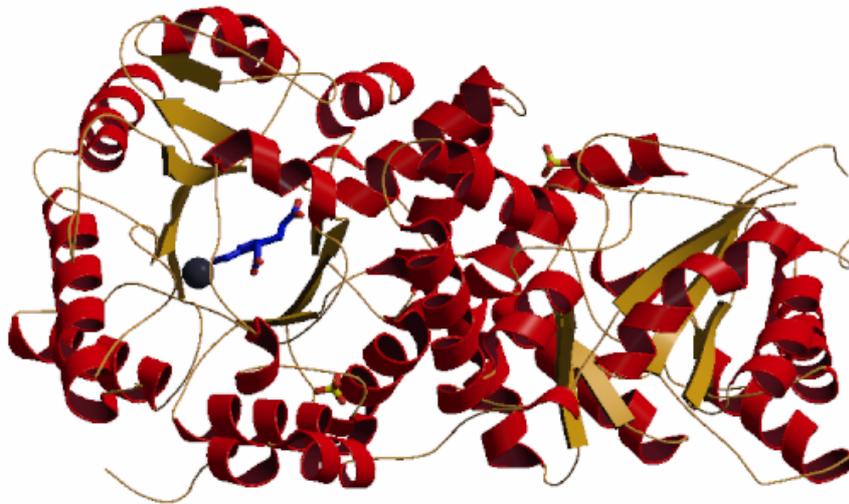


Abbildung 4c: Struktur der humanen Porphobilinogen-Synthase PBGS mit gebundenem Inhibitor 3-[5-(Aminomethyl)-4-(Carboxymethyl)-1H-Pyrrol-3-yl]propansäure und Zn^{2+} . Gezeigt ist das Dimer der asymmetrischen Einheit, das Enzym liegt als Oktamer vor (PDB-Eintrag 1E51; (Mills-Davies, to be published)).

Hydroxymethylbilan-Synthase und Uroporphyrinogen III Synthase

Hydroxymethylbilan-Synthase

Das Enzym 1-Hydroxymethylbilan-Synthase oder Porphobilinogen-Desaminase (HMBS, EC 4.3.1.8) katalysiert die schrittweise Polymerisation von vier Molekülen Porphobilinogen in das offenkettige Tetrapyrrol Preuroporphyrinogen (1-Hydroxymethylbilan). Das Enzym liegt als Monomer vor, die Proteine aus *E. coli*, *Euglena gracilis* und dem Menschen weisen eine Identität der Aminosäuresequenzen von über 45 % auf.

Ungewöhnlich für die Porphobilinogen-Desaminase ist die Verwendung von zwei Substratmolekülen Porphobilinogen als Cofaktor für die Katalyse. Dieser Dipyrromethan-Cofaktor wird vom Apoenzym synthetisiert und kovalent an die Seitenkette eines Cysteins gebunden. Der Cofaktor, der selbst nicht umgesetzt wird, dient als *primer*, an dem die Polypyrrolkette während der Polymerisierungsreaktion gebildet und kovalent an ein Cystein

gebunden wird. Die schrittweise Verlängerung des Polypyrrols am Dipyrromethan-Cofaktor erfolgt über vier kovalent an das Enzym gebundene Zwischenprodukte hin zum Hexapyrrrol. Die hydrolytische Abspaltung des Produkts Preuroporphyrinogen vom letzten Komplex regeneriert das Holoenzym (Jahn et al., 1996).

Der Mechanismus, der es dem Enzym ermöglicht, trotz der wachsenden Polypyrrolkette wiederholt von dem gleichen katalytischen Zentrum Gebrauch zu machen und die strukturellen Faktoren, die das Kettenwachstum auf der Stufe des Tetrapyrrols beenden, ist noch ungeklärt.

Die einzige bisher bekannte Struktur einer HMBS ist diejenige aus *E. coli* (PDB-Eintrag 2YPN), das Monomer besteht aus drei α/β -Domänen ähnlicher Größe. Zwei dieser Domänen zeigen eine Topologie ähnlich der Gruppe-II-Periplasma-bindenden Proteine und einem duplizierten Lappen („lobe“) der bilobalen Transferrine. Der Cofaktor liegt zwischen diesen Domänen in einer Spalte (Abb.4d). Nur die reduzierte Form des Cofaktors ist aktiv (Hadener et al., 1999).

Uroporphyrinogen III Synthase

Für die weitere Modifikation der Ringsysteme ist ein asymmetrisches Tetrapyrrol notwendig. Die erforderliche Asymmetrie wird durch eine Drehung des Ringes D mit anschließender Zyklisierung durch die Uroporphyrinogen III Synthase (U3S, EC 4.2.1.75) unter Bildung von Uroporphyrinogen III erreicht. Das Enzym wurde auch Cosynthase genannt, da es im Zusammenspiel mit der Porphobilinogen-Desaminase agieren muss, um die Freisetzung von Preuroporphyrinogen zu verhindern. Preuroporphyrinogen würde nämlich nach seiner Freisetzung spontan zu dem völlig symmetrischen Tetrapyrrol Uroporphyrinogen I zyklisieren, das die Hämbiosynthese inhibiert und daher eine toxische Wirkung für die meisten Organismen hat. Die Uroporphyrinogen III Synthasen sind Monomere mit lediglich 25 % Aminosäuresequenzidentität zwischen Proteinen von *E. coli*, Spinat und dem Menschen.

Das Verständnis des Mechanismus der Ringdrehung war eine Herausforderung für die Biochemie, und bis zu seiner Aufklärung wurden über zwanzig verschiedene Modelle postuliert. Heute geht man davon aus, dass die Reaktion durch Bindung des C₁₆ an den Kohlenstoff der Hydroxymethylgruppe (C₁) unter Abspaltung von Wasser eingeleitet wird. Durch diesen Schritt wird Ring D mit Ring A verknüpft. Nach Bildung des Spiropyrrrolenzwischenproduktes wird durch einen Fragmentierungs-Rekombinierungsmechanismus die Bindung von Ring D zu Ring C geöffnet, umgelagert und wieder verknüpft, um das Endprodukt Uroporphyrinogen III zu bilden. Von zentraler Bedeutung für die Stabilisierung der verschiedenen Zwischenstufen sind die einsamen

Elektronenpaare der Stickstoffatome im Ring C und D, die in das Ringsystem verschoben werden können.

Das Gen für die Uroporphyrinogen-III-Synthase (*hem D*) liegt in allen bisher untersuchten Bakterien in einem Operon zusammen mit dem Gen für die Hydroxymethylbilan-Synthase (*hem C*). Wahrscheinlich soll durch Coexpression beider Enzyme die Bildung des toxischen Uroporphyrinogen I verhindert werden (Jahn et al., 1996).

Die humane U3S (PDB-Eintrag 1JR2) faltet in zwei α/β -Domänen, die durch eine β -Leiter miteinander verbunden sind. Diese daraus resultierende inhärente Flexibilität kann ein wesentliches Merkmal der Substratbindung und der Produktfreisetzung sein. Die beiden Domänen haben eine ähnliche Faltung und beinhalten jeweils ein paralleles β -Faltblatt mit umgebenden α -Helices. Die Domäne 1 gehört zur Flavodoxin-Faltungs-Familie und beinhaltet ein fünfsträngiges paralleles β -Faltblatt, das von fünf α -Helices umgeben ist. Domäne 2 nimmt eine DNA-Glycosylase-Faltung an, es ist ein viersträngiges paralleles β -Faltblatt umgeben von sieben α -Helices.

Domäne 1 ist ähnlich der Vitamin B₁₂-Bindedomäne der Methionin-Synthase. Durch Vergleich mit dem aktiven Zentrum der Methionin-Synthase und durch Betrachten der konservierten Reste in der U3S kann man vermuten, dass sich das aktive Zentrum in der breiten offenen Spalte zwischen den beiden Domänen befindet (Abb.4e). Erste Versuche, einen Inhibitor cozukristallisieren oder zu soaken, scheiterten (Mathews et al., 2001).

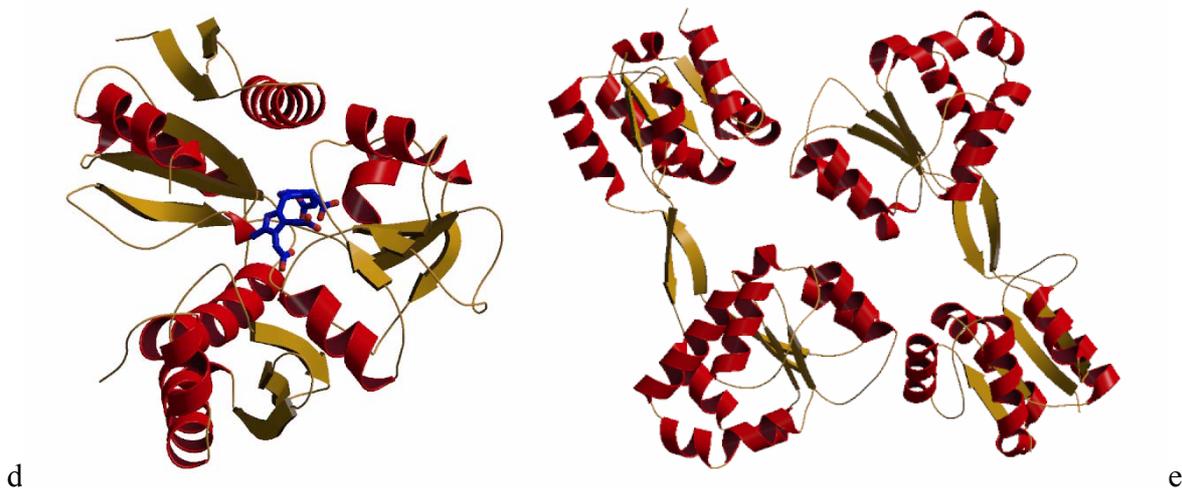


Abbildung4d: Struktur der monomeren Hydroxymethylbilan-Synthase HMBS aus *E.coli* mit gebundenem Dipyromethan-Cofaktor (PDB-Eintrag 2YPN; (Hadener et al., 1999)).

Abbildung4e: Struktur der humanen Uroporphyrinogen III Synthase U3S mit beiden in der asymmetrischen Einheit vorhandenen Monomeren. Das Enzym ist als Monomer funktionsfähig. (PDB-Eintrag 1JR2; (Mathews et al., 2001)).

Biosynthese von Vitamin B₁₂, Sirohäm, Häm *d_I* und von Coenzym F₄₃₀

Einen wichtigen Verzweigungspunkt in der Biosynthese der verschiedenen Tetrapyrrole stellt die Umwandlung von Uroporphyrinogen III dar. An dieser Stelle trennen sich die Biosynthesewege für Corrinoide, Sirohäm, Häm *d_I* und den Nickeltetrapyrrol F₄₃₀ der methanogenen Archaea von der Bildung des Häms und der Chlorophylle (Abb.4). Ersteren gemeinsam ist die Bildung von Dihydrosirohydrochlorin (Auch Precorrin-2 genannt) durch die Uroporphyrinogen-III-Methyltransferase (COB A), die eine S-Adenosylmethionin-abhängige Methylierung an der C₂ und C₇ Position durchführt. Diese neuen Kohlenstoffsubstituenten bewirken eine Umlagerung des Bindungssystems bei einer konstanten Anzahl von acht Doppelbindungen. Sirohäm und Häm *d_I* (neun Doppelbindungen), Corrinoide (sechs) und Coenzym F₄₃₀ (fünf) leiten sich alle von diesem Grundgerüst ab (Jahn et al., 1996).

Uroporphyrinogen-III-Decarboxylase

Zur Biosynthese von Häm und Chlorophyllen werden die vier Acetatreste des Uroporphyrinogens III schrittweise zu Methylgruppen decarboxyliert, um Coproporphyrinogen III zu bilden. Die Uroporphyrinogen III Decarboxylase (UroD, EC 4.1.1.37) beginnt diese Decarboxylierung am asymmetrischen Ring D und setzt sie dann im Uhrzeigersinn an den Ringen A, B und C fort. Unerwartet war der Befund, dass für die Reaktion weder ein Coenzym noch ein Metall benötigt werden. Die UroD katalysiert sowohl die Decarboxylierung des Uroporphyrinogen III als auch des symmetrischen und toxischen Uroporphyrinogen I (Jahn et al., 1996).

Die Struktur der humanen UroD (PDB-Eintrag 1URO, (Whitby et al., 1998)) ist bereits seit längerem bekannt und wurde vor kurzem als Wildtyp und als Mutanten mit Substrat und Produkt kokristallisiert (PDB-Einträge 1R3Q, 1R3R, 1R3S, 1R3T, 1R3V, 1R3W und 1R3Y; Phillips, J. D. *et al.*, EMBO 2003) wodurch der Mechanismus jetzt endgültig geklärt werden konnte. Weiterhin gibt es die Struktur der Tabak-UroD (Abb.4f) (PDB-Eintrag 1J93; (Martins et al., 2001)).

Die UroD liegt als verzerrtes ($\alpha\beta$)₈ (TIM)-Barrel vor, an dessen C-terminalen Strangenden Loops die tiefe Spalte bilden, in der sich das aktive Zentrum befindet. Im aktiven Zentrum befinden sich viele konservierte Arg-Reste, deren positive Ladung der Stabilisierung und Bindung der acht Carboxylate des Substrates dient. Durch die Struktur der humanen UroD in Komplex mit den beiden möglichen Produkten Coproporphyrinogen III und I (Abb.4g) und durch die katalytisch inaktiven Asn, Gly und Glu Mutanten des vermutlich aktiven Restes Asp86 konnte der Mechanismus ziemlich sicher aufgeklärt werden. Asp86 ist der einzige negativ geladene Rest im aktiven Zentrum, er koordiniert die vier NH-Gruppen der Pyrrolringe

des Porphyrinogens, das sich in einer „Dom“-Konformation befindet, d.h. alle vier NH-Gruppen zeigen auf das Asp86. Der vorgeschlagene Mechanismus beginnt mit einer Protonierung des fixierten Porphyrinogens, die eine konzertierte Elektronenwanderung von der Carboxylatgruppe bewirkt, wodurch das Produkt CO_2 freigesetzt wird (Phillips et al., 2003).

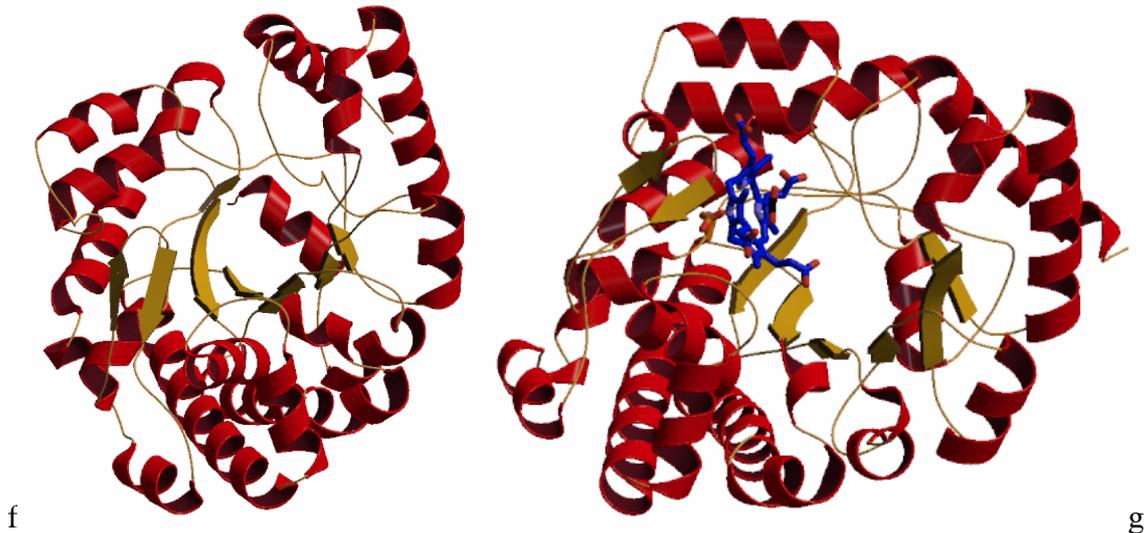


Abbildung4f: Struktur der Uroporphyrinogen III Decarboxylase UroD aus *Nicotiana tabacum*. Das Enzym ist als Monomer funktionsfähig, liegt in Lösung aber als Dimer vor (PDB-Eintrag 1J93; (Martins et al., 2001)).

Abbildung4g: Struktur der humanen Uroporphyrinogen III Decarboxylase UroD mit gebundenen Produkten Coproporphyrinogen I und CO_2 . Die die Pyrrol-Stickstoffe koordinierende Aminosäure Asp86 ist ebenfalls gezeigt (PDB-Eintrag 1R3Q; (Phillips et al., 2003)).

Coproporphyrinogen III Oxidase

Coproporphyrinogen III Oxidase (CPO, EC 1.3.3.3) katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen IX. Dabei werden an den Ringen A und B die Propionatreste zu Vinylgruppen decarboxyliert und oxidiert. Unter aeroben Bedingungen dient molekularer Sauerstoff als Elektronenakzeptor für diese Reaktion, unter anaeroben Bedingungen werden NADP^+ , ATP, Mg^{2+} und L-Methionin für die Katalyse benötigt. Für die beiden Reaktionen existieren zwei strukturell nicht verwandte Enzyme. Bisher wurde für Tiere und Pflanzen nur das sauerstoffabhängige Enzym nachgewiesen (in Bakterien HEM F), während eine Reihe von Bakterien zusätzlich das sauerstoffunabhängige Enzym HEM N besitzen. Das eukaryotische Enzym liegt als Dimer vor, es konnten keinerlei prosthetische Gruppen nachgewiesen werden. Die enzymatische Decarboxylierung beginnt am Ring A und endet am Ring B.

Physiologische Untersuchungen identifizierten die oxidative Decarboxylierung von Coproporphyrinogen III neben der ALA-Bildung als zweiten regulierten Schritt der Hämbiosynthese (Jahn et al., 1996).

Vom sauerstoffabhängigen Enzym ist noch keine Struktur bekannt. Kürzlich konnte die Struktur der sauerstoffunabhängigen CPO aus *E. coli* (HEM N) gelöst werden (PDB-Eintrag 1OLT). Das Eisen-Schwefel-Cluster (4Fe-4S-Cluster) wurde mit dem Cofaktor S-Adenosylmethionin (SAM) unter anaeroben Bedingungen kokristallisiert. HEM N ist ein monomeres Protein, das aus zwei Domänen besteht (Abb.4h). Die N-terminale Domäne besteht aus einem 12-strängigen weitgehend parallelen β -Faltblatt, das vorwiegend auf seiner Außenseite von α -Helices dekoriert wird. Die sechs N-terminalen β -Stränge bilden ein $(\alpha\beta)_6$ -Barrel als zentrales Motiv der Domäne. Das Barrel kann als drei Viertel $(\alpha\beta)_8$ - oder TIM-Barrel verstanden werden, in dessen fehlendem Viertel sich die Substratbindetasche befindet senkrecht zur β -Barrel-Achse. Das Barrel enthält einen tiefen Tunnel für das aktive Zentrum, der beide Cofaktoren wie auch das große Coproporphyrinogen III aufnehmen kann. Die C-terminale Domäne ist durch einen kurzen Loop mit der N-terminalen verbunden und besteht aus einem Bündel von vier, nahezu parallelen α -Helices und einem kleinen dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt. Höchst wahrscheinlich deckt es die Substratbindetasche ab und füllt diese auch teilweise aus, um das gebundene Substrat vom Solvens abzuschirmen. (Layer et al., 2003).

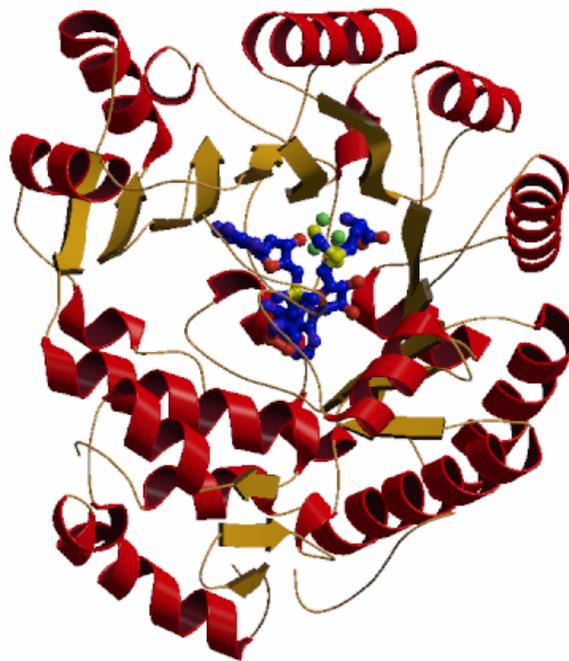


Abbildung 4h: Struktur der sauerstoffunabhängigen Coproporphyrinogen-III-Oxidase CPO (HEM N) aus *E. coli* mit gebundenen 4Fe-4S-Cluster und S-Adenosylmethionin (SAM)-Cofaktoren. Deutlich zu erkennen ist das zentrale $(\alpha\beta)_6$ -Barrel, das das aktive Zentrum beherbergt (PDB-Eintrag 1OLT ; (Layer et al., 2003)).

Protoporphyrinogen IX Oxidase

Die Struktur der Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO, EC 1.3.3.4) ist Gegenstand dieser Arbeit und daher soll dieses Enzym im nächsten Abschnitt genauer beschrieben werden.

Ferrochelatase

Die Ferrochelatase (FeCh, EC 4.99.1.1) katalysiert den letzten Schritt der Häm biosynthese, die Insertion von Fe^{2+} in Protoporphyrin IX. Das Enzym erkennt das Substrat über die Substituenten an den Ringen C und D. Zunächst aber bindet Fe^{2+} an das Enzym, wobei zwei Protonen freigesetzt werden. Anschließend bindet Protoporphyrin IX, Fe^{2+} wird eingebaut und nachfolgend wird Protohäm IX (Häm *b*) freigesetzt. Das Enzym kann auch andere Metallionen wie Co^{2+} , Ni^{2+} und teilweise auch Zn^{2+} inserieren, während Cu^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} und Hg^{2+} als Inhibitoren wirken (Jahn et al., 1996).

Es sind bisher die Strukturen aus *B. subtilis*, *S. cerevisiae* und Mensch bekannt. Die humane Ferrochelatase (HFc, PDB-Eintrag 1HRK) liegt als Dimer vor, das mit der Matrixseite (Innenseite) der inneren Mitochondrienmembran assoziiert ist. Es faltet in zwei sich ähnelnde Domänen, die jeweils aus einem viersträngigen β -Faltblatt bestehen, das von einer α -Helix in einem $\beta\alpha\beta$ -Motiv flankiert wird. Die beiden Domänen sind wohl durch Genduplikation auseinander hervorgegangen (Abb.4i).

Ein Teil des aktiven Zentrums wird von zwei Helices gebildet, die in einen Loop übergehen. Die so entstehende „große Lippe“ befindet sich auf einer Seite des aktiven Zentrums, die gegenüberstehende „kleine Lippe“ wird von einem kleinen Loop geformt. Die beiden kleinen Lippen des Dimers befinden sich jeweils im Inneren des Dimers nahe der Kontaktfläche der beiden Untereinheiten. Die tierischen FeChs haben im Gegensatz zu den FeChs aus anderen Organismen ein 2Fe-2S-Cluster gebunden, das zumindest in der HFc-Struktur über ein Wassernetzwerk indirekt der Dimerisierung dient.

Die gesamte hydrophobe Oberfläche ist über beide aktive Zentren verteilt, weshalb der Membranbindeteil des Enzyms gleichzeitig auch der Eingang zum aktiven Zentrum ist. Beide Lippen sind hydrophob. Dies positioniert die aktiven Zentren hin zur hydrophoben Membran und ermöglicht es dem wenig löslichen Porphyrin-Substrat und Häm-Produkt, über die Membran einzudringen und auch wieder rauszugehen.

Im Gegensatz zu den hydrophoben Lippen ist das Innere der aktiven Höhlungen durchaus hydrophil und enthält einige konservierte Reste. Der Boden der Höhlung ist stark negativ geladen, was von drei konservierten sauren Resten herrührt, die mutmaßlich in die Protonenabstraktion des Porphyrinrings involviert sind.

Die in der Struktur gefundene Co^{2+} -Bindestelle, die wohl die Fe^{2+} -Bindestelle darstellen soll, befindet sich überraschenderweise auf der dem aktiven Zentrum gegenüberliegenden Oberflächenseite. Es wird postuliert, dass das Metallion zur Insertion durch einen von konservierten Resten gesäumten Pfad zum aktiven Zentrum transportiert wird.

Die Porphyrinbindung wird teilweise von konservierten hydrophoben und aromatischen Resten vermittelt (Wu et al., 2001).

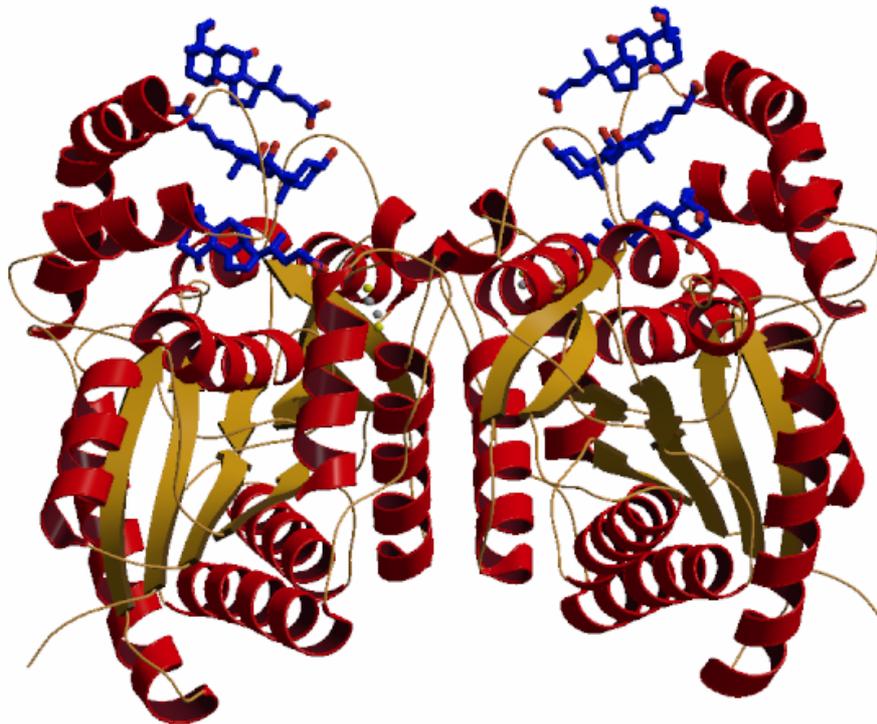


Abbildung 4i: Struktur der humanen Ferrochelatase (Hfe) mit gebundenem 2Fe-2S-Cluster und den drei Cholat-Molekülen im aktiven Zentrum. Deutlich zu erkennen sind die beiden großen Lippen am äußeren Rand des Dimers und die kleine Lippe in Nähe der Dimer-Dimer-Kontaktfläche, die die Höhle des aktiven Zentrums aufspannen (PDB-Eintrag 1HRK; (Wu et al., 2001)).

Porphyrinbiosynthese

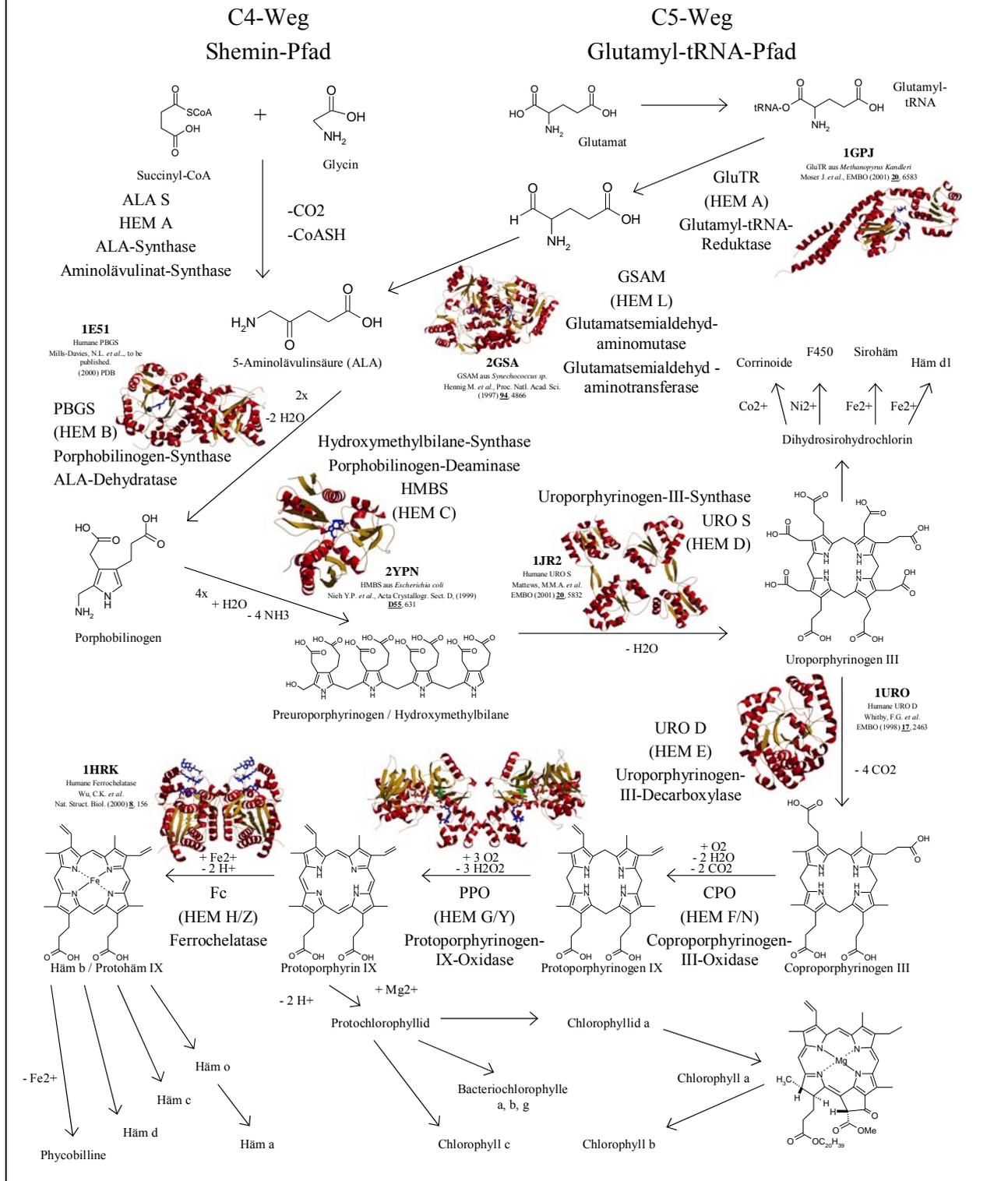


Abbildung4: Porphyrinbiosynthese in Eukaryonten (Legende auf der nächsten Seite)

Abbildung4: Porphyrinbiosynthese in Eukaryonten mit Abbildungen der bekannten eukaryontischen, teilweise auch prokaryontischen, Enzymstrukturen. Die Porphyrinbiosynthese aller Organismen beginnt mit der Synthese des für alle gemeinsamen Vorläufermoleküls 5-Aminolävulinsäure (ALA). Nach der Bildung des ersten zyklischen Tetrapyrrols Uroporphyrinogen III zweigen die Biosynthesewege der Corrinoiden (Co^{2+}), Faktor F_{430} (Ni^{2+}), Sirohäm (Fe^{2+}) und Häm d_1 (Fe^{2+}) ab. Durch Oxidation des Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX entsteht das erste aromatische Porphyrinsystem. Ein letzter Verzweigungspunkt existiert nur in photosynthetisch aktiven Organismen, die durch Insertion von Fe^{2+} in das Protoporphyrin IX Häm bilden bzw. durch Insertion von Mg^{2+} die Chlorophyllbiosynthese einleiten.

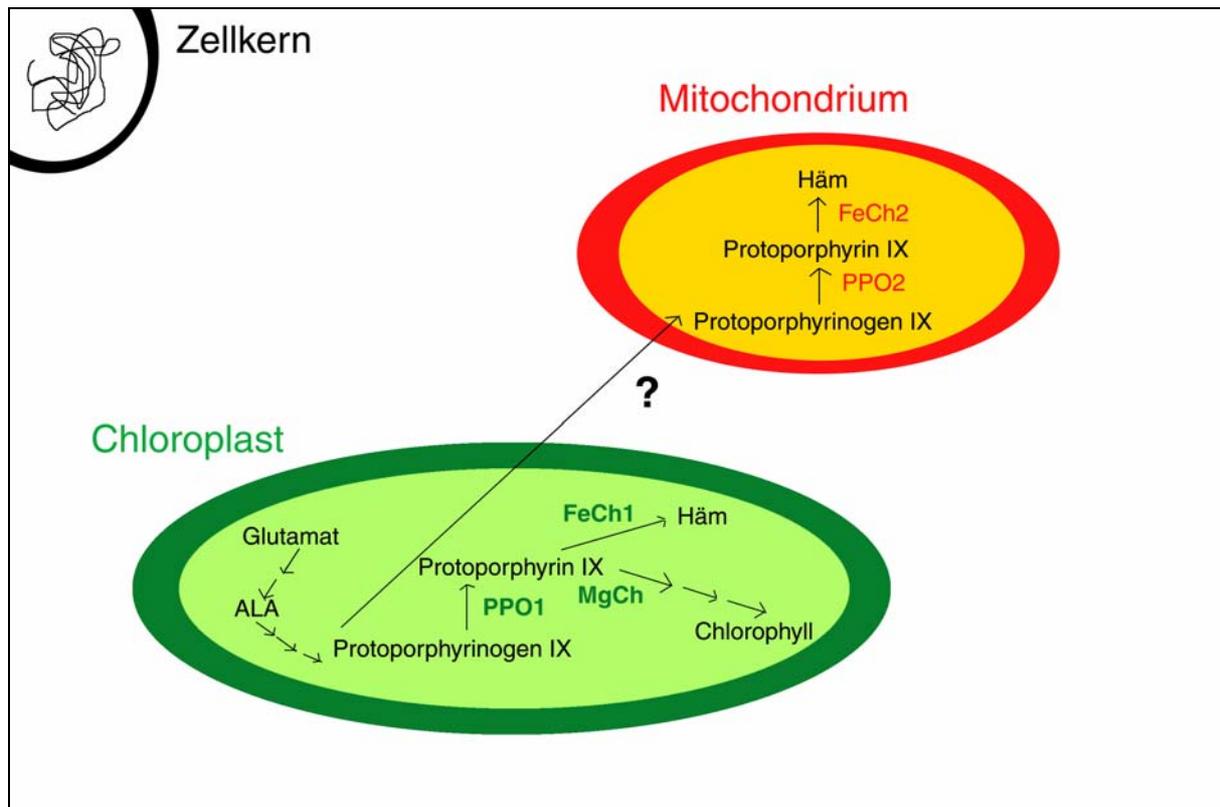
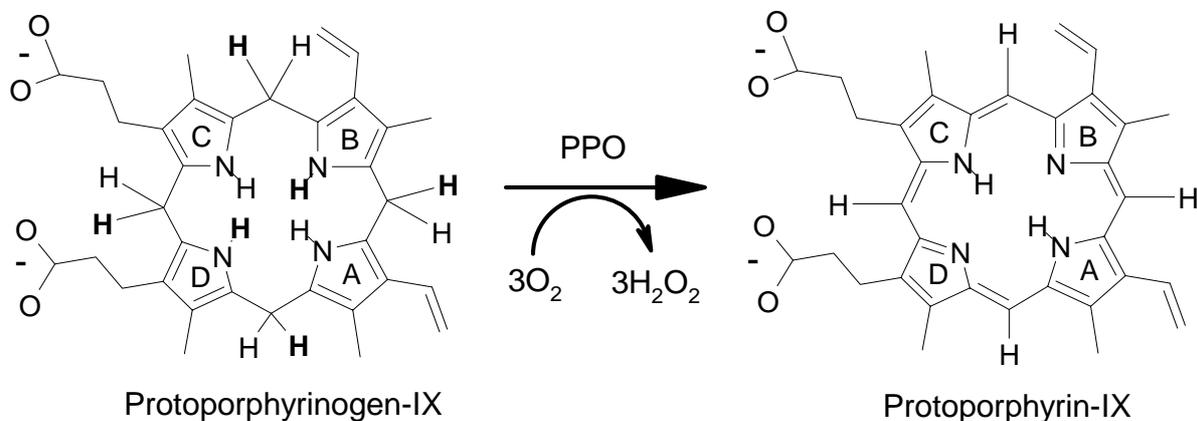


Abbildung5: Lokalisation der Porphyrinbiosynthese in den Organellen der Pflanzen. Die Porphyrinbiosynthese beginnt mit der für Pflanzen vom Glutamat ausgehenden Synthese des für alle Eukaryonten gemeinsamen Vorläufermoleküls 5-Aminolävulinat (ALA) in den Chloroplasten, wo auch die nachfolgenden Schritte lokalisiert sind. Da pflanzliche Mitochondrien selbst erst die Enzyme ab der PPO besitzen, muss angenommen werden, dass das zur Hämbiosynthese erforderliche Protoporphyrinogen IX aus den Chloroplasten importiert wird. In Mitochondrien wird in das durch Oxidation des Protoporphyrinogen IX entstandene Protoporphyrin IX ein Eisenion (Fe^{2+}) inseriert und dadurch Häm gebildet. Die dafür notwendigen Enzyme PPO und FeCh sind eigene Isoformen, die sich in der Aminosäuresequenz von ihren chloroplastischen Isoenzymen unterscheiden. In Chloroplasten findet nach der Bildung des Protoporphyrin IX eine Teilung des Stoffwechselweges statt, durch Insertion von Fe^{2+} in den Porphyrinring entsteht Häm, durch Insertion von Magnesium (Mg^{2+}) durch die Magnesiumchelatasen wird die Chlorophyllbiosynthese eingeleitet (Lermontova, 2000).

3.3 Protoporphyrinogen IX Oxidase und Porphyrinbiosynthese in Pflanzen

Protoporphyrinogen IX Oxidase

Die Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO, EC 1.3.3.4) ist das letzte gemeinsame Enzym in den Biosynthesewegen zu Häm und Chlorophyll und katalysiert die Oxidation von Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX unter Aromatisierung des Ringsystems durch die drei zusätzlich eingebrachten Doppelbindungen. Oxidiert werden zwei der vier Iminogruppen des Pyrrols und die vier Brückenkohlenstoffatome (C₅, C₁₀, C₁₅ und C₂₀). Unter aeroben Bedingungen dient dabei molekularer Sauerstoff als Elektronenakzeptor (Schema1), unter anaeroben Bedingungen werden die Elektronen in anaerobe Elektronentransportketten z.B. zum Nitrat oder Fumarat eingeschleust.



Schema1: Reaktionsschema der PPO. Oxidation von Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX erfolgt durch molekularen Sauerstoff (O₂), der zu Peroxiden reduziert wird. Die bei der Reaktion eliminierten Wasserstoffatome sind fett dargestellt.

PPO ist höchst wahrscheinlich durch eine konservierte hydrophobe Region membraninsetiert. In der Literatur (Arnould et al., 1999) wurde über eine vollständige Membransinsertion oder eine monotop Membranverankerung diskutiert, wobei letztere die eher wahrscheinliche Variante darstellt. Das Enzym befindet sich auf der Außenseite der Mitochondrien-Innenmembran.

Das Enzym ist das Target einer großen Klasse von peroxidierenden Herbiziden, die PPO mit großer Effizienz und Spezifität (pI₅₀-Werte größer 7) inhibieren und phototoxische Schäden verursachen durch schädliche Sauerstoffradikale, die durch die Photosensitivierung des sich autoxidativ bildenden und sich in den Mitochondrien- und Chloroplastenmembranen ansammelnden Protoporphyrin IX induziert werden. Zu diesen Inhibitoren zählt der Diphenylether Azifluorfen.

Beim Menschen verursacht ein Defekt in der PPO-Aktivität die dominant vererbte Stoffwechselkrankheit Porphyria Variegata (VP, variegata porphyria), deren Schädigungen ebenfalls durch akkumuliertes Protoporphyrin IX erzeugt werden. Die offensichtlichsten Anzeichen für die fast ausschließlich in Südafrika auftretende Krankheit sind Lichtempfindlichkeit der Haut der Patienten. In mehr als 94 % aller Krankheitsfälle ist Arg59 zu Tryptophan mutiert. Dieser Rest ist auch in Maus und Fruchtfliege konserviert (Abb.6). Eine R59K-Mutante der menschlichen PPO zeigt nur noch ein Drittel der Aktivität des Wildtyps, wohingegen R59S und R59I-Mutanten nahezu inaktiv sind, was die Bedeutung einer positiven Ladung in dieser Position des Enzyms verdeutlicht.

Eukaryote Enzyme enthalten das Flavin FAD als Cofaktor, deshalb gehört die PPO zur Familie der FAD-haltigen Oxidasen, wie auch die Monoaminoxidase (MAO), die Polyaminoxidase (PAO), die D-Aminosäureoxidase (DAO) und die *p*-Hydroxybenzoathydroxylase (PHBH) (Binda et al., 2002). Das reduzierte Flavin wird unter Bildung von Peroxiden durch molekularen Sauerstoff regeneriert (Jahn et al., 1996). Es wird ein Mechanismus ähnlich dem der N-C und C-C-Bindungsoxidation in der PAO und der MAO diskutiert, bei dem für die PPO einmalig sechs Wasserstoffe und sechs Elektronen entzogen werden.

In gram-positiven Bakterien wurde ein sauerstoffabhängiges Enzym, HEM Y, gefunden, das mit dem eukaryontischen Enzym eng verwandt ist. Weiterhin enthalten Bakterien ein komplex aufgebautes sauerstoffunabhängiges System, dessen aktivierender Faktor das HEM G sein koennte, das lange Zeit als bakterielle PPO diskutiert wurde (Jahn, D., persönliche Mitteilung).

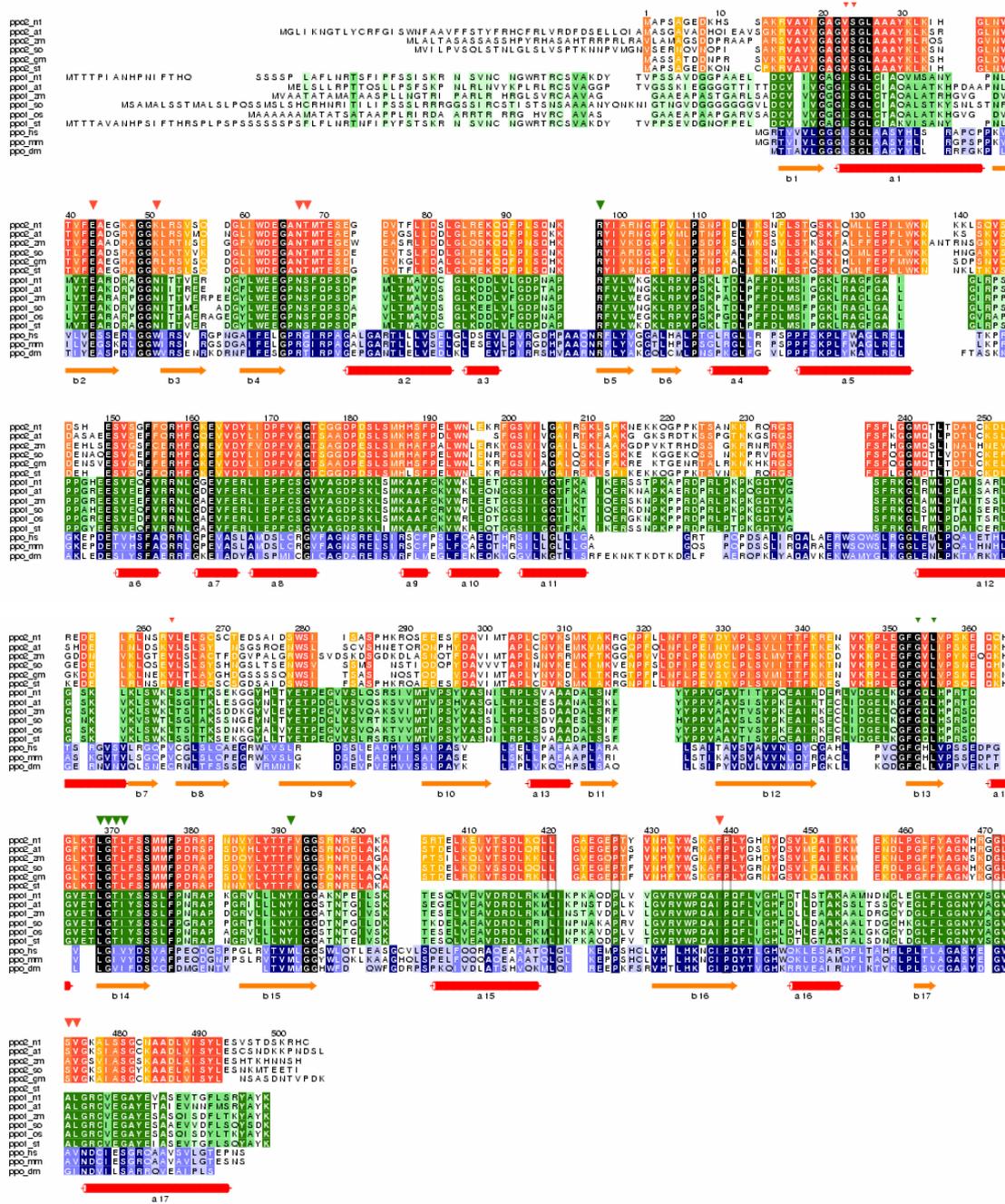


Abbildung 6: Multiples Aminosäuresequenz-Alignment der eukaryontischen PPOs. Die Sequenzen der mitochondrialen PPOs aus den Pflanzen Tabak (NT, *N. tabacum*), Ackerschmalwand (AT, *Arabidopsis thaliana*), Mais (ZM, *Zea mays*), Spinat (SO, *Spinacia oleracea*), Sojabohne (GM, *Glycine max*) und Kartoffel (ST, *Solanum tuberosum*) sind untereinander verglichen, identische Reste sind rot, hoch konservierte Reste orange und weniger stark konservierte Reste gelb dargestellt. Gleiches wird für die chloroplastischen Isoenzyme aus Tabak (NT), Ackerschmalwand (AT), Mais (ZM), Spinat (SO), Reis (OS, *Oryza sativa*) und Kartoffel (ST) in den Farben dunkel-, mittel- und hellgrün gezeigt. Für die drei tierischen Organismen Mensch (HS, *Homo sapiens*), Maus (MM, *Mus musculus*) und Fruchtfliege (DM, *Drosophila melanogaster*) wurden die Farben dunkelblau, zyan und hellblau gewählt. Hier existieren nur mitochondriale PPOs. Für alle gezeigten Sequenzen sind die in allen Organismen identisch-konservierten Reste schwarz hinterlegt. Unter dem Aminosäurealignment sind die Sekundärstrukturelemente der bisher einzigen bekannten Struktur der PPO2 aus *N. tabacum* mit ihren jeweiligen Bezeichnungen angebracht.

Porphyrinbiosynthese in Pflanzen

Die Porphyrinbiosynthese beginnt in Pflanzen mit der Synthese des ALA ausgehend von der Glutamyl-tRNA-Reduktase.

Pflanzen enthalten alle für die Hämbiosynthese erforderlichen Proteine (s. Abschnitt 3.2.) in den Chloroplasten (Abb.5), wo auch die an die PPO anschließenden Proteine der Chlorophyllbiosynthese lokalisiert sind: Magnesiumchelatase inseriert Mg^{2+} in das Protoporphyrin IX unter Bildung von Magnesium-Protoporphyrin IX, das durch die Methyltransferase zu Mg-Protoporphyrin IX-Monomethylether umgesetzt wird. Die Cyclase wandelt diesen Ether in das Divinyl-Protochlorophyllid *a* um, das von der 4-Vinyl-Reduktase zum Protochlorophyllid *a* hydriert wird, die Oxidoreduktase schließlich erzeugt Chlorophyllid *a* und die Chlorophyll-Synthase letztendlich durch Veresterung mit Phytylalkohol das Chlorophyll *a* (Abb.7) (Lermontova, 2000).

Pflanzliche Protoporphyrinogen IX Oxidasen

Pflanzliche PPO liegt in zwei Isoformen vor, der chloroplastischen PPO1 und der mitochondrialen PPO2. Beide Isoformen zeigen starke Ähnlichkeiten mit über 25 % iger Identität der Aminosäurereste innerhalb der gleichen Pflanze (Abb.6). PPO1 ist in den Thylakoid und den Grana-Membranen der Chloroplasten lokalisiert, einmal auf der entgegengesetzten Seite der Magnesiumchelatase und noch einmal gegenüber der FeCh, die in der Thylakoid-Membran verankert ist. PPO2 ist auf der Periplasma-Seite (Außenseite) der inneren Mitochondrienmembran zu finden, also auf der entgegengesetzten Membranseite der FeCh-Lokalisation.

Die Hämbiosynthese in pflanzlichen Mitochondrien beginnt erst mit der mitochondrialen Isoform der PPO (PPO2). Das erforderliche Protoporphyrinogen IX muss aus den Chloroplasten auf bisher unerforschtem Wege in die Mitochondrien importiert werden, da eine CPO-Aktivität nur in chloroplastischen Membranbestandteilen, nicht aber in cytosolischen oder mitochondrialen, nachweisbar ist (Lermontova, 2000; Santana et al., 2002). Nach der Oxidation des Protoporphyrinogen IX zum Protoporphyrin IX inseriert die Ferrochelatase Eisen in das Porphyringerüst und erzeugt so Protohäm IX oder Häm *b*. Für die Ferrochelatase werden ebenfalls zwei Isoformen, eine chloroplastische und eine chloroplastisch-mitochondriale Isoform, diskutiert (Singh et al., 2002), die sich allerdings weit weniger unterscheiden als die beiden PPO-Isoformen.

Zwischen der PPO und der FeCh wird ein Komplex mit Substrat-Transport-Funktion diskutiert (Ferreira et al., 1988). Die Entkopplung der Protoporphyrinogen-IX-Erzeugung und der Eiseninsertion führt zu einem Verlust der Feedback-Kontrolle durch das Endprodukt Häm. Das

photosensitivierende Protoporphyrinogen IX erzeugt Singulett-Sauerstoff, der Lipid-Peroxidation und dadurch hervorgerufenen Zelltod induziert. Dies führt zum vollständigen Ausbleichen der photosynthetisch aktiven Teile der Pflanze.

Die Hämbiosynthese und die Chlorophyllbiosynthese in Pflanzen ist in Abb.7 dargestellt. Insertion von Eisen (Fe^{2+}) durch die Ferrochelatase ergibt das Vorläufermolekül aller anderen Häme mit Ausnahme des Häm d_1 und des Sirohäm, das Häm b oder Protohäm IX. Durch Hydroxyfarnesylierung entsteht Hem o , durch dessen Oxidation Hem a . Einführen von zwei Cysteinmolekülen an den beiden Vinylgruppen ergibt Hem c , Reduktion von Ring C Hem d .

Die mehrstufige Chlorophyllbiosynthese wird durch Insertion von Magnesium (Mg^{2+}) in das Protoporphyrin IX eingeleitet.

Magnesiumchelatase

Magnesiumchelatase ist ein – im Gegensatz zur Ferrochelatase - ATP-abhängiges heterotrimeres Enzym mit den Untereinheiten D, I und H. Die Untereinheit I besitzt ATPase-Aktivität und gehört zur AAA-Familie der ATPasen („ATPase associated with a variety of cellular activities). Bekannt ist lediglich die Struktur der Magnesiumchelatase-I-Untereinheit (BCH I) aus *Rhodobacter capsulatus* (Abb.7a). Die N-terminale Domäne besteht aus einem fünfsträngigen parallelen β -Faltblatt, das von α -Helices umgeben ist (offene α/β -Struktur), ein Nukleotid-Bindemotiv (Rossmann-fold). Die C-terminale Domäne besteht aus einem Vier-Helix-Bündel (PDB-Eintrag 1G8P). Die C-terminale Domäne der D-Untereinheit ist eine Integrin I Domäne, deren N-terminale Domäne gehört ebenfalls der AAA-Familie an, die dazwischen befindliche Prolin-reiche Linkerregion könnte an der Assoziation der D und I Untereinheit beteiligt sein durch Bindung einer positiv geladenen Spalte auf der Oberfläche der Nukleotidbindedomäne der I-Untereinheit. Die Untereinheit H bindet das Mg-Protoporphyrin IX nicht kovalent, was darauf schliessen lässt, dass sie die Rolle einer katalytischen Untereinheit bei der Magnesiuminsertion spielt.

Im Gegensatz zur Ferrochelatase sind die Magnesiumchelatase und die Kobaltchelatase komplexe ATP-abhängige Enzyme, die aus je drei Untereinheiten bestehen. Zwei der Untereinheiten der Kobaltchelatase, COB N und COB S, sind homolog zu BCH H bzw. BCH I, während die dritte Untereinheit, COB T, keine hervorgehobene Ähnlichkeit mit BCH D zu haben scheint. Die Magnesiuminsertion in das Protoporphyrin IX läuft in einer Zweischritt-Reaktion ab, die aus einer Mg:ATP-abhängigen Aktivierung, die die BCH I und BCH D Untereinheiten betrifft, besteht, gefolgt von einem Mg^{2+} -Insertionsschritt, bei dem das ATP hydrolysiert wird (Fodje et al., 2001).

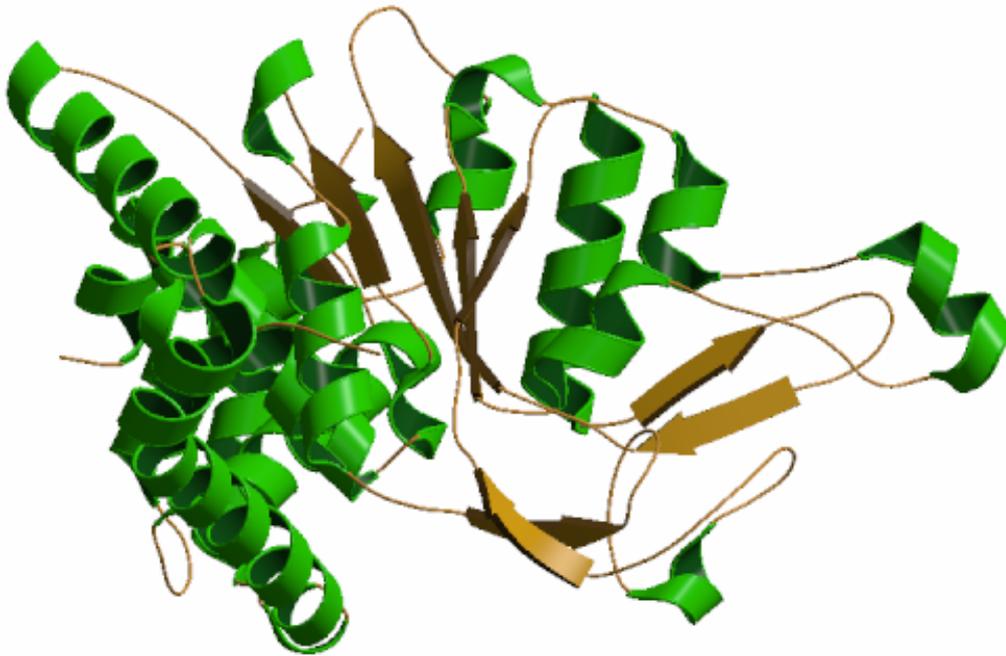


Abbildung 7a: Struktur der Magnesiumchelatasase-I-Untereinheit (BCH I) aus *Rhodospirillum rubrum*. Magnesiumchelatasase ist ein ATP-abhängiges heterotrimeres Enzym mit den Untereinheiten D, I und H (PDB-Eintrag 1G8P, (Fodje et al., 2001)).

S-Adenosyl-Methionin:Mg-protoporphyrin IX methyltransferase

Das entstehende Magnesiumprotoporphyrin IX wird durch die S-Adenosyl-Methionin (SAM):Mg-protoporphyrin IX methyltransferase (EC 2.1.1.11) mittels SAM zum Magnesiumprotoporphyrin Monomethylester (MME) an der Propionatgruppe des Rings C spezifisch methyliert. Es handelt sich um ein lösliches Enzym, das in Pflanzen und in Algen gefunden worden ist (Beale, 1999).

Die Mg-Protoporphyrin IX Monomethylester Oxidative Cyclase

Die Mg-Protoporphyrin IX MME oxidative Cyclase erzeugt einen fünften Ring am Ring C durch Anlagerung der Propionatgruppe an das C₁₅-Atom. Dieses Enzym gehört zu den am wenigsten charakterisierten Komponenten der Chlorophyllbiosynthese. Der isozyklische Ring soll via β -Oxidation mittels molekularem Sauerstoff der Methyl-Propionatgruppe des Ringes C zur Methyl- β -ketopropionatseitenkette erfolgen. Weiterhin ist das Enzym NADPH-abhängig. Das entsprechende Gen in *R. rubrum* heißt *bchE* (Beale, 1999).

Divinylchlorophyllid-4-Vinyl-Reduktase

Die Vinylgruppe am Ring B des Divinylprotochlorophyllids *a* wird durch die NADPH-abhängige Divinylchlorophyllid-4-vinyl-reduktase zur Ethylgruppe. Dies kann entweder vor oder nach der Reduktion des Ringes D erfolgen. Das Gen in *R. rubrum* heißt *bchJ* (Beale, 1999).

Reduktion des Pyrrolrings D

Der Ring D des entstehenden Monovinylprotochlorophyllids a wird stereospezifisch reduziert. Diese Reaktion kann sowohl lichtabhängig durch die NADPH-Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR, EC: 1.3.1.33) als auch lichtunabhängig durch den dem Nitrogenasekomplex ähnlichen Komplex aus CHL B, L und N unter ATP-Hydrolyse, vermutlich mittels Ferredoxin, erfolgen. Die POR ist als monomeres Enzym aktiv, sie gehört zur Enzymfamilie der sekundären Alkohol-Reduktasen. Sie soll weiterhin ein peripheres Membranprotein sein. Die Reaktion erfordert lediglich ein Photon. Das entstehende NADP^+ wird nach der Reaktion gegen NADPH ausgetauscht, dann erst erfolgt die Freigabe des Chlorophyllids (Beale, 1999). Die Organismen, die die Reduktion des Rings D des Protochlorophyllids in Abwesenheit von Licht durchführen können, besitzen drei Gene, *bchB*, *bchL* und *bchN* (für *R. capsulatus*). In Cyanobakterien und Eukaryonten heissen diese Gene *chlB*, *chlL* und *chlN*, da diese Organismen Chlorophyll statt Bakterichlorophyll besitzen. Die Proteine weisen eine deutliche Ähnlichkeit zu den Komponenten des Enzymkomplexes der Stickstofffixierung auf. CHL B und N ähneln sich untereinander und NIF D bzw. K, die Untereinheiten des Nitrogenaseenzym sind (FeMo Protein oder Komponente I), einem nativen $\alpha_2\beta_2$ -Komplex, der molekularen Stickstoff (N_2) bindet und ihn zu Ammoniak (NH_3) reduziert. Das CHL L Protein ähnelt dem NIF H, der Nitrogenase Reduktase (Fe Protein oder Komponente II), einem nativen ATP-hydrolysierenden Homodimer, das reduziertes Ferredoxin der Komponente I zur Verfügung stellt. Aus dieser Analogie zum stickstofffixierenden System kann geschlossen werden, dass das licht-unabhängige Protochlorophyllid-Reduktase-System aus einer B_2N_2 -Komponente, die das Pigment-Substrat bindet und einer L_2 -Komponente, die der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten (vermutlich Ferredoxin) dient, besteht. Dieses Modell ist bislang noch nicht durch die Expression der B, L und N Proteine bestätigt worden. NADPH stimuliert die Reaktion, ist aber nicht unbedingt erforderlich.

Alle Organismen, die Chlorophyll akkumulieren, haben POR und alle Organismen, die Bakteriochlorophyll ansammeln, haben keine POR. Dies führt zur Annahme, dass in allen Organismen außer den Angiospermen (die von der POR zur Protochlorophyllidreduktion abhängen), POR hauptsächlich eine Signalfunktion und keine biosynthetische Funktion übernimmt. Da Protochlorophyllid ein dem des Chlorophyll ähnliches, aber von dem des Bakteriochlorophyll deutlich verschiedenes, Absorptionsspektrum aufweist, könnte die Lichtaktivierung von POR in Chlorophyll-enthaltenden Organismen ein Signal an die Zellen geben, dass photosynthetisch verwertbares Licht da ist und die Zellen anregen, das Entwicklungsprogramm zu aktivieren, dieses Licht zu nutzen (Beale, 1999).

Chlorophyllsynthase

Die Chlorophyllsynthase erzeugt durch Addition von Phytolpyrophosphat bzw. Geranylgeranylpyrophosphat und dessen Reduktion zum Phytylrest aus Chlorophyllid *a* Chlorophyll *a*, das in Pflanzen häufigste Chlorophyll. Das initiale C₂₀-Produkt des Polyisoprenbiosyntheseweges ist $\Delta^{2,6,10,14}$ -*all trans*-geranylgeranyl-PP. Phytol leitet sich vom Geranylgeraniol dadurch ab, dass die drei distalen der vier Doppelbindungen des Geranylgeraniol im Phytol gesättigt sind. Das erste Chlorophyll, das in angiospermen Geweben nach Lichteinfall entsteht, enthält Geranylgeranyl als Isoprenkomponente. Unmittelbar nach der Veresterung wird das pigment-gebundene Geranylgeranyl nacheinander an den 6, 10 und 14 Positionen in einem NADPH- und ATP-abhängigen Prozess reduziert, es entsteht (2*E*, 7*R*, 11*R*)-Phytyl. In späteren Stadien des Grünens, enthalten Chloroplasten Phytyl-PP und das Chlorophyll wird dann direkt mit Phytyl verestert. Die Reduktion des Geranylgeranyl-PP geschieht in den Granula-Membranen der Spinat-Chloroplasten, wohingegen die Reduktion des Geranylgeranyl-Chlorophyllids in den Thylakoid-Membranen passiert. Beide Aktivitäten erfordern NADPH als Elektronendonator. Es ist nicht bekannt, ob diese beiden Aktivitäten von nur einem Enzym ausgeführt werden oder nicht. Ein einziges veresterndes Enzym, das sich im Thylakoid befindet, kann entweder Geranylgeranyl-PP oder Phytol-PP als Substrat benutzen, das Enzym bevorzugt aber Phytol-PP. Nur Mg- oder Zn-enthaltende Pigmente sind mögliche Substrate für die Chlorophyllsynthase, andere Metalle enthaltende Pigmente scheiden aus (Beale, 1999).

Biosynthese anderer Chlorophylle in Pflanzen und Algen

Andere Chlorophylle sollen sich vom Chlorophyll *a* (Chlorophylle *b* und *d*) oder von Chlorophyll *a* Precursoren (Chlorophylle *c*) ableiten. Es gibt bisher nur wenig oder keine direkten Beweise für dieses hypothetische Biosynthesemodell, das lediglich auf den strukturellen Verwandtschaften der Moleküle aufbaut (Beale, 1999). Im folgenden wird nur auf das Chlorophyll *b* eingegangen.

Chlorophyll *a* Oxygenase

Durch Oxidation mit molekularem Sauerstoff durch die Chlorophyll *a* Oxygenase entsteht Chlorophyll *b*, das statt einer Methyl- eine Aldehydgruppe am Ring B trägt. Alle Pflanzen und grünen Algen enthalten zu 15-20 % ihres gesamten Chlorophyllgehaltes Chlorophyll *b*, welches für die Photosynthese nicht essentiell ist. Dieses Pigment trägt aber zweifelsohne zum Erfolg der terrestrischen und Flachwasser-Pflanzen bei, da es Licht in der Wellenlängen-Region von 425 bis 475 nm absorbiert, in der viel Licht vorhanden ist, Chlorophyll *a* aber schlecht absorbiert, und überträgt die Anregungsenergie mit hoher Ausbeute auf Chlorophyll *a*, was

wegen des hohen Überlappens in der Spektralregion des roten Lichtes sehr gut funktioniert. Alle Organismen mit Chlorophyll *b* sind aerob. Die Chlorophyll *a* Oxygenase ist verwandt mit den Methylmonooxygenasen und soll sowohl ein [2Fe-2S]-Zentrum wie auch ein einzelnes Fe-Ion enthalten. In der Umwandlung vom Chlorophyll *a* zum Chlorophyll *b* soll ein 3-Hydroxymethyl-Chlorophyll *a* beteiligt sein. Dieses könnte durch Einführen eines Sauerstoffatoms aus molekularem Sauerstoff in die 3-Methylgruppe mittels einer Monooxygenase entstehen und die Hydroxymethylgruppe könnte dann zum Chlorophyll *b* oxidiert werden. Allerdings ist 3-Hydroxymethyl-Chlorophyll *a* auch ein Zwischenprodukt im entgegengesetzten Prozess, der Umwandlung von Chlorophyll *b* zum Chlorophyll *a*. Diese ist im Chlorophyll-Abbau wichtig, da die Enzyme höherer Pflanzen nur Chlorophyll *a* und seine Derivate umsetzen können (Beale, 1999).

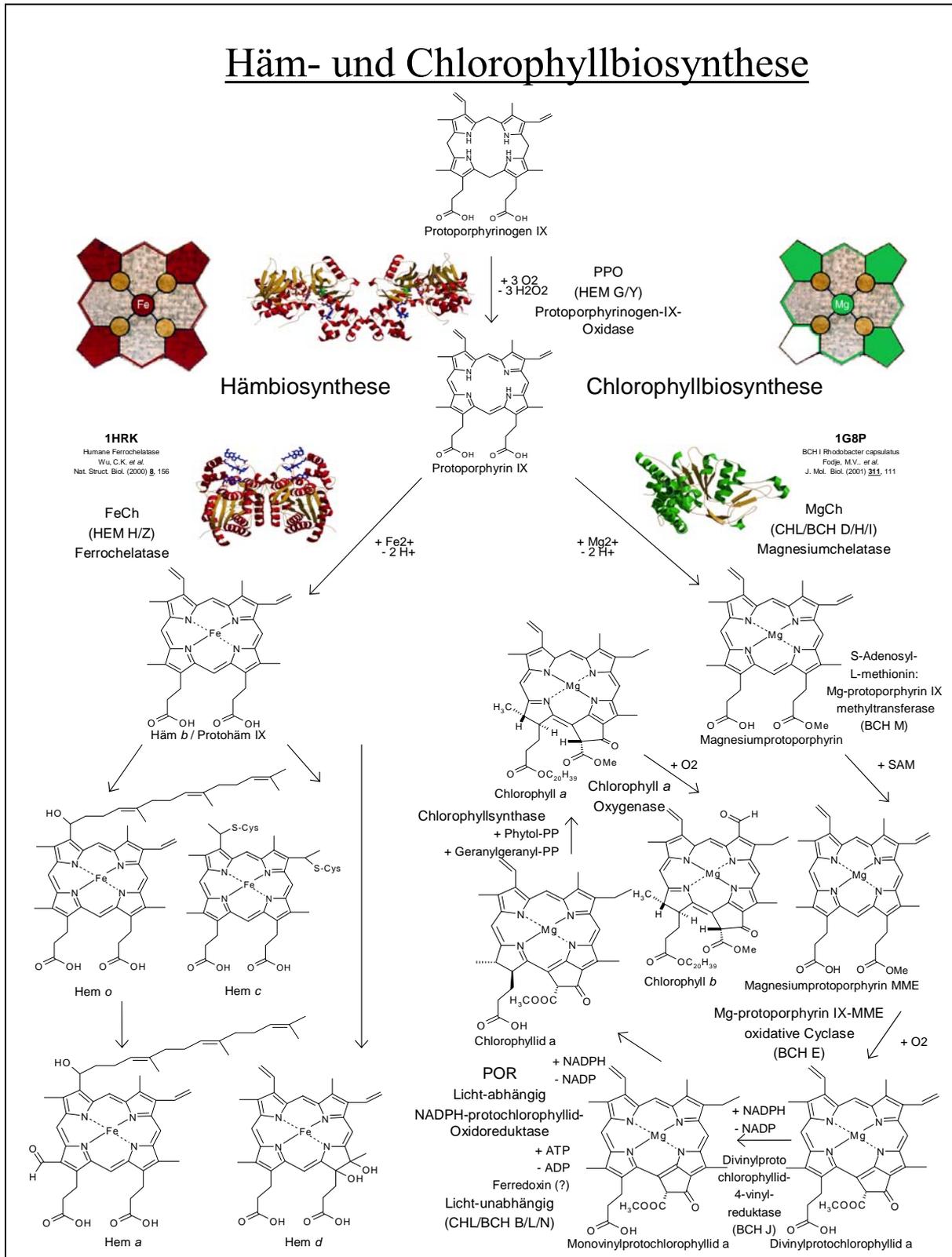


Abbildung 7: Hämbiosynthese und Chlorophyllbiosynthese in Pflanzen mit Abbildungen der bekannten eukaryontischen, teilweise auch prokaryontischen, Enzymstrukturen. Der Verzweigungspunkt für die Biosynthese von Häm und Chlorophyll ist das Protoporphyrin IX. Insertion von Eisen (Fe²⁺) durch die Ferrochelatase leitet die Hämbiosynthese ein, die mehrstufige Chlorophyllbiosynthese wird durch Insertion von Magnesium (Mg²⁺) in das Protoporphyrin IX eingeleitet.

3.4. Cupredoxine

Typ 1 blaue Kupferproteine (Cupredoxine) funktionieren als Elektronen-transfer Agentien sowohl in Prokaryonten wie in Eukaryonten. Sie besitzen eine mononukleare Kupferbindestelle die immer die Kupferkoordination durch zwei Histidine einschließt, via ihrer N^{δ} Atome, und die Thiolgruppe eines Cysteins. In manchen Cupredoxinen ist der axiale Methionin-Ligand durch ein Glutamin ersetzt (Messerschmidt, 1998). Typ 1 Kupferzentren haben einmalige spektroskopische Eigenschaften im Zustand des Kupfers als Konsequenz der Koordinationsgeometrie ihres aktiven Zentrums. Dies beinhaltet eine intensive $S(\text{Cys}) \Rightarrow \text{Cu}(\text{II})$ Ligand-zu-Metall-Charge-Transfer-(LMCT)-Übergangsbände bei ungefähr 600 nm in ihrem sichtbaren Spektrum mit einer zweiten LMCT-Bande bei etwa 450 nm. Die Phytocyanine sind eine Unterklasse der Cupredoxine, die von Pflanzen stammen. Die Phytocyanine wurden in drei Unterfamilien gruppiert: die Stellacyanine (das Stellacyanin aus *Rhus vernicifera*, STC, ist eines der am besten untersuchten Phytocyanine), die Plantacyanine (einschließlich Cucumber Basic Protein, CBP), und die Uclacyanine (Dennison and Lawler, 2001). Stellacyanine zeichnen sich aus durch einen axialen Gln-Liganden, wie die Struktur des Stellacyanin CST (Hart et al., 1996) aus Gurke (*cucumis sativus*) zeigt (Abb.8). Sie tragen weiterhin Kohlenhydrate und sind chimere Proteine, die aus einer kupferbindenden Domäne (Cupredoxin) und einer Zellwandankerdomäne bestehen.

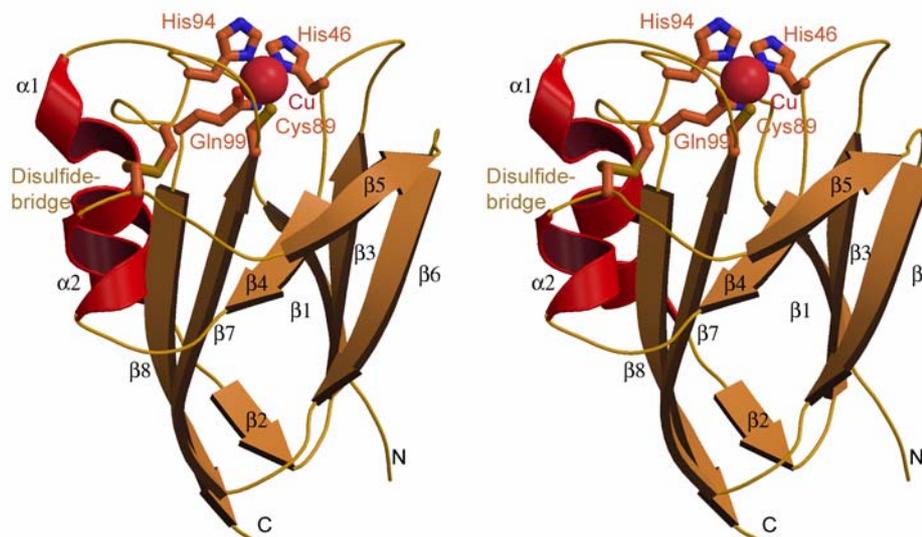


Abbildung8: Das Stellacyanin Monomer besteht aus einem achtsträngigen β -Barrel und zwei α -Helices. Das Kupferatom ist als kupferrote Kugel dargestellt mit seinen koordinierenden Resten His46, Cys89, His94 und Gln99 als Kugel-Stab-Modelle. Die Disulfidbrücke zwischen Cys60 und Cys95 ist ebenfalls als Kugel-Stab-Modell dargestellt (Hart et al., 1996).

Umecyanin (UME) ist ein wenig untersuchtes Phytocyanin, das aus Meerrettich-Wurzeln isoliert wurde. Aus Aminosäure-Sequenzalignments mit anderen Phytocyaninen wurde der

axiale Gln-Ligand identifiziert (Abb.9). UME gehört in die Stellacyanin-Unterklasse der Phytocyanine. Die Anwesenheit des Gln-Liganden resultiert in gewissen spektroskopischen Besonderheiten der Stellacyanine. Die Spektren im sichtbaren Bereich des Lichts des UME zeigen feine Unterschiede zu denen von CST und SCY. Die Spektren im sichtbaren Bereich des Lichts von CST und SCY zeigen eine relative intensive Absorptionsbande bei etwa 450 nm. Umecyanin zeigt sehr niedrige Absorption bei 450 nm (Dennison and Lawler, 2001).

Eine interessante Eigenschaft aller bisher untersuchten Phytocyanine ist der Übergang, der bei hohen pH-Werten im oxidierten Protein stattfindet und der sich dadurch bemerkbar macht, dass das Protein die Farbe von blau nach violett wechselt. Alkalische Übergänge sind kürzlich in UME, CST und in der Gln9Met-Mutante von CST beobachtet worden. Obwohl zahlreiche Untersuchungen über den alkalischen Übergang von Phytocyaninen angestellt worden sind, wurde die genaue Ursache für diesen Effekt bisher nicht gefunden (Dennison et al., 2003).

Deshalb sollte die Strukturbestimmung der oxidierten und der reduzierten Form des Umecyanin bei pH5.0 und alkalischem pH-Wert bei nahezu atomarer Auflösung tiefere Einsicht in die Koordinationsgeometrie des Kupfers geben und die Erklärung für den beobachteten alkalischen Übergang geben.

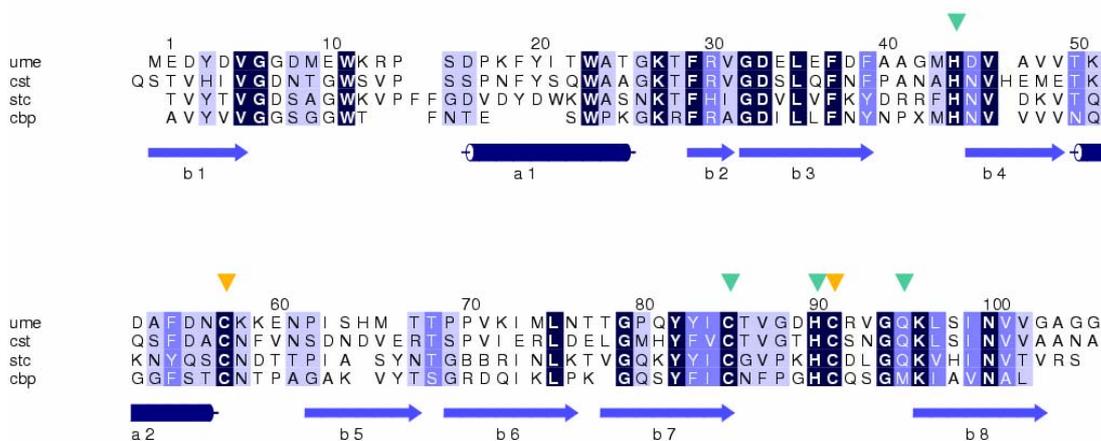


Abbildung9: Multiples Aminosäure Sequenzalignment von Meerettich-Umecyanin (UME) mit Stellacyanin aus Gurke, *cucumis sativus*, (CST), Stellacyanin aus *Rhus vernicifera* (STC) und Cucumber Basic Protein (CBP). Identität wird durch eine dunkelblaue Farbe dargestellt, hohe Konservierung durch eine mittelblaue und niedrige Konservierung durch eine hellblaue Farbe. Die kupferbindenden Liganden sind durch zyanfarbene Pfeile und die beiden an der Disulfidbrücke beteiligten Cysteine durch gelbe Pfeile markiert. Die Sekundärstrukturelemente (SSE) des UME sind als dunkelblaue Zylinder (Helices) und mittelblaue Pfeile (β -Stränge) dargestellt.

3.5. Riboflavinbiosynthese und Lumazinsynthese

6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazine Synthase (Lumazin Synthase, LUSY) katalysiert die Bildung des direkten Vorläufers von Vitamin B₂ (Riboflavin) durch Kondensation von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidinedion mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (Abb.10) (Gerhardt et al., 2002). Die Lumazinsynthasen von Hefen und Pilzen sind C₅-symmetrische Homopentamere, wohingegen die Lumazinsynthasen aus Pflanzen und vielen Bakterien 60 identische Untereinheiten bilden mit ikosaedrischer 532-Symmetrie. Die dreidimensionalen Strukturen dieser hohlen ikosaedrischen Partikel sind bestens beschrieben als Dodekamere von Pentameren. Die Faltung aller bekannten Lumazinsynthase-Untereinheiten ist sehr ähnlich. Ein zentrales viersträngiges β -Faltblatt ist auf beiden Seiten mit jeweils zwei α -Helices umgeben (offene α/β -Struktur). Die aktiven Zentren der Lumazinsynthasen befinden sich unveränderlich in jedem Interface zwischen verbundenen Untereinheiten in den pentameren Modulen.

Die Bindung von Substrat- und Produktanaloga ist untersucht worden bei den Lumazinsynthasen von *Aquifex aeolicus*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*. Analoga von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidinedion (Substrat) und 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (Produkt) binden unveränderlich mit der Ribitylseitenkette in der langgestreckten Konformation.

Überraschenderweise wird das Enzym aus *S. pombe* nach der Reinigung als gelbes Protein erhalten, das teilweise Riboflavin, teilweise 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin in den aktiven Zentren gebunden enthält. Dies resultiert aus der relativ hohen Affinität des Enzyms für sein eigenes Produkt als auch für das Endprodukt des Biosynthesewegs.

Es ist gezeigt worden, dass die heterozyklischen Hälften vieler Liganden, darunter Riboflavin, coplanare π -Komplexe mit dem Indolring des Tryptophan²⁷ des Wildtyp-Enzyms aus *S. pombe* eingehen. Allgemein spielen solche π -Stacking-Wechselwirkungen eine große Rolle in der Modulation der Cofaktor-Reaktivität (Breinlinger et al., 1998; Breinlinger and Rotello, 1997; Hunter and Sanders, 1990). Ein Beispiel sind die Flavodoxine, die ein Flavin-Mononukleotid (FMN) als Cofaktor benutzen, der in einer hoch konservierten Bindestelle, die Tryptophan- und Tyrosin-Reste enthält, gebunden ist (Stockman et al., 1994; Vervoort et al., 1985). Die Bindung des FMN in einer π -gestackten Konfiguration mit diesen aromatischen Aminosäureseitenketten ändert die Redoxeeigenschaften des Flavin, was die Bildung des Flavinsemichinons bei niedrigen Potentialen erleichtert. Weiterhin spielen π -Stacking-Wechselwirkungen eine Rolle bei der Bindung von Flavinen durch Proteine. Zum Beispiel erleichtert ein Tryptophan-Paar im kürzlich entdeckten Flavoprotein Dodecin die Bildung einer einzigartigen Tetrade, die ein Riboflavin-Paar mit antiparalleler Anordnung ihrer Isoalloxazinhälften enthält, die zwischen

den Indolgruppen der symmetrieverwandten Tryptophane gebunden sind (Bieger et al., 2003). Bei der Lumazinsynthase korreliert eine solche π -stacked Topologie mit einem substantiell modifizierten Absorptionsspektrum des gebundenen Riboflavin. Die Absorption des proteingebundenen Vitamins geht zu Wellenlängen oberhalb von 500 nm und die relative Intensität der optischen Übergänge bei 445 und 370 nm ist invertiert im Vergleich zum ungebundenen Riboflavin. Diese Eigenschaften sind in einer W27Y-Mutante weniger ausgeprägt und sind in einer W27G-Mutante des Proteins nicht beobachtbar (Fischer et al., 2002). Indizien für die π -stacking Wechselwirkungen von Trp27 und anderen aromatischen Resten wie Tyrosin und Phenylalanin mit Riboflavin liefern auch zeitaufgelöste EPR-Experimente, aus denen die Triplet-Parameter des Riboflavin erhalten werden können. (Manuskript in Vorbereitung). Die Ausdehnung der π -Orbitalüberlappung beeinflusst die Triplettde-lokalisierung, die sich in den triplet zero-field splitting parameters widerspiegelt. Daher stellt das in die Lumazinsynthase gebundene Riboflavin ein ideales System dar, spezifisch solche π -stacking Wechselwirkungen von Flavinen in einer Proteinumgebung zu untersuchen.

Um die strukturellen Grundlagen der physikalischen Eigenschaften des Riboflavin-Lumazinsynthase-Komplexes zu untersuchen, wurden die dreidimensionalen Strukturen der W27Y-Mutanten Protein-Ligand-Komplexe bestimmt, die durch Cokristallisation mit Riboflavin, 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazin (CEOL) und 5-Nitroso-6-(D-ribitylamino)-2,4(1H,3H)-pyrimidinedion (NORAP) bei Auflösungen von 2.80 Å, 2.75 Å und 2.70 Å erhalten wurden.

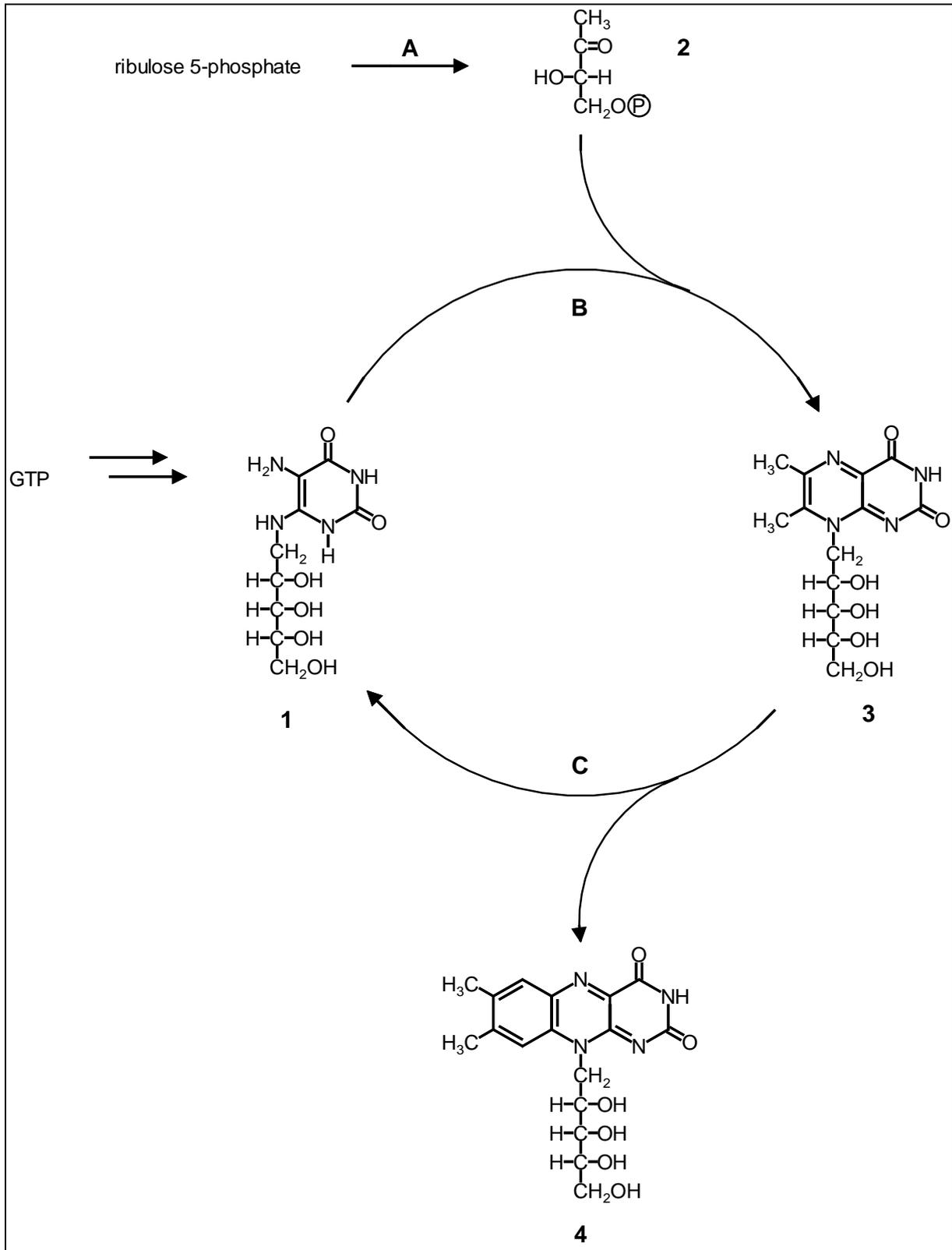


Abbildung 10: Die letzten Schritte in der Riboflavin-Biosynthese. A: 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase; B: 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase; C: Riboflavinsynthase; 1: 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidinedion; 2: 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat; 3: 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin; 4: Riboflavin (Gerhardt et al., 2002).

4. Materialien und Methoden

4.1 Materialien

DNA-Oligos

Alle aufgeführten Oligonukleotide (Tab.1) wurden von der Firma TibMolbiol bzw. Synthesezentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München (München) synthetisiert, in lyophilisierter Form geliefert und in destilliertem Wasser aufgenommen (Endkonzentration 100 μ M).

Tabelle1: Liste der verwendeten DNA-Oligomere

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
PPO2NT		
<i>PPO2NT-BamHI-fw</i>	ATCGGGATCCATGGCTCCTTCTGCCGGAG	Klonierung von <i>PPO2NT</i>
<i>PPO2NT-BamHI-re</i>	ATGCGGATCCCATGTCAAGTTGCACCTTGTGC	Klonierung von <i>PPO2NT</i>
<i>NT-PPX2-TB-MscI</i>	ATAATAATATGGCCATATGCACCA	Deletieren des S-Tags
<i>NT-PPX2-TB-1</i>	CATCATCATTCTTCTGGTCTGGTG	Deletieren des S-Tags
<i>NT-PPX2-HindIII-5980</i>	TATTATTATAAGCTTTGATCCAGT	Deletieren des S-Tags
<i>PPO2NT-K224Q-fw</i>	CAAGGGCCACCCCAA AA ACTTCAGC	Mutieren von Lys 224
<i>PPO2NT-K224Q-re</i>	GCTGAAGTTTGGGGTGGCCCTTG	Mutieren von Lys 224

Bakterien

Sämtliche molekularbiologischen Arbeiten sowie die heterologe Expression rekombinanter Proteine wurden in folgenden Derivaten des *E. coli* Stammes K12 durchgeführt:

Klonierung:

<i>E. coli</i> DH5 α	(Stratagene GmbH, Heidelberg)
Genotyp:	F ⁻ , <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>), ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15F λ ⁻
<i>E. coli</i> XL1Blue	(Stratagene GmbH, Heidelberg)
Genotyp:	<i>recA</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR-17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Δ M15, <i>Tn10</i> (tet ^r)]

Expression :

<i>E. coli</i> BL21(DE3)	(Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA)
Genotyp:	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) RIL	(Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA)
Genotyp:	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)
<i>E. coli</i> BL 834	(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J. Sun Kim, MPI für Biochemie, Abt. Strukturforschung)

Plasmide

PET32a (Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA) Klonierungs- und Expressionsvektor für *E. coli*, wobei die Expression über einen IPTG induzierbaren T7-Promotor gesteuert wird.

Enzyme und Kits

<i>Pwo</i> DNA-Polymerase	(Roche Molecular Biology, Penzberg)
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	(Roche Molecular Biology, Penzberg)
Restriktionsenzyme	(New England Biolabs (NEB), Schwalbach)
T4 DNA-Ligase	(New England Biolabs (NEB), Schwalbach, oder Promega)
<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i> (alkalische Phosphatase, CIP)	(New England Biolabs(NEB), Schwalbach)
<i>Qiagen Spin Miniprep Kit</i>	(Qiagen, Hilden)
<i>QIAquick PCR purification Kit</i>	(Qiagen, Hilden)
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	(Qiagen, Hilden)
<i>Crystal Screen</i>	(Hampton, Laguna Niguel)
<i>Crystal Screen II</i>	(Hampton, Laguna Niguel)
<i>Crystal Screen Lite</i>	(Hampton, Laguna Niguel)
<i>Crystal Screen Cryo</i>	(Hampton, Laguna Niguel)
<i>MembFac</i>	(Hampton, Laguna Niguel)
<i>Natrix</i>	(Hampton, Laguna Niguel)
<i>Wizard I</i>	(Emerald Biostructures, Bainbridge Island)
<i>Wizard II</i>	(Emerald Biostructures, Bainbridge Island)
<i>Cryo I</i>	(Emerald Biostructures, Bainbridge Island)
<i>Cryo II</i>	(Emerald Biostructures, Bainbridge Island)

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur exakten Bestimmung der Konzentration gelöster DNA wurde die DNA-Lösung UVspektrometrisch bei 260 nm vermessen. Eine $A_{260\text{nm}} = 1,0$ entspricht dabei einer Konzentration von $50 \mu\text{gml}^{-1}$ doppelsträngiger oder $33 \mu\text{gml}^{-1}$ einzelsträngiger DNA.

4.2.2 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte in Agarosegelen. Zur Herstellung eines Agarosegels wurden, je

nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente, 0,8-1,5 % Agarose (w/v) (Biomol, Hamburg) in 0,5xTAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde die Lösung in eine Gelapparatur gegossen und nach ihrem Erstarren mit 0,5xTAE-Puffer überschichtet. Die zu trennenden DNA-Proben wurden mit 6x Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 5-10 V/cm Gellänge für 45 bis 120 min. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) detektiert und ihre Länge anhand von DNA-Längenstandards ermittelt.

<u>0,5xTAE-Puffer:</u>	20mM Tris 10mM Essigsäure 0,5mM EDTA gelöst bei pH=8.0
<u>6fach Probenpuffer:</u>	30% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) Bromphenolblau

4.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurden in einem *Hot-Top Thermocycler* (PE9600, Perkin Elmer) bei folgenden Bedingungen durchgeführt.

<u>50μl PCR Ansatz:</u>	5 μ l 10x PCR-Puffer 1 μ l dNTP-Mix [10mM je dNTP] 1 μ l <i>forward-primer</i> [10 μ M] 1 μ l <i>reverse-primer</i> [10 μ M] 50-200ng <i>template</i> 1-2,5 <i>units</i> DNA-Polymerase d 50 μ l ddH ₂ O
----------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

4.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Zur Klonierung wurden 0,1–2,0 μ g DNA (PCR-Produkt bzw. Vektor-DNA) mit 5–20 *units* der geeigneten Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers geschnitten und die verdaute DNA über ein Agarosegel und den *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt.

Plasmid-DNA zur Transformanden-Analyse wurde mit Hilfe des *Qiagen Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden) gereinigt und wie oben verdaut und analysiert.

4.2.5 Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Geschnittene Vektor-DNA wurde mit alkalischer Phosphatase (CIP, New England Biolabs, Schwalbach) behandelt, um eine Religation partiell geschnittener Plasmide zu verhindern. Dem Restriktionsansatz wurden 0,2 *units* alkalische Phosphatase pro μ g DNA zugesetzt und die Dephosphorylierungsreaktion für 30 min bei 37 °C durchgeführt.

4.2.6 Ligation von DNA Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung zweier DNA-Fragmente nach Spaltung durch Restriktionsenzyme erfordert die Bildung von Phosphodiesterbindungen durch DNA-Ligase. Dazu muß mindestens

PPXII entfernt. Nach Transformation in DH5 α und anschließender Plasmidpräparation wurde aus dem pET32a-PPXII- Δ HindIII-Plasmid durch MscI- und HindIII- Verdau der ca. 500 bp große vordere Teil des *inserts* mit S-Tag entfernt. Anschließend wurde das ebenfalls mit MscI- und HindIII-geschnittene *insert* aus der 2.PCR in den linearisierten Vektor ligiert, in XL1 blue transformiert und ein Klon mit einem *insert* der erwarteten Länge sequenziert und nach der Bestätigung der Sequenz für weitere Arbeiten verwendet (*PPO2NT*).

4.2.10 Mutation von Lysin224 in *pET32a-PPO2NT*

Um eine durch Proteolysestudien und N-terminale Edman-Sequenzierung (Simone Greven, Bayer ZF, Leverkusen) identifizierte Thrombinschnittstelle vor Lys224 zu entfernen, sollte dieser Rest durch Gln224 ausgetauscht werden. Dazu wurde mit den Mutagenese-Primern *PPO2NT-K224Q-fw* und *PPO2NT-K224Q-re* ein Adenin gegen ein Cytosin mit einer PCR ausgetauscht und nach Bestätigung der Sequenz für weitere Arbeiten verwendet (*PPO2NT-K224Q*). Das PCR-Protokoll bei dieser Mutagenese lautete:

initiale Denaturierung:	3 min 96°C
Amplifikation:	[1 min 96°C, 1 min 50°C, 12 min 72°C] 30 Zyklen
finale Elongation :	10 min 72°C

4.3 Mikrobiologische Methoden

Bei allen Arbeiten mit Bakterien wurde sorgfältig auf die Sterilität der verwendeten Arbeitsgeräte, Medien und Lösungen geachtet. Medien und Lösungen wurden autoklaviert oder steril filtriert.

4.3.1 *E. coli* Flüssigkulturen

Autoklaviertes LB (Luria-Bertani)-Flüssigmedium bzw. NMM (*new minimal medium*) wurde mit den benötigten Antibiotika versetzt und *E. coli* Flüssigkulturen - soweit nicht anders beschrieben - bei 37 °C und 140 U/min im Schüttler kultiviert. Von den Antibiotika wurden 1000fach konzentrierte Stammlösungen hergestellt, steril filtriert und bei -20°C gelagert.

Antibiotika-Lösungen:

Ampicillin (Amp) 1000x (100 mgml⁻¹ in ddH₂O)

LB-Medium:

10 g NaCl
 10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefe-Extrakt
 2,5 g Na₂HPO₄ (pH 7,2)
 ddH₂O ad 1 Liter

NMM-Medium:

7,5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	8,5 mM NaCl	22mM KH ₂ PO ₄	57.6 mM K ₂ HPO ₄	1 mM MgSO ₄
20 mM Glucose	50 mg/l Aminosäuren	1 mg/l CaCl ₂	1 mg/l Fe ²⁺	100 mg/l Ampicillin
10 mg/l Thiamin	10 mg/l Biotin/KOH	0,01 µg/l Spurenelemente		

4.3.2 *E. coli* Plattenkulturen

LB-Medium wurde mit 15g l^{-1} Agar versetzt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Mediums auf ca. 60°C wurden benötigte Antibiotika in der gewünschten Konzentration zugegeben und das Medium steril in Petrischalen gegossen. Die Platten wurden nach dem Erstarren des Mediums bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

4.3.3 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Transformationskompetente Zellen wurden modifiziert nach einer Vorschrift von D. Alexander (ARCO Plant Cell Research Institute, Stanford, USA) hergestellt. 100ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Über-Nacht-Kultur der entsprechenden Zellen angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,5 geschüttelt. Nach Zugabe von 2 ml 1 M MgCl_2 wurde für weitere 10 min bei 37°C und anschließend 1h in Eiswasser inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, $2000 \times g$, 4°C) wurde das Zellpellet in 40 ml Puffer A (100 mM CaCl_2 , 70 mM MnCl_2 , 40 mM Na-Acetat, pH 5,5) resuspendiert und 1h bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (wie oben) wurde das Zellpellet in 4ml Puffer B (100mM CaCl_2 , 70mM MnCl_2 , 40mM Na-Acetat, pH 5,5, 15 % Glycerin) aufgenommen, in 100 μl -Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Zellen für die Transformation mittels Elektroporation wurden bei 37°C in 1 l SOC-Medium kultiviert und bei einer OD_{600} von 0,5 bis 0,7 pelletiert. Das Bakterienpellet wurde zweimal mit 15 %-iger Glycerinlösung gewaschen und abschließend in 4 ml 15 %-iger Glycerinlösung resuspendiert, in 50 μl -Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

SOC-Medium:

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

4.3.4 Transformation in kompetente *E. coli* Zellen

100 μl transformationskompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 μl eines Ligationsansatzes oder 0,01–1 μg Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschritt für 1 min bei 42°C , wonach der komplette Transformationsansatz auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert oder direkt zum Animpfen von Expressionskulturen verwendet wurde.

4.3.5 Transformation über Elektroporation

50 μl elektrokompente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in einer Elektroporationsküvette (1 mm) mit 2 μl Ligationsansatz oder Plasmid-DNA versetzt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 1650 V mit einem *BioPulse* (BioRad, München). Die Zellen wurden in

500 µl LB-Medium aufgenommen, 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 100 µl der Zellsuspension auf LB-Agar-Platten (4.3.2) ausgestrichen.

4.3.6 Expression von PPXIINT, PPO2NT und PPO2NT-K224Q

Das PCNA-Homologe aus *Pyrococcus furiosus* wurde in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert. Dazu wurden kompetente Zellen mit PPXIINT, PPO2NT bzw. PPO2NT-K224Q (diese Arbeit) transformiert und auf Amp-LB-Platten ausgestrichen. Mit einer einzelnen Kolonie wurde eine 1 l-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen der gewachsenen Vorkultur wurden abzentrifugiert und in 50 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden mit jeweils 4 ml der resuspendierten Zellen 12 Hauptkulturen eines Volumens von 1200 ml angeimpft und die Zellen bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 geschüttelt. Die Expression wurde durch Zugabe von 250 µM IPTG (Endkonzentration) induziert und bei 37 °C über Nacht durchgeführt. Nach Beendigung der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert, in 50mM Tris/HCl, pH 8,0; 25 ml je 1200 ml-Kultur resuspendiert, abzentrifugiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.3.7 Herstellung von *E. coli* Rohextrakten

Resuspendierte Zellen mit rekombinantem PPXIINT, PPO2NT bzw. PPO2NT-K224Q wurden bei Raumtemperatur in Resuspendierungspuffer (20 mM Tris, pH 8,0, 1 M NaCl, 10 % Triton-X-100, 2 mM Imidazol, pH 8,0) aufgetaut und in einem Rosettengefäß unter Eiskühlung durch Ultraschall (*MacroTip*, 15-20 min auf Stufe 10 bei 50 % Puls-Zyklus) aufgeschlossen (Branson, Sonifier 250). Die Trennung von löslichen und unlöslichen Bestandteilen erfolgte durch Zentrifugation (45 min, JA20-Rotor, 20'000 U/min, 4 °C).

4.4 Proteinchemische Methoden

4.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit der Methode nach Bradford photometrisch bei 595 nm bestimmt. Dazu wurde eine Eichegrade mit BSA in den Konzentrationen 0,1 bis 15 µgml⁻¹ im Absorptionsbereich von 0 bis 1,2 erstellt. 200 µl Bradfordreagenz (BioRad, München) wurden mit 1 bis 50 µl Probenlösung versetzt und mit ddH₂O auf 1 ml Volumen aufgefüllt. Nach 5min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt.

4.4.2 Proteinfällung mit TCA

Niedrig konzentrierte Proteinlösungen wurden mit 1/9 Volumen TCA (Trichloressigsäure) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Gefällte Proteine wurden durch 15 min Zentrifugation in einer Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde

zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen (Zentrifugation wie oben), mit 2x SDS-Auftragspuffer versetzt und die Probe durch SDS-PAGE analysiert.

4.4.3 Konzentrierung von Proteinlösungen

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen nach dem Prinzip der Ultrafiltration wurden Zentrifugationskonzentratoren des Typs Centriprep und Centricon (Millipore, Eschborn) eingesetzt.

4.4.4 Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden aufgrund ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld in einer diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die SDS-PAGE wurde mit einem 7-10 %-igen Sammelgel und einem 12-16 %-igen Trenngel durchgeführt.

Sammelgel:

Xml Acrylamid-Stammlösung (Protogel)
7,5ml 1M Tris/HCl pH=6.8
300µl (w/v) 20%SDS
ad 50ml H₂O

Trenngel:

Yml Acrylamid-Stammlösung (Protogel)
17ml 2M Tris/HCl pH 8.8
450µl 20% (w/v) SDS
ad 90ml H₂O

Es wurden jeweils acht Gele (8,5x8 cm²) in einer Gelgießkammer (Eigenbau, MPI Martinsried) gegossen. Die Trenngellösung wurde nach Zugabe von 90 µl TEMED und 450 µl (0,1gml⁻¹) APS in die vorbereitete Apparatur gegossen und mit 300 µl Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Alkoholschicht entfernt, das Sammelgel mit 32µl TEMED und 300 µl (0,1 gml⁻¹) APS versetzt und in den Gießstand eingefüllt. Teflon-Kämme mit zehn bis 18 Geltaschen wurden luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt und die ausgehärteten Gele bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Für die Gelelektrophorese wurden die Proteinproben mit 2-fach Probenpuffer versetzt und 2 min bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA im SDS-Laufpuffer.

2x Probenpuffer:

100mM Tris/HCl pH 6.8
200mM DTT
0,2% (w/v) Bromphenolblau
20% (w/v) Glycerin
SDS-Laufpuffer: 25mM Tris/HCl pH 8.3
200mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

4.4.5 Coomassie-Färbung

Polyacrylamid-Gele wurden nach erfolgter Elektrophorese in einer Coomassie-Lösung gefärbt. Dazu wurden die Gele in der Färbelösung kurz erhitzt, 15 min bei RT geschüttelt, danach in Entfärbelösung solange gewaschen, bis der Hintergrund farblos erschien.

Coomassie-Färbelösung:

0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

40% (v/v) Ethanol

10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung:

40% (v/v) Ethanol

10% (v/v) Essigsäure

4.4.6 Proteinpräparation

Reinigung von *PPO*

Zellextrakte mit rekombinantem *PPXIINT*, *PPO2NT* bzw. *PPO2NT-K244Q* wurden auf eine mit Resuspendierungspuffer (4.3.7) äquilibrierte Ni-NTA-Säule (Volumen 50ml; Flußrate 2 mlmin⁻¹) geladen. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 90 % Puffer A (20 mM Tris, pH8,0, 200 mM NaCl, 0,1 % Triton-X-100) und 10 % Puffer B (Puffer A, dem 150 mM Imidazol, pH 8,0, zugesetzt waren) entfernt und *PPXIINT*, *PPO2NT* bzw. *PPO2NT-K244Q* anschließend mit einem Puffer B eluiert (Volumen 600ml, Flußrate 2 mlmin⁻¹). Fraktionen mit *PPXIINT*, *PPO2NT* bzw. *PPO2NT-K244Q* wurden mit 2,5 mM Magnesiumchlorid und 0,2 Umg⁻¹ Thrombin versetzt, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, mit 0,5 mM Pefabloc-Proteaseinhibitor versetzt, über eine Ultrafiltrationseinheit mit einem *cutoff* von 50kDa konzentriert und durch Gelpermeationschromatographie auf einer Sephacryl S-200-Säule (Pharmacia) gereinigt (Laufpuffer 20mM Tris, pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,1 % Triton-X-100; Flußrate 1mlmin⁻¹). Nach Konzentrierung wurde das erhaltene Protein auf einer ResourceQ (Pharmacia)-Säule gereinigt.

4.5 Kristallographische Methoden

4.5.1 Kristallisation

Die Kristallisationsansätze erfolgten bei 20 °C nach der Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen (*sitting drop*) in CrysChem Platten (Charles Supper Company), Die CrysChem Platten wurden mit transparenter Klebefolie (CrystalClear, MancoInc., Avon, USA) verschlossen. Der Kristallisationsverlauf wurde über mehrere Monate verfolgt.

Für das *screening* einer großen Anzahl von Kristallisationsbedingungen wurde das Prinzip des *sparse matrix sampling* angewandt. Dabei wurden jeweils 2 µl (10 mgml⁻¹) Proteinlösung mit 2 µl des Kristallisationspuffers vermischt und gegen 250-400 µl Reservoirlösung äquilibriert.

Initiale Kristallisationsbedingungen wurden durch Variation verschiedener Parameter (Konzentration von Protein, Präzipitantz sowie etwaiger Additive; Tropfenvolumen und Mischungsverhältnis; Temperatur; *screening* verschiedener Additive) optimiert.

4.5.2 Transformation der PPO2NT-Kristalle

Um die Streuleistung der Kristalle deutlich zu verbessern, wurden sie mit Hilfe eines „Free Mounting System“ bei einer Feuchte drei Prozent unterhalb ihrer Startfeuchte montiert, vom umgebenden Puffer befreit, mit Perfluoropolyether (PFPE) umgeben und im Stickstoff-cryostrom bei 100 K gefroren.

Das Free-mounting System (Abb.11a) besteht aus einem Kristallhalter, Befeuchtereinheit und Steuercomputer. Befeuchtereinheit und Kristallhalter sind über einen flexiblen Schlauch miteinander verbunden (Abb.11b). Die relative Feuchte des Luftstroms wird genau eingestellt und kann variiert werden, um die Kristallqualität zu erhöhen, v.a. durch Trocknen, was zur Kristallschrumpfung führt (Kiefersauer et al., 2000).

Der Kristallhalter oder Probenkopf trägt den Kristall in einer bzgl. Feuchtigkeit und Temperatur definierten Atmosphäre (Abb.11b). In Abb.11c ist der Probenkopf im geöffneten Zustand zu sehen, um die Probe montieren bzw. wieder entnehmen zu können. Gezeigt ist ein montierter Loop, wie er standardmäßig in der Proteinkristallographie als Probenhalter verwendet wird. Der Kristallhalter hat im Inneren einen Magneten, auf dem man einen Standardloop montieren kann. In Abb.11d ist der Probenkopf im geschlossenen Zustand auf einem Goniometer montiert gezeigt. Der Kristall befindet sich dabei etwas ausserhalb vom Probenkopf, so dass er frei einer Analyse mit Röntgenstrahlen oder optischem Licht zugänglich ist. Der Abstand des Kristalls zum Düsenmund ist ein wichtiger Parameter für die effektive relative Feuchte am Ort des Kristalls. Durch Hinein- bzw. Herausschrauben des Loophalters (Magnet) kann dieser Parameter exakt angepasst werden. Der feuchte Luftstrom fließt durch einen Kanal aus dem äußeren Teil zu dem Kristall. Das in den Probenkopf eingeführte Messgas fließt durch den Kopf nach vorne zum Kristall. Beim Durchfluss im Kopf nimmt das Messgas die Temperatur des Probenkopfes an, sodass eine definierte Temperatur am Kristall eingestellt wird. Der Taupunkt des Messgases und die Gastemperatur am Kristall ergeben die relative Feuchte am Kristall. Das Innenteil des Probenkopfes, welches den Kristall trägt, ist unabhängig drehbar zum klappbaren Außenteil des Probenkopfes. Alle Anschlüsse des Probenkopfes befinden sich am Außenteil, so dass beim Drehen der Probe die Zuleitungen nicht beschädigt werden können. Der gesamte Probenkopf ist an einem herkömmlichen Goniometerkopf montiert und passt auf allen gängigen Röntgenkameras. Anstatt eines Loop als Probenhalter kann eine Mikropipette verwendet werden, auf deren flaches Ende der Pipettenspitze der Kristall gehalten wird.

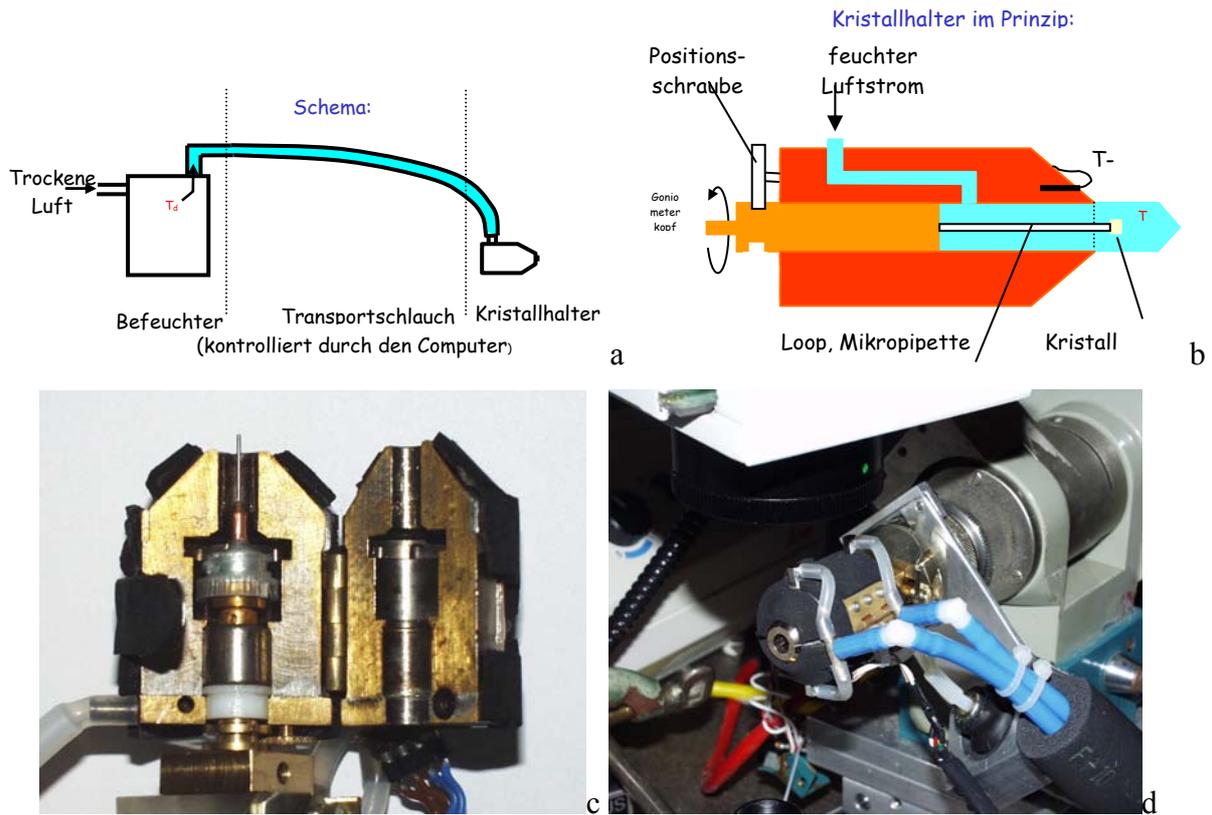


Abbildung11: „Free Mounting System“ **a** Schema des gesamten Systems, **b** Prinzipieller Aufbau des Kristallhalters, **c** Kristallhalter mit geöffnetem Kopf und eingelegtem Loop, **d** montierter Kristallhalter mit geschlossenem Kopf und Schläuchen für den Luftstrom und Temperaturregelung (<http://www.kenes.com/iucr/program/abstracts/1735.doc>).

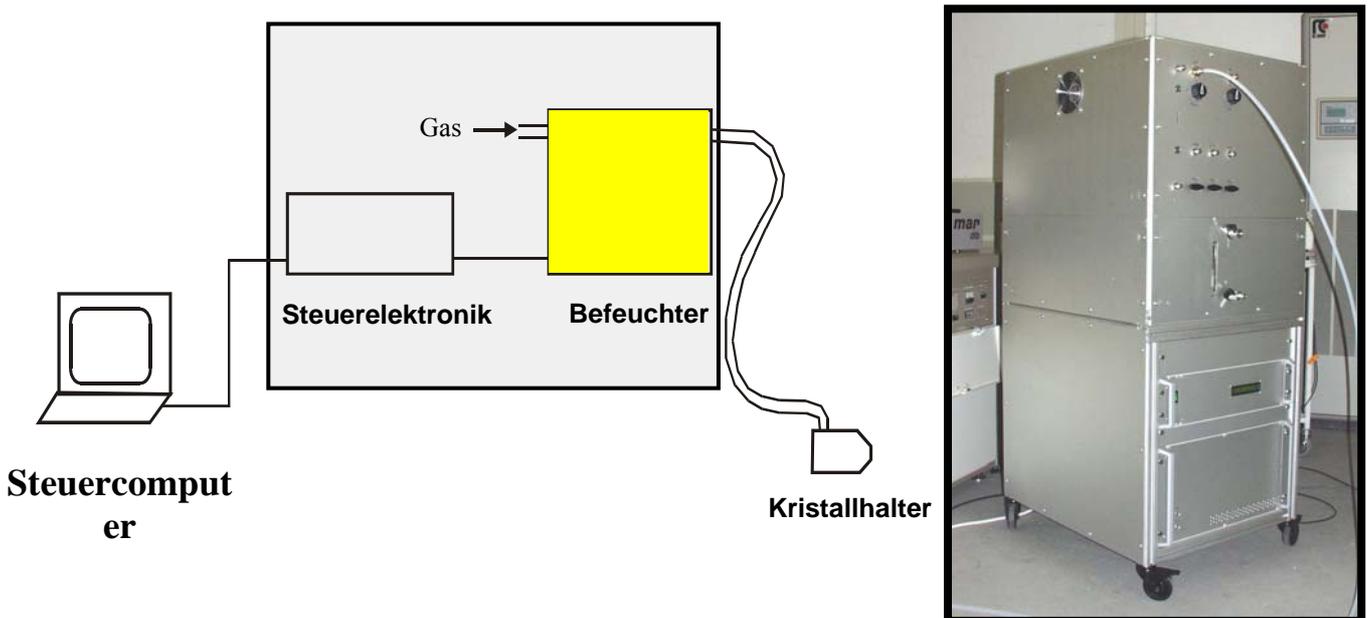


Abbildung12: Grundsätzlicher Aufbau des Free-mounting Systems aus Kristallhalter, Befeuchtereinheit und Steuercomputer

Ein wichtiger Bestandteil des Free-mounting Systems ist die Befeuchtereinheit (Abb.12, graues Feld und Foto). Diese besteht im wesentlichen aus dem Befeuchter, der Steuerelektronik und der Leistungselektronik. An der Befeuchtereinheit angeschlossen ist die Messgasleitung, welche das konditionierte Gas zum Kristallhalter (Probenkopf) befördert. Diese wird beheizt, um Kondensation während des Transportes auszuschließen. Die Temperatur des Kristallhalters wird über eine Kühlflüssigkeit exakt eingestellt. Die Temperierung der Kühlflüssigkeit geschieht ebenfalls in der Befeuchtereinheit und wird von dort zum Kristallhalter befördert. Die Regelung aller wichtigen Prozesstemperaturen (Befeuchter, Messgasleitung, Probenkopf etc.) wird von der Steuerelektronik übernommen. Je nach Vorgabe werden die Temperaturen ständig aufeinander abgestimmt. Die für die relative Feuchte am Kristall wichtigen Temperaturen wie Gastaupunkt und Gastemperatur werden mit einer relativen Genauigkeit von $\pm 0.02 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt. Dies ergibt eine Genauigkeit in der relativen Feuchte von $\pm 0.2 \text{ } \%$. Die hohe Genauigkeit ist für das Arbeiten mit empfindlichen Proteinkristallen notwendig, um die Kristalle nicht zu beschädigen und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Der einstellbare Feuchtebereich liegt zwischen $30 \text{ } \%$ und $99 \text{ } \%$. Die Gastemperatur kann in einem weiten Bereich von $4 \text{ }^\circ\text{C}$ – $60 \text{ }^\circ\text{C}$ variiert werden. Der Gasfluss wird über einen Massenflussregler gesteuert. Zusätzlich sind Anschlüsse vorgesehen um Fremdgase wie z.B. Ammoniak zum Hauptstrom beizumischen. Flüssigkeiten, z.B. Alkohole, können separat verdampft, dem Hauptgasstrom beigemischt und so dem Kristall zugeführt werden. Ein über eine serielle Leitung angeschlossener Steuercomputer erlaubt es dem Experimentator, auf einfache Weise seine Experimente auszuführen und zu jeder Zeit in das System einzugreifen. Dazu wurde eine umfassende Software entwickelt. Das Montieren erfolgt am Montageplatz (Abb.13).



Abbildung13: Montageplatz. Der hier gezeigte Montageplatz umfasst im wesentlichen ein Videosystem (Mikroskop, Beleuchtung, CCD-Kamera) und einen drehbaren Goniometerkopfhalter zur Aufnahme des Probenkopfes. Der Goniometerkopfhalter ist auf einer Zweiachsenverschiebeeinheit montiert, um die Position der Probe relativ zur Optik anpassen zu können. Der Montageplatz dient als erstes zur Messung der Startfeuchte (optische Methode) und zur Montage des Kristalls in den Probenkopf.

Falls nötig können weitere Manipulationen am Kristall unter dem Stereomikroskop vorgenommen werden. Der gesamte Probenkopf wird dann abgenommen und zur Röntgenkamera gebracht. Wegen der flexiblen Zuleitungen wird der Kristall ständig in der feuchten Atmosphäre stabil gehalten.

4.5.3 Datensammlung und Datenreduktion

Zur Aufnahme von Röntgendiffraktionsdaten bei 291 K wurden Kristalle in silanisierten Quarzkapillaren (0,5mm Ø, Mark-Röhrchen für röntgenographische Aufnahmen, W. Müller, Berlin) montiert. Beide Seiten der Kapillare wurden anschließend mit etwas Reservoirlösung gefüllt und mit Dentalwachs (Richter&Hoffmann Harvard Dental GmbH) verschlossen. Die Kapillaren wurden auf einem Goniometerkopf fixiert und die Datensätze als Serie von Rotationsaufnahmen auf einer Drehanode bei (50 kV, 100 mA) gesammelt. Die Messungen erfolgten mit Graphit-monochromatisierter $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$) auf einer MAR345 *Image Plate* (MAR Research, Hamburg). Alternativ wurden Cryo-Datensätze bei 100K aufgenommen. Dazu wurde ein Kristall in einer Nylon-Schleife (Hampton Research) aufgenommen, in einem geeigneten Cryoprotektans äquilibriert und entweder in flüssigem Stickstoff oder im Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren. SAD-Daten der PPO2NT aus *Nicotiana tabacum* wurden an der *Beamline* ID29 der European Radiation Synchrotron Facility (ESRF), Grenoble aufgenommen. Dazu wurde Synchrotronstrahlung einer Wellenlänge von $0,9790 \text{ \AA}$ verwendet.

Die Bestimmung der Kristallorientierung, der Elementarzelle und der Raumgruppe, sowie die Integration der Reflexintensitäten erfolgte mit MOSFLM, Version 6.01 – Version 6.11 (Leslie, 1998), DENZO (Otwinowsky, 1993) oder XDS (Kabsch, 1993). Die weitere Analyse der Daten wurde mit den Programmen des CCP4 *program package* (Bailey, 1994) oder des HKL-Programmpakets (Otwinowski and Minor, 1997) durchgeführt.

4.5.4 Anomale Streuung und SAD

Anomale Streuung

Bei der normalen Thompson-Streuung der Röntgenstrahlen können die Elektronen im Atom wie freie Elektronen behandelt werden, die als Dipol-Oszillator in Resonanz mit der einfallenden elektromagnetischen Strahlung schwingen. Da die Elektronen aber in den Atomorbitalen lokalisiert sind, gilt diese Betrachtung nur, wenn die Frequenz ω der einfallenden Strahlung groß ist verglichen mit einer natürlichen Absorptionsfrequenz ω_{kn} des streuenden Atoms. Dies gilt für die leichten Atome in biologischen Makromolekülen (H, C, N, O, S, P). Für schwerere Elemente kann die Frequenz ω höher oder niedriger sein je nach der Absorptionsfrequenz. Ist ω gleich der Absorptionsfrequenz ω_{kn} , so ist die Absorption der Strahlung verbunden mit der Freisetzung eines Photoelektrons, deren Energie der Ionisierungsenergie dieses Elektrons entspricht. Dieser Übergang erfolgt in die kontinuierliche Region, da alle diskreten Energieniveaus in dem Atom besetzt sind. Die Absorptionsfrequenzen für die K, L oder M Schale sind verbunden mit den entsprechenden Absorptionskanten, die

durch einen scharfen Abfall in der Absorptionskurve (Absorption gegen Wellenlänge) gekennzeichnet sind. Es ist offensichtlich, dass die Streuung von Elektronen, deren Resonanzfrequenzen auf oder nahe der Frequenz des einfallenden Lichtes liegen, einen besonderen Beitrag liefert, der anomale Streuung genannt wird.

Ist ω vergleichbar mit ω_s (die natürliche zirkulare Frequenz des Dipols, wenn die Ladung verschoben wird), aber geringfügig größer, so wird f (der Streufaktor des Dipols) komplex:

$$F = f' + if'' = f_0 + \Delta f' + i\Delta f''$$

Der Imaginärteil ist um $\pi/2$ zur primären Welle phasenverschoben, d.h. er läuft immer $\pi/2$ vor der gestreuten Welle. $\Delta f''$ ist als Absorptionskomponente der anomalen Streuung bekannt. Es folgt aus der Theorie der anomalen Streuung, dass f_0 real ist, unabhängig von der Wellenlänge der einfallenden Röntgenstrahlen, aber unabhängig vom Streuwinkel. $\Delta f'$ und $\Delta f''$ hängen von der Wellenlänge λ ab, von der einfallenden Strahlung, sind aber scheinbar unabhängig vom Streuwinkel.

Da Fluoreszenz und Absorption nahe verwandt sind, werden Fluoreszenzmessungen mit wechselnder Frequenz der Röntgenstrahlung dazu verwendet, die Frequenzabhängigkeit der dispersiven Komponenten der verschiedenen chemischen Elemente zu bestimmen. Anstatt mit der Frequenz ω , wird Strahlung häufig mit ihrer Wellenlänge λ oder Photonenenergie E charakterisiert. Die Dispersionskorrekturterme $\Delta f'$ und $\Delta f''$ werden häufig als f' und f'' bezeichnet. Abb.18 (5.1.2) zeigt die anomalen Streufaktoren nahe der K-Absorptionskante des Selen eines Kristalls der PPO2NT. Das Spektrum wurde mit wellenlängenveränderbarer Synchrotronstrahlung gemessen. Abgesehen von der Eigenschaft der „weißen Linie“, fällt f'' um ca. 4 Elektronen, wenn die Kante von der kurzwelligen Seite her erreicht wird; f' weist einen symmetrischen Abfall von -8 Elektronen um die Kante auf. Ähnliche Werte können an den K-Kanten für Fe, Cu, Zn und Br beobachtet werden, deren Wellenlängen alle zwischen 0,9 und 1,8 Å liegen, was gut passt für Röntgen-Streuxperimente an biologischen Makromolekülen. Für andere interessante Schweratome wie Sm, Ho, Yb, W, Os, Pt und Hg liegen die $L_{II}(\text{Sm})$ oder L_{III} Kanten in dieser Region. Hier sind die Effekte sogar größer. Deutlich größere Änderungen werden für manche Lanthanide wie Yb gefunden, wo das Minimum f' -33 Elektronen und das Maximum f'' 35 Elektronen beträgt.

Unter der Annahme, dass der Kristall eine Gruppe anomaler Streuer enthält, kann man die Beiträge der verschiedenen Komponenten des Streufaktors nach Hendrickson und Ogata trennen, um folgende Gleichung zu erhalten:

$$\lambda F(\mathbf{h}) = {}^0F_N(\mathbf{h}) + {}^0F_A(\mathbf{h}) + \lambda F'_A(\mathbf{h}) + i\lambda F''_A(\mathbf{h})$$

wobei 0F_N der Beitrag der normalen Streuer und 0F_A , ${}^0F''_A$ und ${}^0F'_A$ die Beiträge für die entsprechenden Komponenten des komplexen Atomformfaktors sind. Für zentrosymmetrische Reflexion erhalten wir:

$${}^\lambda F(-h) = {}^0F_N(-h) + {}^0F_A(-h) + {}^\lambda F'_A(-h) + i {}^\lambda F''_A(-h)$$

Die geometrische Darstellung beider Strukturfaktoren ist in Abb.14a bzw. b gezeigt. Die Umkehrung des Vorzeichens von h verursacht negative Phasenwinkel für alle Beiträge, deren Komponenten des Streufaktors real sind. Dies gilt ebenso für den f'' -abhängigen Teil, aber wegen des imaginären Faktors i muß dieser Vektor mit einem Phasenwinkel $+\pi/2$ bzgl. ${}^0F_A(-h)$ und ${}^\lambda F'_A(-h)$ gezeichnet werden. Die resultierenden absoluten Werte für ${}^\lambda F(h)$ und ${}^\lambda F(-h)$ sind nicht länger gleich, was bedeutet, dass ihre Intensitäten (Quadrate der Amplitude) verschieden sind (Zusammenbruch des Friedel'schen Gesetzes) (Messerschmidt, 2000).

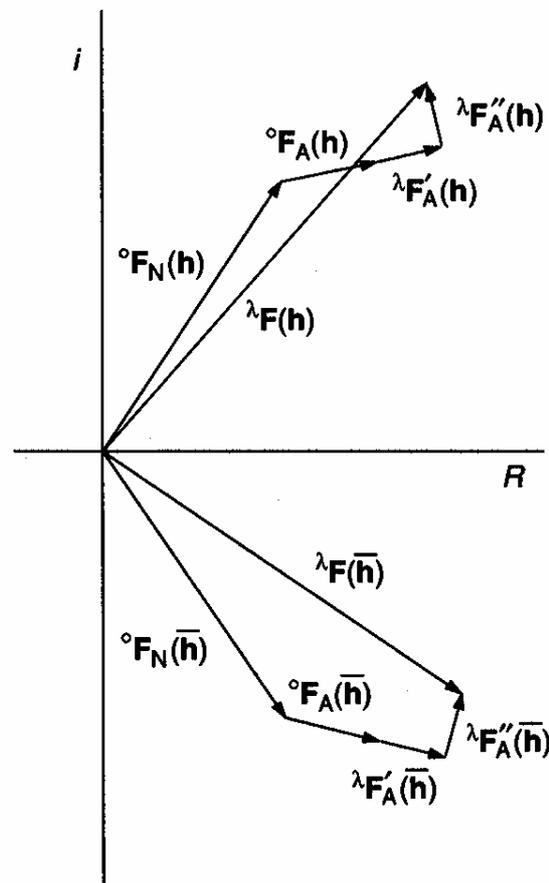


Abbildung14a: Vektordiagramm zur Erklärung des Zusammenbruchs des Friedel'schen Gesetzes. Die resultierenden absoluten Werte für ${}^\lambda F(h)$ und ${}^\lambda F(-h)$ sind im anomalen Fall nicht gleich.

Single Wavelength Anomalous Diffraction (SAD)

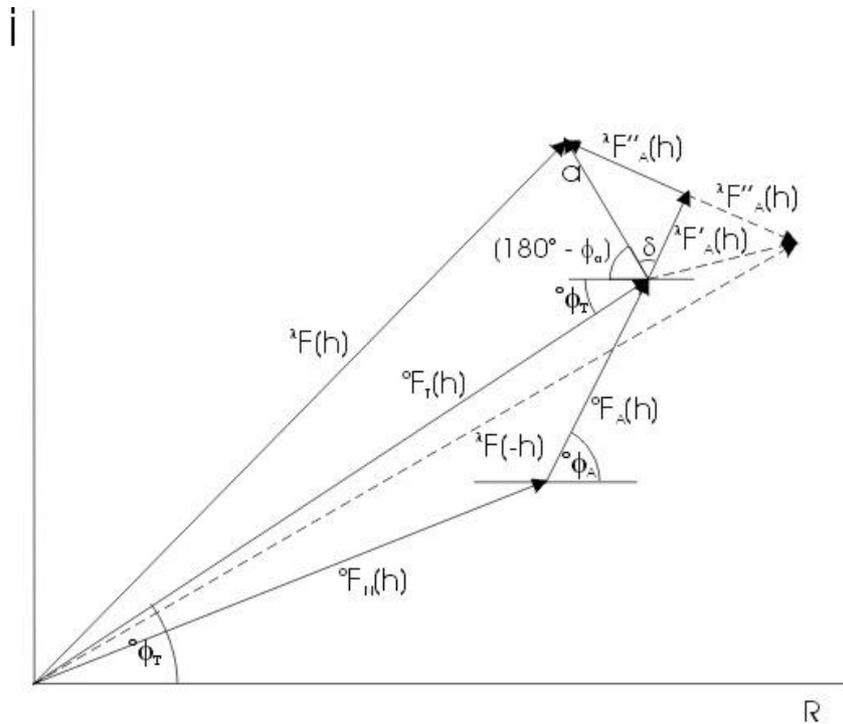


Abbildung14b: Vektordiagramm zur Erklärung des Zusammenbruchs des Friedel'schen Gesetzes im Fall von SAD. $f = f_0 + \Delta f^r + i\Delta f^c$ ${}^{\lambda}F(\mathbf{h}) = {}^{\circ}F_{N}(\mathbf{h}) + {}^{\circ}F_{A}(\mathbf{h}) + {}^{\lambda}F'_{A}(\mathbf{h}) + i{}^{\lambda}F''_{A}(\mathbf{h})$

SAD Phasenberechnung

Es gilt:

$$|{}^{\lambda}F_{+/-}(\mathbf{h})|^2 = |{}^{\circ}F_{T}(\mathbf{h})|^2 + (\Delta f^{c2} + \Delta f^{r2})/f_0^2 |{}^{\circ}F_{A}(\mathbf{h})|^2 + |{}^{\circ}F_{T}(\mathbf{h})|^2 \times |{}^{\circ}F_{A}(\mathbf{h})|^2 \times 2 \Delta f^r/f_0 \times \cos({}^{\circ}\phi_T - {}^{\circ}\phi_A) +/- |{}^{\circ}F_{T}(\mathbf{h})|^2 \times |{}^{\circ}F_{A}(\mathbf{h})|^2 \times 2 \Delta f^c/f_0 \times \sin({}^{\circ}\phi_T - {}^{\circ}\phi_A).$$

Unbekannte Größen sind $|{}^{\circ}F_{T}(\mathbf{h})|$, $|{}^{\circ}F_{A}(\mathbf{h})|$ und $({}^{\circ}\phi_T - {}^{\circ}\phi_A)$, die alle von der Wellenlänge λ unabhängig und für alle Friedelpaare gleich sind mit Ausnahme des Vorzeichens von $({}^{\circ}\phi_T - {}^{\circ}\phi_A)$.

Bestimmung der anomalen Streuer

$${}^{\lambda}F(\mathbf{h}) - {}^{\lambda}F(-\mathbf{h}) \sim 2/k[{}^{\circ}F_{A}(\mathbf{h}) + {}^{\lambda}F'_{A}(\mathbf{h})]\sin(\alpha_{\mathbf{h}} - \alpha_A)$$

$\alpha_{\mathbf{h}}$ - Phasenwinkel von ${}^{\lambda}F(\mathbf{h})$

α_A - Phasenwinkel der anomalen Streuer

$$k = [{}^{\circ}F_{A}(\mathbf{h}) + {}^{\lambda}F'_{A}(\mathbf{h})]/{}^{\lambda}F''_{A}(\mathbf{h})$$

Diese Differenzen werden in Programmen, die direkte Methoden benutzen, verwendet, wie z.B. Shake & Bake (Weeks and Miller, 1999). Die Quadrate der Differenzen können andererseits dazu benutzt werden, eine anomale Differenz-Patterson-Elektronendichte zu berechnen.

Problem der Mehrdeutigkeit der Phasen beim SAD

Es gilt allgemein: $\phi_{\mathbf{h}} = \phi'_{\mathbf{h}} \pm |\Delta\phi_{\mathbf{h}}|$

Das Problem der Mehrdeutigkeit der Phasen kann durch viele verschiedene Methoden umgangen werden. Eine nützliche Methode ist die Sim-Verteilung. Diese liefert die wahrscheinliche Verteilung des Phasenwinkels $\phi_{\mathbf{h}}$, wenn die Phase $\phi_{\mathbf{h},p}$ der bekannten partiellen Struktur gegeben ist, in unserem Fall die der anomalen Streuer.

$$P_{\text{Sim}}(\phi_{\mathbf{h}}) = [2\pi I_o(x)]^{-1} \times \exp[x \cos(\phi_{\mathbf{h}} - \phi_{\mathbf{h},p})] \text{ mit } \phi_{\mathbf{h}} = \phi'_{\mathbf{h}} + \Delta\phi_{\mathbf{h}}$$

Phasenberechnungen können mit dem Programmen SHARP (delaFortelle and Bricogne, 1997) und SOLVE (<http://www.ccp14.ac.uk/solution/macromolecular-software/>) vorgenommen werden.

4.5.5 Strukturlösung

Protoporphyrinogen IX Oxidase

Die Kristallstruktur der Protoporphyrinogen IX Oxidase *Nicotiana tabacum* wurde mittels *Single Wavelength Anomalous Dispersion* (SAD) mit Selenomethionin als anomalem Streuer gelöst. Direkte Methoden im Programm SnB (Weeks and Miller, 1999) ergaben 14 der 18 theoretischen Selen-Positionen. Die Verfeinerung der Schweratomparameter, Phasenberechnung und Solvent Flattening wurden mit SHARP (delaFortelle and Bricogne, 1997) und SOLVE (<http://www.ccp14.ac.uk/solution/macromolecular-software/>) durchgeführt. Die initiale Elektronendichte wurde zweifach gemittelt mit AVE (Jones, 1992).

Umecyanin

Initiale Phasen der Struktur des oxidierten Umecyanin konnten mittels Molekularem Ersatz (*Molecular Replacement*) und dem Programm AMoRe erhalten werden, wobei die Struktur des Stellacyanins aus *Rhus vernicifera* als Suchmodell (*template*) diente.

Lumazinsynthase-W27Y-Mutante

Die Initialen Phasen des Riboflavinkomplexes wie auch der beiden Inhibitorkomplexe mit CEOL und NORAP wurden mittels Differenz Fourier Synthese ausgehend von den Koordinaten der riboflavingebundenen Wildtyp-Struktur aus *S. pombe* (Gerhardt et al., 2002) bestimmt.

4.5.6 Modellbau und Verfeinerung

Nach initialer Rigidbody-Minimierung, wurde die Verfeinerung durch abwechselndes Modellbauen mit dem Programm O (<http://xray.bmc.uu.se/alwyn>) (Jones et al., 1991) und kristallographischer Verfeinerung mit CNS (Brunger et al., 1998) durchgeführt. Die Verfeinerungsprozedur beinhaltete Geometrieverfeinerung („positional refinement“) und Temperaturfaktorverfeinerung („restrained temperature factor refinement“). Als Zielfunktion wurde der freie R-Faktor minimiert, wobei 5 % der Reflexe zufällig ausgewählt und als Test-Set nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden (Brunger, 1992). Schließlich wurden die Wassermoleküle automatisch eingebaut und manuell durch Begutachtung der F_o-F_c Differenzdichte überprüft. Nichtkristallographische Symmetrie (NCS) wurde auf das Modell der Protoporphyrinogen IX Oxidase und alle drei Modelle der Lumazinsynthase-Mutante angewandt. Die Liganden waren in den ersten Verfeinerungszyklen nicht in den Modellen enthalten. Danach konnten die Modelle des Cofaktors FAD und des Inhibitors INH in die klar definierte Elektronendichte der Protoporphyrinogen IX Oxidase eingebaut werden, das Detergenzmolekül Triton-X-100 war ebenso gut definiert in der Elektronendichte mit Ausnahme der fünf letzten Kohlenstoffatome des Alkylrestes. Das Modell ist in der Dichte erst definiert ab Rest 13 und endet mit Rest 497, weiterhin sind zwei Regionen nicht definiert in der Elektronendichte, nämlich Reste 138 bis 147 und Reste 213 bis 223. Vier Loopbereiche sind nicht gut definiert, nämlich Reste 148 bis 149, 224 bis 230, 272 bis 278 und 286 bis 292. Ebenso wie die Liganden der PPO konnten CEOL und NORAP leicht in die klar definierte Elektronendichte der Lumazinsynthasemutante eingebaut werden im Gegensatz zum Riboflavin, das nur wenig Elektronendichte aufwies. Auch Rest 159 und die N-terminalen Reste 1-12 konnten aufgrund von Unordnung in der Elektronendichte nicht bestimmt werden. Dahingegen waren im Modell des Umecyanin alle Reste bis auf die letzten beiden Glycine des rekombinanten Proteins definiert. Das Kupferatom befand sich an derselben Stelle wie im Stellacyanin-Suchmodell. Die stereochemischen Parameter der Strukturen wurden mit PROCHECK (Laskowski et al., 1993) bestimmt. Sekundärstrukturelemente wurden mit den Programmen STRIDE (Frishman and Argos, 1995) und MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) automatisch zugeordnet, visuell überprüft und angepaßt. Die Abbildungen wurden mit MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), BOBSCRIPT (Esnouf, 1997) und RASTER3D (Merritt and Murphy, 1994) gemacht.

4.5.7 Molecular Modelling mit Substrat- und Produktbau

Das Molecular Modelling wurde mit den Modulen Viewer, Builder und Discover3 des Programms Insight II (Version 98.0; Molecular Dimensions Ltd, Los Angeles, 1998) durchgeführt. Die Röntgenstruktur der PPO2 wurde als Ausgangspunkt für das Modelling und die Energieminimierung der modellierten Komplexe gewählt. Die Protoporphyrinogen IX und Protoporphyrin IX Moleküle wurden mit dem Modul builder erzeugt. Die enge Substrat/Produkt-Bindetasche mit ihrem hydrophoben hinteren Teil erlaubt die Insertion des Substrat/Produkt-Moleküls nur so, dass sich die Vinylgruppen des Moleküls am hinteren Teil der Tasche befinden und die Methylenbrücke von Atom C₂₀ nahe dem N₅-Atom des FAD-Cofaktors zu liegen kommt. Die Propionatgruppe des Rings C kann eine Salzbrücke mit dem streng konservierten Rest Arg98 ausbilden. Das "Consistent Valence Forcefield" (CVFF) des Programms Insight II wurde für Energieminimierungen mit Discover3 benutzt, das über 1000 Schritte bis zur Konvergenz benötigte (0.1 kcal/mol Toleranz). Die Protein-Ligand-Komplexe wurden simultan minimiert. Der Enzym-Produkt-Komplex wurde zunächst zu einer Gesamtenergie von 1247 kcal/mol minimiert. Dieser minimierte Komplex diente als Ausgangspunkt für die Energieminimierung des Enzym-Substrat-Komplexes. Die produktgebundene Struktur wurde vor der Minimierung der Substrat-gebundenen so geändert, dass sie mit der Substrat-gebundenen übereinstimmte, was eine Gesamtenergie von 764 kcal/mol ergab. Die positiven Gesamtenergiewerte ergaben sich aufgrund der hohen abstossenden van der Waals Energietermine, die durch die enge Substrat/Produkt-Bindetasche der PPO2 verursacht wurden.

4.5.8 Graphische Darstellungen und Sequenzvergleiche

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme BOBSCRIPT (Esnouf, 1997), MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und Raster3D (Merritt and Murphy, 1994) benutzt. Moleküloberflächen wurden mit dem Programm GRASP (Nicholls et al., 1993) berechnet und dargestellt. Zur graphischen Darstellung von Sequenzvergleichen wurde das Programm ALSRIPT (Barton, 1993) verwendet. Zur Nachbearbeitung von Bildern, sowie zu deren Konvertierung kamen die Programme PHOTOSHOP (Adobe Systems Inc., USA), XV (J. Bradley, Pennsylvania, USA) und CorelDRAW (Corel Corporation Limited, 1998) zur Anwendung.

5. Ergebnisse

5.1 Strukturlösung der mitochondrialen Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO2) aus *Nicotiana tabacum*

5.1.1 Klonierung, Expression, Reinigung, Kristallisation und Transformation von PPO2 aus *Nicotiana tabacum*

Aus einer *Nicotiana tabacum* cDNA-Genbank (Bayer AG, Monheim) wurde die mitochondriale PPO (PPXIINT, PPO2NT bzw. PPO2NT-K224Q) kloniert, exprimiert und in seiner dimeren Form mittels dreier Reinigungsschritte (Ni-NTA-Affinitätschromatographie, Gelpermeationschromatographie und Anionenaustauschchromatographie) gereinigt (Abb.15).

Die finale Ausbeute an für die Kristallisation ausreichend gereinigtem Protein betrug etwa 3 mg je Liter Expressionskultur.

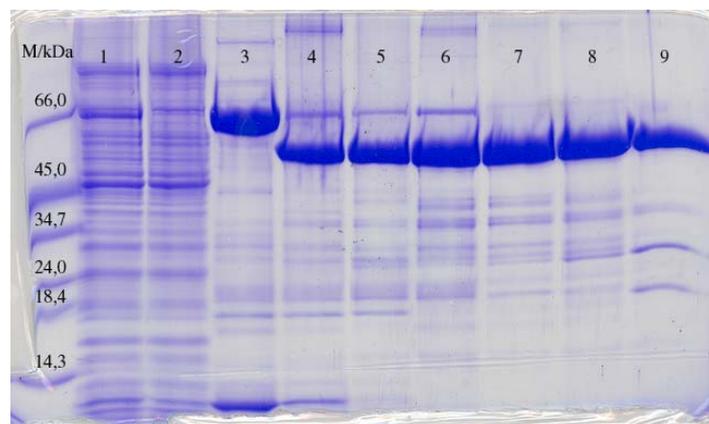


Abbildung15: SDS-PAGE einer Reinigung von PPO2NT-K224Q-SeaMet. Aufgetragen sind von links nach rechts **1** Rohextrakt, **2** Durchfluss durch die Ni-NTA, **3** vereinigte Fraktionen der Ni-NTA, **4** Thrombin-Verdau über Nacht, **5** konzentrierter Thrombin-Verdau, **6** Protein nach Gelfiltration, **7** ResourceQ Lauf a, **8** ResourceQ Lauf b, **9** Probe von PPO2NT nach Thrombin-Verdau und Reinigung. Deutlich zu erkennen sind die beiden Spaltprodukte der PPO2NT nach Thrombin-Verdau (Bande 9) von ca. 30 und 25 kDa Größe. Durch die Mutation des Lysin224 zu Glutamin kann das Protein nicht mehr von Thrombin geschnitten werden, daher fehlen im Thrombin-verdauten PPO2NT-K224Q diese beiden Banden.

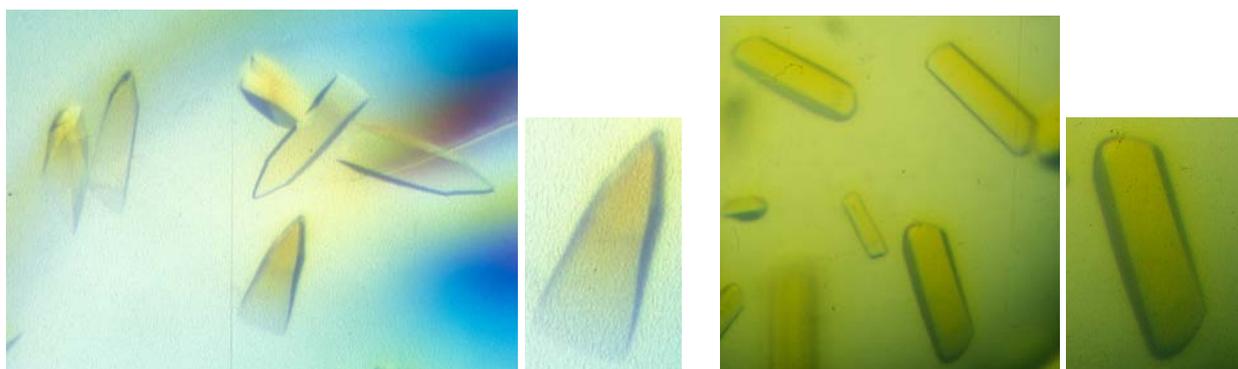


Abbildung16: gelbe Kristalle der PPO2NT-K224Q, rechts mit SeMet angezogen.

Rekombinante PPO2NT wurde in CrysChem-Platten im sitzenden Tropfen kristallisiert. Dazu wurden 4 μl Proteinlösung mit einer Konzentration von 15 mgml^{-1} mit 4 μl Präzipitanslösung (0,1 M Natrium-Citrat, pH=4,0; 10 % PEG 1000; 0,2 M NaCl) gemischt und bei 20 °C gegen 400 μl Mutterlauge äquilibriert. Stabförmige Kristalle mit einer rhombischen Grundfläche (Durchmesser etwa 50-100 μm) bildeten sich innerhalb von ein bis zwei Tagen und erreichten nach etwa einer Woche eine maximale Länge von etwa 150 μm .

Die Kristalle gehörten der Raumgruppe $C222_1$ an ($a = 119.090 \text{ \AA}$, $b = 147.250 \text{ \AA}$, $c = 127.040 \text{ \AA}$), mit zwei PPO2NT-Molekülen in der asymmetrischen Einheit. Die Kristalle zeigten nur Reflexe bis zu einer maximalen Auflösung von 8 \AA , nach Transformation mit einem Free-mounting System (Kiefersauer et al., 2000) (Proteros biostructures GmbH, Martinsried) streuten sie in Synchrotronstrahlung bis zu 2.9 \AA . Ein komplettes *Single Wavelength Anomalous Diffraction* (SAD) Experiment wurde mit den SeMet-Kristallen an der Beamline ID29 am European Radiation Synchrotron Facility (ESRF) durchgeführt.

Transformation der Kristalle

In der Kapillare streuten die Kristalle nur bis zu maximal 6 \AA . In verschiedenen und breit variierten Cryobedingungen war die Auflösungsgrenze 8 \AA . Auf dem Free-mounting System (Kiefersauer et al., 2000) bei der den Kristallen eigenen Startfeuchte von 91,0 % relativer Feuchte (r.F.) streuten die Kristalle bis zu 3.6 \AA . Es war aber noch nicht möglich, diese Streuqualität beim Frieren zu erhalten. Erst das kontrollierte Trocknen der Kristalle auf 88,0 % r.F. konnte die Kristallqualität beim Frieren erhalten. Die maximale Auflösung blieb die gleiche, die Intensität nahm nur etwas ab (Abb.17) (<http://www.kenes.com/iucr/program/abstracts/1735.doc>).

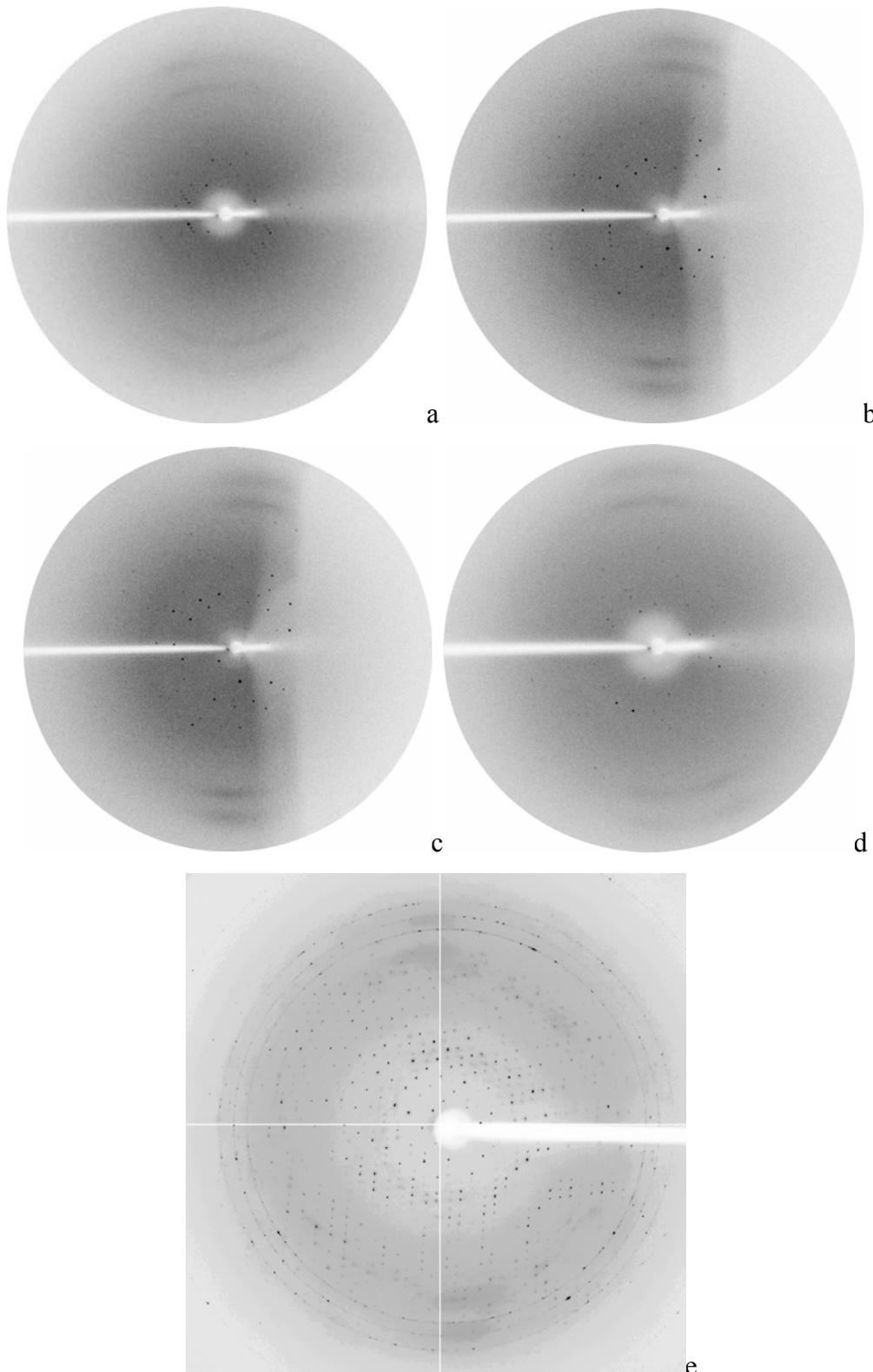


Abbildung 17: Sequenz der Streubilder von PPO2NT im Verlauf der Transformation: **a** Gefrieren der Kristalls im Cryostrahl der Röntgenmaschine ohne Cryoprotectans oder umgebende Flüssigkeit führt zu einer schwachen Beugung bis zu 8 Å. **b** nativer Kristall montiert auf dem Free-mounting System bei einer Startfeuchte von 91,0% r.F. zeigt Reflexe bis zu 3,6 Å. **c** Kristall montiert bei 88,0 % r.F. streut so gut wie in Startfeuchte (3,6 Å). **d** Kristall behandelt wie in c, gefroren im Cryostrom der Röntgenmaschine durch Herausnahme aus dem Free-mounting Gerät, behält seine Auflösung mit nur geringem Verlust an Intensität (3,6 Å), **e** derselbe Kristall wie in e streut bis zu 2,9 Å in Synchrotronstrahlung.

5.1.2 Phasierung, Modellbau und Verfeinerung

Zur Strukturlösung wurde die Methode der *Single Anomalous Dispersion* (SAD) mit Selen als anomalem Streuer benutzt. Das Selenomethionin enthaltende Protein kristallisierte unter der gleichen Bedingung wie das substituierte Enzym, auch die Größe der Kristalle war vergleichbar. Mit Hilfe direkter Methoden (Programm *Shake'n'Bake*) konnten in dem anomalen Selen-Datensatz an der Selen-Kante (peak) gemessen bei 0,9790 Å (Abb.18) von PPO2NT 14 Selen-Positionen gefunden werden, die über eine zweizählige Achse ineinander überführbar waren, d.h. jeweils sieben Selenatome gehörten einem Monomer der asymmetrischen Einheit (Abb.19) an. Die aus der Phasierung mit diesen 14 Selen-Lagen resultierende Elektronendichte-Verteilung wurde mittels zweifacher Dichtemittelung und des *solvent-flattening*s so weit verbessert, dass manuell mit Hilfe des Programms O (Jones et al., 1991) ein zu ca. 90 % komplettes Poly-Alanin-Modell mit einigen Seitenketten gebaut werden konnte. Dieses initiale Modell wurde in mehreren Zyklen von Verfeinerung und manuellem Überbauen erweitert und verbessert (Abb.20) und enthält final in beiden kristallographisch unabhängigen Molekülen jeweils die Aminosäuren 13-137, 148-212 und 224 bis 497. Eine Übersicht über die kristallographischen Statistiken gibt Tabelle2.

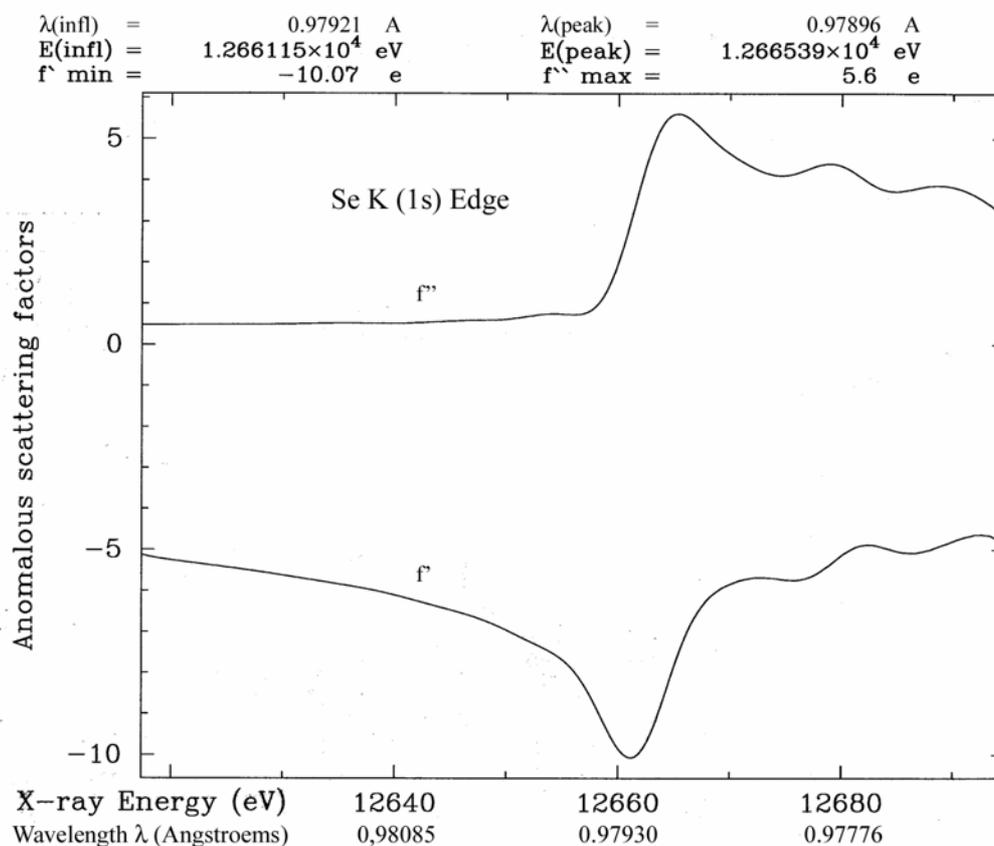


Abbildung18: Fluoreszenzscan der PPO2NT-K224Q-SeMet-Kristalle im Bereich der Selenabsorptionskante. Aufgetragen sind f'' und f' in Abhängigkeit von der Wellenlänge bzw. Energie.

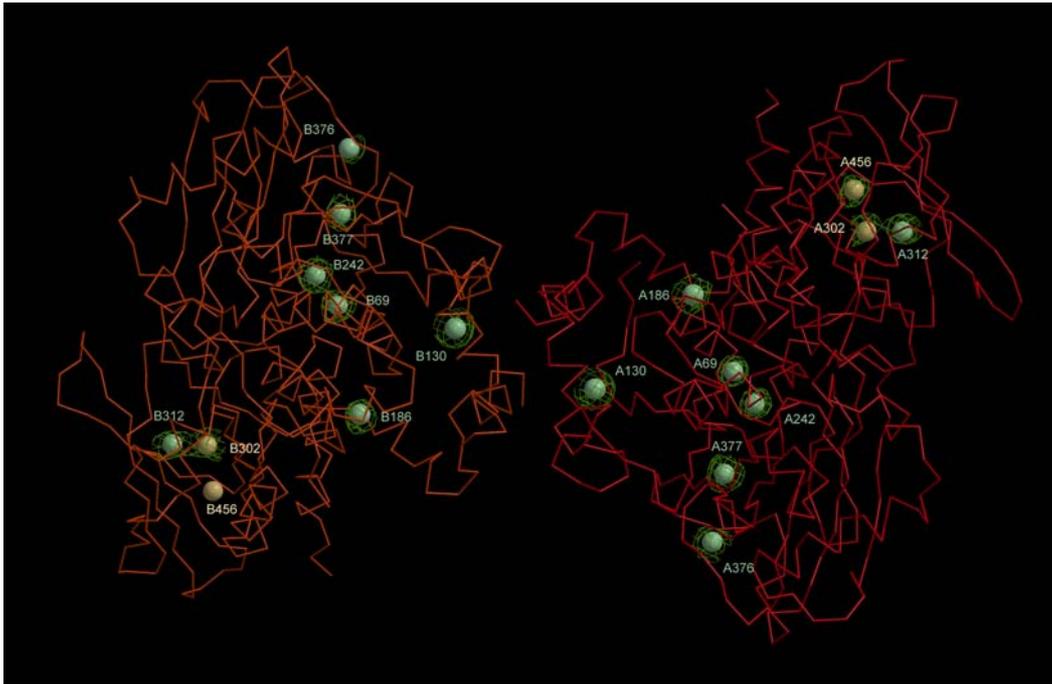


Abbildung 19: Lagen der 18 Selenatome in der asymmetrischen Einheit der PPO2NT, die 14 zum Phasieren benutzten sind als grüne Kugeln, die anderen vier als gelbe Kugeln dargestellt. Alle Selenatome sind mit ihrer zugehörigen initialen Elektronendichte in hellgrün umgeben bei 2,9 Å Auflösung. In der Mitte des Bildes befindet sich die zweizählige Achse senkrecht zur Papierebene. Das Monomer A ist in rot, B in orange als C_{α} -trace dargestellt.

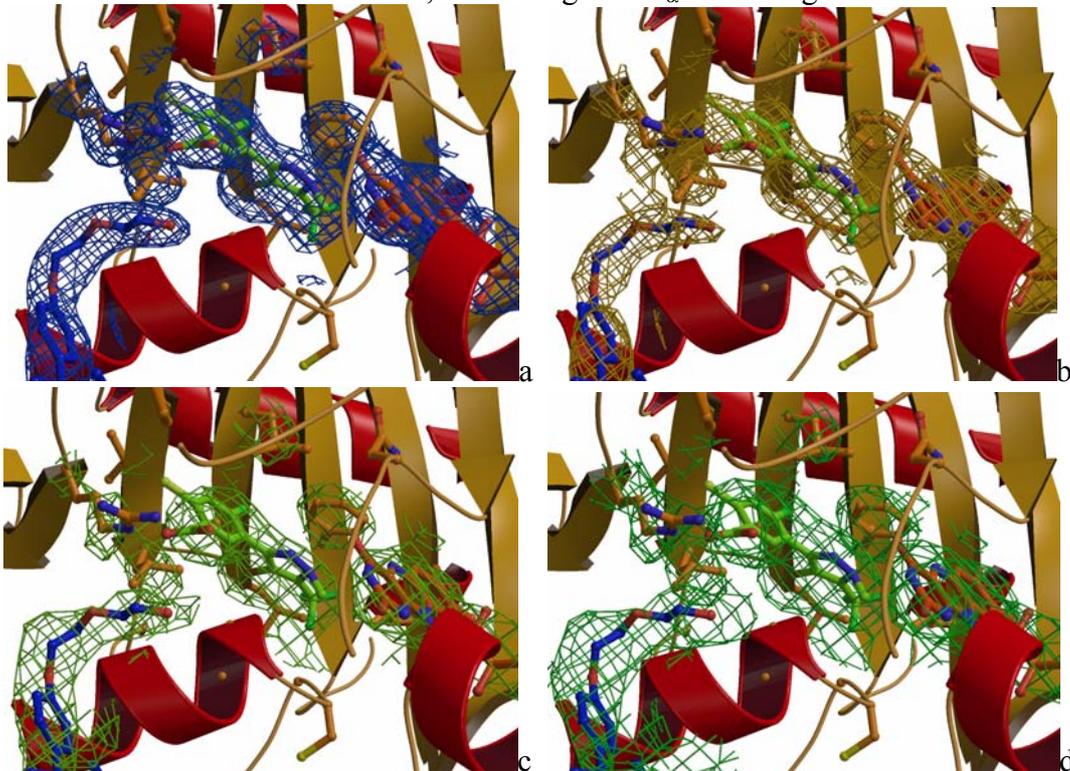


Abbildung 20: Substratbindetasche der PPO2NT mit Inhibitor INH (grün), FAD (orange), Triton-X-100 (blau) und umgebenden Resten Arg98, Leu 356, Leu372 und Phe392 umgeben von **a** der fertig verfeinerten ($2F_o - F_c$)-Elektronendichte in stahlblau, **b** der composite omit Elektronendichte in gold **c** der initialen Elektronendichte in grün und **d** der gemittelten initialen Elektronendichte in dunkelgrün konturiert auf 1.0σ bei 2,9 Å Auflösung. In der Mitte des Bildes befindet sich die zweizählige Achse senkrecht zur Papierebene.

Tabelle2: Datensammlung, Phasierung und Verfeinerungsstatistiken ¹

Datensatz	PPO2NT SeMet (peak)
Datensammlung	
Auflösung [\AA] ²	20 – 2.9 (3.0 – 2.9)
Einheitszelle [\AA]	119.09 / 147.25 / 127.04
Wellenlänge [\AA]	0.9790
I/ σ (I)	11.6 (2.8)
Volständigkeit der Daten [%]	99.3 (100.0)
Multiplizität	3.8 (3.8)
R _{merge} [%] ³	7.9 (52.8)
Phasierung	
Anomale Streuer	14 Se
Phasing power ano ⁴	1.13
R _{culis} ano ⁵	0.79
Figure of merit	0.51
Modellverfeinerung	
Auflösung [\AA]	20 - 2.9
Anzahl der Reflektionen für R _{cryst} / R _{free}	23,234 / 1,187
Anzahl der Proteinatome / Ligandenatome / Solvensmoleküle	6,962 / 192 / 143
Mittlere Temperaturfaktoren (Protein / Liganden / Solvens)	67.7 / 60.7 / 57.2
Rmsd (Bindungslängen [\AA] / Winkel [$^\circ$] / bonded Bs [\AA^2]) ⁶	0.008 / 1.3 / 1.5
Ramachandran-Plot most favoured / disallowed [%]	82.6 / 0.0
R-faktoren: R _{cryst} / R _{free} [%] ⁷	22.7 / 29.3

¹ Alle Werte beziehen sich auf anomale Streuung. Die Diffractionsdaten wurden mit dem Programm XDS (Kabsch, 1993) prozessiert und skaliert. Die Verfeinerung der Schweratomparameter, Phasenberechnung und solvent flattening wurden mit SnB (Weeks and Miller, 1999), SHARP (delaFortelle and Bricogne, 1997) und SOLVE ausgeführt (<http://www.ccp14.ac.uk/solution/macromolecular-software/>). Die Stereochemie des Modells wurde mit PROCHECK überprüft (Laskowski et al., 1993).

² Die Daten der letzten Auflösungsschale sind in Klammern angegeben.

³ $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(\text{hkl})}$.

⁴ "Phasing power" ist der Mittelwert der Schweratom-Derivat Strukturfaktor-Amplitude abgeleitet vom "residual lack of closure error".

⁵ $R_{\text{culis}} = \frac{\sum \text{hkl} | |F_{\text{ph}}| - |F_{\text{p}}| - F_{\text{h,calc}} |}{\sum \text{hkl} | F_{\text{ph}} - F_{\text{p}} |}$.

⁶ Root mean square Abweichungen (rmsd) der Temperaturfaktoren der gebundenen Atome.

⁷ $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum \text{hkl} | |F_{\text{obs}}(\text{hkl})| - k |F_{\text{calc}}(\text{hkl})| |}{\sum \text{hkl} |F_{\text{obs}}(\text{hkl})|}$ für die Reflektionen des Arbeitssatzes; R_{free} ist der R-Wert für 5% of der Reflektionen, die von der Verfeinerung ausgenommen sind.

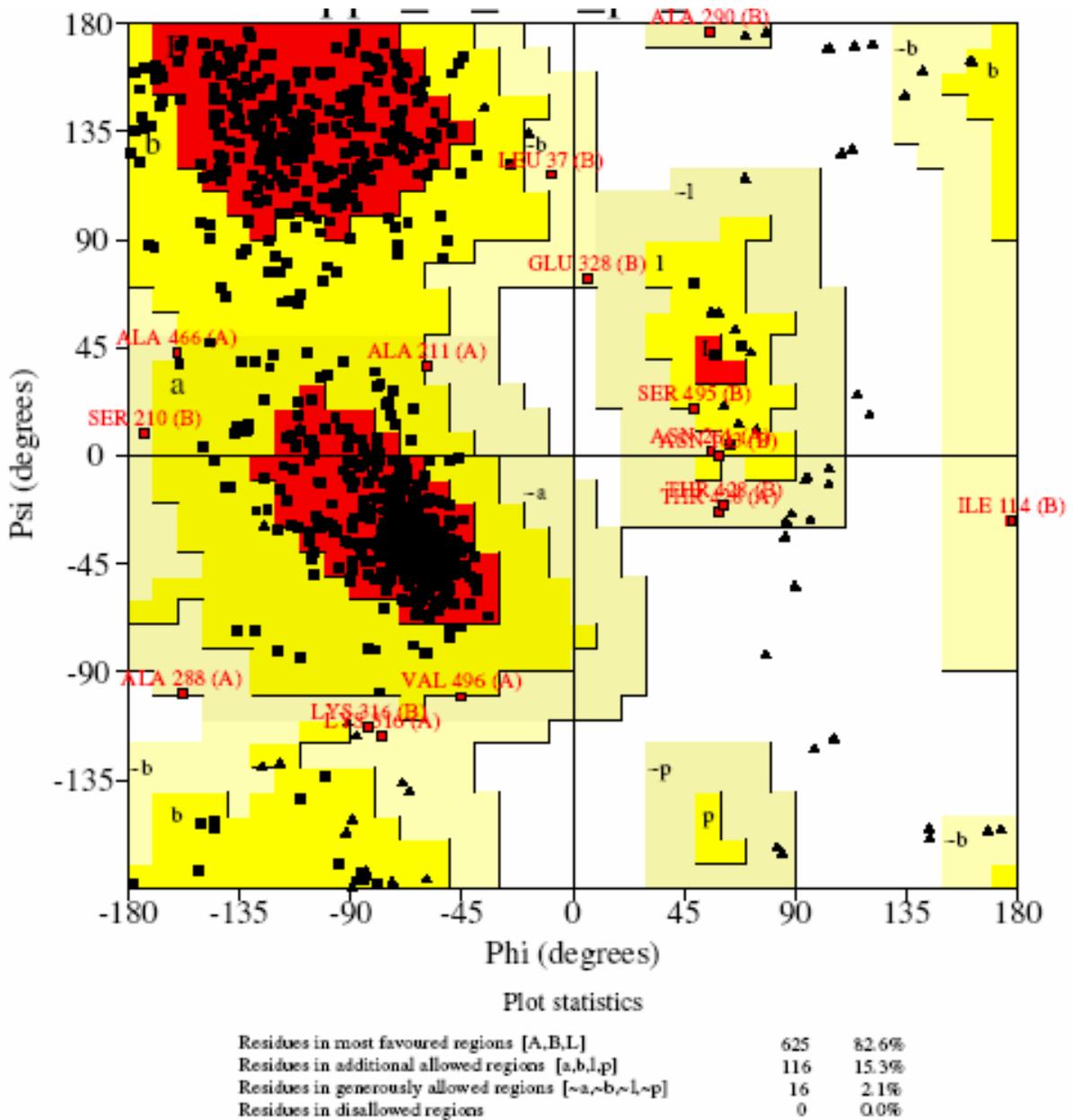


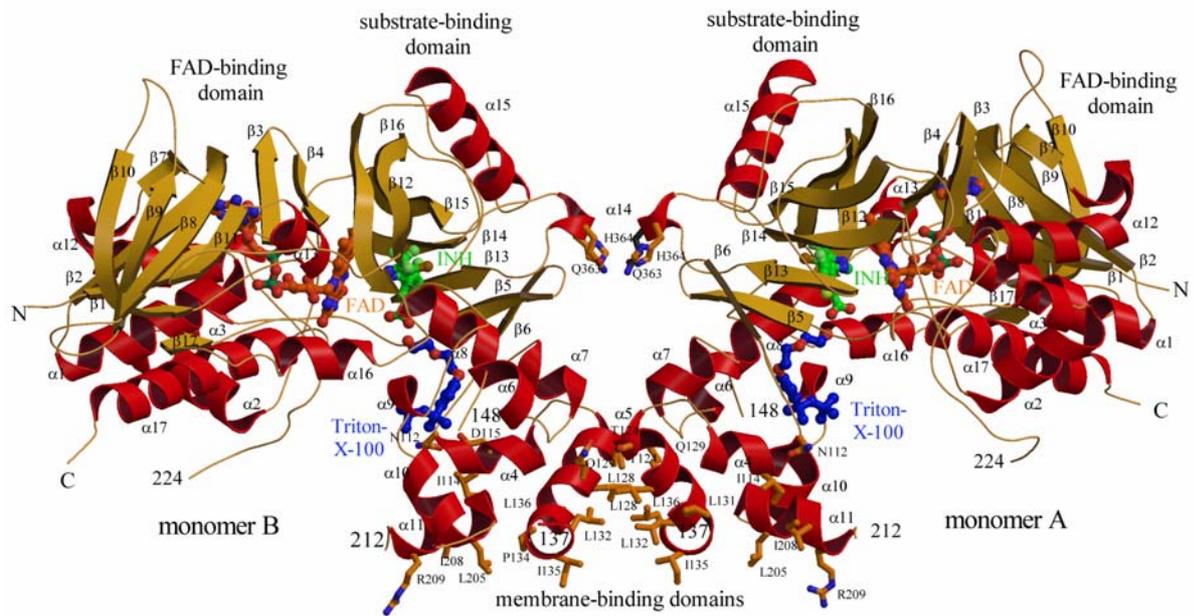
Abbildung 21: Ramachandran-Plot der finalen Verfeinerung der PPO2NT. Rot hinterlegt sind die bevorzugt erlaubten, intensiv gelb die zusätzlich erlaubten, grau-gelb die großzügig erlaubten und weiß die nicht erlaubten Bereiche. Reste außer Prolin und Glycin sind als Quadrate, Proline als Dreiecke dargestellt. Bezeichnungen der Reste außer Prolin und Glycin in den großzügig erlaubten Bereichen sind in rot gehalten.

5.1.3 Überblick über die Struktur

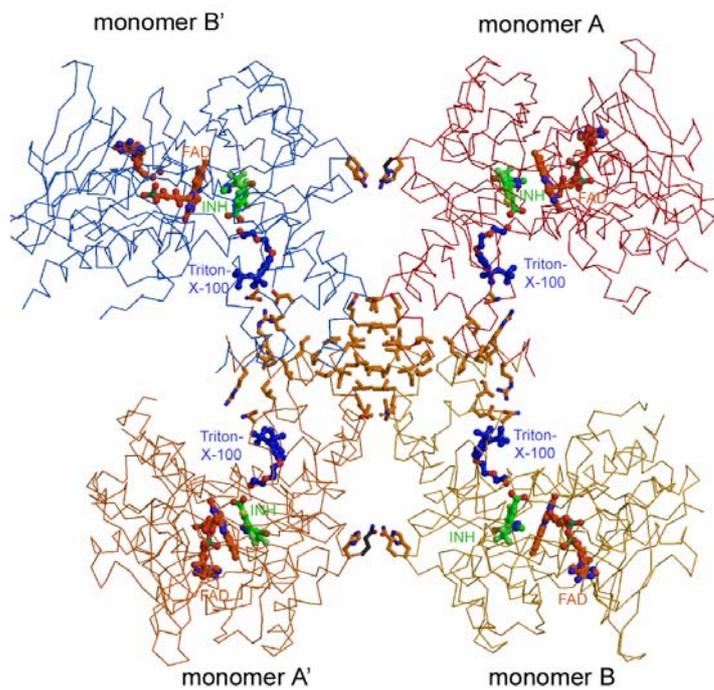
Die 503 Aminosäuren der PPO2NT falten zu einer kompakten Struktur (Abb.22a) in drei Domänen, eine FAD-Bindedomäne und eine Substrat-Bindedomäne, die eine der p-Hydroxybenzoathydrolyase (PHBH)-Faltung ähnliche Topologie zeigen (Abb.41a), und eine membranbindende Domäne (Abb.23). Die Teile der Struktur, die für die FAD-Bindung verantwortlich sind, zeigen deutliche Sequenz- und Strukturhomologien zu anderen Flavoenzymen (Ghisla and Massey, 1989).

Die PPO2NT ist fest an die innere Mitochondrienmembran gebunden. Die Solubilisierung und die Kristallisation des rekombinanten Proteins ist nur nach Detergenzextraktion mit Triton-X-100 möglich. Es wird angenommen, dass die Domäne, die die acht Helices α_{4-11} mit den konservierten Sequenzregionen von Rest 112 bis 136 und von 150 bis 213 (Abb.23 und 24a-c) umfasst, den Membrananker darstellt und monotopisch in die Membran inseriert ist ähnlich den monotopen Membranproteinen Squalen-Hopen-Zyklase (Wendt et al., 1999) und der Prostaglandin-H2 Synthase (Loll et al., 1995). In der PPO2 bilden die Helices α_4 , α_5 und α_{11} die Basis dieser Domäne mit vorwiegend apolaren Resten, die in den Lipidteil der Membranen zeigen. Die Wand der zylindrischen angenommenen Membranbindedomäne wird flankiert von negativen und positiven Resten, die mit den positiv und negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide der mitochondrialen Membran wechselwirken können.

Im Kristall der PPO2 bilden die angenommenen Membranbinde-Domänen von vier Protomeren Kontakte. Zwei Kontakte sind jeweils 800 \AA^2 der zugänglichen Oberfläche und die beiden weiteren senkrecht zu diesen stehenden Kontakte jeweils 400 \AA^2 . Es wird angenommen, dass die kleinere Kontaktfläche dem natürlichen PPO2-Dimer entspricht, möglicherweise weiter stabilisiert durch die Phospholipide der umgebenden Membran in vivo. Im dimeren Arrangement der PPO2 liegen die Zugänge der Höhlungen der aktiven Zentren auf der Außenseite des Dimers nahe der Membran, was zu zwei unabhängigen aktiven Zentren führt. Die Dimer-Kontaktfläche wird von den Helices α_{14} und α_5 gebildet, den Hauptanteil stellen Leucinreste von Helix α_5 , die mit den entsprechenden Leucinresten des zweiten Dimers interagieren. Trotz hoher struktureller Homologie mit der MAO B (Binda et al., 2002), findet die Dimerisierung an völlig anderen Teilen der Oberfläche statt. Es ist nicht geklärt, ob die PPO2 als Monomer oder als Dimer in die Membran eintaucht. Strukturell sind beide Möglichkeiten denkbar.



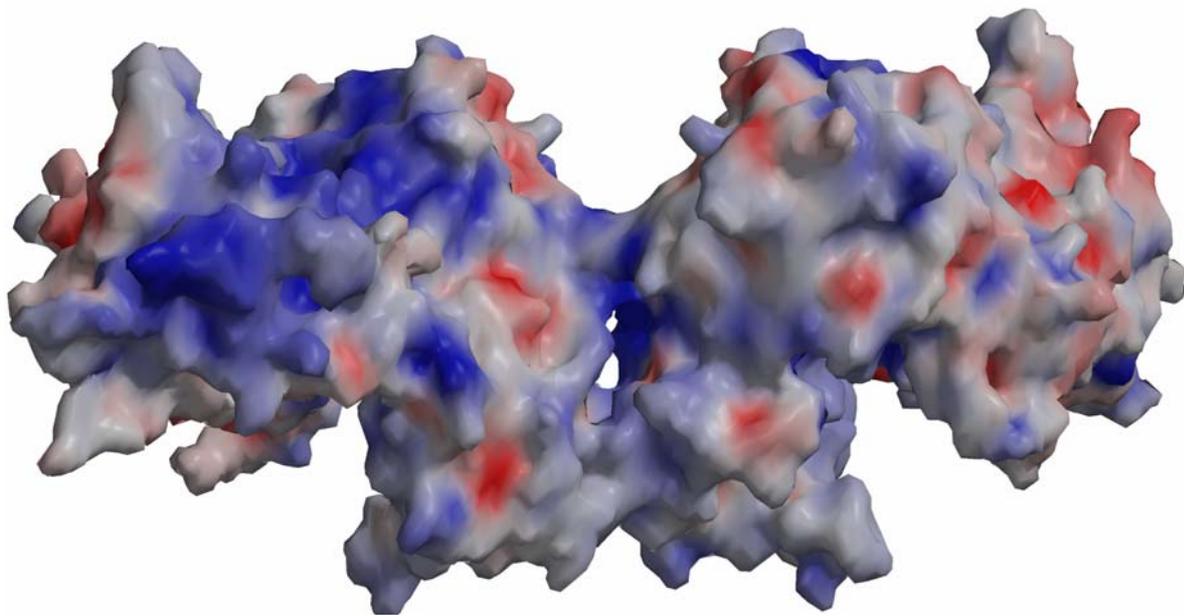
a



b

Abbildung 22: Struktur und Sequenz der mitochondrialen PPO aus *Nicotiana tabacum*

a Dimere Struktur der Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO) aus *N. tabacum*. Das Monomer besteht aus drei Domänen: einer FAD-bindenden, einer Substrat-bindenden und einer Membran-bindenden Domäne. Der Inhibitor 4-Bromo-3-(5'-carboxy-4'-chloro-2'-fluorophenyl)-1-methyl-5-trifluoromethyl-pyrazol (INH, grün) bindet in das aktive Zentrum nahe dem FAD-cofaktor (rot-orange). Der Produktkanal in der Membran-bindenden Domäne beginnt an dem gebundenen Triton-X-100 Detergenzmolekül. Zusätzlich sind die Reste gezeigt, die Kristallkontakte ausführen. **b** Tetramer, wie es im Kristall erscheint, A und B bilden die asymmetrische Einheit und A und B' das physiologische Dimer.



c

Abbildung22:c Potentialoberfläche der PPO2NT, positive geladene Teile sind blau, negativ geladene rot dargestellt.

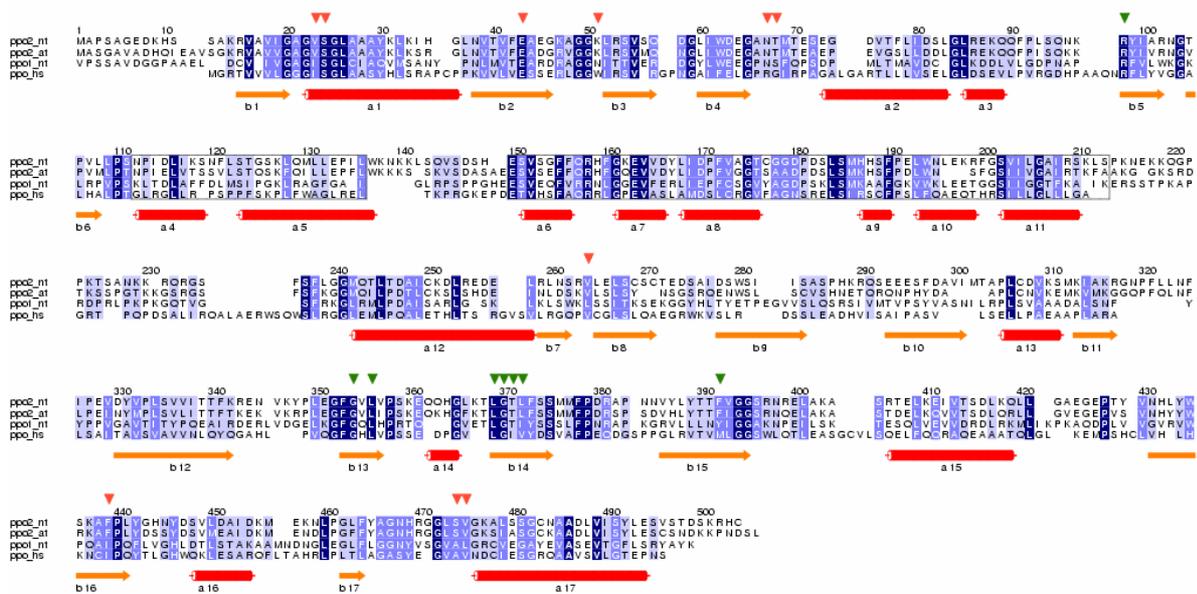
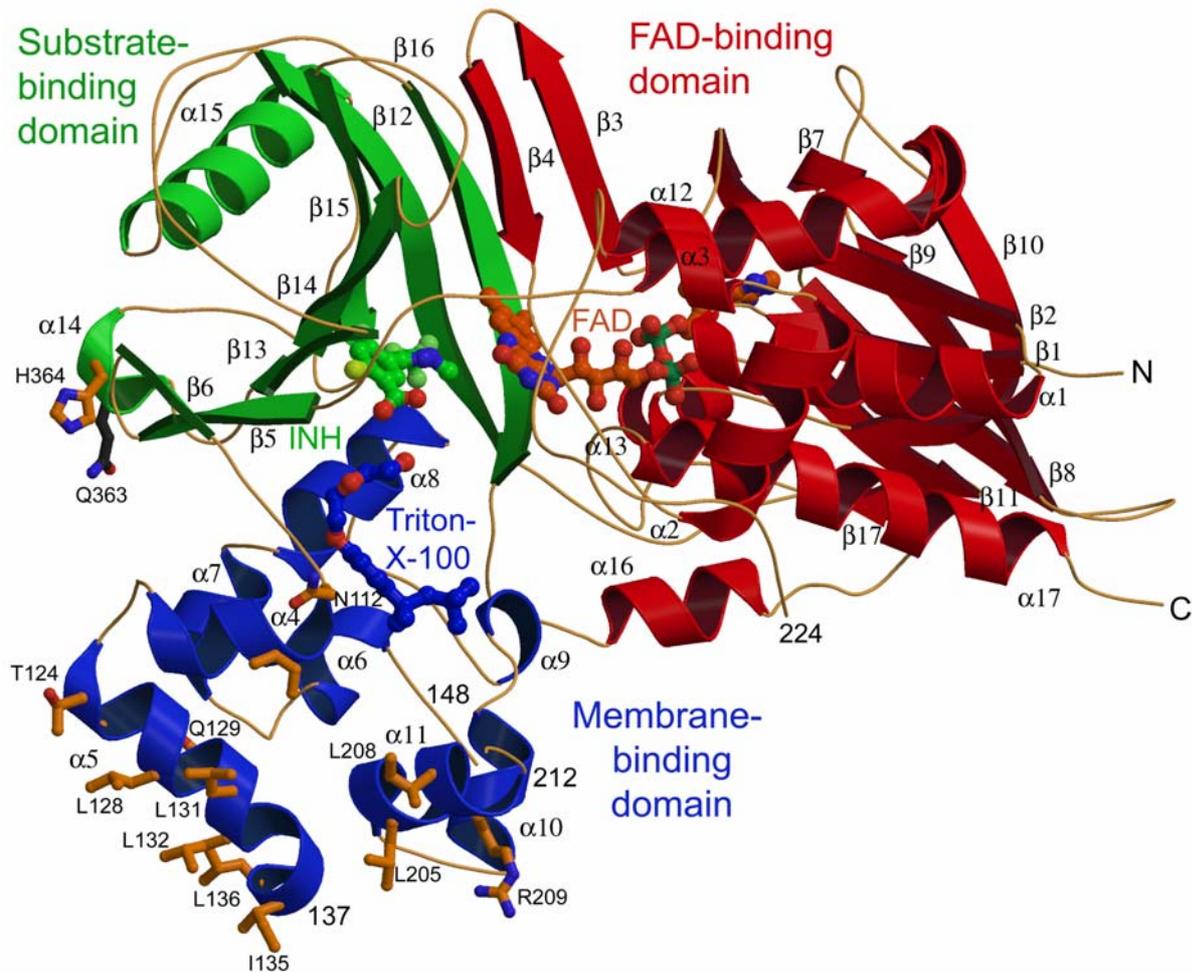
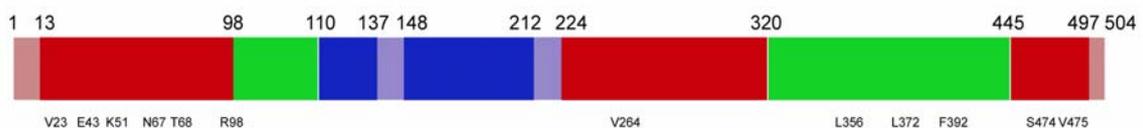


Abbildung23: Multiples Aminosäure-Sequenzalignment eukaryotischer PPOs: mitochondriale PPO2 aus *N. tabacum* (NT, Tabak) und *Arabidopsis thaliana* (AT, Ackerschmalwand), chloroplastische PPO1 aus *N. tabacum* und humane mitochondriale PPO (HS). Rote Pfeile markieren Reste, die mit dem Cofaktor FAD Kontakt haben und grüne Pfeile sind Reste, die den Inhibitor binden. Die hoch konservierten membran-bindenden Reste 112 bis 136 und 150 bis 213 sind von zwei schwarzen Rechtecken umgeben. Unterhalb sind die Sekundärstrukturellemente (SSE) der PPO in rot und gelb-orange gezeigt.



b



c

Abbildung24: Die drei Domänen der PPO. **a** Topologie-Diagramm der Protoporphyrinogen IX Oxidase aus *N. tabacum* (PPO2NT). Die FAD-Bindende Domäne ist in rot dargestellt, Regionen, die den Cofaktor FAD binden, sind in hellgrau unterlegt, die Substrat-bindende Domäne ist grün, die Bindung des Inhibitors INH in mittelgrau und die membran-bindende Domäne (mit dem Produktkanal) ist in blau dargestellt. Die Helices α_5 und α_{14} bilden die Dimer-Kontaktfläche. α -Helices sind als Zylinder und β -Stränge als Pfeile symbolisiert. **b** Domänenstruktur der PPO2NT. Die Domänen und Liganden sind in denselben Farben dargestellt wie in a. **c** Verteilung der PPO-Domänen über die Aminosäuresequenz von PPO2NT. Über der Farbdarstellung der Domänen sind die Reste als Nummern geschrieben. Die Farben der Domänen sind die gleichen wie in a, hellere Farbtöne kennzeichnen die Teile der Sequenz, die in der Struktur nicht sichtbar sind. Unterhalb der Farbdarstellung befinden sich wichtige koordinierende Reste im Einbuchstabencode mit Sequenznummer.

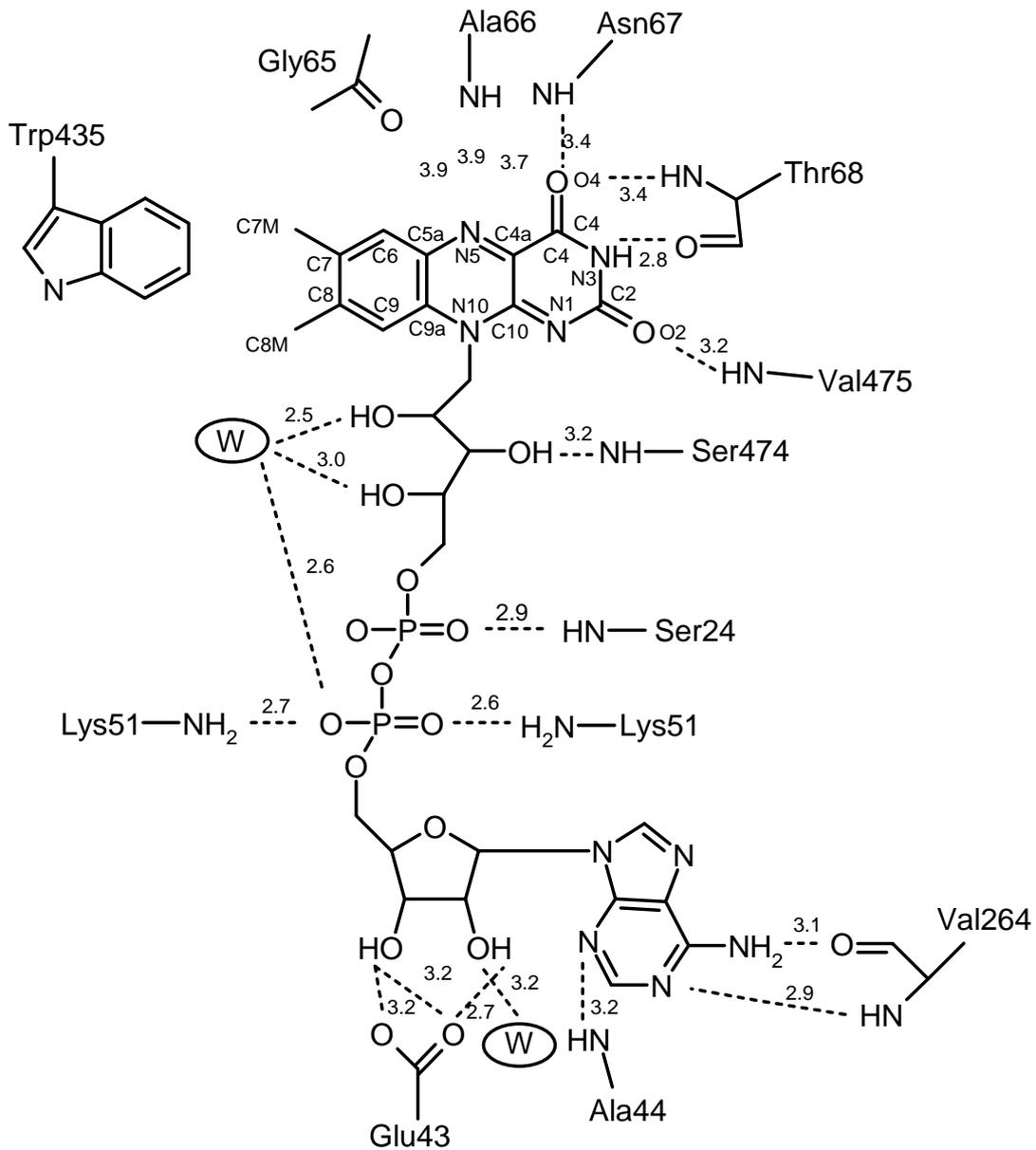


Abbildung25: Die Koordination des FAD-Cofaktors in PPO2NT ähnelt der in Polyamin Oxidase (Binda et al., 1999) (PAO) mit der Ausnahme eines Wassermoleküls, das in der PAO an das N₅-Atom des Isoalloxazinteils des FAD bindet. Dieses Wassermolekül ist evtl. für die Hydrolyse des PAO-Produktes verantwortlich, diese tritt in der PPO-Reaktion nicht auf.

5.1.4 Komplex mit der Ferrochelatase

Die Membranbindedomäne beinhaltet einen U-förmigen Kanal, der auf einer Seite offen ist, der vom aktiven Zentrum in die Membrandoppelschicht führt. Es wird vorgeschlagen, dass durch diesen Kanal Protoporphyrin IX zu der dimeren Ferrochelatase (Fc) transportiert wird (Abb.26a). Fc soll monotopisch als Dimer in die Membran eingebunden sein mit einem Arrangement, das in der Kristallstruktur der menschlichen Ferrochelatase (HFc) zu sehen ist (Wu et al., 2001). In unserem Modell des heterodimeren Komplexes von PPO2 und HFc-Dimeren wurden die beiden zweizähligen Achsen aufeinandergelegt und die Komponenten rotiert und die Protomere bewegt bis zur besten Anpassung (Abb.26c). Die Reste, die die Kontaktfläche bilden, passen sehr gut aufeinander, die Reste 195 bis 212 (α_{10} und α_{11}) der PPO2 wechselwirken mit den Resten 99 bis 122 der HFc (große Lippe, Helix von 104 bis 122) und Reste 131 bis 137 (α_5 , PPO2) mit den Resten 304 bis 310 (kleiner Lippen-Loop, HFc) (Wu et al., 2001). Interessanterweise sind die Kontaktflächenreste der PPO identisch mit denjenigen, die den 800 Å Kristallkontakt herstellen, der oben beschrieben ist (Abb.26a). Die Dimensionen der beiden kanalbildenden Teile und die zweifachen Achsen in beiden Enzymen passen gut zusammen, mit Ausnahme der Reste 209 bis 213 der PPO, deren Konformation vermutlich durch die Kristallpackung beeinflusst ist (Abb.26b). Der hydrophobe Teil der PPO berührt die kleineren Lippen der HFc und der Rand der Membranbindedomäne (Abb.25a) der PPO passt zwischen die größeren Lippen der HFc (Abb.26c).

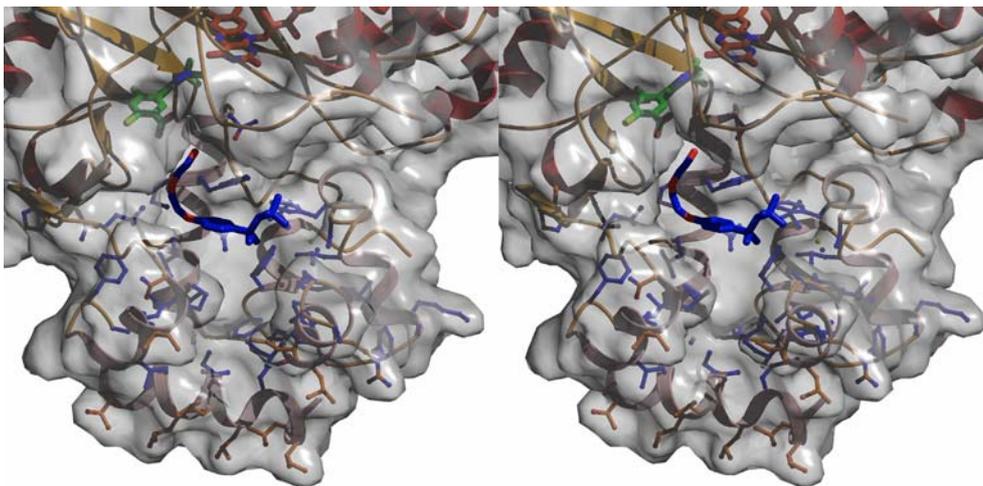
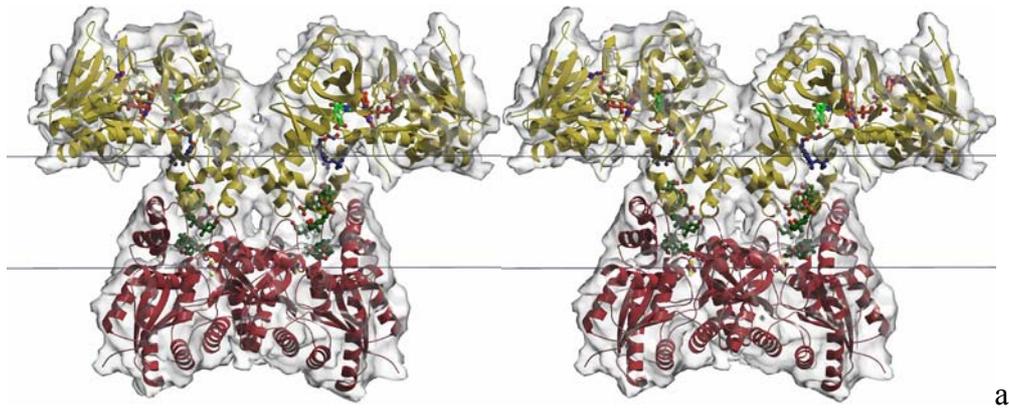
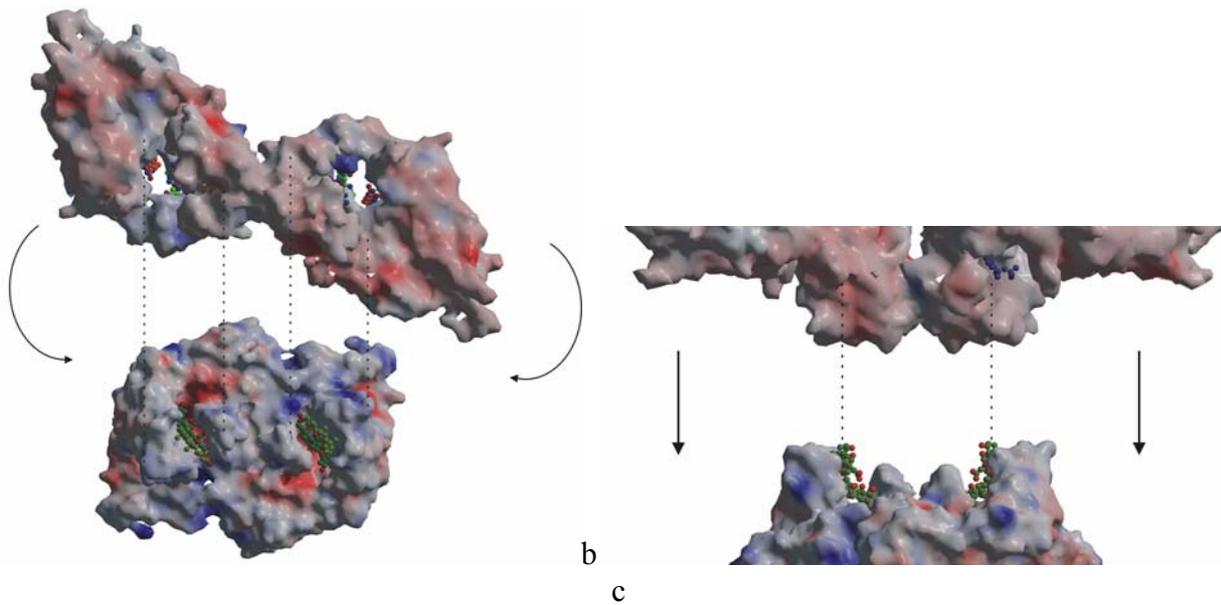


Abbildung25a: Membranbindedomäne der PPO Stereo-Ansicht des Membrankanals der PPO mit flankierenden Resten und dem gebundenen Triton-X-100-Molekül in blau.



a

Abbildung 26: Vorgeschlagene Zusammenlagerung der zwei letzten Enzyme in der menschlichen Häm biosynthese. **a** Stereo-Ansicht des vermuteten PPO-HFc-Komplexes, die PPO-Faltung ist in gelb gezeigt, HFc in rot, der PPO-Tunnel und der Protoporphyrin IX-Kanal im Komplex sind mit dem Cofaktor FAD (PPO, rot-orange), dem PPO-Inhibitor (INH, grün), den Detergenzmolekülen Triton-X-100 (PPO-Teil des Kanals, blau) und drei Cholat-Molekülen (HFc, oliv-grün) gefüllt. Die innere Mitochondrienmembran ist durch schwarze Linien dargestellt.



b

c

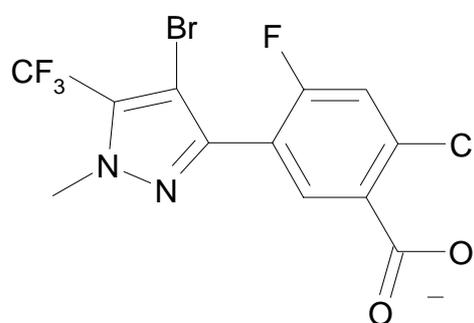
b + c Moleküloberflächen der PPO und der HFc in der angenommenen Dock-Region gefärbt nach dem elektrostatischen Potential, positiv geladene Bereiche sind blau gefärbt, negativ geladene rot und ungeladene und hydrophobe Teile hellgrau. **b** Ansicht der interagierenden Oberflächen von oben. Die PPO-Oberfläche weist einen hydrophoben Bereich an der bindenden Kontaktfläche auf. In der Öffnung des aktiven Zentrums sind das FAD (rot-orange), der Inhibitor INH (grün) und das Triton-X-100-Molekül (blau) zu sehen. Der HFc-Teil des Kanals ist durch eine tiefe Höhle ins Enzym hinein gekennzeichnet, die von drei Cholat-Molekülen (oliv-grün) gefüllt ist. **c** Seitenansicht der PPO-HFc-Kontaktfläche nach Trennung des Komplexes durch Nachobenschieben der PPO. Der hydrophobe Teil der PPO berührt die kleineren Lippen der HFc und der Rand der Membranbindedomäne der PPO passt zwischen die größeren Lippen der HFc.

5.1.5 Das aktive Zentrum

Das aktive Zentrum der PPO befindet sich zwischen der FAD- und der Substrat-Bindedomäne. Die Elektronendichte (Abb.27c) zeigt die Bindung des Inhibitors INH (Schema2) in den Tunnel des aktiven Zentrums (Abb.27a) in der Nähe des FAD-Cofaktors in seiner langgestreckten Konformation. Die Substratbindetasche unterhalb des FAD wird durch eine flache Höhle gebildet, die von einigen aromatischen und aliphatischen Aminosäuren und von Asn67 und Arg98 umgeben ist (Abb.27b).

Die Koordination des Cofaktors FAD (Abb.25) gleicht der in MAO (Binda et al., 2002) und PAO (Binda et al., 1999). Das FAD-N₅-Atom, das für die Wasserstoffabstraktion von der Methylenbrücke zwischen Ring A und D (C₂₀-Atom) verantwortlich ist, liegt nahe am C₂₀-Atom und startet die Reaktion an dieser Stelle des Substrates. Weil das aktive Zentrum sehr eng ist und das Substrat durch ionische Wechselwirkung eines Propionatsauerstoffs von Ring C mit dem N_{H2}-Atom vom Arg98, durch Stacking von Ring B zwischen Leu356 und Leu372 und durch aromatische Stackingwechselwirkung von Ring A mit Phe392 festgehalten wird, ist eine Rotation des Substrates während der Reaktion auszuschliessen und alle Wasserstoffübertragungen erfolgen von diesem C₂₀-Atom (Abb.27c).

Unterhalb des Inhibitors befindet sich gut definierte Elektronendichte für ein Triton-X-100-Molkül. Es befindet sich im Produktkanal mit dem Ethylenoxidschwanz in Richtung auf das aktive Zentrum. Tiefer im Kanal befinden sich zwei weitere Elektronendichtemaxima, die zwei weniger gut definierte Detergenzmoleküle darstellen könnten. Dieser Kanal kann auch eine mögliche Bindestelle für Ubichinon sein, das die Reaktion der PPO ab Konzentrationen von 30 µM inhibiert (Ferreira and Dailey, 1988). Ubichinone, die membrangebunden vorliegen, könnten in den Kanal von der Membran her eindringen und die PPO-Reaktion durch sterische Hinderung der Substratbindung und durch Blockierung des Produkttransports inhibieren.



Schema2: Inhibitor INH: 4-Bromo-3-(5'-carboxy-4'-chloro-2'-fluoro-phenyl)-1-methyl-5-trifluoromethyl-pyrazol

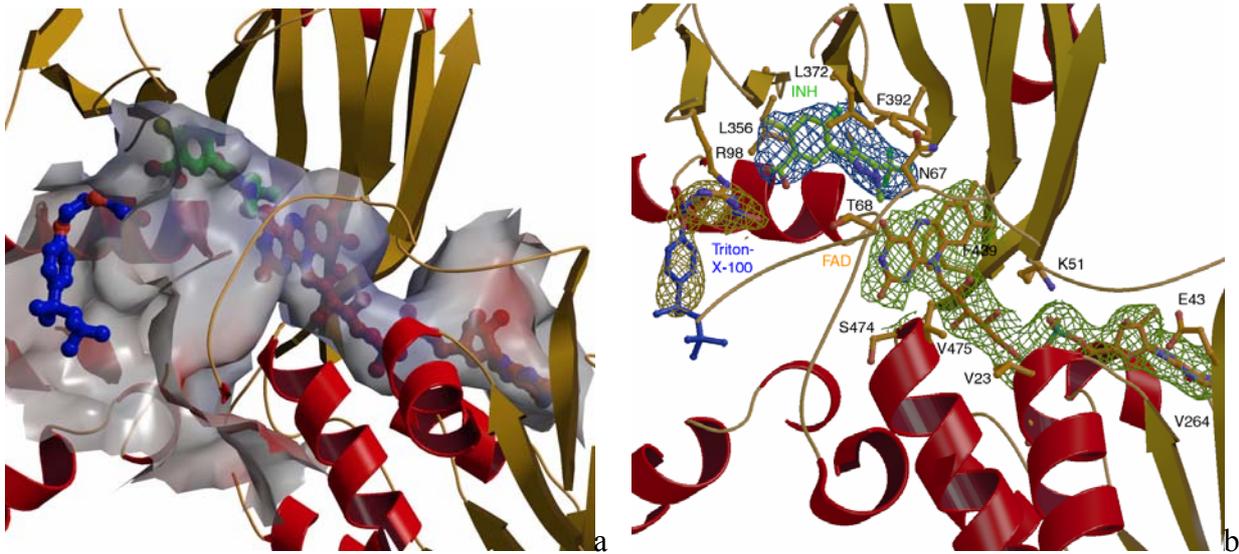
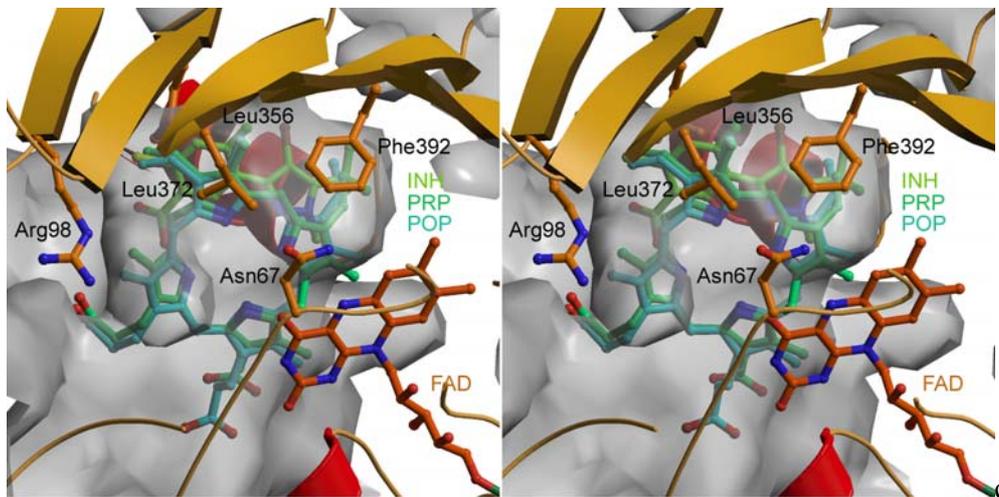


Abbildung 27: Aktives Zentrum der PPO **a** Bindetunnel für FAD, Substrat und Triton-X-100. Die Adenosylhälfte des FAD (rot-orange) ist solvensexponiert, die Öffnung des aktiven Zentrums ist zur Membran hin offen. Gezeigt sind der FAD-Cofaktor (rot-orange), der Inhibitor INH (grün) und ein Triton-X-100 Detergenzmolekül (blau), die in den Tunnel binden. **b** Der Tunnel des aktiven Zentrums mit allen Liganden. Der Inhibitor INH (grün) ist in seiner Elektronendichte (stahlblau) gezeigt und liegt zwischen den Resten Arg98, Leu356, Leu372 und Phe392. Die Koordination des Cofaktors FAD (rot-orange), der von seiner Elektronendichte (grasgrün) umgeben ist, gleicht der in MAO (Binda et al., 2002) und PAO (Binda et al., 1999). Das Detergenzmolekül Triton-X-100 (blau) ist in den Eingang des Produktkanals gebunden, die aliphatische Trimethylethyl-Gruppe der Octylgruppe ist in der Elektronendichte (goldgelb) nicht definiert. Die Omit-Elektronendichte ist auf 1.0σ konturiert.



c Öffnung des aktiven Zentrums mit gebundenem FAD (rot-orange), Inhibitor INH (hellgrün) und dem modellierten Substrat Protoporphyrinogen IX (PRP, grün) und dem Produkt Protoporphyrin IX (POP, zyan). Dargestellt sind die an der Substratbindung beteiligten und konservierten Reste Arg98, Asn67, Leu356, Leu372 und Phe392.

5.2 Strukturlösung des blauen Cupredoxins Umecyanin aus Meerrettich (*Armoracia rusticana*)

5.2.1 Kristallisation und Kristalle

Das gereinigte rekombinant in *E.coli* produzierte Meerrettich-Umecyanin wurde von der Chris Dennison Gruppe (School of Natural Sciences, University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne NE1 7RU, U.K.) in einer Konzentration von ca. 11 mg/ml erhalten.

Das Umecyanin-Protein wurde mit verschiedenen käuflich erhältlichen Kristallisations-Screens pipettiert. Viele Kristallisationsbedingungen führten zu Nadeln, andere ergaben voluminöse Kristalle (Abb.28). Der Reservoirpuffer der endgültigen Bedingung enthielt 25 % PEG 3350, 0,1 M Bicin, pH5,0 und 0,2 M MgCl₂. Die Kristalle wurden mittels der Methode des sitzenden Tropfens erhalten dadurch, dass jeweils 2 µl Reservoirpuffer zu 2 µl Proteinlösung hinzugefügt wurden. Es wurden Kristalle erhalten der maximalen Größe von 400 x 300 x 300 µm³.

Die Kristalle konnten einfach gefroren werden nach Soaken im Cryo-Puffer 10 % PEG 600, 25 % PEG 3350, 0,1 M Bicin, pH5,0, 0,2 M MgCl₂, der aus dem Reservoirpuffer durch Zugabe von 10 % PEG 600 erhalten wurde.

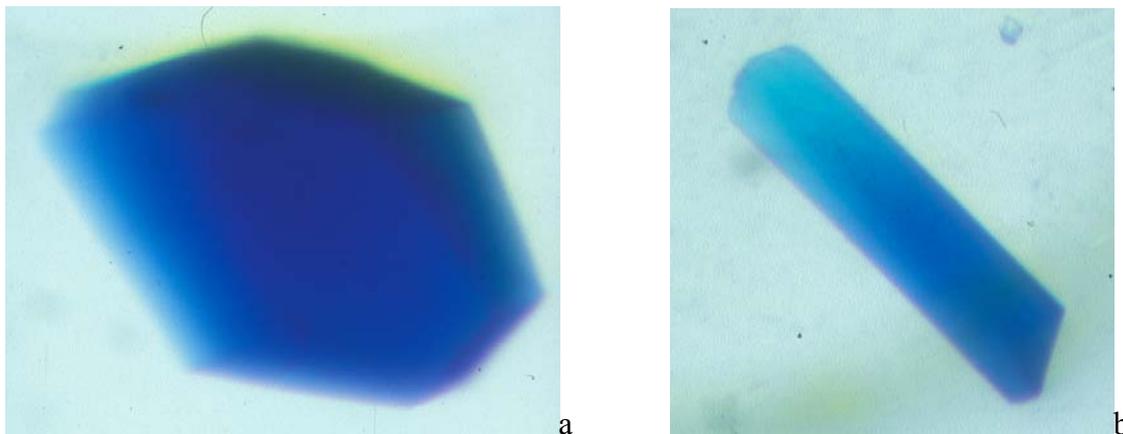


Abbildung28: Blaue hexagonale Kristalle von Umecyanin erhalten mit der Methode des sitzenden Tropfens aus 2 µl Proteinlösung und 2 µl Reservoir-Puffer (25 % PEG 3350, 0,1 M Bicin pH5,0, 0,2 M MgCl₂). Die Größe der Kristalle beträgt **a** ca. 400 x 300 x 300 µm³ **b** ca. 400 x 200 x 200 µm³.

5.2.2 Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung

Ein Datensatz der blauen oxidierten Form des Umecyanin, die Cu(II) enthält, wurde auf einem MARResearch 345 Image Plate Detektor System bis zu einer Auflösung von 1.9 Å erhalten, das auf eine Rigaku RU-200 rotierende Anode montiert war, die bei 50 mA und 100 kV betrieben wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = \text{CuK}\alpha = 1.542 \text{ \AA}$. Die Kristalle gehörten der Raumgruppe $P6_5$ an, die Zellkonstanten waren $a = b = 92,69 \text{ \AA}$, $c = 47,31 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$, der R_{merge} der prozessierten Daten betrug 5,9 %. Von einem Kristall, der mit 10 mM Ascobat gelöst im Cryo Puffer gesoakt wurde, konnte ein Datensatz der reduzierten Form des Umecyanins, die Cu(I) enthält, bis zu einer Auflösung von 1.8 Å gemessen werden (Abb.29). Die Zellkonstanten in derselben Raumgruppe waren nahezu die gleichen und der R_{merge} betrug hier 7,7 % (Tabelle3).

Initiale Phasen der Struktur des oxidierten Umecyanin konnten mittels MR und dem Programm AMoRe erhalten werden, wobei die Struktur des Stellacyanins aus *Rhus vernicifera* als Templat diente. Nach initialer Rigid-Body-Minimierung, wurde die Verfeinerung der Struktur durchgeführt durch abwechselndes Modellbauen mit dem Programm O und kristallographische Verfeinerung mit CNS. Das aktive Zentrum in seiner Elektronendichte ist als Beispiel für die gute Qualität der Elektronendichte gezeigt (Abb.32a und b).

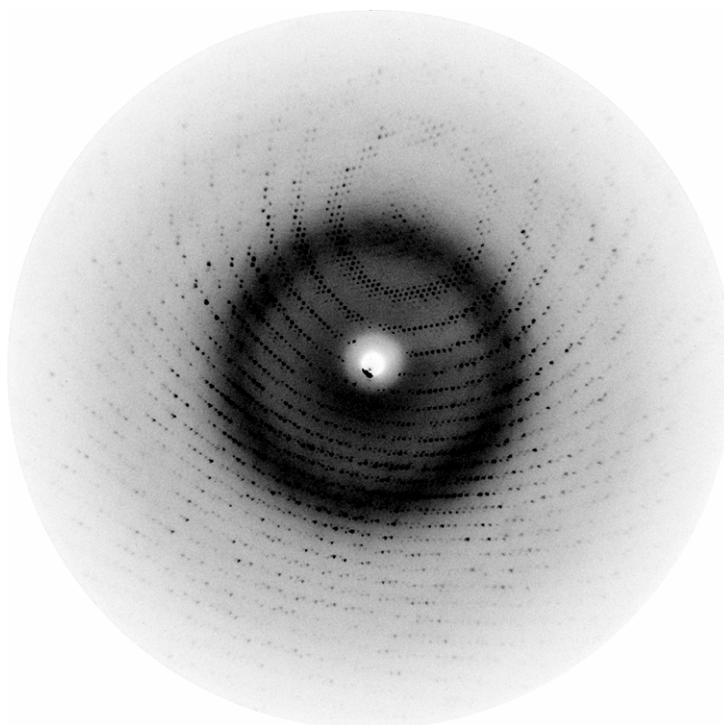


Abbildung29: Diffractionsmuster eines Kristalls der reduzierten Form (URED) gefroren im Cryo Strahl im Cryo-Puffer (10% PEG 600, 25 % PEG 3350, 0,1 M Bicine pH5,0, 0,2 M MgCl_2), die bis zu 1.8 Å streuten.

Tabelle3: Roentgen-Daten-Prozessierung und Verfeinerungs-Statistik

Datensatz	Umecyanin (oxidiert, Cu ^{II})	Ured (reduziert, Cu ^I)
Datensammlung		
Anzahl of einmaligen Reflexe	18,450	21,408
Multiplizität ^a	8.6 (8.2)	6.6 (6.2)
Raumgruppe		P6 ₃
Zellkonstanten	a = b = 92.69 Å, c = 47.31 Å, α = β = 90°, γ = 120°	a = b = 92.65 Å, c = 47.70 Å, α = β = 90°, γ = 120°
Maximale Auflösung [Å]	1.90	1.80
Vollständigkeit der Daten [%]	100.0 (99.8)	98.2 (100.0)
R _{merge} ^b [%]	5.9 (26.9)	7.7 (44.5)
I/σ	45.0 (16.0)	27.5 (3.2)
Molekularer Ersatz		
R _{cryst} [%]	51.0	-
Korrelationsfaktor C [%]	29.1	-
Verfeinerung		
R _{cryst} /R _{free} ^c [%]	21.8 / 26.5	19.9 / 24.4
Nicht-Wasserstoff -Proteinatome	1641	1641
Zahl der Kupferatome	2	2
Zahl der Wassermoleküle	272	215
Rmsd (Bindungslängen [Å] / Winkel [°] / bonded Bs [Å ²]) ^d	0.018 / 2.83 / 1.35	0.017 / 1.77 / 2.53
Mittlere Temperaturfaktoren (Protein / Kupfer / Solvens)	22.34 / 17.36 / 32.69	24.92 / 23.21 / 31.39

a) Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösungsschale zwischen 1.96 und 1.90 Å (Umecyanin) and 1.85 and 1.80 Å (Ured).

b) $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(\text{hkl})}$.

c) $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_h ||F_o(\text{hkl})| - |F_c(\text{hkl})||}{\sum_h |F_o(\text{hkl})|}$.

d) Root mean square Abweichungen (rmsd) der Temperaturfaktoren der gebundenen Atome.

5.2.3 Strukturbeschreibung und Interpretation

Umecyanin liegt als C₂-symmetrisches Dimer in der asymmetrischen Einheit vor, die Kontaktfläche hat eine Größe von 510 Å² entsprechend ca. 9 % der gesamten Oberfläche (Abb.30). Kontakte treten auf zwischen Resten der benachbarten Stränge β₅ und β₆ des jeweils anderen Monomers (Tabelle4).

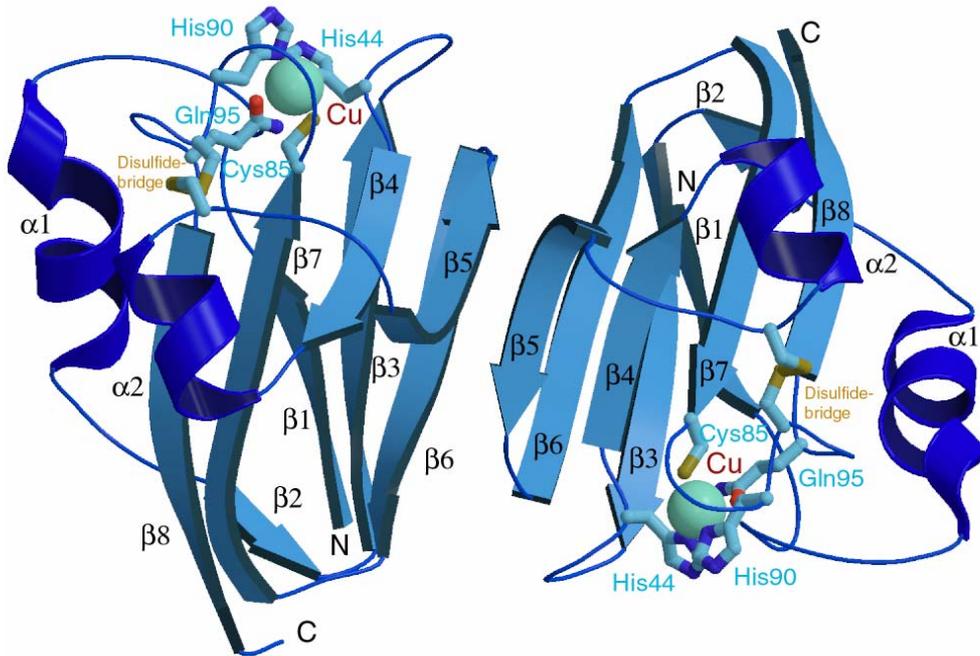


Abbildung30: Das Umecyanin Dimer besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die nicht-kristallographische zweizählige Achse steht senkrecht auf der Papierebene zwischen den β_5 -Strängen der beiden Monomere. Das Kupferatom ist als zyanfarbene Kugel gezeigt umgeben von seinen koordinierenden Resten.

Tabelle4: Abstände zwischen den beiden Untereinheiten. Die Abstände zwischen Resten der Untereinheiten A und B, die Kontakte zwischen den Untereinheiten herstellen.

Rest, Monomer A, Atom	Rest, Monomer B, Atom	Abstand [Å]
Glu 34 A O _{e1}	Lys 72 B N _ε	3.34
Ser 64 A O _γ	Thr 67 B N	3.17
Ser 64 A O _γ	Thr 67 B O _{γ1}	2.88
Thr 67 A N	Ser 64 B O _γ	3.19
Thr 67 A O _{γ1}	Ser 64 B O _γ	2.80
Pro 69 A O	Asn 76 B N _{δ2}	2.70
Asn 76 A N _{δ2}	Pro 68 B O	3.28

Das Umecyanin Monomer setzt sich zusammen aus einem achtsträngigen β -Barrel und zwei α -Helices (Abb.31), es hat damit die Topologie des Stellacyanin (Abb.8, Einleitung). Das Kupferatom wird im Umecyanin (Stellacyanin) von His44 (His46), His 90 (His94), Cys 85 (Cys89) und Gln95 (Gln99) koordiniert (Abb. 3a und b). Die Abstände der jeweiligen koordinierenden Atome zum Kupfer und die Winkel Ligand-Kupfer-Ligand sind in Tabelle5 dargestellt. Zwischen den beiden Cysteinen Cys57 (Cys60) und Cys91 (Cys95) besteht eine Disulfidbrücke, die die Geometrie des Umecyanins im Bereich vor der variablen Region stabilisiert.

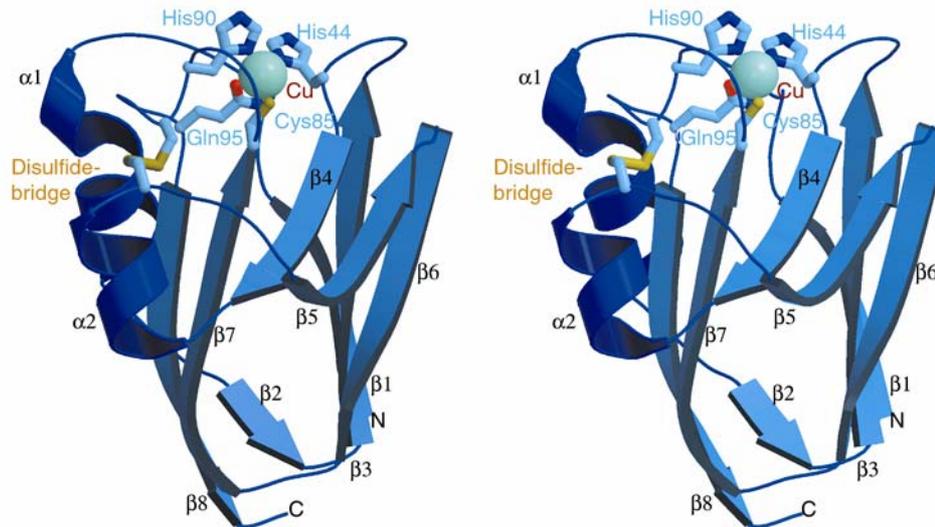


Abbildung31: Das Umecyanin Monomer besteht aus einem achtsträngigen β -Barrel und zwei α -Helices. Das Kupferatom ist als zyanfarbene Kugel mit seinen koordinierenden Resten His44, Cys85, His90 und Gln95 als Kugelstabmodell dargestellt. Die Disulfidbrücke zwischen Cys57 und Cys91 ist ebenfalls als Kugelstabmodell dargestellt.

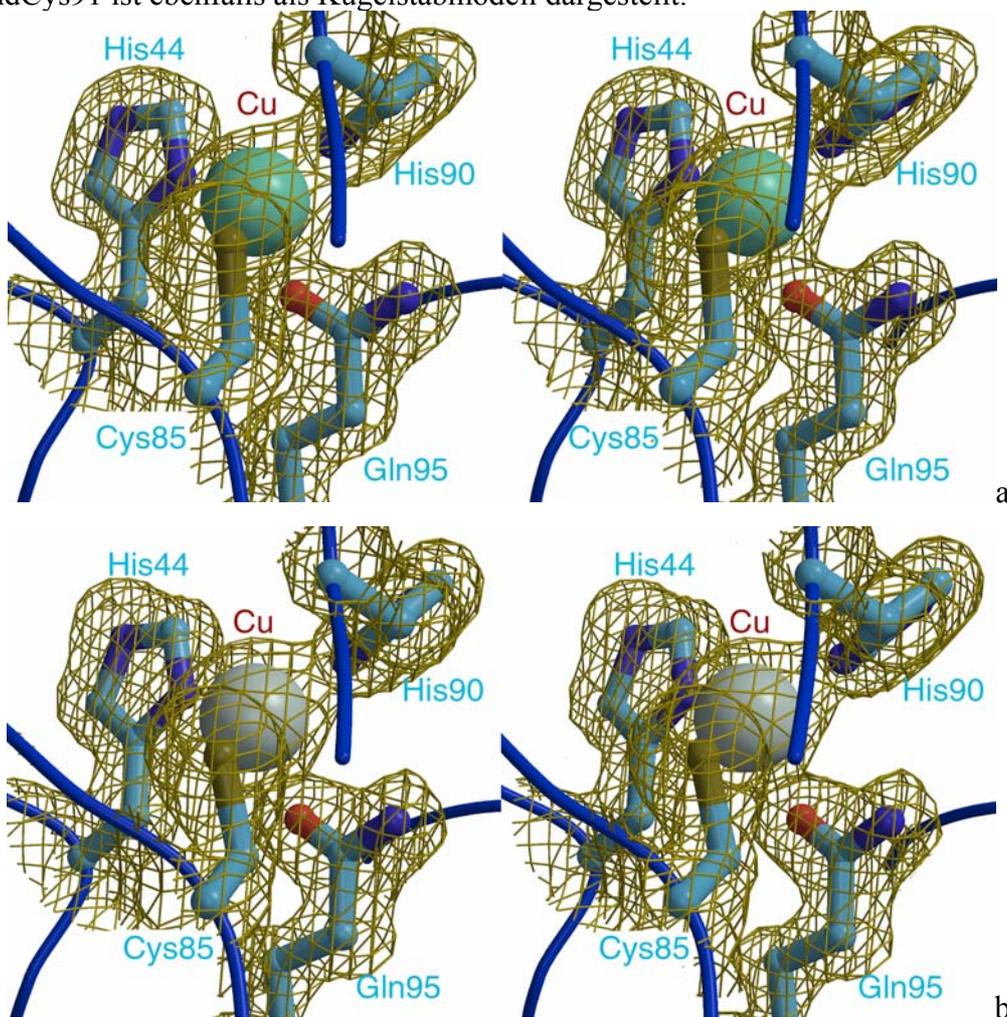


Abbildung32: Koordination des Kupfers **a** im oxidierten Umecyanin, Cu^{II} (zyanfarbene Kugel) und **b** im reduzierten Umecyanin, Cu^{I} (graue Kugel). Die Histidin-, Cystein- und Glutamin-Liganden sind als Kugel-Stab-Modelle dargestellt umgeben von der dazugehörigen Elektronendichte in Gold.

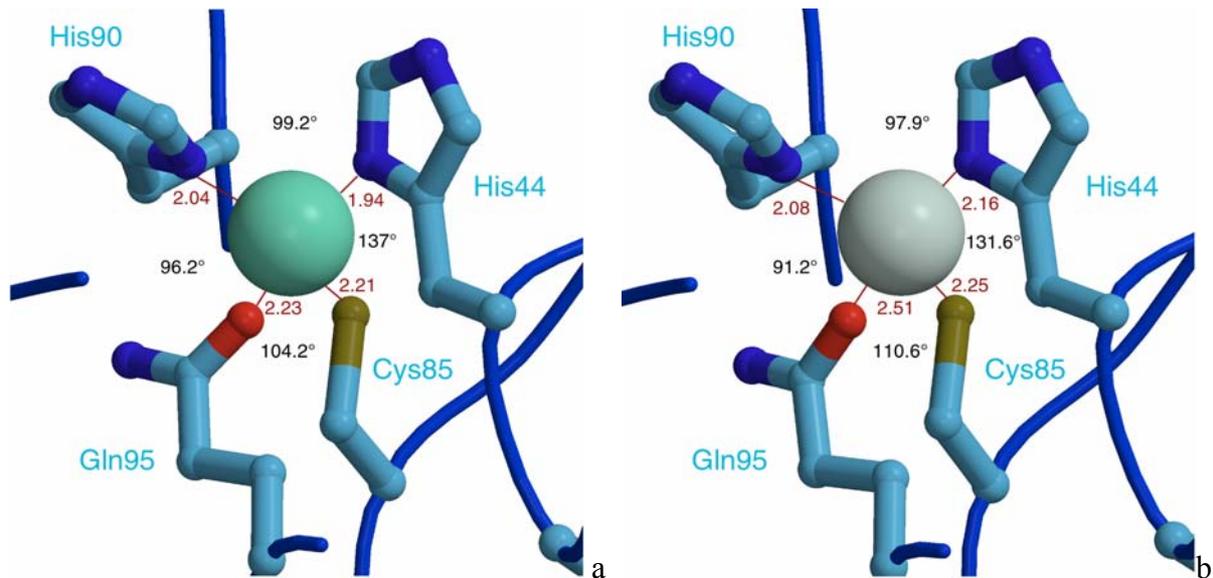


Abbildung 33: Geometrie der Kupferkoordination **a** im oxidierten Umecyanin, Cu^{II} (zyanfarbene Kugel) und **b** im reduzierten Umecyanin, Cu^{I} (graue Kugel). Die Histidin-, Cystein- und Glutamin-Liganden sind als Kugel-Stab-Modell gezeigt. Die Abstände zwischen dem koordinierenden Liganden und dem Kupferion sind in Å angegeben, weiterhin die Winkel Ligand-Kupfer-Ligand.

Tabelle 5: Abstände und Winkel zwischen Kupfer und Liganden. Die Abstände zwischen koordinierendem Ligandenatom und dem Kupferion sind in Å angegeben und die Winkel Ligand-Kupfer-Ligand in Grad(°).

Datensatz	Umecyanin (oxidiert, Cu^{II})			Ured (reduziert, Cu^{I})		
	A	B	Mittel	A	B	Mittel
Abstand Cu-His44 ($\text{N}_{\delta 1}$)	1.88	2.00	1.94	2.15	2.18	2.16
Abstand Cu-Cys85 ($\text{S}_{\gamma 1}$)	2.23	2.19	2.21	2.24	2.26	2.25
Abstand Cu-His90 ($\text{N}_{\delta 1}$)	2.06	2.02	2.04	2.05	2.10	2.08
Abstand Cu-Gln95 ($\text{O}_{\epsilon 1}$)	2.22	2.24	2.23	2.52	2.50	2.51
Winkel His44-Cu-Cys85	127.5	146.4	137	132.2	131.0	131.6
Winkel His44-Cu-His90	99.7	98.6	99.2	98.7	97.0	97.9
Winkel His44-Cu-Gln95	94.1	95.9	95.0	86.0	89.8	87.9
Winkel Cys85-Cu-His90	125.7	105.9	116	124.3	125.0	124.6
Winkel Cys85-Cu-Gln95	105.1	103.3	104.2	111.3	109.9	110.6
Winkel His90-Cu-Gln95	95.2	97.3	96.2	89.9	92.5	91.2

5.3 Strukturlösung der Lumazinsynthase W27Y-Mutante aus Spaltheefe (*Schizosaccharomyces pombe*)

5.3.1 Reinigung, Kristallisation und Datensammlung

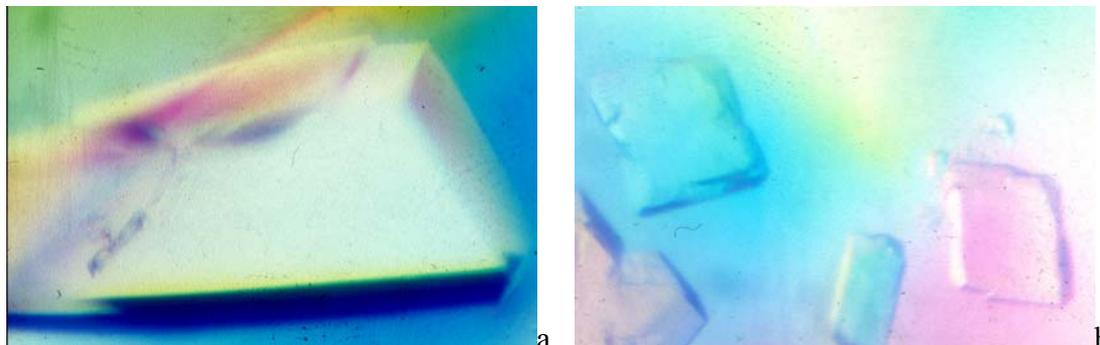


Abbildung34: Farblose Kristalle der LUSY mit **a** CEOL und **b** NORAP erhalten durch Cokristallisation und der Methode des sitzenden Tropfens aus 2 μ l Proteinlösung und 2 μ l Reservoir-Puffer (0,1 M Natriumcitrat, pH5,0, 0,7 M Ammoniumdihydrogenphosphat). Die Größe der Kristalle beträgt **a** ca. 400 x 250 x 250 μ m³ **b** ca. 300 x 300 x 200 μ m³.

Die W27Y-Mutante der Lumazinsynthase aus *S. pombe* wurde wie beschrieben (Gerhardt et al., 2002) kloniert, exprimiert und gereinigt. Nach der Reinigung ohne Zusatz von Riboflavin, enthielt etwas weniger als 20 % der Mutante gebundenes Riboflavin (Gerhardt et al., 2002). Um das Protein mit Riboflavin zu sättigen, wurde es mit Riboflavin cokristallisiert und die Kristalle danach mit Riboflavin gesoakt. Cokristallisationsexperimente mit dem Substratanalogon NORAP und dem Produktanalogon CEOL wurden mit der gereinigten Mutante (11 mg/ml) in 20 mM Kaliumphosphat (pH7,0) und 50 mM Kaliumchlorid nach Zugabe des entsprechenden Inhibitors bis zum zehnfachen molaren Überschuss durchgeführt. Die Kristalle wurden bei 18 °C mittels der Verdampfungsdiffusions-Methode des sitzenden Tropfens durchgeführt, wobei 2 μ l der Protein-Inhibitor-Lösung mit 2 μ l des Reservoirpuffers (0,1 M Natriumcitrat, pH5,0, 0,7 M Ammoniumdihydrogenphosphat) gemischt und gegen die Reservoirlösung äquilibriert wurden (Abb.34).

Die Kristalle mit Riboflavin gehörten der Raumgruppe C222₁ mit den Zellkonstanten a = 111.6 Å, b = 145.1 Å, c = 129.2 Å an. Die asymmetrische Einheit enthielt ein Pentamer. Die Kristalle der Inhibitor Komplexe gehörten derselben Raumgruppe an mit den Zellkonstanten a = 111.1 Å, b = 144.9 Å, c = 128.3 Å bzw. a = 111.2 Å, b = 144.8 Å, c = 127.8 Å.

5.3.2 Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung

Die Datensätze bis zu einer Auflösung von 2.7 Å wurden mit DENZO¹ und SCALEPACK (Otwinowsky, 1993) integriert, skaliert und gemergt. Die drei Strukturen der Lumazinsynthase-W27Y-Mutanten im Komplex mit Riboflavin, CEOL und NORAP wurden mittels Differenz-

Fourier-Synthese ausgehend von den Koordinaten der riboflavingebundenen Wildtyp-Struktur aus *S. pombe* (Gerhardt et al., 2002) gelöst. Die Statistiken der Datensammlung sind in Tabelle 6 gezeigt. Nach der Verfeinerung lagen mehr als 90 % der Reste aller drei Strukturen in der bevorzugten Region des Ramachandranplots.

Tabelle 6: Datenprozessierung und Verfeinerungsstatistiken

Datensatz	W27Y-Riboflavin	W27Y-CEOL	W27Y-NORAP
Anzahl der einmaligen Reflexe	25,184	26,937	28,707
Multiplizität ^a	2.7 (2.1)	3.9 (3.8)	3.9 (3.8)
Maximale Auflösung [Å]	2.80	2.75	2.70
Vollständigkeit [%]	96.7 (91.6)	99.4 (99.5)	99.9 (100.0)
R _{merge} ^b [%]	8.5 (37.3)	8.0 (51.7)	10.9 (48.2)
I/σ	7.0 (2.0)	15.5 (2.6)	11.6 (2.6)
R _{cryst} /R _{free} ^c [%]	20.4 / 22.2	20.6 / 23.0	19.1 / 21.2
Nicht-Wasserstoff Proteinatome	5550	5550	5550
Anzahl der Wassermoleküle	28	-	58
Nicht-Wasserstoff-Ligandenatome	135	115	100
Nicht-Wasserstoff-Ionenatome	25	25	25
Rmsd (Bindungslängen [Å] / Winkel [°] / bonded Bs [Å ²]) ^d	0.008 / 1.34 / 2.33	0.009 / 1.40 / 2.07	0.009 / 1.42 / 2.21
Mittlere Temperaturfaktoren (Protein / Ligand / Ion / Solvens)	49.3 / 75.4 / 51.0 / 47.5	60.6 / 52.9 / 68.9 / -	43.7 / 38.1 / 43.0 / 40.2

a) Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösungsschale zwischen 2.95-2.80 Å (W27Y-Riboflavin), 2.83-2.75 Å (W27Y-CEOL) und 2.78-2.70 Å (W27Y-NORAP).

b) $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(\text{hkl})$.

c) $R_{\text{cryst}} = \sum_h ||F_o(\text{hkl})| - |F_c(\text{hkl})|| / \sum_h |F_o(\text{hkl})|$.

d) Root mean square Abweichungen (rmsd) der Temperaturfaktoren gebundener Atome.

5.3.3 Strukturbeschreibung

Die C_α-Verbindungslinien der drei ligandgebundenen Strukturen zeigen keine bemerkenswerten Änderungen weder verlichen mit dem Wildtyp noch untereinander, mit Ausnahme des C_α-Atoms von Rest Tyr27, das um ca. 0.6 Å versetzt ist in der riboflavingebundenen Mutantenstruktur. Die fünf aktiven Zentren der Lumazinsynthase sitzen in den Kontaktflächen zwischen den jeweiligen Monomerpaaaren (Abb.35). Daher bilden Reste beider verbundener Monomere Kontakte zu den Liganden, die in die Substratbindetasche gebunden sind. Abgesehen von Tyr27, His94 und Trp63 eines Monomers, die den größten Teil der Substratbindestelle (Abb.37a und b) bilden, schließen Leu119 und His142 des zweiten Monomers die Tasche von der gegenüberliegenden Seite (Abb.35).

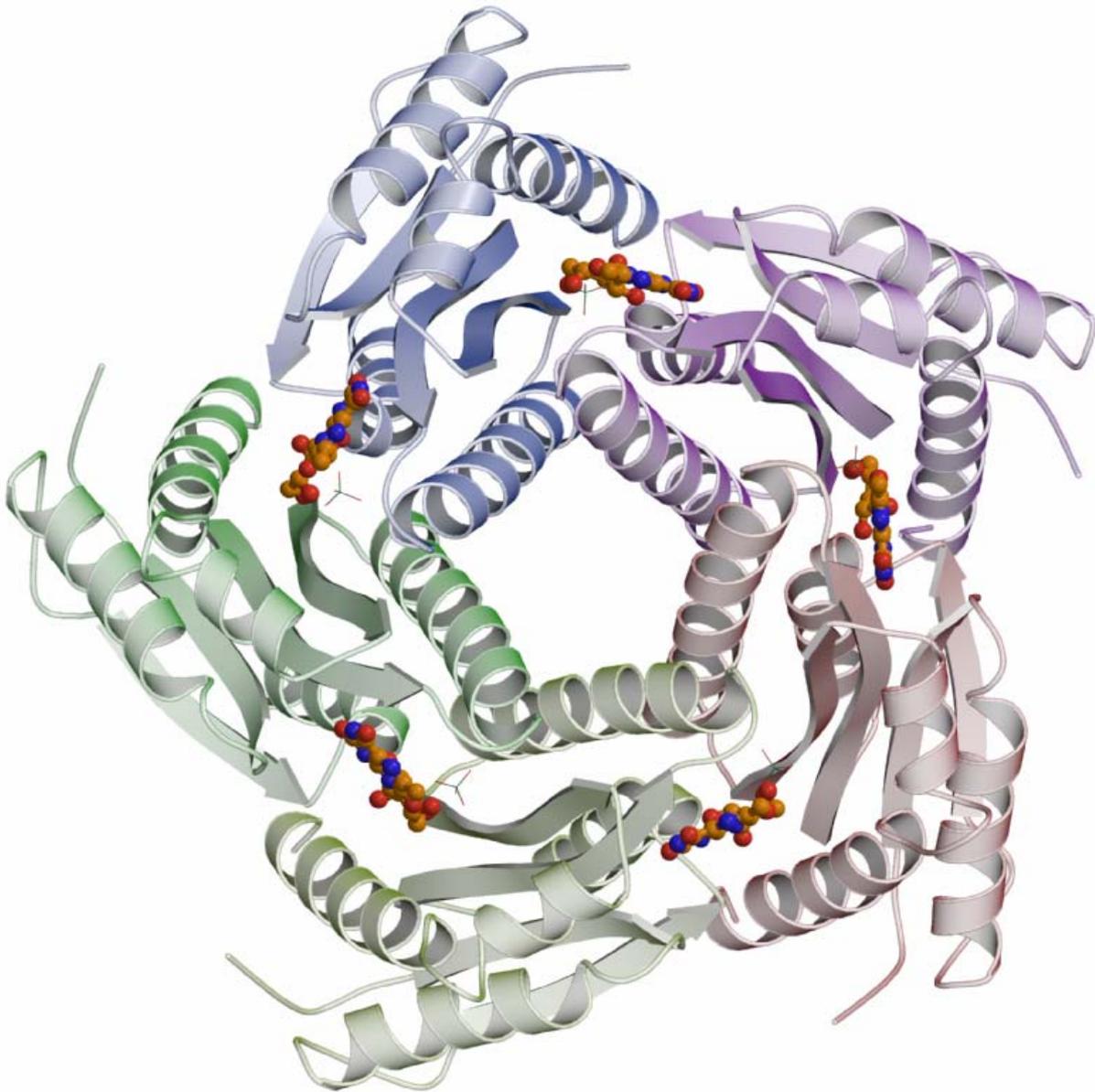


Abbildung35: Übersicht über das *S. pombe*-Lumazinsynthase-W27Y-Mutanten-Pentamer mit gebundenem Inhibitor 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazine (CEOL) als Kugelstabmodell (subunit: A-red, B-light green, C-green, D-blue, E-violet).

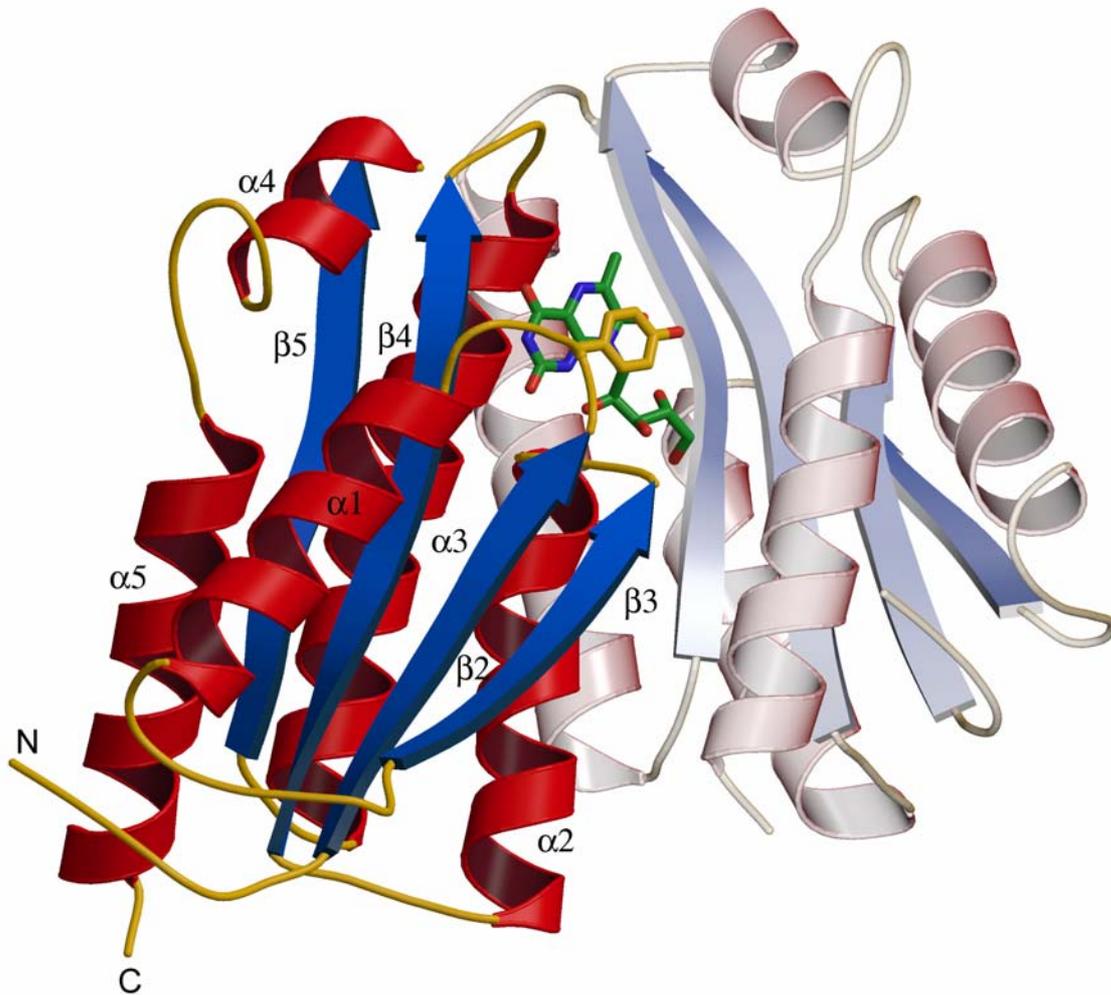


Abbildung36: *S. pombe*-Lumazinsynthase-Faltung und Dimerisierungsinterface mit gebundenem Inhibitor 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazine (CEOL, grün) und dem mutierten Rest Tyrosin 27 (gelb-orange) als Kugelstabmodell.

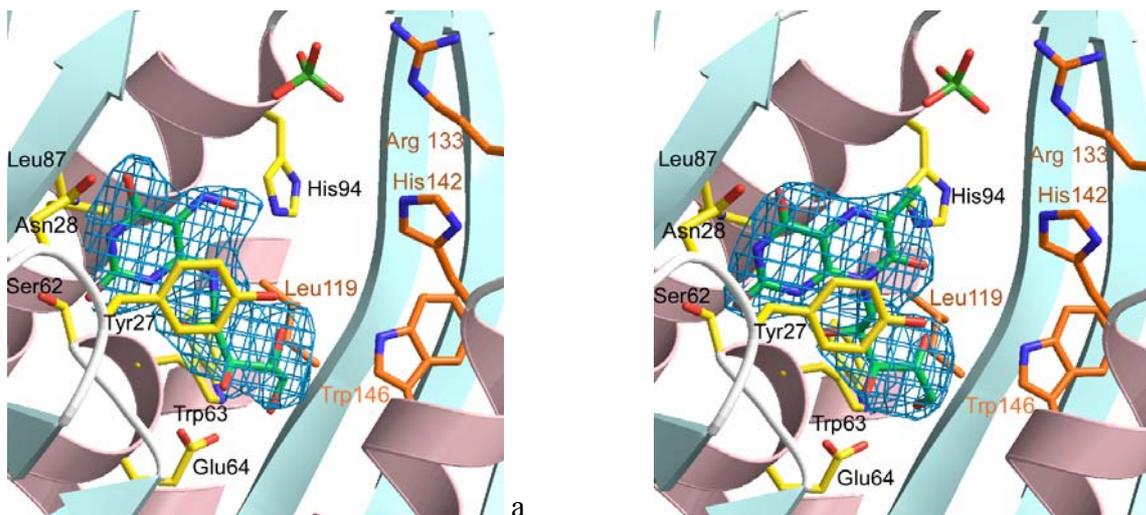


Abbildung37: Aktives Zentrum der *S. pombe*-Lumazinsynthase-W27Y-Mutante mit den gebundenen Inhibitoren. **a** Bindung des Substratanalogen 5-Nitroso-6-(D-ribitylamino)-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione (NORAP, grün) ins aktive Zentrum. Die finale ($2F_o - F_c$)-OMIT Dichte des Inhibitors wurde bei 2.7 Å Auflösung berechnet; **b** Bindung des Produktanalogen 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityl-lumazine (CEOL, grün) ins aktive Zentrum. Die finale ($2F_o - F_c$)-OMIT Dichte des Inhibitors wurde bei 2.8 Å Auflösung berechnet.

6. Diskussion

6.1 Protoporphyrinogen IX Oxidase

6.1.1 Aktives Zentrum, Substratbindung, Konservierung und Reaktionsmechanismus

Die Bindung von Protoporphyrinogen IX und von Protoporphyrin IX wurde modelliert ausgehend von der Inhibitorbindestelle (Abb.39a). Die negativ geladenen Propionylgruppen wurden zu den solvensexponierten Teilen der Öffnung des aktiven Zentrums hin orientiert. Arg98, das über alle eukaryontischen PPOs konserviert ist (Abb.40), stellt die Gegenladung der Carboxylatgruppe des Inhibitors INH und höchst wahrscheinlich auch der Propionatgruppe des Rings C des Protoporphyrin(ogen)s IX dar. Der Pyrazolring des Inhibitors dient als Modell für den Ring A des Protoporphyrin(ogen) IX und wird in Position gehalten durch aromatisches Stacking mit Phe392, das in den mitochondrialen pflanzlichen Enzymen konserviert (Abb.39, Tab.7) ist. In den chloroplastischen Enzymen ist es durch einen Tyrosinrest ausgetauscht. Der Phenylring von INH ahmt den Ring B des Protoporphyrin(ogen) IX nach und ist zwischen die beiden konservierten Reste Leu356 und Leu372 gebunden. Die Methylenbrücke (C₂₀) zwischen Ring A und D des modellierten Protoporphyrinogen IX ist zum N₅-Atom des FAD hin orientiert, was vermuten lässt, dass diese Position zuerst vom FAD oxidiert wird. Weitere Oxidation sollte von dieser Position aus weitergehen, weil die enge Tasche des aktiven Zentrums eine Bindung des Protoporphyrinogen IX nur in dieser Orientierung zulässt und Rotationen des Substrats ausschließt. Durch Wasserstoffumlagerungen mittels Imin-Enamin-Tautomerisierungen könnten alle Reaktionen ausgehend vom C₂₀ erfolgen. Das Atom C₁₀ zwischen den Ringen C und D kann nicht nahe genug an das N₅-Atom des FAD heran gebracht werden wegen der interferierenden Vinylgruppe auf der C₁₀-Seite des Moleküls. Das FAD wird dreimal zurückoxidiert durch molekularen Sauerstoff, was zu drei Molekülen Wasserstoffperoxid führt (Jordan, 1991). (Abb.38). In der Nähe des Substrates werden keine konservierten Reste beobachtet, die als Base dienen könnten. Ein möglicher Mechanismus der Deprotonierung beinhaltet die Reduktion des molekularen Sauerstoffs durch negativ geladenes FADH⁻ zu einem Peroxidation, das ein Proton von Wasser abstrahiert. Das resultierende Hydroxidion könnte dann als Base fungieren.

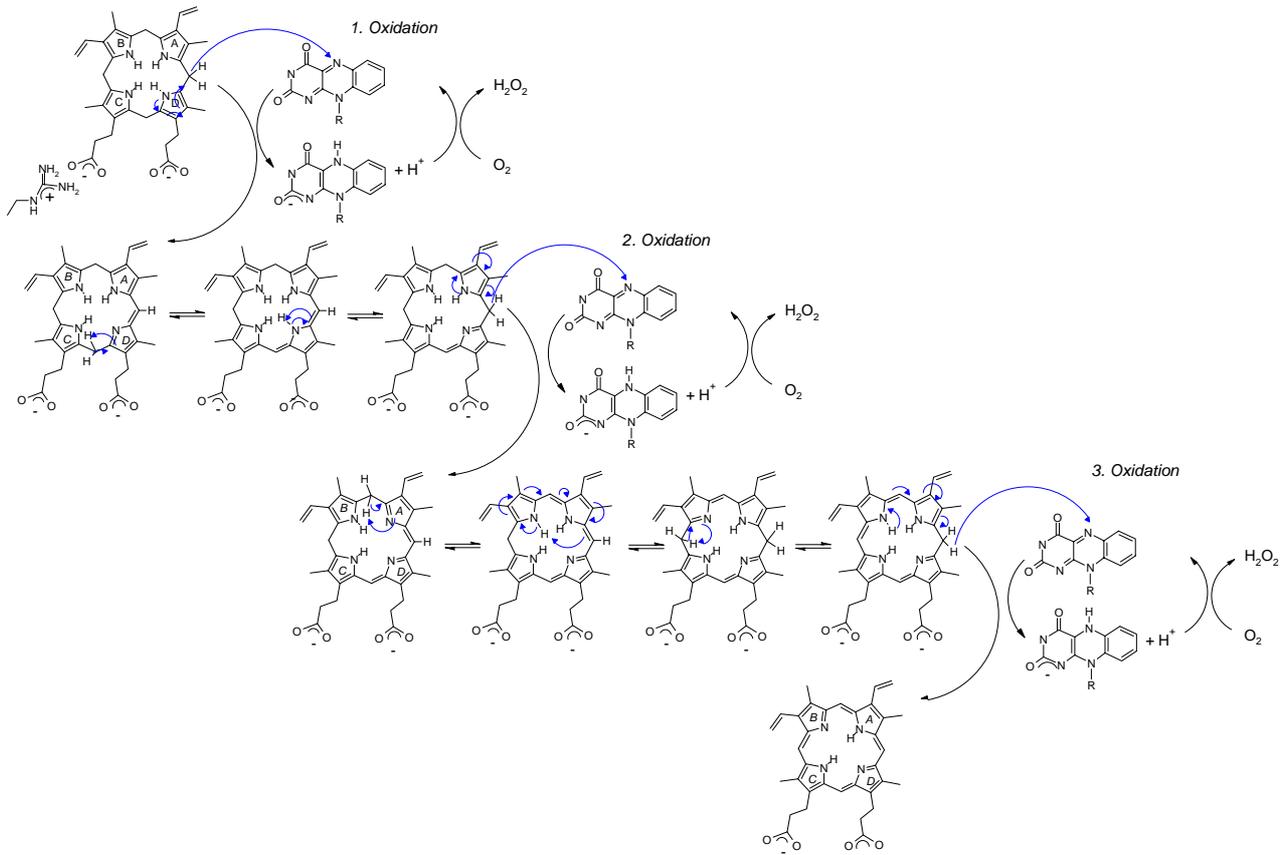


Abbildung 38: Vorgeschlagerer Reaktionsmechanismus der PPO. Die Oxidation von Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX erfolgt in drei Schritten, wobei jedesmal der FAD-Cofaktor durch den Tetrapyrrolring reduziert und durch ein Sauerstoffmolekül zurückoxidiert wird, das dabei zu Wasserstoffperoxid reduziert wird. Die Reaktion beginnt jedes Mal am C₂₀-Atom des Tetrapyrrolrings und Wasserstoffumlagerungen finden über das gesamte Ringsystem via Enamin-Imin-Tautomerisierungen statt (Jordan, 1991).

Für die Fixierung der Position des Porphyrin(ogen)rings spricht auch der Mechanismus der Uroporphyrinogen III decarboxylase (Phillips et al., 2003).

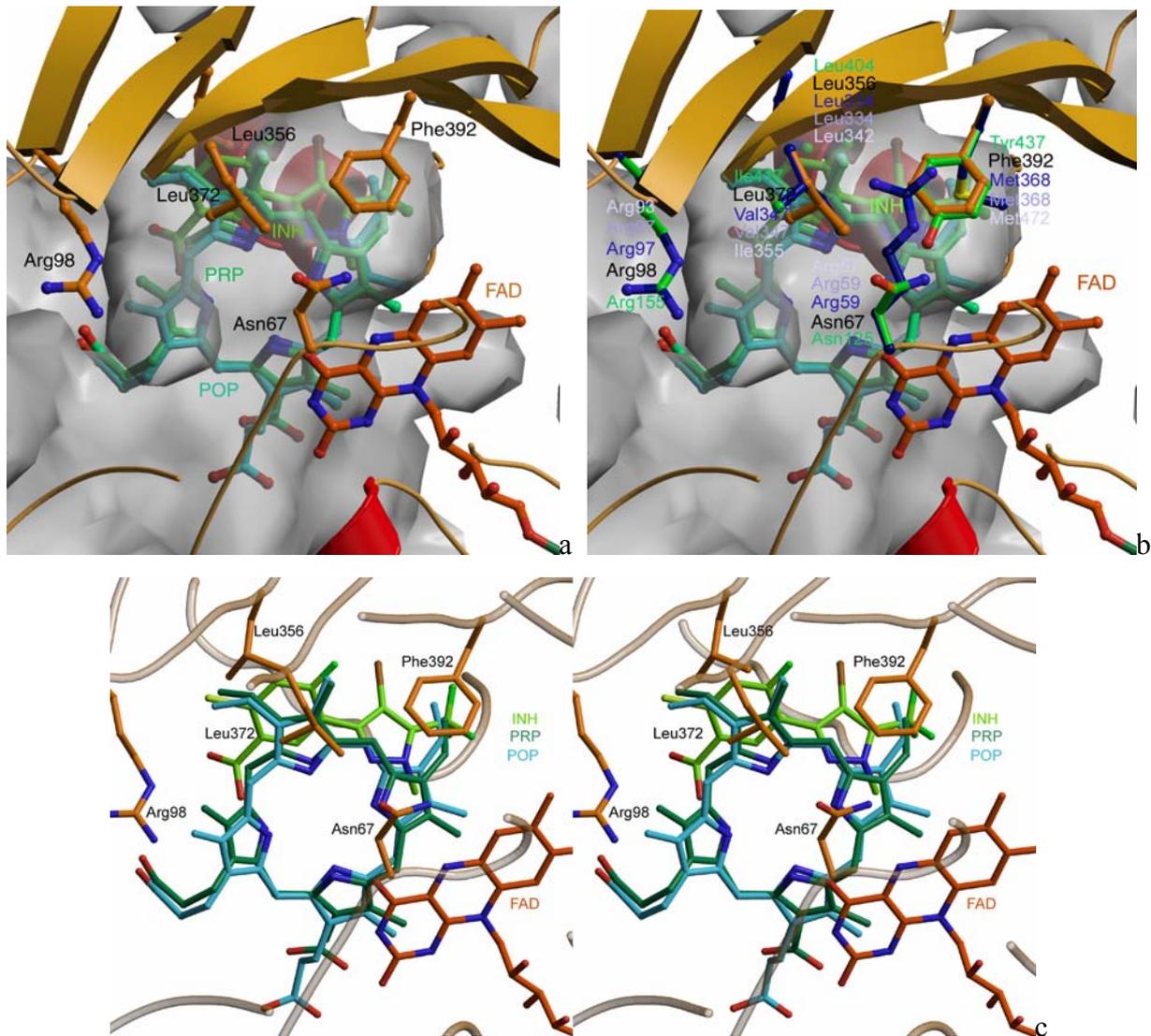


Abbildung39: a aktives Zentrum der PPO2NT b mit eingefügten Resten der chloroplastischen PPO1NT aus Tabak (hellgrün) und der humanen PPOHS. Die Reste wurden nicht geometrieverfeinert, sondern lediglich an die Stelle der entsprechenden Reste in PPO2NT eingefügt. c Stereoabbildung ohne Oberfläche.

Tabelle7: Zusammenstellung der Reste des aktiven Zentrums der mitochondrialen PPO2NT aus Tabak und der PPO2AT aus Ackerschmalwand (Arabidopsis), der chloroplastischen PPO1NT aus Tabak und der PPOHS aus Mensch, PPOMM aus Maus und PPODM aus der Fruchtfliege (Drosophila).

PPO2NT	Asn67	Arg98	Leu356	Leu372	Phe392
PPO2AT	Asn116	Arg147	Leu397	Leu413	Phe433
PPO1NT	Asn125	Arg155	Leu404	Ile417	Tyr437
PPOHS	Arg59	Arg97	Leu334	Val347	Met368
PPOMM	Arg59	Arg97	Leu334	Val347	Met368
PPODM	Arg57	Arg93	Leu342	Ile355	Met472

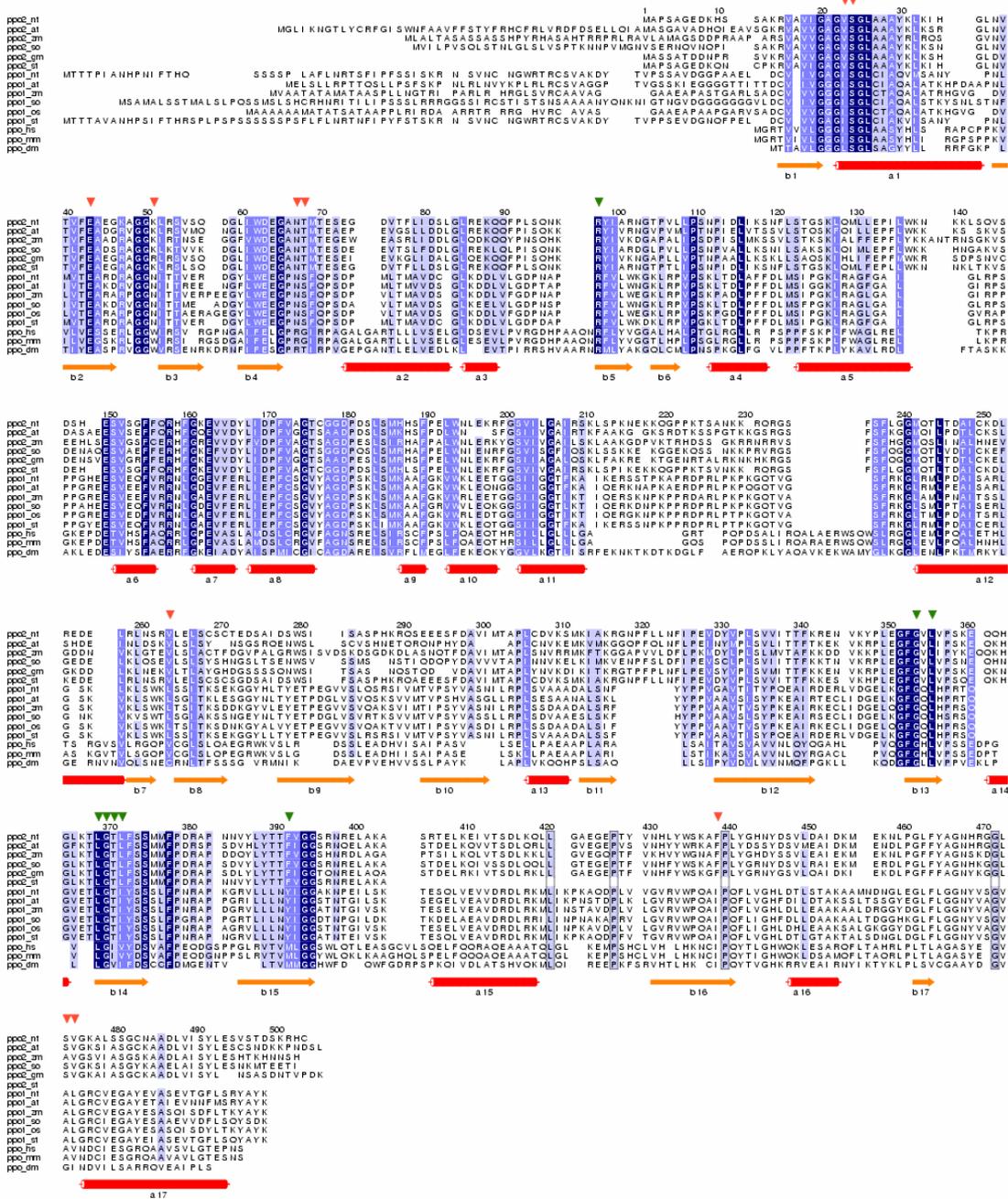


Abbildung40: Multiples Aminosäure-sequenz-Alignment der bekannten eukaryotischen PPOs: pflanzliche mitochondriale PPO2s, chloroplastische PPO1s und tierische mitochondriale PPOs aus *Nicotiana tabacum* (NT, Tabak), *Arabidopsis thaliana* (AT, Ackerschmalwand), *Zea mays* (ZM, Mais), *Spinacia oleracea* (SO, Spinat), *Glycine max* (GM, Sojabohne), *Solanum tuberosum* (ST, Kartoffel), *Oryza sativa* (OS, Reis), *Homo sapiens* (HS, Mensch), *Mus musculus* (MM, Maus) und *Drosophila melanogaster* (DM, Fruchtfliege). Rote Pfeile markieren die Reste, die in Kontakt mit dem Cofaktor FAD stehen und grüne Pfeile stehen für Inhibitor-bindende Reste. Unterhalb sind die Sekundärstrukturelemente (SSE) der PPO in rot und gelb-orange gezeigt.

6.1.2 FAD-Bindungsdomäne-Faltung (PHBH-Faltungsmotiv)

Die Teile der Struktur, die für die FAD-Bindung verantwortlich sind, zeigen deutliche Sequenz- und Strukturhomologien zu anderen Flavoenzymen (Ghisla and Massey, 1989). (Abb.41a), wie die humane Monoaminoxidase B (Binda et al., 2002) (MAO B, 1,68 Å rmsd über 256 C_α-Atome mit 14,9 % Sequenzidentität) und die D-Aminosäureoxidase (Mizutani et al., 1996) (DAO, 1,98 Å rmsd über 148 C_α-Atome mit 14,9 % Sequenzidentität) und weiterhin die Phytoen-Desaturase (PDS) (Norris et al., 1995) mit 15,2 % Sequenzidentität, ein Pflanzenenzym, das an der Carotinoid-Biosynthese beteiligt ist.

In Abb.41b ist ein multiples Aminosäuresequenzalignment gezeigt. Reste, deren C_α-Atome weniger als 1,0 Å von den C_α-Atomen der überlagerten Reste der PPO entfernt liegen, sind in blau geschrieben und mittelgrau unterlegt. Diese Regionen sind alle an der FAD-Bindung beteiligt wie auch die am meisten konservierte Region der Sequenz (Reste 15 bis 65). Daher kann die hohe Ähnlichkeit dieser Strukturen mit der gemeinsamen Funktion der Enzyme, FAD zu binden, erklärt werden. Die Substratbindedomäne wie auch insbesondere die Membranbindedomäne der PPO sind weder von der Sequenz noch von der Struktur her mit den anderen Enzymen verwandt, was durch eine FASTA Suche auf der „swall protein sequence data base“ und dem „DALI-server“ (Holm and Sander, 1993) verifiziert wurde.

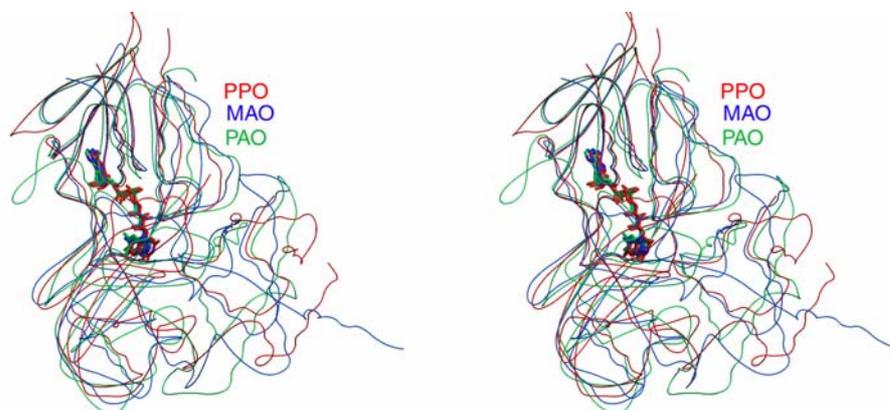


Abbildung41: a Überlagerung der Strukturen der strukturell am nächsten mit der PPO (rot) verwandten Strukturen Monoamin-Oxidase (Binda et al., 2002) (MAO, blau) und Polyamin-Oxidase (Binda et al., 1999) (PAO, grün).

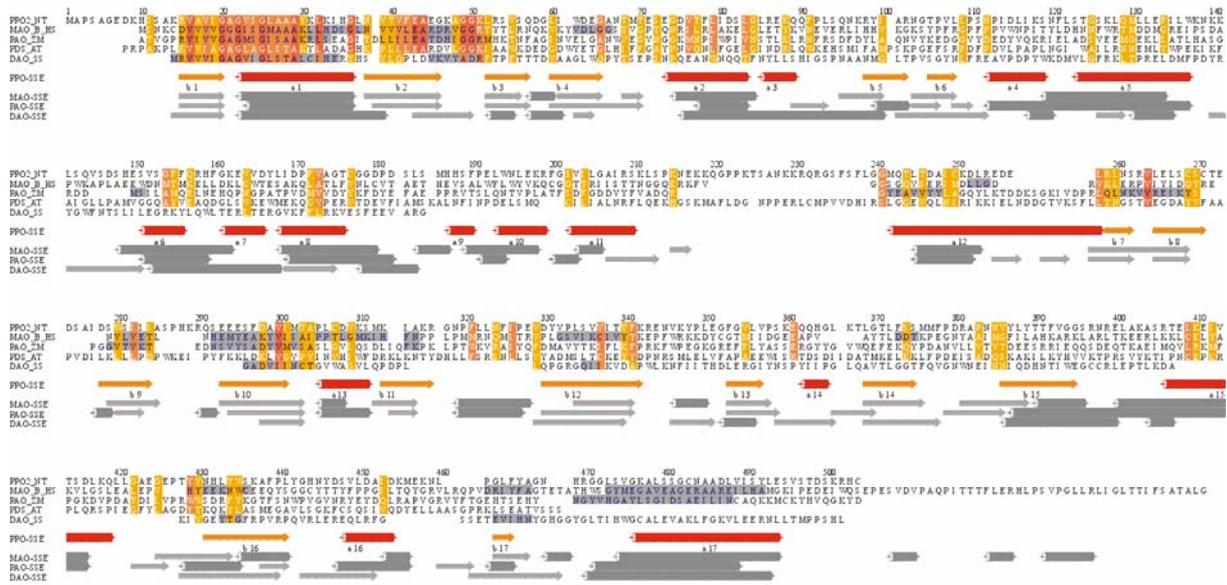
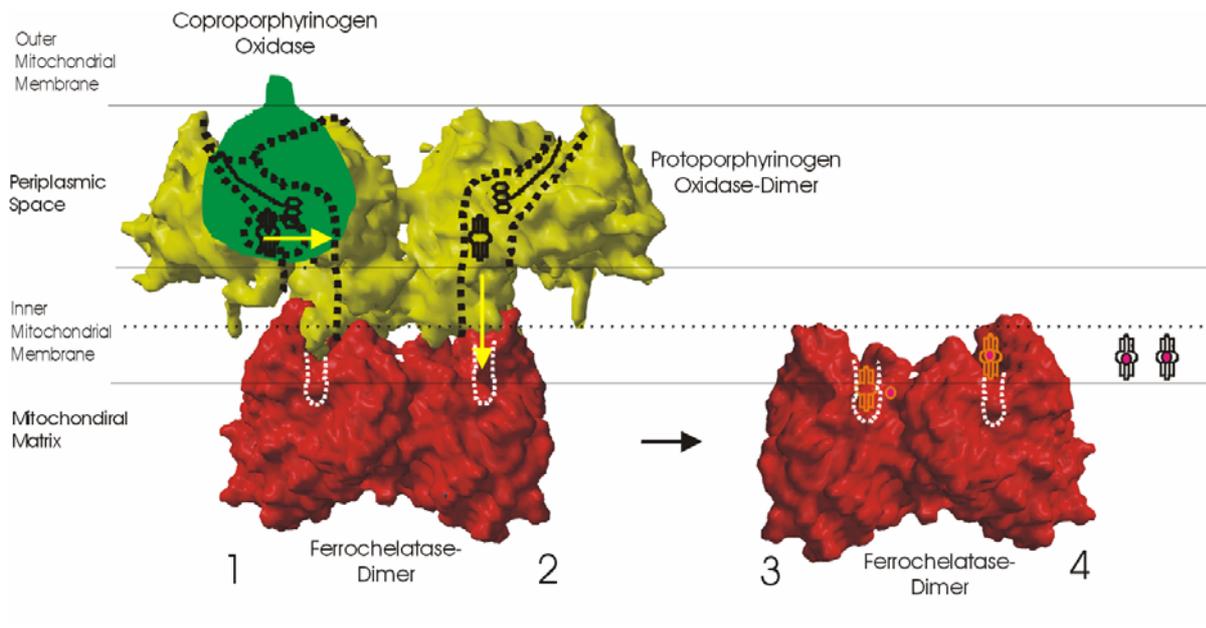


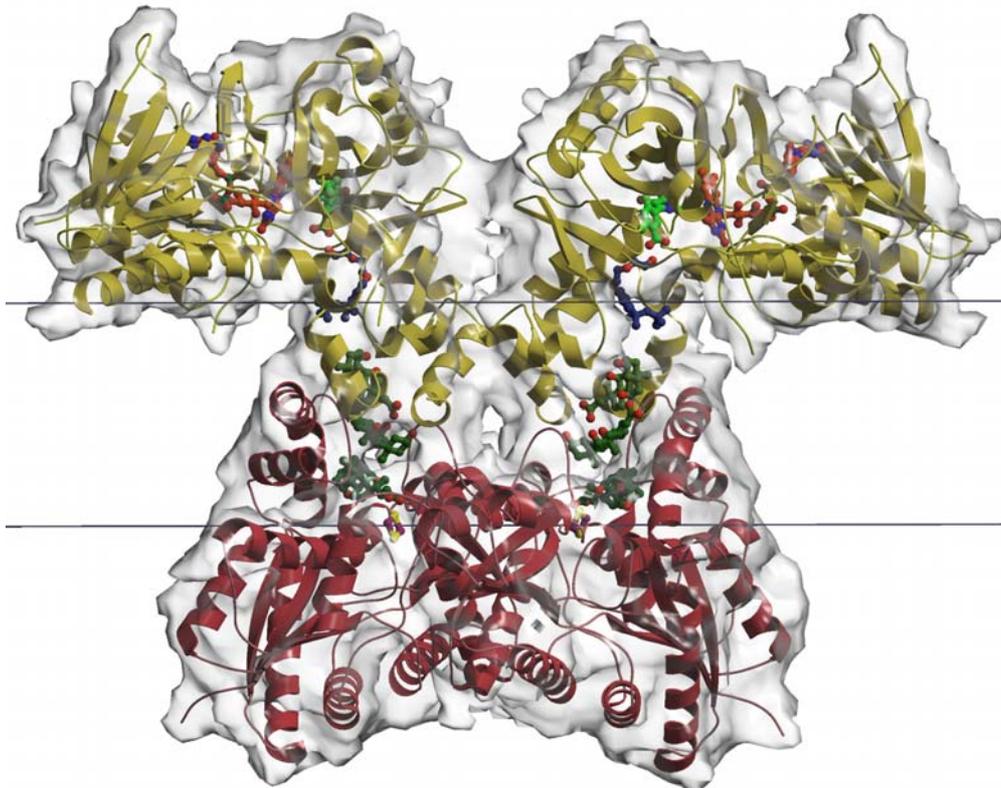
Abbildung41: b Strukturbasiertes multiples Aminosäure Sequenz-Alignment der Enzyme der p-Hydroxybenzoate-Hydroxylase-Faltung (Schreuder et al., 1992) (PHBH): mitochondrial Protoporphyrinogen IX Oxidase aus *N. tabacum* (PPO2_NT), humane Monoamin-Oxidase B (MAO_B_HS), Polyamin-Oxidase aus *Zea mays* (PAO_ZM), Phytoen-Desaturase (Norris et al., 1995) aus *Arabidopsis thaliana* (PDS_AT) und D-Aminosäure Oxidase aus *Sus scrofa* (Mizutani et al., 1996) (DAO_SS). Darunter sind die Sekundärstrukturelemente (SSE) der PPO (in rotundgelb-orange) und von MAO, PAO und DAO (in dunkel- und hellgrau) gezeigt.

6.1.3 Produktprozessierung im Komplex mit der Ferrochelatase



a

Abbildung42: Vorgeschlagene Zusammenlagerung der drei letzten Enzyme in der menschlichen Hämbiosynthese. a Lokalisation der Coproporphyrinogen III Oxidase (Santana et al., 2002) (CPO, EC 1.3.3.3, grün), Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO, Oberfläche der Tabakstruktur in gelb) und menschliche Ferrochelatase (Wu et al., 2001) (HFc, rot) im mitochondrialen Periplasma.



b

b Vermuteter PPO-HFc-Komplexes, die PPO-Faltung ist in gelb gezeigt, HFc in rot, der PPO-Tunnel und der Protoporphyrin IX-Kanal im Komplex sind mit dem Cofaktor FAD (PPO, rot-orange), dem PPO-Inhibitor (INH, grün), den Detergenzmolekülen Triton-X-100 (PPO-Teil des Kanals, blau) und drei Cholat-Molekülen (HFc, oliv-grün) gefüllt. Die innere Mitochondrienmembran ist durch schwarze Linien dargestellt.

Der gedockte Komplex zwischen der PPO2NT und der HFc (Abb.42b) zeigt interessanterweise, dass die beiden Strukturen fast vollständig aufeinander passen. Interessanterweise sind die Kontaktflächenreste der PPO identisch mit denjenigen, die den 800 Å Kristallkontakt herstellen, der oben beschrieben ist (Abb.42b). Der Teil der Komplexes, der die innere Membran durchspannen sollen, hat eine Länge von 28 Å, was gut der angenommenen Breite des Lipidteils einer Membran von 30 Å entspricht. Eine ansprechende Eigenschaft des Modells ist der Überlappen der Kanalöffnungen von PPO2 und HFc, die die ungestörte Produkt/Substrat – Diffusion von den aktiven Zentren des PPO2-Dimers in diejenige der dimeren HFc im Komplex vereinfachen. Im Komplex könnte die Aufnahme des Protoporphyrinogen IX von der periplasmatischen Seite her erfolgen durch die Öffnung unterhalb der Öffnung des aktiven Zentrums der PPO2, vielleicht über einen Komplex mit der Coproporphyrinogen III Oxidase, die das Substrat in tierischen Mitochondrien zur Verfügung stellt. Nach Oxidation des Protoporphyrinogen IX, könnte das Produkt dann zur Fc geleitet werden, und wird nach Eiseninsertion in die Membran entlassen durch die laterale Öffnung der verbundenen Kanäle. Die Beobachtung, dass Eiseninsertion durch die Fc nur in Anwesenheit von PPO stattfinden kann (Ferreira et al., 1988), spricht für einen physiologischen Komplex zwischen den beiden Komponenten.

Die CPO bindet auf die Innenseite der äußeren Mitochondrienmembran der menschlichen Mitochondrien. Die PPO bindet auf die Außenseite der inneren Mitochondrienmembran und die Ferrochelatase auf die gegenüberliegende Innenseite der inneren Mitochondrienmembran (Abb.42b). Von links nach rechts ist die Reaktionssequenz von der Protoporphyrinogen IX Aufnahme der PPO von der CPO (1), der Reaktion zu Protoporphyrin IX in der PPO und dem Transport in das aktive Zentrum der Ferrochelatase (2), Insertion des Eisenions in das Protoporphyrin IX unter Bildung von Protohäm oder Häm b (3) und dessen Freisetzung in die Membran (4) dargestellt. Der Kanal von der PPO zur HFc ist membranoffen auf der PPOseite des PPO-HFc-komplexes, hier können Moleküle in den Komplex eintreten oder ihn verlassen.

6.1.4 Porphyrin Variegata

Es sind mehrere Stoffwechselkrankheiten bekannt, deren Ursache im Fehlen oder der gestörten Funktion von Enzymen der Porphyrinbiosynthese liegt (Sassa, 2002). Beim Menschen ist ein Defekt der PPO, der zu verminderter Enzymaktivität führt, verantwortlich für die dominant vererbte Krankheit Porphyrin Variegata, deren offensichtlichste Anzeichen Lichtempfindlichkeit der Haut der Patienten sind. Bei mehr als 94 % aller Patienten ist Arg59 zu Tryptophan mutiert (Maneli et al., 2003). Der Rest im mitochondrialen Tabakenzym, der dem menschlichen Arg59 entspricht, das in Maus und Drosophila konserviert ist, ist Asn67, das in allen bekannten Pflanzenenzymen konserviert ist (Abb.40, Tab.7). Asn67 sitzt auf einem Loop zwischen dem Isoalloxazinring des FAD und der Substratbindestelle. Ein großer Tryptophanrest an dieser Stelle kann die Proteinstruktur im aktiven Zentrum stören und mit der FAD und Substratbindung interferieren. Eine Arg59Lys-Mutante der menschlichen PPO zeigte noch mehr als ein Drittel der Wild-Typ-Aktivität, wohingegen Arg59Ser und Arg59Ile Mutanten nahezu inaktiv sind, was die Bedeutung eines positiv geladenen Restes an dieser Stelle zeigt (Maneli et al., 2003).

6.2 Umecyanin (Vergleich mit Stellacyanin und alkalischer Übergang)

Die Überlagerung von Stellacyanin und Umecyanin zeigt eine rmsd-Abweichung von 0,94 Å über 101 von 107 Resten des Umecyanins. Besondere Abweichungen ergeben sich im Bereich des variablen Stranges β_5 (Abb.43). Dieser Strang trägt insbesondere zu den Dimer-Dimer-Wechselwirkungen beim Umecyanin bei. Da beim Stellacyanin ein Dimer nicht so deutlich auszumachen ist wie beim Umecyanin, kann der Unterschied in dieser variablen Region als Grund gesehen werden.

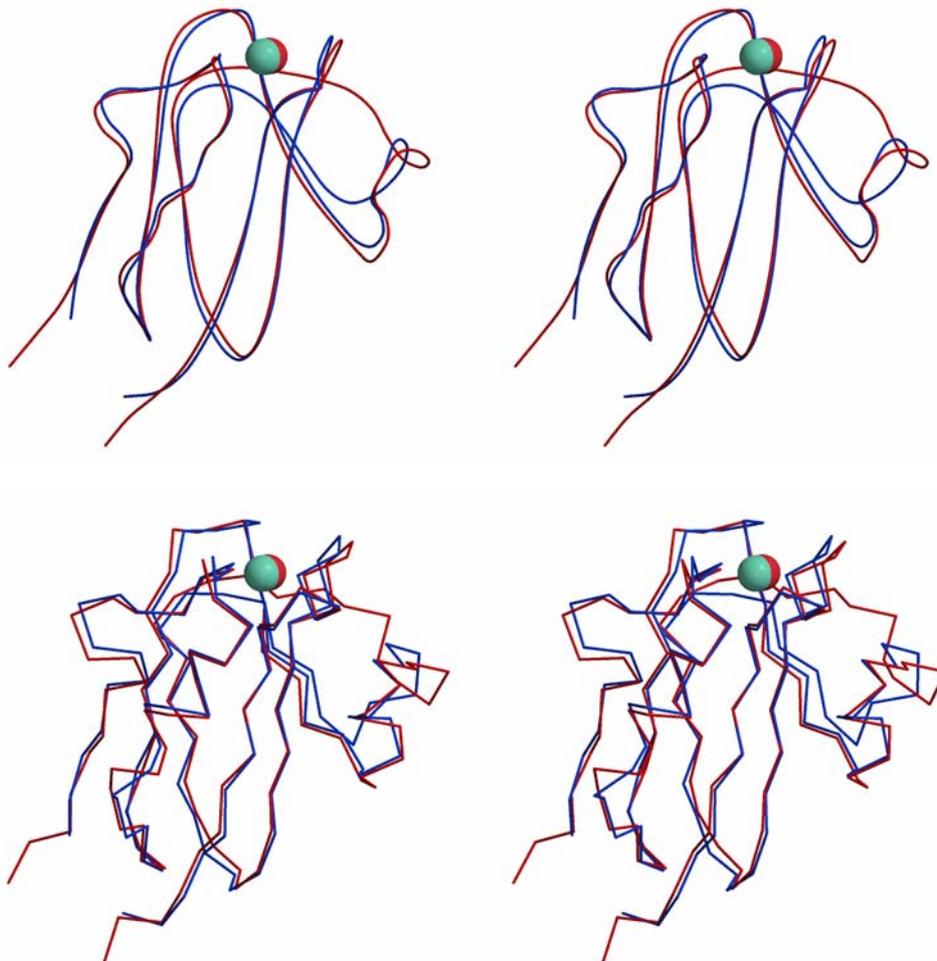


Abbildung43: Überlagerung der Strukturen von Stellacyanin (SCY, rot) und Umecyanin (UME, blau), jeweils dargestellt als C_α -Verbindungslinien. Die Kupferatome der beiden Proteine sind als rote bzw. zyanfarbene Kugeln dargestellt. Rechts unterhalb der Kupferzentren befindet sich die variable Region um Strang β_5 , der einzige Teil der Umecyaninstruktur, der deutlich mehr als 1 Å von der Stellacyaninstruktur abweicht.

Die Struktur der oxidierten Form des Umecyanin ähnelt sehr derjenigen des Stellacyanin. Auch die Koordination des Cu^{II} -Ions ist sehr ähnlich. Die reduzierte Form des Umecyanin, die erste Struktur eines reduzierten Stellacyanin, zeigt deutliche Abweichungen in der Koordination des Cu^{I} gegenüber der in der oxidierten Form. Der Abstand des Gln-Liganden nimmt deutlich zu,

was dazu führt, dass die Koordination des Kupfers von tetraedrisch nach trigonal pyramidal wechselt.

Die Struktur des Umecyanin nach dem alkalischen Übergang bei hohem pH-Wert war leider aufgrund der Zerstörung der Kristalle durch die aggressive Natronlauge nicht möglich. Ein milderer Verfahren, z.B. Zugabe von CAPS-Puffer (pH 11,0) führte nicht zum erwünschten Farbübergang, da diese Bedingung nicht alkalisch genug war.

Eine Möglichkeit, den alkalischen Übergang doch noch kristallographisch zu beobachten, bestünde in der Anwendung des modifizierten Free-mounting Systems, bei dem man gezielt durch eine mikrofeine Kapillare geringe Mengen Natronlauge auf den Kristall aufbringen und dabei sowohl optisch als auch röntgenkristallographisch die Änderungen nahezu zeitgleich verfolgen könnte.

6.3 Lumazinsynthese-W27Y-Mutante

Vergleicht man die verschiedenen Wildtyp und W27Y-Strukturen, so erkennt man deutliche Unterschiede in der Seitenkettenkonformation für His94 (Abb.44a). His94 (His88 bei *Aquifex aeolicus*) ist hoch konserviert über alle bekannten Lumazinsynthesesequenzen und soll an den anfänglichen Protontransferschritten der Katalyse beteiligt sein (Zhang et al., 2003). Die Orientierung von His94 variiert abhängig vom gebundenen Liganden, ist aber nahezu völlig unabhängig von der Natur der Restes 27 (Tabelle8). Im Fall der beiden Substratanalogen befindet sich His94 näher an der Ligandenebene (NORAP bei der W27Y-Mutanten und 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidinedion NRAP im Wildtyp) als in den beiden Komplexen mit dem größeren Substratanalogen CEOL, das zwei annelierte Sechsringe enthält. Der kleinste Abstand zwischen His94 und der Inhibitorebene wird in den Strukturen mit gebundenem Riboflavin gefunden. Weitehrhin steht der Ring des His94 nahezu parallel zum Riboflavin, was zu den beobachteten Stacking-Wechselwirkungen zwischen dem eingeschlossenen Riboflavin und His94 und Rest 27 beiträgt (Abstände zwischen den Ebenen um 4 Å) (Gerhardt et al., 2002) (Tabelle8).

Der Rest His142 zeigt eine geringere, aber dennoch beobachtbare Abweichung in den beiden Strukturen mit dem gebundenen Riboflavin im Vergleich zu den Strukturen mit den gebundenen Inhibitoren. His142 (Lys135 bei *A. aeolicus*) soll während der Katalyse eine Salzbrücke zum Phosphation des zweiten Substrates, (3*S*)-3,4-Dihydroxy-2-butanone-4-phosphate, bilden, und wird selbst durch Asp145 (Glu138 bei *A. aeolicus*) in Position gehalten (Zhang et al., 2003). In den Komplexen mit Substrat- und Produktanaloga ist ein Phosphation in die Phosphatbindestelle des zweiten Substrates gebunden (Gerhardt et al., 2002), das keinen direkten Kontakt mit den Inhibitoren aufweist. Das viel größere Riboflavin, das nicht in die Tasche binden können sollte, bewegt die Position von His142 etwas relativ zu den anderen Liganden.

In den CEOL und NORAP Strukturen der W27Y-Mutante und in allen drei Liganden-Strukturen des Wildtyps sind die Positionen der C_α-Atome und die aromatischen Ebenen der Reste Tyr27 und Trp27 nahezu identisch (Abb.44a). Allerdings weicht das C_α-Atom von Tyr27 in der W27Y-Mutanten-Struktur mit gebundenem Riboflavin um 0,6 Å von denen in den anderen Strukturen ab und der aromatische Ring ist sehr flexibel. In den beiden Substrat- und Produktanaloga-Komplexen findet Stacking-Wechselwirkung zwischen dem Liganden und Tyr27 bzw. Trp27 statt. Dies führt zu einer starren Orientierung der Tyr27-Seitenkette, parallel zum Ringsystem mit gut definierter Elektronendichte für diese beiden Liganden (Abb.37a und b, 5.3.3). Die Mutante bindet Riboflavin weniger stark als der Wildtyp. Das

gebundene Riboflavin im Komplex mit der Mutante ist weniger gut definiert als die beiden anderen Liganden und daher kann seine Position nicht zuverlässig bestimmt werden. Dies verhindert aromatisches Stacking und somit die Fixierung von Tyr27.

Die Überlappung des Isoalloxazinrings des Riboflavin mit dem Rest 27 ist substantiell vermindert in der Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp, weil einerseits der einzige aromatische Ring des Tyrosins kleiner ist als das Indolsystem des Tryptophans. Andererseits fehlt die Wechselwirkung zwischen dem N-terminalen Rest Pro8 mit Trp27 im Wildtyp bei dem Komplex mit der Mutante, weil dort die N-terminale Region nicht in der Elektronendichte definiert ist. Die π - π -Stacking-Wechselwirkung zwischen dem aromatischen Rest 27 und dem Pyrimidinsystem trägt vermutlich zur Substratbindeenergie bei (Zhang et al., 2003) Hier ist diese Bindeenergie vermindert und dies führt zu einer reduzierten Affinität für den Liganden.

Der Phenylring des Restes Phe22 im Enzym aus *A. aeolicus* ist um 30° rotiert verglichen mit der Orientierung des Trp27 im *S. pombe* Wildtyp-Enzym, das coplanar zur aromatischen Ebene der gebundenen aromatischen Liganden ist (Zhang et al., 2003). Die Orientierung des Restes Tyr27 in der *S. pombe* W27Y Mutante ist ebenfalls nicht coplanar zur aromatischen Ebene. Daher gleicht die Orientierung des Tyr27 in der Mutante der Situation in dem Protein ohne Liganden. Dies ist der Grund für den geringeren Gehalt an Riboflavin im Riboflavin-Mutante-Komplex verglichen mit dem Riboflavin-Wildtyp-Komplex (Abb.44b).

Tabelle8: Abstand zwischen den Liganden und dem Rest His94. Die berechneten Abstände beziehen sich auf die Position des C_γ -Atoms in His94 und den Positionen des N_5 -Atoms im Riboflavin und den entsprechenden N-Atomen in CEOL und NORAP (d.h. N7(CEOL), N5(NORAP), N5(NRAP)), als Fixpunkten für die Ligandenebene. Der Wert für das Riboflavin in der W27Y-Mutante ist unsicher, wegen der schlechten Dichte des Liganden und wegen seiner daher nicht genau bestimmbarer Position im Modell.

W27Y- Struktur mit Ligand	Abstand	Wildtyp-Struktur mit Ligand	Abstand
riboflavin	~ 5.3 Å	riboflavin	4.9 Å
CEOL	6.1 Å	CEOL	6.5 Å
NORAP	5.5 Å	NRAP	5.5 Å

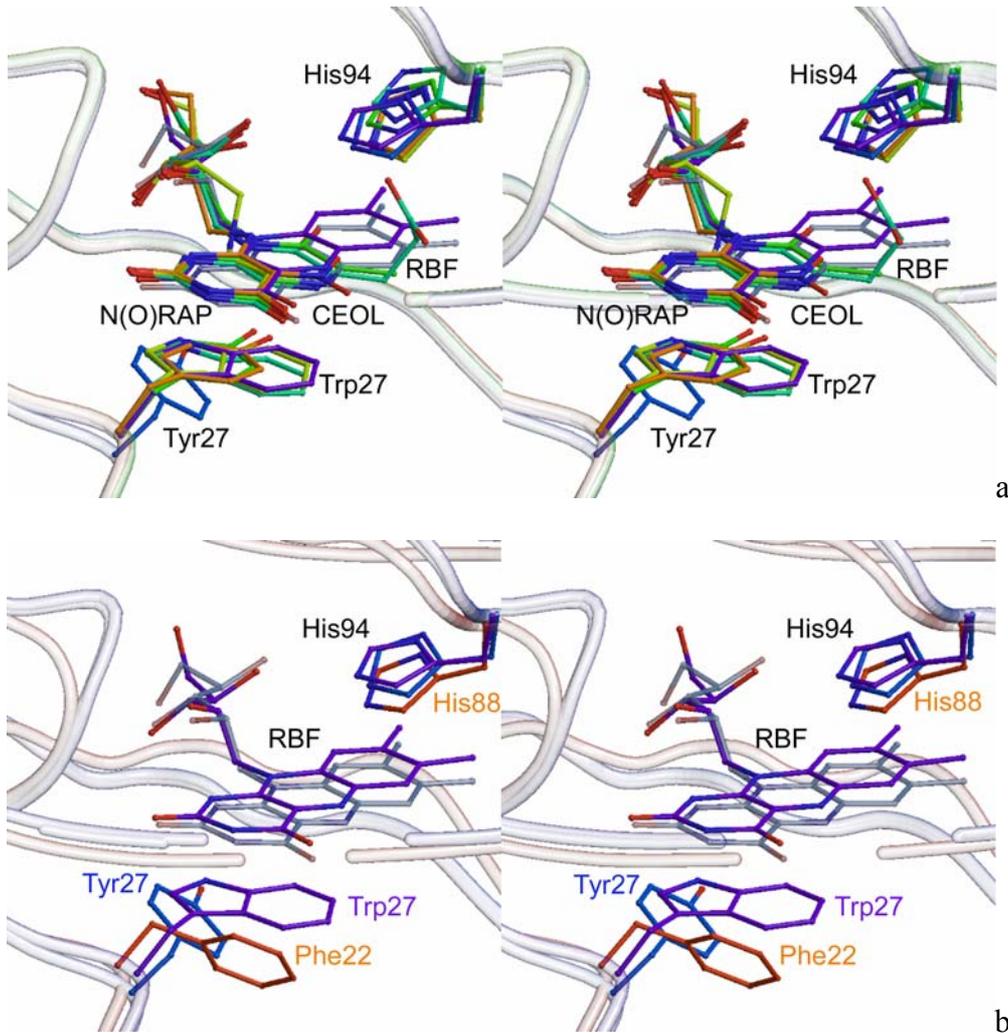


Abbildung44: **a** Strukturalignment der aktiven Zentren der Wildtyp- und W27Y-Mutante Lumazinsynthase-Ligand-Komplexe aus *S. pombe*. (CEOL-Komplexe sind in grün für die W27Y-Mutante und in zyan für das Wildtyp-Enzym, substratanaloge Komplexe in orange für die W27Y-Mutante mit gebundenem NORAP und in gelb für das NRAP-gebundene Wildtyp-Enzym, die Riboflavin-gebundenen Enzyme sind in blau bzw. violett dargestellt). Die Position von Rest His94 wechselt abhängig vom gebundenen Liganden unabhängig von der Art von Rest 27. Die Positionen der aromatischen Ebenen der Reste Tyr27 und Trp27 sind nahezu identisch für fünf der sechs Strukturen. Die C_α-Position von Tyr27 in der Riboflavin-gebundenen Mutante unterscheidet sich von der Position von Rest27 in den anderen Proteinen. **b** Strukturalignment der aktiven Zentren der *S. pombe* Lumazinsynthase-W27Y-Mutante im Komplex mit Riboflavin (blau), des *S. pombe* Lumazinsynthase Wildtyp-Enzyms (violett) und der *A. aeolicus* Lumazinsynthase (orange). Der Rest Phe22 aus *A. aeolicus* hat eine Orientierung 30° gewinkelt zur Orientierung des Trp27 im *S. pombe* Wildtypenzym, das coplanar zur aromatischen Ebene der gebundenen aromatischen Liganden ist (Zhang et al., 2003). Die Orientierung des Restes Tyr27 in der *S. pombe* W27Y-Mutante ist ebenfalls nicht coplanar zur aromatischen Ebene. Daher kann gefolgert werden, dass die Orientierung des Tyr27 in der Mutanten mehr einer ligandenfreien als einer ligandengebundenen ähnelt. Dies entspricht dem geringeren Riboflavinegehalt im Riboflavin-Mutante-Komplex verglichen mit dem Riboflavin-Wildtyp-Komplex.

Im Gegensatz zu Lumazinsynthasen aus anderen untersuchten Organismen bindet das *S. pombe*-Enzym Riboflavin mit relativ hoher Affinität, was auf den π -Komplex zwischen gebundenem Liganden und dem benachbarten Rest X27 zurückzuführen ist.

Das Wildtypenzym bindet Riboflavin stärker als die W27Y-Mutante. Tyrosin hat eine kleinere Interaktionsfläche mit Riboflavin als Tryptophan. Weiterhin spielt vermutlich der N-Terminus eine Rolle. Im Wildtypenzym ist der N-Terminus geordnet, wohingegen er in der W27Y-Mutante ungeordnet ist. Ein vermuteter Grund dafür ist die bessere Wechselwirkung zwischen dem coplanaren Pro8 zu Trp27 als zu Tyr27.

7. Literaturverzeichnis

- Arnould, S., Takahashi, M. and Camadro, J.M. (1999) Acylation stabilizes a protease-resistant conformation of protoporphyrinogen oxidase, the molecular target of diphenyl ether-type herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 14825-14830.
- Bailey, S. (1994) The Ccp4 Suite - Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 50, 760-763.
- Barton, G.J. (1993) Alscript - a Tool to Format Multiple Sequence Alignments. *Protein Engineering*, 6, 37-40.
- Beale, S.I. (1999) Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research*, 60, 43-73.
- Bieger, B., Essen, L.O. and Oesterhelt, D. (2003) Crystal structure of halophilic dodecin: A novel, dodecameric flavin binding protein from *Halobacterium salinarum*. *Structure*, 11, 375-385.
- Binda, C., Coda, A., Angelini, R., Federico, R., Ascenzi, P. and Mattevi, A. (1999) A 30 angstrom long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure of polyamine oxidase. *Structure with Folding & Design*, 7, 265-276.
- Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubalek, F., Edmondson, D.E. and Mattevi, A. (2002) Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nature Structural Biology*, 9, 22-26.
- Breinlinger, E.C., Keenan, C.J. and Rotello, V.M. (1998) Modulation of flavin recognition and redox properties through donor atom- π interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 8606-8609.
- Breinlinger, E.C. and Rotello, V.M. (1997) Model systems for flavoenzyme activity. Modulation of flavin redox potentials through tau-stacking interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 119, 1165-1166.
- Brunger, A.T. (1992) Free R-Value - a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal-Structures. *Nature*, 355, 472-475.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 54, 905-921.
- deLaFortelle, E. and Bricogne, G. (1997) Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. In *Macromolecular Crystallography, Pt A*, Vol. 276, pp. 472-494.
- Dennison, C., Harrison, M.D. and Lawler, A.T. (2003) Alkaline transition of phycocyanin: a comparison of stellacyanin and umecyanin. *Biochemical Journal*, 371, 377-383.
- Dennison, C. and Lawler, A.T. (2001) Investigations of the alkaline and acid transitions of umecyanin, a stellacyanin from horseradish roots. *Biochemistry*, 40, 3158-3166.
- Esnouf, R.M. (1997) An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 15, 132-&.
- Ferreira, G.C., Andrew, T.L., Karr, S.W. and Dailey, H.A. (1988) Organization of the Terminal 2 Enzymes of the Heme Biosynthetic-Pathway - Orientation of Protoporphyrinogen Oxidase and Evidence for a Membrane Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 3835-3839.
- Ferreira, G.C. and Dailey, H.A. (1988) Mouse Protoporphyrinogen Oxidase - Kinetic-Parameters and Demonstration of Inhibition by Bilirubin. *Biochemical Journal*, 250, 597-603.
- Fischer, M., Haase, I., Feicht, R., Richter, G., Gerhardt, S., Changeux, J.P., Huber, R. and Bacher, A. (2002) Biosynthesis of riboflavin - 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase of *Schizosaccharomyces pombe*. *European Journal of Biochemistry*, 269, 519-526.
- Fodje, M.N., Hansson, A., Hansson, M., Olsen, J.G., Gough, S., Willows, R.D. and Al-Karadaghi, S. (2001) Interplay between an AAA module and an integrin I domain may regulate the function of magnesium chelatase. *Journal of Molecular Biology*, 311, 111-122.
- Frankenberg, N., Erskine, P.T., Cooper, J.B., Shoolingin-Jordan, P.M., Jahn, D. and Heinz, D.W. (1999) High resolution crystal structure of a Mg²⁺-dependent porphobilinogen synthase. *Journal of Molecular Biology*, 289, 591-602.
- Frishman, D. and Argos, P. (1995) Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 23, 566-579.
- George, G.N., Hedman, B. and Hodgson, K.O. (1998) An edge with XAS. *Nature Structural Biology*, 5, 645-647.
- Gerhardt, S., Haase, I., Steinbacher, S., Kaiser, J.T., Cushman, M., Bacher, A., Huber, R. and Fischer, M. (2002) The structural basis of riboflavin binding to *Schizosaccharomyces pombe* 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *Journal of Molecular Biology*, 318, 1317-1329.
- Ghisla, S. and Massey, V. (1989) Mechanisms of Flavoprotein-Catalyzed Reactions. *European Journal of Biochemistry*, 181, 1-17.
- Hadener, A., Matzinger, P.K., Battersby, A.R., McSweeney, S., Thompson, A.W., Hammersley, A.P., Harrop, S.J., Cassetta, A., Deacon, A., Hunter, W.N., Nieh, Y.P., Raftery, J., Hunter, N. and Helliwell, J.R. (1999) Determination of the structure of seleno-methionine-labelled hydroxymethylbilane synthase in its active form by multi-wavelength anomalous dispersion. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 55, 631-643.
- Hart, P.J., Nersissian, A.M., Herrmann, R.G., Nalbandyan, R.M., Valentine, J.S. and Eisenberg, D. (1996) A missing link in cupredoxins: Crystal structure of cucumber stellacyanin at 1.6 angstrom resolution. *Protein Science*, 5, 2175-2183.
- Hennig, M., Grimm, B., Contestabile, R., John, R.A. and Jansonius, J.N. (1997) Crystal structure of glutamate-1-semialdehyde aminomutase: An alpha-dimeric vitamin B-6-dependent enzyme with asymmetry in structure and active site reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 4866-4871.
- Holm, L. and Sander, C. (1993) Protein-Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices. *Journal of Molecular Biology*, 233, 123-138.
- Hunter, C.A. and Sanders, J.K.M. (1990) The Nature of Pi-Pi Interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 112, 5525-5534.
- Jahn, D., Hungerer, C. and Troup, B. (1996) Unusual pathways and environmentally controlled genes of bacterial heme biosynthesis. *Naturwissenschaften*, 83, 389-400.
- Jones, T.A. (1992) A, yaap, asap, @*?: a set of averaging programs. In E.J. Dodson, S.G., and W. Wolf (ed.), *Molecular Replacement (CCP4)*. Daresbury Laboratory, Warrington, pp. 99-105.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard, M. (1991) Improved Methods for Building Protein Models in Electron-Density Maps and the Location of Errors in These Models. *Acta Crystallographica Section A*, 47, 110-119.
- Jordan, P.M. (1991) *Biosynthesis of Tetrapyrroles*. Elsevier, New York.
- Kabsch, W. (1993) Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants. *Journal of Applied Crystallography*, 26, 795-800.

- Kiefersauer, R., Than, M.E., Dobbek, H., Gremer, L., Melero, M., Strobl, S., Dias, J.M., Soulimane, T. and Huber, R. (2000) A novel free-mounting system for protein crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes. *Journal of Applied Crystallography*, 33, 1223-1230.
- Kraulis, P.J. (1991) Molscript - a Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography*, 24, 946-950.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. and Thornton, J.M. (1993) Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26, 283-291.
- Layer, G., Moser, J., Heinz, D.W., Jahn, D. and Schubert, W.D. (2003) Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of Radical SAM enzymes. *Embo Journal*, 22, 6214-6224.
- Lermontova, I., Kruse, E., Mock, H.P. and Grimm, B. (1997) Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 8895-8900.
- Lermontova, I. (2000) Cloning, molecular biological and physiological characterization of two isoforms of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase. *Dissertation*, Halle (Saale).
- Leslie, A.G.W. (1998) *MOSFLM version 6.0*, Cambridge.
- Loll, P.J., Picot, D. and Garavito, R.M. (1995) The Structural Basis of Aspirin Activity Inferred from the Crystal-Structure of Inactivated Prostaglandin H-2 Synthase. *Nature Structural Biology*, 2, 637-643.
- Maneli, M.H., Corrigan, A.V., Klump, H.H., Davids, L.M., Kirsch, R.E. and Meissner, P.N. (2003) Kinetic and physical characterisation of recombinant wild-type and mutant human protoporphyrinogen oxidases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1650, 10-21.
- Martins, B.M., Grimm, B., Mock, H.P., Huber, R. and Messerschmidt, A. (2001) Crystal structure and substrate binding modeling of the uroporphyrinogen-III decarboxylase from *Nicotiana tabacum* - Implications for the catalytic mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 44108-44116.
- Mathews, M.A.A., Schubert, H.L., Whitby, F.G., Alexander, K.J., Schadick, K., Bergonia, H.A., Phillips, J.D. and Hill, C.P. (2001) Crystal structure of human uroporphyrinogen III synthase. *Embo Journal*, 20, 5832-5839.
- Merritt, E.A., Bacon, D.J. (1997) Macromolecular Crystallography. In *Methods in Enzymology*. Academic, New York, Vol. 277, pp. 505-524.
- Merritt, E.A. and Murphy, M.E.P. (1994) Raster3d Version-2.0 - a Program for Photorealistic Molecular Graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 50, 869-873.
- Messerschmidt, A. (1998) Metal sites in small blue copper proteins, blue copper oxidases and vanadium-containing enzymes. In *Metal Sites in Proteins and Models*, Vol. 90, pp. 37-68.
- Messerschmidt, A., Huber, R. (2000) X-ray Crystallography of Biological Macromolecules. In Meyers, R.A. (ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp. 6061-6107.
- Mills-Davies, N.L., Thompson, D., Cooper, J.B., Shoolingin-Jordan, P.M., et al. (to be published) Structure of Human Ala-Dehydratase.
- Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., Nishina, Y., Shiga, K., Setoyama, C. and Miura, R. (1996) Three-dimensional structure of porcine kidney D-amino acid oxidase at 3.0 angstrom resolution. *Journal of Biochemistry*, 120, 14-17.
- Moser, J., Schubert, W.D., Beier, V., Bringemeier, I., Jahn, D. and Heinz, D.W. (2001) V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *Embo Journal*, 20, 6583-6590.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R. and Honig, B. (1993) Grasp - Graphical Representation and Analysis of Surface-Properties. *Biophysical Journal*, 64, A166-A166.
- Norris, S.R., Barrette, T.R. and DellaPenna, D. (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell*, 7, 2139-2149.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Macromolecular Crystallography, Pt A*, Vol. 276, pp. 307-326.
- Otwinowski, Z.M., W. (1993) DENZO: A Film-processing Program For Macromolecular Crystallography. *Yale Univ. Press*, New Haven, CT.
- Phillips, J.D., Whitby, F.G., Kushner, J.P. and Hill, C.P. (2003) Structural basis for tetrapyrrole coordination by uroporphyrinogen decarboxylase. *Embo Journal*, 22, 6225-6233.
- Santana, M.A., Tan, F.C. and Smith, A.G. (2002) Molecular characterisation of coproporphyrinogen oxidase from *Glycine max* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 289-298.
- Sassa, S. (2002) The porphyrias. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine*, 18, 56-67.
- Schreuder, H.A., Vanderlaan, J.M., Swarte, M.B.A., Kalk, K.H., Hol, W.G.J. and Drenth, J. (1992) Crystal-Structure of the Reduced Form of P-Hydroxybenzoate Hydroxylase Refined at 2.3-Å Resolution. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 14, 178-190.
- Singh, D.P., Cornah, J.E., Hadingham, S. and Smith, A.G. (2002) Expression analysis of the two ferrochelatase genes in *Arabidopsis* in different tissues and under stress conditions reveals their different roles in haem biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 50, 773-788.
- Stockman, B.J., Richardson, T.E. and Swenson, R.P. (1994) Structural-Changes Caused by Site-Directed Mutagenesis of Tyrosine-98 in *Desulfovibrio-Vulgaris* Flavodoxin Delineated by H-1 and N-15 Nmr-Spectroscopy - Implications for Redox Potential Modulation. *Biochemistry*, 33, 15298-15308.
- Vervoort, J., Muller, F., Legall, J., Bacher, A. and Sedlmaier, H. (1985) C-13 and N-15 Nmr Investigation on *Desulfovibrio-Vulgaris* Flavodoxin. *European Journal of Biochemistry*, 151, 49-57.
- Weeks, C.M. and Miller, R. (1999) The design and implementation of SnB version 2.0. *Journal of Applied Crystallography*, 32, 120-124.
- Wendt, K.U., Lenhart, A. and Schulz, G.E. (1999) The structure of the membrane protein squalene-hopene cyclase at 2.0 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology*, 286, 175-187.
- Whitby, F.G., Phillips, J.D., Kushner, J.P. and Hill, C.P. (1998) Crystal structure of human uroporphyrinogen decarboxylase. *Embo Journal*, 17, 2463-2471.
- Wu, C.K., Dailey, H.A., Rose, J.P., Burden, A., Sellers, V.M. and Wang, B.C. (2001) The 2.0 angstrom structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nature Structural Biology*, 8, 156-160.
- Zhang, J.S. and Ferreira, C. (2002) Transient state kinetic investigation of 5-aminolevulinic synthase reaction mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 44660-44669.
- Zhang, X.F., Meining, W., Cushman, M., Haase, I., Fischer, M., Bacher, A. and Ladenstein, R. (2003) A structure-based model of the reaction catalyzed by lumazine synthase from *Aquifex aeolicus*. *Journal of Molecular Biology*, 328, 167-182.