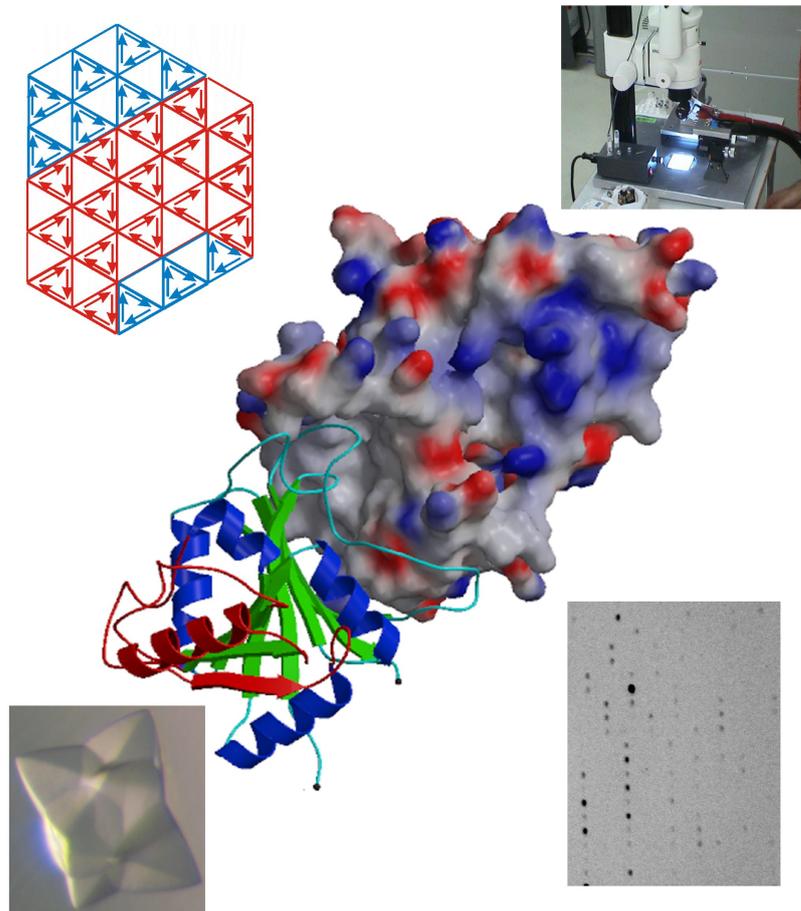


Röntgenkristallographische Untersuchung
mit Problemen der Pseudoinnenzentrierung und
Verzwilligung
von Rib7 einem Protein aus der Biosynthese von Riboflavin



Lorenz Chatwell

Max-Planck-Institut für Biochemie

Abteilung Strukturforschung

D-82152 Martinsried

Max-Planck-Institut für Biochemie

Abteilung Strukturforschung

**Röntgenkristallographische Untersuchung
mit Problemen der Pseudoinnenzentrierung und
Verzwilligung
von Rib7 einem Protein aus der Biosynthese von Riboflavin**

Lorenz Chatwell

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der

Technischen Universität München zur Erlangung

des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. Robert Huber

2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher

Die Dissertation wurde am 22.02.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 11.04.2005 angenommen.

Meinen Eltern,
Großeltern,
Tini und Cora

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Mitte November 2001 bis Mitte April 2005 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich danken für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Anleitung durchzuführen, vor allem jedoch für die große Freiheit, die die Arbeit zu einer sehr angenehmen Erfahrung werden ließ. Die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung mit hervorragenden wissenschaftlichen Arbeitsbedingungen anzufertigen, war ein großes Privileg.

Herrn Prof. Dr. Adelbert Bacher möchte ich für die gute und stets angenehme Zusammenarbeit sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Für seine unermüdliche Hilfe und seinen Einsatz möchte ich mich ganz herzlich bei Tobias Krojer bedanken, der mir, durch seine außerordentlich engagierte und zeitintensive Betreuung, den Einstieg in die Kristallographie ermöglicht hat und mit dem ich als Team auch uns beiden unbekannte Schwierigkeiten überwunden habe.

Im Weiteren gilt mein Dank all den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Bacher, die zu meiner Arbeit beigetragen haben, insbesondere Dr. PD Markus Fischer.

Bei Dr. PD Tim Clausen möchte ich mich für seine Unterstützung und Betreuung im ersten Jahr meiner Doktorarbeit bedanken. Außerdem gilt mein Dank den Post Docs Dr. Peter Sondermann, Dr. Manuel Than und Dr. Klaus Maskos. Vielen Dank für die vielen Antworten, Diskussionen und die große Unterstützung! Dr. Reiner Kiefersauer möchte ich für die Einführung und Unterstützung zur Transformation von Kristallen danken, wodurch die Strukturlösung erst ermöglicht wurde.

Mein Dank gilt auch Frau Renate Rüller, Frau Monika Bumann, Herrn Werner Dersch und Herrn Ottmar Paul für die immer freundliche Hilfe und unverdrossene Unterstützung bei der Überwindung diverser technischer und bürokratischer Hin-

dernisse.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Abteilung Strukturforschung möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Dies gilt insbesondere für Kerstin Rohr, Katja Wenig und Stefan Henrich.

Auch danke ich meinen Freunden außerhalb des Labors, Ralf Pieckert, Hannes Keil, Marion Weber, Nicole Euba, Maya Rinklage, Alexander Weiß, Tobias Sinnberg und Verena Güssregen für die oft bereits langjährige Freundschaft.

Last but not least gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, Großeltern, Tini und natürlich Cora für den Rückhalt und die moralische Unterstützung über die Jahre hinweg.

Teile der Arbeit sind bzw. werden veröffentlicht in:

Publikationen

Chatwell L, Bacher A, Huber R, Fischer M and Krojer K. (2005) The X-ray structure of the pyrimidine nucleotide reductase of *Methanococcus jannaschii* . In Vorbereitung

Wenig K, Chatwell L, von Pawel-Rammingen U, Bjorck L, Huber R and Sondermann P. (2004) Structure of the streptococcal endopeptidase IdeS, a cysteine proteinase with strict specificity for IgG. Proc Natl Acad Sci U S A, 50:17371-6.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1.1	Ziel dieser Arbeit	1
1.2	Rib7	1
2	Einleitung	3
2.1	Riboflavinbiosynthese	3
2.1.1	NADH bzw. NADPH und FADH ₂ sind die wichtigsten Elektronen- Transporter bei der Oxidation von Brennstoffmolekülen . . .	3
2.1.2	NADPH ist der wichtigste Elektronendonator bei reduktiven Biosynthesen.	3
2.1.3	GTP - Die Ausgangssubstanz verschiedener Coenzym - Bio- synthesewege	4
2.1.4	Riboflavin	5
2.1.5	<i>Methanococcus jannaschii</i>	10
2.2	Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	12
2.2.1	Überblick	12
2.2.2	Zusammenfassung der Strukturlösung durch Röntgenstrahl- kristallographie	13
2.2.3	Messung von Kristallen	14
2.2.4	Datenauswertung und Skalierung	14
2.2.5	Berechnung der Elektronendichte	16

2.2.6	Zweidimensionale Darstellung von Strukturfaktoren	18
2.2.7	Friedelpaare	18
2.2.8	Lösung des Phasenproblems	19
2.2.9	Isomorpher Ersatz	20
2.2.10	Bestimmung der Proteinphasen	21
2.2.11	Finden weiterer Schwermetallpositionen	23
2.2.12	Bedingungen für SIR-Lösungen	23
2.2.13	Direkte Methoden	24
2.2.14	Multiple Anomale Dispersion	24
2.2.15	Molekularer Ersatz	30
3	Material und Methoden	33
3.1	Materialien und Geräte	33
3.1.1	Materialien	33
3.1.2	Geräte	34
3.2	Proteinchemische Methoden	35
3.2.1	Sequenzanalyse und -vergleiche	35
3.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	35
3.2.3	Pufferwechsel von Proteinlösungen mit Hilfe der Dialyse . .	36
3.2.4	Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.2.5	Coomassie-Färbung	38
3.2.6	Transfer von Proteinen durch Elektroblothing	39
3.2.7	N-terminale Sequenzierung nach EDMAN	40
3.2.8	Ausschlußchromatographie (Gelfiltration)	40
3.2.9	Massenspektrometrie	41
3.2.10	Analytische Ultrazentrifugation	42
3.2.11	Dynamische Lichtstreuung	44
3.2.12	Konzentrierung von Proteinlösungen	44
3.3	Röntgenkristallographische Methoden	45
3.3.1	Kristallisation	45
3.3.2	Datensammlung bei 291 K	45

3.3.3	Kryokristallographie bei 100 K	46
3.3.4	Kristalltransformation	46
3.3.5	Datenauswertung	48
3.3.6	Phasierung	48
3.3.7	Modellbau und Verfeinerung	49
3.3.8	Modelling	50
3.3.9	Strukturanalyse und graphische Darstellung	50
3.4	Kristallanomalien	51
3.4.1	Verzwilligung	51
3.4.2	Allgemeine Anzeichen für Zwillingskristalle	55
3.4.3	Erkennen von Pseudo-merohedralem- und Merohedralem Ver- zwilligung	56
3.4.4	Pseudoinnenzentrierung	58
3.4.5	Entzwilligung der Daten	62
4	Ergebnisse und Diskussion	65
4.1	Ergebnisse	65
4.1.1	Kristallisation	65
4.1.2	Derivatisierung mit Selen	67
4.1.3	Datensammlung und Strukturlösung	67
4.1.4	Probleme bei der Strukturlösung	68
4.1.5	Pseudoinnenzentrierung	68
4.1.6	Problemlösung	69
4.1.7	Kristalltransformation	69
4.1.8	Datensammlung und Strukturlösung	70
4.1.9	Verfeinerung mit CNS	72
4.1.10	Probleme bei der Verfeinerung	73
4.1.11	$P4_12_12$	74
4.1.12	Verzwilligung	76
4.1.13	Strukturbeschreibung	81
4.1.14	Die Nucleotidbindungsstelle	85

4.1.15 Aktives Zentrum	89
4.2 Diskussion	96
5 Abkürzungen	99
Literatur	101

1 Zusammenfassung

1.1 Ziel dieser Arbeit

Essentielle Enzyme der Riboflavin- und der Cofaktor F_{420} -Biosynthese spielen eine wichtige Rolle als potentielle Target-Proteine bei der Entwicklung neuer inhibitorischer Wirkstoffe in der Medizin. Ziel der Arbeit war, durch röntgenkristallographische Untersuchungen an dem Schlüsselenzym Rib7 dieses Stoffwechselweges, detaillierte strukturelle Kenntnisse des Reaktionszentrums zu erlangen und somit die Basis zu einem rationalen „Drug-Design“ zu ermöglichen.

1.2 Rib7

Riboflavin (Vitamin B2) spielt in Form seiner Flavocoenzyme FMN (Riboflavin-5'-Phosphat; Flavinmononukleotid) und FAD (Flavinadenindiphosphat, Flavinadenindinukleotid) in allen Organismen für die Katalyse von vielen Redox-Reaktionen und für eine Vielzahl anderer Funktionen im Stoffwechsel eine entscheidende Rolle. Nach der Umsetzung von GTP zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5-phosphat, folgt eine Sequenz von Desaminierung und Reduktion, deren Reihenfolge vom jeweiligen Organismus abhängig ist. Bei Eubakterien und Pflanzen wird zuerst der Pyrimidinring an Position 2 desaminiert und dann die Ribosylseitenkette reduziert (Burrows, 1978), bei Hefen und anderen Pilzen ist die Reaktionsreihenfolge umgekehrt (Bacher and Lingens, 1970; Nielsen and Bacher, 1981). Graup-

ner et al (Graupner, 2002) zeigen, daß Archaeobakterien den Biosyntheseweg der Hefen verwenden. Rib7 aus *Methanococcus jannaschii* katalysiert eine Reduktion von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5-phosphat, bei der als Produkt 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat entsteht, ein biosynthetischer Vorläufer des Riboflavin. In faktoriellen Screening-Experimenten konnten eine reproduzierbare Kristallisationsbedingung gefunden werden und die daraus resultierenden Kristalle wurden in röntgenkristallographischen Untersuchungen eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig die Kristallstruktur eines der Enzyme der frühen Reaktionen der Riboflavinbiosynthese beschrieben werden. Die Struktur wurde mittels "Multiple Wavelength Anomalous Diffraction" (MAD) gelöst.

Bei der Strukturlösung ergaben sich Probleme der Pseudoinnenzentrierung und der Verzwilligung. Mit Hilfe des „Free mounting Systems“ konnten die Kristalle jedoch so transformiert werden, daß die Probleme überwunden werden konnten und die Strukturlösung möglich war. Das Atommodell mit gebundenem NADPH-Cofaktor wurde bei einer Auflösung von $2,7 \text{ \AA}$ auf einen kristallographischen R-Faktor von 23 % verfeinert.

Modellierungen der Substratbindung und der Substratumsetzung erlauben eine genaue Untersuchung der Spezifität. Dies wäre die Voraussetzung für ein rationales „Drugdesign“. So könnte die Struktur von Rib7 die Basis zur Entwicklung von Inhibitoren sein, die nicht nur als Antiinfektika gegen humanpathogene Krankheiten eingesetzt werden könnten, sondern gleichzeitig auch, um Pflanzen und Eubakterien wirkungsvoll vor Pilzen zu schützen. Außerdem könnte auf Grund der hohen Sequenzhomologie zwischen Rib7 und den orthologen Enzymen in Pflanzen und Eubaktieren, die Möglichkeit eines Homologiemodelling bestehen.

2 Einleitung

2.1 Riboflavinbiosynthese

2.1.1 NADH bzw. NADPH und $FADH_2$ sind die wichtigsten Elektronen-Transporter bei der Oxidation von Brennstoffmolekülen

Chemotrophe Organismen gewinnen freie Energie aus der Oxidation von Nahrungsstoffen wie Glukose und Fettsäuren. Das NAD^+ bzw. $NADP^+$ sind die wichtigsten Elektronenakzeptoren bei der Oxidation von Brennstoffen. Beiden gemeinsam ist das Nicotinamidringssystem als reaktiver Teil. Bei der Oxidation eines Substratmoleküls nimmt dieser Nicotinamidring ein Wasserstoffion und zwei Elektronen, entsprechend einem Hydridion, auf. Der zweite wichtige Elektronen-Transporter bei der Oxidation von Nahrungsstoffen ist das Flavinadenindinucleotid. Dieses setzt sich aus einem Riboflavinmolekül und zwei Molekülen ATP zusammen.

2.1.2 NADPH ist der wichtigste Elektronendonator bei reduktiven Biosynthesen.

Bei den meisten Biosynthesen liegen die Vorstufen in einer höheren Oxidationsstufe vor als die Produkte. Man braucht also zusätzlich zum ATP noch weitere Reduktionsäquivalente. NADPH unterscheidet sich von NADH dadurch, daß die 2'-

Hydroxylgruppe seines Adenosins mit Phosphat verestert ist. NADPH transportiert Elektronen in der gleichen Weise wie NADH, jedoch wird NADPH fast ausschließlich für reduktive Biosynthesen verwendet, NADH dagegen in erster Linie zur Erzeugung von ATP. Die Besonderheit von Rib7 ist, daß es beide Elektronentransporter alternativ verwenden kann. In unserer Struktur hatte Rib7 jedoch nur NADPH gebunden. Die Strukturformel und die Abgabe eines Hydridions von NADPH sind schematisch in 2.1 dargestellt. Im Unterschied zu NADPH ist im NADH die rot dargestellte Phosphatgruppe durch ein Wasserstoffatom ersetzt.

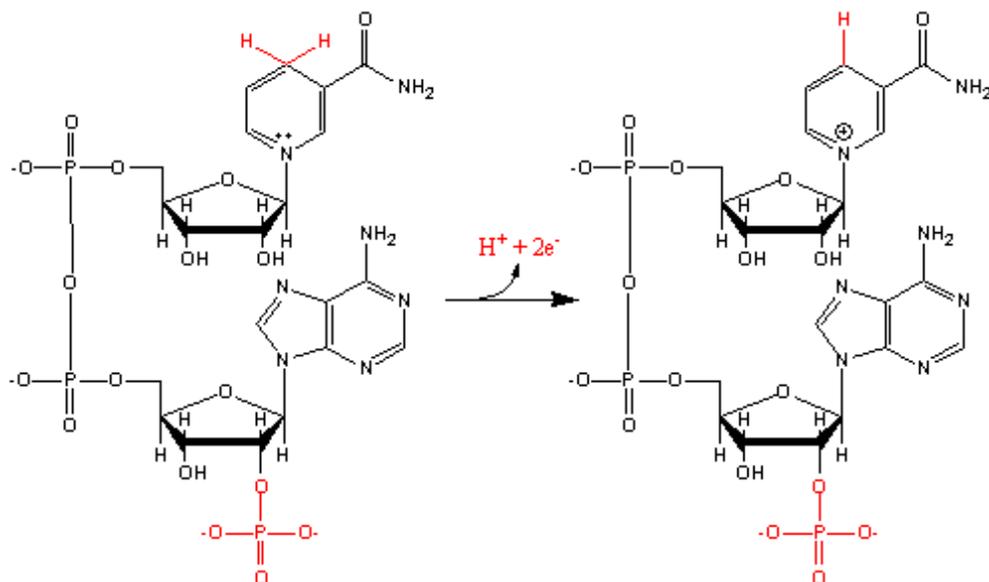


Abbildung 2.1: Reaktionsmechanismus von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zu NADP^+

2.1.3 GTP - Die Ausgangssubstanz verschiedener Coenzym - Biosynthesewege

Enzyme bestehen oftmals aus einem Proteinanteil und einem niedermolekularen organischen Cofaktor, dem so genannten Coenzym, das für die Katalyse unverzichtbar ist. Einige Coenzyme, wie Flavinadenindinukleotid (FAD) leiten sich von Vitaminen ab, die vom tierischen Körper nicht selbst hergestellt werden können und daher mit der Nahrung aufgenommen werden müssen. Im Gegensatz zu Tieren sind Pflanzen und viele Mikroorganismen in der Lage, die von ihnen benötigten Vitamine zu

synthetisieren und fungieren damit als wichtige Nährstoffquellen. Zusätzlich stellen die entsprechenden Biosynthesewege attraktive Ziele für Antiinfektiva oder Herbizide dar, da das Problem der Toxizität gegenüber dem Menschen und höheren Tieren reduziert ist. Dies wird hier noch verstärkt, da Gram-Negative Bakterien absolut auf endogen synthetisiertes Riboflavin angewiesen sind, da sie kein System für die Aufnahme von Flavinen und Flavincoenzymen besitzen. Dies führt dazu, daß riboflavindefiziente Mutanten, wie z.B. von *E. coli* und *Salmonella sp.* nur bei extrem hohen Konzentrationen an exogenem Riboflavin wachsen können. Dasselbe gilt für Hefen wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida guilliermondii* (Müller, 1992; Bacher, 1996, 2000, 2001; Young, 1986). Deshalb sollten diese Organismen anfällig für Inhibitoren der Riboflavinbiosynthese sein, die sich damit als neue besonders effektive Antiinfektiva qualifizieren sollten. Die strukturelle und mechanistische Untersuchung des Riboflavinstoffwechsels, könnte somit als Basis für ein „rational drug design“ dienen. Neben seiner Funktion als Baustein der DNA stellt Guanosintriphosphat (GTP) die Ausgangssubstanz verschiedener Coenzym-Biosynthesewege dar. Die Umsetzung von GTP zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat ist bei Pflanzen und Mikroorganismen der erste Schritt der Riboflavin (Vitamin B2) - Biosynthese (Müller, 1988) Der Ausgangsstoff ist Ribulose-5-phosphat (Ru5P).

2.1.4 Riboflavin

Riboflavin (Vitamin B2) spielt in Form seiner Flavocoenzyme FMN (Riboflavin-5'-Phosphat; Flavinmononukleotid) und FAD (Flavinadenindiphosphat, Flavinadenindinukleotid) in allen Organismen für die Katalyse von vielen Redox-Reaktionen und für eine Vielzahl anderer Funktionen im Stoffwechsel eine entscheidende Rolle. So wird es für die Acyl-CoA-Dehydrogenase der Beta-Oxidation, die NADH-Dehydrogenase der Atmungskette und die Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus benötigt, um nur einige Beispiele zu nennen. Außerdem sind die Monoaminoxidasen der Flavoproteine auf die Co-Enzymformen von Riboflavin angewiesen. Des

Weiteren sind Flavocoenzyme an einer Vielzahl anderer physiologischer Prozesse wie Phototropismus (Briggs and Huala, 1999; Salomon et al., 2001; Crosson and Moffat, 2001), Biolumineszenz (Meighen, 1991; O’Kane and Prasher, 1992; Meighen, 1993) und DNA-Photoreparatur (Thompson and Sancar, 2002) beteiligt.

Seit der Entdeckung der Flavine in den 30iger Jahren wurden durch umfangreiche Forschungsarbeiten zahlreiche flavinabhängige Redoxenzyme identifiziert. In den letzten Jahren sind zahlreiche Übersichtsartikel zu den Arbeiten am Biosyntheseweg von Riboflavin erschienen (Bacher et al. 2001, 2000, 1996, 1993a, 1993b, 1991, Plaut et al. 1974, Plaut, 1971, 1961, Brown et al. 1982, 1963).

Die Biosynthese von Riboflavin (Vitamin B₂) geht von zwei verschiedenen Primärmetaboliten, beginnend mit einem Molekül GTP und zwei Molekülen ribulose 5-phosphat, aus (2.2). In Eubakterien, Pflanzen und Hefen katalysiert die GTP-Cyclohydrolase II (GCHII) die Umsetzung von GTP zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5-phosphat (15) (Foor and Brown, 1975; 1980). Dabei wird zum einen Formate vom Imidazolring abgegeben und zum anderen Pyrophosphat von der Seitenkette des Nucleotides abgespalten. Es folgt eine Sequenz von Desaminierung und Reduktion, deren Reihenfolge abhängt vom jeweiligen Organismus. Bei Prokaryoten und Pflanzen wird zuerst der Pyrimidinring an Position 2 desaminiert und dann die Ribosylseitenkette reduziert (Burrows, 1978), bei Hefen und anderen Pilzen ist die Reaktionsreihenfolge umgekehrt (Bacher and Lingens, 1970; Nielsen and Bacher, 1981). Diese Abfolge der Reaktion wurde später in *in vitro* Studien von *Ashbya gossypii* und *S. cerevisiae* bestätigt (Hollander, 1979; Klein, 1980; Nielsen, 1981). Ein Enzym, welches die Desaminierungsreaktion von 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5’-phosphat unter der Bildung von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion katalysiert wurde aus einem *E. coli* Zellextrakt 200-fach gereinigt (Burrow, 1987). Dieses konnte die dephosphorylierte Form von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5’-phosphat nicht als Substrat verwenden. Ein Enzym, welches die Reduktion von 2,5-Diamino-6-ribosyl-amino-4(3H)-pyrimidinon-5’-phosphat unter Bildung von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5’-phosphat katalysierte wurde ebenfalls aus ei-

nem *E. coli* Zellextrakt 200-fach gereinigt. Dieses Enzym benötigte NADPH als Cofaktor, konnte aber das dephosphorylierte 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'phosphat nicht als Substrat umsetzen.

Die beiden Eingangsenzyme der Riboflavin-Biosynthese, die GCHII und DBPS, sind in verschiedenen Organismen als monofunktionelle Polypeptide beschrieben worden, so z.B. in *E. coli* (Richter et al., 1992), *Candida guilliermondii* (Volk and Bacher, 1990), und *Methanococcus jannaschii* (Fischer et al., 2002). In Pflanzen (Herz et al., 2000) und *Bacillus subtilis* (Richter et al., 1993) hat man beide Enzymfunktionen in einem bifunktionellen Polypeptid mit zwei getrennten Domänen gefunden. Diese bifunktionelle Enzyme besitzen eine N-terminale Desaminase (II) und eine C-terminale Reduktase (III)-Domäne (Richter et al., 1997). Es resultiert 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5-phosphat (18), welches erst nach Dephosphorylierung zu 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (19, ARP) weiter umgesetzt werden kann. Eine spezifische Phosphatase ist bis heute jedoch noch unbekannt. An dieser Stelle der Riboflavin-Biosynthese treffen sich die jeweils vom GTP bzw. Ru5P herführenden Zweige. Das Enzym 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase (V, DBPS) katalysiert die Umsetzung von Ru5P (23) zu L-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (20, DBP) und Formiat (Neuberger and Bacher, 1986; Volk and Bacher, 1988; 1990; Volk and Bacher, 1991).

Durch den Einbau C^{13} -markierter Vorstufen in wachsende Kulturen von *Ashbya gossypii* konnte gezeigt werden, daß die C4-Einheit regiospezifisch in Lumazin eingebaut wird (Bacher et al., 1983). Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, daß Ribulose-5-phosphat ein direkter Vorläufer der C4-Einheit ist (Volk and Bacher, 1988, 1990). Volk und Bacher konnten schließlich 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat als den C4-Körper identifizieren. Das Enzym, das die Umsetzung von Ribulose-5-phosphat zu 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat katalysiert, ist die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase (DBPS).

DBP und ARP werden von der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase (VI, Lusy) zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (21) kondensiert (Neuberger and Bacher, 1986;

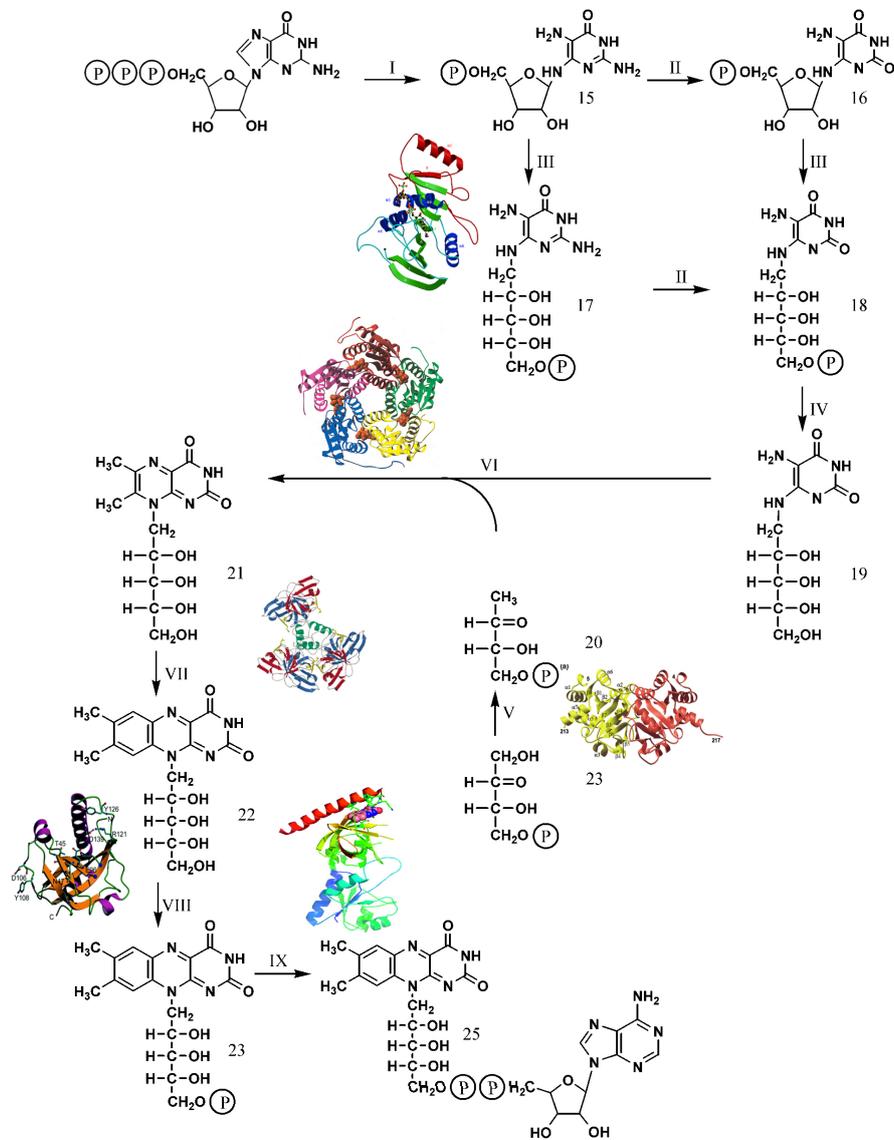


Abbildung 2.2: Riboflavinbiosynthese mit Folgereaktionen zu FMN und FAD. I: Cyclohydrolase II; II: Desaminase; III: Reduktase; IV: Phosphatase; V: 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase; VI: 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin Synthase; VII: Riboflavin Synthase; VIII: Flavokinase; IX: FAD-Synthethase. 1: GTP; 15: 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat; 16: 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat; 17: 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat; 18: 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat; 19: 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion; 20: 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat; 21: 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin; 22: Riboflavin; 23: Ribulose-5-phosphat; 24: FMN; 25: FAD.

Kis and Bacher, 1995). Im letzten Schritt katalysiert die Riboflavin Synthase (VII) die Umsetzung von zwei Molekülen Lumazin zu je einem Molekül Riboflavin (22) und ARP. Letzteres wird in den Biosyntheseweg zurückgeführt (Plaut, 1960; 1963; Wacker et al., 1964; Harvey and Plaut, 1966).

In der Bilanz werden für den Aufbau des Xylenringes des Riboflavins demnach zwei Moleküle DBP und ein Molekül GTP verbraucht. Die biologisch aktiven Cofaktoren Flavinmononukleotid (24, FMN) und Flavinadenindinukleotid (25, FAD) entstehen aus Riboflavin durch Phosphorylierung der Seitenkette durch die Riboflavinkinase (VIII) bzw. eine weitere Umsetzung mit ATP durch die FAD-Synthetase (IX) (Bacher, 1991).

Pflanzen und viele Mikroorganismen können Flavine aus einfachen Grundstoffen synthetisieren. Tiere müssen Riboflavin bzw. Derivate mit der Nahrung aufnehmen (Müller et al. 1988). Wie bereits erwähnt sind zahlreiche humanpathogene Mikroorganismen (z.B. Enterobacteriaceae) auf die endogene Riboflavinbildung zwingend angewiesen und können das Vitamin bzw. die davon abgeleiteten Coenzyme nicht aus dem umgebenden Milieu aufnehmen, da sie nicht über ein entsprechendes Transportsystem verfügen. Hemmstoffe für die Enzyme der Riboflavinbiosynthese könnten deshalb als Antibiotika wirken. Ein Mangel an Riboflavin kann beim Menschen unter anderem zu Stomatitis, Dermatitis und hypochromer Anämie führen. Da Riboflavin jedoch in sehr vielen Lebensmitteln enthalten ist, treten oben genannte Folgeerscheinungen eher selten auf.

Die Riboflavin-Biosynthese (siehe Abbildung 2.2) wurde detailliert in Eubakterien und Pilzen untersucht und ist weitestgehend aufgeklärt (Young, 1986; Bacher et al., 1996, 2001). Bei Archaeobakterien wurden unerwarteterweise anfänglich bei genomischen Sequenzannotationen kaum Gene für die Biosynthese von Coenzymen identifiziert. Dies galt auch für den Biosyntheseweg von Flavinadeninedinucleotiden (FAD), in dem nur wenige „open reading frames“ als möglich erachtet werden konnten (Graupner, 2002). Später konnten zwar die möglichen Biosynthesegene definiert werden, jedoch war eine Etablierung der funktionelle Identität dieser Gene in

keinster Weise möglich. Trotz dem Mangel an bekannten Genen unterstützen frühe biosynthetische Markierungsuntersuchungen bereits die These, daß der Biosyntheseweg des Riboflavin in Archaeobakterien dem bereits etablierten von Bakterien und Hefen gleich und auch auf GTP basierte. Wie oben beschrieben wird bei Prokaryoten zuerst der Pyrimidinring an Position 2 desaminiert und dann die Ribosylseitenkette reduziert (Burrows, 1978), bei Hefen ist die Reaktionsreihenfolge umgekehrt (Bacher and Lingens, 1970; Nielsen and Bacher, 1981). Welchen der beiden Wege jedoch nun tatsächlich in Archaeobakterien vorkommt war lange Zeit unbekannt. Erst 2002 konnten Graupner et al zeigen, daß Rib7 das Genprodukt von *Methanococcus jannaschii* nur 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat in 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat umsetzen kann. Das deaminierte Substrat 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'phosphat des orthologen Enzyms von *E. coli* (RibD), konnte hingegen nicht umgesetzt werden. Damit konnte zum Einen gezeigt werden, daß die vorgeschlagene Annotation von MJ0671 korrekt war und daß zum Anderen Archaeobakterien den Biosyntheseweg der Hefen verwenden.

2.1.5 *Methanococcus jannaschii*

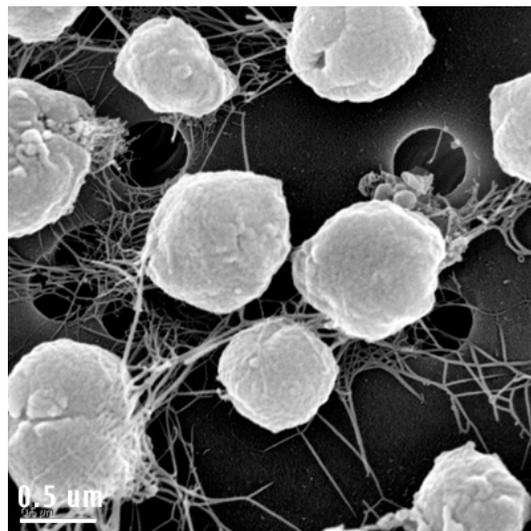


Abbildung 2.3: *Methanococcus jannaschii*

Methanogene Organismen sind ubiquitär in der Microorganismenwelt vertreten. Sie katalysieren den letzten Schritt in der anaeroben Nahrungskette in dem sie einfache Komponenten, wie z.B. Kohlenstoff und Wasserstoff, in Methan reduzieren (Zinder 1993). Organismen des Genus *Methanococcus* sind maritime Methanogene mit einem geringen G/C Gehalt. Die mesophilen, thermophilen und extrem-thermophilen Spezies zeigen kein nahes Verwandtschaftsverhältnis. Deshalb wurden die letzten beiden Spezies in einem separaten Genus zusammengefaßt. *Methanococcus jannaschii* ist ein autotrophes und strikt anaerobisches Archaeobakterium. Ursprünglich entdeckt wurde es von J.A. Leigh aus einer Sedimentprobe eines Unterwasservulkans, die in 2600m Tiefe isoliert wurde (Jones Wolfe, 1983). Sein Lebensraum erstreckt sich in einem Temperaturbereich von 48-94°C mit einem Optimum bei 85°C. Außerdem können Drücke von mehr als 200 Atmosphären vorliegen. Das Genom von *Methanococcus jannaschii* war das erste vollständig sequenzierte aller Archaeobakteriengenome (Bult and Venter, 1996).

Wie oben beschrieben wurde die Riboflavin-Biosynthese (siehe Abbildung 2.2) bereits detailliert in Eubakterien und Pilzen untersucht und ist weitestgehend aufgeklärt (Young, 1986; Bacher et al., 1996, 2001). Strukturell gilt dies nur für die Enzyme nach der noch vollkommen unbekanntem Phosphatase (IV) ((V) Liao et al., (2001); (VI) Ladenstein et al.,(1988); (VII) Gerhardt et al., (2002); (VIII) Bauer et al.,(2003); (IX) Wang et al.,(2005)). Auf Grund der geringen Stabilität der Enzyme und der schlechten Kristallisationseigenschaften, konnten lange Zeit die Enzyme kristallographisch nicht untersucht werden. Da thermostabile Proteine auf Grund ihrer meist rigiden Struktur besser kristallisieren wurde Rib7 von *Methanococcus jannaschii* ausgewählt. Dabei besteht bei Rib7 ein besonderes Interesse, weil sich hier die Biosynthesewege Eubakterien und Pflanzen zu dem von Hefen und anderen Pilzen kurzzeitig unterscheidet. Bei Prokaryoten und Pflanze wird zuerst der Pyrimidinring an Position 2 desaminiert und dann die Ribosylseitenkette reduziert (Burrows, 1978), bei Hefen und anderen Pilzen ist die Reaktionsreihenfolge umgekehrt (Bacher and Lingens, 1970; Nielsen and Bacher, 1981). Auffällig ist dabei die strikte Spezifität für das Substrat 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-

5'-phosphat (Graupner, 2002). Es ist beeindruckend, daß 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat das desaminierte Substrat, für die orthologe *E. coli* Riboflavinreduktase RibD, von Rib7 nicht Katalysiert werden kann (siehe Abbildung 2.2). Auch die Vorstufe des Substrates, das GMP, wird von Rib7 nicht als Substrat akzeptiert. Eines der Hauptziele der Strukturforschung von Enzymen ist natürlich die präzise stereochemische Auflösung des Katalysemechanismus des untersuchten Protein. Soweit uns bekannt ist bis jetzt noch keine strukturelle Information bekannt, die die Reduktion von Nukleotiden in Oxidoreduktasen erklärt. Zum anderen könnte die Struktur von Rib7 die Basis zur Entwicklung von Inhibitoren, die nicht nur als Antiinfektika gegen humanpathogene Krankheiten eingesetzt werden können sondern gleichzeitig auch wirkungsvoll Pflanzen und Bakterien von Pilzen unterscheiden. Die hohe Sequenzhomologie zu den Oxidoreduktasen in Pflanzen, Hefen und Eubakterien führt zu guten Einblicke in die ersten Schritte der Ribofavinbiosynthese und könnte eine gute Basis für ein Homologiemodelling sein.

2.2 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

2.2.1 Überblick

Die Methode der Röntgenkristallographie zur Strukturaufklärung von Proteinen und Nukleinsäuren ist in verschiedenen Lehrbüchern ausführlich behandelt (Blundell and Johnson, 1976; Drenth, 1994; Stout and Jensen, 1989). Daher werden im Folgenden nur wichtige Grundprinzipien dieser Methode kurz dargestellt. Die erreichbare Auflösung mikroskopischer Techniken ist stark durch die verwendete Wellenlänge limitiert. Um atomare Distanzen auflösen zu können, benötigt man Strahlung im spektralen Bereich der Röntgenstrahlen. Während jedoch in der Lichtmikroskopie Bilder eines Objekts durch die Verwendung von Linsen erhalten werden können, sind für Röntgenstrahlen solche Linsen nicht verfügbar. Man benützt statt dessen Interferenzeffekte, die durch die Beugung von Röntgenstrahlen entstehen. Da diese sehr schwach sind, ist eine dreidimensionale periodische Anordnung des Ob-

jekts notwendig wie sie z.B. in einem Kristall vorkommt. Der erste Schritt und eines der Grundprobleme der Proteinstrukturaufklärung in der Röntgenkristallographie ist somit die Erzeugung eines Proteinkristalls.

2.2.2 Zusammenfassung der Strukturlösung durch Röntgenstrahlkristallographie

Um die Struktur eines Proteins zu lösen sind eine Reihe von Schritten nötig, angefangen mit der Clonierung, der Expression, der Reinigung, bis hin zur Kristallisation. Im Laufe der letzten Jahre wurden große Fortschritte zur Erleichterung der Strukturlösung gemacht, wie z.B. die Phasierung mit Hilfe von Selenomethionin, die Verfügbarkeit von Hoch-Energie-Synchrotrons und modernen CCD-Detektoren, die schnell anwachsende Rechenleistung, sowie neue automatisierende Softwarepakete. Trotz der Verfügbarkeit der oft sehr komplexen Hard- und Software, scheitert die Strukturlösung meist an der technisch relativ simplen Kristallisation der Proteine. Strukturfabriken versuchen mit Hilfe von Robotoren, die mit immer geringeren Mengen von Protein, tausende von Kristallisationsbedingungen untersuchen können, dieses Problem zu umgehen. Dennoch bleibt dieser Versuch und Irrtums Prozess das Hauptproblem der Strukturlösung, weil ein Ergebniss eines multiparameter Prozess nicht vorhergesagt werden kann. Wie in Abbildung 2.4 dargestellt, kann die Strukturlösung grob in drei aufeinander folgender Teile eingeteilt werden:

1. Kristallisation und Datenaufnahme
2. Phasierung
3. Modellbau und Verfeinerung

Dabei ist die Phasierung aus kristallographischer Sicht der aufwendigste Schritt. Dieser Teil wird in den folgenden Abschnitten beschrieben. Danach folgen Modellbau und die Verfeinerung. Dabei wird nach erfolgreicher Phasierung ein Molekülmodell in die Elektronendichte gebaut. Die sich daran anschließende Verfeinerung ist

ein iterativer Prozess, dessen Ziel es ist zum einen die Übereinstimmung von Modell und experimentellen Daten (Die Intensitäten der einzelnen Reflexe) zu maximieren, zum andern das Modell möglichst gut an die chemische Gesetze anzupassen. Dabei müssen z.B. Bindungslängen, Bindungswinkel und konformationelle Winkel und Abstände mit denen aus der Kleinmolekülkristallographie bekannten Werten übereinstimmen.

2.2.3 Messung von Kristallen

Bei der Messung wird der Kristall pro Bild um einen bestimmten Winkel (0.2-2.0°) gedreht. Mehrere Bilder werden unter fortlaufender Drehung des Kristalls aufgenommen, bis ein hinreichender Bereich des reziproken Raumes erfaßt ist.

2.2.4 Datenauswertung und Skalierung

Danach erfolgt die Indizierung der Bilder. Dabei erfolgt zum einen die Identifizierung des Bravaisstyps des Kristallgitters und die Zuordnung der hkl-Indizes zu den einzelnen Reflexen. Heutzutage erfolgt dies durch Computerprogramme, da die theoretischen Grundlagen sehr kompliziert sind, wenn die Kristalle, wie heutzutage üblich, nicht mehr speziell orientiert werden. Danach sind die Zellkonstanten und die Kristallorientierung bekannt und somit können weiter reziproke Gitterpunkte und somit Reflexe vorausgesagt werden. Nach Absorptions- Polarisations- und Lorenz-korrekturen werden die Reflexe integriert. Nach relativer Skalierung der einzelnen Bilder, mit Hilfe symmetrieverwandter Reflexe erfolgt die Mittelung dieser Reflexe und die Datenreduktion kann erfolgen. Diese Mittelwerte von Intensitäten der einzelnen Reflexe werden mit den Einzelintensitäten verglichen. Das Ergebnis ist der so genannte R-Faktor, der sich im Fall einer falschen Wahl der Kristallsymmetrie und somit einer Verknüpfung eigentlich unabhängiger Reflexe, stark erhöht.

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

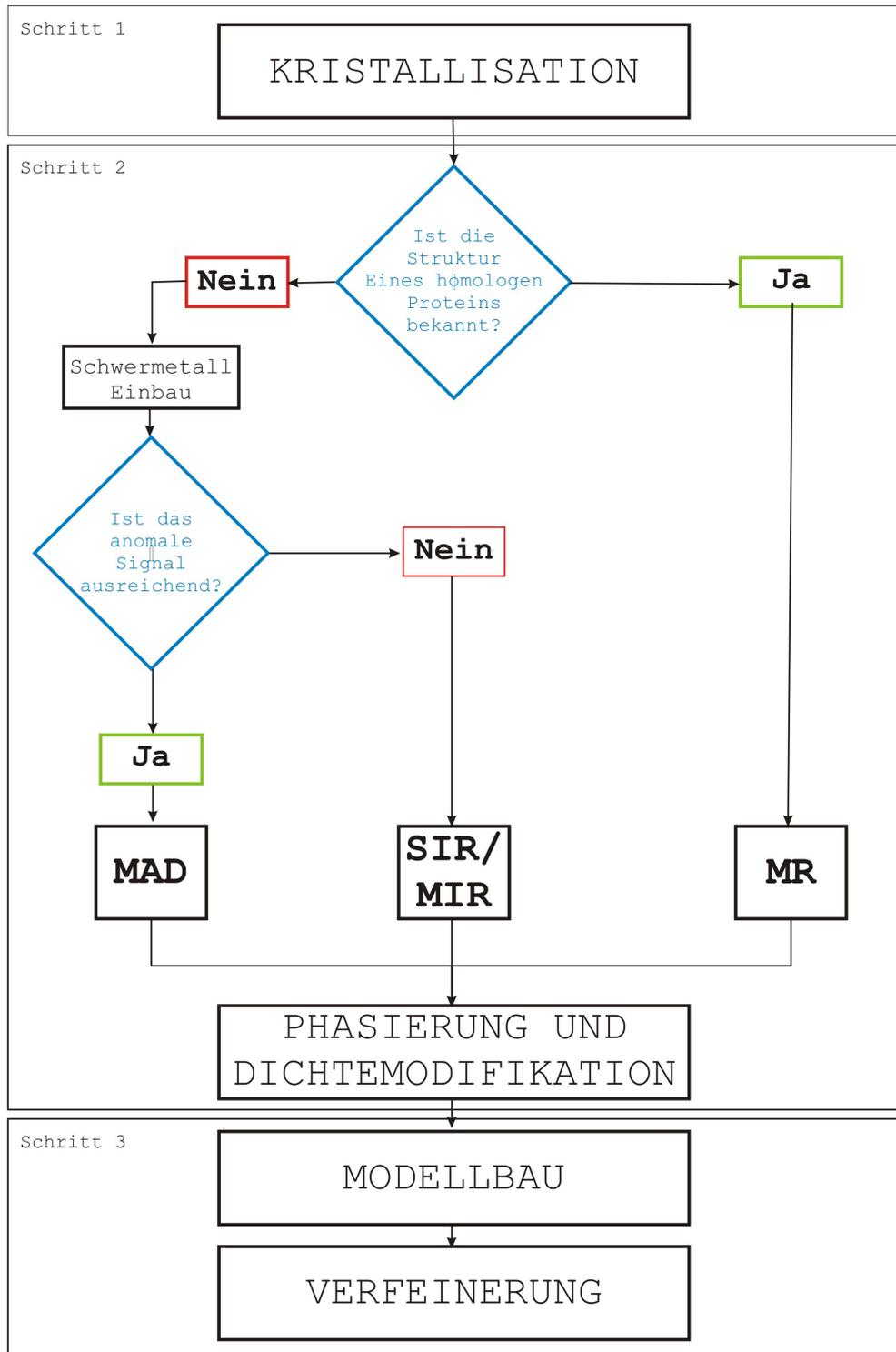


Abbildung 2.4: Übersicht: Proteinkristallographie

2.2.5 Berechnung der Elektronendichte

Da die Röntgenstrahlen an der Atomhülle der Atome gebeugt werden, ergeben sich aus der Strukturanalyse nicht sofort die genauen Atompositionen, sondern die dreidimensionale Verteilung der Elektronen der Atome, die als Elektronendichteverteilung bezeichnet wird.

Jeder einzelne, im Diffraktionsbild beobachtete, Reflex ist die Summe der Streuteile aller Atome in der Einheitszelle. Alle Reflexe zusammen bilden dann die Transformierte der Elektronendichteverteilung. Die Fouriertransformation beschreibt dabei die mathematische Beziehungen zwischen dem Objekt und dem Diffraktionsbild. Dies ist also die eine Art Linsensimulation die der Computer ausführt, um ein Bild des Moleküls oder genauer der Elektronenwolken im Kristall zu erstellen. Ein Strukturfaktor F_{hkl} ist eine Kombination von N Wellen in der Richtung hkl , die bei einem Beugungsexperiment von den N Atomen in der Elementarzelle ausgehen. Diese Wellen haben die Amplitude f_j (atomarer Streufaktor) und die Phase α_j , die ein Ausdruck der räumlichen Anordnung des Atoms j in der Elementarzelle ist. Der Strukturfaktor F_{hkl} kann als Summe der atomaren Streufaktoren dargestellt werden:

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

Die Intensität des gestreuten Röntgenstrahl jedes Atomtyps ist damit abhängig von einer Größe f , dem Streufaktor. Dieser ist zum Einen proportional zu Zahl der Elektronen des Atoms und zum Anderen reziprog proportional zum Streuwinkel. Dies ist wie folgt zu erklären. Mit zunehmenden Streuwinkel nimmt der Gangunterschied, zwischen den verschiedenen räumlichen Position, innerhalb der am Atoms gestreuten Röntgenstrahlen, zu. Da diese inneratomaren Distanzen deutlich kleiner sind, als die Abstände zwischen den einzelnen Gitterebenen d_{hkl} und somit der Gangunterschiede nur Bruchteile der Wellenlänge ausmacht, führt dies nicht zur vollständigen Auslöschung. Die Streuleistung eines Atoms verringert sich, zusätzlich in auflösungsabhängiger Weise, durch dessen thermische Schwingung. Dieser

Sachverhalt wird durch die Einführung des Temperaturfaktors berücksichtigt. Der Term $T(\text{iso})$, der den Temperaturfaktor B enthält, wird mit dem atomaren Formfaktor multipliziert.

Die so erhaltenen Reflexe werden durch die komplexen Strukturformfaktoren beschrieben. Der mathematische Zusammenhang zwischen den Positionen der Atome (oder besser deren Elektronenhüllen) in der Elementarzelle und den komplexen Strukturformfaktoren kann durch eine FOURIER-Transformation hergestellt werden.

Der Strukturformfaktor für einen einzelnen Reflex ist damit die Fourierreihe in der jeder einzelne Term dem Anteil am Gesamtstreubeitrag jedes einzelnen Atoms entspricht. Dabei wird jedes Atom als einfach Elektronendichtekugel behandelt. Damit ist der Anteil jedes Atoms j zu F_{hkl} zum Einen abhängig von der Art des Atom, welches f_j , die Amplitude des Streuteils, bestimmt und zum Anderen von der Position (x_j, y_j, z_j) in der Einheitszelle, die Einfluß auf die Phase des Streuteils hat.

Die Elektronendichteverteilung ρ an jedem Punkt (x,y,z) in einem Kristall kann durch die Gesamtheit der Größen f_j und \vec{r}_j ausgedrückt werden, womit sie sich als inverse Fouriertransformierte der Strukturformfaktoren ergibt.

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

Der Phasenwinkel ϕ_{hkl} eines Reflexes, der den Gangunterschied des Reflexes im Vergleich zu einer am Ursprung der Elementarzelle gestreuten Welle angibt, ist bei einer Messung nicht direkt zugänglich, da aus den integrierten Reflexintensitäten lediglich die Strukturamplituden \vec{F}_{hkl} , die proportional zu den Quadratwurzeln der gemessenen Intensitäten sind, bestimmt werden können.

Wie bereits erwähnt ist die Phase aus den Messdaten nicht ableitbar und damit unbekannt. Diese Unbestimmtheit wird in der Proteinkristallographie als Phasenproblem bezeichnet.

2.2.6 Zweidimensionale Darstellung von Strukturfaktoren

Jeder Strukturfaktor F_{hkl} can als Vektor einer zweidimensionalen Ebene komplexer Zahlen der Form $a + i \cdot b$ dargestellt werden. Dabei steht i für die imaginäre Zahl $(-1)^{\frac{1}{2}}$ (siehe Abbildung 2.5) Die Länge von F ist proportional zur Quadratwurzel der gemessenen Reflexintensität und der Winkel zwischen F und der positiven realen Achse ist die Phase α .

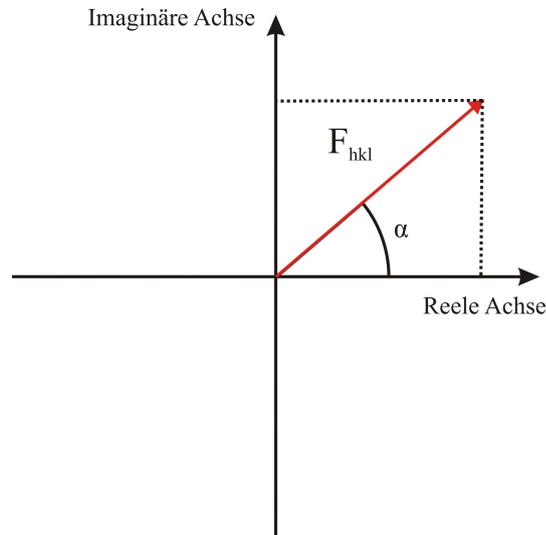


Abbildung 2.5: Der Strukturfaktor F , dargestellt als Vektor in der Ebene der komplexen Zahlen

2.2.7 Friedelpaare

Jedes Reziproke Gitter und damit alle Diffraktionsdaten haben ein zusätzliches Symmetrieelement, ein Inversionzentrum. Dies ist unabhängig von der Tatsache, daß chirale Moleküle wie z.B. Proteine nur in nicht zentrosymmetrischen Raumgruppen kristallisieren können. Der Grund dafür liegt darin, daß jeder Reflex auf einer bestimmten hkl Ebene, ebenfalls einen Reflex in der correspondierenden $-h -k -l$ Ebene erzeugt. Die Intensitäten beider Ebenen sind dabei gleich groß. Diese Tatsache, daß $I_{hkl} = I_{-h-k-l}$ wird als Friedelgesetz bezeichnet. F_{hkl} und F_{-h-k-l} werden als Friedelpartener bezeichnet. Dabei ist zu bedenken, daß obwohl die Intensitäten von F_{hkl} und F_{-h-k-l} identisch sind, dies nicht für die Strukturfaktoren selbst gilt.

In Bezug auf die graphische Darstellung zeigt sich dies dadurch, daß F_{-h-k-l} das Spiegelbild von F_{hkl} ist, wobei die reelle Achse die Spiegelachse ist (siehe Abbildung 2.6). Die Friedelpartner haben damit entgegengesetzte Phasen. Durch das Einführen von Schweratomen und die Bestrahlung des Kristalls mit bestimmten Wellenlängen kann erreicht werden, daß dieses Gesetz nicht mehr gilt. Diese Bedingungen wird, wie in Abschnitt 2.2.14 beschrieben, zur Lösung des Phasenproblems ausgenutzt werden.

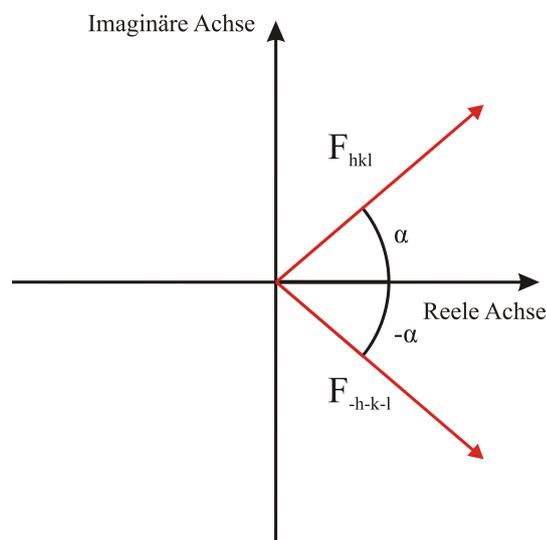


Abbildung 2.6: Die Strukturfaktoren eines Friedelpaars dargestellt als Vektor in der Ebene der komplexen Zahlen

2.2.8 Lösung des Phasenproblems

Das Phasenproblem kann durch die Lokalisierung einer Substruktur gelöst werden, wobei zur Bestimmung der Substruktur direkte Methoden oder Patterson-Methoden verwendet werden können. Den Patterson-Methoden liegt eine Funktion zugrunde, die nur von den Strukturfaktoramplituden und nicht von den Phasen abhängig ist, die so genannte Pattersonfunktion:

$$P(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l | \vec{F}_{hkl} |^2 \cdot \cos(2\pi \cdot (hx + ky + lz))$$

Die Maxima dieser Funktion entsprechen jedoch nicht den Atompositionen, sondern stellen die interatomaren Distanzvektoren dar. Daher entspricht die Symmetrie der Patterson-Synthese derjenigen der Elektronendichte ohne jegliche translatorische Symmetrieelemente jedoch mit einem Inversionszentrums. Bedingt durch die kristallographischen Symmetrieelemente der jeweiligen Raumgruppe kommt es in bestimmten Bereichen dieser Dichtekarte zu einer Häufung von Distanzvektoren. Diese Bereiche werden Harker-Ebenen genannt. Aufgrund der großen Anzahl von Atomen in einem Protein ist es jedoch nicht möglich aus der Patterson-Synthese auf die Proteinstruktur zu schließen und so ein Modell für die initiale Phaseninformation zu erhalten. Statt dessen müssen Methoden angewandt werden, in denen Patterson-Synthesen von einfacheren Substrukturen interpretiert werden, um die Phaseninformation für die Proteinstruktur abzuleiten (SIR, MIR, MAD), oder in denen experimentelle Patterson-Synthesen mit theoretischen verglichen werden, um ein ausreichend homologes Modell zur initialen Phasierung zu platzieren (MR).

2.2.9 Isomorpher Ersatz

Bei der Methode des Isomorphen Ersatzes werden ein Datensatz eines Proteinkristalls (NATI) und in den meisten Fällen mehrere Datensätze unabhängiger isomorpher Schweratom-Derivate (DERI) der Kristalle aufgenommen (MIR). Der Isomorphe Ersatz (Green et al., 1954) bezeichnet ein Verfahren, das eine lokale Änderung in der Elektronendichteverteilung eines Kristalls, verursacht durch die Anwesenheit eines Schweratoms, ausnutzt. Verwendbare Derivat-Kristalle müssen dabei eine möglichst gute Kristallisomorphie, sowie die geordnete Bindung der Schweratome aufweisen. Es kann dann in guter Näherung angenommen werden, daß die Differenzen der Strukturfaktoramplituden ($\Delta | \vec{F} |$) von DERI und NATI auf die Differenzen in den Strukturen, also die im DERI zusätzlichen Schwermetallatome zurückzuführen sind. Vektoriell läßt sich dies, wie in Abbildung 2.7, darstellen.

Diese Konstruktion ist möglich, da Strukturfaktoren des Gesamtmodells als vektorielle Summen der einzelnen Strukturfaktoren dargestellt werden können. Meßfeh-

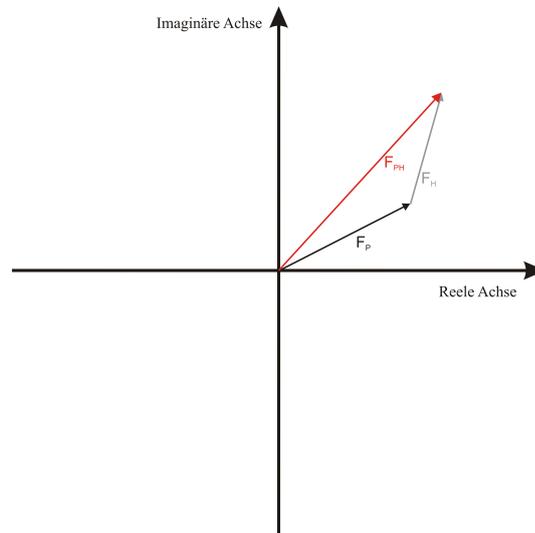


Abbildung 2.7: Vektorsumme der Strukturfaktor F_P , F_H und F_{PH} , dargestellt als Vektor in der Ebene der komplexen Zahlen

ler durch Isomorphieabweichungen und Phasenfehler verhindern nicht notwendigerweise eine Lösung, da $F_{P,HKL}$ und $F_{PH,HKL}$ meist viel größer als $F_{H,HKL}$ sind. Das Schweratom-Teilmodell lässt sich mit Hilfe von direkten oder Pattersonmethoden lösen. Für die Pattersonmethode wird eine Fouriersummitation mit den Koeffizienten $(|F_{PH}| - |F_P|)^2$ und einem Phasenwinkel von Null, eine so genannte Differenz-Pattersonfunktion berechnet. Die Maxima dieser Funktion entsprechen den Vektoren zwischen den Schweratomen. Unter Beachtung der Raumgruppensymmetrie lassen sich die Koordinaten x,y,z des Teilmodells bestimmen. Eine aus den $(\Delta | \vec{F} |)$ berechnete Patterson-Synthese sollte also nur die interatomaren Distanzvektoren der Schweratome beinhalten und daher durch ein geeignetes Schweratommodell interpretierbar sein. Dies ist in der Praxis aufgrund der wesentlich geringeren Anzahl der Schwermetallatome im Vergleich zu den Proteinatomen möglich.

2.2.10 Bestimmung der Proteinphasen

Sobald die Schweratompositionen bekannt sind, werden die Schweratomparameter (xyz Positionen, Besetzung im Kristall und die thermischen Parameter) verfeinert und zur Berechnung genauerer $|F_H|$ und der entsprechenden Phasen α_H verwen-

det. Das weitere Vorgehen läßt sich am besten mit Hilfe der Harkerkonstruktion demonstrieren (siehe Abbildung 2.8) Zuerst können wir nun den Vektor \vec{F}_H des Schweratoms in das Diagramm einzeichnen, da wir sowohl die Länge als auch die Phase kennen. Die Länge des Vektors des Nativen Kristalls $|\vec{F}_P|$ ist ebenfalls bekannt.

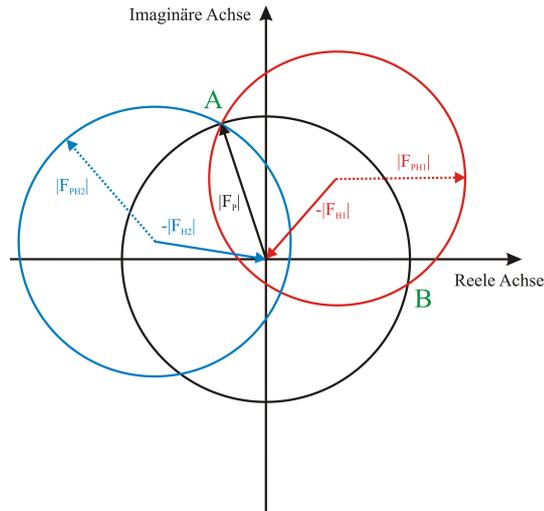


Abbildung 2.8: Harkerkonstruktion (Harker, 1956). Um den Ursprung wird ein Kreis mit dem Radius $|F_P|$ für den jeweiligen Reflex gezeichnet (schwarz). Um $-\vec{F}_{H1}$ (Lage und damit Phase des Schwermetalls sind bekannt) wird ein weiterer Kreis mit dem Radius $|F_{PH1}|$ gezeichnet. Die beiden Schnittpunkte A und B ergeben zwei Möglichkeiten für \vec{F}_P . Mit einem zweiten Derivat kann diese Prozedur wiederholt werden und so die eindeutige Phase des Reflexes bestimmt werden (Schnittpunkt A).

Es ist dabei offensichtlich, daß in dieser Konstruktion F_H in den Ursprung verschoben wurde. Die eindeutige Bestimmung der Proteinphasen ist dabei noch nicht möglich, da die Phasenkerne zwei Schnittpunkte haben. Durch Vergleich von Nativ- mit mehreren Derivat- und Differenzstrukturfaktoramplituden mit den komplexen Strukturfaktoren aus dem Schweratommodell können initiale Phasenwinkel für die Proteinstrukturfaktoren bestimmt werden.

2.2.11 Finden weiterer Schwermetallpositionen

Mit Hilfe der ersten Proteinphasen lässt sich eine Differenzfourier-Elektronendichtekarte als Fouriersumme mit den Koeffizienten $|F_{PH}| - |F_P|$ und den Phasenwinkeln α_P berechnen. Maxima in diesen Elektronendichtekarten treten an den Positionen der Schweratome auf. Mit Hilfe dieser Karten lassen sich zusätzliche Schweratomlagen oder bei neuen Derivaten die Positionen der Schweratome bestimmen. Diese Elektronendichtekarten zeigen einen höheren Kontrast als die Pattersonfunktion und liefern die Positionen der Schweratome in Bezug auf den gleichen Ursprung wie das Derivat, das zur Berechnung der ersten Phasen benutzt wurde.

2.2.12 Bedingungen für SIR-Lösungen

In manchen Fällen lassen sich bereits mit einem Derivat hinreichend genaue Proteinphasen bestimmen, (Single Isomorphous Replacement, SIR) oft sind jedoch mindestens zwei unabhängige Schweratom-Derivate nötig (Multiple Isomorphous Replacement, MIR). Falls jedoch z.B. mehrere gleiche Moleküle in der asymmetrischen Einheit vorhanden sind, kann man die Ambiguität auch durch Mitteln der Elektronendichte lösen. Dazu wird zunächst für jeden Reflex zufällig einer der beiden möglichen Phasenwinkel gewählt und damit eine Elektronendichtekarte berechnet. Die korrekt ausgewählten Phasenwinkel ergeben die wahre Elektronendichteverteilung, die falschen tragen zum Rauschen bei. Lassen sich in dieser Dichtekarte die Bereiche mit Protein von dem Lösungsmittelbereich unterscheiden, kann man mit Hilfe einer Maske und den Symmetrieoperatoren die Elektronendichte mitteln. Die Symmetrieoperatoren, die ein Molekül auf ein anderes abbilden, können aus dem Schweratom-Teilmodell abgeleitet werden.

2.2.13 Direkte Methoden

In den letzten Jahren wurden leistungsfähige Computer immer billiger. Außerdem wurde durch die zunehmende Verwendung von selenmethionsubstituierten Kristallen und der damit oft verbundenen großen Anzahl von Schwermetallatomen in der asymmetrischen Einheit die normale Pattersoninterpretation immer schwieriger. Eine Lösung boten die aus der Kleinmolekülkristallographie bekannten direkten Methoden wie Shake and Bake und ShelXD, die für zufällig angeordnete Atome, Diffraktionsbilder berechnen und mit denen des Kristalls vergleichen. Unterstützt wird dies durch Verwendung einschränkender statistischer Beziehungen zwischen den Phasen einzelner Reflexe und der Identifikation von Teilmodellen mit Hilfe der Pattersonsynthese. Bei Kristallen von sehr kleinen Proteinen ist im Fall, eines ultra guten Streuverhaltens, sogar eine ab initio Phasierung möglich, im Fall von Schweratomdifferenzdaten sind die Anforderungen an die Daten jedoch nicht so hoch. Bei einer geringen Zahl von Schwermetallatomen in der Asymmetrischen Einheit reicht oft bereits eine Auflösung von 3.5 Å

2.2.14 Multiple Anomale Dispersion

Eine weitere Möglichkeit zur Lösung des Phasenproblems bietet das Phänomen der anomalen Streuung. Normalerweise werden die Elektronen an denen die Streuung erfolgt in guter Näherung, als freie Elektronen beschrieben (elastische Streuung). Dies gilt in der Nähe der Absorptionskante eines Elements nicht mehr, da hier auch innere Elektronen betroffen sind. Die Frequenzen, bei der Absorption der inneren Elektronen, correspondieren mit Absorptionskanten, deren Charakteristik ein scharfes abfallen der Absorptionskurve und damit ein starker Anstieg der Fluoreszenz ist. In Abbildung 2.9 ist als Beispiel das Spektrum der Fluoreszenzmessung des mit Selenomethionin derivatisiertem Rib7 Kristall dargestellt.

Bei der Bestimmung von Proteinphasen durch Multiple Anomale Dispersion (multiple wavelength anomalous dispersion, MAD) wird diese Eigenschaft von Schwerato-

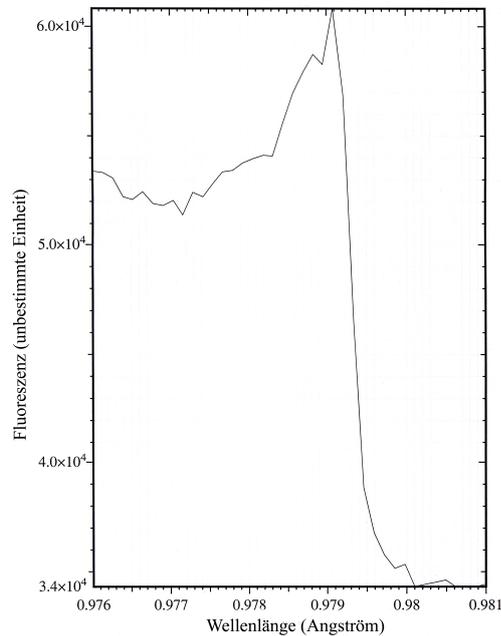


Abbildung 2.9: Fluoreszenzspektrum eines Selenomethionin substituierten Rib7 - Kristalls gemessen an der BW6 Beamline DESY Hamburg

men als anomaler Streuer in Proteinkristallen ausgenutzt. Dazu wird Röntgenstrahlung mit variabler Wellenlänge (Synchrotronstrahlung) an der spezifischen Absorptionskante der Schweratome verwendet. Wechselwirkung der Synchrotronstrahlung mit dem Atomkern durch Ionisation eines Elektrons aus der K Schale, bedingt eine Phasenverschiebung (anomale Streuung oder Dispersion), die sich von der Phasenverschiebung elastischer Streuung (180°) unterscheidet. Der Atomformfaktor ist dann nicht mehr länger eine reelle, sondern eine komplexe Zahl ($\delta F_r + \delta F_i$), wobei der imaginäre Anteil immer um $\frac{\pi}{2}$ vor der Phase des realen Anteils verschoben ist.

Bei dieser Methode wird also sowohl die dispersive Differenz, die analog zur isomorphen Differenz, eine Änderung des realen Streubeitrages darstellt, als auch die anomale Differenz, die durch die Phasenverschiebung entsteht, für die Phasierung ausgenutzt. Diese Differenzen werden durch die Messung bei verschiedenen Wellenlängen optimiert. Der atomare Streufaktor eines anomal streuenden Atoms f_{anom} lässt sich als Summe der von der Wellenlängen unabhängigen Anteile (f_0) und dem abhängigen Anteilen $f(\lambda)$ darstellen (siehe Abbildung 2.10)

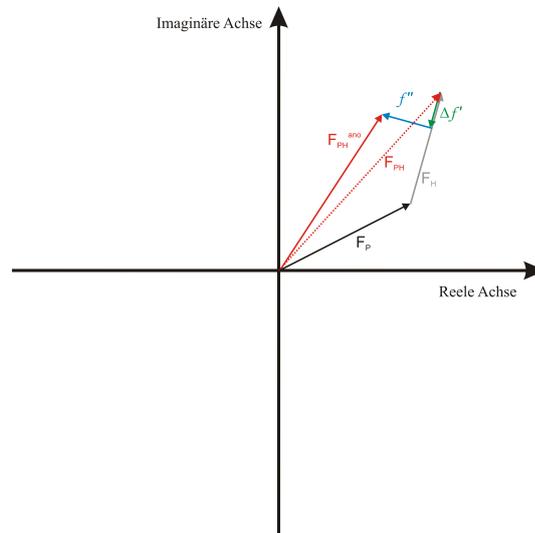


Abbildung 2.10: Realer und imaginärer anomaler Streubeitrag und ihre Einflüsse auf die Größe und die Phase des Strukturfaktors

$$f_{anom} = f_0 + f(\lambda) = f_0 + f'(\lambda) + i \cdot f''(\lambda)$$

Die von der Wellenlänge abhängigen Anteile führen aufgrund von Absorptionseffekten sowohl zu einer Verringerung der Streukraft ($f'(\lambda) < 0$), als auch zu der schon beschriebenen Phasenverschiebung ($i \cdot f''(\lambda)$). Die dispersive Differenz beruht auf den unterschiedlichen Werten von $f'(\lambda)$, und die anomale Differenz hebt in Abhängigkeit von der Größe $i \cdot f''(\lambda)$ die Friedel-Symmetrie innerhalb eines Datensatzes auf (siehe Abbildung 2.11).

Beide Differenzen sind proportional zu den Strukturfaktoramplituden des Schwertomteilmodells und da beide Terme voneinander unabhängig sind, kann man mit ihnen auch das Phasenproblem eindeutig lösen. Dadurch kann aus den Amplitudendifferenzen (Bijvet-Differenzen) dieser Reflexe eine Patterson-Synthese errechnet werden, aus der sich ein Modell der Substruktur aller bei einer bestimmten Wellenlänge anomal streuenden Atome erstellen lässt. Theoretisch würde es genügen zwei Datensätze bei verschiedenen Wellenlängen zu messen, praktisch werden jedoch wenn möglich drei Datensätze gemessen. Einer bei maximalem f'' , einer bei minimalem f' und, um die dispersiven Differenzen zu maximieren, der dritte bei

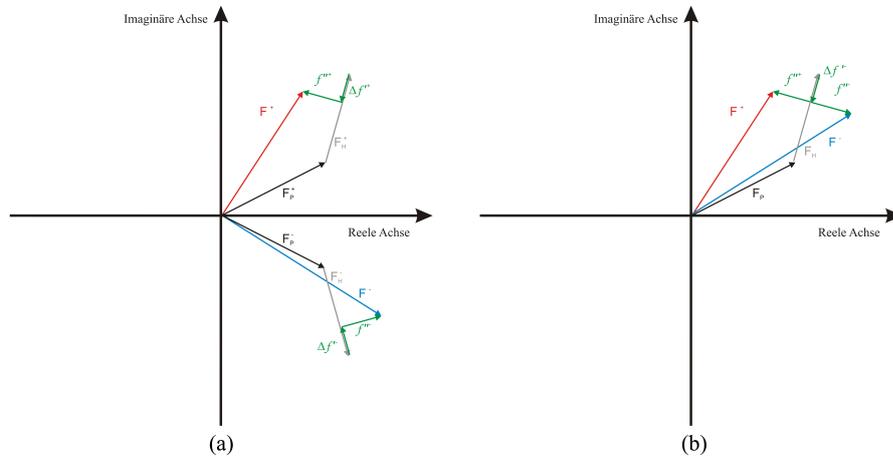


Abbildung 2.11: Ungültigkeit des Friedel-Gesetzes (a) Das Vektordiagramm zeigt den Effekt der anomalen Streuung auf die Reflexe hkl und $-hkl$. (b) Kombiniertes Vektordiagramm $|\vec{F}_{-hkl}|$ wurde an der realen Achse gespiegelt

einer weit von der Absorptionskante entfernten Wellenlänge (remote point), bei der f' nahe Null ist (siehe Abbildung 2.12 und 2.13).

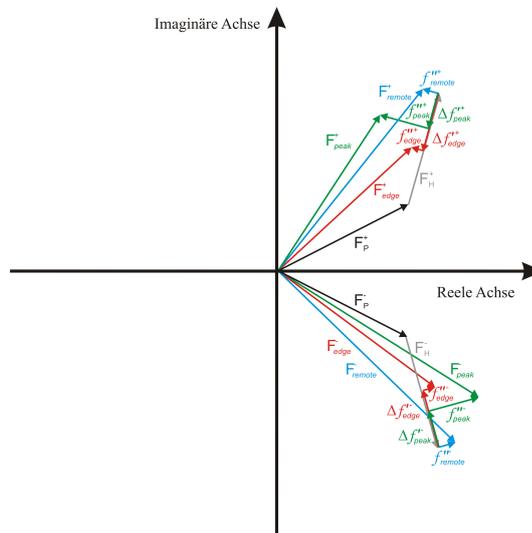


Abbildung 2.12: Phasendiagramm eines MAD-Experiments mit Darstellung der Struktur faktoren in der komplexen Zahlenebene. Es sind die verschiedenen Struktur faktoren sowie die dazu führenden dispersiven und anomalen Anteile der einzelnen Wellenlängen abgebildet (blau: λ_{remote} , grün: λ_{peak} , rot: λ_{edge}). Die Struktur faktoren vom Protein (F_P) und von den Schweratomen (F_H) sind in schwarz bzw. grau gezeigt. Ungültigkeit des Friedel-Gesetzes

Ein großer Vorteil der MAD ist, dass keine Fehler durch Nichtisomorphie auftreten,

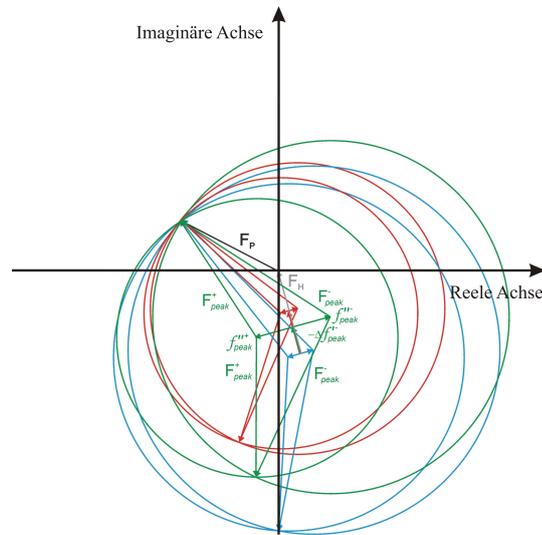


Abbildung 2.13: Harker-Konstruktion der Proteinphasen eines MAD-Experiment. Der Vektor F_H in der komplexen Zahlenebene ist der bekannte Strukturfaktor der anomalen Streuer und $-\Delta f'(peak)$ und $f''^{+/-}(peak)$ sind seine anomalen Anteile bei der Wellenlänge λ_{peak} . Die Radien der Kreise entsprechen den Strukturfaktoramplituden, die bei den drei verschiedenen Wellenlängen gemessen wurden (blau: λ_{remote} , grün: λ_{peak} , rot: λ_{edge}). Die Mittelpunkte liegen am Ende der Summe der Vektoren $f'(\lambda_{peak}) + i \cdot f''^{+/-}(\lambda_{peak})$. Idealerweise entsteht nur ein Schnittpunkt aller Kreise, der das Ende des gesuchten Vektors \vec{F}_{PH} markiert. Aus F_H und F_{PH} läßt sich dann der Strukturfaktor F_P der nativen Proteinstruktur berechnen.

da alle Datensätze vom gleichen Kristall gemessen werden. Dies führt häufig zu einer ausgezeichneten Bestimmung der Phasen, obwohl die Differenzen in der Größenordnung des Messfehlers für die Strukturfaktoramplituden liegen. Dazu kommt noch, daß wichtiger als die Anzahl der Elektronen, die durch ein Atom zusätzlich in den Kristall eingeführt werden, die Lage einer Absorptionskante des Atoms ist. Die Energie einer solchen Kante muss im Bereich der verwendeten Strahlung liegen. Es können für ein MAD-Experiment Atome verwendet werden, die für den Isomorphen Ersatz zu wenige Elektronen besitzen würden, wie zum Beispiel Zn und Se. Außerdem ist die Auflösung, bis zu der Phasen berechnet werden können, nur durch die maximale Auflösung der Datensätze begrenzt. Dies liegt daran, dass die von der Wellenlänge abhängigen Terme im Gegensatz zu dem wellenlängenunabhängigen Term f_0 , der eine normale Abnahme der Streukraft mit der Auflösung zeigt, unabhängig von der Auflösung sind, da zu diesen Termen nur die inneren Elektronen des

anormalen Streuers beitragen.

SAD Single anomalous dispersion

Ursprünglich wurde angenommen, daß durch die Verwendung der Cryokristallographie, das Problem der Strahlungsschäden während der Messung, umgangen worden wären. Doch durch die zunehmende Verwendung von Synchrotrons der dritten Generation, mit ihrem sehr hohen Röntgenstrahlenfluß, hat sich die Situation wieder geändert. Deshalb sind oft Strahlungsschäden heutzutage wieder der limitierende Faktor (Burmeister 2000). Wie oben bereits beschrieben müssen für ein gewöhnliches MAD-Experiment Diffraktionsdaten bei drei verschiedenen Wellenlängen von einem Kristall aufgenommen werden. Dies bedeutet jedoch, daß besonders bei Kristallen mit einer niederen Symmetrieraumgruppe, die Zeit der Bestrahlung, die ein vollständiges MAD-Experiment benötigt, zu lange ist und der Kristall bereit nach der Aufnahme der ersten Wellenlänge an Streuleistung etc. abbaut. Deshalb ist es heutzutage immer häufiger üblich, nur Diffraktionsdaten der Peakwellenlänge aufzuzeichnen und die Struktur mit Hilfe der SAD Methode zu lösen. Wie jedoch oben bereits beschrieben ist es formell nicht möglich die Proteinphasen eindeutig zu bestimmen, wenn nur zwei unabhängige experimentelle Messungen zur Verfügung stehen, wie dies im Fall von Diffraktionsdaten von einer Wellenlänge, mit nur einer anomalen Differenz, vorliegt. Dies gilt selbst unter der Annahme, daß die gemessenen Amplituden F^+ und F^- und die berechneten Amplituden und Phasenanteile der anomalen Substruktur fehlerfrei sind, da immernoch eine Ambiguität in der Bestimmung der Proteinphasen vorliegt. Dennoch haben statistische Untersuchungen gezeigt, daß eine der beiden Lösungen wahrscheinlicher ist als die andere (Dauter et al., 2002). Moderne Maximum Likelihood basierte Phasierungsprogramme wie z.B. das Programm SHARP (de la Fortelle and Bricogne, 1997) verwenden diese Tatsache um die Phasenambiguität zu lösen und eine Phasierung einer neuen Struktur mit einem einzelnen Diffraktionsdatensatz zu ermöglichen.

2.2.15 Molekularer Ersatz

In der Methode des Molekularen Ersatzes auch Faltmolekülmethode oder Molekular Replacement (MR) genannt, (Hoppe, 1957; Huber, 1965; Rossmann and Blow, 1962)) muß bereits ein Atommodell einer bekannten Kristallstruktur mit hinreichender Ähnlichkeit zum untersuchten Modell vorliegen, daß dann entsprechend des native Proteindatensatzes korrekt positioniert werden muß, um zur initialen Phasierung herangezogen werden zu können. Dies geschieht in der Regel unter Benutzung der Patterson-Funktion, die es erlaubt Rotations- und Translationsmöglichkeiten zur Positionierung des Modells getrennt abzusuchen. Für die Rotation werden aus dem Modell Strukturfaktoren (F_{calc}) und daraus dann die Pattersonfunktion berechnet. Diese wird mit der Pattersonfunktion des gemessenen Datensatzes verglichen und die Übereinstimmung mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten $C \cdot (|F_{obs}|^2; |F_{calc}|^2)$ überprüft. Entscheidend ist dabei die maximale Überlappung von intramolekularen Differenzvektoren (hauptsächlich Patterson-Vektoren im Bereich der erwarteten Molekülgröße) für die korrekte Orientierung (Rotationslösung) des Modells, die nur von den Rotationsfreiheitsgraden eines Moleküls abhängen. Für die Translation wird eine Übereinstimmung sowohl mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten, als auch mit Hilfe des kristallographischen R-Faktors verwendet. Die Positionierung des orientierten Modells (Translationslösung) wird dann meist mit Hilfe der intermolekularen Pattersonvektoren durchgeführt.

Modellbau

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

so in die Elektronendichtekarten eingepasst werden. Atomare Modelle wurden mit einer Octane (Silicon Graphics Inc.) und dem Programm O (Jones et al., 1991) in die Elektronendichte eingepasst.

Modellbau bei MAD

Wird die Elektronendichteverteilung mit Hilfe des isomorphen Ersatzes oder einem MAD-Experiment gewonnen, wird in der leeren Elektronendichtekarte zunächst nach typischen Sekundärstrukturelementen wie den α - Helices und den β - Faltblättern gesucht. In diese Bereiche wird ein Polyalanin-Modell eingepasst. Danach versucht man gegeben falls nach einer Verfeinerung des Modells, Phasenkombination und neuerlicher Phasierung fehlende Konnektivitäten zu finden und die Seitenketten der Aminosäuren zuzuordnen. Da Anfang und Ende des Proteins in der Elektronendichte nicht leicht zu finden sind und oft auf Grund der erhöhten Flexibilität nicht definiert sind, wird für die Zuordnung der Seitenketten nach Bereichen in der Primärstruktur gesucht, die ein typisches Aussehen der Elektronendichteverteilung verursachen (z.B. aromatische Aminosäuren wie Tryptophane oder auch Selenomethionine). Nach dieser Zuordnung können dann weitere Seitenketten entsprechend der Aminosäureabfolge zugeordnet werden.

Modelbau bei MR

Wurde die Elektronendichteverteilung mit der Patterson Suchmethode gewonnen, liegt nach der Platzierung des Suchmodells bereits dieses Modell in der mit Modellphasen berechneten Elektronendichtekarte. Bereiche die nicht mit dem Suchmodell übereinstimmen müssen nun identifiziert werden und diese nach der Elektronendichtekarte eingepaßt oder gegebenenfalls das Suchmodell teilweise oder vollständig durch ein Neues ersetzt werden. Das Hauptproblem dabei ist, daß, auf Grund von mangelnden experimentellen Phasen, die Elektronendichtekarten immer sehr stark an das Suchmodell angepasst (model bias) sind. Um dies zu beheben werden vor

allen Bereichen gesucht die stark von Suchmodell abweichen z.B. Bereiche die im Suchmodell fehlen aber im untersuchten Protein vorhanden sein sollten. Eine weitere Unterstützung bieten omit-maps. Bei diesen werden Elektronendichtekarten nur mit Phasen eines Teilbereichs des Modells berechnet. Sinnvollerweise werden also fragliche Bereiche weggelassen. Mehrere Zyklen von Interpretation und Einpassung in die Elektronendichtekarte und anschließende Verfeinerung des Modells und Neuberechnung der Elektronendichteverteilung mit Phasen des neuen Modells sind nötig bis, ein endgültiges Modell erreicht wird, wobei die Änderung von Zyklus zu Zyklus immer geringer werden (Konvergenz).

Unterstützende Programme beim Modelbau

Viele Methoden wurden entwickelt um den Modelbau zu automatisieren. Ein Beispiel ist das Skeletonisieren der Elektronendichtekarte (Swanson 1994) was die Identifikation von Sekundärstrukturelementen erleichtert. Außerdem dienen Rotamerbibliotheken mit optimalen Seitenkettengeometrien einer Erleichterung beim Einpassen des Modells (Jones et al. 1991). Kombinationen von automatischer Veränderungen des Modells und kristallographische Verfeinerung in zyklischen Wechsel bis zu Konvergenz (Lamzin & Wilson 1997), können bei Auflösung von ca. 2.5 Å für den Einbau im Kristallgitter definierter Wassermoleküle verwendet werden. Automatische Methoden für den Ein- bzw. Umbau kompletter Proteinstrukturen in neuphasierte Elektronendichtekarten aus MAD bzw. Pattersonsuchmethoden sind jedoch nur bedingt möglich und meist sehr Fehlerhaft, sobald die Auflösung und die experimentelle Passenqualität nicht ausgezeichnet sind, so daß es bis jetzt noch keine Alternative zum manuellen Einbau darstellt.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Materialien

Soweit nicht ausdrücklich anders erwähnt, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Aldrich (Steinheim), Fluka (Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Roche-Biochemicals (Mannheim), Qiagen (Hilden), Amersham Pharmacia (Freiburg), oder Sigma (Deisenhofen), Calbiochem (Bad Soden) mit dem Reinheitsgrad p.a. bezogen.

- Centricon Mikrokonzentratoren Millipore (Billerica, USA)
Ausschlussgröße 5 und 10 kDa
- Dialyseschläuche Spectra/Pore Spectrum Laboratories, Inc. (Gardena, USA)
Ausschlußgröße: 6-8 kDa
- Eppendorf Reaktionsgefäße Eppendorf, Netheler und Hinz GmbH
(Hamburg), 1,5ml und 2ml
- Filterpapier Whatman (Maidstone, USA)
- PVDF-Membran Pall (New York, USA)
- Petrischalen Greiner (Nürtingen)
- Quarzglasküvette Hellma (Müllheim), d=1 cm

- Sterilfilter membraPure (Bodenheim)
- Ultrafree-MC Millipore (Billerica, USA) GV 0,22 μm

3.1.2 Geräte

- Feinwaage BP 211D Sartorius (Göttingen)
- Heizblock Digital Dry Block Heater PMC
- Kristallisationplatten Charles Supper Company (Natick, USA)
- pH-Meter MP220 mit Elektrode Mettler Toledo GmbH (Schweiz)
- PHM 82 Standard pH-Meter (Radiometer Copenhagen, Dänemark)
- Amicon stirred cell series 8000 Millipore (Billerica, USA)
- Tischzentrifugen 5804 R, 5415 R Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH (Hamburg)
- Waage PE 3600 Mettler Toledo GmbH (Schweiz)
- Zentrifuge Avanti J-25TM, Beckmann (München)
- Zentrifuge J-6 M/E Beckmann (München)
- Dioden-Array Photometer DU 7500 (Beckmann (München)
- Äkta Amersham Pharmacia (Freiburg)
- Goniometerkopf Huber Diffractionstechnik (Rimsting)
- Kühlzentrifuge J2-21 Beckmann (München)
- Schüttelinkubator Infors AG, (Bottmingen Schweiz)
- Branson Sonifier Modell 250 Fa. G. Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
- Drehanoden RU200 mit MARRE-SEARCH Image Plate Detektoren RIGATU, (Hamburg)

Zur Datenverarbeitung aller Art wurden Server und Workstations der Firma DIGITAL alpha-stations (OSF), SILICON GRAPHICS work-stations und Computer Server (IRIX) oder IBM-kompatible Personal Computer eingesetzt.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Sequenzanalyse und -vergleiche

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

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradfordreagenz

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit der Methode nach Bradford photometrisch bei 595 nm bestimmt. Dazu wurde eine Eichgrade mit BSA in den Konzentrationen 0,1 bis 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt.

Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Absorptionsmessung bei 280 nm

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde die auf Tyrosine, Tryptophane und Cysteine zurückzuführende Absorption von UV-Licht bei 280 nm mit einem UV/Vis-Spektrometer gemessen. Der Extinktionskoeffizient wurde mit dem Programm ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>; (Gill and Hip-pel, 1989)) gemäß der Proteinsequenz ermittelt und mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetz die Proteinkonzentration bestimmt:

$$OD = \varepsilon_{280} \cdot c \cdot d$$

OD = optische Dichte

c = Proteinkonzentration [M]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

ε_{280nm} = berechneter Extinktionskoeffizient bei 280 nm/M·cm

3.2.3 Pufferwechsel von Proteinlösungen mit Hilfe der Dialyse

Zur Dialyse von Proteinlösung wurden Dialyseschläuche mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa verwendet. Der Dialysepuffer wurde vor Beginn der Dialyse auf 4 °C heruntergekühlt. Für Probenvolumina unter 1 mL wurden QuixSep Micro Dialyzer (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe) verwendet. Hierbei wurde die Probe in die Kammer eines knopfförmigen Schwimmers pipettiert. Die Öffnung der Kammer wurde durch eine darüber befestigte Dialysemembran verschlossen. Der QuixSep Micro Dialyzer wurde mit der Öffnung nach unten in den Dialysepuffer gegeben und mindestens 2 h unter leichtem Rühren darin belassen. Für größere Probenvolumina wurde ein Schlauchabschnitt der benötigten Länge an einem Enden verknötet und zusätzlich mit einer Klemme verschlossen. Durch das offene Ende wurde die Probe mit Hilfe einer Pipette möglichst luftblasenfrei eingefüllt. Das andere Schlauchende wurde ebenfalls verknötet und mit einer Klemme verschlossen und in den Dialysepuffer überführt. Nach mindestens 1 h wurde der Dialysepuffer erneuert und die Dialyse über Nacht fortgesetzt.

3.2.4 Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Kontrolle der Reinheit des Proteins wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) durchgeführt. 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.

10 % Ammoniumpersulfat (APS)

1 g APS wurde in 10 ml H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

10% Natriumdodecylsulfat (SDS)

5 g SDS wurden in 40 ml H₂O gelöst, dabei war es teilweise nötig den Reaktionsansatz etwas anzuwärmen, um Kristalle zu lösen. Dann wurde der pH-Wert mittels HCl auf 7,2 eingestellt und das Volumen anschließend auf 50 ml aufgefüllt. SDS ist bei RT stabil.

SDS-PAGE Trenngel 12 % (für 8 Gele)

24,4 ml	Wasser
32 ml	Acrylamidlösung, 30 %
20 ml	Tris/HCl; 1,5 M; pH 8,8
800 μ l	SDS, 10 %
800 μ l	APS, 10 %
32 μ l	TEMED

SDS-PAGE Sammelgel (für 8 Gele)

20,4 ml	Wasser
5,1 ml	Acrylamidlösung, 30 %
3,75 ml	Tris/HCl; 1 M; pH 6,8
300 μ l	SDS, 10 %
300 μ l	APS, 10 %
30 μ l	TEMED

Es wurden jeweils acht Gele (8,5 \times 8 cm²) in einer Gelgießkammer (Eigenbau, MPI Martinsried) gegossen. Die Trenngellösung wurde nach Zugabe von 90 μ l TEMED

und 800 μl (0,1 g/ml) APS in die vorbereitete Apparatur gegossen und mit 300 μl Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Alkoholschicht entfernt, das Sammelgel mit 32 μl TEMED und 300 μl (0,1 g/ml) APS versetzt und in den Gießstand eingefüllt. Teflon-Kämme mit 10 bis 12 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×Probenpuffer versetzt und 2 min bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA im SDS-Laufpuffer.

SDS-PAGE-Probenpuffer

10 ml	1,5 M Tris (pH 6,8)
12 ml	10 % SDS
30 ml	Glycerin
15 ml	β -Mercaptoethanol
1,8 mg	Bromphenolblau

10 × SDS-PAGE-Laufpuffer

10 g	SDS
30,3 g	Tris
144,1 g	Glycin

3.2.5 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-Blue-Färbelösung

2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250
450 ml Ethanol
100 ml Essigsäure
450 ml H₂O

Coomassie-Blue-Entfärbelösung

450 ml Ethanol
100 ml Essigsäure
450 ml H₂O

3.2.6 Transfer von Proteinen durch ElektrobloTTing

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

Aufbau

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

Alle Komponenten des Blots wurden vor dem Zusammenbau mit Transferpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte für 2 Std. bei $0,65 \text{ mA/cm}^2$ Gel.

Transferpuffer

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

3.2.7 N-terminale Sequenzierung nach EDMAN

Nach der Methode des EDMAN-Abbaus (Edman and Henschen, 1975) wird die N-terminale Aminosäure mit Phenylisothiocyanat umgesetzt und dabei als Phenylthiohydantoin-Derivat abgespalten. Nach einer HPLC-Auftrennung wird die Aminosäure durch Vergleich eines mit getrennten Standard-Aminosäuregemisches identifiziert. Die durch Elektroblothing an PVDF Membranen fixierten Proteine wurden, wie unter 3.2.5 beschrieben, mit Coomassie Blue G-250 gefärbt und einer N-terminalen Sequenzanalyse zugeführt. Zur Sequenzanalyse gereinigter rekombinanter Proteine wurden 60 bis $100 \mu\text{g}$ Protein in einem Gesamtvolumen von max. $100 \mu\text{l}$ auf eine mit $10 \mu\text{l}$ Methanol vorbehandelten ProSorb PVDF-Membran (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA) pipettiert und dort immobilisiert. Die anschließende Sequenzierung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Mann am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in einem Applied Biosystems Sequenzierer 470A durchgeführt.

3.2.8 Ausschlußchromatographie (Gelfiltration)

Für die Ausschlußchromatographie, wurden je nach den zu trennenden Größenbereich eine Superdex 200 oder eine Superdex 75 26/60, verwendet. Die Säule wurde in

mindestens 1 SV des jeweiligen Laufpuffers äquilibriert. Das maximale Probenauftragsvolumen betrug 5 mL. Die Elution erfolgte isokratisch mit 360 mL Laufpuffer und einer Flußrate von 1 - 3 mL/min. Fraktionen von 2 mL wurden ab einem Elutionsvolumen von 100 mL gesammelt.

3.2.9 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) erlaubt mit einer sehr hohen Genauigkeit die Bestimmung von Proteinmassen. Ermittelt wird die Ionenmasse in der Gasphase, eigentlich das Verhältnis von Masse zu Ladung. Analytische Ionen können aus der Lösung oder als Feststoff in die Gasphase überführt werden, wie zum Beispiel bei der Elektrospray-MALDI (matrix assisted laser desorption ionisation). Dabei werden die Moleküle, die ionisiert werden nicht zerstört (Karas and Hillenkamp 1990). Der Analyt wird erst mit einem im Überschuß vorliegenden Matrixkomponente kokristallisiert. Üblicherweise ist die Matrix eine UV-absorbierende, organische Säure. Mit Hilfe eines gepulsten Lasers wird die Matrix, mit enthaltenem Analyten, durch die Strahlung vaporisiert. Die Matrix dient jedoch zusätzlich zur Absorption, als Donor und Akzeptor von Protonen, wobei der Analyt, abhängig von der Art der Ionisation positiv bzw. negativ geladen wird. Der ionisierte Analyt, in der Gasphase, wird einem elektromagnetischen Feld ausgesetzt. Diese Kraft verursacht eine Beschleunigung, die sowohl von der Masse als auch von der Ionenladung abhängt. Das Spektrophotometer trennt und quantifiziert die Ionen in einer Zeit und Raum aufgelösten Weise und bestimmt damit das Massen-Ladungsverhältnis. Die Ermittlung des Molekulargewichts (pro Untereinheit) von gereinigtem Protein wurde an einem Quadrupol Ionenspray-Massenspektrometer API365 freundlicherweise von Frau Sylvia Koernen am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Es wurden 100 µg Protein eingesetzt. Die Eichung der m/z-Skala erfolgte mit Ammonium-Addukten von Polypropylenglykol-Oligomeren. Aus den m/z-Peaks aller erzeugten Molekülonen mit multipler Ladung wurden die durchschnittlichen Molekularmassen ermittelt (Covey et al., 1988; Mann, 1995).

3.2.10 Analytische Ultrazentrifugation

Zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten bzw. der molaren Masse der Proteinprobe wurde das Enzym zunächst gegen Vergleichspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 300 mM KCl) dialysiert. Die Messzellen bestanden aus Doppelkammern mit einem Aluminiummittelstück und Saphirfenstern. Die Zentrifugationsläufe wurden in der Optima XL-A Analytical Ultrazentrifuge von Beckman mit integrierten optischen Systemen (Scanning UV/VIS Absorbance und Raleigh Interference) durchgeführt. Die Steuerung erfolgte über einen Computer, der mit der XL-A Analytical Data Analysis Software, Version 2.01, ausgestattet war. Zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten wurde die dialysierte Probe mit einer OD_{280} von etwa 1 in die eine Kammer und der Dialysepuffer als Referenz in die zweite Kammer gefüllt. Die Zentrifugation wurde bei 20 °C mit einer Geschwindigkeit von 59000 rpm durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Ultrascan Version 5.0 for UNIX mit der Fitmethode von van Holde und Weischet (1978). Die Methode entfernt den störenden Beitrag der Diffusion von den Daten und führt zu einem Mittelwert von Sedimentationskoeffizienten. Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts (Sedimentationsgleichgewichtsanalyse) wurden die dialysierten Proben mit Dialysepuffer auf eine OD_{280} von 0,3 verdünnt und 120 μL in der Messzelle mit 15 μL Öl (Fluorochemical FC43, Beckman) unterschichtet. Als Referenz diente 150 μL Dialysepuffer. Die Zentrifugationen wurden bei 4 °C über etwa 72 h (bis zur Einstellung des Gleichgewichts) bei einer Geschwindigkeit von 8000 - 13000 rpm je nach vermuteter Quartärstruktur durchgeführt. Für die Auswertung wurde das Programm Origin single (Origin v 3.78) der Software XLA-Data Analysis (Beckman) verwendet. Das benötigte partielle spezifische Volumen v_4 bei 4 °C wurde näherungsweise aus den partiellen spezifischen Volumina v_{25} der Aminosäuren (Cohn & Edsall, 1943) und einer Temperaturkorrektur T_{corr} (Laue et al., 1992) berechnet:

$$v_4 = v_{25} + T_{corr} = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i \cdot V_i}{\sum_i N_i \cdot M_i} + \frac{277,16 - 298,16}{2352,9}$$

N_i = Anzahl der Aminosäure i

M_i = Molekulargewicht der Aminosäure i

V_i = partielles spezifisches Teilvolumen der Aminosäure i

Die benötigte Dichte der Pufferlösung $p_{b,4}$ bei 4 °C wurde nach Laue (1992), aus den einzelnen Pufferkomponenten und einem Temperaturkorrekturfaktor p_4 berechnet:

$$p_{b,4} = \frac{(0,998234 + \sum \Delta p_{ci}) \cdot p_4}{0,998234}$$

p_{ci} = Dichteinkrement der Pufferkomponente i mit der molaren Konzentration c_i , errechnet sich aus:

$$p_{ci} = (A_i + B_i c_i^{0,5} + C_i c_i + D_i c_i^2 + E_i c_i^3 + F_i c_i^4) - 0,998234$$

$A_i - F_i$ = Parameter, vgl. (Laue et al., 1992)

und

$$p_4 = 1,000028 \cdot 10^{-3} \cdot \left[\frac{999,83952 + 16,945176 \cdot T}{1 + (16,945176 \cdot 10^{-3} \cdot T)} - \frac{(7,9870401 \cdot 10^{-3} \cdot T^2) + (46,170461 \cdot 10^{-6} \cdot T^3)}{1 + 16,879850 \cdot 10^{-3} \cdot T} - \frac{(105,56302 \cdot 10^{-3} \cdot T^2) - (280,54253 \cdot 10^{-12} \cdot T^5)}{1 + (16,879850 \cdot 10^{-3} \cdot T)} \right]$$

Durch Bestimmung der Absorption (A , A_0) in Abhängigkeit vom Radius (r , r_0) im Sedimentationsgleichgewicht kann so mit Hilfe der folgenden Gleichung das Molekulargewicht M ermittelt werden:

$$A = A_0 \cdot e^{[H \cdot M \cdot (r^2 - r_0^2)]} + E$$

daraus ergibt sich

$$M = \frac{\ln(A - E) - \ln(A_0)}{H \cdot (A_0 \cdot (r^2 - r_2^2))}$$

mit

$$H = \frac{(1 - v \cdot \rho) \cdot \omega^2}{2 \cdot R \cdot T}$$

E = konstante Abweichung durch nichtsedimentierende Substanzen

R = Gaskonstante = 8,3144 J K⁻¹ mol⁻¹

ω = Winkelgeschwindigkeit

Für die Rib7 wurde ein Molekulargewicht von 50 kDa erhalten.

Diese Arbeiten wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Markus Fisch von der Technischen Universität München durchgeführt.

3.2.11 Dynamische Lichtstreuung

Zur Bestimmung des Multimerisierungszustandes von Rib7 wurden dynamische Lichtstreuungsexperimente durchgeführt. Dazu wurde die Lösung von Rib7 auf eine Konzentration von 0,2 mg/ml verdünnt und filtriert (Ausschlussgrenze des Filters: 0,02 μ m, Whatman). Mit Rib7 wurde in einem DynaPro light scattering Instrument (Protein Solutions, Lakewood, NJ) dynamische Lichtstreuungsexperimente durchgeführt. Als Standard wurde hierbei Rinder-Serum-Albumin verwendet. Für Rib7 wurde ein Molekulargewicht von 50 kDa erhalten.

3.2.12 Konzentrierung von Proteinlösungen

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

3.3 Röntgenkristallographische Methoden

3.3.1 Kristallisation

Die Kristallisationsansätze erfolgten bei 18 °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 hinweg verfolgt. Für das screening einer großen Anzahl von Kristallisationsbedingungen wurde das Prinzip des sparse matrix sampling angewandt. Dabei wurden jeweils 2 μ l (10 mg/ml) Proteinlösung mit 1 μ l des Kristallisationspuffers vermischt und gegen 250-400 μ l Reservoirlösung äquilibriert. Initiale Kristallisationsbedingungen wurden durch Variation verschiedener Parameter (Konzentration von Protein, Präzipitanz sowie etwaiger Additive; Tropfenvolumen und Mischungsverhältnis; Temperatur; screening verschiedener Additive) optimiert.

3.3.2 Datensammlung bei 291 K

Zur Aufnahme von Röntgendiffraktionsdaten bei 291 K wurden Kristalle in silanisierten Quarzkapillaren (0,5 mm Durchmesser, 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 CuK_α -Strahlung ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) auf einer MAR345 Image Plate (MAR Research, Hamburg).

3.3.3 Kryokristallographie bei 100 K

Da Kristalle durch die hochenergetische Röntgenstrahlung des Synchrotrons Strahlenschäden erleiden, was zu einer Verschlechterung des Streubildes führt, wurden die verwendeten Kristalle auf 100 K abgekühlt. Um zu verhindern, daß beim Einfrieren das im Kristall vorhandene Wasser Eisstrukturen ausbildet und eine Zerstörung des geordneten Kristallgitters hervorruft, wurden die tetrakisshexagonalförmigen Kristalle in Perfluoropolyether (PFPE; PFO-X125/03, Fa. Lancaster) gelegt. Mit einem so genannten „cryo-loop“, bestehend aus einem Halter und einer kleinen Schlaufe aus synthetischer Faser, wurden die Kristalle aus der Mutterlauge geholt und direkt im Gasstrom eines Stickstoff-Kühlaggregates (Oxford Cryosystem) auf 100 K gekühlt. Die gefrorenen Kristalle konnten bis zu den Diffraktionsmessungen in flüssigem Stickstoff (77 K) gelagert werden. MAD-Daten wurden an der Beamline BW6 (Wiggler-Beamline mit Toroidspiegel am Deutschen Elektronen Synchrotron DESY, Hamburg) und an der Beamline ID14-4 der European Radiation Synchrotron Facility (ESRF), Grenoble aufgenommen.

3.3.4 Kristalltransformation

Die Kristalle wurden mit Hilfe eines „cryo-loops“ im Kristallhalter des „Free-Mounting-Systems“ (Fa. Proteros Biostructures; Kiefersauer et al., 2000) platziert (siehe Abbildung 3.1 und 3.2). In diesem System umgab ein Luftstrom mit regelbarer Feuchte den Kristall, wodurch der Wassergehalt im Kristall gezielt verändert werden konnte.

Die Luftfeuchtigkeit war vorher auf den Wasserdampfdruck der Mutterlauge (und damit des nativen Kristalls) eingestellt worden (Kiefersauer et al., 1998). Transformation wurde durch verschiedene Feuchte-Zeit-Profile erreicht, wobei der Kristall in den Röntgenstrahl eines Drehanodengenerators gebracht wurde. Die Qualität und Veränderungen des Kristalls wurden, über mehrere Diffraktionsbilder hinweg, beobachtet.



Abbildung 3.1: Montagetisch. 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.

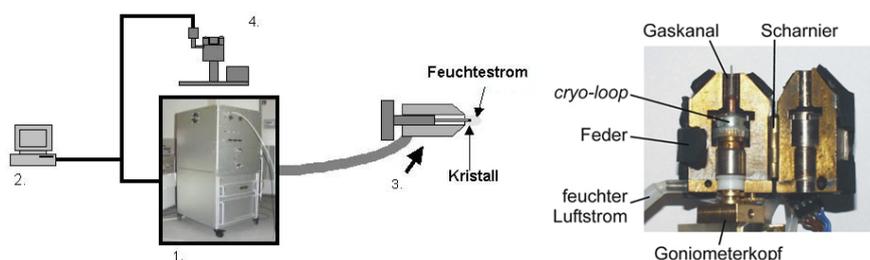


Abbildung 3.2: „Free Mounting System“ Kristallhalter mit geöffnetem Kopf und eingelegtem Loop. 1.) Feuchtgenerator (Humidifier): Der Feuchtgenerator erzeugt um den Kristall einen Luftstrom mit exakt einstellbarer Feuchte. 2.) Kontroll-Einheit (Operation Control Unit) zur Bedienung des Feuchtgenerators. 3.) Probenkopf (Free-Mounting Head) für Proteinkristall. 4.) Mounting-Station zur Montage und Startfeuchtebestimmung des Kristalls

Bei Erreichen einer Transformation wurden die Kristalle in Perfluoropolyether (PFPE; PFO-X125/03, Fa. Lancaster) überführt und direkt im Gasstrom eines Stickstoff-Kühlaggregates (Oxford Cryosystem) auf 100 K gekühlt.

3.3.5 Datenauswertung

Die Bestimmung der Kristallorientierung, der Elementarzelle und der Raumgruppe, sowie die Integration der Reflexintensitäten erfolgte mit MOSFLM (Leslie, 1998), DENZO (Otwinowsky, 1993) oder XDS (Kabsch, 1993). Die weitere Analyse der Daten wurde mit den Programmen des CCP4 Programmpakets (Bailey, 1994) oder des HKL-Programmpakets (Otwinowski and Minor, 1997) durchgeführt. Die Phasen der Strukturfaktoren wurden mit Hilfe eines MAD-Experiments bestimmt. Hierzu wurden der Kristall-Mutterlauge für mehrere Stunden eine Mersalyl Säurelösung (2-[N-(3-hydroxymercuri-2-methoxypropyl)carbamoyl]phenoxyacetic acid) zugesetzt, so daß Hg^{2+} -Ionen in das Kristallgitter eingebaut wurden. Nach Überführung des Kristalls in PFPE wurden diese auf 100 K gekühlt. Zur Bestimmung der Absorptionskante wurde am Synchrotron die Wellenlänge langsam verändert und die vom Kristall emittierte Fluoreszenz, die proportional zu f'' war, detektiert (siehe Abbildung 2.9). Bei drei Wellenlängen $1,006 \text{ \AA}$ (peak), $1,009 \text{ \AA}$ (inflection) und $0,95 \text{ \AA}$ (remote) wurden mit einem CCD-Detektor drei Datensätze bis zu einer Auflösung von $2,7 \text{ \AA}$ aufgezeichnet. Die Messungen erfolgten jeweils über ein kontinuierliches Winkelsegment von 90° , gefolgt von weiteren 90° in inverser Strahlengeometrie zum direkten Messen der Friedelpaare. Die anschließende Integration und Skalierungen der Reflexintensitäten wurde mit SCALA (CCP4, 1994) bzw. DENZO und SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) durchgeführt.

3.3.6 Phasierung

Die Bestimmung von Schweratomlagen erfolgte mit dem Programm SHELXD (Sheldrick et al., 1993). unter Verwendung direkter Methoden. Diese ergaben 7 der 9 theoretischen Quecksilber-Positionen. Die Verfeinerung der Schweratomparameter, Phasenberechnung und Solvent Flattening wurden mit SHARP (de la Fortelle and Bricogne, 1997) durchgeführt. Die initiale Elektronendichte wurde dreifach mit Hilfe des Programms AVE (Jones, 1992) gemittelt.

3.3.7 Modellbau und Verfeinerung

Atommodelle wurden auf einer SILICON GRAPHICS work station mit dem Programm O (Jones et al., 1991) in die Elektronendichtekarten eingepaßt. Hierbei wurde die Realraumverfeinerungsoption benutzt, um eine möglichst gute Anpassung an die Elektronendichte zu erhalten. Die Atommodelle wurden mit CNS verfeinert (Brünger, 1998), wobei die nichtkristallographische Symmetrie (NCS) berücksichtigt wurde. Als Zielfunktion wurde der kristallographische R-Faktor minimiert, wobei geometrische Parameter (Engh and Huber, 1991) berücksichtigt wurden, da die Zahl der beobachteten Variablen im Verhältnis zur Anzahl der verfeinerten Parameter in der Proteinkristallographie im allgemeinen nicht ausreichend überbestimmt ist. Das Gewichtsverhältnis zwischen kristallographischem und geometrischem Term wurde dabei zu Beginn der Verfeinerung bestimmt und mit fortschreitender Qualität des Modells schrittweise erhöht. Um ein objektives Kriterium für den Erfolg der Verfeinerungsrechnungen zu haben, wurden 5 % der Reflexe, angeordnet in dünnen Auflösungsschalen, ausgewählt und als TEST-Satz nicht in die Verfeinerung einbezogen (Brünger, 1992). Der so berechnete freie R-Faktor - im Regelfall 5 % höher als der kristallographische R-Faktor - warnt dabei vor einer Überanpassung des Atommodells an die Daten. Positionelle Verfeinerung und „simulated annealing“ (SA) alternierten mit visueller Inspektion der Elektronendichte und manuellem Einpassen und Änderungen in der Raumgruppe, bis zu einem Absinken des R-Faktors auf unter 32 %. Danach wurden Wassermoleküle automatisiert mit CNS eingebaut. Im Anschluss an die Koordinatenverfeinerung wurden individuelle Temperaturfaktoren verfeinert. Dabei wurden Einschränkungen auferlegt für direkt verknüpfte Atome und für über einen Winkel verknüpfte Atome, jeweils für Haupt- und Seitenketten. Die Zielwerte der Standardabweichungen betragen dabei $1,5\sigma$ (Hauptkette) und $2,0\sigma$ (Seitenkette) für benachbarte Atome und $2,0\sigma$ (Hauptkette) und $2,5\sigma$ (Seitenkette) für über Winkel verknüpfte Atome.

3.3.8 Modelling

FTDock (Fourier Transform Dockock) versucht mit Hilfe eines rigid-body docking die korrekte Bindungsgeometrie von zwei Biomolekülen vorherzusagen. Bewertet wird die Komplementarität der Oberflächen. Dies wird ermöglicht durch die Implementierung eines Fourier-Korrelationsalgorithmuses von Katchalski-Katzir in Kombination mit einer elektrostatischen Funktion, die an die Fourierkorrelation angepasst wurde (Gabb, 1997). Die Fourier Transformation beschleunigt den Prozess. Die Ausgabe besteht aus vielen verschiedenen Vorhersagen, die mit Hilfe von biologischen Informationen zusätzlich beurteilt werden können. Diese kann mit dem Programm RPScor weiterbearbeitet werden. RPScore (Residue level Pair potential Score) verwendet als einzige Bedingung eine empirisch abgeleitete, paarweise potenzial Matrix (Moont 1999), um die Ausgabe von FTDock in eine Rangliste zu verwandeln. Es wurde gezeigt, daß dies die Liste der möglichen Komplexe enorm reduzieren kann. Die Finale Lösung kann mit Hilfe von MultiDock (Multiple copy side-chain refinement Dock) (Jackson 1998) energetisch verfeinert werden in dem die Kontaktfläche entscheidend verbessert wird. Dies wird erreicht durch Modellierung von Seitenkettenkonformationsänderungen und „rigid-body“ Bewegungen.

3.3.9 Strukturanalyse und graphische Darstellung

Nach der Verfeinerung der kristallographischen und der modellierten Strukturen wurde die Qualität der Modelle mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) kontrolliert. Falls sich in den verschiedenen Statistiken und Grafiken (z.B. Ramachandran-Plot und Planarität von aromatischen Ringen) Abweichungen zu Standardwerten zeigten, wurden die entsprechenden Aminosäuren noch einmal überprüft. Überlagerungen von mehreren Proteinen wurden mit dem Programm LS-QMAN (Jones, 1992) durchgeführt. Zur Erstellung von Sequenzvergleichen wurden die Programme ClustalW (Thompson et al., 1994) und GCG (Genetics Computer Group, Madison, USA) verwendet. Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Pro-

ogramm STRIDE (Frishman and Argos, 1995) zugeordnet. Die Ligandenmodelle wurden mit dem PRODRG-Server generiert und energetisch minimiert. Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme BOBSCRIPT (Esnouf, 1997), MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und SwissPdbViewer (www.expasy.ch/spdv) benutzt. Zur Darstellung von Sequenzvergleichen wurde das Programm ALSRIPT (Barton, 1993) und BOXSHADE (Hofmann, Baron) angewandt. Zur Nachbearbeitung von Bildern, sowie zur Konvertierung kamen die Programme PHOTOSHOP (Adobe Systems Inc., USA), XV (J. Bradley, Pennsylvania, USA), ILLUSTRATOR (Adobe Systems Inc., USA) und CorelDRAW (Corel Corporation Limited, 1998) zur Anwendung.

3.4 Kristallanomalien

3.4.1 Verzwillingung

Verzwillingung ist eine Anomalie im Kristallwachstum, wobei der Kristall eigentlich aus zwei Kristallen besteht, deren Orientierung sich in einer speziellen Weise unterscheidet. Üblicherweise werden diese Kristallteile als Domänen bezeichnet. Jede dieser Domänen des verzwillingten Kristalls führt zu einem eigenen Diffraktionsmuster. Gemessen wird die Summe all dieser Muster, wobei die Anteile, an der Gesamtintensitäten einzelner Domänen, die Anteile der Domänen am Gesamtkristall widerspiegelt. Dabei beschreibt das Zwillingsgesetz in Form einer 3×3 Matrix die genaue Art und Weise, wie sich die Domänen geometrisch ineinander überführen lassen. Weiterhin ist für die vollständige Beschreibung der Verzwillingung, der relative Anteil der einzelnen Domänen am Kristallaufbau anzugeben.

Grob werden drei Fälle unterschieden.

- Epitaxiale Verzwillingung
- Merohedrale Verzwillingung

- Pseudomerohedrale Verzwilligung

Die Zuordnung erfolgt in Abhängigkeit der Überlappung der Gitterachsen in den drei Raumrichtungen oder kann, was gleichbedeutend ist, nach der Auswirkung der Verzwilligung auf das Beugungsbild vorgenommen werden.

Epitaxiale Verzwilligung

Bei epitaxial verzwilligten Kristallen (siehe Abbildung 3.3) überlappen weniger als drei Achsen und somit kommt es auch nicht zur vollständigen Überlappung der Diffraktionsmuster. Das Hauptproblem spielt hier die Indizierung und die Datensammlung. Kann jedoch eines der beiden Diffraktionsmuster identifiziert werden, so kann wie bei unverzwilligten Kristallen weiterverfahren werden. Es kann manchmal zu Problemen mit der Integration von einzelnen Reflexen kommen. Mit Hilfe des Zillingsoperators können diese jedoch identifiziert und dann korrigiert oder verworfen werden. Diese Verzwilligung ist meist makroskopisch zu sehen.

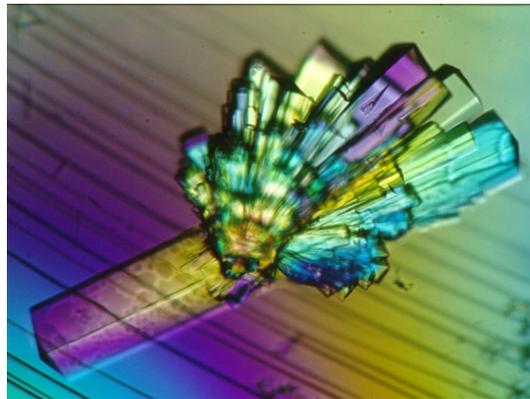


Abbildung 3.3: Epitaxial verzwilligter Kristall

Pseudomerohedrale oder Merohedrale Verzwilligung

Überlappen die Gitter in allen drei Raumrichtungen (wie z.B. in Abbildung 3.4), was jedoch nur in bestimmten Raumgruppen vorkommen kann, spricht man von

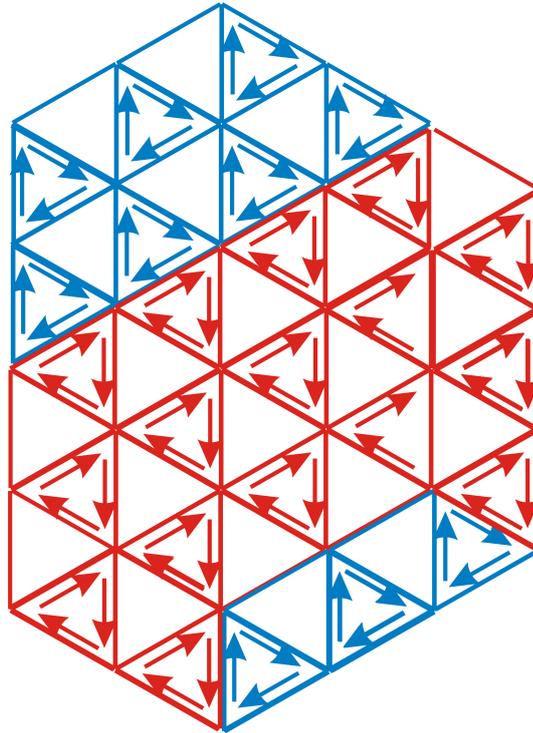


Abbildung 3.4: Hypothetisches Beispiel eines merohedralen Zwillingskristall Jede Domäne hat eine P3 Symmetrie und die Zwillingsoperation ist eine Drehung um 180° um eine Achse parallel zur dreizähligen Achse

pseudomerohedraler oder merohedraler Verzwilligung. Hier kommt es zu einer exakten Überlagerung der Beugungsbilder.

Bei diesen beiden Arten von Verzwilligung kann die Fehlordnung nicht makroskopisch gesehen werden und auch das Beugungsbild zeigt in diesen Fällen keine besondere Auffälligkeit (siehe Abbildung 3.5). Im Unterschied zur merohedralen Verzwilligung, bei der eine Verzwilligung innerhalb eines Kristallsystems stattfindet, ist die pseudo-merohedrale Verzwilligung kristallsystemübergreifend.

Pseudomerohedrale Verzwilligung

Im Falle der kristallsystemübergreifenden pseudo-merohedralen Verzwilligung erscheint ein Kristallsystem niedriger Symmetrie durch das Zwillingsgesetz als höher-

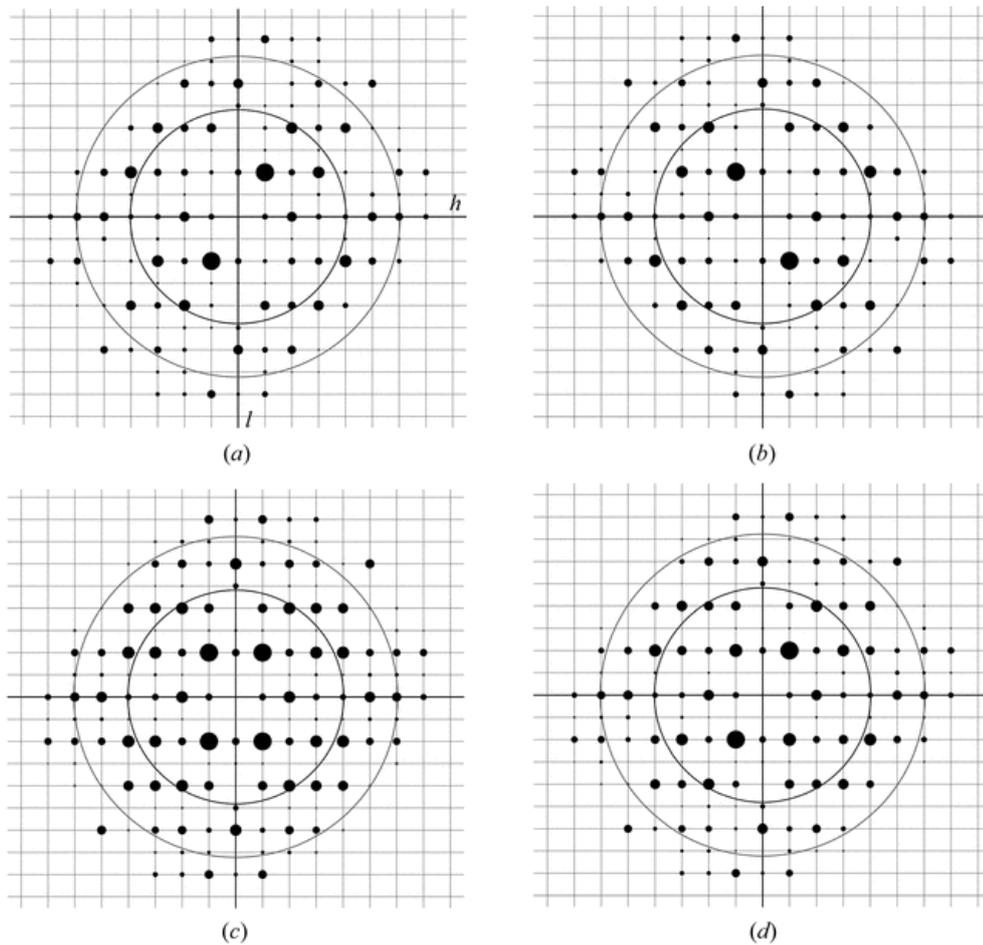


Abbildung 3.5: Musterbeispiel der Effekte von Verzwilligung auf das Diffraktionsbild. (a) und (b) separate Diffraktionsbilder der einzelnen Domänen. (c) Überlagerung von (a) und (b) mit Skalierungsfaktor 0.5 und damit Simulation einer perfekten Verzwilligung. (d) Überlagerung von (a) und (b) mit 80 % (a) und 20 % (b) und damit Simulation einer nicht perfekten Verzwilligung.

symmetrisch. Diese Verzwilligungsart ist jedoch nur im Fall einer speziellen Geometrie möglich, wenn die metrische Symmetrie der Elementarzelle höher ist als vom Kristallsystem gefordert. Das Musterbeispiel hierfür ist eine monokline Raumgruppe mit einem Winkel β von ungefähr 90° . Selbst in diesem Fall ist aber, wie gewöhnlich, eine Verzwilligung nur dann zu beobachten, wenn die intermolekularen Interaktionen, über die Zwillingsgrenzen hinweg, energetisch mit denen vergleichbar sind, die im Fall des unverzwilligten Kristall vorliegen würden. Hier entspricht das Verzwilligungsgesetz einen Symmetriepoperator, der zu einer höher symmetrischen Superzelle gehört. Als weiteres Beispiel kann eine primitiv monokline Zelle mit $a = b$

unmittelbar in eine größere orthorhombische C-zentrierte umgestellt werden. Auch kann eine monokline Elementarzelle mit der geometrischen Beziehung $c \cdot \cos\beta = -\frac{a}{2}$ in eine C-zentrierte orthorhombische überführt werden.

Merohedrale Verzwillingung

Eine merohedrale Verzwillingung kann nur bei Kristallsystemen mit zwei möglichen Lauegruppen vorliegen. In diesem Fall kristallisiert das Protein mit einer höheren Punktgruppensymmetrie als der korrespondierenden Raumgruppe. In diesen Kristallsystemen (tetragonal, trigonal, hexagonal und kubisch) besteht die Möglichkeit ein Gitter niedrigerer Lauesymmetrie durch das Zwillingsgesetz so auf sich abzubilden, daß dadurch die höhere Symmetrie erzeugt werden kann. Eine höhere Symmetrie wird allerdings nur dann erzeugt wenn es sich um eine perfekte Verzwillingung handelt, d.h. wenn beide Zwillingsdomänen in gleicher relativer Besetzung im Kristall vorhanden sind. Je größer der Unterschied der Besetzung der Domänen ist, desto stärker werden die Abweichungen von der höheren Symmetrie deutlich.

3.4.2 Allgemeine Anzeichen für Zwillingskristalle

Offensichtliche Verzwillingungserscheinungen sind z.B. die äußere Erscheinung des Kristalls oder das Vorhandensein von Doppelreflexen im Streubild, dies wäre theoretisch nur bei epitaxial verzwillingten Kristallen möglich. In der Praxis kann es jedoch vorkommen, weil jeder Kristall sich immer etwas von den anderen unterscheidet, daß auch Indizien im merohedralen und pseudo-merohedralen Fall gefunden werden können. Ein Indiz für alle Verzwillingungsarten ist z.B. wenn bei Berechnungen des Matthews Koeffizient, die Zahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit, kleiner als 1 ist. Weiterhin kann es vorkommen das die systematischen Absenzen zu keiner bekannten Raumgruppe passen.

3.4.3 Erkennen von Pseudo-merohedraler- und Merohedraler Verzwillingung

Die Intensitätsstatistiken eines unverzwilligten Kristalls unterscheiden sich deutlich von denen eines verzwilligten Kristalls. Willson zeigte, daß für einen unverzwilligten Kristall, die mittleren und höheren Momente, der zentrischen und azentrischen Reflexe, einem vorhersagbaren Muster folgen (Willson 1949). Wie bereits erwähnt ist jeder Reflex eines verzwilligten Kristalls eigentlich die gewichtete Summe der Reflexe der Zwillingsdomänen. Mit Hilfe der Intensitätsstatistiken ist deshalb eine Identifikation möglich. Die kumulative Intensitätsstatistik (siehe Abbildung 3.6) zeigt die Anzahl der beobachteten Reflexe aufgetragen gegen die relative Intensität, bezüglich der mittleren Intensität. Für verzwilligte Daten ist die Anzahl schwacher Reflexe viel geringer als erwartet und somit verläuft die Kurve der azentrischen Reflexe immer sigmoidal. Dies ist leicht erklärbar, wenn man bedenkt, daß bei verzwilligten Kristallen die Intensität der einzelnen Reflexe die Summe der Reflexe ihrer Domäne ist und es unwahrscheinlich ist, daß alle zusammenwirkenden Intensitätsteile gleichzeitig schwach sind. Genauso unwahrscheinlich ist es, daß alle stark sind, weshalb auch diese Anzahl geringer als erwartet ist. Zentrische Reflexe dürfen bei diesen Betrachtungen nicht berücksichtigt werden, weil es sein kann, daß durch die Verzwillingung eine falsche Raumgruppe gewählt wurde und somit Reflexe fälschlicher Weise als zentrische Reflexe ausgewählt wurden.

Ein weiterer relativ sensibler und zuverlässiger Indikator für eine Verzwillingung der Daten ist der Mittelwert von $|E^2 - 1|$. Dieser Wert ist umso größer, je größer die Unterschiede zwischen den Reflexintensitäten sind und deshalb zeigen die Beugungsbilder von Zwillingskristallen eine Abweichung vom Erwartungswert nach unten. Das gleiche gilt auch für das Verhältnis von $\frac{\langle I^2 \rangle}{\langle I \rangle^2}$ der azentrischen Reflexe aufgetragen gegen die Auflösung der Messdaten, die betrachtet werden (siehe Abbildung 3.7). Unverzwilligte Kristalle liefern Werte um 2.0, verzwilligte Kristalle um 1.5. Statt der Intensität können auch die normalisierten Strukturaktoren betrachtet werden.

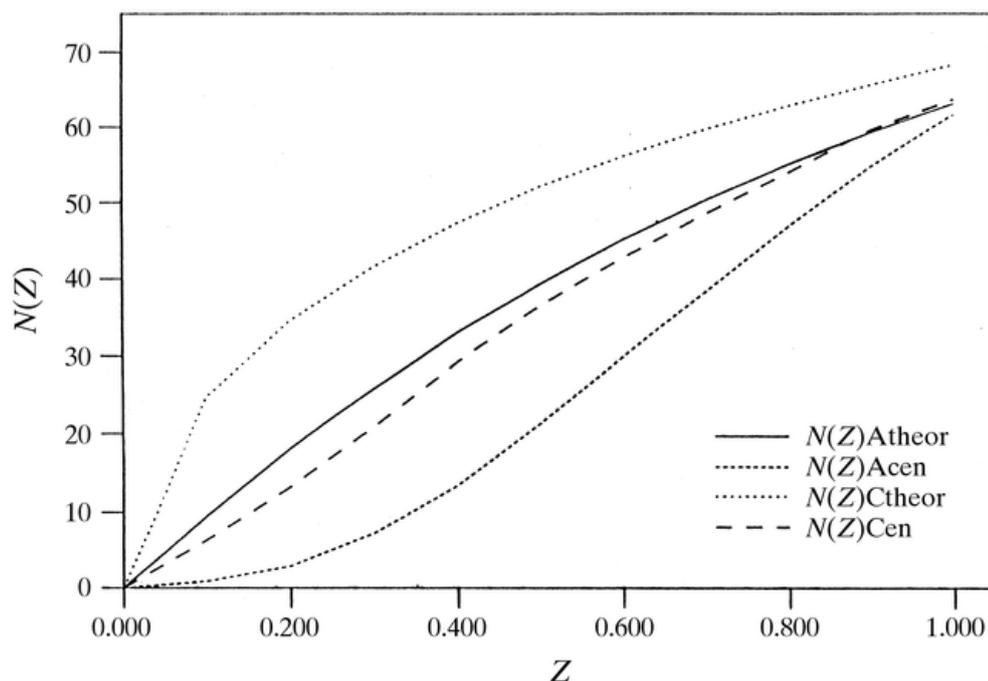


Abbildung 3.6: Graphische Darstellung der kumulativen Intensitätsstatistiken. Dargestellt sind die kumulativen Intensitätsstatistiken ($N(Z)$) aufgetragen gegen die relative Intensität bezogen auf die mittleren Intensität ($Z = I/\langle I \rangle$) azentrischer Daten.

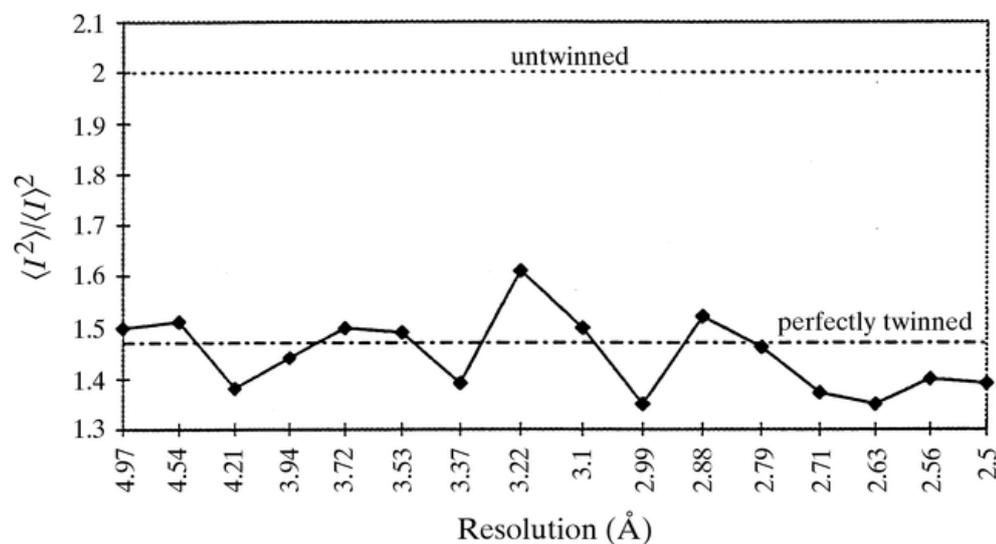


Abbildung 3.7: Graphische Darstellung eines Zwillingstest

Verschleierung der Verzwilligung

Die Erkennung von Verzwilligung mit Hilfe von Intensitätsstatistiken wird als sehr robust und zuverlässig angesehen. Es gibt eigentlich nur drei mögliche Erklärungen

für das Versagen dieser Methode.

1. Das Vorhandensein von starker Anisotropie
2. Zusammenfallen einer zweifachen NCS Achse mit einem Zwillingsoperator
3. Die Anwesenheit von translationeller NCS

In unseren Fall ist Anisotropie auszuschließen, da weder optische Betrachtung der Streubilder, noch Untersuchungen mit Hilfe der „Fall-off“ Prozedur des Programms TRUNCATE dies andeuten würden. Der zweite Fall mußte nicht untersucht werden, da aus einer Nativen Patterson und der Intensitätsstatistikuntersuchung der Reflexe mit Hilfe des Programms TRUNCATE offensichtlich war, daß eine Pseudoinnenzentrierung vorlag und somit Fall 3 eingetreten war.

3.4.4 Pseudoinnenzentrierung

Erkennen der Pseudoinnenzentrierung

Eine Möglichkeit Pseudoinnenzentrierung zu erkennen, ist die einzelnen Reflexe selbst zu betrachten. Dies kann zum einen in einem Streubild selbst erkannt werden, wenn lokal oder alternierend schwache Reflexe auftreten (siehe Abbildung 3.8) zum anderen können die Reflexintensitätsstatistiken betrachtet werden. Abhängig von der Raumgruppe kann Pseudoinnenzentrierung nur bestimmte Klassen von Reflexen betreffen. Im Fall einer tetragonalen Raumgruppe kommt es zum Beispiel zu Unterschieden zwischen den geraden und ungeraden $h+k+l$ Reflexen (siehe Tabelle 3.4.5)

KAPITEL 3. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3.1: Trunkatestatistik der Reflexintensitäten geordnet nach den HKL-Indizes

Range	Min_S	D_{max}	N_{ref}	1 h	2 k	3 l	4 h+k	5 h+l	6 k+l	7 h+k+l	8 h+k,h+l,k+l
1	0.00250	15.23	335	12.6 13.1	12.4 13.3	12.4 13.4	12.4 13.3	12.6 13.1	12.6 13.1	19.1 6.7	11.9 13.1
2	0.00431	12.78	410	23.2 21.5	21.6 23.0	22.1 22.5	20.8 23.9	22.3 22.3	21.0 23.6	31.0 14.0	19.5 23.2
3	0.00612	11.23	482	25.1 24.2	24.4 24.8	23.2 26.0	24.9 24.3	24.2 25.0	23.6 25.6	32.4 16.7	23.5 25.0
4	0.00793	10.13	529	25.9 26.6	24.8 27.6	25.0 27.5	25.5 26.9	25.8 26.6	26.3 26.1	33.8 19.3	25.2 26.6
5	0.00974	9.30	567	25.9 27.0	27.2 25.7	27.2 25.7	25.6 27.3	26.8 26.2	27.0 25.9	31.8 21.3	26.5 26.4
6	0.01155	8.65	630	22.8 22.2	21.1 24.0	22.0 23.0	21.6 23.4	23.4 21.6	22.4 22.6	28.2 16.9	22.4 22.5
7	0.01336	8.12	682	20.3 19.4	19.0 20.7	20.9 18.8	19.7 20.1	18.1 21.7	20.1 19.7	26.7 13.0	18.0 20.5
8	0.01517	7.67	734	19.3 18.6	19.1 18.8	20.0 17.8	19.1 18.8	19.9 18.0	18.1 19.8	24.5 13.2	19.1 18.9
9	0.01698	7.30	750	15.7 17.0	15.8 16.9	17.3 15.3	16.4 16.3	15.1 17.6	16.1 16.5	21.4 11.3	14.9 16.8
10	0.01879	6.97	798	13.8 14.6	15.1 13.3	14.1 14.3	13.6 14.9	15.6 12.9	14.3 14.1	18.4 9.9	15.0 14.0
11	0.02060	6.68	845	12.6 10.9	12.0 11.5	12.2 11.2	11.9 11.6	12.0 11.5	11.9 11.6	15.5 8.0	12.3 11.5
12	0.02241	6.43	852	11.4 10.5	11.4 10.6	11.2 10.8	10.7 11.2	10.7 11.3	11.3 10.6	14.2 7.8	10.8 11.1
13	0.02422	6.20	901	12.1 13.2	12.3 13.0	12.2 13.1	12.4 13.0	12.8 12.6	12.1 13.2	16.4 9.1	11.9 12.9
14	0.02603	5.99	927	11.7 12.1	12.4 11.4	12.4 11.4	12.0 11.8	12.6 11.3	11.6 12.2	15.8 8.0	12.4 11.7
15	0.02784	5.81	981	11.7 11.3	11.6 11.4	11.4 11.6	12.1 10.9	10.9 12.1	11.7 11.3	14.4 8.6	11.7 11.4
16	0.02965	5.64	982	10.2 12.6	11.7 11.2	11.6 11.2	11.2 11.6	12.1 10.8	10.5 12.3	13.9 8.9	11.0 11.6
17	0.03146	5.48	1015	12.1 10.2	11.3 11.1	11.2 11.2	10.8 11.5	11.0 11.4	12.0 10.4	14.6 7.9	11.5 11.1
18	0.03327	5.34	1060	12.1 11.6	11.2 12.5	11.8 11.9	11.7 12.0	11.4 12.3	11.5 12.2	14.5 9.3	11.0 12.2
19	0.03508	5.21	1063	12.0 12.3	12.7 11.6	12.4 11.9	12.4 11.9	12.4 11.9	12.4 11.9	15.1 9.0	12.9 11.9
20	0.03689	5.08	1090	12.9 12.7	12.9 12.7	12.5 13.1	13.4 12.2	12.4 13.3	12.8 12.8	14.9 10.8	13.0 12.7
21	0.03870	4.97	1155	11.8 12.5	12.4 11.9	12.1 12.2	12.2 12.1	11.9 12.4	12.0 12.3	13.5 10.8	11.8 12.3
22	0.04051	4.86	1139	12.5 12.7	12.6 12.6	12.4 12.9	12.2 13.1	12.3 12.9	12.2 13.0	14.2 11.0	11.5 13.0
23	0.04232	4.76	1184	12.3 12.2	12.6 11.9	12.0 12.5	12.3 12.2	11.6 13.0	12.5 12.0	13.7 10.8	11.8 12.4
24	0.04413	4.67	1199	13.0 12.7	13.0 12.6	11.8 13.8	12.3 13.3	12.4 13.2	12.9 12.8	14.1 11.5	12.0 13.1
25	0.04594	4.58	1185	12.8 14.0	13.5 13.4	13.2 13.7	13.2 13.7	13.5 13.3	13.5 13.3	14.2 12.7	13.4 13.5
26	0.04775	4.49	1260	12.2 12.4	12.3 12.3	12.4 12.1	13.0 11.6	12.3 12.3	12.2 12.4	13.2 11.4	12.9 12.1
27	0.04956	4.41	1261	11.7 13.1	12.5 12.2	12.2 12.5	12.4 12.3	12.3 12.4	13.0 11.7	13.7 10.9	13.0 12.1
28	0.05137	4.34	1321	11.7 10.9	11.5 11.0	11.3 11.2	11.5 11.0	11.3 11.2	11.2 11.3	11.6 10.9	11.5 11.2
29	0.05318	4.26	1263	9.8 10.7	10.0 10.5	9.8 10.7	10.7 9.7	9.8 10.8	9.7 10.8	10.8 9.7	9.7 10.4
30	0.05499	4.20	1371	9.7 10.6	10.2 10.1	9.9 10.4	9.6 10.6	10.6 9.8	9.6 10.7	10.6 9.7	9.4 10.4
31	0.05680	4.13	1343	8.6 9.4	8.8 9.1	9.2 8.6	9.1 8.8	8.7 9.2	9.0 9.0	9.8 8.1	8.8 9.0
32	0.05861	4.07	1388	9.4 8.7	9.1 9.0	9.2 8.9	9.5 8.6	8.6 9.4	9.4 8.7	9.1 9.0	9.5 8.9
33	0.06042	4.01	1382	8.1 9.6	8.7 9.1	9.0 8.8	8.6 9.1	8.6 9.2	8.2 9.6	9.3 8.4	7.6 9.3
34	0.06223	3.95	1442	7.8 7.9	7.8 7.9	8.2 7.4	7.8 7.9	8.1 7.6	7.5 8.2	8.4 7.4	7.7 7.9
35	0.06404	3.90	1442	7.1 7.0	7.4 6.7	6.8 7.3	6.7 7.4	7.1 7.0	6.8 7.3	7.4 6.7	6.5 7.2
36	0.06585	3.84	1460	7.2 6.5	6.8 6.9	6.7 7.0	7.1 6.6	6.8 7.0	7.0 6.7	7.4 6.4	7.2 6.8
37	0.06766	3.79	1444	6.7 6.5	6.8 6.4	6.8 6.3	6.9 6.3	6.7 6.5	6.6 6.6	6.9 6.3	7.0 6.5
38	0.06947	3.75	1505	5.6 5.8	5.5 5.9	5.8 5.6	5.9 5.5	5.9 5.5	5.8 5.6	6.2 5.3	6.1 5.6
39	0.07128	3.70	1504	6.3 5.6	6.1 5.9	6.5 5.5	6.5 5.5	6.2 5.8	6.0 5.9	6.0 5.9	6.8 5.7
40	0.07309	3.65	1581	6.0 6.1	6.1 6.0	6.3 5.8	6.0 6.0	5.5 6.6	5.8 6.3	6.6 5.5	5.3 6.3
41	0.07490	3.61	1525	5.0 4.9	5.3 4.6	4.7 5.1	5.0 4.9	5.0 4.9	4.6 5.3	5.0 4.8	4.7 5.0
42	0.07671	3.57	1505	4.5 3.9	4.1 4.3	3.9 4.4	4.3 4.1	4.1 4.2	4.6 3.8	4.3 4.1	4.7 4.0
43	0.07852	3.53	1605	4.3 4.4	4.3 4.4	4.4 4.3	4.2 4.6	4.5 4.2	4.3 4.4	4.6 4.2	4.3 4.4
44	0.08033	3.49	1595	5.2 4.1	4.7 4.7	4.9 4.4	5.2 4.2	4.8 4.6	4.9 4.5	4.8 4.6	5.5 4.4
45	0.08214	3.45	1612	3.8 3.8	4.0 3.7	3.7 3.9	3.8 3.8	3.8 3.8	4.2 3.4	3.8 3.8	4.1 3.7
.
.
.
Totals:			75911	7.5 7.6	7.6 7.5	7.6 7.5	7.6 7.6	7.5 7.6	7.5 7.6	8.7 6.4	7.5 7.6

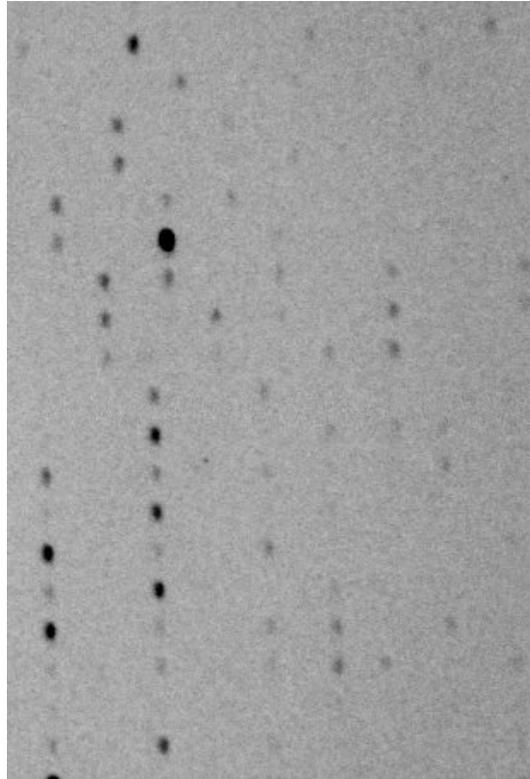


Abbildung 3.8: Ausschnitt aus einem Streubild eines pseudo-innenzentrierten Kristalls

Native Patterson

Eine weitere Möglichkeit bietet die native Patterson mit der Identifikation von Pseudoursprungpeaks, die im Fall einer Pseudoinnenzentrierung auftreten. Die Ursache dafür liegt im Vorhandensein einer NCS Translationssymmetrie. Dadurch kommt es zu einer Häufung des Abstandsvektors, der dem Translationsvektor entspricht und dieser kann in der Nativen Patterson identifiziert werden. In unserem Fall entsprach die Peakhöhe $\sim \frac{1}{3}$ der Peakhöhe des Ursprungspeak (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Native Patterson Peaklist

Nummer	x	y	z	Peakhöhe
PEAK 1	0.0000	0.0000	0.0000	341.85
PEAK 2	0.5000	0.5000	0.4898	125.63
PEAK 3	0.5000	0.5000	0.5102	125.63
PEAK 4	0.9786	0.0283	0.0000	16.57
PEAK 5	0.0214	0.9717	0.0000	16.57
PEAK 6	0.9717	0.9786	0.0000	16.57
PEAK 7	0.9796	0.0276	0.9952	13.95
PEAK 8	0.0204	0.9724	0.9952	13.95
PEAK 9	0.9724	0.9796	0.9952	13.95
PEAK 10	0.0364	0.0000	0.0000	11.24
PEAK 11	0.0000	0.9926	0.0219	9.53
PEAK 12	0.9926	0.0000	0.9781	9.53
PEAK 13	0.0000	0.9926	0.9781	9.53
PEAK 14	0.9926	0.9926	0.0220	7.30
PEAK 15	0.9926	0.9926	0.9780	7.30
PEAK 16	0.0000	0.0000	0.9488	5.94
PEAK 17	0.0000	0.0000	0.5000	5.87
PEAK 18	0.9423	0.0508	0.0000	5.65

Wie verhindert die Pseudoinnenzentrierung das Erkennen von Verzwilligung

Das Vorhandensein der hohen nicht kristallographischen Symmetrie (NCS), in Kombination mit einer Pseudoinnenzentrierung, scheint die Hauptursache, für das Nichterkennen der Verzwilligung, mit Hilfe statistischer Methoden, zu sein. Wenn die NCS Translationselemente besitzt und diese nahe der rationalen Fraktionen der Einheitszelle liegen, verursacht die Pseudoinnenzentrierung, daß ein großer Anteil der Reflexe schwach sind oder ganz fehlen. Gleichzeitig können auch bestimmte Reflexe verstärkt werden. Der Einfluß dieses Effektes ist abhängig von der Passgenauigkeit der Pseudoinnenzentrierung und der Reinheit der translationellen Symmetrie. Diese

Abweichung wirkt natürlich der Erkennung von Verzwilligung entgegen, da bei einer Verzwilligung gerade die Anzahl sehr schwacher und sehr starker Reflexe verringert wird.

3.4.5 Entzwilligung der Daten

In den meisten Fällen ist eine Strukturlösung mit verzwilligten Datensätzen nicht möglich, so dass eine mathematische Entzwilligung der Daten notwendig wird. Dies wird möglich da das gemessene Beugungsbild als Überlagerung zweier korrekter Beugungsbilder angesehen werden kann. Zu jedem Reflex gibt es daher einen zwillingsverwandten Reflex, wobei dieser aus dem ersten durch Anwendung des reziproken Zwillingsoperators erzeugt wird. Konnte der Zwillingsoperator identifiziert werden, wobei für bestimmte Raumgruppen oft nur bestimmte Operatoren möglich sind, kann versucht werden den Datensatz zu entzwilligen. Problematisch ist aber die genaue Zwillingsfraktion festzustellen da diese normalerweise unbekannt ist und abgeschätzt werden muss. Experimentell können einfach verschiedene Zwillingsfraktionen angenommen werden und das Verhalten des Datensatzes beobachtet werden. Die Intensitätsstatistiken sollten sich normalisieren und die Anzahl der negativen Teilintensitäten der einzelnen Domänen klein sein (Britton 1972). Außerdem sollte die Korrelation der Teilintensitäten minimal sein. Eine weitere Möglichkeit ist mit verschiedenen Verzwilligungsfraktionen das Verhalten des R_{merge} in den Auflösungsstufen zu betrachten. Einen guten Wert für die Zwillingsfraktion liefert auch der partielle Zwillingstest von Yeates (1997). Dieser Test ist jedoch nicht selbst ein Verzwilligungstest. Er kann nicht zwischen NCS Operatoren und Zwillingsoperatoren unterscheiden, wenn die NCS-Achse ähnlich wie ein potentiellen Verzwilligungsoperator liegt (Yeates 1999). Mit dieser Methode entfernt man zwar die Verzwilligung der Daten aber man rechnet neue systematische Fehler hinein, und zwar umso stärker, je näher der Wert der Zwillingsfraktion bei 0,5 liegt. Bei perfekter Verzwilligung ist das Problem aus mathematischen Gründen (Teilung durch Null) nicht lösbar. Durch die neu entstandenen systematischen Fehler ist auch eine Verfeinerung der

entzwilligten Daten nie unproblematisch.

Verfeinerung ohne Entzwilligung mit CNS

Bei CNS wird die Verzwilligung direkt in der Verfeinerung (refinement target) berücksichtigt und die Daten werden nicht entzwilligt. Das verwendete kristallographische Target ist

$$target = (Fo - k(\sqrt{(1 - \alpha)Fc^2 + (\alpha)Fc'^2}))^2g$$

Alpha entspricht hier der Zwillingsfraktion (zwischen 0-0.5) und Fc' bezeichnet die Anwendung des Zwillingsoperators. k ist ein Skalierungsfaktor zwischen beobachteten und berechneten Daten. Dieser wird konstant gehalten während der Verfeinerung und wird dann neu berechnet, sobald die Gewichtung zwischen kristallographischen und geometrischen Term neu berechnet wurde. Die Zwillingsfraktion wird während des ganzen Refinement nicht verändert.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Kristallisation

Rib7 aus *Methanococcus jannaschii* wurde in einem rekombinanten *E. coli* - Stamm als funktionelles Protein exprimiert und freundlicherweise von Herrn Dr. Markus Fischer von der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt. Das Protein wurde mit Konzentrationen im Bereich von 10 mg/ml in Sitting drop Kristallisationsexperimenten eingesetzt. Je 1 μ l des aufkonzentrierten Proteines wurden mit 1 μ l der optimierten Präzipitanzlösung (100 mM Tris/HCl, pH 7,8 und 1,1 M Na₃Citrate) versetzt und gegen 300 μ l Reservoirpuffer derselben Bedingung bei 20 °C äquilibriert. Ausreichend streufähige Kristalle wurden erst durch die Cokristallisation mit den Detergenz Cymal2 (Cyclohexyl-ethyl- β -D-maltoside, siehe Abbildung 4.1) erhalten.

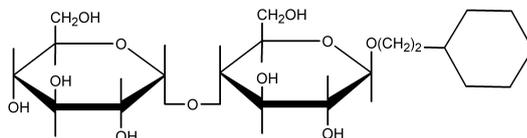


Abbildung 4.1: Strukturformel von Cymal

Dabei wurde zu der Mischung aus Protein und Präzipitanzlösung noch 0.2 μ l des Detergenz zugegeben. Aus diesen Ansätzen wuchsen nach ca. einer Woche meßbare Proteinkristalle bis zu einer Größe von etwa 400 μ m \times 200 μ m \times 200 μ m heran. Ein

Exemplar der terakisshexagonal förmigen Kristalle sowie das Diffraktionspattern von Rib7 sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

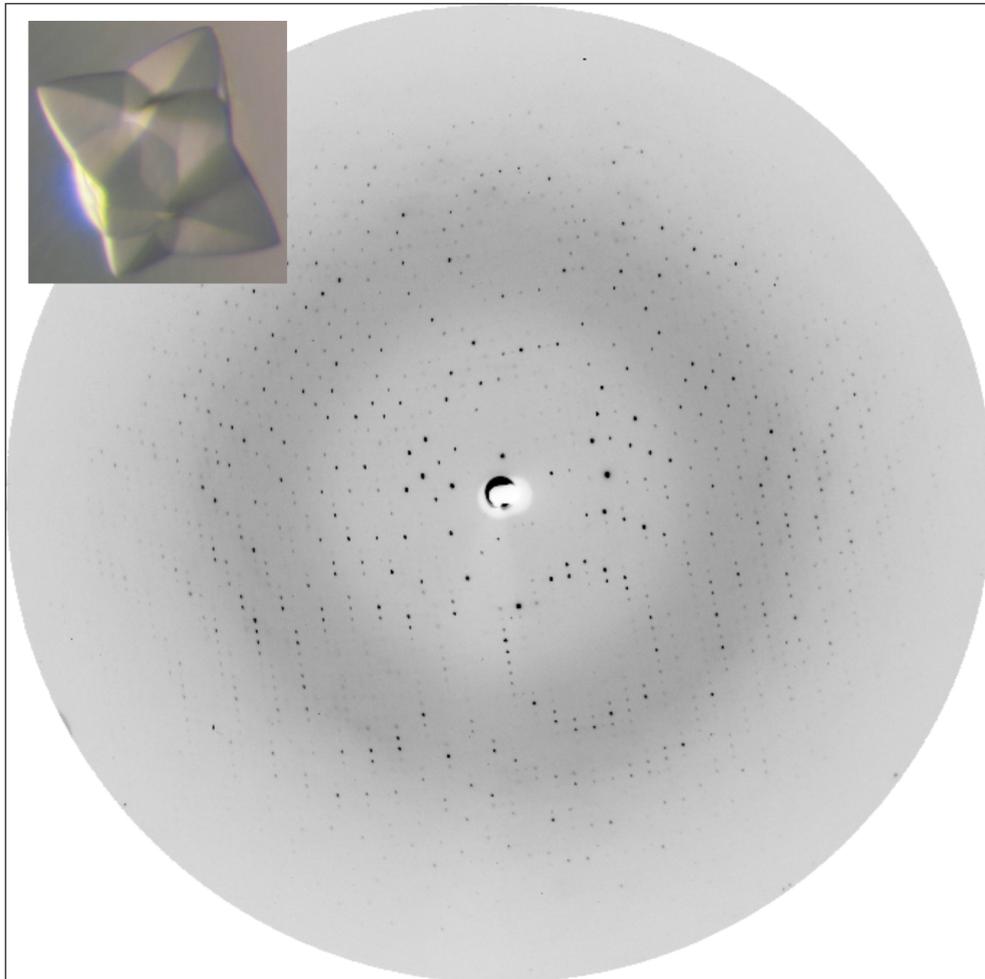


Abbildung 4.2: Diffraktionspattern (maximale Auflösung: 2.7 \AA) Rotation: 0.5° , Wellenlänge $\lambda = 1.006 \text{ \AA}$ und Kristalle von Rib7 von *Methanococcus jannaschii* in 100mM Hepes/NaOH pH 7.5, 1,2M Na_3Citrat und gefroren in PFO Öl

Die Kristalle der nativen-Form von Rib7 wurden zur Phasierung in Soaking-Kristallisationsexperimenten derivatisiert. Hierzu wurden der Mutterlauge eines Kristalls für mehrere Stunden $0.2 \mu\text{l}$ 10 mM Mersalyl Säurelösung ([2-[N-(3-hydroxymercuri-2-methoxypropyl)-carbamoyl]-phenoxyacetic acid, siehe Abbildung 4.3) zugesetzt, so daß Hg^{2+} -Ionen in das Kristallgitter eingebaut wurden. Nach Überführung des Kristalls in PFPE wurden diese auf 100 K gekühlt.

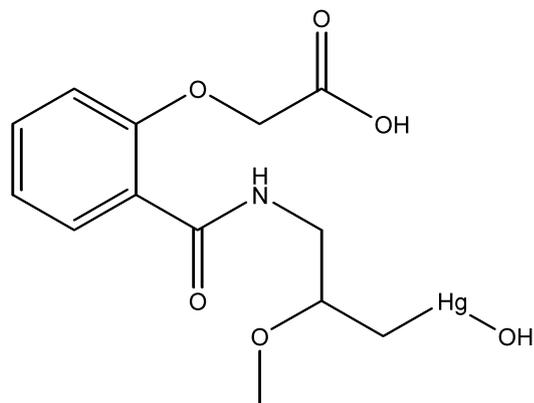


Abbildung 4.3: Strukturformel von Mersalyl Säure

4.1.2 Derivatisierung mit Selen

Zur Integration von Selenomethionin in die nativen Kristalle wurde auf Grund einer Inkompatibilität des entsprechenden Expressionsvektor mit dem methionin-auxotrophen *E. coli* - Stamm B834 (DE3), wie im Fall der nativen Proteins in den *E. coli* - Stamm M15 transformiert. Die Expression des Proteins wurde in Minimalmedium (Budisa, 1995) durchgeführt. Vor der Überimpfung auf Minimalmedium wurden die LB-Vorkulturen abzentrifugiert (10 min bei 4000 rpm) und das Zellpellet in Minimalmedium resuspendiert. Zur Überprüfung des Einbaus von Selenomethionin in das Protein wurde mit Hilfe eines Elektrospray-MALDI Massenspektrometers sowohl die Masse des nativen- als auch des selenomethioninhaltigen Proteins bestimmt. Der Vergleich der beiden Massen ergab, daß durchschnittlich 4 - 5 der 7 möglichen Methionine pro Monomer ersetzt worden waren.

4.1.3 Datensammlung und Strukturlösung

Die Indizierung der jeweiligen Diffraktionsdaten zeigte eine tetragonale Gittermetrik mit den Gitterkonstanten $a = b = 136,350 \text{ \AA}$ $c = 211,221 \text{ \AA}$ und $\alpha = \beta = \gamma = 90,00^\circ$. Es konnten vollständige Datensätze bis zu einer Auflösung von $2,5 \text{ \AA}$ aufgenommen werden. Die Auswertung der Datensätze ergab, daß Reflexe mit $h = 1 = 0$ und $k = 2n$ und Reflexe mit $h = k = 0$ und $l = 4n$, fehlten. Diese charakteristischen

Auslöschungen weisen bei primitiv tetragonaler Gittermetrik auf eine Zuordnung der Raumgruppe $P4_12_12$ oder $P4_32_12$ hin. Eine endgültige Aussage über die tatsächliche Raumgruppe mußten die unterschiedlichen Lösungen bei der Phasierung und Verfeinerung in den beiden Raumgruppen ergeben, da zu diesem Zeitpunkt keine Unterscheidung der Schraubenachse gemacht werden konnte. Das Verhältnis von Zellvolumen zu molekularer Masse $V_o m$, der so genannte Mathews-Koeffizient, betrug $2,5 \text{ \AA}^3/\text{Dalton}$ für 6 Rib7 Moleküle pro asymmetrischer Einheit bei einem Solvensgehalt von 50 %. Er liegt damit im für Proteine typischen Rahmen von 1,6- $3,6 \text{ \AA}^3/\text{Dalton}$ (Matthews, 1968).

4.1.4 Probleme bei der Strukturlösung

Obwohl durch die Aufnahme anomaler Daten, die Stärke des Signals anzeigte, daß ausreichend Quecksilber gebunden bzw. Selen eingebaut worden war, gelang eine Phasenbestimmung und die damit verbundene Strukturlösung, weder mit Hilfe der Patterson Methode noch unter Verwendung direkter Methoden.

4.1.5 Pseudoinnenzentrierung

Tests auf Verzwillingung nativer Kristalle die zu Beginn der Untersuchungen durchgeführt wurden, hatten keine Indizien geliefert, die eine Verzwillingung in Betracht gezogen hätte. Untersuchungen der Nativen Patterson ergaben jedoch einen Pseudoursprungpeak bei 0,5 0,5 0,49 bzw. 0,5 0,5 0,51 (siehe Tabelle 3.2). Genauere Betrachtung einzelner Streubilder und Betrachtungen der Statistiken des Programms TRUNCATE, insbesondere die der $h+k+l$ Reflexe deuteten auf eine Pseudoinnenzentrierung hin (siehe Tabelle 3.4.5).

4.1.6 Problemlösung

Während der Schwermetallsuche, war gelegentlich aufgefallen, daß sich eine innen-zentrierte, tetragonale Lauegruppe ergab und sich somit der Gittertyp von $P4_12_12$ bzw. dem enationmorphen $P43_12_12$ zu $I4_122$ bzw. $I4_322$ änderte. Diese Kristalle hatten jedoch ein wesentlich schlechteres Streuverhalten. Von Versuchen an anderen Kristallen war bekannt, daß eine Änderung der Umgebungsfeuchte, mit Hilfe des „Free-Mounting-Systems“, zu einer Transformation des Kristallgitters führte, bei der die Mosaizität verringert bzw. die Auflösung verbessert werden konnte (Kiefersauer et al., 2000). Dies kann ein Indiz für eine Erhöhung der Kristallordnung sein. In der Hoffnung auch hier eine Art Gittertransformation zu erzielen, wurden Versuche mit dem „Free-Mounting System“ angeschlossen (Kiefersauer et al., 2000).

4.1.7 Kristalltransformation

Zur Durchführung einer solchen Kristalltransformation mußte zunächst die Startfeuchte der Mutterlauge bestimmt werden. Ein schon im Kristallhalter vormontierter „cryo-loop“ wurde mit Mutterlauge benetzt und über ein Videosystem die Tropfengröße verfolgt, bis bei einer relativen Feuchte keine Größenänderung des Tropfens mehr auftrat. Diese relative Feuchte wurde als Startwert konstant gehalten. Die Kristalle wurden aus der Mutterlösung genommen und im Kristallhalter positioniert. Überschüssige Lösung wurde mit Hilfe von Filterpapier entfernt. Zunächst wurden die Größenänderung sowie anschließend die Diffraktionseigenschaften verfolgt. Aus mehreren Vorversuchen ergab sich eine optimale Feuchtereduktion von 3- 4 %, nachdem die Kristalle montiert wurden. Bei konstanter relativer Feuchte wurde wieder mit einer Belichtungszeit von zwei Minuten ein Diffraktionsbild aufgenommen und die Streubilder sofort indiziert. Nachdem eine Veränderung der Diffraktionsbilder beobachtet wurde, wurde der Kristallhalter von der Röntgenmaschine genommen. Der Kristall wurde mit PFO umgeben, der Kristallhalter geöffnet und der „cryo-loop“ schnell in den Stickstoffstrom gebracht, so daß der Kristall auf

100 K gekühlt wurde. Zur Kontrolle der Schockkühlung wurden weitere Diffraktionsbilder aufgenommen.

4.1.8 Datensammlung und Strukturlösung

Die Indizierung der neuen Diffraktionsdaten zeigte eine tetragonal innenzentrierte Gittermetrik mit leicht abweichenden Gitterkonstanten ($a = b = 135,613 \text{ \AA}$, $c = 208,887 \text{ \AA}$ und $\alpha = \beta = \gamma = 90.00^\circ$). Es konnten vollständige Datensätze bis zu einer Auflösung von $2,8 \text{ \AA}$ gesammelt werden. Die Auswertung der Datensätze ergab, daß nur noch die Reflexe mit $h = k = 0$ und $l = 4n$, fehlten. Diese charakteristischen Auslöschungen wiesen bei primitiv tetragonaler Gittermetrik, in den transformierten Kristallen, auf eine Zuordnung der Raumgruppe $I4_12_12$ oder $I4_32_12$ hin. Eine endgültige Aussage über die tatsächliche Raumgruppe mußten die unterschiedlichen Lösungen bei der Phasierung und Verfeinerung in den beiden Raumgruppen ergeben, da zu diesem Zeitpunkt keine Unterscheidung der Schraubenachse gemacht werden konnte. Das Verhältnis von Zellvolumen zu molekularer Masse V_0m beträgt $2,7 \text{ \AA}^3/\text{Dalton}$ für 3 Rib7 Moleküle pro asymmetrischer Einheit bei einem Solvensgehalt von 49 %. Er liegt damit im für Proteine typischen Rahmen von $1,6 - 3,6 \text{ \AA}^3/\text{Dalton}$ (Matthews, 1968). Da die Daten der transformierten Kristalle, aus geometrischen Gründen keine Pseudoinnenzentrierung mehr aufwiesen, sondern nun wirklich innenzentriert sind, war nun eine Phasierung möglich. Die Gewinnung der Phaseninformation erfolgte über ein MAD-Experiment, bei dem die dispersiven und anomalen Beiträge, von den Kristallen zugefügten Hg^{2+} -Ionen, ausgenutzt wurden. Für die Bestimmung des dispersiven Beitrags f' (edge) und des anomalen Beitrags f'' (peak) des Quecksilbers wurde am Minimum von f' bei der Wellenlänge $1,009 \text{ \AA}$ (edge) bzw. am Maximum von f'' bei $1,006 \text{ \AA}$ (peak) gemessen. Als isomorphe Referenz, bei dem der Einfluß des Quecksilbers möglichst klein war, diente ein dritter Datensatz bei der Wellenlänge $0,95 \text{ \AA}$ (remote). Mit Hilfe direkter Methoden (Programm ShelXD) konnten in dem anomalen Datensatz der Quecksilberkante (peak) 7 Quecksilber-Positionen gefunden werden. Die Statistiken der Datensammlung und

der Phasierung sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Datensammlungs- und Phasierungsstatistiken

	pk	ip	rm
Space group		$I4_122$	
Resolution [\AA] ¹		20-2.7 (2.8-2.7)	
Unit Cell [\AA]		a= 135.613 b= 135.613 c= 208.887	
		$\alpha= 90 \beta= 90 \gamma= 90$	
Wavelength	1.006	1.009	0.95
I/sigma(I)	29.5(5)	28.0(3.2)	29.3(5.2)
Completeness [%]	98.8 (90.4)	98.3(90.3)	99.5 (94.2)
Measured Reflections	305981	304691	325107
Unique Reflections	53783	53597	56776
Rsym [%] ²	0.056(0.471)	0.06 (0.522)	0.057 (0.34)
Phasing Procedure			
Phasing Power iso/ano ³	1.356/1.691	1.642/1.196	0/1.630
R_{cullis} iso/ano ⁴	0.534/0.734	0.521/0.835	0/0.733
Figure of merit		0.50397	

¹ Werte der höchsten Auflösungsschale sind in Klammern angegeben.

² R_{sym} ist der nicht gewichtete R-Wert bezüglich der I zwischen Symmetrieverwandten.

³ Phasing power ist der Mittelwert der Schweratom-Derivat Strukturfaktor-Amplitude abgeleitet vom residual lack of closure error.

$$^4 R_{cullis} = \frac{\sum_{hkl} ||F_{ph}| - |F_p| - F_{h,calc}|}{\sum_{hkl} |F_{ph} - F_p|}$$

Die aus der Phasierung mit Sharp resultierende Elektronendichte Verteilung wurde mittels des Solventflattening und dreifacher Dichtemittelung weiter verbessert. Bei dieser Mittelung wurden Bereiche festgelegt, die die Monomere vollständig umgaben, welche dann mit Hilfe der NCS-Operatoren superpositioniert und gemittelt wurden. Mit Hilfe des Programms O (Jones et al., 1991) konnten manuell zwei zu ca. 90 % kompletten Poly-Alanin-Modelle mit einigen Seitenketten gebaut werden. Das dritte Monomer konnte nicht gebaut werden, da die Elektronendichte in

diesen Bereichen eine zu schlechte Qualität aufwies. Solch extreme Unterschiede, zwischen verschiedenen Molekülen, in der asymmetrischen Einheitszelle, sind nicht sehr häufig und oft mit einer schlechten Datenqualität korreliert. Dies war aus den Statistiken der transformierten Kristalle nicht zu ersehen. Die eigentliche Ursache dafür konnte erst später identifiziert werden.

4.1.9 Verfeinerung mit CNS

Eine erste Verfeinerung in CNS (Brünger et al., 1998) unter Verwendung der Modellphasen und der nichtkristallographischen Symmetrie (NCS) mit einer hohen Kraftkonstanten ($300 \text{ kcal/mol \AA}^2$) auf alle Reste umfasste eine „rigid-body“ Verfeinerung und ein simulated annealing bei 4000 K. Um eine durch die hohe NCS bedingte Aufnahme voneinander abhängiger Reflexen im Testbereich zu verhindern, wurden komplette Auflösungsbereiche (5 % der gesamten unabhängigen Reflexe) als Testbereich definiert. Die Reflexe dieser Auflösungsbereiche wurden nicht zur Strukturverfeinerung verwendet. Dies ergab einen ersten kristallographischen Arbeits-R-Faktor von 45,7 % und einen freien R-Faktor von 46,3 %. Im späteren Verlauf der Verfeinerung wurden pro Rib7 Molekül ein NADPH Cofaktor und insgesamt 8 Cymal2 Detergenzien in ihre Fo-Fc Differenzdichten eingebaut. Das NADPH bzw. das Cymal2 wurden mit dem PRODRG-Server erstellt und geometrisch minimiert. Außerdem wurden Parameter und Topologiedaten berechnet, die als „Restraints“ in der Verfeinerung mit CNS verwendet wurden. Dabei ist zu bedenken, daß das NADPH weder in der Kristallisationslösung vorhanden war noch zu den bereits bestehenden Kristallen dazugegeben wurde (soaking). Das bedeutet, daß das NADPH während der Zellexpression oder des Zellaufschluß an Rib7 gebunden hatte und weder abgebaut noch wieder freigegeben wurde. Dies ist ein deutliches Indiz für eine sehr starke Bindung.

4.1.10 Probleme bei der Verfeinerung

Iterative Zyklen von manuellem Modellbau und Verfeinerung der Daten wurden im Auflösungsbereich von 20 - 2,7 Å durchgeführt. Die Verfeinerung umfasste Minimierungen und eine gruppierte und anschließende individuelle B-Faktor-Verfeinerung. Dies führte schließlich zu einem kristallographischen Arbeits-R-Faktor von 37,3% und einem freien R-Faktor von 39,2%. Dieser Wert war für die erreichte Auflösung inakzeptabel und auch nicht durch eine schlechte Datenqualität und die Pseudoinnenzentrierung zu erklären. Auch konnte eine Überverfeinerung ausgeschlossen werden, da ein angemessener und an die hohe NCS angepasster, unabhängiger Prozentsatz an Reflexen, zu Beginn der Verfeinerung ausgewählt wurde und die Differenz zwischen Arbeits- und Freiem-R-Faktor mit 2,1% sehr gering war. Optisch waren das Modell und auch die zusätzlichen Moleküle wie z.B. die Cymale sehr gut in die Elektronendichte eingepasst worden, so daß das Modell an sich, ebenfalls als Fehlerquelle ausgeschlossen werden konnte. Eine Verifizierung der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette im Rib7 Atommodell zeigte, daß sich 84,7% aller Aminosäuren (ausgenommen Glycin und Prolin) in dem am meisten bevorzugten Bereich befanden, 15,3% waren im zusätzlich erlaubten Bereich zu finden und keine der Aminosäuren war in dem weitläufig erlaubten oder im verbotenen Bereich der Ramachandran-Statistik (Ramachandran und Sasisekharan, 1968). Eine Zusammenfassung der Verfeinerungstatistiken ist in Tabelle dargestellt.

Tabelle 4.2: Verfeinerungsstatistiken $I4_122$

Refinement	$I4_122$
Resolution	25.00 - 2.7 Å
Number of protein atoms/solvent molecules	4447/-
rmsd ¹ bond length [Å]/angles[°]/bonded B's[Å ²]	0.010905/1.58662/-
Number of reflections R_{work} / R_{free}	50999/2656
Ramachandran: most favored/disallowed	84.7/0
R-factor: R_{cryst} / R_{free} [%] ²	37.3/39.2
Average B-value [Å ²] Protein	46.4343

¹ Root mean square Abweichungen (rmsd) der Temperaturfaktoren der gebundenen Atome.

² $R_{cryst} = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)| - k \cdot |F_{calc}(hkl)|}{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)|}$ für die Reflektionen des Arbeitssatzes; R_{free} Reflektionen, die von der Verfeinerung ausgenommen sind.

4.1.11 $P4_12_12$

Bei der Betrachtung der Synchrotron-Daten, ausgewertet in $P4_12_12$ (4.3) wurde deutlich, daß die Pseudoinnenzentrierung nicht vollständig durch die Transformation der Kristalle mit Hilfe des „Free Mounting Systems“ beseitigt werden konnte bzw., daß die Kristalle nach der Transformation nicht vollständig innenzentriert waren. Damit wurden bei der Behandlung der Datensätze als $I4_122$ vorhandene Reflexe als Hintergrundrauschen betrachtet und nicht in Betracht gezogen. Auch dies ist ein möglicher Grund für das schlechte Verfeinerungsverhalten. Deshalb wurde die Verfeinerung für die Raumgruppe für $P4_12_12$ durchgeführt. Dadurch fielen der Arbeits- bzw. der Freie-R-Faktor direkt auf 35,6 % bzw. 37,5 %. Eine Zusammenfassung der Verfeinerungsstatistiken ist in Tabelle 4.4 dargestellt.

KAPITEL 4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 4.3: Trunkatestatistik der Reflexintensitäten geordnet nach den HKL-Indizes

Range	Min_S	D_{max}	N_{ref}	1 h	2 k	3 l	4 h+k	5 h+1	6 k+1	7 h+k+1	8 h+k,h+1,k+1
1	0.00251	14.37	423	29.0 29.7	30.6 28.2	29.5 29.3	29.8 28.9	29.5 29.2	30.6 28.2	50.0 8.6	31.1 28.8
2	0.00485	11.80	529	33.4 31.5	33.4 31.6	32.4 32.6	32.4 32.6	32.4 32.5	32.3 32.6	52.6 12.9	32.2 32.6
3	0.00718	10.25	634	33.5 35.9	34.6 34.8	34.0 35.5	34.5 34.9	34.7 34.7	34.8 34.6	55.4 14.7	34.7 34.7
4	0.00952	9.19	701	37.0 36.6	36.3 37.3	36.6 37.1	36.7 37.0	36.9 36.7	37.9 35.7	55.5 17.5	37.9 36.4
5	0.01185	8.40	801	31.1 30.8	31.5 30.5	31.4 30.5	30.6 31.4	31.7 30.3	29.7 32.3	52.2 10.1	30.0 31.3
6	0.01419	7.78	858	31.2 30.1	29.8 31.5	30.4 30.9	29.5 31.7	30.5 30.8	30.9 30.4	52.3 9.2	29.6 31.0
7	0.01652	7.28	915	29.7 29.7	29.7 29.8	29.5 30.0	29.7 29.7	29.6 29.9	29.2 30.3	51.5 7.7	29.0 29.9
8	0.01886	6.87	1004	29.3 28.1	28.5 28.9	28.0 29.4	28.4 28.9	28.7 28.6	29.0 28.3	51.2 5.8	28.8 28.6
9	0.02119	6.52	1040	27.9 26.7	26.9 27.7	27.1 27.4	27.2 27.4	27.1 27.4	28.1 26.5	49.1 5.3	27.8 27.1
10	0.02353	6.22	1076	25.3 26.4	25.8 26.0	26.3 25.4	25.9 25.8	26.1 25.6	25.1 26.6	47.5 5.4	25.4 26.0
11	0.02586	5.96	1158	27.4 27.3	27.3 27.4	27.1 27.6	27.6 27.1	27.0 27.7	27.1 27.6	49.0 5.7	27.0 27.5
12	0.02820	5.72	1213	26.0 26.2	26.2 26.0	25.9 26.2	25.5 26.7	25.9 26.3	26.1 26.0	47.0 4.7	25.4 26.3
13	0.03053	5.52	1249	23.7 23.5	23.5 23.7	23.7 23.5	23.6 23.6	23.6 23.5	23.6 23.6	42.6 4.6	23.7 23.6
14	0.03287	5.33	1293	24.1 23.2	23.5 23.8	23.5 23.8	24.2 23.1	23.6 23.7	23.4 23.9	42.3 4.9	23.9 23.6
15	0.03520	5.16	1329	24.3 23.6	24.0 23.9	23.8 24.1	23.9 24.0	23.5 24.4	24.0 23.9	43.5 4.4	23.5 24.1
16	0.03754	5.01	1405	24.0 24.4	23.9 24.4	23.5 24.9	23.9 24.5	24.3 24.1	23.9 24.5	43.1 5.6	23.7 24.3
17	0.03987	4.87	1412	24.2 23.8	24.3 23.6	23.5 24.5	24.1 23.9	23.5 24.4	23.7 24.3	43.4 5.3	23.3 24.2
18	0.04221	4.74	1463	24.6 24.9	24.5 25.0	25.0 24.5	24.7 24.8	24.4 25.2	25.6 24.0	43.7 5.3	25.1 24.7
19	0.04454	4.62	1520	24.2 24.5	24.2 24.4	24.0 24.7	24.5 24.1	23.8 24.8	24.1 24.6	43.2 5.7	23.7 24.5
20	0.04688	4.51	1533	24.2 24.2	24.0 24.4	23.5 24.9	23.7 24.7	24.5 23.9	24.0 24.4	42.8 5.7	23.8 24.3
21	0.04921	4.40	1580	22.9 23.4	23.5 22.8	22.9 23.4	23.7 22.6	22.9 23.4	23.8 22.5	40.6 5.8	24.1 22.8
22	0.05155	4.31	1636	22.4 22.3	22.1 22.6	22.4 22.3	22.2 22.5	22.1 22.6	22.2 22.5	39.8 5.0	21.7 22.6
23	0.05388	4.22	1635	22.2 23.1	23.1 22.2	21.8 23.5	23.0 22.3	22.7 22.6	22.0 23.3	39.7 4.8	22.4 22.7
24	0.05622	4.13	1708	20.8 21.0	21.3 20.4	21.0 20.8	20.7 21.1	21.3 20.4	21.3 20.4	38.1 3.7	21.6 20.6
25	0.05855	4.05	1729	19.8 20.3	19.9 20.2	20.2 19.9	20.3 19.8	19.7 20.4	20.0 20.1	37.2 3.7	19.9 20.1
26	0.06089	3.98	1746	20.0 20.6	19.7 20.9	20.3 20.4	20.3 20.3	19.9 20.7	20.2 20.4	36.3 3.7	19.8 20.5
27	0.06322	3.91	1818	18.3 17.9	18.4 17.8	18.2 18.0	18.3 17.9	18.6 17.6	18.2 18.0	34.1 2.1	18.9 17.8
28	0.06556	3.84	1795	17.0 16.9	17.5 16.4	16.2 17.8	16.6 17.3	17.3 16.6	16.7 17.2	31.6 2.8	16.7 17.0
29	0.06789	3.77	1848	16.3 16.1	15.8 16.6	16.7 15.7	16.2 16.2	16.0 16.4	16.2 16.2	30.1 2.0	16.0 16.3
30	0.07023	3.71	1933	16.0 15.7	16.3 15.4	15.7 16.0	16.2 15.5	15.6 16.0	15.9 15.7	30.0 1.7	16.0 15.7
31	0.07256	3.65	1901	15.6 16.3	15.9 16.0	15.5 16.4	15.9 16.0	16.3 15.6	15.7 16.1	28.9 2.8	16.0 15.9
32	0.07490	3.60	1957	14.4 15.4	15.2 14.6	14.9 14.9	14.8 15.0	14.8 15.0	14.6 15.2	28.1 1.5	14.4 15.1
33	0.07723	3.55	1964	16.0 15.8	15.4 16.4	15.8 16.1	16.0 15.8	15.7 16.1	16.1 15.7	31.2 1.1	16.0 15.9
34	0.07957	3.49	2021	16.6 16.0	17.1 15.5	16.1 16.4	15.9 16.6	16.6 15.9	16.7 15.9	30.6 1.4	16.6 16.1
35	0.08190	3.45	2082	14.7 15.4	14.9 15.2	14.6 15.5	15.0 15.0	15.0 15.1	14.8 15.3	29.2 1.5	14.7 15.1
36	0.08424	3.40	2064	14.6 14.6	14.9 14.3	14.7 14.5	14.8 14.4	14.8 14.4	14.5 14.8	27.5 1.2	14.9 14.5
37	0.08657	3.35	2074	12.8 13.2	12.3 13.6	13.1 12.9	13.0 13.0	12.3 13.6	13.2 12.7	25.6 0.6	12.5 13.1
38	0.08891	3.31	2114	12.8 13.1	13.3 12.6	13.0 12.9	13.0 12.9	13.4 12.5	12.8 13.1	25.4 0.7	13.3 12.9
39	0.09124	3.27	2184	14.3 13.8	13.7 14.3	14.0 14.0	13.9 14.2	14.1 13.9	14.0 14.0	26.8 0.7	13.9 14.0
40	0.09358	3.23	2125	12.3 13.0	13.1 12.3	12.6 12.7	13.0 12.3	12.4 13.0	12.5 12.9	24.7 0.9	12.5 12.7
41	0.09591	3.19	2263	11.4 11.6	11.9 11.1	10.7 12.4	11.1 11.9	12.2 10.9	11.6 11.4	22.2 0.8	11.9 11.4
42	0.09825	3.15	2179	11.6 10.2	11.0 10.8	10.4 11.4	10.6 11.3	10.8 11.0	11.8 10.0	21.1 0.8	11.4 10.8
43	0.10058	3.12	2329	10.6 11.2	10.6 11.2	11.0 10.9	10.9 10.9	11.0 10.9	10.6 11.2	21.0 0.5	10.6 11.0
44	0.10292	3.08	2272	9.1 9.9	9.3 9.7	9.5 9.5	9.4 9.6	9.1 9.9	8.9 10.1	19.0 0.4	8.4 9.9
45	0.10525	3.05	2307	9.8 8.1	8.6 9.3	9.0 9.0	8.8 9.2	8.9 9.0	9.7 8.3	17.0 0.5	9.4 8.8
.
.
.
Totals:			108334	13.8 13.7	13.8 13.7	13.7 13.8	13.7 13.8	13.8 13.8	13.8 13.7	25.2 2.3	13.8 13.8

Tabelle 4.4: Verfeinerungsstatistiken $P4_12_12$

Refinement	$P4_12_12$
Resolution	25.00 - 2.7 Å
Number of protein atoms/solvent molecules	9974/-
rmsd ¹ bond length [Å]/angles[°]/bondedB's[Å ²]	0.009939/1.49106/-
Number of reflections R_{work} / R_{free}	94392/4856
Ramachandran: most favored/disallowed	88.7/0
R-factor: R_{work} / R_{free} [%] ²	35.6/37.5
Average B-value [Å ²] Protein	45.0755

¹ Root mean square Abweichungen (rmsd) der Temperaturfaktoren der gebundenen Atome.

² $R_{cryst} = \frac{\sum hkl |F_{obs}(hkl)| - k \cdot |F_{calc}(hkl)|}{\sum hkl |F_{obs}(hkl)|}$ für die Reflektionen des Arbeitssatzes; R_{free} Reflektionen, die von der Verfeinerung ausgenommen sind.

4.1.12 Verzwilligung

Wie in 3.4.4 beschrieben kann es durch eine Pseudoinnenzentrierung zu einer Verschleierung der Verzwilligung eines Kristalls kommen, so daß diese nicht erkannt wird. Es wurde deshalb entschieden die Untersuchungen zu wiederholen und die Verfeinerung zu modifizieren und sie, wie im Fall einer vorliegenden Verzwilligung, durchzuführen. Es wurde deshalb die Raumgruppe auf $P4_1$ geändert. Iterative Zyklen von manuellem Modellbau und Verfeinerung der Daten wurden im Auflösungsbereich von 20 - 2,7 Å durchgeführt. Diese waren jedoch nur in einem moderaten Ausmaß nötig, da keine großen Veränderungen am Protein aufgetreten waren. Die Verfeinerung umfasste Minimierungen und eine gruppierte und anschließende individuelle B-Faktor-Verfeinerung. Dies führte schließlich zu einem kristallographischen Arbeits-R-Faktor von 28,7% und einem freien R-Faktor von 31,5%.

Tabelle 4.5: Verfeinerungsstatistiken $P4_1$

Refinement	$P4_1$
Resolution	25.00 - 2.7 Å
Number of protein atoms/solvent molecules	9974/-
rmsd ¹ bond length [Å]/angles[°]/bonded B's[Å ²]	0.010939/1.5506/-
Number of reflections R_{work} / R_{free}	94678/4761
Ramachaandran: most favored/disallowed	88.7/0
R-factor: R_{work} / R_{free} [%] ²	28.7/31.5
Average B-value [Å ²] Protein	48.4107

¹ Root mean square Abweichungen (rmsd) der Temperaturfaktoren der gebundenen Atome.

² $R_{cryst} = \frac{\sum hkl |F_{obs}(hkl)| - k \cdot |F_{calc}(hkl)|}{\sum hkl |F_{obs}(hkl)|}$ für die Reflektionen des Arbeitssatzes; R_{free} Reflektionen, die von der Verfeinerung ausgenommen sind.

Datenverarbeitung und Datenauswertung mit den pseudoinnenzentrierten Kristallen

Da offensichtlich die Transformation nicht vollständig war, wurde auch wegen des besseren Streuverhaltens mit Hilfe des Molekularen Ersatzes (Programm Phaser, Storoni et al., 2004) und dem Modell das bereits berechnet wurde, die Struktur nochmals für die pseudoinnenzentrierten Kristalldaten berechnet. Die Selenpositionen wurden mit Hilfe einer anomalen Differenzfourierpatterson identifiziert. Die aus der Phasierung mit Sharp resultierende Elektronendichte Verteilung wurde mittels des Solventflattening und dreifacher Dichtemittelung weiter verbessert. Bei dieser Mittelung wurden Bereiche festgelegt, die die Monomere vollständig umgaben, welche dann mit Hilfe der NCS-Operatoren superpositioniert und gemittelt wurden. Diese Kristalle zeigten jedoch keine Verzwillingung und wurden mit $P4_32_12$ gelöst

und verfeinert. Iterative Zyklen von manuellem Modellbau und Verfeinerung der Daten wurden im Auflösungsbereich von 20- 2,5 Å durchgeführt. Diese waren jedoch nur in einem moderaten Ausmaß nötig, da keine großen Veränderungen am Protein aufgetreten waren. Die Verfeinerung umfasste Minimierungen und eine gruppierte und anschließende individuelle B-Faktor-Verfeinerung. Dies führte schließlich zu einem kristallographischen Arbeits-R-Faktor von 23% und einem freien R-Faktor von 25,3%. Die Statistiken der Datensammlung und der Phasierung sind in Tabelle 4.6 dargestellt. Die Elektronendichte der N-terminalen fünf Aminosäuren wurde auch in späteren Verfeinerungs- und Bauzyklen nicht interpretierbar. Dieser ungeordnete Teil des Proteins wurde nicht in das finale Atommodell eingebaut und läßt auf eine hohe Flexibilität dieses Bereiches schließen, so daß sich das finale Rib7 Atommodell auf 221 Aminosäuren pro Monomer erstreckt. Eine Verifizierung der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette im Rib7 Atommodell zeigte, daß sich 88,5% aller Aminosäuren (ausgenommen Glycin und Prolin) in dem am meisten bevorzugten Bereich, der Ramachandranstatistik (Ramachandran und Sasisekharan, 1968) befanden, 11,5% sind im zusätzlich erlaubten Bereich zu finden und keine der Aminosäuren sich in dem weitläufig erlaubten oder im verbotenen Bereich. In der Abbildung 4.4 ist die Ramachandran-Statistik aller 221 Aminosäuren des bis 2,5 Å verfeinerten Rib7 Atommodells graphisch dargestellt. Die Bereiche, die für L-Aminosäuren erlaubt sind, sind gelb dargestellt, wobei die sterisch günstigsten Regionen rot gezeichnet sind. Die weißen Flächen markieren die sterisch verbotenen Bereiche. Die Qualität des verfeinerten Modells wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) überprüft. Die Verfeinerungsstatistik des Datensatzes ist in 4.7 gezeigt.

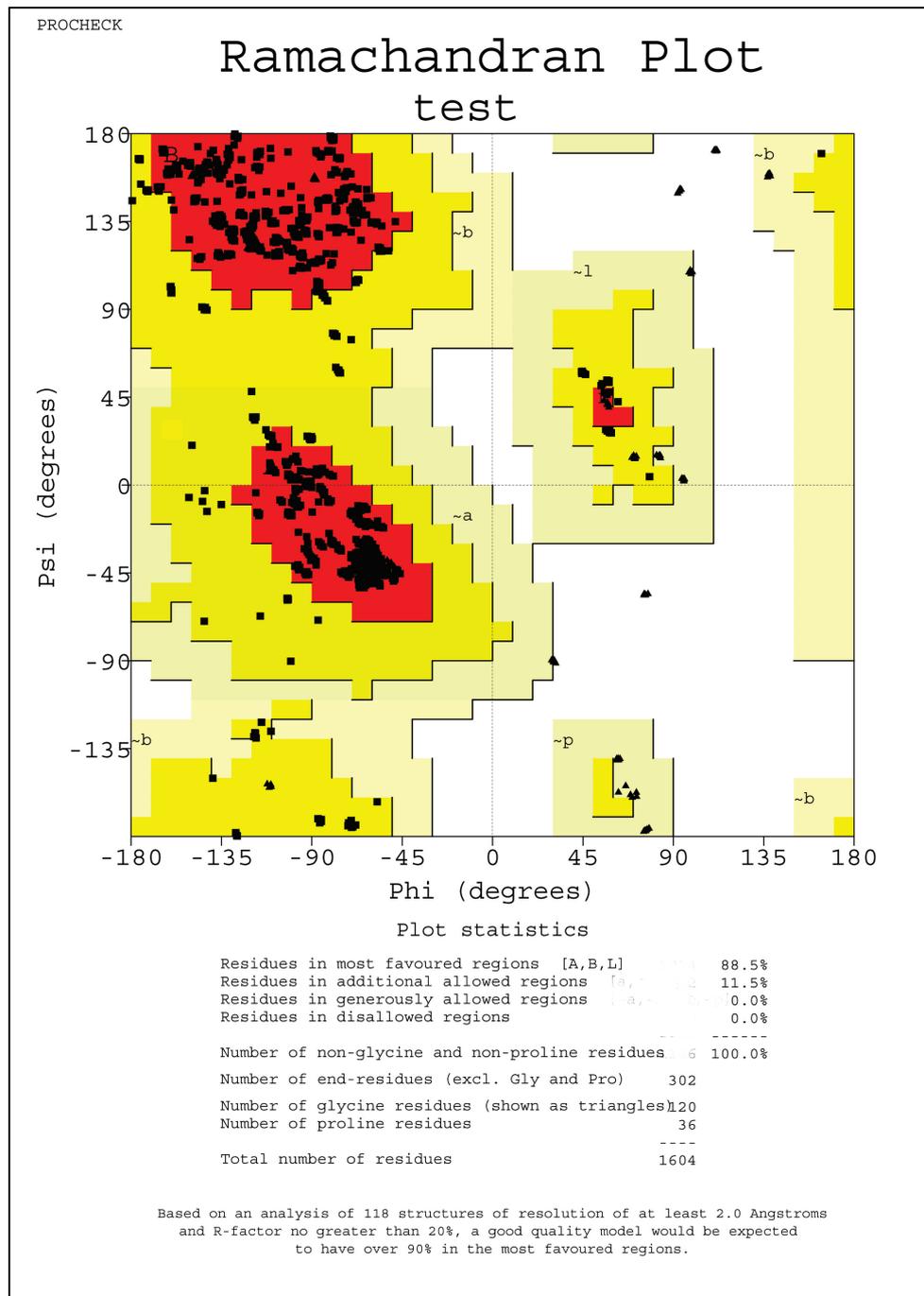


Abbildung 4.4: Ramachandran-Plot der finalen Verfeinerung von Rib7 . Rot hinterlegt sind die bevorzugt erlaubten, intensiv gelb die zusätzlich erlaubten, grau-gelb die großzügig erlaubten und weiß die nicht erlaubten Bereiche dargestellt. Diese Auflagen gelten für alle Reste außer Prolin und Glycin. Reste außer Prolin und Glycin sind Quadrate, Prolin als Dreiecke dargestellt. Reste außerhalb den großzügig erlaubten Bereichen sind in rot gehalten.

Tabelle 4.6: Datensammlungs- und Phasierungsstatistiken

	pk	ip	rm
Space group		$P4_32_12$	
Resolution [\AA] ¹		30-2.5 (2.56-2.5)	
Unit Cell [\AA]		a=136.981,b=136.981,c=213.692, $\alpha=90.000, \beta =90.000, \gamma =90.000$	
Wavelength	0.9790	0.9795	0.9567
I/sig(I)	17.6(2.0)	16.4(1.7)	15.3(1.3)
Completeness [%]	97.9 (83.4)	98.3(83.9)	99.4 (94.2)
Measured Reflections	491750	498508	510658
Unique Reflections	131576	132214	134041
Rsym [%] ²	0.078(0.549)	0.084 (0.634)	0.089 (0.804)
Phasing Procedure			
Phasing Power iso/ano ³	0/1.675	0.832/0.784	0.799/0.655
Rcullis iso/ano ⁴	0/0.721	0.742/0.820	0.811/0.877
Figure of merit		0.46891	

¹ Werte der höchsten Auflösungsschale sind in Klammern angegeben.

² R_{sym} ist der nicht gewichtete R-Wert bezüglich der I zwischen Symmetrierverwandten.

³ Phasing power ist der Mittelwert der Schweratom-Derivat Strukturfaktor-Amplitude abgeleitet vom residual lack of closure error.

$$^4 R_{cullis} = \frac{\sum_{hkl} ||F_{ph}| - |F_p| - F_{h,calc}|}{\sum_{hkl} |F_{ph} - F_p|}$$

Tabelle 4.7: Verfeinerungsstatistiken $P4_32_12$

Refinement	$P4_32_12$
Resolution	25.00 - 2.5 Å
Number of protein atoms/solvent molecules	10260/274
rmsd ¹ bond length [Å]/angles[°]/bonded B's[Å ²]	0.006929/1.40306/1.430
Number of reflections R_{work} / R_{free}	127183/6681
Ramachaandran: most favored/disallowed	88.7/0
R-factot: R_{work} / R_{free} [%] ²	23.0/25.3
Average B-value [Å] Overall	55.931
Average B-value [Å] Protein	53.658
Average B-value [Å] NADPH	83.196
Average B-value [Å] Solvent	84.248

¹ Root mean square Abweichungen (rmsd) der Temperaturfaktoren der gebundenen Atome.

² $R_{cryst} = \frac{\sum hkl |F_{obs}(hkl)| - k \cdot |F_{calc}(hkl)|}{\sum hkl |F_{obs}(hkl)|}$ für die Reflektionen des Arbeitssatzes;
 R_{free} Reflektionen, die von der Verfeinerung ausgenommen sind.

4.1.13 Strukturbeschreibung

Oligomerisierungszustand aus kristallographischer Sicht

Obwohl drei ($I4_122$) bzw. sechs ($P4_32_12$) Monomere in der asymmetrischen Einheit vorkommen, verhält sich Rib7 kristallographisch offensichtlich als Monomer. Alle Oligomerisierungskontakte die als möglich erachtet werden konnten, seien es die innerhalb der asymmetrischen Einheit oder die zwischen den asymmetrischen Einheit, werden durch das Detergenz Cymal2 ermöglicht, welches für den Erhalt streufähiger Kristalle unbedingt notwendig war und als Additiv der Kristallisationslösung zugesetzt werden mußte. Zusätzlich war die durchschnittliche Kontaktfläche nur 300-

350 Å², was ein weiteres Indiz für schwache Interaktionen darstellte.

Überblick über die Faltung

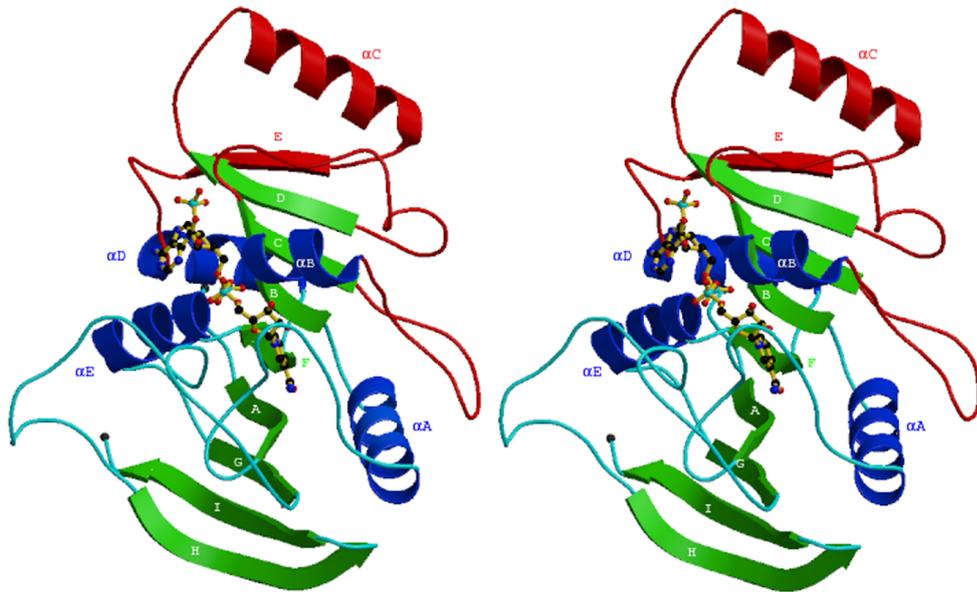


Abbildung 4.5: Ribbondarstellung von Rib7 aus *Methanococcus jannaschii* im Komplex mit gebundenen NADPH in stereo. Zusätzliche Strukturelemente und große Insertionen, die in der TmDHFR nicht vorkommen, sind in rot dargestellt. Analoge α - Helices wurden in blau, analoge β - Stränge wurden in grün eingefärbt. Das NADPH wurde in der Ball-Stick-Darstellung gezeichnet. Die Abbildung wurde mit dem Programmen Molscrip (Kraulis, 1991) und RASTER3D (Merritt and Bacon, 1997) erstellt.

Die Substrat und Coenzymbindung werden von zwei überlappenden Teilen der Aminosäurekette ausgeübt und nicht von separaten Domänen. Rib7 setzt sich zusammen aus einer Mischung von α - und β - Strukturen (Levitt,1976). Zentral bildet sich ein neun strängiges β - Faltblatt (Stränge $\beta A - \beta H$) (siehe Abbildung 4.5). Von diesen Strängen sind alle parallel bis auf den C-terminalen der antiparallel verläuft (βI). Dieses β - Faltblatt wird von vier α - Helices flankiert (αA , αB , αD und αE), mit jeweils zwei auf jeder Seite. Ein zusätzliches befindet sich an der Oberseite (αC). Sieben mehr oder weniger lange Loops vermitteln die Verbindung dieser Sekundärelemente. Obwohl kaum eine Sequenzidentität vorliegt und obwohl

weder Ähnlichkeiten im Substrat noch in der Substratumsetzung vorliegen, ergab sich, daß Rib7 strukturelle Motive aufweist, die für die Oxidoreduktase-Familie der Dehydrofolatreduktasen typisch sind.

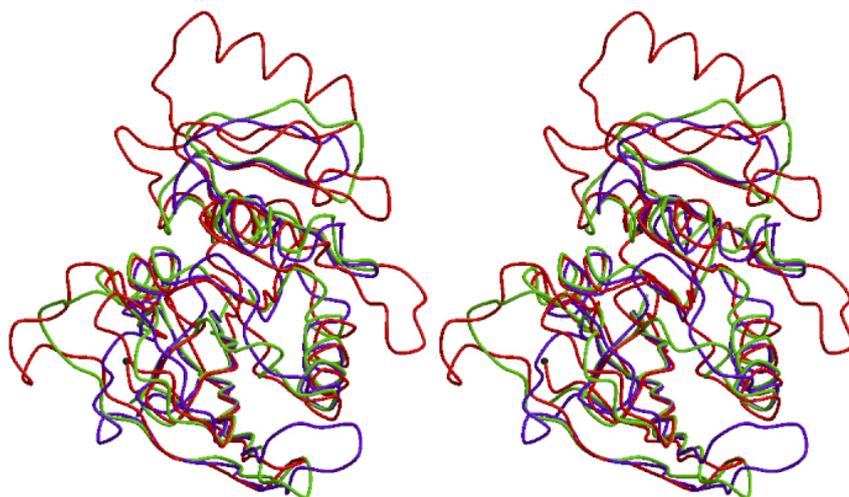


Abbildung 4.6: Coil-Darstellung der überlagerten Modelle von Rib7 (grün), TmDHFR (Dams et al., 2000) und EcDHFR (Bolin et al., 1982). Für die optimale Überlagerung wurde das Programm LSQMAN (Kleywegt, 1994) verwendet. Das Bild wurde mit Hilfe des Programms Molscrip (Kraulis, 1991) und RASTER3D (Merritt and Bacon, 1997) erstellt.

Der Dali-Algorithmus (Holm 1994), der verwendet wurde um Strukturhomologe zu identifizieren, ergab die DHFR von *Thermotoga maritima* als die ähnlichste Struktur (Z Wert von 18,5 C_{α} und einen „rmsd-Wert“ von 2,2 unter Berücksichtigung aller C_{α} Kohlenstoffe)(siehe Abbildung 4.6). Die Sequenzidentität betrug 22 %. TmDHFR bildete im Kristall ein Dimer, was dem Zustand von Rib7 in Lösung entsprechen würde. Da jedoch Rib7 im Kristall offensichtlich als Monomer vorlag, ergaben sich keine Parallelen in der Kristallarchitektur. Trotz der größtenteils ähnlichen Faltung (siehe Abbildung 4.6), zeigen die Verbindungssegmente zwischen den Sekundärstrukturelementen, eine signifikante Variabilität. Rib7 ist deutlich größer, wobei die meisten strukturellen Abweichungen auf Grund substantieller Insertionen zustande kommen. Beide Enzyme haben circa 50 % strukturell identische Aminosäuren, von denen einige auch unter den DHFR Familienmitgliedern konserviert sind (Her-

vorgehoben in Rot in Abbildung 4.7). Herausragend sind die zusätzlichen Sekundärstrukturelemente der α - Helix αC sowie das β - Faltblatt βE die durch eine Insertion von 28 Resten zu Stande kommen.

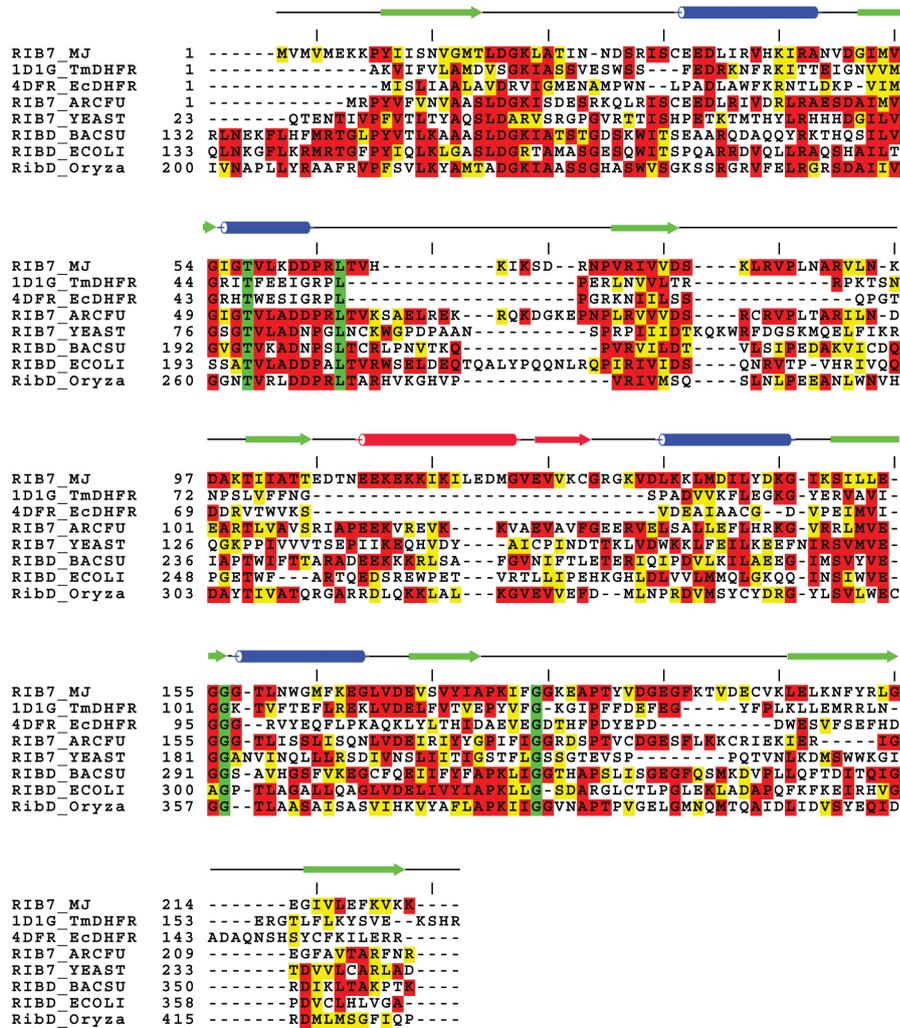


Abbildung 4.7: Eine Kombination aus Struktur- und Homologiealignment. Die Aminosäuresequenzen sind unter der Swiss Prot Zugangsnummer gezeigt. Faltblätter bzw. Helices von Rib7 sind durch Pfeile bzw. Zylinder dargestellt. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms BOXSHADE (Hofmann and Baron 2004) erstellt.

Die DHFR-Familie wurde sowohl strukturell als auch biochemisch bereits sehr gut untersucht. Da sich alle Informationen, die DHFR betreffend sich immer auf die DHFR von *E. coli* beziehen, sind wir ebenfalls diesem Standard gefolgt. Deshalb beziehen sich alle Nummerierungen der Reste etc. auf die Reste der *E. coli* - DHFR,

obwohl eigentlich die DHFR von *Methanococcus jannaschii*, Rib7 am Ähnlichsten ist.

Die strukturelle Einheit, bestehend aus Strang B, C, D und F mit den Helices B, D und E gehören zu einer Unterdomäne. Da diese für die Bindung des Adenosin-Teiles des NADPH verantwortlich ist, wurde sie, in Anlehnung an die DHFR Adenosinunterdomäne genannt. Der Rest der Struktur wurde ebenfalls in Anlehnung an die DHFR-Familie als Loop-Domäne bezeichnet, da dieser Teil zu 51 % aus Loops besteht. Die Spalte die diese beiden Unterdomänen trennt wird durch einen Bruch in dem Wasserstoffbrückennetzwerk von Strang A und F gebildet. Der Nicotinamidring, der coplanar mit dem Faltblatt verläuft, erstreckt sich partiell in diese Spalte.

4.1.14 Die Nucleotidbindungsstelle

Übersicht

Rib7 und die DHFR binden beide NADPH und auch die Sekundärstrukturelemente, nach einer bestmöglichen Überlagerung, zeigen ähnliche Charakteristika. Die konformationellen Unterschiede der Hauptketten sind relativ moderat und die Art der Cosubstratbindungen sind relativ konserviert. Trotzdem gibt es viele Unterschiede, da nur teilweise funktionell äquivalente Reste involviert sind. Berechnungen der Oberflächenladungen, die mit dem Programm GRASP (Nicholls, 1993) berechnet wurden, legen nahe, daß der Cofaktor hauptsächlich durch van der Waals Interaktionen wechselwirkt, wobei sich auch eine ganze Reihe von polaren Bindungen ausbilden (siehe Abbildung 4.8), wie es auch für die DHFR beschrieben wurde.

Die Adeninbindungsstelle

Im Gegensatz zu den DHFR-Familienmitgliedern ist der Adeninring in Rib7 um ca. 180° um die Bindung zwischen der AMN-Ribose und dem Adeninring verdreht

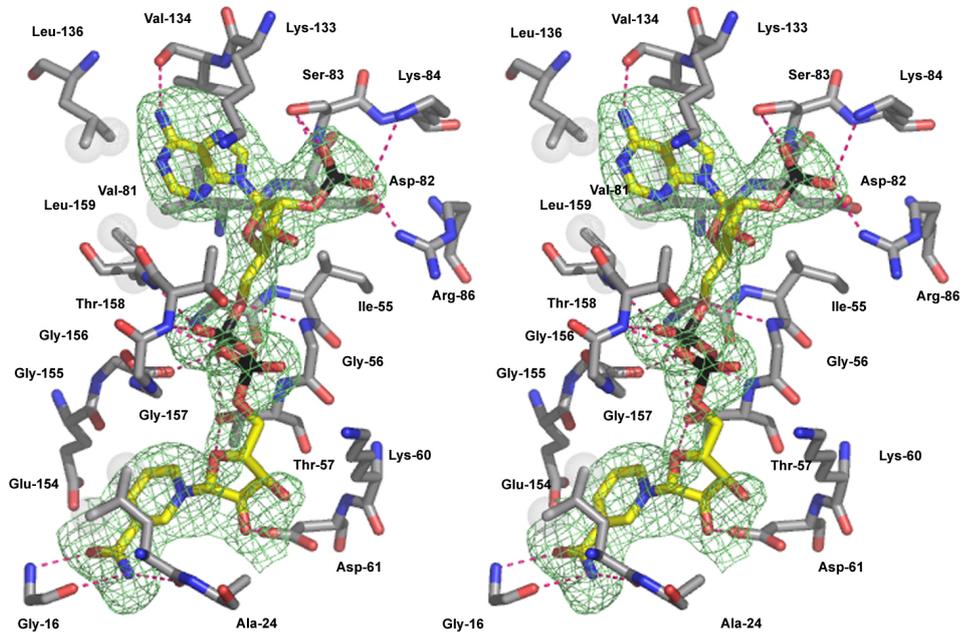


Abbildung 4.8: Stereodarstellungen des Bereiches der Cofaktorbindungsstelle von Rib7 . Abgebildet sind nur einige ausgewählte Reste, die von besonderer Bedeutung sind und das gebundene NADPH als Ball-Stick-Modell. Die initiale Fo-Fc Differenzelektronendichte um den gebundenen Liganden ist auf 2,5 Sigma konturiert. Mögliche Wasserstoffbrücken bzw. hydrophobe Interaktionen sind durch gestrichelte Linien bzw. kleine Kugeln dargestellt. Das Bild wurde mit Hilfe des Programms Pymol (DeLano, 2004) erstellt.

und zusätzlich noch um circa $1,5 \text{ \AA}$ verschoben. An Stelle des strikt konservierten Leu-62 innerhalb der DHFR-Familie ist in der Rib7 - Struktur ein Val-81 zu finden. In der DHFR-Familie ist dieses Leucin allein für die Ausbildung des hydrophoben Bodens dieser Tasche verantwortlich, was die strikte Konservierung erklärt. In Rib7 verliert die Aminosäure diese zentrale Rolle da hier auch die Seitenketten von Leu-136 und Leu-159 eine hydrophobe Oberfläche vermitteln. Die Seitenketten von Ser-83 und die Hauptkette von Val-134 und Gly-162 formen die polaren Wände. Nur der Hauptkettensauerstoff von Val-133 bildet eine Wasserstoffbrücke aus. Da die Abstände der anderen polaren Reste circa $3,3 \text{ \AA}$ betragen, können diese nur als polare Interaktionen betrachtet werden. Einen weiteren Unterschied verursacht die Seitenkette von Lys-133, deren exakte Position nur ungefähr abgeschätzt werden konnte, da die Elektronendichte nur von den Hauptkettenatomen und des C_{β} gut

definiert sind. Der Rest der Seitenkette ist zu flexibel, wobei jedoch die Bewegungsfreiheit auf den Bereich über der Tasche eingeschränkt ist. Es scheint fast so als ob es wie eine Art Deckel das Adenin in der Tasche hält.

Bindungsstelle der beiden zentralen Phosphate

Die Stränge βB und βF enden abrupt an der Pyrophosphatbindungsstelle, wobei beide Kettenteile, einen scharfen Knick mit Hilfe eines Glycins vollführen (Gly-54 bzw. Gly-155), um danach die folgende α - Helix zu beginnen (αB bzw. αE). Eine kristallographische Verfeinerung zeigte ganz deutlich, daß die Pyrophosphatbrücke eine ganze Reihe von Wasserstoffbrücken mit der Hauptkette, mit den Enden der α - Helices αF und αE bildet (Reste 55 - 57 bzw. 155 - 159). Zusätzlich zu diesen Kontakten bildet das Dinucleotid-Pyrophosphat auch eine Wasserstoffbrücke zu den Seitenkette von Thr-56 aus und auch Lys-60 und der Stickstoff von Gly-157 binden mit Hilfe eines Solventmoleküles. Die basischen Aminosäure Arg-44, welche in der DHFR-Familie strikt konserviert ist und auch Thr-123, das immer über eine Solventmolekül gebunden ist, fehlen in Rib7 vollständig. Obwohl das Pyrophosphat im Vergleich um circa $1,5 \text{ \AA}$ verschoben ist, ist die Bindung in Rib7 stereochemisch der der DHFR Familie dennoch relativ ähnlich.

Ribose-Bindung

Beide Ribosyl-Gruppen des Dinucleotides besetzen relativ lösungsmittlexponierte Bereiche der Cofaktorbindungsspalte. Die Bindung der NMN-Ribose ist relativ spezifisch, da es direkte Wasserstoffbrücken zu den Seitenkettensauerstoffen von Asn-23 und Asp-61 und zusätzlich indirekte Brücken mit Hilfe von Wassermolekülen, mit den Seitenketten von Gly-157 und Lys-60 ausgebildet werden. Obwohl dieser Teil des NADPH in Rib7 die gleiche Position einnimmt, sind die in der DHFR Familie strikt konservierten Reste Ile-14 bzw. Gly-15 durch Leucin bzw. Alanin ersetzt. Zusätzlich sind diese Reste auf Grund von Änderungen der Loop-Position weiter

als 6 Å entfernt, so daß die typischen hydrophoben Interaktionen nur marginal möglich sind. Das Asp-125 ist gar nicht vorhanden. Im Gegensatz zur NMN-Ribose scheint die Bindung der AMN-Ribose viel schwächer und weniger spezifisch zu sein. Offensichtlich existieren keine hydrophoben Kontakte und Wasserstoffbrücken zum Protein. Auch Bindungen über fixierte Wasser wurden nicht beobachtet.

Die AMN-2'-Phosphatbindestelle

Im Gegensatz dazu steht das AMN-2'-Phosphat. Es bildet vier Wasserstoffbrücken zu Arg-86, Lys-84 und Ser-83 aus und ist damit sehr stark gebunden. Durch die Bindung des AMN-2'-Phosphat zur AMN-Ribose und die geometrischen Gegebenheiten ihrer anderen Bindungspartner wird die Ribose final auch fixiert.

Die Nikotinamidbindung

Die Nikotinamidbindungstasche formiert sich aus den Resten der zwei zentralen β - Faltblätter βA und βF , der α - Helix αE und dem Loop, der zwischen βA und αA liegt (Reste zwischen 18 und 35). Die Konformation dieses Loops ist zum einen durch interne Wasserstoffbrücken zum andern durch Brücken des Loops der βG folgt, stabilisiert. Gly-16 bildet mit der Carboxamid- und Aminogruppe des Nicotinrings mehrere Wasserstoffbrücken aus. Das Carboxamid wechselwirkt zusätzlich noch mit Ala 23. Diese Interaktionen legen die Orientierung des Nikotinamidringes genau fest. Im Vergleich zur DHFR Familie ist die Tasche um den Nikotinamidring wesentlich weiter, da das charakteristische Met-20 und Tyr-100 durch Ser-20 bzw. Asn-160 ersetzt wurden. Es ist auffällig, daß die Temperaturfaktoren des NADPH im Vergleich mit dem Protein deutlich erhöht sind. Dies ist wahrscheinlich mit der nicht vollständigen Besetzung zu erklären (siehe Tabelle 4.7). Es ist jedoch zu bedenken, daß keine Zugabe von NADPH von Nöten gewesen ist und dennoch so viel NADPH gebunden war, daß, anhand der Differenzdichte, eine deutliche Bindung beobachtet werden konnte. Das gebundene NADPH muß deshalb bereits während der

Zellexpression oder des Zellaufschlusses von Rib7 gebunden worden sein. Dies ist ein weiteres Indiz für die starke Bindung des Cofaktors.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß obwohl die Sekundärstrukturelemente der überlagerten Strukturen von DHFR und Rib7 Gemeinsamkeiten aufweisen, der Bindungsmodus des NADPHs jedoch ziemlich unterschiedlich ist. Zusätzlich ist die Orientierung des Adeninrings bezüglich der AMN Ribose, die, soweit uns bekannt ist, in allen Mitgliedern der EC1 Gruppe in anti-Konformation vorliegt, bei Rib7 um ca. 180° um die Bindung zwischen der AMN-Ribose und dem Adeninring rotiert und nimmt damit eine syn-Konformation ein (siehe Abbildung 4.9).

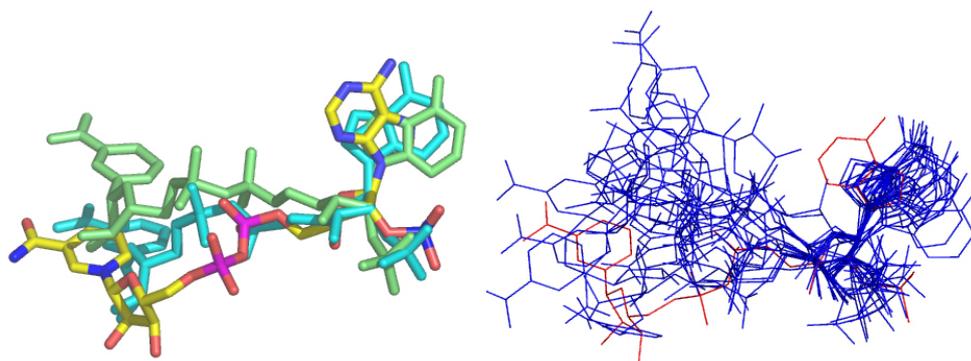


Abbildung 4.9: Überlagerung enzymgebundener NADPHs aus verschiedenen Strukturen der EC1-Gruppe a) NADPHs von Rib7 aus *Methanococcus jannaschii* (gelb, blau, pink und rot) und der DHFR von *Thermotoga maritima* (cyan) und *E. coli* (lime). b) NADPHs von Rib7 (rot); NADPHs der Vergleichsenzyme in blau. Die Vergleichsenzyme sind (PDB-Benennung): 1D1G; 4DFR; 1USO; 1KC3; 1G0O; 1Q0Q; 1DOH; 1C3V; 1QFZ; 1AMO; 1AE4; 1RM4; 1H7X; 1DLR; 1DGH; 1DAP. Das Bild wurde mit Hilfe des Programms Pymol (Delano,2004) erstellt.

4.1.15 Aktives Zentrum

Da das aktive Zentrum von Rib7 und der DHFR fast keine Ähnlichkeit aufweisen, ist ein Transfer bezüglich Bindung und Katalyse nicht möglich. Die DHFR überträgt nur ein Wasserstoffatom, wobei bei Rib7 die Hauptaufgabe in der Ringöffnung des Substratzuckers ist. Außerdem sind nicht nur das aktive Zentrum sondern auch die

umliegenden Bereiche sehr verschieden. Nur die Position der reaktiven Bindung des Substrates sollte ableitbar sein, da die Lage des Adeninerings und die Reduktionsreaktion selbst konserviert zu sein scheint. Auffallend ist die Form und Größe der tiefen runden Tasche des aktiven Zentrums, welche ziemlich groß relativ zur Substratgröße ist. Der Grund der Tasche bilden die β - Stränge A, B und F, während die Wände durch α - Helix A und den beiden Loops, die in Abbildung 4.5 mit Loop1 und Loop2 bezeichnet sind, aufgebaut werden. Unter Berücksichtigung der Gesamtladung des aktiven Zentrums, die mit Hilfe des Programms GRASP (Nicholls et al., 1993) berechnet wurde, ergibt sich, daß das Substratmolekül hauptsächlich durch polare Kontakte gebunden wird. Bezüglich der Ladung ist die Tasche zweigeteilt. Die mögliche Phosphatbindungsstelle ist hauptsächlich positiv geladen während der Rest hauptsächlich negativ geladen ist. Die Oberseite der großen Tasche hat eine besonders hohe Dichte an negativ geladenen Resten, wie in Grafik 4.10 zu sehen ist. Die dargestellten Farben zeigen das elektrostatische Oberflächenpotential bei einem pH-Wert von 7. Die Konturierung reicht von +20 kT/e (tiefblau) zu -20kT/e (dunkelrot).

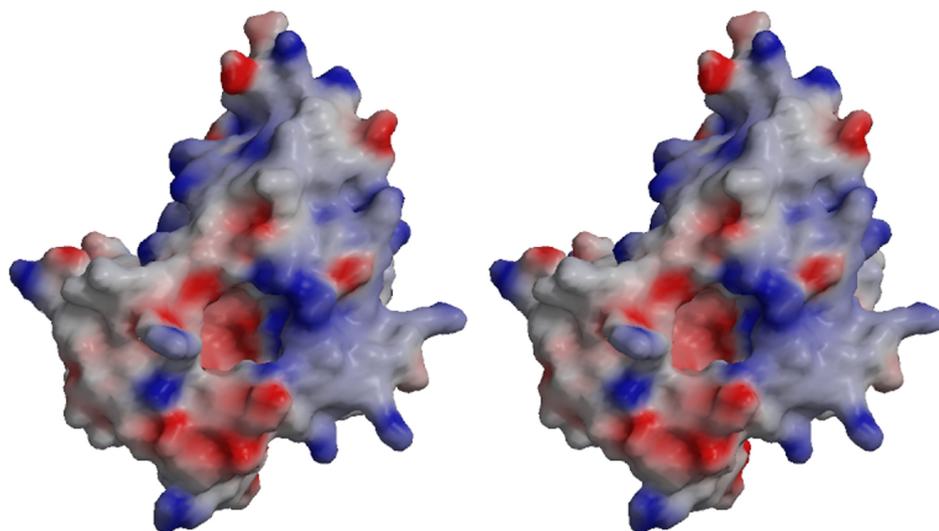


Abbildung 4.10: Stereodarstellungen des Bereiches der Substratbindungsstelle von Rib7 . Abgebildet ist die elektrostatische Oberfläche. Die Farbgebung repräsentiert das elektrostatische Oberflächenpotential bei einem pH von 7 konturiert von +20 kT/e (tiefblau) bis -20 kT/e (dunkelrot). Das Bild wurde mit Hilfe der Programme Molscript (Kraulis, 1991), GRASP (Nicholls et al., 1993) und RASTER3D (Meritt and Bacon, 1997) erstellt.

Substrat

Eines der Hauptziele der Strukturforschung von Enzymen ist natürlich die präzise stereochemische Auflösung des Katalysemechanismus des untersuchten Proteins. Soweit uns bekannt, ist bis jetzt noch keine strukturelle Information vorhanden, die die Reduktion von Nukleotiden in Oxidoreduktasen erklärt. Da 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat zu instabil für eine Cokristallisation und Soakingexperimente ist und noch keine Inhibitoren verfügbar sind, war es uns nicht möglich eine Komplexstruktur zu lösen. Nichtsdestotrotz würde unser Modell sowohl den Reaktionsmechanismus als auch die sehr strikte Selektivität für 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat erklären (s.u.).

Modelling mit AutoDock

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des molekular Modelling Programms AutoDock (Morris et al., 1998), wurde ein hypothetisches Modell der Substratbindung berechnet. Das Ergebnis dieser Berechnungen, nach geometrischer Energieminimierung des Moleküls ist in Graphik 4.11 dargestellt. Da wir über keine röntgenkristallographischen Daten verfügen, können jedoch Verschiebungen und strukturelle Änderungen nicht ausgeschlossen werden. Deshalb ist es auch zu spekulativ konformationelle Umordnungen, die möglicherweise mit einer Substratbindung einhergehen, vorherzusagen.

Pyrimidindioneringbindung

Bezüglich unseres Modells bilden die polaren Gruppen des Pyrimidindionerings eine ganze Reihe von Wasserstoffbrücken mit Haupt- und Seitenkettenatomen des Proteins aus. Die Seitenkette von Asn-14 wechselwirkt mit dem Carbonylringsauerstoff. Weitere Interaktionen konnten zwischen der 5-Aminogruppe und der Carbonylgruppe von Glu-154 und zwischen der 2-Aminogruppe und der Hydroxylgruppe von

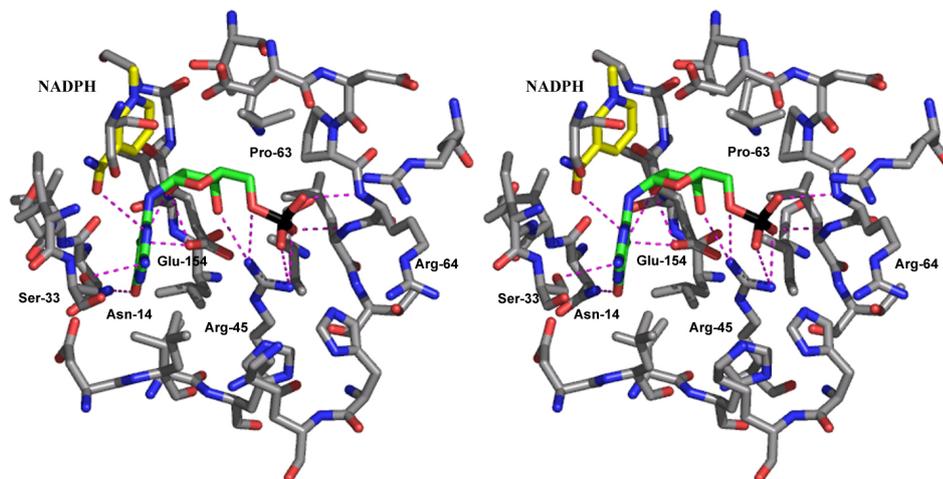


Abbildung 4.11: Stereodarstellungen des Bereiches der Substratbindungsstelle von Rib7 mit dem modellierten gebundenen Substrat. Abgebildet sind nur einige ausgewählte Reste, die von besonderer Bedeutung sind und das gebundene Substratmodell in der Ball-Stick-Darstellung. Mögliche Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Das Bild wurde mit Hilfe des Programms Pymol (Delano,2004) erstellt.

Ser-33 beobachtet werden. Zusätzlich bildet der Carboxamidsauerstoff des Nikotinamidringes noch eine Wasserstoffbrücke mit 1-Amine des Pyrimidinedioneringes aus. Das Asp-37, welches in der DHFR-Familie strikt konserviert ist und mechanistisch eine zentrale Rolle spielt, liegt nach einer Überlagerung der Modelle fast an der gleichen Stelle. Trotzdem unter Berücksichtigung unseres Modells ist der kürzeste Abstand zum modellierten Substrat circa $4,5 \text{ \AA}$ und kann deshalb bestenfalls als polare Interaktion charakterisiert werden. Da jedoch der Sequenzvergleich zeigte, daß dieses Aspartat in den orthologen Riboflavinreduktasen anderer Organismen nicht konserviert ist (siehe Abbildung 4.7) sind wir davon überzeugt, daß dies unserem Modell keinen Abbruch tut.

Der Ribosering

Der Ribosering ist fixiert durch eine ganze Reihe von Wasserstoffbrücken. Die 3'-Hydroxylgruppe interagiert mit der Seitenkettenaminogruppe des Arg-45, während

die 4'-Hydroxylgruppe eine Wasserstoffbrücke mit dem Carboxysauerstoff von Glu-154 ausbildet. Die selbe Gruppe setzt auch in Wechselwirkung mit der 5-Aminogruppe des Pyrimidinedionerings des gleichen Moleküls. Die Alkoxygruppe des Riboseringes ist gut zugänglich für Lösungsmittelmoleküle und bildet sehr wahrscheinlich Wasserstoffbrücken mit Wassermolekülen aus.

Phosphatbindung

Das Phosphat des Substratmoleküls wird ebenfalls durch Wasserstoffbrücken gebunden. Die Seitenkette von Arg-45 interagiert sowohl mit dem Phosphorestersauerstoff als auch mit einem der Phosphatsauerstoffe. Diese Wechselwirkungen auch mit den Hauptkettenaminogruppen der Reste Arg-64 und Leu-65.

Reaktionsmechanismus- und Selektivitätsmodell

Unser Modell würde den Reaktionsmechanismus als auch die sehr strikte Selektivität für 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat wie folgt erklären: Mechanistisch ist unumstritten, daß das Substrat in seiner Enol-form reduziert wird. Da das Alkoxy-Sauerstoffatom sehr Lösungsmittel exponiert ist, sollte durch die Bildung einer Wasserstoffbrücke und einem Protonentransfer das Gleichgewicht zu Gunsten der Enol-Form verschoben werden. Während des Katalyseprozesses wird das NADPH Hydridion nucleophil. Dies ist bedingt durch die Geometrie des katalytischen Asparates als auch durch das gebundene Substrat. Schließlich löst sich dieses Hydridion vom NADPH. Auf Grund der räumlichen Nähe des Hydridions zum N9 Atom des ursprünglichen Purin Ringes und dem C1-Kohlenstoff der Ribose ist die Doppelbindung es der einzig mögliche Akzeptor. Die Bildung einer Wasserstoffbrücke und einem Wasserstofftransfer mit Wasser sollte damit diese Reaktion begünstigen. Diese These wird dadurch unterstützt, daß die N9-C1 Bindung relativ gesehen eine ähnliche Position einnimmt wie das Folat in der DHFR. Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus sollte deshalb schematisch wie in Graphik 4.12

dargestellt ablaufen.

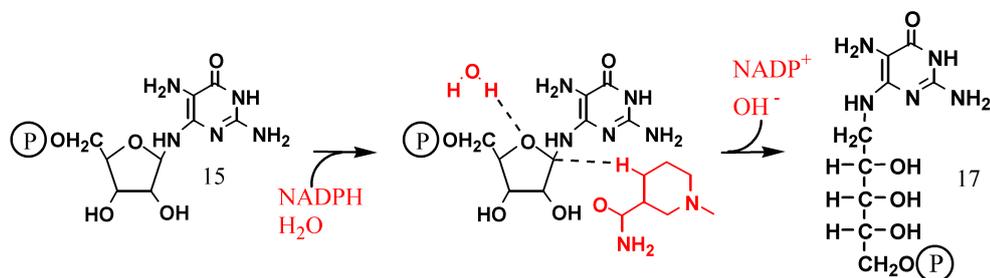


Abbildung 4.12: Möglicher Katalysemechanismus von Rib7 von *Methanococcus jannaschii* Das Bild wurde mit Hilfe des Programms ChemDraw (Fa.: CambridgeSoft) erstellt.

Wie bereits oben beschrieben ist das aktive Zentrum im Vergleich zum Substratmolekül verhältnismäßig groß. Um effektive Wasserstoffbrücken mit dem Nukleotid auszubilden, wären dennoch größere Umlagerungen, der Loops von Nöten, die Taschenwand bildenden. Dafür müßten eine ganze Reihe von Wasserstoffbrücken in dem gesamten Bereich aufgebrochen werden. Deshalb wäre es zu spekulativ konformationelle Umlagerungen die mit der Substratbindung einhergehen sollten, vorherzusagen. Zusätzlich wird unser Modell noch von der Tatsache unterstützt, daß es die strikte Spezifität für das Substrat 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat erklärt (Graupner, 2002). Es ist beeindruckend, daß 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'phosphat das desaminierte Substrat für die orthologe *E. coli* Riboflavinreduktase RibD (siehe Abbildung 2.2) von Rib7 nicht katalysiert werden kann. Da die 2-Aminogruppe des Pyrimidinedionringes und die Hydroxylgruppe von Ser-33 ein für die Substratbindung und die Orientierung wichtige Wasserstoffbrücke bilden, ist dies jedoch offensichtlich. Auch die Vorstufe des Substrates das GMP wird von Rib7 nicht als Substrat akzeptiert, da eine Rotation um ca. 90° um die Bindung zwischen N9 und C4 der ursprünglichen Guaninbase des Substratmoleküls, für die hypothetische Substratbindung und den vorgeschlagenen Katalysemechanismus unbedingt notwendig sind.

Oligomerisierungszustand

Der auffälligste Unterschied der DHFR von *Thermotoga maritima* zu ihren mesophilen Homologen liegt in der Quartärstruktur als Dimer (Dams, 2000). Da bereits wiederholt festgestellt wurde, daß viele hyperthermophile Enzyme durch eine Oligomerisierung stabilisiert werden und auch die Tatsache, daß diese Verbindung der Monomere in der DHFR von *Thermotoga maritima* sehr stabil ist, legte die Vermutung nahe, daß dies einer der wichtigsten Faktoren der extremen Thermostabilität von TmDHFR sein könnte. Das hyperthermophile Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii* hat ein Wachstumsoptimum von 85 °C. Die doch sehr hohe Anzahl von sechs Molekülen in der asymmetrischen Einheit legte die Vermutung nahe, daß Rib7 ebenfalls oligomerisieren würde. Allerdings erschien das unwahrscheinlich, da der durchschnittliche, durch Kontakt verdeckte Bereich, zwischen den Monomeren von Rib7 nur 300- 350 Å² betrug, was auf eine sehr schwache Interaktion schließen ließ, daß eine Oligomerisierung aus kristallographischer Sicht eher unwahrscheinlich war. Zusätzlich ergab sich, daß alle vorstellbaren Oligomerisierungen hauptsächlich durch das Detergenz Cymal2 vermittelt wurden, welches für den Erhalt ausreichend streufähiger Kristalle unbedingt in die Kristallisationslösung gegeben werden mußte. Es wurde deshalb angenommen, daß alle Monomerinteraktionen auf Kristallkontakte zurückgeführt werden konnten, vor allem da der Dali-Algorithmus (Holm 1994) der für die Identifikation von strukturell Homologen Proteinen verwendet wurde, als zweit bzw. dritt homologste Struktur in der Datenbank die Monomeren DHFRs von *H. volcanii* und *E. coli* (Z Wert im Bereich von 15,3 bzw. 15,2 und einem RMSD Wert von 2,5 bzw. 2,7, gemittelt über alle C_α), ergab. Diese beiden Enzyme haben circa 16 bzw. 15,2% Sequenzidentität zu Rib7 und gleichen der TmDHFR nach Überlagerung ebenfalls an der Dimerisierungsstelle. Dennoch zeigten Gelfiltrationsdaten sowie eine durchgeführte Ultrazentrifugation sehr deutlich, daß Rib7 in Lösung dimerisiert. Untersuchungen mit dem Dockingprogramm FTDock (Gabb et al., 1997) ergab eine mögliche Dockinglösung für Rib7, welche einer Dimerisierungsstelle entsprach, die in derselben Region, wie die der TmDHFR, lag. Außerdem paßten die Oberflächen inklusive der wenigen Ladungen der beiden Monomere sehr

gut zusammen, so daß die Interaktion mit Hilfe des Programms MultiDock noch verbessert werden konnte (siehe Abbildung 4.13). Unter Berücksichtigung der elektrostatischen Ladung der Oberflächen von Rib7 zeigte sich, daß dieser Bereich im Vergleich zum restlichen Molekül sehr ausgedehnte hydrophobe Stellen aufwies, was ebenfalls als Indiz für eine Dimerisierung von Rib7 gewertet werden konnte.

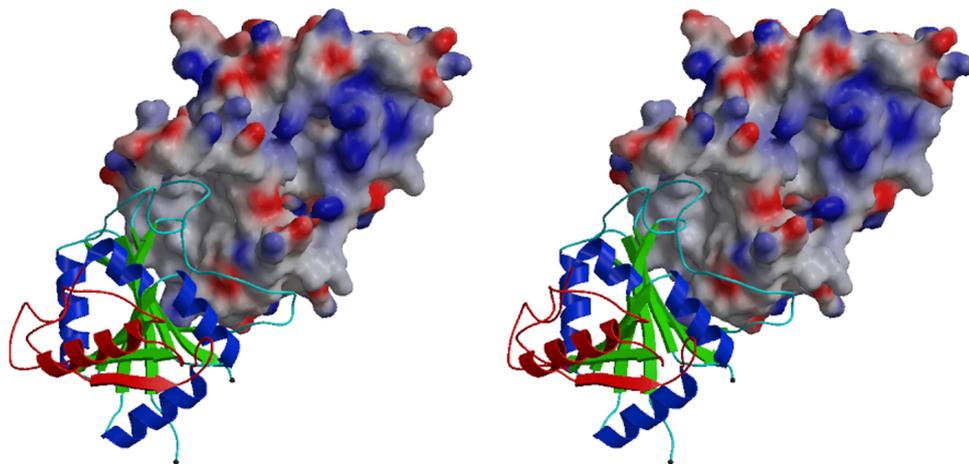


Abbildung 4.13: Darstellung der von uns vorgeschlagenen Dimerisierung von Rib7 , modelliert mit Hilfe des Programms FTDock (Gabb et al., 1997). Eines der Monomere ist als Stereo-Oberflächenmodell dargestellt. Die Farbgebung repräsentiert das elektrostatische Oberflächenpotential bei einem pH von 7 konturiert von +20 kT/e (tiefblau) bis -20 kT/e (dunkelrot). Das zweite Monomer ist dargestellt als Stereo-Ribbon-Modell. Das Bild wurde mit Hilfe der Programme Molscrip (Kraulis, 1991), GRASP (Nicholls et al., 1993) und RASTER3D (Meritt and Bacon, 1997) erstellt.

Wir sind deshalb davon überzeugt, daß der im Kristall beobachtete monomere Zustand von Rib7 ein Artefakt ist, daß durch die hohen Konzentrationen von Salz und dem Detergenz Cymal2 ausgelöst wurde.

4.2 Diskussion

Hier wird erstmalig der Komplex von Rib7 mit seinem Cofaktor NADPH beschrieben, der eine detaillierte Analyse der Enzym-Cofaktor-Interaktionen ermöglicht.

Dabei zeigte sich, daß sich die Bindung im Vergleich zu den anderen Oxidoreduktasen deutlich unterscheidet. Die Orientierung des Adeninrings bezüglich der AMN-Ribose, die soweit uns bekannt ist in allen Mitgliedern der EC1 Klasse immer sehr ähnlich ist und in anti-Konformation vorliegt ist in Rib7 um die Bindung zwischen AMN-Ribose und dem Adeninring, um ca. 180° rotiert und nimmt damit eine syn-Konformation ein (siehe Abbildung 4.9). Wegen der hohen Sequenzhomologie zu den orthologen Oxidoreduktasen von Hefen, Pflanzen und Eubakterien sind nun zum ersten mal detaillierte Einblicke in die ersten Schritte der Riboflavinbiosynthese möglich, die wegen der geringen Stabilität der Enzyme, der Anfangsschritte, der Riboflavinbiosynthese und dem schlechten Kristallisationsverhalten, bis jetzt nicht untersucht werden konnten. Dies hatte dazu geführt, daß die letzten Schritte des Riboflavinstoffwechsels im Detail charakterisiert sind, während die ersten Enzyme des Reaktionsweges im besonderen die GTP-Cyclohydrolase III und die Pyrimidinreduktase, noch sehr schlecht untersucht sind und kaum Informationen über Reaktionsmechanismus etc. vorliegen. Frühere Arbeiten hatten angedeutet, daß das Produkt des ersten Katalyseschrittes der GTP-Cyclohydrolase III 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat ist. Der „open reading frame“ MJ0671 von *Methanococcus jannaschii* wurde kürzlich beschrieben die Reduktion von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat zu 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat zu katalysieren. Damit folgte das Reaktionsschema dem der Hefen und anderen Pilze im Gegensatz zu Reaktionsweg der Eubakterien und Pflanzen (Graupner et al., 2002) Dies konnte durch Komplementationstudien mit *E. coli* Mutanten gezeigt werden. Dennoch ist bis jetzt noch nichts über den enzymatischen Schritt der GTP-Cyclohydrolase III und der Pyrimidinnucleotidreduktase der Archaeobakterien bekannt. Dasselbe gilt für die Desaminierung des Reduktionsproduktes. Molekulare Modellierung wurden durchgeführt, da auf Grund der geringen Stabilität von 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat und dem Mangel an Inhibitoren keine Komplexstrukturlösung möglich war. Diese führten zu ersten strukturellen Informationen bezüglich der Reduktion von Nucleotiden. Außerdem konnte mit Hilfe des Modells ein möglicher Reaktionsmechanismus abgeleitet und die strikte Selektivität für 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-

5'-phosphat erklärt werden, da sich zeigte warum das desaminierte Substrat des orthologen *E. coli* Riboflavinenzym RibD und die Substratvorstufe GMP von Rib7 nicht umgesetzt werden konnte. Die mechanistischen und strukturellen Analysen der Riboflavinstoffwechsels könnten die Basis für ein „rational drug design“ für Inhibitoren des Riboflavinbiosyntheseweges sein. Auf Grund der speziellen Position im Biosyntheseweg könnten sogar Inhibitoren entworfen werden, die zwischen Pilzen bzw. Pflanzen und Eubakterien unterscheiden könnten.

5 Abkürzungen

% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
Å	Angström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
λ	Wellenlänge
$\rho(x, y, z)$	Elektronendichteverteilung
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
APS	Ammoniumsulfat
AS	Aminosäure
AU	asymmetrische Einheit
B	$= 8\pi^2 u^2$;Debye-Waller-Faktor
BW6	Wiggler Beamline BW6 des Deutschen Elektronen Synchrotrons
CC	Korrelationskoeffizient
DHBPS	3,4-Dihydroxy-2-butanon 4-Phosphat Synthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
F_{calc}	Strukturfaktoramplituden, die aus den Koordinaten einer Proteinstruktur berechnet wurden
F_{hkl}	Strukturfaktor
F_{obs}	Strukturfaktoramplituden, die aus den gemessenen Intensitäten resultieren
$2F_{obs} - F_{calc}$	Elektronendichtekarte
$F_{obs} - F_{calc}$	Differenzelektronendichtekarte

FOM	figure of merit; Charakterisierung der Qualität der experimentell ermittelten Proteinphase als Kosinus des mittleren Phasenfehlers
GTP	Guanosin-5-triphosphat
hkl	Netzebenschar bzw. Miller sche Indizes
I_{hkl}	Intensität
kDa	(kilo)Dalton
M	Molar
MAD	Multiple Anomale Dispersion
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MIR	Multiple Isomorphous Replacement
MR	Molecular Replacement
NCS	nicht-kristallographische Symmetrie (non crystallographic symmetry)
PDB	Protein Database
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
$P(u, v, w)$	Pattersonfunktion
rms	Mittleres Abweichungsquadrat
R-Faktor	Beschreibung der Qualität einer verfeinerten Kristallstruktur
R_{free}	freier R-Faktor, wie R-Faktor nur berechnet aus einem festgelegten Testbereich von Reflexen (z. B. 5 % der gemessenen Reflexe). Die Reflexe des Testbereichs werden nicht für die Verfeinerung verwendet.
R_{merge}	R-Faktor für den Vergleich von vereinigten Datensätzen
R_{sym}	beschreibt die Qualität eines Datensatzes als Funktion der Übereinstimmung symmetrieverwandter Reflexe.
RT	Raumtemperatur
Ru5P	Ribulose-5-Phosphat SA Simulated annealing
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIR	single isomorphous replacement

KAPITEL 5. ABKÜRZUNGEN

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vo	Volumen

Literaturverzeichnis

- Bacher, A. (1991). Chemistry and biochemistry of flavoenzymes,. *CRC Press, Boca Raton, FL.*, -:215–259.
- Bacher, A., Eberhardt, S., , and Richter, G. (1996). Escherichia and salmonella,. *Volume 1, washington, d.c. Biosynthesis of riboflavin.*, 1:657–664.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Eisenreich, W., Fischer, M., Herz, S., and Illarionova, B. (2001). Biosynthesis of riboflavin. *Vitam. Horm.*, 61:1–49.
- Bacher, A., Le Van, Q., Buehler, M., Keller, P. J., , and Floss, H. G. (1983). Biosynthesis of riboflavin. origin of the xylen ring. chem. biol. pteridines, proc. int. symp. pteridines folic acid. *Deriv.: Chem. Biol. Clin. Aspects.*, 7th:pages 699–703.
- Bacher, A. and Lingens, F. (1970). Biosynthesis of riboflavin. formation of 2,5-diamino- 6-hydroxy-4-(1'-d-ribitylamino)pyrimidine in a riboflavin auxotroph. *J. Biol. Chem.*, 245:4647–4652.
- Bacher, A. and Mailaender, B. (1973). Biosynthesis of riboflavin. the structure of the purine precursor. *J. Biol. Chem.*, 248(17):6227–31.
- Bacher, A., Richter, G., Ritz, H., Eberhardt, S., Fischer, M., and Krieger, C. (1997). Biosynthesis of riboflavin: Gtp cyclohydrolase ii, deaminase, and reductase. *Methods Enzymol.*, 280:382–9.

LITERATURVERZEICHNIS

- Blundell, T. L. and Johnson, L. N. (1976). Protein crystallography. *Academic Press, London.*, -:-.
- Bragg, W. L. (1913). The structure of some crystals an indicated by their diffraction of x-rays. *Proc. Roy. Soc.*, A89:248–277.
- Bricogne, G. (1974). Geometric sources of redundancy in intensity data and their use for phase determination. *Acta Cryst*, A30:395–405.
- Briggs, W. R. and Huala, E. (1999). Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.*, 15:33–62.
- Brown, G. M. and Reynolds, J. J. (1963). Biogenesis of the water-soluble vitamins. *Annu Rev. Biochem.*, 32:419–462.
- Brown, G. M. and Williamson, J. M. (1982). Biosynthesis of riboflavin, folic acid, thiamine, and pantothenic acid. *adv enzymol relat areas. Mol Biol*, 53:345– 81.
- Brünger, A. (1992). The free r value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature.*, 355:462–474.
- Brünger, A., Adams, P., Clore, G., Delano, W., Gros, P., Grossekunstleve, R., Jiang, J., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N., Read, R., Rice, L., Simonson, T., and Warren, G. (1998). Crystallography and nmr system- a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica.*, -:906–921.
- Brünger, A. T. (1993). Xplor (version 3.1) a system for x-ray crystallography and nmr. *Yale University Press, New Haven, CT.*, -:-.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S., and und Venter, J. C. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *methanococcus jannaschii*. *Science*, 273,:1058–73.

- Burrows, R. B. and Brown, G. M. (1978). Presence in escherichia coli of a deaminase and a reductase involved in biosynthesis of riboflavin. *J. Bacteriol.*, 136:657–667.
- Carter, C. and Carter, C. (1979). Protein crystallography using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.*, 254(23):12219–12223.
- Collaborative Computational Project Number, . (1994). The ccp4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Cryst*, D50:760–763.
- Crosson, S. and Moras, K. (2001). Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: Insights into light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 98(6):2995–3000.
- Drenth, J. (1994). Principles of protein x-ray crystallography. *Springer-Verlag, New York*, -:-.
- Eberhardt, S., Korn, S., Lottspeich, F., and Bacher, A. (1997). Biosynthesis of riboflavin: an unusual riboflavin synthase of methanobacterium thermoautotrophicum. *J. Bacteriol.*, 179(9):2938–43.
- Eberhardt, S., Richter, G., Gimbel, W., Werner, T., and Bacher, A. (1996). Cloning, and sequencing, mapping and hyperexpression of the ribc gene coding for riboflavin synthase of escherichia coli. *Eur. J. Biochem.*, 242(3):712–9.
- Edman, P. and Henschen, A. (1975). Sequence determination. protein sequence determination.,. (*Heidelberg, Springer Verlag*)., 2:-.
- Eisenreich, W., Schwarzkopf, B., and Bacher, A. (1991). A. biosynthesis of nucleotides, and flavins, and deazaflavins in methanobacterium thermoautotrophicum. *J. Biol. Chem.*, 266(15):9622–31.
- Engh, R. A. and Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for x-ray protein structure and refinement. *Acta Cryst.*, A47:392–400.

- Esnouf, R. (1997). An extensively modified version of molscript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graph.*, 15:132–134.
- Ewald, P. P. (1921). Das reziproke gitter in der strukturtheorie. z. *Kristallogr.*, 65:129–156.
- Fischer, M., Haase, I., Feicht, R., Richter, G., Gerhardt, S., and Changeux, J. e. a. (2002a). Biosynthesis of riboflavin: 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase of *schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.*, 269(2):519–26.
- Fischer, M., Haase, I., Kis, K., Meining, W., Ladenstein, R., and Cushman, M. e. a. (2003a). Enzyme catalysis via control of activation entropy: site-directed mutagenesis of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *J. Mol. Biol.*, 326(3):783–93.
- Fischer, M., Römisch, W., Saller, S., Illarionov, B., Richter, G., and Rohdich, F. e. a. (2004). Evolution of vitamin b2 biosynthesis: Structural and functional similarity between pyrimidine deaminases of eubacterial and plant origin. *J. Biol. Chem.*, 279(35):36299–308.
- Fischer, M., Römisch, W., Schiffmann, S., Kelly, M., Oschkinat, H., Steinbacher, S., Huber, R., Eisenreich, W., Richter, G., and Bacher, A. (2002b). Biosynthesis of riboflavin in archaea studies on the mechanism of 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase of *methanococcus jannaschii*. *J Biol Chem.*, 277:41410–41416.
- Fischer, M., Schott, A., Kemter, K., Feicht, R., Richter, G., and Illarionov, B. e. a. (2003b). Riboflavin synthase of *schizosaccharomyces pombe*. protein dynamics revealed by 19f nmr protein perturbation experiments. *BMC Biochem.*, 4(1):18.
- Foor, F. and Brown, G. M. (1975). Purification and properties of guanosine triphosphate cyclohydrolase ii from *escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 250:3545–3551.
- Foor, F. and Brown, G. M. ((1980).). Gtp-cyclohydrolase ii from *escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, 66:303–307.

- Gerhardt, S., Haase, I., Steinbacher, S., Kaiser, J., Cushman, M., and Bacher, A. e. a. (2002a). The structural basis of riboflavin binding to schizosaccharomyces pombe 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *J. Mol. Biol.*, 318(5):1317–29.
- Gerhardt, S., Schott, A., Kairies, N., Cushman, M., Illarionov, B., and Eisenreich, W. e. a. (2002b). Studies on the reaction mechanism of riboflavin synthase: X-ray crystal structure of a complex with 6-carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazine. *Structure (Camb)*, 10(10):1371–81.
- Gill, S. C. and von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data,. *Anal Biochem*, 182:319–326.
- Graupner, M., Xu, H., and RH, W. (2002). The pyrimidine nucleotide reductase step in riboflavin and f(420) biosynthesis in archaea proceeds by the eukaryotic route to riboflavin. *J. Bacteriol.*, 184:1952–1957.
- Green, D., Ingram, V., and Perutz, M. (1954). The structure of the hemoglobin iv. sign determination by isomorphous replacement method. *Proc Roy. Soc. Sect. A,*, 225:287–307.
- Haase, I., Fischer, M., Bacher, A., and Schramek, N. (2003a). Temperature-dependent presteady state kinetics of lumazine synthase from the hyperthermophilic eubacterium aquifex aeolicus. *J. Biol. Chem.*, 278(39):37909–15.
- Haase, I., Mörtl, S., Köhler, P., Bacher, A., and Fischer, M. (2003b). Biosynthesis of riboflavin in archaea. 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase of methanococcus jannaschii. *Eur. J. Biochem.*, 270(5):1025–32.
- Harker, D. (1956). The determination of the phases of the structure factors on non-centrosymmetric crystals by the method of double isomorphous replacement. *Acta Cryst.*, 9:1–9.
- Harvey, R. A. and Plaut, G. W. E. (1966). Riboflavin synthase from yeast: Properties of complexes of the enzyme with lumazine derivatives and riboflavin. *J. Biol. Chem.*, 241:2120–2136.

- Hendrickson, W. A., Smith, J. L., Phizackerley, R. P., and Merritt, E. A. (1988). Crystallographic structure analysis of lamprey hemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation. *Proteins*, 4(2):77–88.
- Herz, S., Eberhardt, S., and Bacher, A. (2000). Biosynthesis of riboflavin in plants. the *riba* gene of *Arabidopsis thaliana* specifies a bifunctional gtp cyclohydrolase ii/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphatase synthase. *Phytochemistry*, 53:723–731.
- Holm, L. and Sander, C. (1993). Protein-structure comparison by alignment of distance matrices. *Journal of Molecular Biology*, 233:123–138.
- Hoppe, W. (1957). Die faltmolekülmethode: eine neue methode zur bestimmung der kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten molekülstrukturen,. *Acta Cryst*, 10:750–751.
- Huber, R. (1965). Die automatisierte faltmolekülmethode,. *Acta Cryst*, -:19.
- Huber, R., Formanek, H., and Epp, O. (1969). Die kristallstruktur von erythrocrucorin (*Chironomus thummi*). *Naturwiss.*, 55:75–77.
- Illarionov, B., Eisenreich, W., and Bacher, A. (2001a). A pentacyclic reaction intermediate of riboflavin synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(13):7224–9.
- Illarionov, B., Haase, I., Bacher, A., Fischer, M., and Schramek, N. (2003). Presteady state kinetic analysis of riboflavin synthase. *J. Biol. Chem.*, 278(48):47700–6.
- Illarionov, B., Kemter, K., Eberhardt, S., Richter, G., Cushman, M., and Bacher, A. (2001b). Riboflavin synthase of *Escherichia coli*. effect of single amino acid substitutions on reaction rate and ligand binding properties. *J. Biol. Chem.*, 276(15):11524–30.
- Jones, B., Thomas, L., Molloy, S., Thulin, C., Fry, M., Walsh, K., and Thomas, G. (1995). Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation

- state of a casein kinase ii site in its cytoplasmic tail. *EMBO Journal*, 14:5869–5883.
- Jones, T. A. (1978). A graphics model building and refinement system for macromolecules. *J. Appl. Crystallogr.*, 11:268–272.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S., and Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.*, A47:110–119.
- Kiefersauer, R., Than, M., Dobbek, H., Gremer, L., Melero, M., Strobl, S., Dias, J., 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.
- Kis, K. and Bacher, A. (1995). Substrate channeling in the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of bacillus subtilis. *J. Biol. Chem.*, 270:16788–16795.
- Kis, K., Volk, R., and Bacher, A. (1995). Biosynthesis of riboflavin. studies on the reaction mechanism of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *Biochemistry (Mosc)*, 34:2883–2892.
- Kleywegt, G. J. and Jones, T. A. (1993). Masks made easy. esf/ccp4. *Newsletter*, 28:56–59.
- Kleywegt, G. J. and Read, R. J. (1997). Not your average density. *Structure*, 5:1557–1569.
- Kraulis, P. (1991). Molscript:a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 24:946–950.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4.,. *Nature*, 227:680–685.

- Laskowski, R., MacArthur, M., Moss, D., and Thornton, J. (1993). Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst.*, 26:283–291.
- Le Van, Q., Keller, P., Bown, D., Floss, H., and Bacher, A. (1985). Biosynthesis of riboflavin in bacillus subtilis: origin of the four-carbon moiety. *J. Bacteriol.*, 162(3):1280–4.
- Lee, J., Gibson, B., O’Kane, D., Kohnle, A., and Bacher, A. (1992). Fluorescence study of the ligand stereospecificity for binding to lumazine protein. *Eur. J. Biochem.*, 210(3):711–9.
- Lu, G. (2000). Top: A new method for protein structure comparisons and similarity searches. *J. Appl. Cryst.*, 33:176–183.
- Mathews, M., Schubert, H., Whitby, F., Alexander, K., Schadick, K., Bergonia, H., Phillips, J., and Hill, C. (2001). Crystal structure of human uroporphyrinogen iii synthase. *Embo Journal*, 20:5832–5839.
- Matthews, B. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.*, 33:491–497.
- Meighen, E. A. (1991). Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.*, 55:123–142.
- Meighen, E. A. (1993). Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *FASEB J.*, 7:1016–1022.
- Meining, W., Mörtl, S., Fischer, M., Cushman, M., Bacher, A., and Ladenstein, R. (2000). The atomic structure of pentameric lumazine synthase from saccharomyces cerevisiae at 1.85 a resolution reveals the binding mode of a phosphonate intermediate analogue. *J. Mol. Biol.*, 299(1):181–97.
- Merritt, E. and Bacon, D. (1997). Raster3d photorealistic molecular graphics. *Methods in Enzymology*, 277:505–527.
- Messerschmidt, A. and Huber, R. (2000). X-ray crystallography of biological ma-

- cromolecules. In Meyers, R., Editor, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, -:6061–6107.
- Mörthl, S., Fischer, M., Richter, G., Tack, J., Weinkauff, S., and Bacher, A. (1996). Biosynthesis of riboflavin. lumazine synthase of escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, 271(52):33201–7.
- Müller, F., Ghisla, S., and Bacher, A. (1988). Vitamin b2 und natürliche flavine. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York*, -:50–159.
- Neuberger, G. and Bacher, A. (1986). Biosynthesis of riboflavin. enzymatic formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by heavy riboflavin synthase from bacillus subtilis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139 (3):1111–1116.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R., and Honig, B. (1993). Grasp: graphical representation and analysis of surface properties. *Biophysical Journal*, -:64.
- Nielsen, P. and Bacher, A. (1981). Biosynthesis of riboflavin. characterization of the product of the deaminase. *Biochim. Biophys. A.*, 662 (2):312–317.
- O’Kane, D. J. and Prasher, D. C. (1992). Evolutionary origins of bacterial bioluminescence. *Mol. Microbiol.*, 6:443–449.
- Patterson, A. L. (1934). A fourier series method for the determination of the components of interatomic distances in crystals. *Phys. Rev.*, 46:372–376.
- Perrakis, A., Morris, R. J. H., and Lamzin, V. S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Struct. Biol.*, 6:458–463.
- Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G., and North, A. (1960). Structure of haemoglobin; a three dimensional fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by x-ray analysis. *Nature*, 185:416–422.
- Plaut, G. W. E. (1960). Studies on the stoichiometry of the enzymatic conversion of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *J. Biol. Chem.*, 235:2225–2243.

- Plaut, G. W. E. (1961). Water-soluble vitamins. ii. (folic acid, riboflavin, thiamine, vitamin b12). *Annu Rev. Biochem.*, 30:409–446.
- Plaut, G. W. E. (1971). Metabolism of water-soluble vitamins: The biosynthesis of riboflavin. In: *Florkin, M., Stotz, E.H. (Hrsg.). Comprehensive Biochemistry, Elsevier, Amsterdam*, 21:11–45.
- Plaut, G. W. E. and Harvey, R. A. (1971). The enzymatic synthesis of riboflavin. *Methods Enzymol.*, 18:515–538.
- Ramachandran, G. and Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 23:283–437.
- Read, S. and Northcote, D. (1981). Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue g dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.*, 116:53–64.
- Reuke, B., Korn, S., Eisenreich, W., and Bacher, A. (1992). Biosynthetic precursors of deazaflavins. *J. Bacteriol.*, 174(12):4042–9.
- Richter, G., Fischer, M., Krieger, C., Eberhardt, S., Lüttgen, H., Gerstenschläger, I., and Bacher, A. (1997). Biosynthesis of riboflavin. characterization of the bifunctional deaminase/reductase of escherichia coli and bacillus subtilis. *J. Bacteriol.*, 179:2022–2028.
- Richter, G., Ritz, H., Katzenmeier, G., Volk, R., Kohnle, A., Lottspeich, F., Allendorf, D., and Bacher, A. (1993). Biosynthesis of riboflavin: Cloning, sequencing, mapping and expression of the gene coding for gtp cyclohydrolase ii in e. coli. *J. Bacteriol.*, 175:4045–4051.
- Richter, G., Volk, R., Krieger, C., Lahm, H. W., Röthlisberger, U., and Bacher, A. (1992). Biosynthesis of riboflavin. cloning, sequencing and expression of the gene code for 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of escherichia coli. *J. Bacteriol.*, 174 (12):4050–4056.

- Rossmann, M. G., , and Blow, D. M. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit,. *Acta Cryst*, 15:24–31.
- Salomon, M., Eisenreich, W., Durr, H., Schleicher, E., Knieb, E., and Massey, V. t. (2001). An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from *avena sativa*. *Proc Natl Acad. Sci. USA*,, 98:12357–12361.
- Sancar, A. (1994). Structure and function of dna photolyase. *Biochemistry*, 33(1):2–9.
- Schramek, N., Haase, I., Fischer, M., and Bacher, A. (2003). Biosynthesis of riboflavin. single turnover kinetic analysis of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(15):4460–6.
- Shavlovskii, G., Logvinenko, E., Sibirnyi, A., Fedorovich, D., and Zakalskii, A. (1981). Activity of the enzyme of the 2d step of flavinogenesis, 2,5-diamino-6-hydroxy-4-ribosylaminopyrimidine-5'-phosphate reductase, in *pichia guilliermondii* yeasts. *Mikrobiologiya*, 50(6):1008–11.
- Sheldrick, G. M., Dauter, Z., Wilson, K. S., Hope, H., and Sieker, L. C. (1993). The application of direct methods of patterson interpretation to high-resolution native protein data. *Acta Crystallogr.*, 49:18–23.
- Steinbacher, S., Schiffmann, S., Richter, G., Huber, R., Bacher, A., and Fischer, M. (2003). Structure of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase from *methanococcus jannaschii* in complex with divalent metal ions and the substrate ribulose 5-phosphate: implications for the catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.*, 278(43):42256–65.
- Stout, G. H. and Jensen, L. H. (1989). X-ray structure determination. (*New York, John Wiley*), -:-.
- Thompson, I. J. and Sancar, A. (2002). Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair dna and reset the circadian clock. *Oncogene*,, 21:9043–9056.

- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.,. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76:4350–4354.
- Volk, R. and Bacher, A. (1988). Biosynthesis of riboflavin. the structure of the four-carbon precursor. *J. Am. Chem. Soc.*, 110:3651–3653.
- Volk, R. and Bacher, A. (1990). Studies on the 4-carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. *J. Biol. Chem.*, 265 (32):19479–19485.
- Volk, R. and Bacher, A. (1991). Biosynthesis of riboflavin. *J. Biol. Chem.*, 266 (31):20610–20618.
- Wacker, H., Harvey, R. A., Winestock, C. H., and Plaut, G. W. E. (1964). 4-(1'-dribitylamino)- 5-amino-2,6,-dihydroxypyrimidine, the second product of the riboflavin synthetase reaction. *J. Biol. Chem.*, 239:3493–3497.
- Young, D. W. (1986). The biosynthesis of the vitamis thiamin, riboflavin, and folic acid. *Nature Prod. Rep.*, 3:395–419.
- Zhang, X., Meining, W., Cushman, M., Haase, I., Fischer, M., and Bacher, A. e. a. (2003). A structure-based model of the reaction catalyzed by lumazine synthase from aquifex aeolicus. *J. Mol. Biol.*, 328(1):167–82.
- Zhang, X., Meining, W., Fischer, M., Bacher, A., and Ladenstein, R. (2001). X-ray structure analysis and crystallographic refinement of lumazine synthase from the hyperthermophile aquifex aeolicus at 1.6 a resolution: determinants of thermostability revealed from structural comparisons. *J. Mol. Biol.*, 306(5):1099–114.