

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

**Biochemische und röntgenkristallographische
Untersuchungen der Pyridoxal-5'-Phosphat abhängigen
Threonin Synthase**

Stephan Ehlert

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

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

Die Dissertation wurde am 2. April 2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 25. April 2001 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 1996 bis März 2001 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Anleitung von Professor Dr. Robert Huber durchgeführt.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Professor Dr. Robert Huber ganz herzlich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis bedanken, für die Überlassung des sehr interessanten Themas, des exzellent ausgestatteten Laborplatzes sowie für sein stetes Interesse an der Arbeit und die Unterstützung während der Promotion.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Tim Clausen, mit dem ich zusammen das Threonin Synthase Projekt begonnen habe. Er war mir stets ein Freund, mit dem ich in jeder Entwicklungsphase der Arbeit alle Probleme diskutieren konnte, der mir auch in schwierigen Situationen wieder Mut machte und mit dem es großen Spaß gebracht hat, zusammenzuarbeiten.

Marta Garrido danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und freundschaftliche Unterstützung, die wichtige Beiträge für das Gelingen dieser Arbeit waren.

Priv. Doz. Albrecht Messerschmidt danke ich für seine Unterstützung während der gesamten Projektphase, insbesondere beim Bau des Moleküls und bei der Energieminimierung.

Bei der AgrEvo AG, Frankfurt am Main, und ihren Mitarbeitern möchte ich mich für die freundliche Überlassung diverser Klone und Plasmide bedanken. Insbesondere danke ich Dr. Bernd Laber für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein Dank geht an Dr. Hans Bartunik und Dr. Gleb Bourenkov für die großzügige Unterstützung am DESY, Hamburg.

Dr. Markus Wahl möchte ich danken für seinen stets fachkundigen Rat, seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und die vorzügliche Zusammenarbeit.

Snezan Marinkovic danke ich für die Bereitschaft, mir jederzeit mit Rat und Tat im Labor zur Seite zu stehen.

Dr. Jens Kaiser und Dr. Hans Georg Beisel danke ich für die kompetente Einführung in die Lösung einer Proteinstruktur.

Ich bedanke mich bei Dr. Karl-Heinz Mann für die Edman-Sequenzierung und bei Marius Boicu für die DNA-Sequenzierung.

Ich möchte mich bei Andrea Papendorf sowie den Praktikanten Thomas Kast und Dagmar Höger für ihre Unterstützung und große Einsatzfreude bedanken.

Den Laborkollegen aus K332 Anja Lang, Berta Martins, Constanze Breithaupt, Kerstin Wendt, Sofia Maciera, Ulrike Breitinger, Dr. Clemens Steegborn, Stephan Krapp, Jochen Kluge und Tobias Krojer danke ich für die vielen anregenden Diskussionen, den vielen kleinen und großen Hilfestellungen und die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke natürlich auch meinen Bürokollegen Dr. Anja Dorowski, Dr. Uta Ohndorf, Dr. Peter Sondermann, Dr. Manuel Than und Andreas Kolbeck für den täglichen „Bürotratsch“.

Ein besonderer Dank geht an die Jungs von K334 Dr. Oliver Einsle, Dr. Michael „Lt.“ Worbs, Dr. Holger Dobbek, Rupert „Rups“ Lang, Stefan Gerhard, Dr. Markus Deibert und Dr. Ulrich Rester für die beständige Verbreitung von guter Laune.

Renate Rüller und Gina Beckmann waren mir stets eine große Hilfe in der Bewältigung vieler kleiner und großer Probleme, die eine Bürokratie mit sich bringt. Werner Dersch und Ottmar Paul haben mich bei technischen Problemen jedweder Art stets schnell, kompetent und immer mit typisch bayerischer Freundlichkeit helfen können.

Allen nicht namentlich erwähnten der Abteilung Huber gilt mein Dank für die schöne Zeit, die ich mit Euch habe verbringen dürfen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir auf meinem Weg immer ihre volle Unterstützung haben zukommen lassen und ohne die ich nicht das erreicht hätte, was ich erreicht habe.

Barbara D'Errico hat durch ihre Rücksichtnahme, Toleranz und ihre aufmunternden Worte entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, wofür ich ihr aus tiefem Herzen dankbar bin.

Für Barbara

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	5
2 Einleitung	7
2.1 Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP)	7
2.2 Einteilung PLP-abhängiger Enzyme	10
2.3 Threoninbiosynthese	13
2.3.1 Synthese von Homoserin.....	13
2.3.2 Synthese von Phosphohomoserin	15
2.3.3 Katabolismus von Threonin	15
2.3.4 Threonin Synthase	16
2.4 Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse	18
2.4.1 Entwicklung der Röntgenkristallographie	18
2.4.2 Beugung von Röntgenstrahlung	19
2.4.3 Berechnung der Elektronendichte.....	22
2.4.4 Lösung des Phasenproblems	22
2.4.5 Multipler isomorpher Ersatz	22
2.4.6 Multiple anomale Dispersion.....	24
2.5 Ziel der Arbeit	25
3 Experimenteller Teil	26
3.1 Materialien und Geräte	26
3.1.1 Bakterien und Plasmide.....	26
3.1.2 Enzyme	27
3.1.3 Oligonukleotide für die PCR	27
3.1.4 Präparationskits.....	27
3.1.5 Chemikalien.....	27
3.1.6 Geräte	28
3.2 Methoden	29
3.2.1 Arbeiten mit Bakterien	29
3.2.1.1 Plattenkulturen	29
3.2.1.2 Flüssigkulturen	29
3.2.1.3 Glycerinkulturen	29
3.2.1.4 Fermentation von <i>E.coli</i>	30

3.2.1.5 Selenomethionin-Expression	30
3.2.1.6 Herstellung transformationskompetenter <i>E.coli</i> Zellen	30
3.2.1.7 Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	31
3.2.2 Arbeiten mit DNA.....	31
3.2.2.1 Agarose Gelelektrophorese	31
3.2.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten	32
3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	32
3.2.2.4 Isolierung von Plasmiden aus <i>E.coli</i>	32
3.2.2.5 Verdau der DNA durch Restriktionsendonucleasen.....	33
3.2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten	33
3.2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
3.2.2.8 DNA-Sequenzierung mit Hilfe der PCR	34
3.2.3 Arbeiten mit Proteinen	35
3.2.3.1 Zellaufschluß.....	35
3.2.3.2 Hitzedenaturierung	35
3.2.3.3 Ionenchromatographie (IC).....	35
3.2.3.4 Hydroxylapatit (HA)	35
3.2.3.5 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	35
3.2.3.6 Gelfiltration (SEC)	36
3.2.3.7 N-terminale Sequenzierung	36
3.2.3.8 Proteinkonzentrationsbestimmung	36
3.2.3.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
3.2.3.10 Massenbestimmung von Proteinen.....	38
3.2.3.11 Western-Blot	39
3.2.3.12 Isoelektrische Fokussierung	39
3.2.4 Röntgenstrukturanalytische Arbeiten	40
3.2.4.1 Kristallisation	40
3.2.4.2 Datensammlung	41
3.2.4.3 Datenauswertung	42
3.2.4.4 Selen-Lagen und Mittelung.....	42
3.2.4.5 Modellbau und Verfeinerung	42
3.2.4.6 Geometrische Analyse	43
3.2.4.7 Graphische Darstellung.....	43
3.2.4.8 Energieminimierung	43

4 Ergebnisse	45
4.1 Threonin Synthase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
4.1.1 Klonierung	45
4.1.2 Expression und Reinigung.....	45
4.1.3 Charakterisierung	46
4.1.3.1 UV/VIS-Spektrum	46
4.1.3.2 Molekularmassenbestimmung	47
4.1.3.3 Isoelektrischer Punkt	47
4.1.4 Sequenzanalyse	48
4.1.5 Kristallisation	51
4.1.6 Selenlagen und Elektronendichteberechnung.....	53
4.1.7 Modellbau und Verfeinerung.....	54
4.1.8 Strukturbeschreibung	56
4.1.9 Architektur des Aktivzentrums	60
4.1.10 Energieminimierung.....	62
4.2 Threonin Synthase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
4.2.1 Expression und Reinigung.....	64
4.2.2 Charakterisierung	65
4.2.2.1 UV/VIS-Spektrum	65
4.2.2.2 Molekularmassenbestimmung	65
4.2.3 Sequenzanalyse	66
4.2.4 Kristallisation	67
4.3 Threonin Synthase aus <i>Thermotoga maritima</i>	70
4.3.1 Klonierung	70
4.3.2 Expression und Reinigung.....	70
4.3.3 Charakterisierung	71
4.3.3.1 UV/VIS-Spektrum	71
4.3.3.2 Molekularmassenbestimmung	71
4.3.3.3 Isoelektrische Fokussierung	72
4.3.4 Sequenzanalyse	73
4.3.5 Kristallisation	73

5 Diskussion	76
5.1 Threonin Synthase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	76
5.1.1 Expression und Reinigung der TSH.....	76
5.1.2 Kristallisation und Verfeinerung der TSH-Struktur.....	77
5.1.3 Vergleich der TSH mit verwandten Strukturen	78
5.1.4 Vorschlag eines Reaktionsmechanismus für TSH	83
5.2 Threonin Synthase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	87
5.2.1 Expression, Reinigung, Charakterisierung der TSA.....	87
5.2.2 Kristallisation der TSA	87
5.3 Threonin Synthase aus <i>Thermotoga maritima</i>	88
5.3.1 Klonierung, Expression, Reinigung, Charakterisierung der TSTM	88
5.3.2 Kristallisation der TSTM.....	89
5.4 Ausblick.....	89
6 Literaturverzeichnis.....	91
7 Anhang	102
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	102
Abbildungsverzeichnis	103
Tabellenverzeichnis	104
Buchstabencode der Aminosäuren	104
<i>Factorial</i> -Lösungen.....	105

1 Zusammenfassung

Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) ist einer der vielseitigsten enzymatischen Kofaktoren und spielt eine zentrale Rolle im Aminosäurestoffwechsel zahlreicher Organismen. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die biochemische und strukturelle Charakterisierung der Threonin Synthase (TS), einem Enzym, das den letzten Schritt der Threoninbiosynthese von o-Homoserinphosphat zu Threonin katalysiert. Threonin Synthase zählt zur β -Familie der PLP-Enzyme und kommt nur in Bakterien, Pilzen und Pflanzen vor. Threonin selbst zählt somit zu den essentiellen Aminosäuren. Aufgrund ihres Vorkommens ist die Threonin Synthase daher ein interessantes *Target*-Molekül zur Entwicklung neuer Fungi- und Herbizide.

In dieser Arbeit konnte Threonin Synthase aus den Organismen *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* und *Thermotoga maritima* kloniert, gereinigt, charakterisiert sowie kristallisiert werden. Die Struktur des Hefe-Enzyms (TSH) konnte durch die gezielte Dotierung des Proteins mit Selenomethionin in einem MAD-Experiment (*multiple anomalous dispersion*) bis zu einer Auflösung von 2,7 Å aufgeklärt werden. In die Elektronendichte konnten, nach einer zweifachen Mittelung, nahezu alle Aminosäuren der Proteinsequenz eingebaut und das atomare Modell bis zu einem *R*-Faktor von 21,7% verfeinert werden.

Die biochemische Charakterisierung ließ den Schluß zu, daß die TSH als Monomer vorliegt was durch die Strukturanalyse bestätigt werden konnte. Die TSH weist eine in drei Untereinheiten gegliederte, offene α/β -Struktur auf. Die N-terminale Domäne besteht aus einem durch eine kleine Helix verbundenen 2-strängigen, parallelen Faltblatt, an das sich weitere drei kurze Helices anschließen. Die PLP-bindende Domäne wird aus einem fünfsträngigen Faltblatt geformt, das von insgesamt 5 Helices umgeben ist. Die dritte Domäne enthält als zentrales Element ein sechs- und ein zweifaches Faltblatt, die durch eine kleine Helix voneinander getrennt werden. Umgeben werden diese Faltblätter von insgesamt sechs weiteren Helices. Ein auffälliges Merkmal der TSH ist ein tiefer Kanal, der sich quer durch das gesamte Molekül erstreckt. In der Mitte dieses Kanals ist der PLP-Kofaktor an der Kontaktfläche zwischen der zweiten und dritten Domäne gebunden. Erstmals konnte mit der vorgestellten Struktur ein monomeres PLP-Enzym charakterisiert werden und durch einen Strukturvergleich mit den bislang bekannten Faltungstyp II Molekülen Threonin Deaminase, O-Acetyl-Sulfhydrylase und der β -Einheit von Tryptophan Synthase diesem Faltungstyp eindeutig zugeordnet werden.

Außerdem konnte durch den Strukturvergleich erklärt werden, warum die TSH als Monomer vorliegt. In den Bereichen, in denen bei den anderen Molekülen die Kontaktflächen für die Dimerisierung bzw. Tetramerisierung ausgebildet sind, befinden sich bei der TSH zusätzliche Sekundärstrukturen, die eine Dimerisierung verhindern.

Um eine genauere Vorstellung über die molekulare Basis der katalysierten Reaktion zu erhalten, wurde, aufbauend auf der Struktur der TSH, der modellierte Enzym/Substrat Komplex energieminiert. Das Modell des ES-Komplex lieferte eine Erklärung für den Reaktionsmechanismus, der bisher nur ausschnittsweise bekannt war. Demnach ist das PLP-bindende Lys verantwortlich für die Übertragung des α -Protons auf das C4' des Kofaktors sowie die Abstraktion des β -Wasserstoffs. Es konnten keine weiteren katalytisch aktiven Reste innerhalb der aktiven Tasche gefunden werden, die sterisch in der Lage wären, die erwähnten Reaktionen auszuführen. Die Bindung des Substrats in einer Phosphatbindetasche über eine Vielzahl spezifischer Wasserstoffbrückenbindungen wird von Aminosäuren bewerkstelligt, die innerhalb der verschiedenen Threonin Synthasen nahezu vollständig konserviert sind. Ein Sequenzvergleich von 30 TS Sequenzen zeigte zudem eine Auftrennung in zwei Unterfamilien, eine Pflanzenfamilie (enthält Pflanzen und Bakterien) und eine Pilzfamilie (enthält Pilze und Bakterien), zwischen denen nur insgesamt sechs Aminosäuren vollständig konserviert sind.

Teile der Doktorarbeit wurden veröffentlicht in:

Laber, B., Maurer, W., Hanke, C., Gräfe, S., Ehlert, S., Messerschmidt, A., Clausen, T., (1999), Characterization of recombinant *Arabidopsis thaliana* threonine synthase, *Eur. J. Biochem.*, **263**, 212-221

Wahl, M.C., Huber, R., Marinkovic, S., Weyher-Stingl, E., Ehlert, S., (2000), Structural investigations of the highly flexible recombinant ribosomal protein L12 from *Thermotoga maritima*. *Biol. Chem.*, **381**, 221-9

Breitinger, U., Clausen, T., Ehlert, S., Huber, R., Laber, B., Schmidt, F., Pohl, E., Messerschmidt, A., (2001), The Three-Dimensional Structure of Cystathionine β -Lyase from *Arabidopsis thaliana* and its Substrate Specificity, in Vorbereitung

Ehlert, S., Garrido, M., Messerschmidt, A., Huber, R., Laber, B., Clausen, T., (2001), Structure and function of threonine synthase from yeast, in Vorbereitung

Kongreßbericht:

Ehlert, S., Clausen, T., Maurer, W., Hanke, C., Gräfe, S., Messerschmidt, A., Huber, R., Laber, B., (1998), Recombinant *Arabidopsis thaliana* threonine synthase: A comparative study with enzymes from *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*; *Workshop: Structure, function and evolution of B₆-enzymes, 1998, Basel (Switzerland)*

2 Einleitung

2.1 Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP)

Das Vitamin B₆ (Pyridoxin, 4,5-Bis(hydroxymethyl)-2-methyl-pyridin-3-ol) wurde in den 30er Jahren von György (1934) bei Nährstoffstudien an Ratten entdeckt und von Kuhn & Wendt (1938) aus Hefeextrakten isoliert. Mikrobiologische Untersuchungen führten zur Entdeckung zweier weiterer Pyridinderivate, Pyridoxal und Pyridoxamin (Snell, 1945), die in Abb. 2.1 in phosphorylierter Form abgebildet sind. Die Verwendung der Silbe „Pyrid“ unterstreicht die strukturelle Ähnlichkeit zum Pyridin (György, 1964).

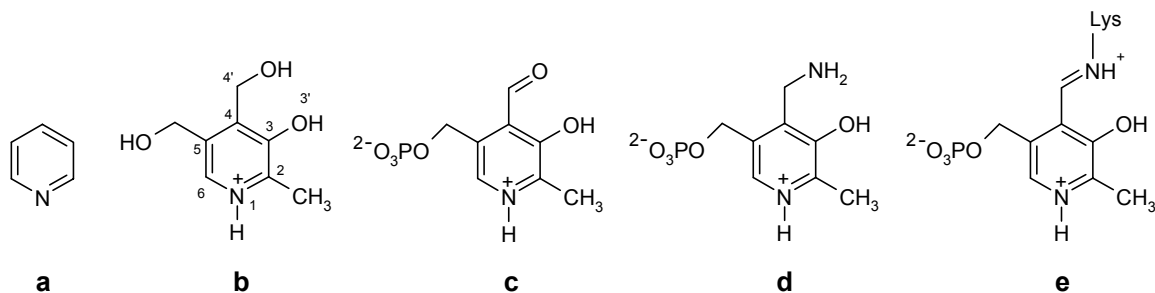


Abb. 2.1

a Pyridin; **b** Pyridoxin (Vitamin B₆); **c** Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP); **d** Pyridoxamin-5'-Phosphat (PMP); **e** Schiff-Base zwischen PLP und Lysinseitenkette. Die Standardnumerierung ist in b angegeben.

Im Pyridoxal-5'-Phosphat ist, anders als im Pyridoxin, die 4-Hydroxymethylgruppe in *para*-Position zu einem Aldehyd oxidiert und kann so über eine Schiff-Base-Bindung (Iminbindung, internes Aldimin) an ein Enzym gebunden werden (Christen & Metzler, 1985). Die phosphorylierte 5-Hydroxymethylgruppe dient dabei als stabiler Phosphat-Anker des Coenzyms, der mehrere Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein ausbildet. Die Hydroxygruppe an C3 kann mit dem Iminstickstoff der Schiff-Base eine Wasserstoffbrücke bilden, die die Planarität zwischen der Imin Doppelbindung und dem Pyridin-Ringsystem stabilisiert (John, 1998).

PLP-abhängige Enzyme spielen eine zentrale Rolle im Aminosäurestoffwechsel, da sie ein breiteres Spektrum an Reaktionen katalysieren als alle anderen kofaktorabhängigen Enzyme. Zu dieser Enzymklasse gehören u.a. Aminotransferasen, Decarboxylasen, Racemasen, α -, β -, γ -Synthasen oder auch β -, γ -Lyasen. Die kovalente Verknüpfung von PLP mit dem Enzym durch Kondensation der Aldehydgruppe und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins zu einer Iminbindung führt zur eigentlich aktiven Gruppe des Holoenzym (Apoprotein + PLP). Die Vielseitigkeit des PLP beruht auf der elektronenziehenden Wirkung des Pyridinstickstoffs (Elektronenfalle), der die mesomere Verteilung einer zusätzlichen Ladung innerhalb des π -Systems erlaubt und so Elektronen von auftretenden Carbanion-

intermediaten stabilisiert. Diese zusätzlichen Elektronen werden genau dann in das konjugierte PLP π -Ringsystem transferiert, wenn eine Überlappung des zu delocalisierenden Elektronenpaars mit dem Kofaktor-Orbitalsystem auftritt (Abb. 2.2) und die zu lösende Bindung in einer Ebene mit dem PLP-Orbitalsystem steht (stereoelektronische Katalyse). Durch Rotation um die $C\alpha$ -N Bindung einer über eine Schiff-Base gebundenen Aminosäure kann jede der drei Bindungen am $C\alpha$ in eine entsprechende Orientierung gebracht werden, wobei der Grad der Rotation durch die Bindungsgeometrie im Aktivzentrum bestimmt wird (Braunstein & Shemyakin, 1953; Metzler *et al.*, 1954; Jenkins *et al.*, 1959).

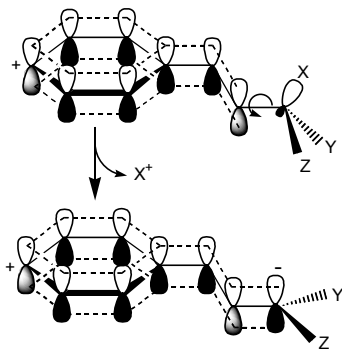


Abb. 2.2

π -Orbitale der Schiff-Base aus PLP und einer Aminosäure. X^+ kann genau dann energetisch günstig eliminiert werden, wenn die X-C-Bindung (sp^3 -Hybrid) in einer Ebene mit dem PLP- π -System steht und die negative Ladung des entstehenden Carbanions über das gesamte Molekül delocalisiert werden kann.

Die PLP-katalysierten Reaktionen beginnen stets mit der Transaldimierung [Ausnahme: Phosphorylasen, in denen die Phosphatgruppe als Säure-Base-Katalysator wirkt (Barford *et al.*, 1991) und die im folgenden nicht weiter berücksichtigt werden]. Dabei wird, ausgehend vom internen Aldimin (I), ein geminales Diamin (II) gebildet, bei dem sowohl Enzym- als auch Substrataminogruppe in Tetraedergeometrie an das $C4'$ gebunden sind (Abb. 2.3) bei gleichzeitigem Protonentransfer von der Substrat- auf die Enzymaminogruppe.

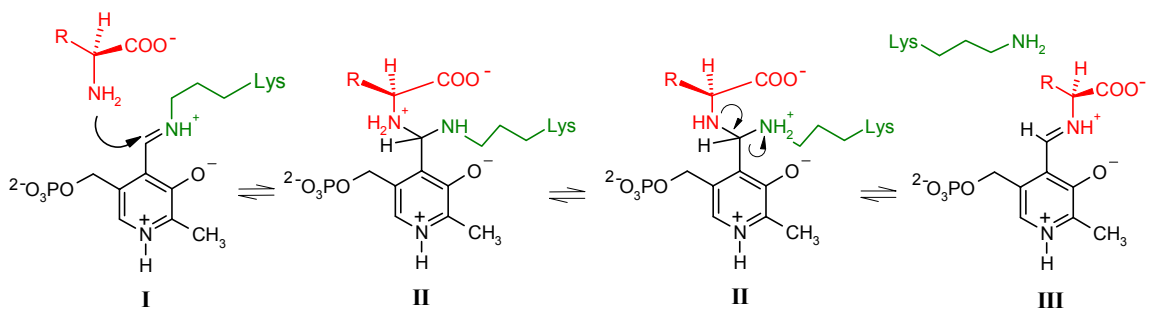


Abb. 2.3

PLP-Transaldimierung mit den typischen Intermediaten: Internes Aldimin (I), geminales Diamin (II), externes Aldimin (III)

Nach der Transaldimierung wird eine der drei $C\alpha$ -Bindungen durch die elektronenziehende Wirkung des PLP's geschwächt und schließlich gespalten. Abhängig davon, welche $C\alpha$ -Bindung gespalten wird, kommt es entweder zur Decarboxylierung, zur ersten Hälfte der Transaminierung, zur Racemisierung oder zu einer Seitenkettenmodifikation, wie z.B. β -Eliminierung (Abb. 2.4).

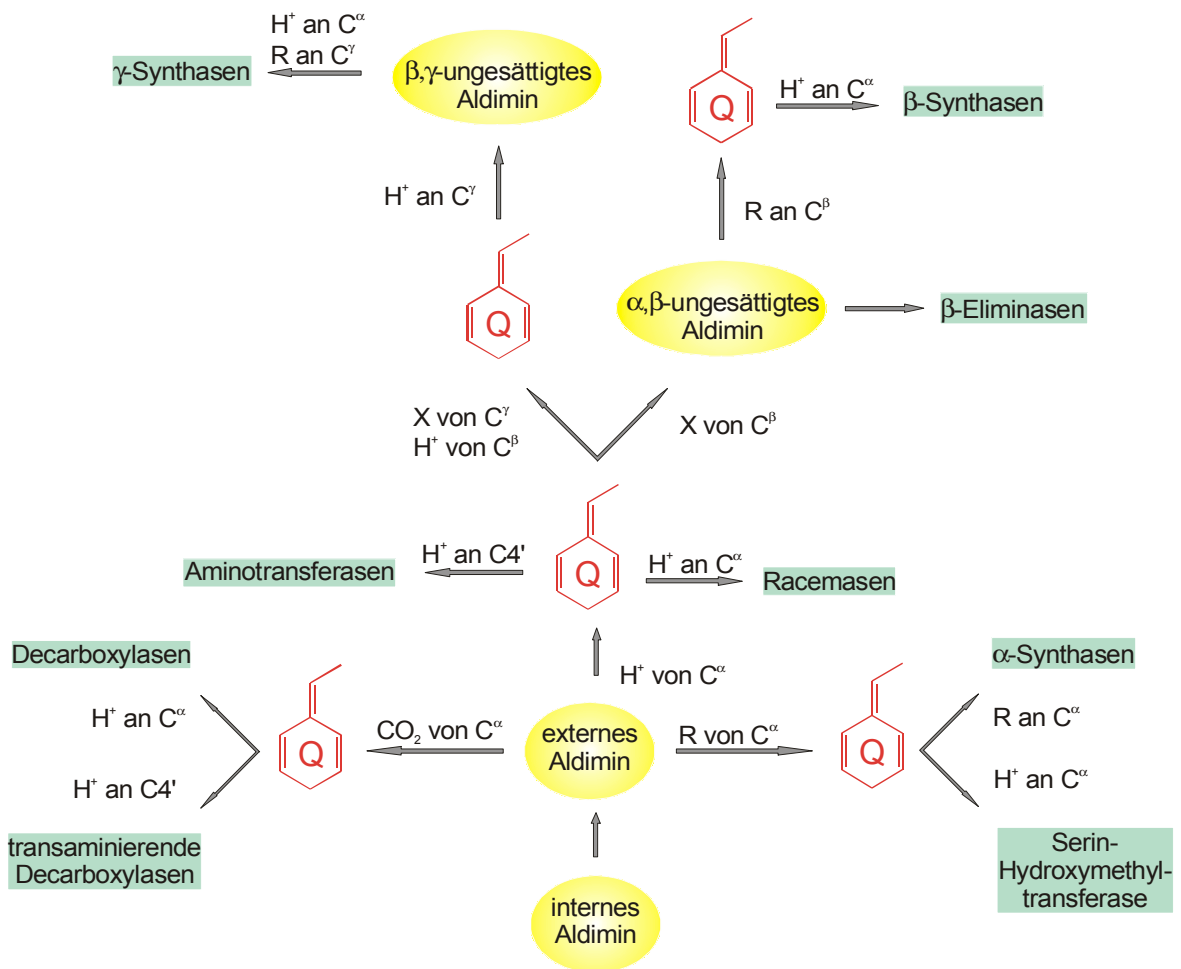


Abb. 2.4

Schematische Darstellung aller vorkommenden PLP Reaktionsspezifitäten. Die katalysierten Reaktionen beginnen stets mit der Umwandlung des internen Aldimins (Transaldimierung). Die mit Q gekennzeichneten Intermediate sind chinoider Natur (aus: John, 1995).

Im Holoenzym ist die Umgebung des Kofaktors von entscheidender Bedeutung, da die Anordnung der Aminosäuren im Aktivzentrum für jedes PLP-Enzym spezifisch ist und hieraus die verschiedenen Substratpräferenzen und Reaktionsspezifitäten resultieren. Die verschiedenen möglichen Reaktionswege der PLP-Enzyme lassen sich als eine Serie aufeinanderfolgender Einzelschritte mit verschiedenen Verzweigungspunkten darstellen, die zu entsprechend unterschiedlichen Produkten führen (Abb. 2.4). In Abwesenheit des Apoenzyms würden alle Reaktionen gleichzeitig stattfinden. Dieser Umstand verdeutlicht die hohe Spezifität und Effizienz der PLP-Enzyme, die nur jeweils einen Reaktionsweg bevorzugen und andere Alternativen ausschließen.

2.2 Einteilung PLP-abhängiger Enzyme

Dunathan stellte in den 70er Jahren die Hypothese auf, daß alle PLP-Enzyme von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen (Dunathan & Voet, 1974). Vor allem interessierte er sich für die Stereochemie von Protonentransferprozessen und untersuchte sieben PLP-Enzyme, deren Mechanismus eine Protonenaddition an C4' beinhaltet. Er fand heraus, daß die Anlagerung an C4' stets auf der *si*-Seite erfolgt und deutete die Ergebnisse so, daß alle PLP-Enzyme den Kofaktor in gleicher Orientierung gebunden haben, mit der *si*-Seite in Richtung Apoprotein. Er postulierte daraufhin einen gemeinsamen „Urvater“, der diese ursprüngliche Bindungsstereochemie aufwies, die während der Reaktion nicht invertiert werden kann, ohne daß dabei katalytisch inaktive Formen auftreten würden. Dunathans Hypothese ist jedoch durch die Aufklärung einer großen Anzahl Sequenzen und Strukturen nicht mehr zu halten; es gibt verschiedene PLP-abhängige Enzymfamilien mit jeweils unterschiedlichem evolutionären Ursprung.

In der Literatur wurden mehrfach Versuche unternommen, die PLP-Enzyme zu systematisieren. Derzeit werden v.a. zwei Vorschläge zur Klassifizierung diskutiert.

Christen und seine Mitarbeiter schlugen die Einteilung in α -, β - und γ -Familie (Alexander *et al.*, 1994) vor, wie sie in Tabelle 2.1 angegeben ist. Ein Großteil der bekannten PLP-Enzyme wurde dabei der α -Familie zugeordnet, in der u.a. Aminotransferasen, Aminosäure-Decarboxylasen usw. vereint werden.

Tab. 2.1 Einteilung der PLP-Enzyme in α -, β - und γ -Familie nach Alexander *et al.* (1994)

α -Familie	β -Familie	γ -Familie
Aminotransferasen (Untergruppe I, II, und IV)	Threonin Synthase	O-Succinylhomoserinlyase
Aminosäure-Decarboxylase (nur Gruppe II)	Serin Dehydratase	O-Acetylhomoserinlyase
5-Aminolaevulinat-Synthase	Threonin Deaminase	Cystationin γ -Synthase
Serinhydroxyl Methyltransferase	Tryptophan Synthase	Cystationin β -Lyase
Dialkylglycin Decarboxylase	Cystein Synthase	
Tyrosin Phenol-Lyase		

Alle Enzyme einer Familie lassen sich demzufolge von einem „Urprotein“ ableiten. In einer früheren Arbeit (Mehta *et al.*, 1993) fand man bei einem Vergleich von 51 Sequenzen verschiedener Aminotransferasen, daß die Ähnlichkeit zwischen den verschiedenen Aminotransferasen, der größten Gruppe der α -Familie, zu klein ist, um mit den üblichen Standardprogrammen überlagert werden zu können. Statt dessen ließen sich die Sequenzen per Hand über Hydropathieplots und Sekundärstrukturvorhersagen abgleichen, woraufhin Aminotransferasen in 4 Untergruppen (I, II, III, IV) unterteilt wurden. Drei dieser Untergruppen sind relativ eng miteinander verwandt, lediglich Gruppe III (D-Aminosäure

Aminotransferase und *branched-chain* Aminotransferase) steht in keinem evolutionären Verhältnis zu den Übrigen, was auch durch die Strukturanalyse bestätigt werden konnte (Sugio *et al.*, 1995). Das *Alignment* der Gruppen I, II und IV zeigte nur vier konservierte Reste. Nach der Nomenklatur von Aspartat-Aminotransferase (Ford *et al.*, 1980) sind das Asp222, das mit dem Pyridin Stickstoff (N1) interagiert und dessen positive Partialladung stabilisieren hilft, Lys258, an dem der Kofaktor als Schiff-Base gebunden ist, Arg386, das die α -Carboxylatgruppe des Substrats bindet, sowie Gly197, das in einem *Turn* an der Grenzfläche zwischen kleiner und großer Domäne liegt. Innerhalb der gesamten α -Familie sind nur zwei der vier invarianten Transaminasereste konserviert, Asp222 und Lys258. Mechanistisch zeichnet die Enzyme der α -Klasse aus, daß sie nur Reaktionen katalysieren, die sich auf Bindungen an C α des Substrats beschränken.

Enzyme der β - und γ -Familie weisen eine weniger stark ausgeprägte Untergliederung auf und sind auch weniger zahlreich. Sie katalysieren eine kovalente Änderung am C α , gefolgt von einer Modifizierung an C β bzw. C γ . Die β -Familie zeigt keinerlei verwandtschaftliche Beziehung mit einer der anderen beiden Gruppen, jedoch ist die strikte Trennung in α und γ -Familie nicht mehr haltbar, da die Strukturanalyse der Cystathionin β -Lyase (Clausen *et al.*, 1996) klare Homologie zu Enzymen der α -Familie aufweist.

Aufgrund der mittlerweile großen Anzahl aufgeklärter PLP-Enzymstrukturen [Übersicht: John, (1995); Jansonius, (1998); Mehta & Christen, (2000); Schneider *et al.*, (2000)] schlugen Grishin *et al.* (1995) eine andere Einteilung der PLP-Enzyme vor, basierend auf dem Vergleich von Proteinstrukturen, Strukturvorhersagen und Sequenzvergleichen. Sie teilten die PLP-Enzyme in sieben Familien ein, deren herausragendes Klassifizierungsmerkmal der Faltungstyp ist (Tab. 2.2).

Faltungstyp I vereint Enzyme aus der α - und γ -Familie (s.o.) und enthält die meisten Aminotransferasen. Die aktiven Einheiten der Enzyme dieses Typs sind Homodimere, dessen Monomere aus je zwei bis drei Domänen bestehen. Das charakteristische der PLP-Domäne ist dabei ein siebensträngiges β -Faltblatt mit +a -g +f +e +d +b +c Topologie, das zusammen mit den umgebenden *Loops* und acht bis neun Helices fast alle katalytisch wichtigen Reste enthält. Die kleinere, substratbindende C-terminale Domäne hat als zentrales Element ein antiparalleles drei- bzw. viersträngiges β -Faltblatt. Einige Enzyme dieses Faltungstyps haben außerdem eine zusätzliche N-terminale Domäne, die für die Dimerisierung bzw. Substratbindung von Bedeutung ist.

Der Faltungstyp II wird von Tryptophan Synthase (Hyde *et al.*, 1988) repräsentiert und beinhaltet einen großen Teil der β -Enzymfamilie. Die Tryptophan Synthase ist das Dimer eines Heterodimers mit einer nahezu linearen $\alpha\beta\alpha$ -Anordnung. Das PLP wird von der β -Untereinheit gebunden, die aus zwei identischen Domänen mit einem viersträngigen,

antiparallelen β -Faltblatt in der Mitte eines $\alpha\beta\alpha$ -Sandwichs besteht. Der Kofaktor ist an der $\alpha\beta$ -Grenzfläche gebunden und bildet, anders als beim Faltungstyp I, ausschließlich mit einer einzigen Domäne das Aktivzentrum.

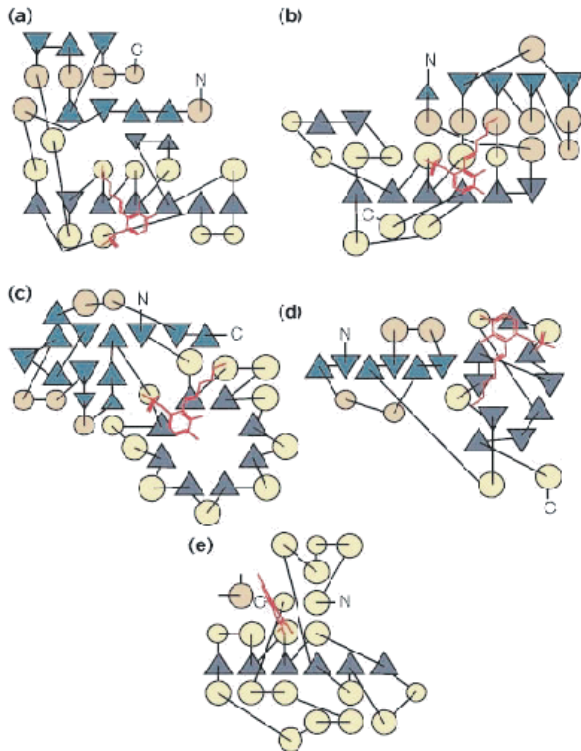


Abb. 2.5

- (a) Faltungstyp I: Diamino-perlagon-säure Synthase
 (b) Faltungstyp II: Tryptophan Synthase
 (c) Faltungstyp III: Alanin Racemase
 (d) Faltungstyp IV: D-Alanin Aminotransferase
 (e) Faltungstyp V: Glycogen Phosphorylase

Farbcode: In den PLP-bindenden Domänen sind β -Faltblätter dunkel blau und α -Helices gelb dargestellt, ansonsten sind β -Faltblätter cyan und α -Helices orange.

Das kovalent an ein Lysin gebundene PLP ist in rot gekennzeichnet.

aus: Schneider et al., 2000

Die Alanin Racemase (Shaw *et al.*, 1997) und eukaryotische Ornithin Decarboxylase (Kern *et al.*, 1999) sind die einzigen Vertreter des Faltungstyps III mit bekannter 3D-Struktur. Enzyme dieser Klasse sind Homodimere, bei der jede Untereinheit aus zwei Domänen aufgebaut ist, einem achtsträngigen $\alpha\beta$ -Barrel und einem zweiten, hauptsächlich aus β -Strängen bestehenden Teil. Das PLP ist in einer Spalte gebunden, die aus den beiden Domänen geformt wird. Der Kofaktor ist hier, anders als bei den Faltungstypen I und II, mit der *re*-Seite zum Protein gebunden.

Der Faltungstyp IV wird von D-Aspartat Aminotransferase (Sugio *et al.*, 1995) und *branched-chain* Aminotransferase (Okada *et al.*, 1997) repräsentiert. Die D-Aspartat Aminotransferase ist als Homodimer mit 65 kDa relativ klein und jede Untereinheit besteht aus einer großen und einer kleinen Domäne. Der Kofaktor ist hier an der hydrophoben Kontaktfläche der beiden Domänen gebunden, ebenfalls mit der *re*-Seite zum Protein.

Der fünfte und letzte Faltungstyp schließlich wird von der Glykogen Phosphorylase (Barford *et al.*, 1991) vertreten, in der das PLP als Säure-Base Katalysator fungiert (s.o.). Succinyldiaminopimelat Aminotransferase und Valin-Pyruvat Aminotransferase lassen sich in keinen der beschriebenen Faltungstypen einordnen und bilden möglicherweise je eine eigene Klasse.

Die Einteilung der PLP-Enzyme in 5 verschiedene Faltungstypen berücksichtigt, anders als die Untergliederung in α -, β - und γ -Familie, nicht die katalysierte Reaktion, sondern die Struktur. Sie ist daher deutlich feiner ausgearbeitet und bei der Deutung der verwandtschaftlichen Beziehungen auch wesentlich erfolgreicher.

Tab. 2.2 Einteilung der PLP-Enzyme in Faltungstypen nach Grishin *et al.* (1995)

Faltungstyp	typische Vertreter
I	Aminotransferase Typ 1, 2, 3 und 5 sowie weitere, nicht zu Aminotransferasen gehörende PLP-Enzyme
II	Tryptophan Synthase und andere
III	Eukaryotische Ornithin Decarboxylase und andere
IV	Aminotransferase Typ 4 und andere
V	Glycogen Phosphorylase
nicht klassifiziert	Succinyldiaminopimelat Aminotransferase
nicht klassifiziert	Valin-pyruvat Aminotransferase

Eine weitere Verfeinerung der Faltungstypenanalyse lieferten Käck *et al.* (1999). Sie unterteilten den Faltungstyp I in sechs verschiedene Unterklassen, ebenfalls basierend auf Struktur- und Sequenzvergleichen (Abb. 2.6).

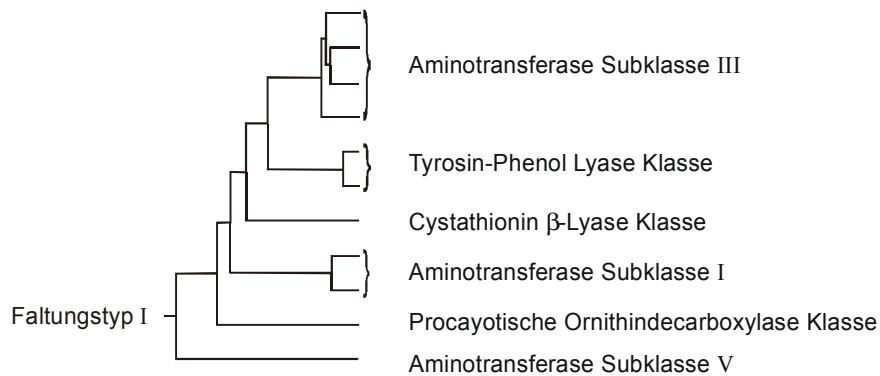


Abb. 2.6
Unterteilung des Faltungstyp I nach Käck *et al.* (1999)

2.3 Threoninbiosynthese

2.3.1 Synthese von Homoserin: Die Vorstufe von Threonin und Methionin

In Pflanzen und Bakterien ist Aspartat die gemeinsame Vorstufe von Threonin, Methionin, Lysin und Isoleucin (Abb. 2.7).

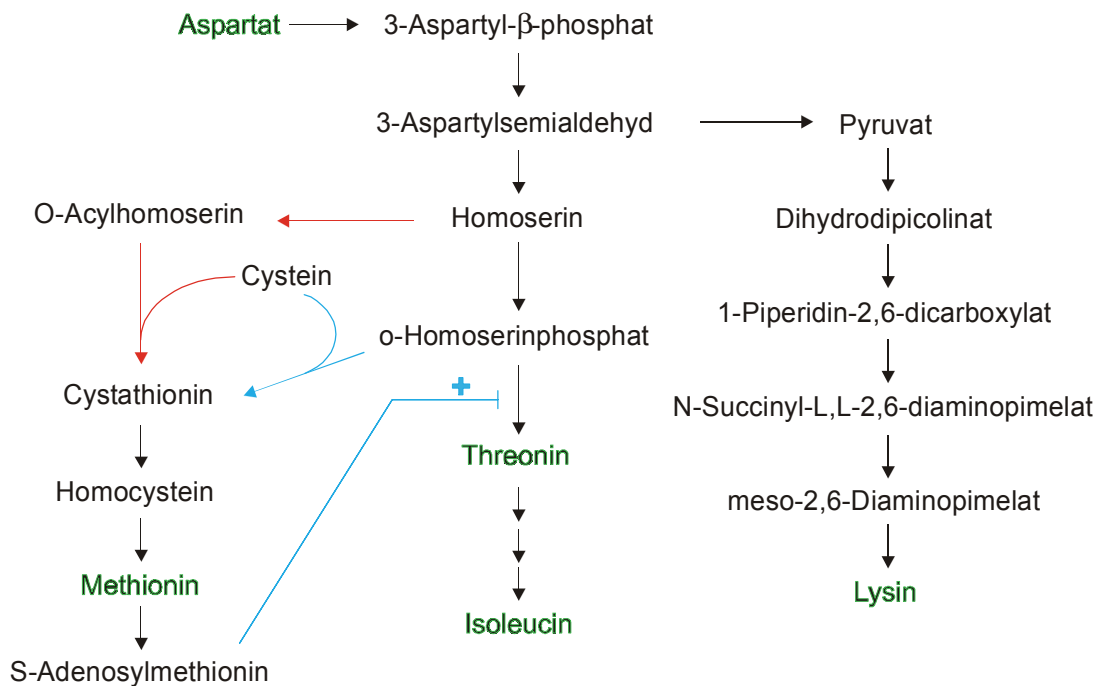


Abb. 2.7

Biosynthese von Threonin, Methionin, Lysin und Isoleucin. Der rot unterlegte Reaktionsweg wird von Bakterien verwendet, der blaue von Pflanzen, bei denen außerdem Threonin Synthese durch SAM allosterisch aktiviert werden kann.

Die Biosynthese dieser vier essentiellen Aminosäuren beginnt mit der durch Aspartokinase katalysierten Phosphorylierung von Aspartat zu Aspartyl-β-phosphat. Obwohl diese einleitende Reaktion für alle vier Endprodukte identisch ist, erfolgt die Regulation der Stoffwechselwege für jede Aminosäure unabhängig voneinander. So sind in *E.coli* drei Isoenzyme der Aspartokinase bekannt, die sowohl eine Rückkopplungs-hemmung der Enzymaktivität als auch eine Repression der Enzymsynthese ermöglichen (Tab. 2.3). Außerdem wird die Richtung des Weges an den Verzweigungen durch die einzelne Aminosäure über Rückkopplungshemmung kontrolliert (*feedback*-Inhibition). So hemmt z.B. Methionin die O-Acylierung von Homoserin oder Lysin die Bildung von Dihydrodipicolinat.

Tab. 2.3 Kontrolle der Isoenzyme der Aspartokinase von *E.coli*

Enzym	Rückkopplungsinhibitor	Corepressor(en) ¹
Aspartokinase I	Threonin	Threonin und Isoleucin
Aspartokinase II	-	Methionin
Aspartokinase III	Lysin	Lysin

¹ Verbindungen, deren Anwesenheit zur Repression der Enzymsynthese führt

Ähnlich agieren auch die zwei bekannten Homoserin Dehydrogenasen (HsDH), die die Reduktion von Aspartatsemialdehyd zu Homoserin katalysieren. Die Aktivität der HsDH I wird durch Threonin inhibiert, ihre Synthese durch Threonin und Isoleucin. Methionin

hingegen reprimiert die Synthese der HsDH II. Die Beteiligung von drei isofunktionellen AspK und zwei HsDH ermöglicht eine sehr effiziente Feinabstimmung der Biosynthese von Threonin, Methionin, Lysin und Isoleucin (Voet & Voet, 1992).

Die katalytischen Aktivitäten der Kinase und der Dehydrogenase sind auf einem bifunktionellen Enzym lokalisiert, das aus drei Domänen aufgebaut ist: dem 27 kDa großen N-terminalen Fragment mit der AspK-Aktivität, der 33 kDa großen C-terminalen Domäne für die Dehydrogenasefunktion sowie einer zentralen Linkerdomäne ohne katalytische Funktion. Beide bisher bekannten AspK-HsDH sind sowohl in ihrer Proteinsequenz als auch in ihrer triglobulären Domänenarchitektur homolog.

2.3.2 Synthese von o-Homoserinphosphat

Die Synthese von o-Homoserinphosphat wird durch die Homoserin Kinase (EC 2.7.1.39) katalysiert (Bender, 1985), einem Homodimer mit einer Masse von ca. 33 kDa pro Untereinheit. Für die katalysierte Reaktion (Homoserin + ATP → o-Homoserinphosphat + ADP) ist, wie bei allen Kinasen, ein zweiwertiges Metallion essentiell. Es gibt auch Hinweise darauf, daß Homoserin Kinase zwei Bindungsstellen für Homoserin besitzt, eine katalytisch aktive und eine inhibierende (Hou & Viola, 1996).

2.3.3 Katabolismus von Threonin

Threonin wird zusammen mit Alanin, Cystein, Glycin, Serin zu Pyruvat abgebaut (Abb. 2.8).

Abb. 2.8

Abbau von Threonin, Alanin, Cystein, Glycin und Serin zu Pyruvat. Die beteiligten Enzyme sind:

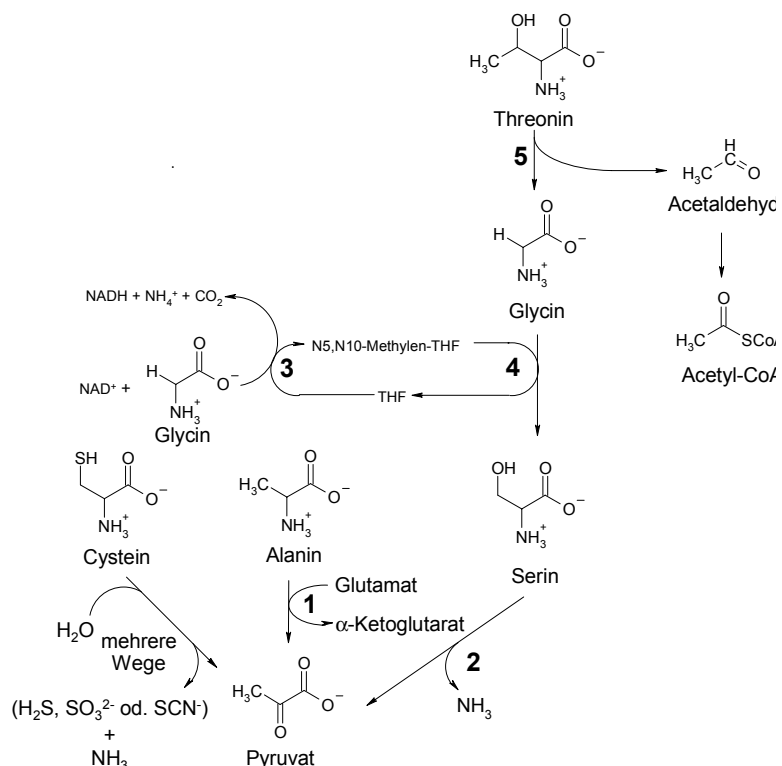
1 Alanin-Aminotransferase

2 Serin-Dehydratase

3 Glycin-Spaltsystem

4 und 5 Serin-

Hydroxymethyltransferase



In einem ersten Schritt spaltet Serin-Hydroxymethyltransferase, ein PLP-abhängiges Enzym, Threonin in Acetyl-CoA und Glycin. Anschließend wandelt das gleiche Enzym Glycin unter Verwendung von N⁵,N¹⁰-Methylen-Tetrahydrofolat in Serin um. Serin wird dann durch die Serin-Dehydratase, ebenfalls ein PLP-abhängiges Enzym, in Aminoacrylat umgesetzt, das tautomerisiert und spontan zum Pyruvat hydrolysiert (Voet & Voet, 1992).

2.3.4 Threonin Synthase

Threonin Synthase (TS, E.C. 4.2.99.2) ist ein PLP-abhängiges Enzym, das den letzten Schritt in der Threonin Biosynthese katalysiert (Abb. 2.9). Dabei wird in einer β,γ -*Replacement* Reaktion o-Homoserinphosphat zu Threonin und anorganischem Phosphat umgesetzt (Watanabe & Shimura, 1956; Wormser & Pardee, 1958; Schnyder *et al.*, 1975).

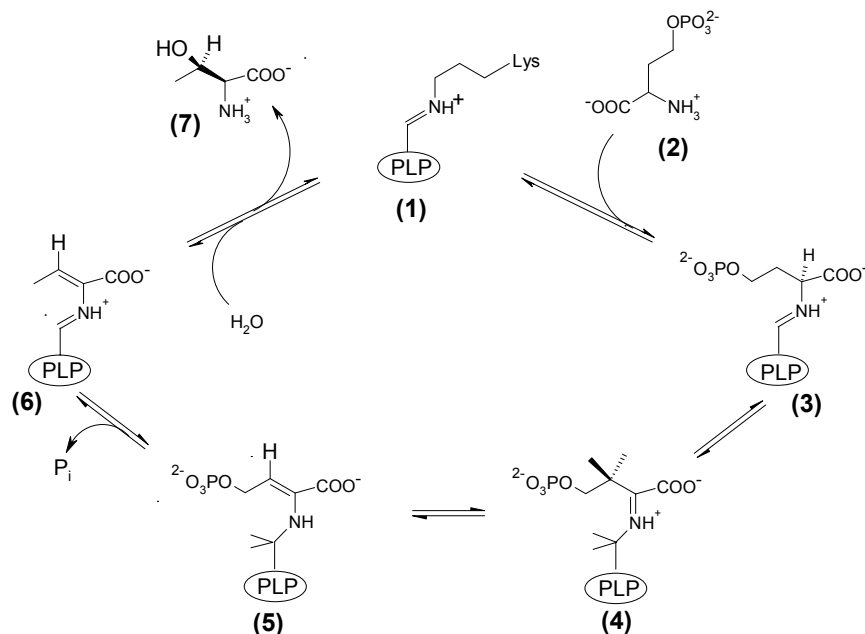


Abb. 2.9
Reaktion Threonin Synthase

Mechanistische Studien haben gezeigt, dass nach der Bildung des externen Aldimins (3) zwischen dem PLP und o-Homoserinphosphat (2) das C α Proton des Substrats auf das C4' des PLP übertragen wird (4) (Fuganti, 1979). Nach der stereospezifischen Abstraktion des β -*pro-S*-Wasserstoffatoms (5) (Fuganti, 1979; Farrington *et al.*, 1993) und der Eliminierung von anorganischem Phosphat (Flavin & Kono, 1960) wird das C γ des Substrats protoniert (6) (Flavin & Slaughter, 1960b). Die Addition von Wasser an C β ergibt schließlich Threonin (7) unter Retention der Konfiguration (Flavin & Kono, 1960; Fuganti, 1979). Abhängig davon, welches Substrat eingesetzt wird, katalysiert TS auch β -Eliminierungen, z.B. von L-Serin zu Pyruvat oder Transaminierungen wie von L-Alanin zu Pyruvat und PMP (Laber *et al.*, 1994a). Auch eine schwache Threonin Deaminaseaktivität wurde berichtet (Skarstedt & Greer,

1973). Trotz der Ähnlichkeit der Reaktion von Threonin Synthase und Cystathionin γ -Synthase (Brzovic *et al.*, 1990) wurde die TS von Alexander *et al.* (1994) zur β -Familie gezählt. Frühere Arbeiten (Parsot, 1986; Parsot, 1987) zeigten bereits eine signifikante Sequenzhomologie zwischen Threonin Synthase, Threonin Deaminase, der β -Untereinheit von Tryptophan Synthase und D-Serin Dehydratase und ließen auf einen gemeinsamen Ursprung dieser vier Enzyme schließen. Die strukturbasierten Einteilungen (Grishin *et al.*, 1995; Christen, 2000) ordnen TS dem Faltungstyp II zu, obwohl bislang keine Struktur dieses Enzyms bekannt ist. Diese Einteilung erfolgte daher für die TS ausschließlich aufgrund von Strukturvorhersagen.

Threonin Synthase ist aus verschiedenen Bakterien und Pilzen gereinigt worden, wie z.B. *Neurospora crassa* (Flavin & Slaughter, 1960a), *Bacillus subtilis* (Skarstedt & Greer, 1973), *Escherichia coli* (Parsot *et al.*, 1983; Shames *et al.*, 1984; Laber *et al.*, 1994b), *Brevibacterium lactofermentum* (Malumbres *et al.*, 1994) oder auch aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Curien *et al.*, 1996, Laber *et al.*, 1999). Aus verschiedenen anderen höheren Pflanzen wurde nur von einer teilweisen Reinigung berichtet (Madison & Thompón, 1976; Thoen *et al.*, 1978; Giovanelli *et al.*, 1984). Die aus Bakterien und Pilzen gereinigten Enzyme haben Massen zwischen 45 und 55 kDa und frühe Arbeiten deuteten darauf hin, daß deren TS in Lösung als Monomer vorkommt (Flavin & Slaughter, 1960a). Die pflanzliche TS aus *A.thaliana* hingegen ist ein Homodimer mit ca. 55 kDa pro Untereinheit (Curien *et al.*, 1996). In allen Enzymen ist ein PLP-Molekül pro Monomer über ein im Aktivzentrum gelegenes Lysin als internes Aldimin gebunden. Dabei deuten Sequenzvergleiche darauf hin, daß PLP im *E.coli*-Enzym an Lys107 gebunden ist (Parsot, 1986; Saito *et al.*, 1993) und im *A.thaliana* Enzym an Lys202 (Curien *et al.*, 1996).

Threonin gehört zur Aspartat-Familie, die auch Methionin, Lysin und Isoleucin beinhaltet (Abb. 2.7). In Pflanzen ist dabei o-Homoserinphosphat die gemeinsame Ausgangssubstanz für die Synthese von Threonin und Methionin (Giovanelli *et al.*, 1980). Eine Überproduktion von Methionin führt zu einem Anstieg der Konzentration von S-Adenosylmethionin (SAM), das jedoch nicht als *feedback*-Inhibitor der Cystathionin- γ -Synthase wirkt (o-Homoserinphosphat \rightarrow Cystathionin, Abb. 2.7, blaue Linie), sondern als allosterischer Aktivator der Threonin Synthase, wodurch vermehrt o-Homoserinphosphat in die Threonin Biosynthese gelangt (Giovanelli *et al.*, 1980). Diese allosterische Aktivierung der Threonin Synthase durch SAM konnte bisher in verschiedenen höheren Pflanzen beobachtet werden (Madison *et al.*, 1976; Thoen *et al.*, 1978; Curien *et al.*, 1998). Detaillierte Studien mit dem *A.thaliana* Enzym konnten zeigen, daß der verlängerte N-Terminus im Pflanzenenzym diese regulatorische Funktion beinhaltet (Curien *et al.*, 1998; Laber *et al.*, 1999). In Bakterien und Pilzen, in denen Homoserin den Verzweigungspunkt in der Threonin/Methionin-Biosynthese darstellt (Abb. 2.7, rote Linie), ist keine allosterische Aktivierung der TS bekannt. Die

Regulierung der Threonin Synthese wird hier vielmehr durch eine *feedback*-Inhibierung der Homoserinkinase (Homoserin → o-Homoserinphosphat) durch Threonin erreicht (Theze *et al.*, 1974; Burr *et al.*, 1976).

Threonin Synthase kommt nur in Bakterien, Pilzen und Pflanzen vor und ist somit ein interessantes Zielmolekül für die Entwicklung neuer antibakterieller Agenzien und Herbizide. Eine Reihe verschiedener o-Homoserinphosphat-Analoga wurde daher auf ihr Inhibierungspotential hin getestet (Farrington *et al.*, 1993; Harde *et al.*, 1994; Laber *et al.*, 1994a, Laber *et al.*, 1999). Auch irreversible Inhibition mit Rhizoctinen und Plumbemicinen (Laber *et al.*, 1994b), zwei Gruppen von Di- bzw. Tripeptiden aus *B.Subtilis* (Rapp *et al.*, 1988), wurde beschrieben.

2.4 Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

2.4.1 Entwicklung der Röntgenkristallographie

Wilhelm Konrad Röntgen legte durch seine Experimente mit Kathodenstrahlen (Röntgen, 1895) und der Entdeckung der nach ihm benannten Röntgenstrahlung die Grundlagen für die Röntgenstrukturanalyse. Die Diffraktion von Röntgenstrahlen an Kristallen konnte erstmals von Laue und seinen Mitarbeitern (Friedrich *et al.*, 1912) gezeigt werden und die erste Röntgenstruktur stellte Bragg (1913) am Beispiel von Natrium- und Kalium-chloridkristallen vor. Proteinkristalle wurden bereits 1840 erwähnt (Hünefeld, 1840), aber erst 1934 wurden die ersten Röntgendiffraktionsbilder eines Proteinkristalls veröffentlicht (Bernal & Crowford, 1934) und nachdem gezeigt werden konnte, daß das Prinzip des isomorphen Ersatzes auch für Proteine gilt (Green *et al.*, 1954; Harker, 1956; Blow & Crick, 1959), wurden als erste Proteinstrukturen Myoglobin (Kendrew *et al.*, 1960) und Hämoglobin (Perutz *et al.*, 1960) gelöst.

Die Proteinstrukturanalyse unterteilt sich in mehrere Schritte:

- Bereitstellung einer ausreichenden Menge an hochreinem Protein
- Suche nach einer geeigneten Kristallisationsbedingung
- Datensammlung und Datenauswertung
- Lösung des Phasenproblems
- Interpretation der Elektronendichtekarte und Verfeinerung des Modells

Durch den in den letzten zehn Jahren erreichten Fortschritt in der Molekularbiologie, den verwendeten Proteinreinigungsmethoden sowie der Entwicklung immer leistungsfähigerer Computer und Meßstationen steigt die Zahl der publizierten Strukturen sehr stark an und die Strukturanalyse entwickelt sich zunehmend zu einer Standardanalyse für die Charakterisierung von Proteinen. Bis zum 23. Januar 2001 waren in der Proteindatenbank in

Brookhaven 13329 freigegebene Proteinstrukturen hinterlegt, davon wurden 83,9 % mit Diffraktionstechniken, 13,8 % mit NMR (Nuclear Magnetic Resonance) und 2,2 % mit theoretischen Methoden bestimmt.

Die große Bedeutung der Proteinstrukturen resultiert aus der Möglichkeit, biochemische Prozesse auf atomarer Ebene zu verstehen, das Bindemotiv mit Hilfe von Protein-Inhibitor-Komplexen zu ergründen und so zu den Zugang zu einem gezielten Wirkstoffscreening mit Hilfe des *Molecular modelling* zu erhalten.

2.4.2 Beugung von Röntgenstrahlung

Trifft Röntgenstrahlung auf einen Kristall, regt ihr oszillierendes elektrisches Feld die Elektronen zu Schwingungen mit gleicher Frequenz an. Die Elektronen wirken als oszillierende Dipole und senden ihrerseits Sekundärstrahlung mit der Frequenz der einfallenden Strahlung aus, die aber um 180° phasenverschoben ist. Diese elastische und kohärente Strahlung (Thomson-Streuung) wird unter Vernachlässigung von Mehrfachstreuung durch die kinematische Streutheorie beschrieben. Aufgrund der Phasenverschiebung der gebeugten Einzelwellen - ausgehend von jedem Punkt endlicher Elektronendichte - summiert sich die Gesamtintensität der resultierenden Sekundärstrahlung aller Elektronen zu Null (destruktive Interferenz), wenn der Gangunterschied nicht ein ganzzahliges Vielfache der Wellenlänge ist (konstruktive Interferenz). Die Beugung von Röntgenstrahlung am Kristallgitter lässt sich nun wie folgt beschreiben.

Das Kristallgitter ergibt sich durch die periodische Wiederholung der Elementarzelle mit den entsprechenden Translationsvektoren. Dieses Gitter wird von Netzebenen durchzogen, die durch ihre Schnittpunkte mit den Achsen der Elementarzelle charakterisiert werden (Miller'sche Indices). Die Ansammlung aller Normalenvektoren dieser Netzebenenenschar bildet das reziproke Gitter. Die reziproken Gittervektoren werden vom Ursprung des reziproken Gitters aus gezeichnet, ihre Länge entspricht dem reziproken Abstand der Ebenen einer Netzebenenenschar. Bei kohärenter Streuung an einer Netzebenenenschar des Gitters tritt unter einem Winkel θ zwischen einfallendem Strahl und Netzebenenenschar konstruktive Interferenz auf, wenn der Gangunterschied zwischen den gebeugten Wellen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist. Das wird durch die Bragg'sche Gleichung beschrieben:

$$2d_{hkl} \sin \Theta = n\lambda \quad \text{d: Netzebenenabstand; n: ganze Zahl; } \lambda: \text{ Wellenlänge}$$

Die Bragg'sche Gleichung lässt sich mit Hilfe der Ewald-Konstruktion (Ewald, 1921) unter Verwendung des reziproken Gitters als Vektordiagramm darstellen (Abb. 2.10). Der Kristall befindet sich dabei im Mittelpunkt der Ewald-Kugel mit dem Radius $1/\lambda$, der Ursprung (U) des reziproken Gitters liegt an dem Punkt auf der Oberfläche der Ewald-Kugel, an dem sie

ein Vektor in Richtung des einfallenden Strahls schneidet. Für jeden Punkt P des reziproken Gitters, der auf der Kugeloberfläche liegt, ist die Reflexionsbedingung erfüllt. Bei einer Rotation des Kristalls dreht sich neben dem Kristallgitter auch das reziproke Gitter, so daß bei verschiedenen Orientierungen unterschiedliche Beugungsbedingungen erfüllt sind.

Die Intensität der gebeugten Strahlung wird vom Inhalt der Elementarzelle bestimmt. Da ein Kristall die Faltung des Elementarzelleninhaltes mit dem dreidimensionalen Gitter darstellt, ergibt sich das Diffraktionsmuster des Molekülkristalls aus dem Produkt der Fourier-Transformation des Zellinhaltes mit dem reziproken Gitter. Dieses Produkt beider

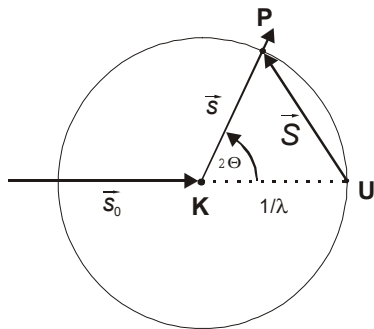


Abb. 2.10 Ewald-Konstruktion

Man konstruiert eine Kugel mit dem Radius $1/\lambda$, in deren Zentrum sich der Kristall K befindet, der Ursprung des reziproken Gitters ist U . Der Wellenvektor \vec{s}_0 zeigt in Richtung des einfallenden Strahls; der unter dem Winkel 2θ gebeugte Strahl wird durch den Wellenvektor \vec{s} dargestellt. Ein reziproker Gittervektor wird durch \vec{S} repräsentiert. P ist der Punkt des reziproken Gitters, für den die Reflexbedingung erfüllt ist.

Transformationen resultiert in einer Abbildung dieser Fourier-Transformation an den reziproken Gitterpunkten, wodurch die Intensität an einem reziproken Gitterpunkt hoch ist, wenn die zugrunde liegende Fourier-Transformation an diesem Punkt eine hohe Intensität besitzt.

Da die Elektronenhülle eines Atoms ein endliches Volumen einnimmt, hängt die gestreute Gesamtwellenlänge vom Einfallswinkel ab. Bei großen Streuwinkeln ist die Phasendifferenz zwischen den Wellen, die an unterschiedlichen Positionen innerhalb der Atomhülle gebeugt werden, ebenfalls hoch, so daß die resultierende Gesamtintensität mit zunehmendem Winkel, also mit steigender Auflösung, abnimmt. Die an einem Atom gestreute Gesamtwellenlänge errechnet sich durch das Aufsummieren aller individuellen Beiträge innerhalb des Atomvolumens:

$$f(\vec{S}) = \int_V \rho(\vec{r}) \exp[2\pi i \vec{r} \cdot \vec{S}] dV$$

Unter der Annahme, daß die Elektronendichte des Atoms kugelsymmetrisch ist, hängt der *atomare Formfaktor* f nur von der Länge des Streuvektors \vec{S} ab, nicht aber von dessen Richtung. Die atomaren Formfaktoren innerhalb einer Elementarzelle mit n Atomen summieren sich unter Multiplikation mit ihrem jeweiligen Phasenwinkel zum Strukturfaktor \vec{F} auf:

$$\vec{F}(\vec{S}) = \sum_{j=1}^n f_j \exp[2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{S}]$$

Dabei gibt der Vektor \vec{r}_j die Position des Atoms j in Fraktionalkoordinaten an.

Analog zur Winkelabhängigkeit der gebeugten Strahlungsintensität im Falle nicht punktförmiger Streuer bewirkt auch die thermische Schwingung von Atomen eine zunehmende destruktive Interferenz der gestreuten Wellen gerade bei großen Streuwinkeln. Deshalb wird der atomare Formfaktor mit einem Temperaturfaktor B multipliziert:

$$T(iso) = \exp\left[-B \frac{\sin^2 \Theta}{\lambda^2}\right]$$

Der Temperaturfaktor ist mit der mittleren quadratischen Auslenkung wie folgt verknüpft:

$$B = 8\pi^2 \cdot \bar{u}^2$$

Zusätzlich zu dieser dynamischen Unordnung gehen in den Temperaturfaktor noch andere Beiträge ein, z. B. statische Unordnung, falsche Datenskalierung, Absorption oder nicht korrekte Kurven für die atomaren Formfaktoren.

Aufgrund der Fehlordnung (Mosaizität) der Kristalle sind die Beugungsreflexe nicht unendlich scharf. Die Netzebenenscharen eines Kristalls befinden sich nur über einem endlichen Winkelbereich in Reflexstellung. Die Gesamtintensität $I(\vec{h})$ eines gebeugten Strahls für einen Kristall, der mit einer gleichförmigen Winkelgeschwindigkeit ω durch die Reflexposition rotiert und sich in einem Röntgenstrahl mit der Intensität des einfallenden Strahls I_0 befindet, ist durch die Darwin Formel beschrieben (Darwin, 1914):

$$I(\vec{h}) = \frac{I_0}{\omega} \lambda^3 \frac{e^4}{m^2 c^4} \frac{1 + \cos^2 2\Theta}{2} \frac{L A V_x}{V^2} \left| \vec{F}(\vec{h}) \right|^2$$

Dabei ist λ die Wellenlänge der Röntgenstrahlung, e die Elementarladung, m die Elektronenmasse und c die Lichtgeschwindigkeit. Der Term $(1 + \cos^2 2\Theta)/2$ stellt den Polarisierungsfaktor dar, der die partielle Polarisierung des gebeugten Strahls für den Bragg-Winkel Θ angibt, wenn der Primärstrahl unpolarisiert ist. L ist der Lorentzfaktor und berücksichtigt die relative Zeit, die jeder Reflex in der Reflexposition verbringt, A ist der Absorptionsfaktor, V_x das Kristallvolumen, V das Volumen der Elementarzelle und $\left| \vec{F}(\vec{h}) \right|$ die Strukturamplitude für den Reflex \vec{h} . Somit ist bei kinematischer Streuung ohne Mehrfachstreuung die Intensität $I(\vec{h})$ des gebeugten Röntgenstrahls proportional zum Amplitudenquadrat des Strukturfaktors $\vec{F}(\vec{h})$.

2.4.3 Berechnung der Elektronendichte

Der Strukturfaktor $\vec{F}(\vec{h})$ ist die Fourier-Transformation der Elektronendichte. Daher lässt sich die Elektronendichte ρ am Ort xyz durch inverse Fourier-Transformation berechnen:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \vec{F}(hkl) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$

Es gilt: $\vec{F}(hkl) = |\vec{F}(hkl)| \exp i\alpha(hkl)$, wobei $\alpha(hkl)$ den Phasenwinkel des Reflexes hkl darstellt. Im Beugungsexperiment erhält man aus den integrierten Intensitäten lediglich die Strukturfaktoramplituden $|\vec{F}(hkl)|$, nicht aber die dazu gehörigen Phasenwinkel, ohne die die Elektronendichte des Moleküls nicht berechnet werden kann.

2.4.4 Lösung des Phasenproblems

Vier verschiedene Methoden stehen zur Lösung des Phasenproblems zur Verfügung:

1. Multipler isomorpher Ersatz (MIR)
2. Multiple anomale Dispersion (MAD)
3. Molekularer Ersatz (MR)
4. Direkte Methoden (DM)

Die wichtigste Methode in der Proteinkristallographie ist derzeit die Methode des isomorphen Schweratomersatzes. Aufgrund des technischen Fortschritts an den Synchrotron-*Beamlines* gewinnt jedoch die MAD-Methode zunehmend an Bedeutung (Hendrickson *et al.*, 1988). Ist die Struktur eines homologen Proteins bekannt, kann diese mit Hilfe der Patterson-Suchmethode (Molekularer Ersatz, MR) unter günstigen Umständen zur anfänglichen Phasenbestimmung herangezogen werden (Hoppe, 1957a; Hoppe, 1957b; Rossmann & Blow, 1962; Huber, 1965). Diese Methode findet vor allem deshalb steigende Anwendung, da eine immer größere Zahl von Proteinstrukturen zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu spielen direkte Methoden in der Proteinstrukturanalyse (Karle, 1989) aufgrund der limitierten Auflösung der Proteinkristalle und der großen Anzahl Atome in der Elementarzelle bislang keine wichtige Rolle. Im folgenden wird auf die MIR und MAD-Methode näher eingegangen, da beide Methoden in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kamen.

2.4.5 Multipler isomorpher Ersatz

Die Methode des multiplen Isomorphen Ersatzes beruht auf einer lokalen Änderung in der Elektronendichteverteilung des Kristalls. Solche Änderungen lassen sich z.B. durch Einlegen des Kristalls in eine Schwermetalllösung (*soaken*) erreichen, bei dem, ohne die kristalline

Ordnung zu zerstören, die Schwermetallverbindungen mit dem Protein (funktionelle Gruppen der Aminosäuren oder Liganden) reagieren oder auch durch Verwenden von derivatisierten Inhibitoren oder Substraten (kokristallisieren oder *soaken*). Die Positionen der Schweratome werden durch Differenz-Patterson-Funktionen aus Derivat und nativem Kristall berechnet. Die Patterson-Funktion (Patterson, 1934) ist eine Fourier-Summation aus den Quadraten der Strukturfaktoramplituden (den experimentell zugänglichen Intensitäten) ohne Phasenkomponente.

$$P(uvw) = \frac{2}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)|^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw)$$

Diese Patterson-Funktion beinhaltet die interatomaren Abstandsvektoren. Der Strukturfaktor des Schweratomderivats \vec{F}_{PH} ergibt sich aus der Summe der Strukturfaktoren des nativen Proteins und der gebundenen Schweratome:

$$\vec{F}_{PH} = \vec{F}_P + \vec{F}_H$$

Nach der Verfeinerung der Schweratomparameter lassen sich aus den so bestimmten \vec{F}_H über die Harker-Konstruktion (Abb. 2.11) die Proteinphasen berechnen.

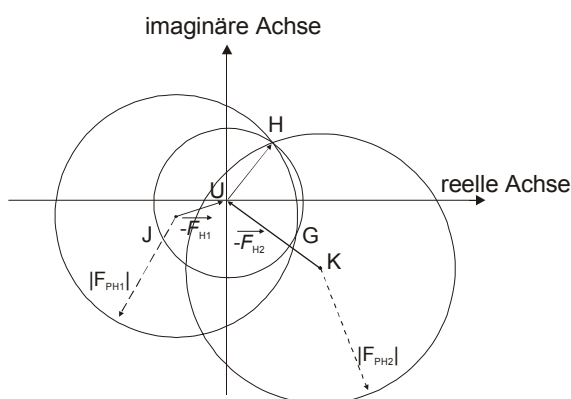


Abb. 2.11 Harker-Diagramm

Für jeden Reflex wird um den Ursprung U ein Kreis mit dem Radius $|\vec{F}_p|$ gezeichnet und um $-\vec{F}_{H1}$ versetzt ein weiterer Kreis mit dem Radius $|\vec{F}_{PH1}|$. Dadurch ergeben sich zwei mögliche Werte für die Proteinphase α_p , bedingt durch die zwei Schnittpunkte beider Kreise (H und G). Erst ein weiteres, unabhängiges Derivat löst diese Doppeldeutigkeit auf. Am gemeinsamen Schnittpunkt aller drei Kreise (H) ergibt sich die Proteinphase eindeutig.

Mit einem einzigen Derivat (SIR, Single Isomorphous Replacement) können die Phasen i.d.R. nicht eindeutig bestimmt werden, es sei denn, man kann sie durch zusätzliche Informationen verbessern. Neben Elektronendichtemanipulationen, die auf dem hohen Solvensgehalt von Proteinkristallen beruhen oder auf Statistikanalyse, ist vor allem bei Anwesenheit von nicht-kristallographischer Symmetrie (NCS, Non-Cystallographic Symmetry) das Mitteln der Elektronendichte zu nennen. Ohne solche speziellen Methoden lassen sich Proteinphasen erst mit Hilfe mindestens eines zusätzlichen Derivates eindeutig bestimmen; in der Praxis jedoch werden, aufgrund der Qualität der Derivate, meist mehrere unabhängige Derivatdatensätze benötigt.

2.4.6 Multiple anomale Dispersion

Die MAD-Methode kann als besondere Form des Isomorphen Ersatzes betrachtet werden. Grundvoraussetzung ist das Vorhandensein anomal streuender Atome im Kristall, die entweder natürlich vorkommen (z.B. Eisenatome in Häm enthaltenen Proteinen), beim MIR-Experiment als Schweratomderivat präpariert werden oder, wie in dieser Arbeit, durch Anzucht auf Selenomethionin-haltigem Minimalmedium ins Protein eingeführt werden (Budisa *et al.*, 1995; Doublé, 1997). Der atomare Formfaktor eines anomal streuenden Atoms $f_{anom.}$ setzt sich aus einem Wellenlängen abhängigen Anteil $f(\lambda)$ und einem unabhängigen Anteil f_0 zusammen. Die Wellenlängen abhängigen Anteile führen aufgrund der Absorptionseffekte sowohl zu einer Verringerung der Streukraft ($f'(\lambda) < 0$) als auch zu einer Phasenverschiebung ($if''(\lambda)$).

$$f_{anom.} = f_0 + f(\lambda) = f_0 + f'(\lambda) + if''(\lambda)$$

Sowohl die dispersive Differenz, die auf unterschiedlichen Werten von $f'(\lambda)$ bei verschiedenen Wellenlängen beruht (realer Streubeitrag), als auch die anomale Differenz, die in Abhängigkeit von $if''(\lambda)$ die Friedel-Symmetrie innerhalb eines Datensatzes aufhebt ($\vec{F}_{hkl} \neq \vec{F}_{-h-k-l}$), sind proportional zu den Strukturfaktoramplituden des Schweratom-Teilmodells. Mit diesen Differenzen läßt sich das Teilmodell eindeutig lösen und, da beide Terme orthogonal zueinander stehen, auch das Phasenproblem. Zur Maximierung der beiden Differenzen wird ein Datensatz bei maximalem f'' , einer bei maximalem f' und ein dritter Datensatz bei einer von der Absorptionskante weit entfernten Wellenlänge, bei der f' minimal ist und so die Maximierung der dispersiven Differenz erlaubt, gemessen.

Ein besonderer Vorteil der MAD-Phasierung ist die ideale Isomorphie der Datensätze, da sie mit demselben Kristall gemessen werden. Dies führt zu einer sehr genauen Bestimmung der Phasen, obwohl die anomalen und dispersiven Differenzen sehr klein sind. Ein weiterer Vorteil ist die Auflösungsabhängigkeit der Wellenlängen abhängigen und unabhängigen Anteile des atomaren Streufaktors. Während f_0 alle Elektronen des anomalen Streuers einbezieht und so eine „normale“ Abnahme der Streukraft mit der Auflösung zeigt, tragen zu den von der Wellenlänge abhängigen Termen $f'(\lambda)$ und $f''(\lambda)$ nur die inneren Elektronen bei. Der relative Beitrag dieser von der Wellenlänge abhängigen Terme und damit die Qualität der Phasenbestimmung (*phasing power*) nimmt bei höherer Auflösung zu, während beim Isomorphen Ersatz aufgrund der nie gegebenen 100% Isomorphie der Beitrag zur Phasenbestimmung bei höherer Auflösung abnimmt. In der Praxis lassen sich sinnvolle

Phasen mit der MIR-Methode meist nur bis 3 Å berechnen, während bei der MAD-Methode die Streukraft der Kristalle das Limit stellen.

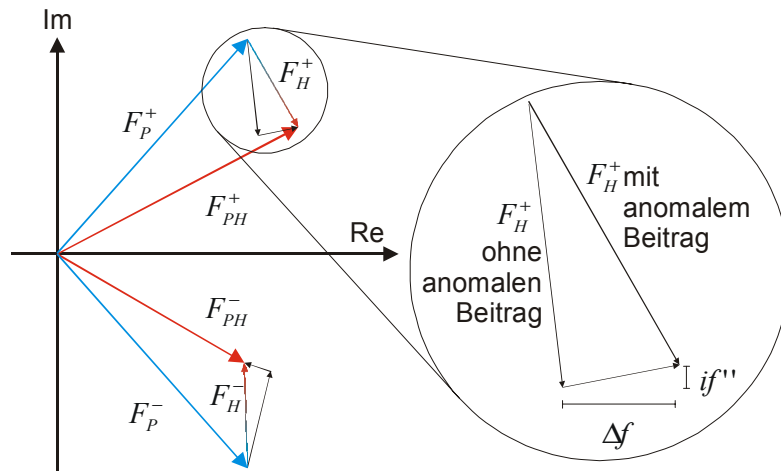


Abb. 2.12

Bei der MIR wird der Strukturfaktor F_H^+ des Schweratoms zum Strukturfaktor F_P^+ des Proteins dazu addiert und ergibt den kombinierten Strukturfaktor F_{PH}^+ . Das Gleiche gilt für den Friedel-Partner, der somit bis auf das Vorzeichen identisch ist. Im anomalen Fall kommt ein weiterer Schweratombeitrag hinzu, der sich in einen realen Δf und einen imaginären if'' aufspalten läßt, womit die Friedelpaare nicht mehr identisch sind. Bei selendotierten Proteinen kann nur dieser Shift benutzt werden, da der anomale Streuer Teil des Proteins ist (Drenth, 1994).

Als Einschränkungen der Methode sind anzuführen, daß eine Röntgenquelle mit frei wählbarer Wellenlänge, also Synchrotronstrahlung, benötigt wird und daß meist geeignete Cryobedingungen zum Einfrieren der Kristalle erforderlich sind, da Synchrotronstrahlung eine sehr hohe Intensität besitzt und nicht gefrorene Proteinkristalle dadurch i.d.R. innerhalb kurzer Zeit zerstört werden.

2.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, das PLP-abhängige Enzym Threonin Synthase aus den Organismen *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* und *Thermotoga maritima* zu klonieren, zu reinigen und zu charakterisieren. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Hefe-Enzyms sollte nach gezielter Dotierung des Proteins mit Selenomethionin in einem MAD-Experiment erfolgen. Von großer Bedeutung war dabei die Aufklärung der atomaren Struktur des Aktivzentrums. Basierend auf der Struktur der TS aus Hefe sollte daran anschließend der Reaktionsmechanismus auf atomarer Ebene erklärt werden können. Dazu sollten durch Energieminimierung des Enzym/Substrat-Komplexes die an der Reaktion beteiligten Aminosäuren des aktiven Zentrums identifiziert werden. Ein Sequenzvergleich mit insgesamt 30 Threonin Synthasen sollte des weiteren Klarheit bringen über mögliche neue Einteilungen innerhalb dieser Klasse von PLP Enzymen.

3 Experimenteller Teil

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Bakterien und Plasmide

Folgende *E.coli* Stämme und Plasmide wurden bei den molekularbiologischen Arbeiten sowie der Proteinexpression verwendet:

E.coli DH5 α (Hanahan, 1983)

Genotyp: $\phi 80dlacZ\Delta M15$ *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17*(r_K⁻,m_K⁺) *supE44 relA1 deoR*
 $\Delta(lacZYA-argF)U169$
(Promega, Mannheim)

E.coli BL21(DE3) (Studier & Moffatt, 1986, Studier *et al.*, 1990, Studier, 1991)

Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻) *gal dcm* (DE3)
(Novagen, Inc., Madison, Wisconsin, USA)

E.coli BL21(DE3) pLysS (Studier & Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990; Studier, 1991)

Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cm^R)
(Novagen, Inc., Madison, Wisconsin, USA)

E.coli B834 (DE3)

Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻) *gal dcm met* (DE3)
(Novagen, Inc., Madison, Wisconsin, USA)

E.coli JM103

(erhalten von Dr. Bernd Laber, Agrevo AG, Frankfurt)

pET22b(+) (Studier *et al.*, 1990; Studier, 1991)

(Stratagene, Heidelberg)

pET23(+); (erhalten von Dr. Bernd Laber, Agrevo AG, Frankfurt)

pDR 540; (erhalten von Dr. Bernd Laber, Agrevo AG, Frankfurt)

3.1.2 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim), Fermentas (St. Leon-Rot) sowie New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Alkalische Phosphatase aus Kälbermagen wurde von Boehringer Mannheim und T4-DNA-Ligase von New England Biolabs gekauft. Taq-DNA-Polymerase wurde von Perkin-Elmer (Weiterstadt) bezogen.

3.1.3 Oligonukleotide für die PCR

Die aufgeführten HPLC-gereinigten Oligonukleotide (Abteilung für Nukleotidsynthese des Genzentrums der LMU München) wurden als Primer zur Amplifizierung des Gens der Threonin Synthase aus *Thermotoga maritima* eingesetzt. Es wurden, Nco I und Xho I-Restriktionsschnittstellen eingefügt, um eine gerichtete Ligation der Gene in den pET22b(+) Vektor zu ermöglichen. Die Restriktionsschnittstellen sind in der Nukleotidsequenz unterstrichen.

Tryp_prime_forward:

5'-CCT GAA TTC CAT GGA AAA CTT TAA ACA TCT CCC TGA ACC-3'

Tryp_prime_reverse:

3'-GCC TAC TCG AGC TAT TAA ACT TCT TTA AGT TTT GCG GTG AAG TG-5'

3.1.4 Präparationskits

JETsorb DNA Extraction from Agarose Gels (Genomed, Bad Oeyenhausen)

Qiagen Plasmid-Kits (Qiagen, Hilden)

Qiaex (Qiagen, Hilden)

3.1.5 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Hampton Research (Laguna Hills ,USA), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) in p.A. Qualität bezogen.

3.1.6 Geräte

Tab. 3.1 Auflistung der verwendeten Geräte

Abimed/Gilson (Langenfeld)	Schlauchpumpe Miniplus3, Pipetten P2, P20, P100, P1000
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	ÄKTAexplorer und SMART-Chromatographiesystem, Sephadex Gelfiltrationssäulen (NAP5, NAP10 und PD10), Flachbettstreifer REC 102, PhastSystem, Fraktionssammler 211 Multirac, Uvicord SII, Powersupply ECPS 3000/150, DEAE-Sepharose FF, Phenylsepharose HP, Q-Sepharose HP, Sephacryl S-200 HR
Amicon (Beverly, MA, USA)	Ultrafiltrationszelle und -membranen sowie Centriprep- und Centricon-Ultrafiltrationsröhrchen
Beckman (München)	Kühlzentrifugen J2-21 mit Rotoren JA-10 und JA20, J-GM/E mit dem Rotor JS 4.2 sowie J-25 mit dem Rotor 25.50, Spektrophotometer DU 7500, Pipettierroboter Biomek 1000
Biomol (Hamburg)	IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid)
BioRad (Richmond, California, USA)	Model1420 A Power Supply, Semidry blot Apparatur
Bio-Tek Instruments Srl (Mailand, Italien)	Spektrophotometer UVICORN 943
Biozym (Hessisch Oldendorf)	0,2 ml Reaktionsgefäße für die PCR
Branson (Danbury, UK)	Sonifier 250
B.Braun (Melsungen)	Inkubationsschüttelschrank KF4
Charles Supper Company (Nattick, MA, USA)	MVD/24 <i>Crystal Growth Chamber (CrysChem)</i>
Difco Laboratories (Deroit, Michigan, USA)	Bacto-Agar, Hefe-Extrakt und Bacto-Trypton
Eppendorf - Netheler - Hinz (Hamburg)	Eppendorf Reaktionsgefäße 3810 (Fassungsvermögen 1,5 ml und 2 ml), Tischzentrifuge Centrifuge 5403, Research-Pipetten 10, 20, 100, 1000 μ l
Greiner und Söhne (Frickhausen)	Petriplatten
Havard-Dental-GmbH (Berlin)	Dentalwachs
Heraeus (Hanau)	Sterilbank LaminAir HB 2448
ICN Biomedicals (Aurora, Ohio, USA)	Linbro tissue culture plates
Infors AG (Bottmingen, Schweiz)	Schüttelinkubator RFK-125
Jobin Yvon (Longjumeau, Frankreich)	Mark-IV Spektropolarimeter
Knauer (Berlin)	UV/VIS Filter Photometer
MarResearch (Hamburg)	Imageplate
Medizin und Labortechnik KG Fritz	Autoklav GVA 570
Gössen (Hamburg)	
Mettler-Toledo (Greifensee, Schweiz)	Feinwaage HL 52
Millipore GmbH (Eschborn)	PVDF-Membran, Sterilfilter als Spritzenaufsätze, Millex-HA Sterilfilter
W. Müller (Berlin)	Mark-Röhrchen für röntgenographische Aufnahmen
Oxford Cryosystem(Oxford, England)	Oxford Cryosystem
Perkin Elmer (Überlingen)	UV/VIS Spektrometer PE Lambda 17
QIAGEN	Plato 3000 Pipettierroboter
Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)	pH-Meter pHM 210
Rigaku (Tokyo, Japan)	Röntgenerators RTP300
Roth (Karlsruhe)	Spektropor Dialyseschläuche
Satorius AG (Göttingen)	Laborwaage LC2200S
Stratagene (Heidelberg)	Gelscanner EagleEye, Robocycler Gradient 96
Werkstatt MPI (Martinsried)	Gelelektrophoresekammer, Säulenkörper

Zur Datenverarbeitung aller Art wurden *Server* und *Workstations* der Firmen *DIGITAL* (VAXstation 4000 60, DEC Alpha 3000-300, 500), *SILICON GRAPHICS* (IndigoExtreme, O2), *IBM*, *EVANS & SUTHERLAND*, *SUN* und *CRAY* sowie *IBM-kompatible Personal Computer* eingesetzt.

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit Bakterien

Bei allen Arbeiten mit Bakterien wurde sorgfältig auf die Sterilität der Arbeitsgeräte und Medien geachtet, um Kontaminationen durch andere Bakterienstämme, Phagen oder Pilze zu vermeiden. Alle Medien, Lösungen und Arbeitsgeräte wurden autoklaviert, nicht autoklavierbare Lösungen sterilfiltriert. Es wurden, soweit nicht anders vermerkt, alle Arbeiten nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

3.2.1.1 Plattenkulturen

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) wurde mit 15 g/l Agar versetzt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 45°C wurde Ampicillin bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben und ca. 6 mm hoch in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Platten offen in der Sterilbank getrocknet und bei 4°C für maximal 8 Wochen gelagert. Das Ausplattieren von Glycerinkulturen und von Einzelkolonien anderer LB-Kulturen erfolgte mit einer sterilen Impföse; bei Flüssigkulturen wurden 5 bis 200 µl Bakterienkultur auf die Platte pipettiert und mit einem Drygalski-Spatel ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und luftdicht bei 4°C gelagert.

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl werden auf 1000 ml mit dest. Wasser aufgefüllt und autoklaviert.

3.2.1.2 Flüssigkulturen

Zur Plasmidpräparation wurden 5 bis 100 ml große Kulturen (Falcon-Röhrchen bzw. 500 ml Schikanekolben) verwendet, für Proteinexpressionen 5 bis 12 l Kulturvolumen (2 l Schikanekolben à 500 ml), die mit Übernachtskulturen im Verhältnis 1:100 bis 1:1000 angeimpft wurden; Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) wurde unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.

3.2.1.3 Glycerinkulturen

Zur Herstellung wurde 1 ml einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Bakterienkultur abzentrifugiert, in 200 µl frischem LB-Medium inkl. Ampicillin (100 µg/ml) resuspendiert, mit 200 µl einer 50 %igen Glycerinlösung vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gelagert wurden diese Kulturen bei -70°C.

3.2.1.4 Fermentation von *E.coli*

Transformationskompetente *E.coli* Zellen wurden mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert und als Vorkultur in ca. 100 ml LB-Medium inkl. Ampicillin (100 µg/ml) bei 37°C über Nacht angezogen. Zum Animpfen der Hauptkultur wurden 1 bis 5 ml Vorkultur verwendet. Die Proteinexpression wurde bei Erreichen einer OD₆₀₀ von ≈0,7 durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Kulturen wurden daraufhin 4 bis 6 Stunden weiter bei 37°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (4000 g, 30 min, 4°C). Das Pellet wurde in 5 ml Aufschlußpuffer pro 1000 ml Expressionskultur resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.2.1.5 Selenomethionin-Expression (Budisa *et al.*, 1995; Pieper *et al.*, 1997; Doublet, 1997)

Für die Selenomethionin-Expression wurden Methionin auxotrophe *E.coli* B834 Zellen verwendet. Die Vorkultur wurde wie beschrieben angezogen, abzentrifugiert und in 11 ml NMM-Medium (New minimal medium) resuspendiert. Die 10 l Hauptkultur (20 Kolben à 500 ml) wurde dann mit je 1 ml angeimpft und wie oben beschrieben weiter behandelt.

NMM-Medium:	740 ml H ₂ O (autoklaviert in 2 l Schikanekolben), 100 ml Salzlösung, 100 ml Aminosäurelösung I, 60 ml Seleno-DL-Methioninlösung (Endkonz. = 0,3 mM), 1 ml Ampicillinlösung (100 mg/ml)
Spurenelementlösung:	5µl MnCl ₂ (10 mg/ml), 5 µl CuSO ₄ ·5H ₂ O (10 mg/ml), 5 µl Na ₂ MoO ₄ (10 mg/ml), 5µl ZnSO ₄ (10 mg/ml) mit H ₂ O auf 50 ml auffüllen
Aminosäurelösung I:	274 ml H ₂ O, 476 ml 1 M K ₂ HPO ₄ , 220 ml 1 M KH ₂ PO ₄ , 0,5 g jeder Aminosäure (außer Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin), 30 ml Aminosäurelösung II
Aminosäurelösung II:	je 0,5 g Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, 28,5 ml H ₂ O, 1,5 ml 32% HCl
Salzlösung:	75 ml 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 17 ml 5 M NaCl, 10 ml 1 M MgSO ₄ , 200 ml 1 M Glucose, 10 ml CaSO ₄ ·2H ₂ O (1 mg/ml), 10 ml Spurenelementlösung, 10 ml Thiaminlösung (10 mg/ml), 10 ml Biotin (10 mg/ml), 10 ml (NH ₄)Fe(II)SO ₄ ·6H ₂ O (1 mg/ml), 648 ml H ₂ O

3.2.1.6 Herstellung transformationskompetenter *E.coli* Zellen

Kompetente Zellen für die Hitzeschock-Methode:

Zur Herstellung von transformationskompetenten Bakterien wurden 50 ml LB-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt, bis die OD₆₀₀ ≈0,5 betrug, auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (4000 g, 5 min, 4°C). Nach Resuspendieren des Bakterienpellets in 20 ml eiskaltem TFB I (Transforming Buffer I) und weiteren 5 min auf Eis wurde erneut abzentrifugiert, mit 2 ml eiskaltem TFB II resuspendiert und aliquotiert (100 µl/Eppendorf-Reaktionsgefäß) und bei -70°C gelagert.

TFB I: 30 mM Kaliumacetat pH 5,8; 150 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % (v/v) Glycerin

TFB II: 10 mM PIPES/KOH pH 6,5; 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% (v/v) Glycerin

Kompetente Zellen für die Elektroporation (Calvin und Hanawalt, 1988):

500 ml SOB-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und nach Erreichen einer OD_{600} von $\approx 0,5$ abzentrifugiert, zweimal in 5 ml eiskaltem WB-Puffer resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in 2 ml 10% (v/v) Glycerin (steril) aufgenommen und in 100 μ l Aliquots bei -70°C gelagert.

SOB-Medium: 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,584 g NaCl, 0,186 g KCl, auf 1000 ml auffüllen

3.2.1.7 Transformation kompetenter *E.coli* Zellen

Hitzeschock-Methode: 100 μ l transformationskompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit ca. 1 μ g Plasmid-DNA versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann für 45 sec auf 42°C erwärmt, 15 Minuten auf Eis gekühlt, mit ca. 800 μ l LB-Medium versetzt und für 1 Stunde bei 37°C im Thermoblock geschüttelt. Die Bakterien wurden entweder auf einer Agarplatte ausplattiert oder direkt für eine Vorkultur verwendet.

Elektroporation: 100 μ l elektrokompente Zellen und eine salzfreie Plasmidlösung (ca. 1 μ g) wurden in eine BioRad Mikropulsküvette gegeben und für 3,6 sec in einem Elektroporator (Stratagene, Heidelberg) bei 1600 V elektroporiert. Im Anschluß wurden ca. 800 μ l LB-Medium zugegeben und wie oben beschrieben weitergearbeitet.

3.2.2 Arbeiten mit DNA

3.2.2.1 Agarose Gelelektrophorese

Zum Gießen eines Agarosegels wurden 0,8-1,2 % (w/v) Agarose in kochendem TBE (analytische Gele) oder TAE (präparative Gele) gelöst. Nach Abkühlen auf $\approx 50^{\circ}\text{C}$ wurde eine Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) zu 0,5 μ g/ml hinzugefügt und in eine horizontale Gelapparatur (7 x 8 cm, 1 cm Höhe bzw. 20 x 13 cm bei 1,5 cm Höhe) gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde die Elektrophorese bei konstanter Spannung (50 bzw. 100 V) mit TBE bzw. TAE als Elektrodenpuffer durchgeführt, wobei die Proben vor dem Auftrag mit einem sechstel ihres Volumen mit DNA-Probenpuffer versetzt wurden. Bei Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) konnte die Lage der DNA-Banden durch die Fluoreszenz des in die DNA-Doppelhelix interkalierten Ethidiumbromids detektiert werden.

TAE-Lösung: 40mM Tris/Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA

TBE-Lösung: 90 mM Tris/ Borsäure pH 8,0; 2 mM EDTA

DNA-Probenpuffer (6x): 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol; 30 % (v/v) Glycerin

DNA-Marker: Lambda DNA/Eco911 (BstEII)

3.2.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des *QIAEX-Kits* (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die gewünschte DNA-Bande wurde aus einem TAE-Agarosegel ausgeschnitten und mit dem Solubilisierungspuffer *QX1* resuspendiert (300 µl/100 mg Agarose). Nach Zugabe von 10 µl *QIAEX*-Suspension und 15 µl 500 mM Tris/HCl pH 7,0 pro 100 mg Agarose wurde die Suspension 10 min bei 50°C inkubiert und mehrfach gemischt. Nach Zentrifugation (10.000 g, RT, 1 min) wurde das Pellet je einmal mit Puffer *QX2* und *QX3* gewaschen, kurz an Luft getrocknet und die DNA mit 20 µl *TE*-Puffer extrahiert.

Puffer *QX1*: 10 mM Tris/HCl pH 7,0; 3 M NaI, 4 M NaClO₄, 10 mM NaS₂O₃

Puffer *QX2*: 10 mM Tris/HCl pH 7,0; 8 M NaClO₄

Puffer *QX3*: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 70 % (v/v) Ethanol, 100 mM NaCl

Puffer *TE*: 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA

3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit erfolgte UV-spektroskopisch (UV/VIS Spektrometer PE Lambda 17, Perkin Elmer, Überlingen). Dabei entspricht einer Absorption₂₆₀ von 1 ca. 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml ssDNA (Sambrook *et al.*, 1989). Der Quotient aus A_{260}/A_{280} wird als Maß für die Reinheit der DNA verwendet und liegt für "saubere" DNA bei 1,8 - 2.

3.2.2.4 Isolierung von Plasmiden aus *E.coli*

Die Reinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde je nach Kulturvolumen mit Hilfe des *Qiagen Plasmid Mini, Midi* oder *Maxi Kits* durchgeführt. Die drei *Kits* unterscheiden sich lediglich in den Volumina der eingesetzten Puffer und der Säulengröße. Die Bakterien einer 1/20/100 ml LB-Übernachtskultur wurden geerntet und mit NaOH/SDS lysiert. Das Bakterienpellet wurde dann in 0,6/4/10 ml gekühltem *P1*-Puffer resuspendiert, mit 0,6/4/10 ml *P2*-Puffer versetzt und 5 min bei 25°C inkubiert. Das resultierende Lysat wurde durch Zugabe von 0,5/4/10 ml *P3*-Puffer neutralisiert und 10 min auf Eis gestellt. Durch Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 30 min) kann die lösliche DNA von der chromosomalen *E.coli*-DNA abgetrennt werden, da letztere durch schnelles Neutralisieren zusammen mit den Zellfragmenten präzipitiert. Der Überstand wurde auf eine mit 1/4/10 ml *QBT*-Puffer äquilibrierte *Qiagen-tip* 20/100/500 Säule aufgetragen. Es wurde zweimal mit 1/10/30 ml *QC*-Puffer gewaschen, wodurch nukleinsäurebindende Proteine entfernt werden. Die Elution des Plasmids erfolgte mit 0,8/5/15 ml *QF*-Puffer. Die so erhaltene DNA wurde durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens Isopropanol bei 25°C präzipitiert, abzentrifugiert (15.000 g, 4°C, 30

min), mit 1/5/15 ml gekühltem Ethanol/Wasser (7:3 v/v) entsalzt und gewaschen, kurz an Luft getrocknet, in 70 µl TE-Puffer oder sterilem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Ausbeute betrug ca. 4 µg Plasmid-DNA/ml LB-Kultur.

- Puffer *P1*: 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
- Puffer *P2*: 200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS
- Puffer *P3*: 3 M Kaliumacetat pH 5,5
- Puffer *QBT*: 50 mM MOPS/NaOH pH 7,0; 750 mM NaCl, 15% (v/v) Ethanol; 0,15 % (v/v) Triton X-100
- Puffer *QC*: 50 mM MOPS/NaOH pH 7,0; 1 M NaCl, 15% (v/v) Ethanol
- Puffer *QF*: 50 mM MOPS/NaOH pH 8,2; 1,2 M NaCl, 15% (v/v) Ethanol
- Puffer *TE*: 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1mM EDTA

3.2.2.5 Verdau der DNA durch Restriktionsendonucleasen

Zur Charakterisierung von DNA oder zur Konstruktion von Plasmiden wurden Restriktionsverdau durchgeföhrt. Für analytische Zwecke wurden 0,4 bis 1,0 µg, für präparative bis zu 15 µg DNA mit 3-8 U Restriktionsenzym/µg DNA, 1/10 Endvolumen des vom Hersteller empfohlenen 10x Puffers und sterilem H₂O_{milliQ} für 1,5 - 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Probenvolumen betrug bei Einzelverdau ca. 20 µl, bei Doppelverdau 30µl und bei präparativen Versuchen 50 µl. Die Restriktionsverdau wurden anschließend über Agarose-Gele elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Um zwei DNA-Fragmente kovalent zu verbinden, müssen mit Hilfe einer Ligase Phosphodiesterbindungen geknüpft werden, da das 5'-Ende eine freie Phosphatgruppe trägt. Ein typischer Ligationsansatz sah wie folgt aus:

- 100 ng linearisierte Vektor-DNA
- X ng Insert-DNA (molares Verhältnis Insert : Vektor: 3 - 5 : 1)
- 2 µl 10x Ligationspuffer
- 1 µl T4 DNA-Ligase (400U/µl) mit H₂O_{milliQ} auf 20 µl auffüllen.

Um die gepaarten Enden identischer DNA-Fragmente zu trennen, wurde jeder Ligationsansatz vor Zugabe der Ligase für 3 min bei 45°C inkubiert und anschließend auf Eis abgeköhlt. Die Ligation wurde über Nacht bei ca. 16°C durchgeföhrt.

3.2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR, nach Mullis & Falcoona, 1987)

Zur Amplifizierung chromosomaler DNA wurde die PCR-Methode angewendet. Ein typischer Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

- 1 µl DNA (≈200 ng)
- 5 µl 10x Pfu-Polymerase Puffer
- 5 µl NTP's (2,5 mM pro Nukleotid)
- 1 µl Primer 1 (pro 100 pmol)
- 1 µl Primer 2 (pro 100 pmol)
- 36 µl H₂O_{milliQ}
- 1 µl Pfu-Polymerase
mit 40 µl Mineralöl überschichtet

Die PCR der TS aus *Thermotoga maritima* wurde in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß (Biozym, Hessisch Oldendorf) mit dem *RoboCycler Gradient 96* (Stratagene, Heidelberg) wie folgt durchgeführt:

- 4,0 min 95°C, 1 min 50°C, 2 min 72°C erster Zyklus
- 0,5 min 95°C, 1 min 50°C, 2 min 72°C 30 Zyklen
- 0,5 min 95°C, 1 min 50°C, 10 min 72°C letzter Zyklus

Alle Ansätze wurden im Agarosegel auf Reinheit geprüft und mit *Qiaquick*-Säulen gereinigt.

3.2.2.8 DNA-Sequenzierung mit Hilfe der PCR

Bei dieser Variante der Didesoxy-Sequenzierung nach Sanger (1977) wurden fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphate als Kettenabbruchreagenzien eingesetzt. 0,5 µg doppelsträngige Plasmid-DNA wurde mit ca. 3,2 pmol Sequenzierprimer und 4 µl PRISM *Ready Reaction DyeDesoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* (Terminator-Premix) versetzt, mit H₂O_{milliQ} auf 10 µl aufgefüllt und mit 10 µl Mineralöl überschichtet. Der Terminator-Premix (Perkin Elmer, Langen) enthielt optimierte Konzentrationen an dNTPs, 168,4 mM Tris/HCl pH 9,0; 4,2 mM (NH₄)₂SO₄; 42,1 mM MgCl₂; 0,42 U/µl AmpliTag DNA-Polymerase sowie optimierte Konzentrationen an mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleotiden zur Detektion des entsprechenden Abbruchnukleotids. Die lineare Amplifizierung der dann mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotid endenden verlängerten Primern erfolgte mit Hilfe eines PCR analogen Temperaturprogramms (30 sec 96°C, 30 sec 50°C, 4 min 60°C, 25 Zyklen; *RoboCycler Gradient 96*, Statagene, Heidelberg). Da G-C-Paarungen besonders stabile Sekundärstrukturen ausbilden, die im Gel häufig zu komprimierten Banden führen, wurde dITP statt dGTP im Terminator-Premix verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden mit *Micro-Spin S-200*-Säulen (Pharmacia, Freiburg) aufgereinigt, mit Ethanol gefällt und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese, Detektion und Auswertung der Fluoreszenzsignale wurden in einem DNA-Sequenator (Modell 373, Applied Biosystems, Forster City, USA) durchgeführt.

3.2.3 Arbeiten mit Proteinen

3.2.3.1 Zellaufschluß

Die tiefgefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei ca. 30°C aufgetaut und in einem Rosettengefäß mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Sonifier W-250) unter Eiskühlung aufgeschlossen (*Output-Control* 8, 50% gepulst, 5 min). Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (50000 g, 4°C, 30 min) von der cytosolischen Fraktion getrennt und der Aufschluß ein zweites Mal mit auf 10 min ausgedehnter Aufschlußzeit durchgeführt.

3.2.3.2 Hitzedenaturierung

Für die Hitzedenaturierung des Rohextrakts wurde dieser in 50 ml *Falcons* gefüllt und für 30 min in ein auf 90°C erhitztes Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Gefäße in einem Eisbad in ca. 5-10 min auf Raumtemperatur abgekühlt und das denaturierte Protein abzentrifugiert (3500g, 15 min, 4°C).

3.2.3.3 Ionenchromatographie (IC)

In der Ionenchromatographie werden die Proteine entsprechend ihrer Nettoladung am Ionentauscher gebunden und können dann durch Änderung des pH-Wertes oder der Salzkonzentration (Gradient- oder Stufenelution) vom Säulenmaterial eluiert werden. Es wurde DEAE Sepharose FF sowie Q-Sepharose (beides Amersham Pharmacia, Freiburg) verwendet.

3.2.3.4 Hydroxylapatit (HA)

Beim Hydroxylapatit interagieren die Aminogruppen des Proteins elektrostatisch mit den Phosphatgruppen, die Carboxygruppen des Proteins werden von den Calciumionen komplexiert. Basische und saure Proteine werden also unterschiedlich aufgetrennt. Durch einen aufsteigenden Phosphat- bzw. Ca^{2+} oder Mg^{2+} -Gradienten lassen sich so saure bzw. basische Proteine eluieren. Verwendet wurde HTP Hydroxylapatit (BioRad, München).

3.2.3.5 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die HIC arbeitet nach dem gleichen Prinzip wie die IC, jedoch werden die Proteine hier aufgrund ihrer Hydrophobizität getrennt. In der Regel wird eine absteigende Salzgradientelution verwendet. Zur Anwendung kam Phenyl Sepharose HP *Fast Flow* (Amersham Pharmacia, Freiburg).

3.2.3.6 Gelfiltration (SEC)

Die Gelfiltration bietet die Möglichkeit, Moleküle aufgrund ihrer Größe (genauer: ihres Stoke'schen Radius) zu trennen. So lassen sich z.B. Proteinlösungen mittels Gelfiltration entsalzen oder Proteingemische trennen. Verwendung fand Sephacryl S-200 HR (Amersham Pharmacia, Freiburg).

In Tab. 3.2 sind schematisch die chromatographischen Reinigungsschritte skizziert.

Alle chromatographischen Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt und durch Beobachtung der Absorption bei 280 nm sowie SDS-PAGE kontrolliert. Die Proteinlösungen wurden, wenn nötig, mittels Ultrafiltration an semipermeablen Membranen aufkonzentriert, wobei in Abhängigkeit vom zu konzentrierenden Volumen Amicon-Zellen, Centriprep- bzw. Centriconkonzentratoren zum Einsatz kamen. Die Lagerung der gereinigten Proteine erfolgte im Gelfiltrationspuffer; Aliquote à 50 µl wurden mit einer Konzentration zwischen 20-50 mg/ml in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei ca. -75°C gelagert.

3.2.3.7 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung wurde nach der Methode von Edmann (Edmann, 1970) durchgeführt, bei der in mehreren Zyklen Phenylisothiocyanat elektrophil an den N-Terminus addiert, unter sauren Bedingungen als Phenylthiohydantion abgespalten und mittels HPLC detektiert wird. Zur Bestimmung des N-Terminus konnte das gereinigte Protein nach ca. 15 min Dialyse gegen Wasser direkt eingesetzt werden.

3.2.3.8 Proteinkonzentrationsbestimmung (nach Bradford, 1976)

Bei dieser Methode wird die Bildung eines stabilen Komplexes zwischen den Sulfonsäuregruppen des Coomassiefarbstoffes und den basischen Aminosäureseitenketten des Proteins zur spektroskopischen Detektion bei 595 nm ausgenutzt.

Für die Konzentrationsbestimmung wurden 10 µl Probe mit 990 µl Bradfordlösung gemischt, 10 Minuten inkubiert und die Absorption bei 595 nm bestimmt; der Nullwert ergibt sich durch die Messung von 10 µl Wasser statt Protein. Die Eichung der Bradfordlösung wurde mit BSA bei verschiedenen Konzentrationen (4; 2; 1; 0,7; 0,5; 0,3; 0,1 mg/ml) durchgeführt.

Bradfordlösung: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml Ethanol, 100 ml 85% Phosphorsäure, auf 1 Liter mit dest. Wasser auffüllen

	TSH	TSA	TSTM
DEAE-Sepharose (5x20 cm) 4 ml/min	0,1 M KP _i pH 7,5 2 mM EDTA 10 µM PLP	0,1 M HEPES/NaOH pH 7,8 2 mM EDTA 10 µM PLP Gradient: 0 - 0,4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2x500 ml	Hitzefällung (90°C, 30 min) 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,8 2 mM EDTA 10 µM PLP Gradient: 0 - 0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2x500 ml
Hydroxylapatit (2,5x15 cm) 2 ml/min		0,1 M HEPES/ NaOH pH 7,8 10 µM PLP Gradient: 0 – 0,1 M KP _i 2x250 ml	
Phenyl-Sepharose (2,0x10 cm) 2 ml/min	0,1 M Tris/HCl pH 7,5 1,3 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 10 µM PLP Gradient: 1,3 - 0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2x150 ml	0,1 M HEPES/NaOH pH 7,8 1,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 10 µM PLP Gradient: 1,0 - 0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2x150 ml	0,1 M HEPES/NaOH pH 8,3 0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 10 µM PLP Gradient: 0,5 - 0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2x150 ml
	Dialyse gegen Auftragspuffer	1:10 verdünnen	
Q-Sepharose (2,0x15 cm) 3 ml/min	0,05 M Tris/HCl pH 8,0 10 µM PLP Gradient: 0 - 0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2x150 ml	0,1 M HEPES/NaOH pH 7,8 10 µM PLP Gradient: 0 - 0,25 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 2x150 ml	
Gelfiltration S200 (1,5x90 cm) 1 ml/min	0,01 M Tris/HCl pH 7,5 10 µM PLP	0,01 M HEPES/NaOH pH 7,8 10 µM PLP	0,01 M HEPES/NaOH pH 7,8 10 µM PLP

Tab. 3.2 Schematische Darstellung der Reinigungsschritte

3.2.3.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)

Es wurden 5%ige Sammelgele und 12%ige Trenngele auf ca. 8,5 x 8 cm² mit einer Stärke von 1 mm verwendet, die zu je 8 Stück in einer Gießkammer gegossen wurden (Eigenbau MPI für Biochemie, Martinsried).

Trenngel (12%ig): 36 ml Wasser; 36 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30% / 0,8%; 17 ml 2 M Tris/HCl pH 8,8; 9 ml 10% SDS; 134 µl Ammoniumpersulfatlösung (0,36 g / 3 ml Wasser); 44 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin)

Sammelgel (5%ig): 36 ml Wasser; 7,5 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8; 10 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30% / 0,8%; 0,6 ml 10% (w/v) SDS; 300 µl Ammoniumpersulfatlösung (0,36 g / 3 ml Wasser); 100 µl TEMED

Auftragspuffer: 100 mM Tris/HCl pH 6,8; 5% Mercaptoethanol; 4% (w/v) SDS; 0,2% (w/v) Bromphenolblau; 20% (v/v) Glycerin

Laufpuffer: 200 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1 % (w/v) SDS

Entwicklerlösung: 630 ml Ethanol; 15 ml Essigsäure_{konz} und 1,4 g Comassie Brilliant Blue R 250 auf 2 l mit Wasser auffüllen

Entfärberlösung: 400 ml Essigsäure_{konz} und 1,25 l Ethanol auf 5 l mit Wasser auffüllen

Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, ca. 3 min bei 90-100°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Im Sammelgel wurden 90 V, im Trenngel 120 V Spannung angelegt. Die Entwicklung der Gele erfolgte nach Zehr (1989) durch Einlegen in ca. 20 ml Entwicklerlösung, kurzem Erwärmen in der Mikrowelle und ca. 30 minütigem Schwenken bei Raumtemperatur. Zum Entfärben wird das Gel in Entfärberlösung bei Raumtemperatur geschwenkt, die mehrfach erneuert wird.

3.2.3.10 Massenbestimmung von Proteinen

In Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen drei Methoden zur Massenbestimmung von Proteinen zum Einsatz:

SDS-Gelelektrophorese: Dabei wird mit Hilfe von Markerproteinen die elektrophile Beweglichkeit R_f gegen den dekadischen Logarithmus der Molekularmasse aufgetragen und durch lineare Regression verbunden. Die Masse des interessierenden Proteins wird durch den Vergleich mit der Eichgeraden ermittelt.

Gelfiltration: Das Molekulargewicht der Enzyme wurde über eine Eichgerade mit Kalibrierungsproteinen bestimmt, wobei der Logarithmus des Molekulargewichts gegen K_{av} aufgetragen wird (Andrews, 1970).

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0) \quad V_e: \text{Elutionsvolumen des Proteins}$$

V_0 : Totvolumen der Säule

V_t : Bettvolumen der Säule

Massenspektrometrie: Bei der eingesetzten Elektrospray-Massenspektrometrie wird die gegen Wasser dialysierte Probe in einer Atmosphärendruckionenquelle zerstäubt und durch ein anliegendes elektrisches Potential elektrisch geladen. Nach Desolvatisierung der Probenmoleküle werden diese in ein Hochvakuum extrahiert und nach ihrem Masse/Ladung Quotienten getrennt (Schröder, 1991).

3.2.3.11 Western-Blot

Die in einem SDS-PAGE Gel aufgetrennten Proteine wurden in einer *Semi-Dry* Blot Apparatur (BioRad, München) „geblotet“ (Towbin *et al.*, 1979; Symington *et al.*, 1981). Ausgehend von der unten liegenden Anode wurden nacheinander folgende Schichten übereinander gelegt:

- 6 Lagen Filterpapier (3MM, Whatman) getränkt mit Anodenpuffer I
- 3 Lagen Filterpapier (3MM, Whatman) getränkt mit Anodenpuffer II
- 1 Lage PVDF-Membran (Millipore, je ca. 5 min in 60% Methanol und Wasser gewaschen)
- das Gel
- 6 Lagen Filterpapier (3MM, Whatman) getränkt mit Kathodenpuffer

Nach Abdecken mit der Kathode wurden die Proteine ca. 1,5 Stunden bei einem Stromfluß von 50 mA (ca. 0,8 mA/cm² Gelfläche) auf die PVDF-Membran immobilisiert. Die Membran wurde anschließend für 5 min in Wasser geschwenkt, 5-10 min in Färbelösung gefärbt und mit der Entfärbelösung entfärbt.

Anodenpuffer I:	300 mM Tris pH ~10,4; 20 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer II:	25 mM Tris pH ~10; 20 % (v/v) Methanol
Kathodenpuffer:	25 mM Tris pH ~10; 40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % (v/v) Methanol
Färbelösung:	0,1 % Coomassie R250, 50 % (v/v) Methanol
Entfärbelösung:	50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

3.2.3.12 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die IEF wurde mit dem PhastSystem von Amersham Pharmacia unter Verwendung von Fertiggelen durchgeführt (PhastGel IEF 3-9, Amersham Pharmacia). Das gereinigte und gegen Wasser dialysierte Protein wurde mit einem Fertiggamm (Pharmacia) auf das Gel aufgetragen und mit dem IEF Programm (bis 90 VAh Fokussierung, Auftrag, Entwicklung bis ca. 300 VAh) aufgetrennt. Markerproteine *Broad pI Kit* (Amersham Pharmacia, Freiburg) halfen bei der Abschätzung des pI.

3.2.4 Röntgenstrukturanalytische Arbeiten

3.2.4.1 Kristallisation

Die Kristallisation von Proteinen erfolgt durch langsame Konzentrationsänderungen der Präzipitanz-, Salz- oder Proteinlösungen (Übersicht: Blundell & Johnson, 1976; McPherson 1976, 1982, 1985; Drenth, 1994). Zur Kristallisation wird über einem Reservoir mit definierter Pufferkonzentration ein proteinhaltiger Tropfen (mit möglichst geringer Pufferkonzentration) positioniert und mit einer definierten Menge Reservoirpuffer vermischt. In einem geschlossenen System gleicht sich durch Dampfdiffusion die Konzentration der einzelnen Komponenten in dem vorgelegten, viel kleineren proteinhaltigen Tropfen der des Reservoirs an. Der Tropfen kann sowohl über der Pufferlösung hängen (*hanging drop*) als auch auf einem Bänkchen abgesetzt sein (*sitting drop*). Durch den Pufferkonzentrationsausgleich konzentriert sich die Proteinlösung an und es kann zur Keimbildung kommen, die letztlich zur Kristallisation des Proteins führt. Durch *Microseeding*, bei dem kleine Kriställchen in den Tropfen eingebracht werden, indem mit einem Kaninchentasthaar ein bereits vorhandener Kristall gestreift und anschließend durch die Proteintropfen gezogen wird, kann die Kristallbildung z.T. erst ermöglicht werden. Dabei muß ein geeigneter Zeitpunkt gefunden werden, wann ein *Microseeding* sinnvoll ist.

Die Kristallisationsansätze erfolgten in *Linbro*-Zellkulturplatten (ICN, Eschwege) mit hängendem Tropfen, in Kristallisationsplatten (*CrysChem*, Charles Supper Company, USA) mit sitzendem Tropfen oder in Kunststoffschalen (7,5 cm Durchmesser, 3 cm hoch) ebenfalls mit sitzendem Tropfen. Dafür wurden entsprechende Volumina Proteinlösung in *CrysChem*-Platten, auf einem silikonisierten Deckgläschen für *Linbro*-Platten oder auf einem mit Silikonfett eingeriebenen Plastikbänkchen vorgelegt, entsprechende Volumina Reservoirlösung zupipettiert und luftdicht verschlossen. Die Reservoirvolumina betragen für *CrysChem*-Platten 0,5 ml, für *Linbro*-Platten 1 ml und für Kunststoffschalen 5 ml.

Für die breit angelegte Suche nach neuen Kristallisationsbedingungen wurden die Prinzipien des *sparse matrix sampling* (Carter & Carter, 1979; Jancarik & Kim, 1991) verwendet. Hierbei wird eine faktorielle Suche durchgeführt, um möglichst weit gestreute Stichproben aus dem vieldimensionalen Raum der Kristallisationsbedingungen zu nehmen. Zur Anwendung kamen die *CrystalScreens* I + II sowie *AdditiveScreen* I-IV (Hampton Research, USA). Außerdem wurden *House Factorials* verwendet, eine im Haus zusammengestellte Puffermischung (s. Anhang). Zusätzlich wurden verschiedene Fällungsmittel (PEG 4.000, 8.000, 20.000, PEG_{Monometylenether} 2.000, (NH₄)₂SO₄, Phosphat) bei systematischer pH-Variation (4-9) getestet. Alle Versuche wurden sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4°C durchgeführt.

3.2.4.2 Datensammlung

Zur Messung von Diffraktionsdaten wurden Kristalle in silanisierten Quarzkapillaren (Mark-Röhrchen für röntgenographische Aufnahmen, W. Müller, Berlin) mit einem Innendurchmesser von 0,7 bzw. 1 mm montiert. Zur Silanisierung wurden die Kapillaren ca. 5 Minuten in eine 2%ige $\text{Cl}_2\text{Me}_2\text{Si}$ -Lösung getaucht, mit Ethanol gespült und über Nacht bei 60°C getrocknet. Mit Hilfe einer Pipette wurden die Kristalle in die Kapillare gesaugt und mit feinschnittenem Filterpapier (3MM, Whatman) getrocknet. Die beiden Enden der Kapillare wurden mit Dentalwachs (Harvard Dental GmbH, Berlin) verschlossen. Zuvor wurde ein Ende der Kapillare wieder mit Reservoirolösung gefüllt, um ein Austrocknen des Kristalls zu verhindern. Alternativ wurden die Kristalle in einem *Cryo-Loop* (Hampton Research, USA) aufgenommen, kurz in einen Cryo-Puffer eingelegt und zügig auf einer Imageplate montiert. Der Kristall lag dabei in einem Stickstoffstrom, der eine konstante Temperatur von 90 – 100 K hatte. Das Einfrieren der Kristalle minimierte die Strahlenschäden drastisch, der Cryo-Puffer verhinderte die Eisbildung (die zu Eisringen im Beugungsbild führt), indem er glasartig im Stickstoffstrom erstarrt. Die so montierten Kristalle wurden auf einer *Imageplate* (MarResearch, Hamburg) vermessen. Bei diesem Detektorsystem werden die Röntgenquanten als latente Bilder auf einer Platte gespeichert, die mit einer $150\ \mu\text{m}$ dicken Schicht aus Barium/Europium-Halogeniden ($\text{BaFBr:Eu}^{2+}\text{Eu-X}$) belegt ist. Auf diese Schicht einfallende Röntgenquanten erzeugen metastabile Zustände angeregter Elektronen, sogenannte Farbzentren. Die Elektronen können durch auftreffende Teilchen einer Energie von mindestens 6eV angeregt werden. Induziert durch He-Ne-Laserstrahlung können diese angeregten Elektronen unter Abgabe elektromagnetischer Strahlung im blauen Spektralbereich (4eV) in ihren Grundzustand zurückkehren. Die Intensität der emittierten Lichtquanten im blauen Spektralbereich ist proportional zu der Menge absorbierter Röntgenquanten. Die Lumineszenzstrahlung wird von einem Photomultiplier aufgenommen. Das Auslesen der Platte erfolgt spiralförmig, wobei die Auslesezeit je Pixel (1 Pixel = $150 \times 150\ \mu\text{m}^2$) über den gesamten Plattenbereich konstant bleibt. Die Intensität und die in das kartesische Koordinatensystem transformierten Koordinaten der ausgelesenen Pixel werden abgespeichert. Die Datensätze wurden am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried mit Graphit-monochromatisierter Cu-K_α -Strahlung ($\lambda=1.5418\ \text{\AA}$) von einem Rigaku RU200 Röntgendrehanodengenerator (Rigaku, Tokyo, Japan; maximale Leistung 50 KV, 100 mA) auf einer *Imageplate* aufgenommen. Während der Belichtungszeit von 15-30 min und einem Kristall-Detektor-Abstand von 200-300 mm wurden die Kristalle um 1° gedreht.

An der Beamline BW6 (einer Röntgen-Wiggler-Beamline des Hamburger Synchrotronlabors HASYLAB am Deutschen Elektronensynchrotron DESY) wurden die Datensätze für die MAD-Experimente mit einem CCD-Detektorsystem bzw. mit einer *Imageplate* (beides: MarResearch, Hamburg) und $0,3^\circ$ bzw. 1° Winkelinkrementen aufgenommen. Die

Temperatur der Kristalle betrug während der Messung an der BW6 100 K (Oxford Cryosystem, Oxford, England).

3.2.4.3 Datenauswertung

Die Bestimmung der Kristallorientierung, der Raumgruppe, der Elementarzelle, des optimalen Rotationssegments und die Datenreduktion erfolgten mit zwei verschiedenen Programmpaketen: Die MAD-Daten wurden mit dem HKL Programmpaket DENZO und SCALEPACK (Version 1.9.1; Otwinoski & Minor, 1996), die nativen Daten mit MOSFLM (Version 5.41 bis 6.00; Leslie, 1994) und SCALA (Collaborative Computational Project Number4, CCP4-Suite, 1994) ausgewertet. Es wurden Reflexe mit $I < 2\sigma(I)$ verworfen. Das Hauptkriterium für die Qualität eines Datensatzes ist der R_{sym} :

$$R_{sym} = \frac{\sum_h \sum_i |I(h,i) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I(h,i)}$$

mit $I(h,i)$ als Intensität einer einzelnen Messung des Reflexes (hkl) und $\langle I(h) \rangle$ als mittlere Intensität eines Reflexes (hkl). R_{sym} -Werte kleiner als 10% wurden akzeptiert.

3.2.4.4 Selen-Lagen und Mittelung im direkten Raum

Die dispersiven und anomalen *Difference Patterson Maps* wurden aus den prozessierten MAD-Daten mit FFT (CCP4-Suite, 1994) berechnet. Die zwölf Selen-Lagen der asymmetrischen Einheit konnten mit Hilfe des Programms RSPS (CCP4-Suite, 1994) bestimmt und mit MLPHARE (CCP4-Suite, 1994) verfeinert werden. Mit SHARP (La Fortelle *et al.*, 1997) wurden diese Lagen weiter verfeinert und initiale Proteinphasen berechnet. Nach einem *solvent flattening* mit SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) und zweifachem Mitteln mit AVE (Kleywegt, 1996; Kleywegt & Read, 1997) unter Verwendung eines *ncs*-Operators, berechnet aus den zwölf Selen-Lagen mit FINDNCS (CCP4-Suite, 1994; Lu, 1997), wurde eine Dichte generiert, in die ein fast vollständiges Poly-Alanin Modell gebaut werden konnte.

3.2.4.5 Modellbau und Strukturverfeinerung

Atomare Modelle wurden auf einer Graphik *Workstation* (Octane) der Firma Silicon Graphics mit dem Programm O (Version 6.2.2.; Jones *et al.*, 1991; Jones & Kjeldgaard, 1991) in die Elektronendichte eingepaßt. Diese Modelle wurden mit dem Programm CNS (Version 0.9; Brünger *et al.*, 1998) nach der *conjugate gradient* Methode verfeinert. Als Zielfunktion wurde der kristallographische *R-Faktor* minimiert, wobei geometrische Parameter für Proteine

(Engh & Huber, 1991) berücksichtigt wurden, da die Zahl der Observablen im Verhältnis zur Anzahl der verfeinerten Parameter in der Proteinkristallographie im allgemeinen nicht ausreichend überbestimmt ist. Das Gewichtsverhältnis zwischen kristallographischem und geometrischen Term wurde zu Beginn der Verfeinerung bestimmt und mit fortschreitender Qualität des Modells schrittweise erhöht. Um ein objektives Kriterium für den Erfolg der Verfeinerungsmethoden zu haben, wurden 5% der Reflexe zufällig ausgewählt und als Testset nicht in die Verfeinerungsrechnung einbezogen (Brünger, 1992). Der aus dem Testset berechnete freie R -Faktor, der nicht mehr als 6% über dem kristallographischen liegen sollte, warnt dabei vor einer Überverfeinerung des Modells. Im Anschluß an die Koordinatenverfeinerung wurden individuelle Temperaturfaktoren verfeinert. Dabei wurden zu Beginn für direkt verknüpfte Atome (1-2 Paare) und für über einen Winkel verknüpfte Atome (1-3 Paare) jeweils für Haupt- und Seitenkette folgende Einschränkungen auferlegt: Die Zielwerte der Standardabweichung betragen $1,5 \sigma$ (Hauptkette) und $2,0 \sigma$ (Seitenkette) für 1-2 Paare, sowie $2,0 \sigma$ (Hauptkette) und $2,5 \sigma$ (Seitenkette) für 1-3 Paare.

Die nichtkristallographische Symmetrie (NCS) wurde zu Beginn mit Einschränkungen der Positionen und Temperaturfaktoren für lokal symmetrieäquivalente Atome berücksichtigt. Zum Ende der Verfeinerung wurden alle diese Einschränkungen fallengelassen.

3.2.4.6 Geometrische Analyse

Die statistische Analyse der Bindungslängen und -winkel sowie der Temperaturfaktoren der atomaren Modelle wurde mit dem Programm CNS (Version 0.9; Brünger *et al.*, 1998) durchgeführt. Weitergehende Analysen der Molekülgeometrie, insbesondere die Erstellung von Ramachandran-Plots (Ramachandran & Sasisekharan, 1968), wurden mit dem Programm PROCHECK (Version 2.0; Laskowski *et al.*, 1993) vorgenommen.

3.2.4.7 Graphische Darstellung

Zur graphischen Darstellung wurden die Programme MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), BOBSCRIPT (Esnouf, 1997) SETOR (Evans, 1993) und RASTER3D (Bacon & Anderson, 1988) benutzt.

3.2.4.8 Energieminimierung

Die Energieminimierung wurde mit dem Programmpaket ÍNSIGHT II (Version 97.0, MSI, Los Angeles, USA) und den Modulen *Viewer*, *Builder*, *Docking*, *Delphi* und *Discover3* durchgeführt. Als Startpunkt für die Energieminimierung wurde ein Monomer der verfeinerten Struktur ausgewählt. Das Substrat der TSH, o-Homoserinphosphat, wurde zusammen mit dem PLP als externes Aldimin erzeugt und in der aktiven Tasche des Enzyms plaziert, wobei

die Orientierung ähnlich der im Komplex von AVG (Aminoethoxyvinylglycin) mit Cystationin β -Lyase (Clausen *et al.*, 1997) war. Für die Energieminimierung kam die *Consistent Valance Forcefield* (CVFF) Methode von INSIGHT II im Modul *Discover3* zur Anwendung und wurde über 1000 Schritte bis zur Konvergenz (0,1 kcal/mol Toleranz) verwendet, wobei Monomer und Ligand simultan minimiert wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Threonin Synthase aus *Saccharomyces cerevisiae*

4.1.1 Klonierung

Threonin Synthase aus Hefe (TSH) wurde von der Firma Agrevo in einem pDR 540 Vektor im *E.coli* Stamm JM 103 überlassen. Zur Anzucht auf Selen-Minimal-Medium wurde das *THR4*-Gen (Aas & Rognes, 1990) in einen pET22(+) Vektor umkloniert und *E.coli* BL21 (DE3) oder B834 (DE3) Zellen transformiert.

4.1.2 Expression und Reinigung

TS aus Hefe wurde in einer 10 L *E.coli* Kultur mit einer Induktionszeit von 4 Stunden exprimiert. Nach dem Zellaufschluß wurde das Protein wie in Tab. 3.2 beschrieben zu elektrophoretischer Homogenität aufgereinigt. Die Abb. 4.1 bis 4.4 zeigen die chromatographischen Reinigungsschritte, die nacheinander zum Einsatz kamen, Abb. 4.5 das Reinigungsgel und Tab. 4.1 die typische Ausbeute. Die Aufreinigung von SeMet (mit Selenomethionin dotiertem Protein) und nativem Material war identisch, die Ausbeute für SeMet-Protein betrug jedoch nur etwa ein Drittel des nativen Materials. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden durch SDS-PAGE verfolgt und entsprechend dem Reinheitsgrad der einzelnen Fraktionen gepoolt.

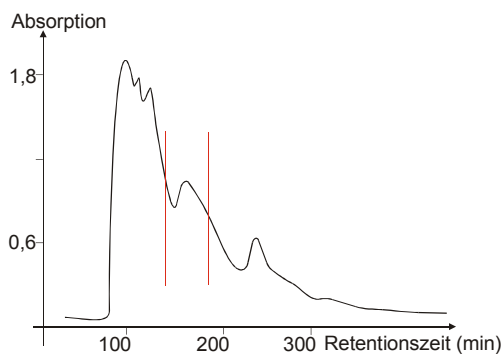


Abb. 4.1 DEAE-Säule

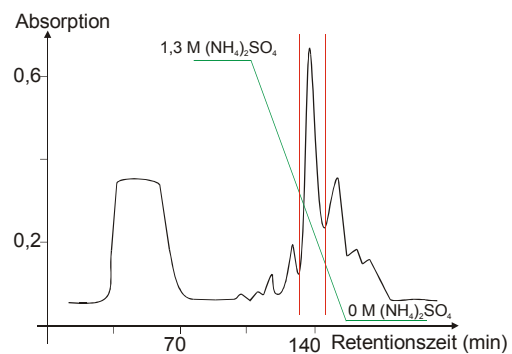


Abb. 4.2 Phenyl-Sepharose-Säule

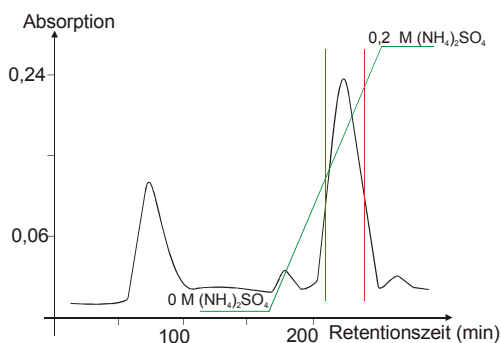


Abb. 4.3 Q-Sepharose-Säule

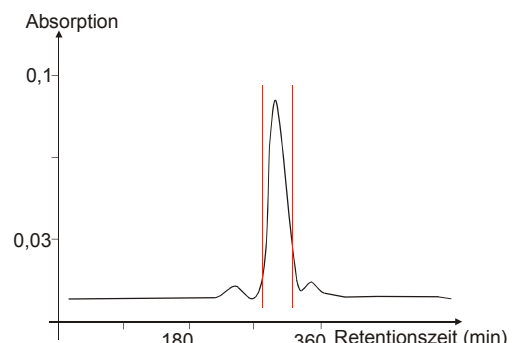


Abb. 4.4 Gelfiltrationssäule

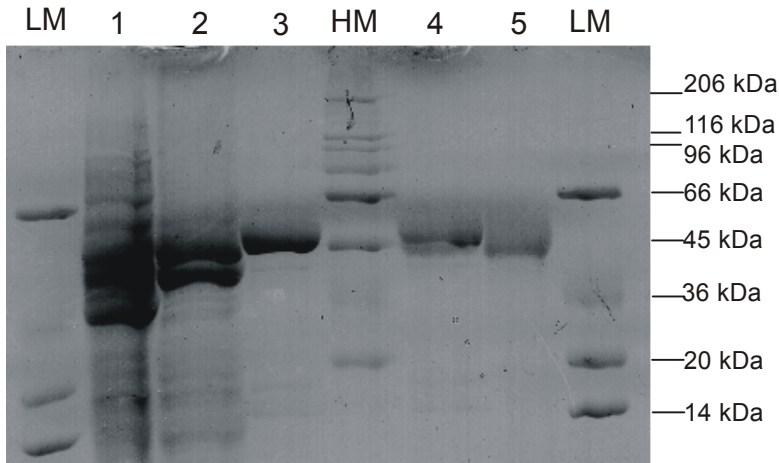


Abb. 4.5
 Reinigungsgel der TSH
 LM: Low Marker
 1: Rohextrakt
 2: DEAE
 HM: High Marker
 3: Phenyl-Sepharose
 4: Q-Sepharose
 5: Gelfiltration

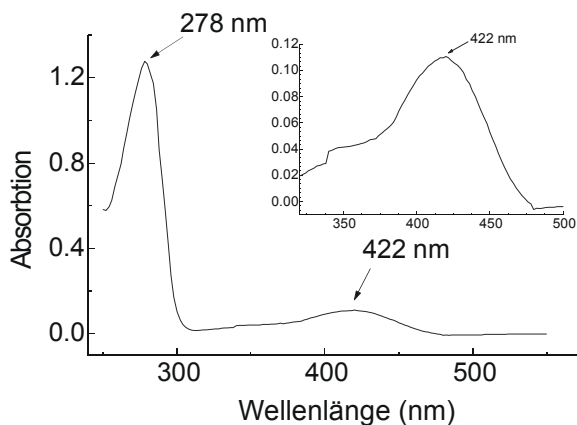
Tab. 4.1 Ausbeute der TSH Reinigung

	V[ml]	c_p [mg/ml]	m_p [mg]
Rohextrakt	160	7,68	1230
DEAE	200	1,75	350
Phenyl-Sepharose	40	6,75	270
Q-Sepharose	100	0,92	92
Gelfiltration	40	1,5	60

4.1.3 Charakterisierung

4.1.3.1 UV/VIS-Spektrum

Das gereinigte Protein zeigte ein für PLP-Enzyme typisches UV/VIS-Spektrum, bei neben der Absorption bei 278 nm ein Maximum bei 422 nm auf die protonierte Form des Kofaktors hinweist. In einem vergrößerten Ausschnitt ist die Absorption zwischen 325 und 500 nm gezeigt.



Das Verhältnis der Absorptionen A_{278}/A_{422} kann als Maß für die Reinheit des Proteins genutzt werden und lag sowohl bei nativem wie bei SeMet Protein zwischen 6,5 und 7,0.

Abb. 4.6 UV/VIS-Spektrum der TSH bei pH 7,7

4.1.3.2 Molekularmassenbestimmung

Mit Hilfe des SmartSystems (Amersham Pharmacia, Freiburg) und einer geeichten Superose12 Säule konnte der hohe Reinheitsgrad des Enzyms gezeigt werden. Die Retentionszeit und die daraus berechnete Masse von 54,2 KDa (berechnet 57,4 KDa) deuten auf ein monomeres Vorkommen der TS aus Hefe in Lösung hin (Abb. 4.7 und 4.8).

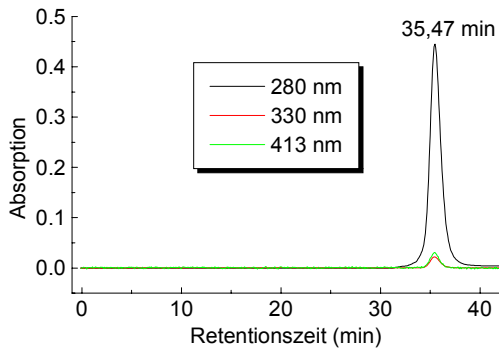


Abb. 4.7 Smart-Chromatogramm der TSH

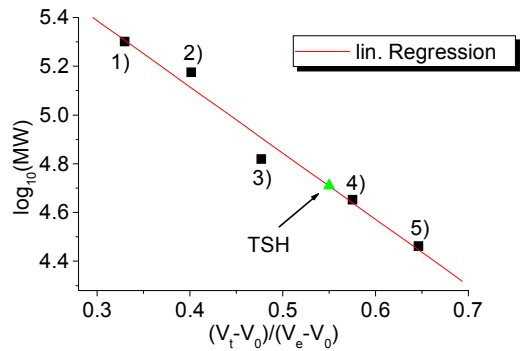


Abb. 4.8 Massenbestimmung der TSH mit Smart

- 1) 200 kDa 2) 150 kDa 3) 66 kDa
- 4) 45 kDa 5) 29 kDa

Die Massenbestimmung mittels SDS-PAGE (Abb.4.9) lieferte eine Masse von 56,2 kDa, die sehr gut mit der berechneten Masse von 57,4 kDa übereinstimmt. Das MALDI-MS ergab ein Gewicht von 57435 kDa und die N-terminalen Sequenzierung durch Edmann-Abbau (zehn Aminosäuren) zeigte eine korrekte N-terminale Expression des Enzyms.

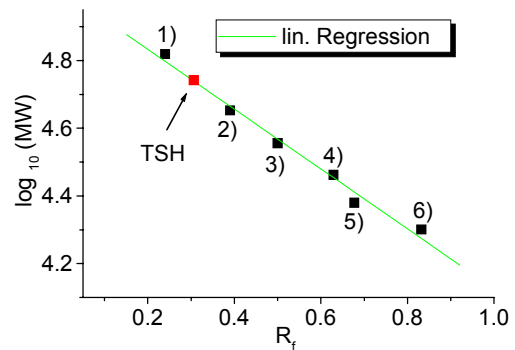
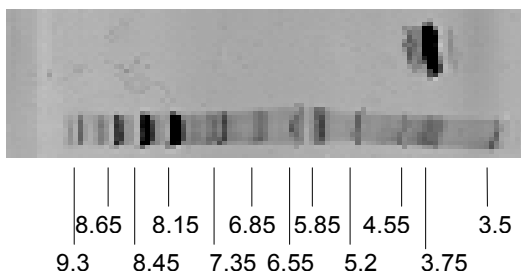


Abb. 4.9 Massenbestimmung mit SDS-PAGE

- 1) 66 kDa 2) 45 kDa 3) 36 kDa
- 4) 29 kDa 5) 24 kDa 6) 20 kDa

4.1.3.3 Isoelektrischer Punkt

Abb. 4.10 Isoelektrische Fokussierung der TSH



Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes, durchgeführt mit dem PhastSystem (Pharmacia), ergab einen pI von ca. 4,0, der berechnete pI beträgt 5,46.

4.1.4 Sequenzanalyse

Der Sequenzvergleich von 30 Threonin Synthasen verschiedener Organismen mit Hilfe des Programmpackets GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA) zeigte eine überraschende Aufteilung in zwei verschiedene Familien (Abb. 4.12). Innerhalb einer Familie besteht eine starke Korrelation, zwischen den Familien gibt es jedoch bis auf das Aktivzentrum mit den drei Resten Phe, Lys (an dem der PLP-Kofaktor gebunden ist) und Asp nur 3 weitere konservierte Aminosäuren. In der Nomenklatur von TSH sind dies Gly163, Pro275 und Thr449. Die TS aus Hefe zählt mit 514 Aminosäuren und einem berechneten Gewicht von 57474 Dalton zur zweiten Familie der Threonin Synthasen, die neben *Pilzen* (*S.cerevisiae*, *S.pombe* und *E.gossypii*) und einigen *Proteobakterien* aus der Gruppe der Eubakterien (*E.coli*, *H.pylori*, *H.influenzae*, *M.glycogenes*, *P.aeruginosa*, *S.marcescens*, *T.maritima*, *M.flagelatum*) auch einen Vertreter der *Corynebakterien* (*C.glutamicum*) enthält. Die erste Familie wird von höheren Pflanzen (*A.thaliana*, *R.communis*, *S.tuberosum*), *Cyanobakterien* (*Synechocystis*), *Archaeobakterien* (*A.fulgidus*, *M.thermoautotrophicum*, *M.janaschii*) sowie Eubakterien aus den Gruppen der *Mycobakterien* (*M.tuberculosis*, *M.leprae*), *Aquificaceae* (*A.aeolicus*) und *Bacillus* (*B.spec.*, *B.subtilis*) gebildet. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß eukaryotische Organismen zu beiden Unterfamilien gehören (höhere Pflanzen zu Familie 1, Pilze zu Familie 2); auch Eubakterien sind in beiden Unterfamilien vertreten. In Abb. 4.11 ist in einem phylogenetischen Baum der Verwandtschaftsgrad der untersuchten Enzyme abgebildet.

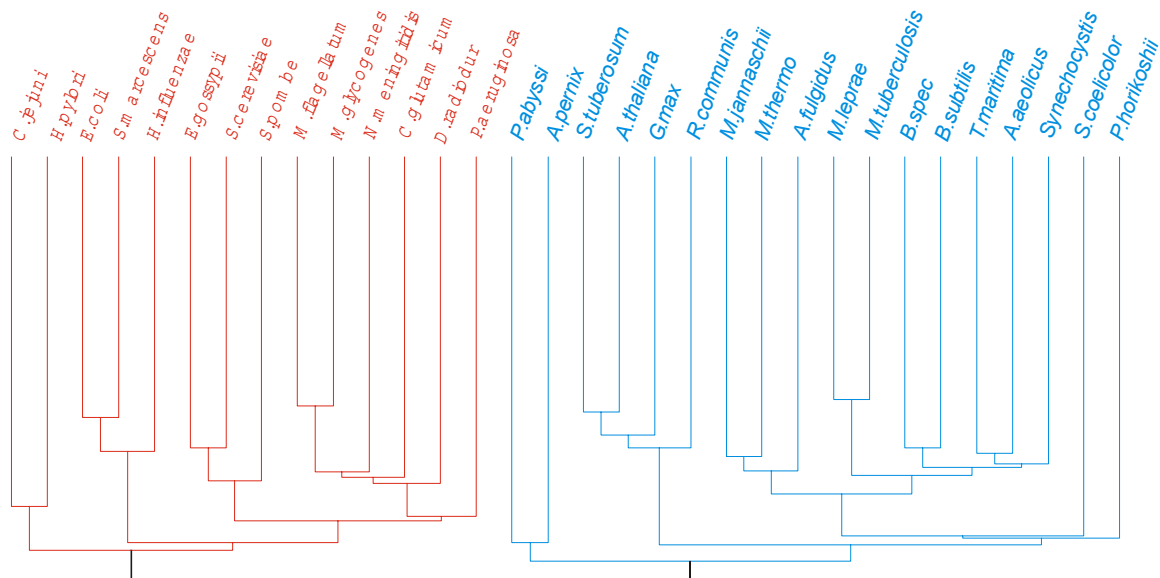


Abb. 4.11
Phylogenetischer Baum der Threonin Synthasen

Ergebnisse

1 100

Athaliana	(1)	-----LSSCLFNASVSSLNPKQDPPIRRHRSTLLRHRPVVISTCADGNNIKAP IETAVKPPHRTEDNIRDEARRNRSNAVN- PFSAKYVPPNAAPG---	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Stuberoseum	(1)	-----MAASCMLRSSFISPLGLPLQHHQSTSKPNNGHFTPIKATATNDASQ-----OKHRRPADENIREARRHCSHNN-----FSARVVPFNAGPN---	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Gmax	(1)	-----ASSSLFOSLPPFLSQTSTKYPAPKPAHFVWRAQSPLTQNNNS-----SKHRRPADENIREARRINAPHDHHHFSAKYVPPFNADSSSSS	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Scoelicolor	(1)	-----MQAETSTINPTDAAVDLGPAATLSR	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Tmaritima	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Apernix	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Babyssi	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Mjannaschii	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Mthermo	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Afulgidus	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Mleprae	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Mtuberculosis	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Bspec	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Bsubtilis	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Aaeolicus	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Synechocystis	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Ecoli	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Smarcescens	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Hinfluenzae	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Egossypii	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Scerevisiae	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Spombe	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Cglutamicum	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Mglycogenes	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Paeruginosa	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Hpylori	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Mflagellatum	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Mningitidis	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Dradiodur	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV
Cjejunii	(1)		-----MKNLYNLDKHN- EQV

101 200

Athaliana	(96)	STESYSLDEIVYRS-RSGGLLDVEHDMEALKRFDGAYWRDLFDSRVGKSTWPYGSVWSKKEWVLEIDDDDIISAFEGNS-----NLFWAERFGKQFL	-----NLFWAERFGKQFL
Stuberoseum	(90)	SDEWYSLDEIVYRS-RSGGLLDVQHMDALKKFDGQYWRSLFDSRVGKTTPYGSVWSKKEWVLEIDSDIISAFEGNS-----NLFWAERFGKQFL	-----NLFWAERFGKQFL
Gmax	(91)	STESYSLDEIVYRS-RSGGLLDVQHMD-----RVGKTTWPYGSVWSKKEWVLEIDDDIISAFEGNS-----NLFWAERFGKQFL	-----NLFWAERFGKQFL
Scoelicolor	(32)	ECGHRVPLGPVFACBECFPPEIAFYDSD-----YDAEELRRIEAGPANIWRYPALFVFPADVATKPNINPG-----WTKVLVQADNLARELG	-----WTKVLVQADNLARELG
Tmaritima	(1)	-----MKNLYNLDKHN- EQV	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Apernix	(1)	-----MKNLYNLDKHN- EQV	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Babyssi	(1)	-----MKNLYNLDKHN- EQV	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Mjannaschii	(1)	-----MKNLYNLDKHN- EQV	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Mthermo	(1)	-----MKNLYNLDKHN- EQV	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Afulgidus	(1)	-----MKNLYNLDKHN- EQV	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Mleprae	(1)	-----MKNLYNLDKHN- EQV	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Mtuberculosis	(1)	-----MKNLYNLDKHN- EQV	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Bspec	(1)	-----MKNLYNLDKHN- EQV	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Bsubtilis	(1)	-----MKNLYNLDKHN- EQV	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Aaeolicus	(1)	-----MKNLYNLDKHN- EQV	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Synechocystis	(1)	-----MKNLYNLDKHN- EQV	-----MKNLYNLDKHN- EQV
Ecoli	(14)	SFAQAVTQGLKNGCGLFFPHDLPEFSLTE-----IDEMKLDVFTRSAKILSAFIDGEIIPQEILEERVR-AAFAPP-----APVANVESD--	-----APVANVESD--
Smarcescens	(14)	SFAQALKQGLKQCGGLFFPLDLPEFELTE-----IDHLLBQDFVTRSRRLSAFIDGEVETALKKRVQ-AAFAPP-----APVAKVTTDD--	-----APVAKVTTDD--
Hinfluenzae	(14)	TFQSAVRVQLGRGCEYDLEEIYTC-ECGGLEIIYDYEEIKDKVSEKLRKREIGVWRYLEYLVKDESKIVSLCEGGT-----PFVRCNTIGSEGL	-----PFVRCNTIGSEGL
Egossypii	(17)	SFEBAVIOGLAEDGGFLFAVIERLREETLFPHWAHLS-----FQDLAMEIMKFIADWEIPAPRELIELRSY--SSFRSE-----EVTPLRKNVTGDD	-----EVTPLRKNVTGDD
Scerevisiae	(20)	SFEBAVIOGLAEDGGFLFAVIERLREETLFPHWAHLS-----FQDLAMEIMKFIADWEIPAPRELIELRSY--SSFRSE-----EVTPLRKNVTGDD	-----EVTPLRKNVTGDD
Spombe	(18)	SFEBAVIOGLAEDGGFLFAVIERLREETLFPHWAHLS-----FQDLAMEIMKFIADWEIPAPRELIELRSY--SSFRSE-----EVTPLRKNVTGDD	-----EVTPLRKNVTGDD
Cglutamicum	(15)	RFDSDILGGLAPDGGLYLEPQYQFSADALSAMRGMN-----YRDLAFTILSRLIDDIP--ADDLRIIVDKTRYADVAYARPGQDABDITPTTKLED--	-----ADDLRIIVDKTRYADVAYARPGQDABDITPTTKLED--
Mglycogenes	(14)	NFEDVLLAGLASDGGLYVFNLENRFRFTLBEIASVWGLP-----YHDLAFTVMRPFPVAGS-IADAPFKKILEBETYGVFAHDASG-----AAAPFERNRTNG--	-----AAAPFERNRTNG--
Paeruginosa	(14)	NFEDVLLAGLASDGGLYVFNLENRFRFTLBEIASVWGLP-----YHDLAFTVMRPFPVAGS-IADAPFKKILEBETYGVFAHDASG-----AAAPFERNRTNG--	-----AAAPFERNRTNG--
Hpylori	(15)	DFIBAILNPNAPKGGYTLERFETLQWQ-----DCLNLSYNDLVCEVFERLQLEIPKNLLASALKRYGVFNDFNK-----NPAPFVARNR--	-----NPAPFVARNR--
Mflagellatum	(14)	SFSEVILLGGLAPDGGLYLEPQYQFSADALSAMRGMN-----YRDLAFTILSRLIDDIP--ADDLRIIVDKTRYADVAYARPGQDABDITPTTKLED--	-----ADDLRIIVDKTRYADVAYARPGQDABDITPTTKLED--
Mningitidis	(14)	PFSEVILLGGLAPDGGLYLEPQYQFSADALSAMRGMN-----YRDLAFTILSRLIDDIP--ADDLRIIVDKTRYADVAYARPGQDABDITPTTKLED--	-----ADDLRIIVDKTRYADVAYARPGQDABDITPTTKLED--
Dradiodur	(14)	SFSEVILLGGLAPDGGLYLEPQYQFSADALSAMRGMN-----YRDLAFTILSRLIDDIP--ADDLRIIVDKTRYADVAYARPGQDABDITPTTKLED--	-----ADDLRIIVDKTRYADVAYARPGQDABDITPTTKLED--
Cjejunii	(14)	SFSEVILLGGLAPDGGLYLEPQYQFSADALSAMRGMN-----YRDLAFTILSRLIDDIP--ADDLRIIVDKTRYADVAYARPGQDABDITPTTKLED--	-----ADDLRIIVDKTRYADVAYARPGQDABDITPTTKLED--

201 300

Athaliana	(184)	G-MNDLWVKHCGISHTGSKFDLGMTVLVSQVNRRLKMKRP-----VVGVCAGTGDTSAAALSAVCSA-GIPSIVFLPANKISMAQLVPIANG--	-----VVGVCAGTGDTSAAALSAVCSA-GIPSIVFLPANKISMAQLVPIANG--
Stuberoseum	(178)	G-MTDLWVKHCGISHTGSKFDLGMTVLVSQVNRRLKMKRP-----VVGVCAGTGDTSAAALSAVCSA-GIPSIVFLPANKISMAQLVPIANG--	-----VVGVCAGTGDTSAAALSAVCSA-GIPSIVFLPANKISMAQLVPIANG--
Gmax	(163)	G-MNDLWVKHCGISHTGSKFDLGMTVLVSQVNRRLKMKRP-----VVGVCAGTGDTSAAALSAVCSA-GIPSIVFLPANKISMAQLVPIANG--	-----VVGVCAGTGDTSAAALSAVCSA-GIPSIVFLPANKISMAQLVPIANG--
Scoelicolor	(110)	VTG-GLYVKDDSGNPTGSKFDLGMVVAQAEBAARAFGFT-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--	-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--
Tmaritima	(43)	-----INLYVKEGNSPTGSKFDLGMVVAQAEBAARAFGFT-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--	-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--
Apernix	(65)	-----VYAKLEYLNSPSTGSKFDLGMVVAQAEBAARAFGFT-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--	-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--
Babyssi	(68)	KDSEDLYLKLDYLOPTGSKFDLGMVVAQAEBAARAFGFT-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--	-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--
Mjannaschii	(89)	IK-ELYVKNEGANPTGSKFDLGMVVAQAEBAARAFGFT-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--	-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--
Mthermo	(88)	I-ELYVKNEGANPTGSKFDLGMVVAQAEBAARAFGFT-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--	-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--
Afulgidus	(83)	VR-RVYVKEHGLNPSGSKFDLGMVVAQAEBAARAFGFT-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--	-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--
Mleprae	(53)	C-TIHLKVEGLNPTGSKFDLGMVVAQAEBAARAFGFT-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--	-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--
Mtuberculosis	(53)	C-TIHLKVEGLNPTGSKFDLGMVVAQAEBAARAFGFT-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--	-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--
Bspec	(43)	-----VQYVKEGNSPTGSKFDLGMVVAQAEBAARAFGFT-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--	-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--
Bsubtilis	(43)	-----IHLVKTGEGVNTGSKFDLGMVVAQAEBAARAFGFT-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--	-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--
Aaeolicus	(45)	F-RGKIYLYEGLNPTGSKFDLGMVVAQAEBAARAFGFT-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--	-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--
Synechocystis	(75)	K-DVRVFKYDGLNPTGSKFDLGMVVAQAEBAARAFGFT-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--	-----TLSCSTGNLAGAVGAAAARA-GFRSCVFIPI-HDLGQGVMAAVYAG--
Ecoli	(93)	-----VGCLELPHGPTLAFKDFGGRFMAQMLTHIAGDKP-----VTILTATS GDTGAAVAHAFYGLPNVKVVI LYPRGKIS PLQEKLFCTLG-GN	-----VTILTATS GDTGAAVAHAFYGLPNVKVVI LYPRGKIS PLQEKLFCTLG-GN
Smarcescens	(93)	-----VGCLELPHGPTLAFKDFGGRFMAQMLTHIAGDKP-----VTILTATS GDTGAAVAHAFYGLPNVKVVI LYPRGKIS PLQEKLFCTLG-GN	-----VTILTATS GDTGAAVAHAFYGLPNVKVVI LYPRGKIS PLQEKLFCTLG-GN
Hinfluenzae	(91)	-----IYALELPHGPTLAFKDFGGRFMAQMLTHIAGDKP-----VTILTATS GDTGAAVAHAFYGLPNVKVVI LYPRGKIS PLQEKLFCTLG-GN	-----VTILTATS GDTGAAVAHAFYGLPNVKVVI LYPRGKIS PLQEKLFCTLG-GN
Egossypii	(105)	E-----NLIHILELPHGPTLAFKDFGGRFMAQMLTHIAGDKP-----VTILTATS GDTGAAVAHAFYGLPNVKVVI LYPRGKIS PLQEKLFCTLG-GN	-----VTILTATS GDTGAAVAHAFYGLPNVKVVI LYPRGKIS PLQEKLFCTLG-GN
Scerevisiae	(108)	E-----NLIHILELPHGPTLAFKDFGGRFMAQMLTHIAGDKP-----VTILTATS GDTGAAVAHAFYGLPNVKVVI LYPRGKIS PLQEKLFCTLG-GN	-----VTILTATS GDTGAAVAHAFYGLPNVKVVI LYPRGKIS PLQEKLFCTLG-GN
Spombe	(103)	-----LNVLLELPHGPTLAFKDFGGRFMAQMLTHIAGDKP-----VTILTATS GDTGAAVAHAFYGLPNVKVVI LYPRGKIS PLQEKLFCTLG-GN	-----VTILTATS GDTGAAVAHAFYGLPNVKVVI LYPRGKIS PLQEKLFCTLG-GN
Cglutamicum	(103)	-----NLYLGLHSEGPTAFAKDMAMQMLLQPLGNLFPEYELRRRN-----ETTINILGATSGDTSAAEYAMRGREGIRVFMILTACRMTFPFOQAQMPGLDDPN	-----ETTINILGATSGDTSAAEYAMRGREGIRVFMILTACRMTFPFOQAQMPGLDDPN
Mglycogenes	(105)	-----DLYLLSLNGPTLAFKDMAMQMLLQPLGNLFPEYELRRRN-----ETTINILGATSGDTSAAEYAMRGREGIRVFMILTACRMTFPFOQAQMPGLDDPN	-----ETTINILGATSGDTSAAEYAMRGREGIRVFMILTACRMTFPFOQAQMPGLDDPN
Paeruginosa	(101)	-----CVELPHGPTLAFKDFGGRFMAQMLTHIAGDKP-----VTILTATS GDTGAAVAHAFYGLPNVKVVI LYPRGKIS PLQEKLFCTLG-GN	-----VTILTATS GDTGAAVAHAFYGLPNVKVVI LYPRGKIS PLQEKLFCTLG-GN
Hpylori	(95)	-----IFVQELYHGBSLAFKDMAMQMLLQPLGNLFPEYELRRRN-----ETTINILGATSGDTSAAEYAMRGREGIRVFMILTACRMTFPFOQAQMPGLDDPN	-----ETTINILGATSGDTSAAEYAMRGREGIRVFMILTACRMTFPFOQAQMPGLDDPN
Mflagellatum	(107)	-----DLYLLSLNGPTLAFKDMAMQMLLQPLGNLFPEYELRRRN-----ETTINILGATSGDTSAAEYAMRGREGIRVFMILTACRMTFPFOQAQMPGLDDPN	-----ETTINILGATSGDTSAAEYAMRGREGIRVFMILTACRMTFPFOQAQMPGLDDPN
Mningitidis	(98)	-----GKIQALSNPTLAFKDMAMQMLLQPLGNLFPEYELRRRN-----ETTINILGATSGDTSAAEYAMRGREGIRVFMILTACRMTFPFOQAQMPGLDDPN	-----ETTINILGATSGDTSAAEYAMRGREGIRVFMILTACRMTFPFOQAQMPGLDDPN
Dradiodur	(99)	-----GLYLLSLNGPTLAFKDMAMQMLLQPLGNLFPEYELRRRN-----ETTINILGATSGDTSAAEYAMRGREGIRVFMILTACRMTFPFOQAQMPGLDDPN	-----ETTINILGATSGDTSAAEYAMRGREGIRVFMILTACRMTFPFOQAQMPGLDDPN
Cjejunii	(93)	-----TYINELWHPPTLAFKDMAMQMLLQPLGNLFPEYELRRRN-----ETTINILGATSGDTSAAEYAMRGREGIRVFMILTACRMTFPFOQAQMPGLDDPN	-----ETTINILGATSGDTSAAEYAMRGREGIRVFMILTACRMTFPFOQAQMPGLDDPN

Ergebnisse

Table with 4 columns: Organism, Accession, Alignment, and Reference. Organisms include Athaliana, Stuberosum, Gmax, Scoelicolor, Tmaritima, Apermix, Pabyssi, Mjannaschii, Mthermo, Afulgidus, Mleprae, Mtuberculosis, Bspec, Sbuttilis, Aaeolicus, and Synchocystis. Reference is 301.

Table with 4 columns: Organism, Accession, Alignment, and Reference. Organisms include Ecoli, Smarcescens, Hinfluenzae, Egossypii, Scerevisiae, Spombe, Cglutamicum, Mglycogenes, Paeruginosa, Hpylori, Mflagellatum, Mningitidis, Dradiodur, and Cjejuni. Reference is 401.

Table with 4 columns: Organism, Accession, Alignment, and Reference. Organisms include Athaliana, Stuberosum, Gmax, Scoelicolor, Tmaritima, Apermix, Pabyssi, Mjannaschii, Mthermo, Afulgidus, Mleprae, Mtuberculosis, Bspec, Sbuttilis, Aaeolicus, and Synchocystis. Reference is 401.

Table with 4 columns: Organism, Accession, Alignment, and Reference. Organisms include Ecoli, Smarcescens, Hinfluenzae, Egossypii, Scerevisiae, Spombe, Cglutamicum, Mglycogenes, Paeruginosa, Hpylori, Mflagellatum, Mningitidis, Dradiodur, and Cjejuni. Reference is 401.

Table with 4 columns: Organism, Accession, Alignment, and Reference. Organisms include Athaliana, Stuberosum, Gmax, Scoelicolor, Tmaritima, Apermix, Pabyssi, Mjannaschii, Mthermo, Afulgidus, Mleprae, Mtuberculosis, Bspec, Sbuttilis, Aaeolicus, and Synchocystis. Reference is 501.

Table with 4 columns: Organism, Accession, Alignment, and Reference. Organisms include Ecoli, Smarcescens, Hinfluenzae, Egossypii, Scerevisiae, Spombe, Cglutamicum, Mglycogenes, Paeruginosa, Hpylori, Mflagellatum, Mningitidis, Dradiodur, and Cjejuni. Reference is 501.

	601		645
Athaliana (491)	-----DMACRFNPPVVDVKADFGAVMDVLKSYLGSNTLTS-		
Stuberosum (485)	-----DMECRFANPPVEVKADFGSVMVDLKSYLELSSQNSKL-		
Gmax (470)	-----DMACRYANPPMQVKADFGSVMVDLKYLYLQSKAH----		
Scoelicolor (413)	-----		
Tmaritima (348)	I-----		
Apernix (346)	-----		
Babyssi (344)	-----		
Mjannaschii (389)	-----IKIECDMNVLKRILKEL-----		
Mthermo (387)	-----VEVEPDINQLRSIIRGTGSS-----		
Afulgidus (381)	-----VKVEASVEAVIRAMRA-----		
Mleprae (344)	-----SPVPVDAVAVVEQLGLV-----		
Mtuberculosis (343)	-----VSPVPVDPVAVVEKLGLA-----		
Bspec (332)	-----IASVSNIDIEQIKDHIKGVIMS-----		
Bsubtilis (332)	-----PVTLPDDEDSILEYVKGAARV-----		
Aaeolicus (336)	-----PITVPPDFDEVVKVLF-----		
Synechocystis (366)	-----KAGLKPDELEIVAKAMGF-----		
Ecoli (393)	TLDDPKELAEARADLPLLSHNLPAADFAALRKLMMNHQ-----		
Smarcescens (393)	ELPLPKALRALRAELPLLSHTLPASFGELRKFIMGGLPA-----		
Hinfluenzae (391)	QLPLPETLDKHNQLPLLSDEMNDFAQLRAYLLKS-----		
Egossypii (469)	-DVLPRRLRRLLGDLEKRIKYVDNTDQVVIKSIIEEELINMGIYNP		
Scerevisiae (473)	KDVLPEEELKLLSTLKKLKFIERADVELVKNAIIEELAKMKL---		
Spombe (473)	TQVLEIEFDGLLDEERTCIFSGKPNIDILKQIEVTLRSREKA---		
Cglutamicum (441)	PQT-ERFAAIMDAPPKVSDLPN-DTDAVKQYIVDAIANTSVK---		
Mglycogenes (441)	PER-PHSLEGLLESLPQRFVMEVA-DAAVIKQFIVEHI-----		
Paeruginosa (429)	APALPAHLADLFEEREERTVLPN-ELAKVQAFVSHGNPQKPL---		
Hpylori (446)	SYNTPDSQRLDDLFERGIKHQEVLLKNEIKSSILLWLESLSH---		
Mflagellatum (443)	PN--ARTAWRLGSLPQRFVMEVA-DVAAIKQFIVEHV-----		
Nmeningitidis (433)	AIPRAALEGLENLQRFVQVTPN-SADAVKGIIEQTLA-----		
Dradiodur (435)	PER-PTRFVGLIESKERFCDVLPN-DAALKAYLAALG-----		
Cjejunii (432)	EFNVQKDBEILALFDLKNSEKVFERNIKKEILDMMQK-----		

<i>Aaeolicus</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
<i>Afulgidus</i>	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
<i>Apernix</i>	<i>Aeropyrum pernix</i>
<i>Athaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Bspec</i>	<i>Bacillus spec.</i>
<i>Bsubtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Cglutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>Cjejunii</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Dradiodur</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>
<i>Ecoli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Egossypii</i>	<i>Eremothecium gossypii</i>
<i>Gmax</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Hinfluenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Hpylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Mflagellatum</i>	<i>Methylobacillus flagellatum</i>
<i>Mglycogenes</i>	<i>Methylobacillus glycogenes</i>
<i>Mjannaschii</i>	<i>Methanococcus jannaschii</i>
<i>Mleprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>Mtherm</i>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
<i>Mtuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Nmeningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Pabyssi</i>	<i>Pyrococcus abyssi</i>
<i>Paeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Phorikoshii</i>	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
<i>Scerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Scoelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>Smarcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Spombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Stuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Synechocystis</i>	<i>Synechocystis sp.</i>
<i>Tmaritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>

Abb. 4.12

Sequenzvergleich verschiedener Threonin Synthasen. Die verwendeten Abkürzungen sind in der Auflistung rechts verzeichnet. Identische Reste innerhalb einer Familie sind grau unterlegt; in beiden Familien konservierte Reste sind gelb markiert.

4.1.5 Kristallisation und Datenauswertung

Die Kristalle der TSH wurden mit der Dampfdiffusionsmethode bei 4°C im sitting drop gezüchtet. Eine Bedingung aus den verwendeten Testreihen führte dabei zu kristallinem Material und mußte weiter optimiert werden; die optimierten Bedingungen sind in Tab. 4.2 aufgeführt.

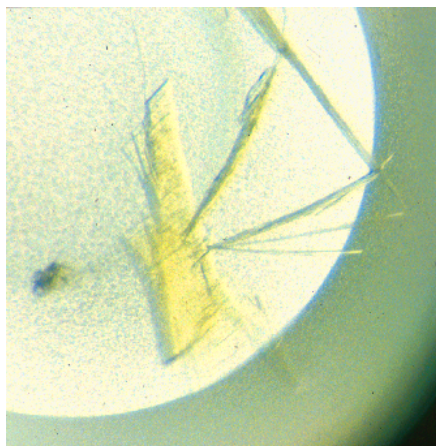


Abb. 4.13a
Kristall der TSH. Deutlich zu erkennen ist der unterschiedliche Habitus der Kristalle in einem einzigen Tropfen

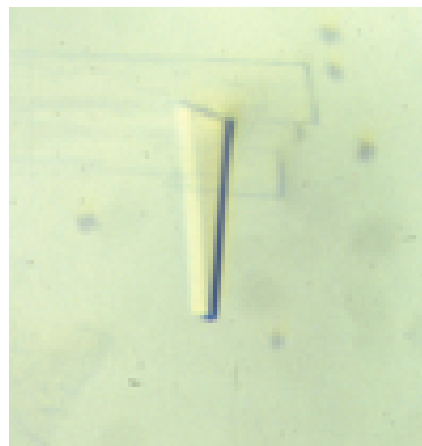


Abb. 4.13b
Kristall aus einem gleichen Ansatz wie in Abb. 4.13a.

Die Kristalle wuchsen innerhalb von ca. 17 bis 21 Tagen und erreichten eine Größe von bis zu $200 \times 100 \times 20 \mu\text{m}^3$. Trotz der vielfältigen Optimierungsversuche blieb die Reproduzierbarkeit für röntgentaugliche Einkristalle hinter den Erwartungen zurück, so daß immer nur ein Teil der identischen Kristallansätze auch tatsächlich zu verwertbaren Kristallen führte. Insgesamt konnten so nur ca. ein Dutzend Kristalle wie in Abb. 4.13b gezeigt gezüchtet werden, die übergroße Mehrheit der Kristallansätze lieferte Ergebnisse wie in Abb. 4.13a. Dieses Verhalten galt sowohl für das native wie für das SeMet Protein.

Tab. 4.2 Zellparameter und Kristallisationsbedingungen der TSH

Protein	Raumgruppe	Zelle (Å)	V_m (Å ³ /Da)	N_{au}	d (Å)	Kristallisationsbedingung
SeMet	P ₂₁	a=95,2 b=53,6 c=106,8 $\beta=99,6^\circ$	2,34	2	2,7	100 mM Hepes/NaOH pH 7,8 20 % PEG 4000 4°C Additiv: 20 % Benzamidin + 0,1 M BaCl ₂ 3 μl : 1,3 μl : 0,2 μl Protein : Reservoir : Additiv (<i>CrysChem</i>)
Nativ	P ₂₁	a=97,5 b=52,4 c=109,4 $\beta=100,3^\circ$	2,40	2	3,2	100 mM Hepes/NaOH pH 7,8 20 % PEG 4000, 10 % Isopropanol 4°C 3 μl : 1,5 μl Protein : Reservoir (<i>CrysChem</i>)

V_m : Matthews Koeffizient, Verhältnis aus Volumen und Gewicht des Proteins in der Einheitszelle (Matthews, 1968)

N_{au} : Anzahl der Monomere in der asymmetrischen Einheit

d: Auflösung

Die Proteinkonzentration der Kristallansätze betrug jeweils 10 mg/ml

Die hoch aufgelösten Datensätze des SeMet Proteins wurden am HASYLAB (Hamburger Synchrotron Labor) aufgenommen. Die exakte Lage der K-Schalenabsorption der Selenatome wurde vor der Messung durch ein Röntgenfluoreszenz-Scan bestimmt und die Meßwellenlängen $f'' = 0,9784 \text{ \AA}$, $f' = 0,98 \text{ \AA}$ und $remote = 0,92 \text{ \AA}$ ermittelt. Als Cryopuffer diente der Kristallisationspuffer, der zusätzlich 16% 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD) enthält.

Tab. 4.3 MAD-Datensammlung der TSH

Datensatz	Auflösung (Å)	Anzahl der Reflexe beobachtet	Anzahl der Reflexe unabhängig	R_{merge} (%)	Vollständigkeit gesamt	Vollständigkeit letzte Schale
f''	2,7	145806	54312	6,3	98,8	97,3
f'	2,7	6865	45956	5,8	83,2	68,6
remote	2,7	97212	53902	6,2	97,0	91,3

$\lambda (f'') = 0,9784 \text{ \AA}$; $\lambda (f') = 0,98 \text{ \AA}$; $\lambda (remote) = 0,92 \text{ \AA}$

Die letzte Auflösungsschale war 2,8 – 2,7 Å

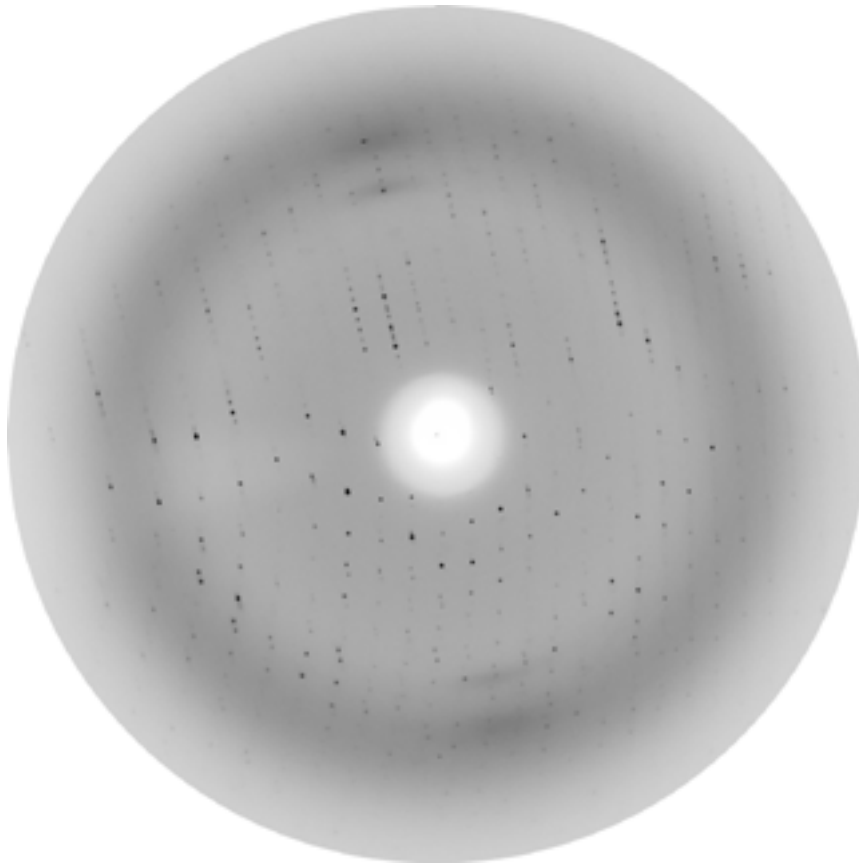


Abb. 4.14

1° Rotationsaufnahme eines TSH Kristalls bei 100 K am Synchrotron. Der Kristall zu Plattenabstand beträgt $d=230$ mm und die Wellenlänge $\lambda=0,9784$ nm (entspricht einer maximalen Auflösung am Plattenrand von $2,7$ Å).

4.1.6 Selen Lagen und Elektronendichte Berechnung

Mit dem Programm FFT (CCP4-Suite, 1994) wurden Differenz-Pattersonfunktionen sowohl für die dispersiven als auch für die anomalen Differenzen berechnet. Die Kreuzvektor-Verifizierung der in den Harker-Sections gefundenen Peaks mit RSPS (CCP4-Suite, 1994) führte zu einem ersten Set von acht Selen-Lagen, die mit dem Programm MLPHARE (CCP4-Suite, 1994) weiter verfeinert wurden. Die höchsten Peaks der resultierenden Fourier-Map wurden auf Konsistenz geprüft und für einen neuen Zyklus verwendet, bis alle zwölf Selen-Lagen der asymmetrischen Einheit bekannt waren. Nach einer weiteren Verfeinerung der Selen-Lagen mit SHARP (La Fortelle *et al.*, 1997) wurde nach einem *solvent flattening* (Abrahams & Leslie, 1996) eine erste Elektronendichte berechnet, in der α -Helices und β -Faltblätter, v.a. im Inneren des Proteins, schon deutlich zu erkennen waren. Die insgesamt zwölf Selen-Atome der beiden Monomere in der asymmetrischen Einheit konnten zur Berechnung eines *ncs*-Operators (*non crystallographic symmetry*) mit FINDNCS (CCP4-Suite, 1994; Lu, 1997) verwendet werden. Die Mittelung über diesen Operator mit Hilfe von AVE (Kleywegt, 1996; Kleywegt & Read, 1997) führte zu einer deutlichen

Qualitätsverbesserung der Elektronendichte, in die das erste Teilmodell mit Polyalanin eingebaut werden konnte.

4.1.7 Modellbau und Verfeinerung

Die kristallographischen und stereochemischen Parameter des TSH Modells sind in Tab. 4.4 aufgeführt. Die kristallographischen und nicht-kristallographischen Kontaktflächen liegen mit weniger als 0,5% einer Gesamtoberfläche von 40135 Å² in einem für monomere Enzyme typischen Bereich (Janin, 1997). Die Kontaktfläche der asymmetrischen Einheit selbst wird dabei von den Aminosäuren Glu72, Asp77, Ala78 und Lys81 gebildet. Zwischen beiden Monomeren gibt es keine kovalente Bindung und auch Wasserstoffbrückenbindungen sind bei einem kleinsten Abstand von 4,2 Å nicht erkennbar. Statt dessen befinden sich insgesamt sechs Wassermoleküle zwischen den beiden Monomeren, von denen zwei je eine Wasserstoffbrücke zu Molekül A und B aufweisen. Die TSH ist also zweifelsfrei ein monomeres Enzym.

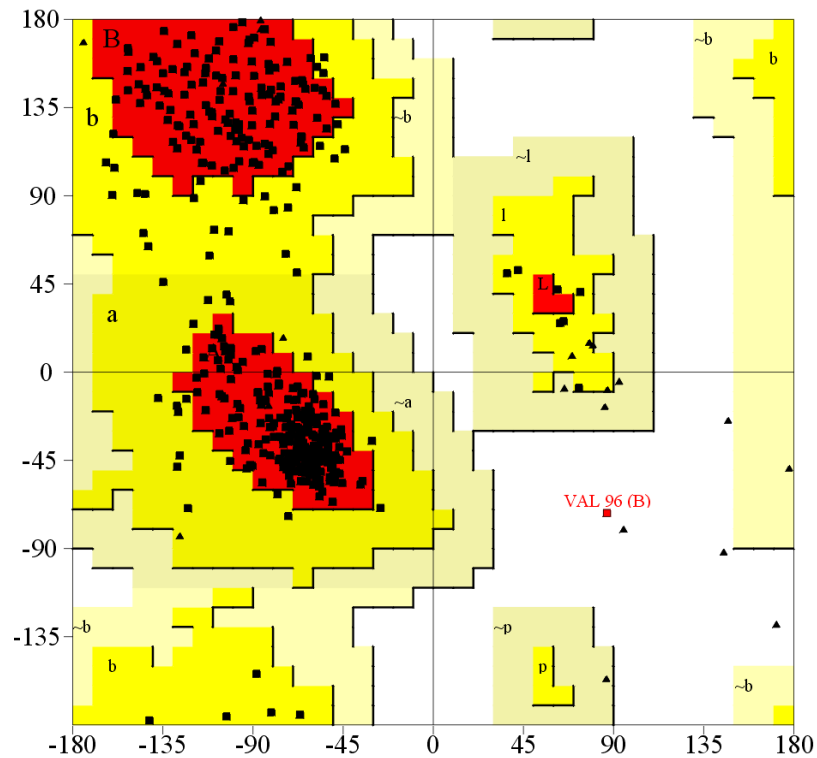
In die finale Elektronendichte konnten fast alle der 514 Aminosäuren eines Monomers eingebaut werden, wobei das zweite Monomer mit Hilfe des *ncs*-Operators aus dem Ersten erzeugt wurde. Lediglich die Reste 146-151, 228-233 sowie 513-514 konnten in beiden Monomeren nicht gebaut werden, da die Elektronendichte in diesen Abschnitten nicht ausreichend definiert war. Diese Bereiche wurden daher auch in der Verfeinerung nicht

Tab. 4.4 Verfeinerungsstatistik der TSH

Auflösung (Å)	20 - 2,7
R _{cryst} (%)	21,7
R _{free} (%)	25,2
Vollständigkeit <i>working set</i> (%)	94,4
<i>Testset</i> (%)	4,8
Anzahl an nicht Wasserstoffatomen	
Protein	7836
Wasser	334
<i>rms</i> Abweichung	
Bindungslänge (Å)	0,008
Bindungswinkel (°)	1,35
Bonded B (Å ²)	2,45
Gemittelte B-Faktoren	
Protein (Å ²)	43,5
PLP (Å ²)	36,5
Wasser (Å ²)	49,3
alle Atome (<i>range</i>) (Å ²)	43,7

berücksichtigt. Außerdem waren die Seitenketten der Reste 219-227 nicht definiert. Die TSH Struktur konnte bis zu einem kristallographischen *R*-Faktor von 21,7 % verfeinert werden mit einem *R_{free}* von 25,2%. In einem Ramachandran-Plot (Abb. 4.14; erstellt mit PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993)) wurden 89,5 % aller Aminosäuren in den am stärksten favorisierten Regionen und 8,9 % in den gleichfalls erlaubten Regionen, 1,5 % in den großzügig erlaubten Regionen sowie ein Rest, Val96, mit verbotenen Torsionswinkelkombinationen gefunden. Die Elektronendichte um diesen Rest war jedoch klar definiert und die B-Faktoren niedrig. Val96 liegt in einem β -turn, eingebettet zwischen mehreren großen

Seitenketten (Tyr88, Tyr256, Phe58, Phe91), die diese Konformation bedingen. Dieser *turn* liegt über 18 Å vom aktiven Zentrum entfernt auf der Rückseite des Kanals (s. Strukturbeschreibung) am äußersten Rand des Moleküls und hat somit eher strukturelle Bedeutung. Beide Monomere der asymmetrischen Einheit sind über eine nicht-kristallographische 2-fach Achse miteinander verknüpft und die Superposition beider Monomere ergab einen Mittlere quadratische Abweichung (*rms*) von 0.019 Å für 500 C α Atome.



Reste in den favorisierten Regionen:	403	89,1%
Reste in gleichfalls erlaubten Regionen	43	8,9%
Reste in großzügig erlaubten Regionen	6	1,5%
Reste in verbotenen Regionen	<u>1</u>	0,2%
Nicht-Glycin und Prolin Reste	455	
Anzahl der Glycin Reste	28	
Anzahl der Prolin Reste	<u>19</u>	
Insgesamt	500	

Abb. 4.15

Ramachandran Diagramm der dihedralen Hauptkettenwinkel Phi und Psi des TSH-Modells. Die für L-Aminosäuren erlaubten Bereiche sind farbig unterlegt, wobei die sterisch günstigsten Regionen rot, die sind. Die Aminosäuren Val96 liegt in einer sterisch verbotenen Zone.

4.1.8 Strukturbeschreibung der TSH

Die Threonin Synthase aus Hefe ist, wie die Gelfiltrations- und Massenspektrometrieexperimente bereits andeuten, ein monomeres Enzym und zugleich das erste strukturell charakterisierte monomere PLP-Enzym überhaupt mit einer Größe von $64 \times 62 \times 58 \text{ \AA}^3$. Die Gesamtstruktur der TSH ist in Abb. 4.16 als $C\alpha$ -Gerüst in einer Stereodarstellung gezeigt und in Abb. 4.17 in einem *Ribbon-Plot*, ebenfalls als Stereodarstellung.

Die Threonin Synthase zeigt eine in drei Untereinheiten gegliederte offene α/β -Struktur. Sie besteht aus einer kleinen N-terminalen Domäne (A), einer großen Domäne (B) und der PLP-bindenden Domäne (C), die auch den C-Terminus beinhaltet. Die Domänen B und C sind jedoch bezüglich ihrer Aminosäuresequenz nicht kontinuierlich aufgebaut: der N-Terminus wird von den Resten 2-94 gebildet, die PLP-bindende Domäne jedoch von den Aminosäuren 120-262 sowie 477-514. Die große Domäne B besteht aus den Resten 95-119 und 263-476. In Abb. 4.18 sind die Sekundärstrukturelemente der TSH in einer schematischen Darstellung gezeigt.

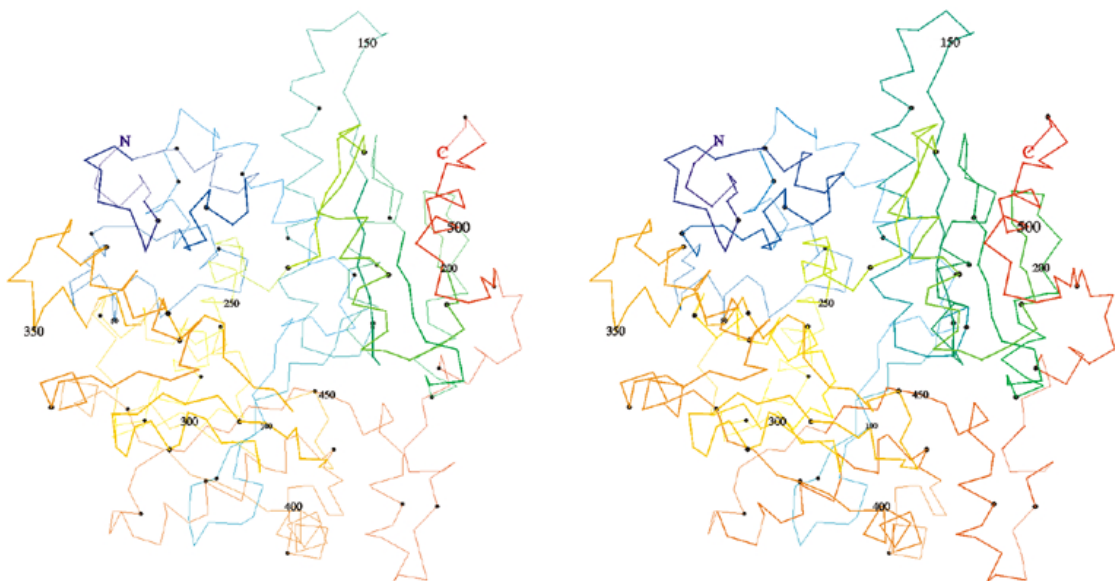


Abb. 4.16

Struktur von Threonin Synthase in einer $C\alpha$ -Trace Darstellung. Der Farbverlauf startet bei blau (N-Terminus) und endet bei rot (C-Terminus). Zusätzlich ist jede 10. Aminosäure markiert, jede 50. nummeriert.

Der N-Terminus besteht aus zwei kleinen, antiparallelen Faltsblättern $+\beta_a$ und $-\beta_b$, verbunden durch die ebenfalls kleine Helix α_1 , an die sich weitere drei Helices, α_2 , α_3 und α_4 auf der solvenzzugänglichen Seite des β -Strangs, anschließen. Die PLP bindende Domäne enthält als Hauptmotiv ein fünfsträngiges, paralleles β -Faltsblatt in der Reihenfolge $+\beta_h$, $+\beta_e$, $+\beta_f$, $+\beta_g$, $+\beta_o$, das von den Helices α_5 , α_6 und α_7 auf der einen Seite, sowie α_8 und α_{20} auf der

anderen Seite vom Solvenz abgeschirmt wird. Der PLP Kofaktor ist über Lys124 an Helix $\alpha 5$, die mit 22 Aminosäuren und 38 Å längste Helix in der gesamten Struktur, gebunden und bildet das für PLP-Enzyme typische interne Aldimin (Christen & Metzler, 1985). Neben dieser kovalenten Verknüpfung ist die Phosphatgruppe des Kofaktors am N-terminalen Ende von Helix $\alpha 10$ und dem ihr vorgelagerten *Loop* über Wasserstoffbrücken verankert (s.u.). Die große Domäne B hat eine etwas kompliziertere Struktur. Sie kann als kombiniertes β -Faltblatt mit einer dazwischen liegenden Helix beschrieben werden. Ein sechssträngiges β -Faltblatt, bestehend aus den Strängen $+\beta d$, $-\beta c$, $-\beta i$, $-\beta n$, $-\beta j$ und $-\beta m$, ist durch die Helix $\alpha 11$ von zwei kurzen, antiparallelen β -Faltblättern $-\beta k$ und $+\beta l$ getrennt. Beide, das sechs- und das zweisträngige β -Faltblatt, werden flankiert von den Helices $\alpha 10$, $\alpha 12$, $\alpha 13$, $\alpha 14$, $\alpha 15$ und $\alpha 16$.

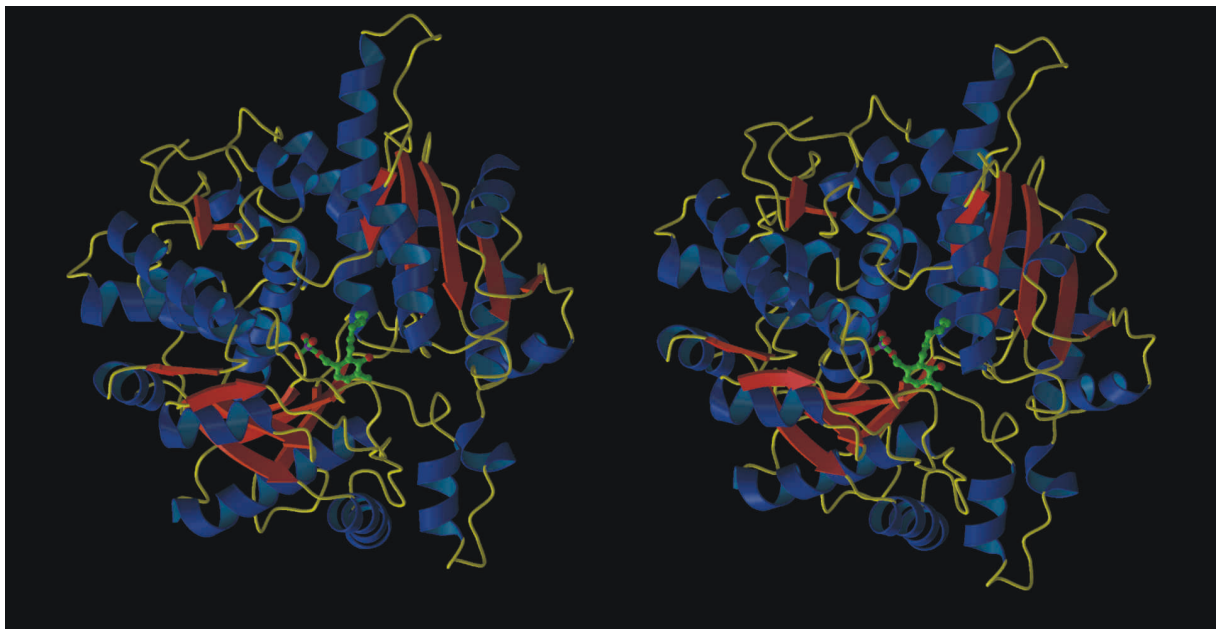


Abb. 4.17

Stereobild der TSH im Ribbon Plot. Das an Lys124 gebundene PLP ist als ball and stick Modell in grün dargestellt, α -Helices sind blau, β -Faltblätter rot und Loops in gelb.

Die drei Domänen der TSH werden durch ein starkes Netzwerk von polaren und hydrophoben intramolekularen Wechselwirkungen zusammengehalten, an denen sowohl die Haupt- als auch Seitenkettenelemente beteiligt sind. So ähnelt z.B. die Grenzfläche zwischen Domäne A und B einem $\alpha\beta\alpha$ Sandwich, bei dem die Helices $\alpha 12$ und $\alpha 13$ von Domäne B einen α -Layer bilden und den β -Strang der Domäne A flankieren. Zwischen beiden Domänen gibt es mehrere Wasserstoffbrückenbindungen sowie eine Salzbrücke zwischen den Resten Arg12 und Glu 340. Die Domänen A und C bilden an ihrer Grenzfläche ein gemischtes „Helixbündel“, bestehend aus den Helices $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, und $\alpha 9$ mit Helix $\alpha 1$ in seiner Mitte. Insgesamt stabilisieren zwölf Wasserstoff- und zwei Salzbrückenbindungen die

beiden Domänen. Der Interdomänenkontakt zwischen Domäne B und C am C-terminalen Ende der β -Strängen wird wie bei den anderen auch durch mehrere Wasserstoffbrücken stabilisiert, wobei besonders die nicht sequentielle Konstruktion der beiden großen Domänen diese besonders stark aneinander bindet. Alles in allem bedingen die z.T. sehr starken Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Domänen deren Orientierung zueinander. Sie sind auch dafür verantwortlich, daß die TSH ein relativ starres und unflexibles Molekül ist, nahezu ohne Möglichkeiten einer Reorientierung der Domänen relativ zueinander.

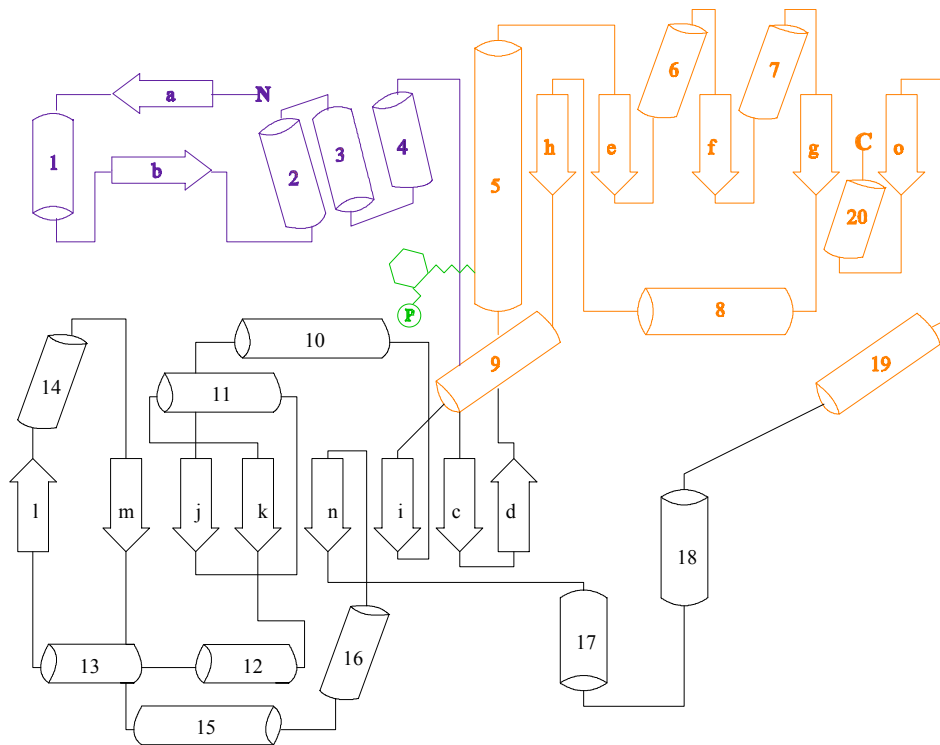


Abb 4.18

Schematische Darstellung der Threonin Synthase. Zylinder symbolisieren α -Helices, Pfeile β -Stränge. Die drei Domänen sind blau (N-terminal), orange (PLP-bindend) und schwarz (große Domäne) dargestellt. Der Kofaktor ist inklusiv seiner Verankerung im Protein grün eingezeichnet.

Die TSH hat insgesamt eine globuläre Form; besonders auffällig ist jedoch eine Art Kanal, der quer über das ganze Molekül verläuft. Dieser Kanal hat eine Ausdehnung von ca. 43 Å, eine Tiefe von ca. 19 Å und erlaubt den Zugang des Substrats zum PLP-Kofaktor, der etwa in der Mitte am Boden des Kanal fixiert ist. Die Abb. 4.19 zeigt eine Oberflächendarstellung der TSH mit den eingefärbten Domänen N, C und B sowie dem PLP-Kofaktor. Der beschriebene Kanal ist dabei deutlich zu erkennen. Die Abb. 4.20 zeigt das elektrostatische Potential der Oberfläche der TSH in der gleichen Orientierung wie in der Domänendarstellung.

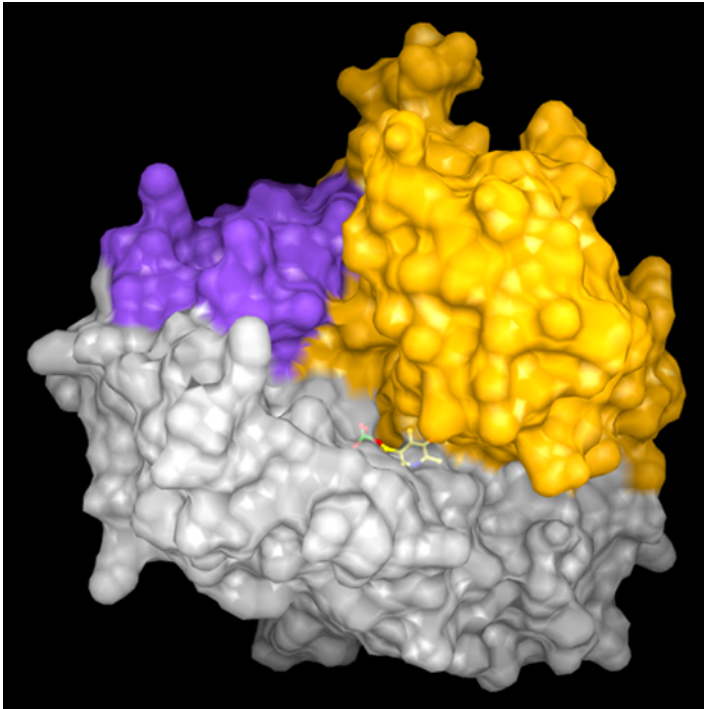


Abb. 4.19

Oberflächendarstellung der TSH. Die einzelnen Domänen sind blau (N-terminal), gelb (PLP-bindend) und grau (große Domäne) eingefärbt. Das PLP ist in der Mitte des Kanals am Boden zwischen den Domänen B und C verankert.

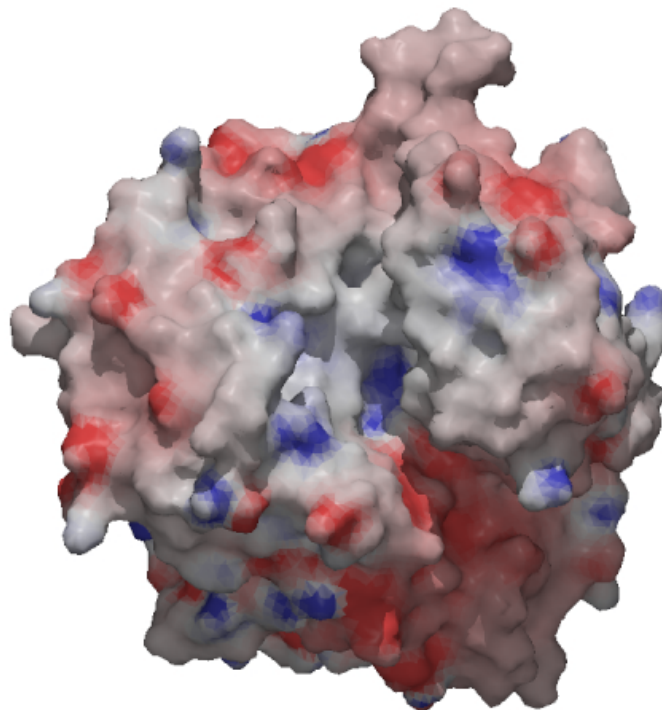


Abb. 4.20

Oberflächenladungsverteilung der TSH. Die Färbung wurde gemäß dem berechneten elektrostatischen Potential zwischen -10 (intensiv rot) und +10 (intensiv blau) variiert. Das Molekül ist in der gleichen Orientierung gezeigt wie in Abb. 4.19.

4.1.9 Architektur des Aktivzentrums von TSH

Der Kofaktor der TSH ist kovalent an Lys124 gebunden und befindet sich an der Grenzfläche zwischen der großen B- und der PLP- bindenden Domäne C inmitten des von beiden Domänen gebildeten Kanals. Die positive Oberflächenladung des Kanal wird v. a. von basischen Aminosäuren aus den Domänen B und C verursacht, die so das negativ geladene Substrat in die aktive Tasche führen. Die Abb. 4.21 zeigt schematisch die Anordnung und die interatomaren Abstände in der aktiven Tasche, Abb. 4.22 das Aktivzentrum und Abb. 4.23 einen Ausschnitt des aktiven Zentrums mit der Elektronendichte um den Kofaktor.

Das Absorptionsmaximum bei 422 nm, das sich auch in einem pH-Bereich von pH 6-9 nicht

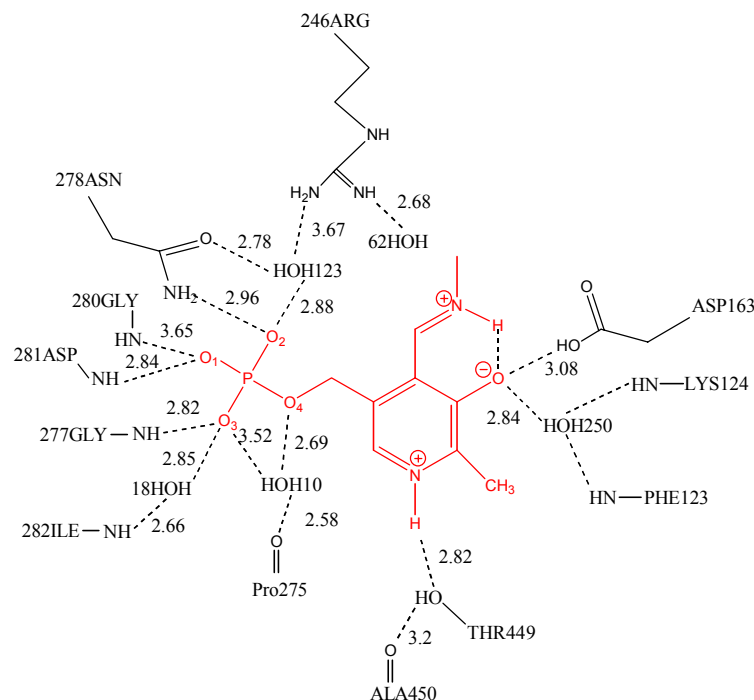


Abb. 4.21

Schematische Darstellung des Aktivzentrums von Threonin Synthase und der Wasserstoffbrücken zwischen dem Protein, Wasser und dem Cofaktor.

wesentlich ändert, läßt auf eine protonierte Form der Schiff Base bei physiologischem pH schließen und deutet weiter an, daß der pK_a der Schiff-Base größer als 9 sein muß. Der Kofaktor der TSH zeigt mit seiner *re*-Seite (bezogen auf das C4') zum Solvenz, wobei der Pyridinring von Ala330, Met331 und His422 auf der dem Solvenz zugewandt und Phe123, das nahezu senkrecht zur Ringebeine des PLP steht, auf der zum Proteininneren zeigenden Seite fixiert wird. Durch diese Anordnung wird eine vertikale Verschiebung des Pyridinrings stark behindert und das PLP fest im Proteinkörper eingepaßt. Die beiden Ringsysteme Phe123 und His422 sind so angeordnet, daß eine Wechselwirkung mit dem π -System des Pyridinrings nicht möglich ist. Der Pyridiniumstickstoff des PLP bildet eine Wasserstoffbrücke mit der Hydroxylgruppe von Thr449, das am Ende von Strang β_n in der Domäne B liegt. Die Hydroxylgruppe von Thr449 wird zusätzlich durch eine Wasserstoffbrücke zur

Carboxylgruppe von Ala450 fixiert und die Methylgruppe von Thr449 zeigt in eine hydrophobe Tasche, die durch Phe123, Leu447 und Pro275 gebildet wird. Die C3 Hydroxylgruppe bildet mit dem protonierten Aldiminstickstoff eine Wasserstoffbrücke, wodurch dessen negative Ladung stabilisiert und gleichzeitig die Schiff Base in einer Ebene mit dem Pyridinring orientiert wird. Durch diese Anordnung der Imingruppe, die ebenfalls charakteristisch für PLP-Enzyme ist, kann das konjugierte π -System erweitert werden. Desweiteren steht die Hydroxylgruppe des PLP zu Asp163 in einem Abstand, der eine Wasserstoffbrücke vermuten läßt, woraus folgt, daß die Carboxylgruppe dieses Aspartats protoniert sein muß. Auch ein Wassermolekül (B-Faktor 38 \AA^2), das von der Amidbindung zwischen Lys124 und Phe123 in Position gehalten wird, bildet eine Wasserstoffbrücke zum O3'. Die Methylgruppe an C2 des Koenzyms hat keinerlei signifikante Interaktion mit der Umgebung und zeigt in eine hydrophobe Tasche, gebildet von Ala450, Phe455 und His422.

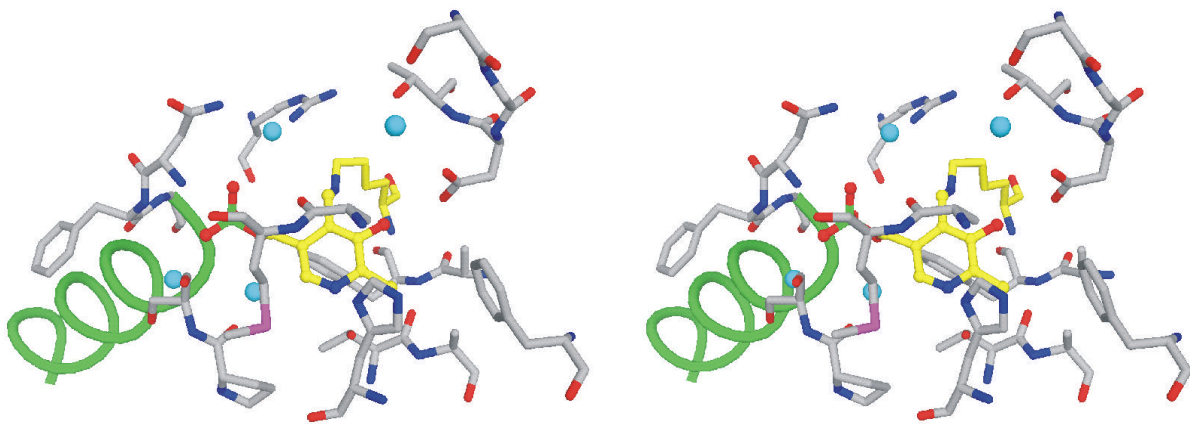


Abb. 4.22

Stereodarstellung des Aktivzentrums der TSH. Das interne Aldimin ist gelb gezeigt, Wassermoleküle in blau und der Makridipol der Helix α 10 ist grün markiert.

Die Phosphatgruppe des Koenzyms bildet dessen Hauptverankerung am Protein und ist an insgesamt acht Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt, die alle mit dem N-terminalen Ende von Helix α 10 bzw. den ihr unmittelbar vorgelagerten Aminosäuren eingegangen werden. Die Hauptketten-Amide von Gly280 und Asp281 am N-Terminus von Helix α 10 bilden je eine Wasserstoffbrücke zum OP1 aus, OP2 wird von Asn278 und einem Wassermolekül komplexiert. Je eine Wasserstoffbrücke wird von Gly277 und einem weiteren Wassermolekül, das von Ile282 fixiert wird, zu OP3 gebildet und OP4 geht mit Pro275 und einem weiteren Wassermolekül zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen ein. Während also der Phosphatanker nur mit Resten aus der Domäne B wechselwirkt, wird die kovalente Verknüpfung vom Kofaktor zum Protein mit der Domäne C hergestellt, eine typische Anordnung bei PLP-Enzymen. Zusätzlich zu den beschriebenen Wasserstoffbrücken wird die negativ geladene Phosphatgruppe durch den positiven Makrodipol von Helix α 10 fixiert.

Auch diese Anordnung ist ein häufig wiederkehrendes Strukturmotiv bei PLP-Enzymen (Jansonius, 1998).

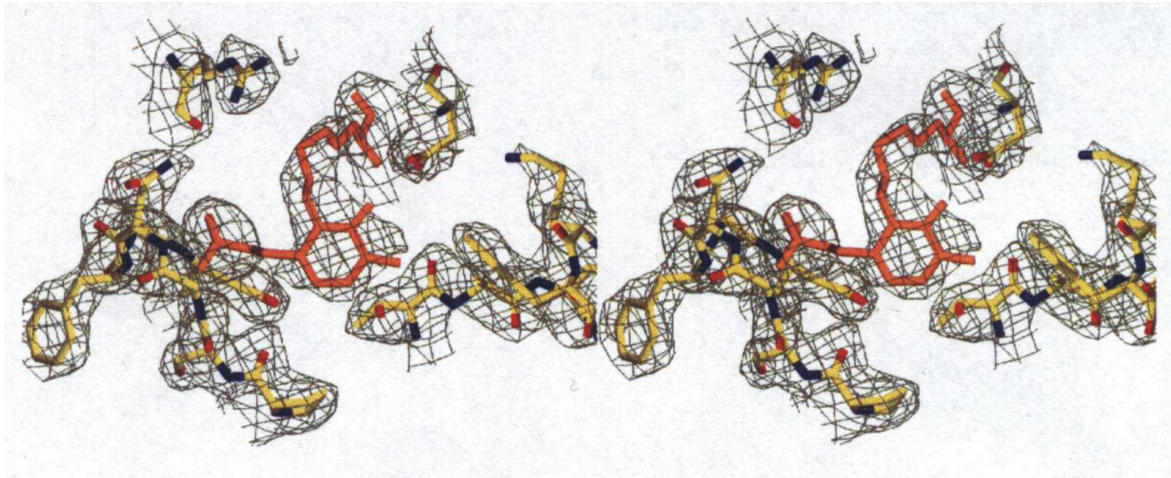


Abb. 4.23

Stereoabbildung des Aktivzentrums mit einer Omicron 2Fo-Fc Elektronendichte um den Kofaktor. Das PLP bindende Lys124 ist orange dargestellt. Die Dichte ist auf 1.0 σ konturiert bei 2.7 Å Auflösung.

4.1.10 Modelling des Enzym/Substrat-Komplex

Um den Reaktionsmechanismus der TSH besser verstehen und die an der Reaktion beteiligten Aminosäuren identifizieren zu können, wurde das Substrat o-Homoserinphosphat zusammen mit der verfeinerten TSH Struktur energieminiert. Dazu wurde der Enzym/Substrat-Komplex als externes Aldimin erzeugt und die α -Carboxylgruppe des Substrats dabei so orientiert, daß sie auf Thr164 zeigt und der Rest des Moleküls in gestreckter Form in der aktiven Tasche lag. Der Enzym/Substrat-Komplex wurde in 1000 Schritten von 127,6 auf 3,4 kcal/mol minimiert und ist in Abb.4.24 gezeigt.

Während der Energieminimierung dreht sich der Pyridinring des PLP leicht um etwa 10°. Die α -Carboxylgruppe von OHSP bildet nun jedoch eine Wasserstoffbrücke zum Thr164 aus. Dieses Threonin ist in allen 30 untersuchten Threonin Synthase Sequenzen konserviert (Abb. 4.11) und ist zweifelsfrei einer der wichtigsten substratbindenden Reste. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung der Substratcarboxylgruppe wird von Ser161 gebildet, das ebenfalls in allen TS-Sequenzen der Unterfamilie 2 konserviert ist. Während der Energieminimierung knickt die Phosphatgruppe des Substrats ab und bildet mehrere neue Wasserstoffbrückenbindungen aus. Zwei der neuen Bindungen werden mit der Guanidiniumgruppe von Arg246 gebildet, die durch elektrostatische Wechselwirkungen noch verstärkt werden. Zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen werden mit Asn240 und mit Ser241 gebildet. Eine fünfte Wasserstoffbrücke bildet der Sauerstoff des Phosphatesters mit Asn278 aus. Alle vier phosphatbindenden Aminosäuren, Asn240, Ser241, Arg246 und

4.2 Threonin Synthase aus *Arabidopsis thaliana*

4.2.1 Expression und Reinigung

Das Gen der TS aus *Arabidopsis thaliana* wurde von der Firma Agrevo in einen pET23(+) Vektor kloniert und für weitere Experimente überlassen. Für die Expression wurden BL21 (DE3) Zellen in einer 12 L *E.coli* Kultur mit 4 Stunden Induktionszeit verwendet. Zellaufschluß und Reinigung wurden wie beschrieben durchgeführt. Die Abb. 4.25 bis 4.29 zeigen die chromatographischen Reinigungsschritte, Abb. 4.30 das Reinigungsgel und Tab. 4.5 die typische Ausbeute.

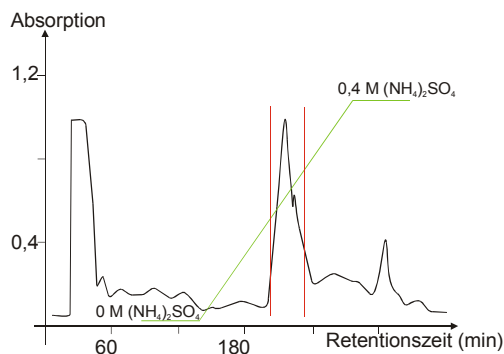


Abb. 4.25 DEAE-Säule

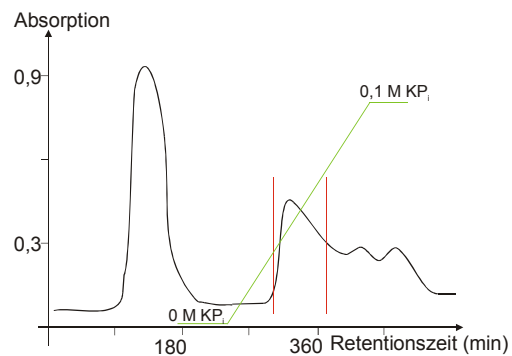


Abb. 4.26 Hydroxylapatit

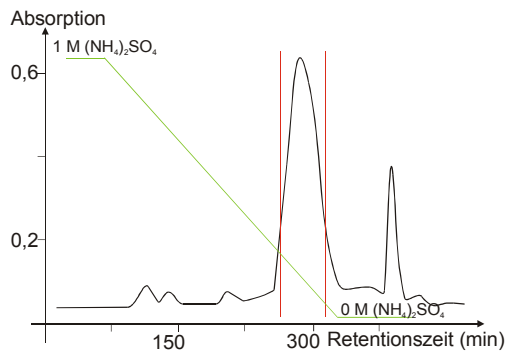


Abb. 4.27 Phenyl-Sepharose

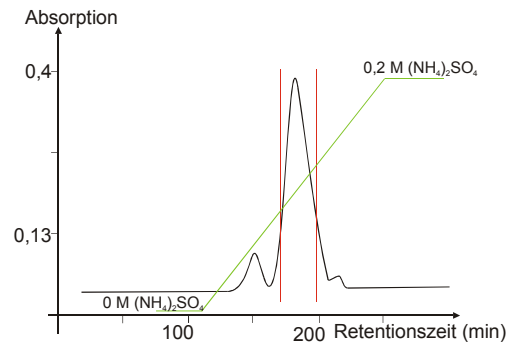


Abb. 4.28 Q-Sepharose

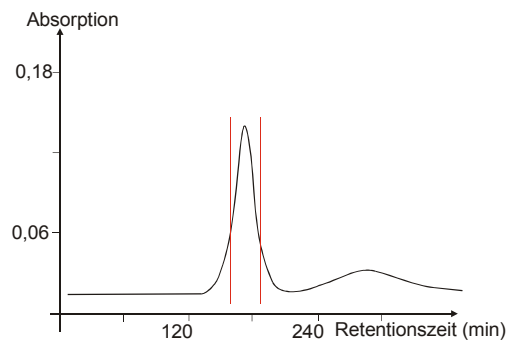


Abb. 4.29 Gelfiltration

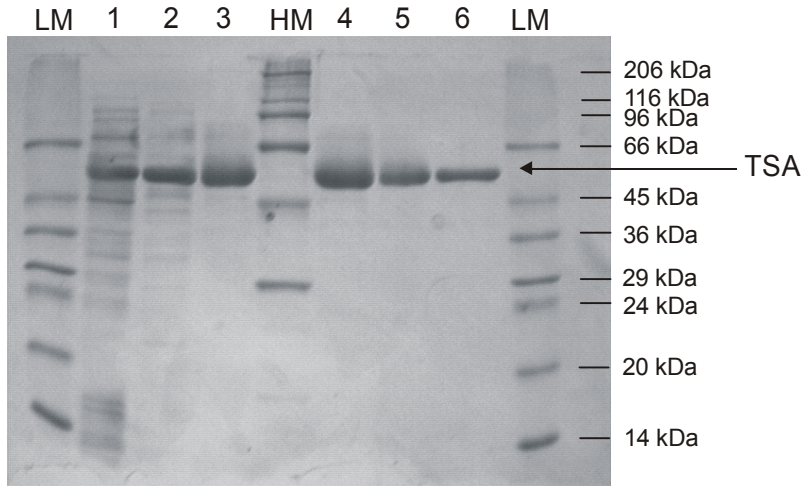


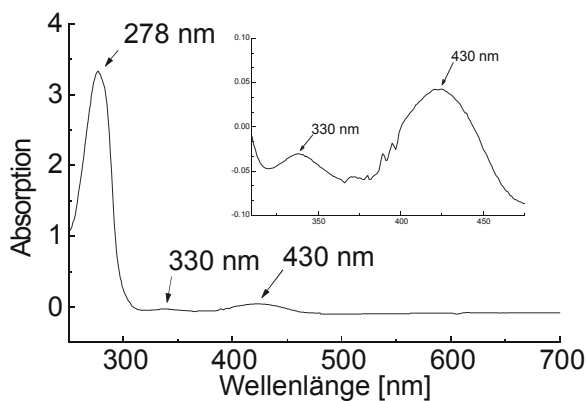
Abb. 4.30
 Reinigungsgel der TSA
 LM: Low Marker
 1: Rohextrakt
 2: DEAE
 3: Hydroxylapatit
 HM: High Marker
 4: Phenyl-Sepharose
 5: Q-Sepharose
 6: Gelfiltration

Tab. 4.5 Ausbeute der TSA-Reinigung

	V[ml]	c_p [mg/ml]	m_p [mg]
Rohextrakt	160	8,18	1310
DEAE	120	1,79	245
Hydroxylapatit	150	2,33	350
Phenyl-Sepharose	90	2,33	210
Q-Sepharose	80	1,56	125
Gelfiltration	50	2,0	100

4.2.2 Charakterisierung

4.2.2.1 UV/VIS-Spektrum



Das gereinigte Protein zeigte neben der Absorption bei 280 nm auch Maxima bei 330 nm und 420 nm, das Verhältnis der Absorptionen A_{278}/A_{430} lag zwischen 25 und 33.

Abb. 4.31
 UV/VIS-Spektrum der TSA

4.2.2.2 Molekularmassenbestimmung

Das SmartSystems (Amersham Pharmacia, Freiburg) mit der geeichten Superose12 Säule zeigte den hohen Reinheitsgrad des Enzyms (Abb. 4.32) und lieferte, bedingt durch die

kurze Retentionszeit, einen deutlichen Hinweis darauf, daß die TSA in Lösung nicht als Monomer vorliegt. Die experimentell bestimmte Masse betrug 149 kDa (Abb. 4.33).

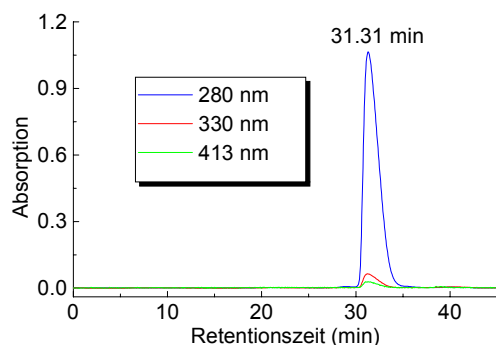


Abb. 4.32 Smart-Chromatogramm der TSA

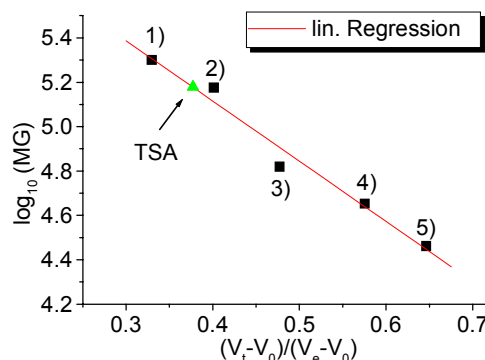


Abb. 4.33 Massenbestimmung mit Smart
1) 200 kDa 2) 150 kDa 3) 66 kDa
4) 45 kDa 5) 29 kDa

Die Massenbestimmung mittels SDS-PAGE lieferte ein Masse von 55,8 kDa, die gut mit der berechneten Masse von 53,5 kDa pro Monomer übereinstimmt (Abb.4.34).

Der Edmann-Abbau lieferte die korrekte N-terminale Sequenz (zehn Aminosäuren) der TSA.

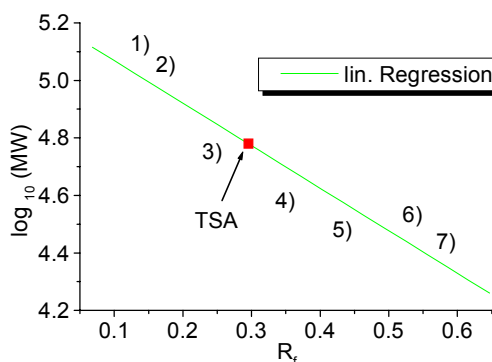


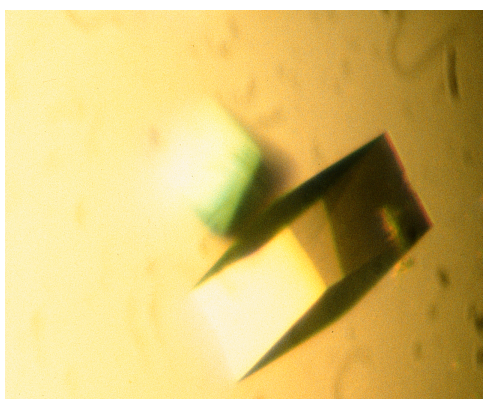
Abb. 4.34 Massenbestimmung der TSA mit SDS-PAGE
1) 66 kDa 2) 45 kDa 3) 36 kDa
4) 29 kDa 5) 24 kDa

4.2.3 Sequenzanalyse

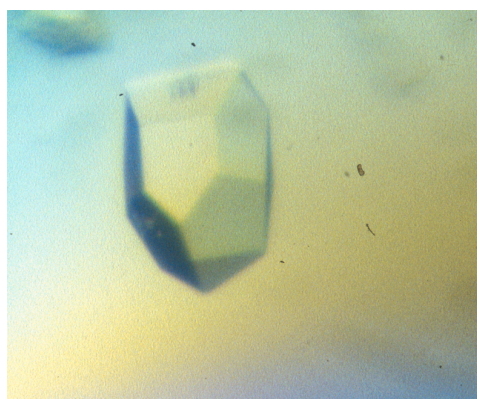
Die TS aus *Arabidopsis thaliana* besteht aus 487 Aminosäuren und zählt nach dem Sequenzalignment zur Unterfamilie 1 der Threonin Synthasen (Abb. 4.11). Besonders auffällig ist der rund 80 Aminosäuren große N-terminale Überhang des *Arabidopsis* Enzyms im Vergleich zu den Enzymen der Unterfamilie 2. Gegenüber den Enzymen der Unterfamilie 1 beträgt der Unterschied sogar über 100 Aminosäuren. Nur die Sequenzen der anderen beiden Pflanzen *S.tuberosum* und *G.max* zeigen einen ähnlich langen N-Terminus wie das *Arabidopsis* Enzym. Detaillierte Untersuchungen mit N-terminal verkürztem Protein (Curien *et al.*, 1998; Laber *et al.*, 1999) lassen darauf schließen, das die Funktion der allosterischen Aktivierbarkeit bei dem *A.thaliana* Enzym auf seinem verlängerten N-Terminus basiert.

4.2.4 Kristallisation

Die Kristalle der TSA wurden mit der Dampfdiffusionsmethode bei 4°C gezüchtet. Eine Bedingung aus den verwendeten Testreihen führte zu kristallinem Material, die nach der Optimierung rhomboedrische, farblose Kristalle ergab (Nativ I). Diese Kristalle wuchsen im *hanging drop* nach ca. 10 bis 14 Tagen zu einer Größe von bis zu $400 \times 200 \times 200 \mu\text{m}^3$. Eine weitere Bedingung konnte durch die Entwicklung eigener Testreihen mit PEG_{Monomethylether}2000 gefunden werden. Diese lieferte allerdings nur dann größere Kristalle, wenn mit Hilfe von *Microseeding* unter Verwendung eines Kaninchen-Tasthaares ca. 48 Stunden nach Ansetzen des Tropfens die Kristallkeimung unterstützt wurde. Die dabei erhaltenen Kristalle wuchsen im *sitting drop* bis zu einer Größe von $550 \times 450 \times 300 \mu\text{m}^3$ heran und waren deutlich gelb gefärbt, hatten aber keinen einheitlichen Habitus.



Nativ I mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



Nativ II mit PEG_{Monomethylether}2000

Abb. 4.35

Kristalle der TSA. Beide Aufnahmen wurden mit polarisiertem Licht gemacht.

Die Nativ I Kristalle streuten etwas besser als die Nativ II Kristalle, wiesen aber auch eine deutlich höhere Mosaitzität von $\approx 2^\circ$ auf. Außerdem war bei den Nativ I Kristallen aufgrund der Farblosigkeit nicht klar, ob sie noch PLP enthalten oder nicht. Es wurde daher eine intensive Schwermetallderivatsuche mit den Nativ II Kristallen unternommen. Unter Verwendung verschiedener anorganischer Verbindungen mit Pt, Hg, U, Re, Er, Tb, Yb, Os in unterschiedlichen Konzentrationen und Soakzeiten wurden mehrere Datensätze aufgenommen und ausgewertet. In keinem Fall jedoch konnte ein Derivat identifiziert werden. Als ebenso problematisch erwies sich der Versuch, die Kristalle einzufrieren, um sie am Synchrotron vermessen zu können. Intensive Tests mit Glycerin, Glycol, Peg 200 und 400, hochkonzentrierten Phosphat-, Glukose- oder auch Peg_{monomethylether}2000-Lösung als Cryoprotektanz im Kristallisationspuffer führten zwar alle zu brauchbaren Cryopuffern, jedoch zerstörten diese die Kristalle entweder vollständig oder aber die Streukraft ließ so stark nach ($>8 \text{ \AA}$), das eine Vermessung sinnlos war.

Tab. 4.6 Zellparameter und Kristallisationsbedingungen der TSA

Protein	Raumgruppe	Zelle (Å)	V_m (Å ³ /Da)	N_{au}	d (Å)	Kristallisationsbedingung
Nativ I	P222	a=61,7 b=105,5 c=146,5 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	2,22	4	3,3	100 mM Hepes/NaOH pH 7,8 1,7 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 4°C 3 µl : 1,5 µl Protein : Reservoir (<i>LinbroPlate</i>)
Nativ II	P322 ₁	a=113,6 b=113,6 c=155,2 $\alpha=\beta=90^\circ$ $\gamma=120^\circ$	2,7	4	3,5	10 mM Tris/HCl pH 9,2 18 % PEG _{Monomethylether} 2000 4°C 3 µl : 1,5 µl Protein : Reservoir (<i>CrysChem</i>)

V_m : Matthews Koeffizient, Verhältnis aus Volumen und Gewicht des Proteins in der Einheitszelle (Matthews, 1968)

N_{au} : Anzahl der Monomere in der asymmetrischen Einheit

d: Auflösung

Die Proteinkonzentration betrug 8 mg/ml (Nativ I) bzw. 10 mg/ml (Nativ II). In beiden Bedingungen wurde das Protein mit 10 µM SAM (Endkonzentration) prä-inkubiert (30 min).

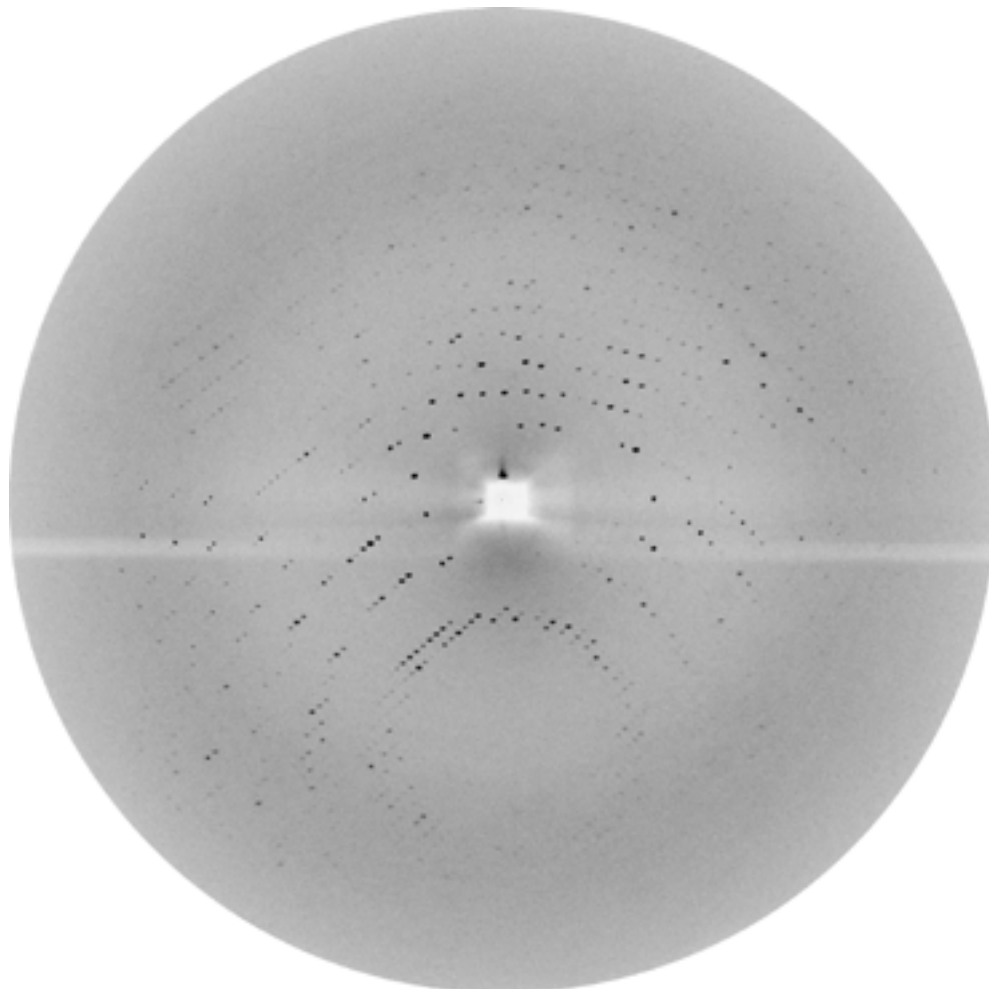


Abb. 4.36

1° Rotationsaufnahme eines TSA Kristalls (Nativ I) bei Raumtemperatur auf der Drehanode. Der Kristall zu Plattenabstand beträgt $d=260$ mm und die Wellenlänge $\lambda=1,5418$ nm (entspricht einer maximalen Auflösung am Plattenrand von 3,0 Å).

Tab. 4.7 Datensammlung der TSA

Datensatz	Auflösung (Å)	Anzahl der Reflexe beobachtet	Anzahl der Reflexe unabhängig	R_{merge} (%)	Vollständigkeit gesamt	Vollständigkeit letzte Schale
Nativ I	3,3	88509	12608	13,7	90,1	80,4
Nativ II	3,5	116868	14205	14,2	98,6	97,3

Die letzte Auflösungsschale für Nativ I Kristalle war 3,4 – 3,3 Å und für Nativ II 3,6 – 3,5 Å

4.3 Threonin Synthase aus *Thermotoga maritima*

4.3.1 Klonierung

TS aus *Thermotoga maritima* konnte nach der vollständigen Sequenzierung des Organismus (Nelson *et al.*, 1999) bearbeitet werden, indem die Sequenz der *Thermotoga maritima* (<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR/report.spl?db=btm&orf=TM0546>) nach Homologien zur TS aus *Bazillus* mit Hilfe des Programmpaketes GCG (1997) durchsucht wurde. Der identifizierte Abschnitt wurde zum *Primerdesign* für die PCR verwendet. Die PCR auf *T.maritima* DNA (erhalten von Jens Kaiser) ergab ein Gen, daß einem pET22b(+) Vektor einkloniert, daß entsprechende Protein exprimierte.

4.3.2 Expression und Reinigung

Die Expression der TS aus *Thermotoga maritima* wurde wie in den Abschnitten 3.2.1.4 und 3.2.1.5 beschrieben in einer 10 L *E.coli* Kultur mit einer Induktionszeit von 6 Stunden durchgeführt. Nach dem Zellaufschluß und einer Hitzedenaturierung (90°C für 30 Minuten) schlossen sich die in Abb. 4.37 bis 4.39 gezeigten chromatographischen Reinigungsschritte an. Das erzielte Reinheitsgrad ist auf einem Gel in Abb. 4.40 dokumentiert und die Ausbeute in Tab. 4.8.

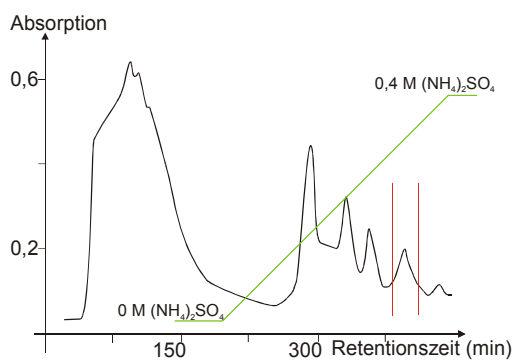


Abb. 4.37 DEAE-Säule

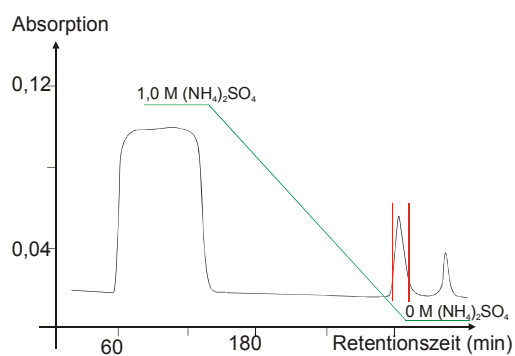


Abb. 4.38 Phenyl-Sepharose-Säule

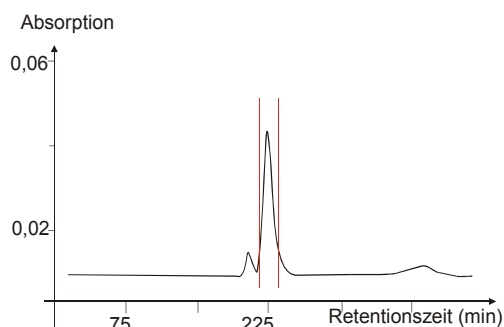


Abb. 4.39 Gelfiltrationssäule

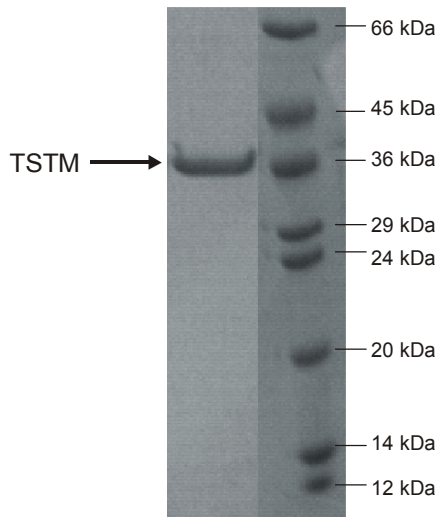


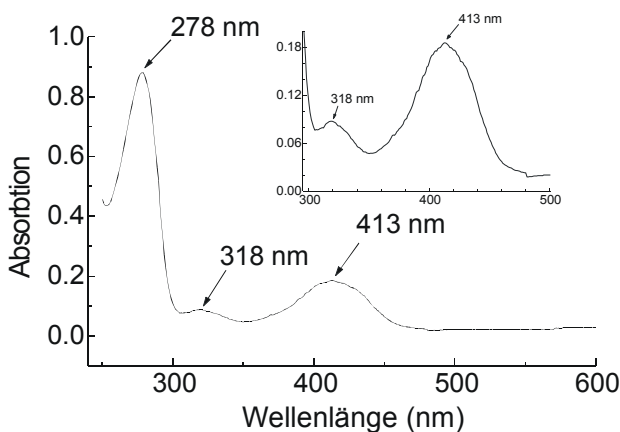
Abb. 4.40
Reinigungsgel der TSTM
 Deutlich zu erkennen ist das Fehlen jeglicher Verunreinigung. Die hier angewandte Proteinpräparation führte zu einem besonders sauberen Protein.

Tab. 4.8 Ausbeute der TSTM Reinigung

	V[ml]	c _p [mg/ml]	m _p [mg]
Rohextrakt	160	6,4	1023
Hitzenaturierung	160	0,75	120
DEAE	110	0,3	35
Phenyl-Sepharose	40	0,4	16
Gelfiltration	20	0,35	7

4.3.3 Charakterisierung

4.3.3.1 UV/VIS-Spektrum



Das gereinigte Protein zeigte neben der Absorption bei 278 nm auch Maxima bei 318 nm und 413 nm, das Verhältnis der Absorptionen A_{280}/A_{413} lag zwischen 4,5 und 5,0.

Abb. 4.41 UV/VIS-Spektrum der TSTM

4.3.3.2 Molekularmassenbestimmung

Das SmartSystems von Pharmacia mit der geeichten Superose12 bzw. Superdex75 Säule zeigte den hohen Reinheitsgrad des Enzyms (Abb. 4.42) und lieferte mit der großen Retentionszeit einen deutlichen Hinweis darauf, daß auch die TS aus *T.maritima* wie das

Hefe-Enzym in Lösung als Monomer vorliegt. Die experimentell bestimmte Masse betrug 34,4 kDa (Abb. 4.43).

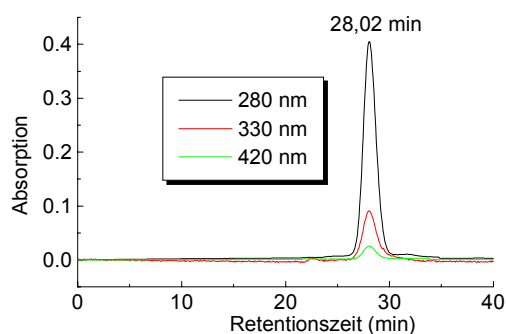


Abb. 4.42 Smart-Chromatogramm der TSTM auf einer Superdex75

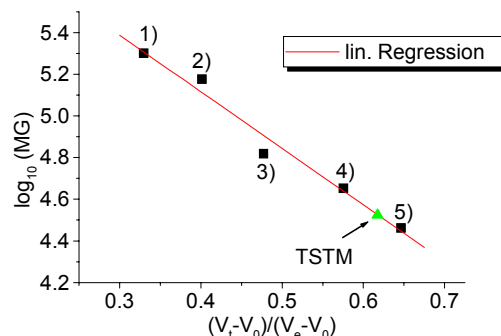


Abb. 4.43 Massenbestimmung TSTM mit Smart

1) 200 kDa 2) 150 kDa 3) 66 kDa
4) 45 kDa 5) 29 kDa

Die Massenbestimmung mittels SDS-PAGE ergab eine Masse von 38,0 kDa, die sehr gut mit dem berechneten Wert von 37,7 kDa übereinstimmt (Abb. 4.44). Das MALDI-MS ergab ein Gewicht von 37764 Da und der Edman-Abbau lieferte die korrekte N-terminale Sequenz (zehn Aminosäuren) der TSTM.

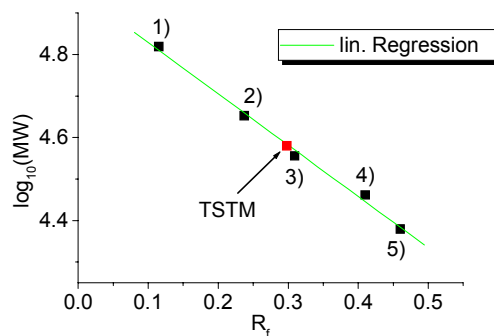


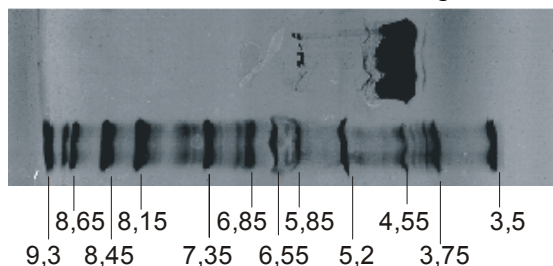
Abb. 4.44 Massenbestimmung der TSTM mit SDS-PAGE

1) 66 kDa 2) 45 kDa 3) 36 kDa
4) 29 kDa 5) 24 kDa

4.3.3.3 Isoelektrischer Punkt

Der Bestimmung des isoelektrischen Punktes mit dem PhastSystem ergab einen pI von etwa 4,6 (berechnet 6,48).

Abb. 4.45 Isoelektrische Fokussierung der TSTM



4.3.4 Sequenzanalyse

Die TS aus *Thermotoga maritima* besteht aus 348 Aminosäuren und zählt nach dem Sequenzalignment (Abb. 4.11) zur Unterfamilie 1. Von allen in dieser Arbeit untersuchten Threonin Synthasen ist das Enzym aus *T.maritima* am kürzesten. Hervorzuheben ist nicht nur das Fehlen des verlängerten N-Terminus, sondern, daß die TSTM zusammen mit den Bacillus Enzymen den kürzesten N-terminalen Abschnitt aller Threonin Synthasen überhaupt aufweist.

4.3.5 Kristallisation

Die Kristalle der TSTM wurden mit der Dampfdiffusionsmethode bei 20°C gezüchtet. Zwei Bedingungen aus den verwendeten Testreihe führten zu kleinen, z.T. verwachsenen

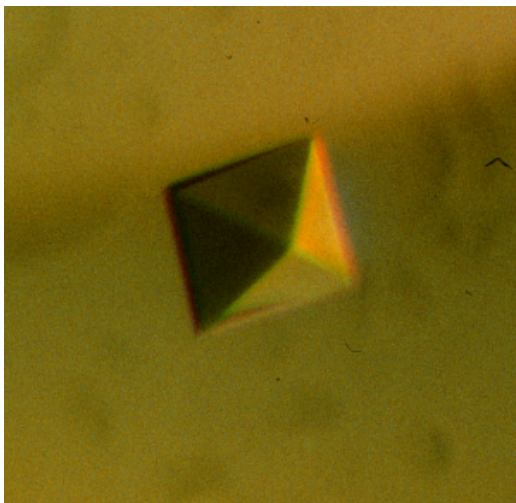


Abb. 4.46
Nativ II Kristall der TSTM, aufgenommen unter polarisierendem Licht

Kristallen und mußten weiter optimiert werden, eine Übersicht zu den optimierten Bedingungen gibt Tab. 4.9. Die erste Bedingung (Nativ I) ergab nach ca. 4 Tagen verwachsene Kristallplatten deren Bruchstücke z.T. vermessen werden konnten. Die Lebensdauer dieser Kristalle war allerdings begrenzt, sie betrug nur wenige Tage, bevor sie sich wieder verflüssigten. In der zweiten Bedingung (Nativ II) hingegen wuchsen nach ca. 3 - 4 Wochen stabile, quadratisch-bipyramidale Kristalle mit den Abmessungen von ca. $50 \times 50 \times 50 \mu\text{m}^3$, die sich nur am Synchrotron mit einer Auflösung von 3 Å vermessen ließen, da ihre Streukraft

auf der Drehanode zu gering war. Als Cryopuffer diente der Kristallisationspuffer mit einem Zusatz von 12 % Peg 400.

Tab. 4.9 Zellparameter und Kristallisationsbedingungen der TSTM

Protein	Raumgruppe	Zelle (Å)	V_m (Å ³ /Da)	N_{au}	d (Å)	Kristallisationsbedingung
Nativ I	P1	a=60,83 b=101,18 c=189,40 α =83,54 β =85,73 γ =73,68	3,68	4	3,4	100 mM Mes/Tris pH 8,5 3,8 M (NH ₄) ₂ SO ₄ (auf pH 8 eingestellt) RT Additiv: 100% PEG 200 4 µl : 3 µl : 0,5 µl Protein : Reservoir : Additiv (CrysChem)

Fortsetzung **Tab. 4.9**

Protein	Raum- gruppe	Zelle (Å)	V_m (Å ³ /Da)	N_{au}	d (Å)	Kristallisationsbedingung
Nativ II	I222	a=124,91 b=124,37 c=176,74 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	2,28	4	3,0	100 mM Citrat pH 5,5 14 % PEG 8000 RT 3 μ l : 1,5 μ l Protein : Reservoir (CrysChem)

V_m : Matthews Koeffizient, Verhältnis aus Volumen und Gewicht des Proteins in der Einheitszelle (Matthews, 1968)
 N_{au} : Anzahl der Monomere in der asymmetrischen Einheit
d: Auflösung
Die Proteinkonzentration betrug bei beiden Bedingungen 6 mg/ml

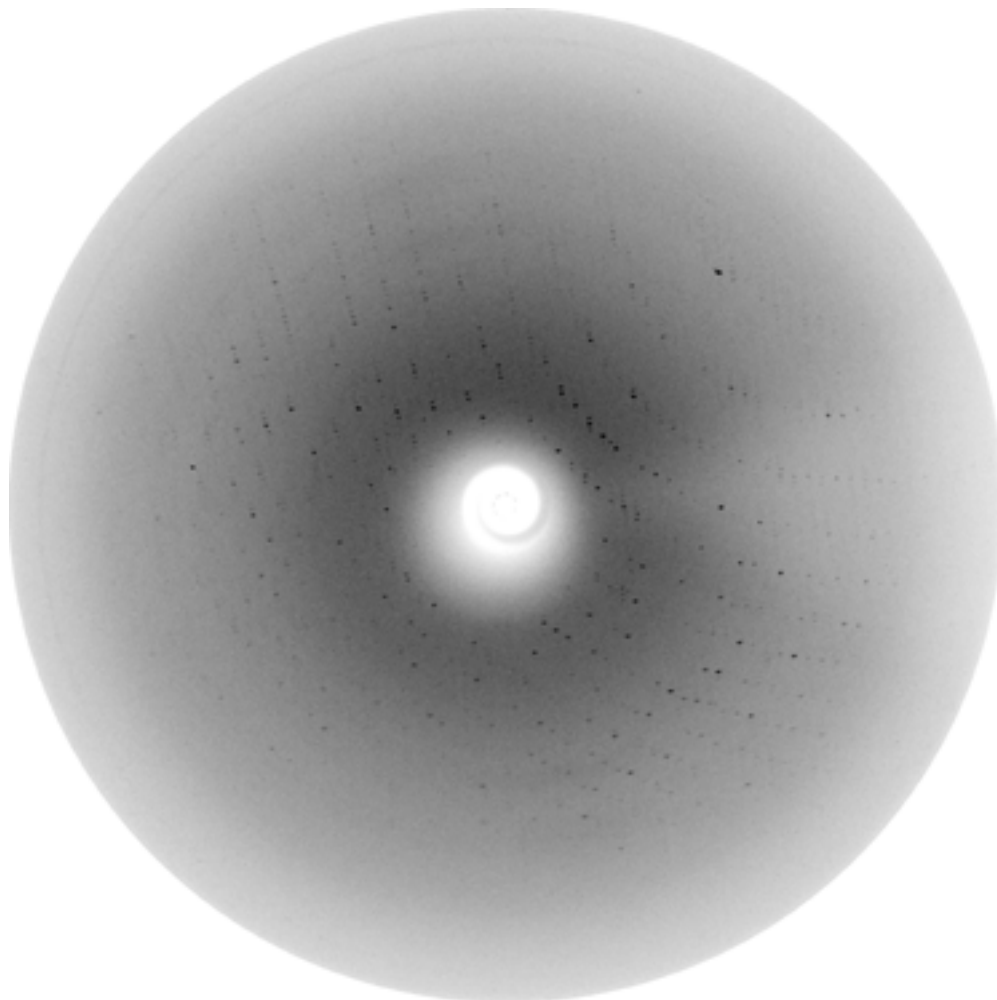


Abb. 4.47

0,5° Rotationsaufnahme eines TSTM Kristalls (Nativ II) bei 100K am Synchrotron. Der Kristall zu Plattenabstand beträgt $d=165$ mm und die Wellenlänge $\lambda=1.099987$ nm (entspricht einer maximalen Auflösung am Plattenrand von 3,0 Å)

Tab. 4.10 Datensammlung TSTM

Datensatz	Auflösung (Å)	Anzahl der Reflexe beobachtet	Anzahl der Reflexe unabhängig	R_{merge} (%)	Vollständigkeit gesamt	Vollständigkeit letzte Schale
Nativ II	3,0	226342	27325	7,8	99,6	99,5

Die letzte Auflösungsschale war 3,11 – 3,0 Å

5 Diskussion

Eine umfassende biochemische Charakterisierung und die sich daran anschließende Kristallisation erfordert i.d.R. eine große Menge des Zielproteins, die häufig nicht durch eine native Aufreinigung bereitgestellt werden kann. In dieser Arbeit wurde daher der Ansatz über die rekombinante Expression der Zielmoleküle in *E.coli* gewählt, der es ermöglichte, alle drei bearbeiteten Threonin Synthasen in ausreichender Menge und hoher Reinheit bereitzustellen.

5.1 Threonin Synthase aus *Saccharomyces cerevisiae*

5.1.1 Expression und Reinigung der TSH

Die Firma Agrevo stellte einen Klon zur Verfügung, der das TSH-Gen in einem pDR 540 Vektor enthielt und in *E.coli* JM103 Zellen transformiert war. In dieser Kombination wurde TSH jedoch zusammen mit Tryptophanase und Galaktokinase, beides *E.coli* Enzyme, koexprimiert. Für eine selektivere Expression der TSH im Hinblick auf die Verwendung von Selenomethionin wurde das TSH-Gen daher in einen pET22(+)-Vektor umklont und in *E.coli* BL21(DE3) Zellen transformiert. Diese Maßnahme führte zu einer starken Reduktion der Koexpression und der Klon enthielt als einziges stark überexprimiertes Protein nur noch die Threonin Synthase der Hefe. Die Ausbeute an hochreinem Protein war ausreichend groß, um intensiv nach geeigneten Kristallisationsbedingungen suchen zu können.

In dieser Arbeit ist Threonin Synthase aus Hefe zum erstenmal überhaupt gereinigt worden. Das etablierte Reinigungsschema ist mit den kommerziell erhältlichen Säulenmaterialien leicht nachzuarbeiten. Die Besonderheit der Reinigung ist die „negative“ Verwendung der DEAE-Säule, bei der TSH im Durchlauf enthalten ist. Dies hat einerseits einen großen Aufreinigungseffekt, da viele verunreinigende Proteine an der Säule gebunden werden und führt andererseits zu einer erheblich verkürzten Nutzungsdauer der Säule, so daß schon am ersten Tag einer Reinigung nach dem Zellaufschluß die DEAE- und die Phenylsepharose - Säule eingesetzt werden kann. Die Reinigung des Enzyms ist so innerhalb von drei bis vier Tagen möglich. Die Kontrolle der Anreicherung wurde mit SDS-PAGE durchgeführt, ein strenges *Poolen* der Fraktionen, bei dem nur auf deren Reinheit geachtet wurde, ergab dennoch stets eine ausreichende Menge Protein.

Die Expression und Reinigung des mit Selenomethionin dotierten Proteins wurde nach denselben Protokollen durchgeführt wie beim nativen Material. Das Wachstum der Zellen auf dem Minimalmedium war jedoch gegenüber dem im LB-Medium deutlich verlangsamt, was zu einer stark verlängerten Wachstumsphase führte (statt 4-5 Std. nun ca. 24 Std.), bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,7 erreicht war. Die Induktionszeit blieb mit ca. 4 Std. unverändert. Beide

Faktoren, das verlangsamte Wachstum im Minimal Medium bei unveränderter Induktionszeit, sind wahrscheinlich die Ursache für die erheblich geringere Ausbeute von nur rund einem Drittel des nativen Materials.

5.1.2 Kristallisation und Verfeinerung der TSH-Struktur

Ein besonderes Problem der Strukturbestimmung von Threonin Synthase aus Hefe war das Kristallisationsverhalten. Alle Versuche, die Kristallisation dahingehend zu beeinflussen, daß aus einem identischen Set von 24 Tropfen nicht nur in ein oder zwei Ansätzen und manchmal sogar in keinem einzigen, brauchbare Einkristalle wuchsen, schlugen fehl. Es konnte kein Additiv identifiziert werden, daß einen wesentlichen Erfolg brachte, *Mikro-* wie *Makroseedling* waren ebenso erfolglos wie die Suche mit eigenen Testreihen, so daß eine intensive Derivatsuche für die MIR-Methode nicht möglich war. Erst der Ansatz mit einer MAD-Messung an Selenomethionin dotiertem Protein führte zur erfolgreichen Strukturaufklärung.

Der am Synchrotron vermessene Kristall war mit einer Größe von ca. $50 \times 40 \times 15 \mu\text{m}^3$ nur der Splitter eines größeren Kristalls, der aber selbst nur eine unzureichende Streukraft besaß. Trotzdem konnten an der *Beamline* drei vollständige Datensätze mit einer Auflösung von 2,7 Å vermessen werden, mit denen die Identifizierung der Selenlagen auf Anhieb gelang. Ein zuvor ebenfalls am Synchrotron vermessener Kristall des SeMet-Proteins streute zwar bis zu einer Auflösung von 2,15 Å, jedoch gelang es wegen der sehr hohen Mosaizität von $>1,5^\circ$ nicht, die Selenlagen zu identifizieren. Diese Aufnahmen wurden auf einem CCD-Detektor mit $0,3^\circ$ Winkelinkrementen aufgenommen. Auch in einem späteren Stadium der Strukturlösung konnten diese hochaufgelösten Daten nicht verwendet werden. Zwar ließen sie sich noch mit dem Programm AmoRe (Navarza, 1994) an die Daten mit 2,7 Å Auflösung anpassen, das resultierende Modell konnte jedoch nicht weiter als bis zu einem *R*-Faktor von ca. 28 verfeinert werden. Daher wurden diese Daten, obwohl sie besser aufgelöst waren, nicht weiter verwendet.

Das Modell der TSH konnte bis zu einem *R*-Faktor von 21,7% verfeinert werden bei einem R_{free} von 25,2%. Einige Bereiche der Struktur sind jedoch nicht bestimmbar gewesen. So fehlen die Reste 146-151, 228-233 sowie 513-514. Die ersten beiden Abschnitte sind *Loops*, die Helices oder β -Faltblätter miteinander verbinden, der dritte Abschnitt sind die beiden C-terminalen Aminosäuren. Betrachtet man die Region, in der diese Reste liegen, wird schnell klar, warum sie schlecht definiert sind: Sie liegen alle in einer flexiblen Region, die in hohem Maße dem Solvenz ausgesetzt ist. Es ist daher nicht verwunderlich, daß diese *Loops* selbst in gefrorenem Zustand nicht sichtbar sind, da ihre verschiedenen Konformationen statistisch über den gesamten Kristall verteilt sind und sich dadurch herausmitteln. Es ist jedoch anzumerken, daß alle drei Abschnitte keine katalytisch wichtigen Reste beinhalten, so daß

auch die Kenntnis ihrer genauen Position keine neuen Einsichten in die TSH Struktur bieten würde.

5.1.3 Vergleich der TSH mit verwandten Strukturen

Mit Hilfe des DALI Programms (<http://www.ebi.ac.uk/dali/>) wurde die Struktur der Threonin Synthase aus Hefe mit allen anderen in der *Protein Data Bank* (Bermann *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>) hinterlegten Strukturen verglichen. Wie erwartet, wurden die höchsten Übereinstimmungen mit den drei bisher bekannten Strukturen des Faltungstyp II gefunden, obwohl sie eine nur sehr niedrige Sequenzhomologie aufweisen. Im einzelnen ergaben sich *z-scores* von 27,4 für die Threonin Deaminase (TD), 27,0 für die *o*-Acetyl-Sulfhydrylase (OASS) und 22,3 für die β -Einheit von Tryptophan Synthase (TRPS β). Die Superposition dieser Enzyme mit TSH im Programm O (Jones & Kjeldgaard, 1991) ergab eine *rms*-Abweichung von 2,1 Å mit 251 C α -Atomen für TD, 2,05 Å mit 245 C α -Atomen für OASS und 2,05 Å mit 233 C α -Atomen für TRPS β . Für einen detaillierten Strukturvergleich wurde das Monomer von TD gewählt, da sie größte strukturelle Homologie zur TSH aufweist, obwohl TD nativ als Homotetramer vorliegt.

Große Teile der inneren Struktur der TSH wie die Helices α 5 bis α 11 und α 15 bis α 17, die β -Faltblätter β c bis β k sowie β m und β n, die zentrale Elemente der Domänen B und C darstellen, sind in den beiden Strukturen konserviert und rechtfertigen somit auch die Zuordnung der Threonin Synthase zum Faltungstyp II (Abb. 5.1).

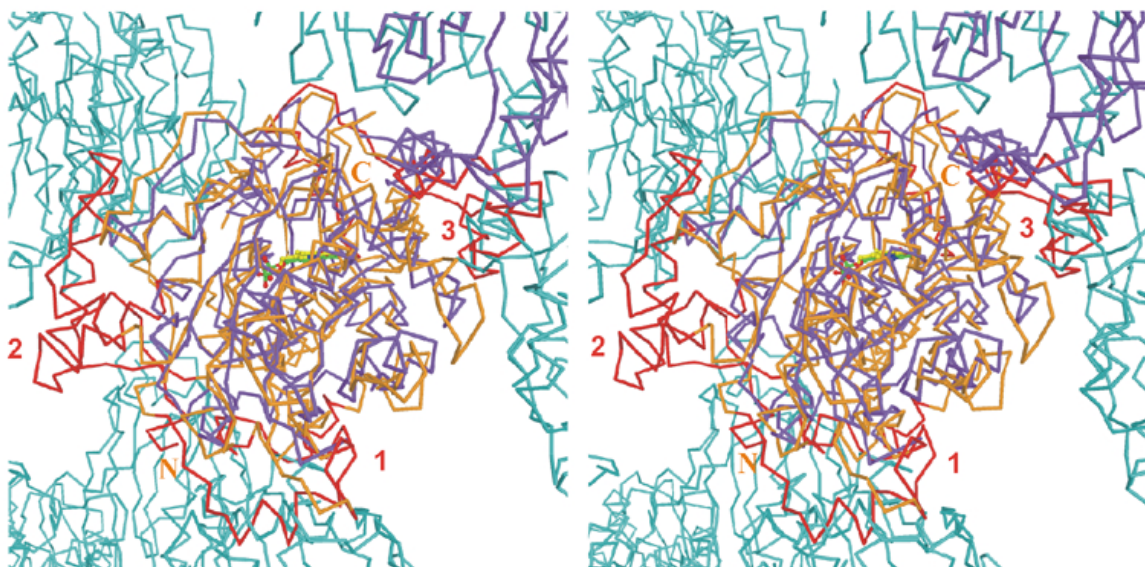


Abb. 5.1

Superposition der TSH (orange) mit dem Tetramer der Threonin Deaminase (lila). Die Kofaktoren sind in gelb bzw. grün eingezeichnet. Das Tetramer der TD ist blau. Die drei stark unterscheidenden Regionen sind (rot markiert): I Aminosäuren 1-20, II α 13, α 14, β I, III α 18-20, β o

In TSH finden sich jedoch noch weitere Sekundärstrukturen, auf die näher eingegangen werden muß.

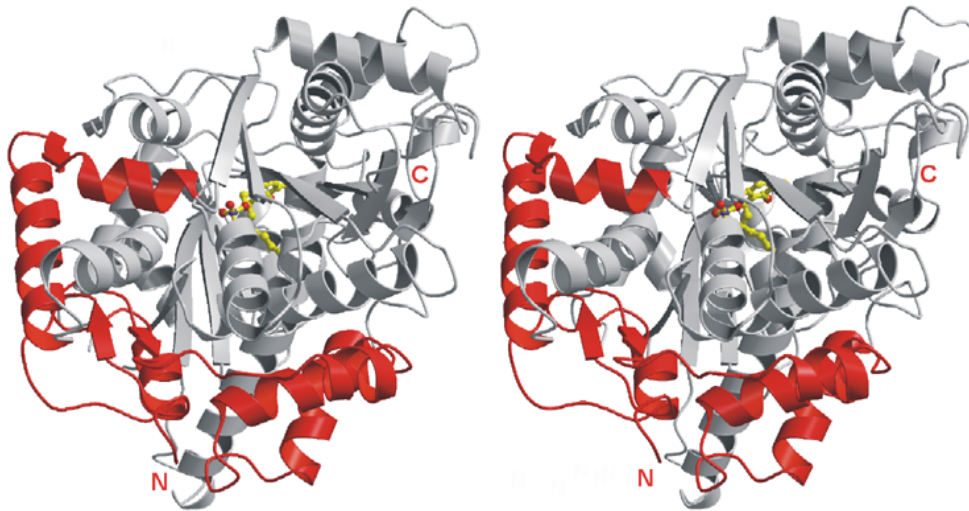


Abb. 5.2

Stereodarstellung der TSH als Ribbon-Plot. Die „Extra-Sekundärstrukturen“ sind in rot hervorgehoben. Die Orientierung des Moleküls ist die gleiche wie in Abb. 5.1.

Am C-terminalen Ende der TSH befinden sich die Helices $\alpha 18$, $\alpha 19$ und $\alpha 20$ sowie der β -Strang $\beta 0$. Diese „zusätzlichen“ Sekundärstrukturelemente liegen genau da, wo in der TD die Monomer-Monomer-Kontakte erfolgen. Die Reste 12 bis 20 mit dem Strang βa sowie die Aminosäuren 346 bis 384 mit den Helices $\alpha 13$ und $\alpha 14$ und dem Strang $\beta 1$ schirmen in der TSH die Fläche ab, an der in der TD die Dimer-Dimer-Kontakte erfolgen. Außerdem ist die Helix $\alpha 5$ und der sich anschließende *Loop* in der TSH, die mit der Helix $\alpha 3$ in TD korrespondiert, im Hefeenzym 13 Aminosäuren länger. Diese im TSH-TD Vergleich gemachten Aussagen lassen sich auch auf die anderen beiden Faltungstyp II Enzyme übertragen. So läßt sich insgesamt feststellen, daß genau in den Bereichen, in denen die Dimerisierung bei der OASS und der TRPS β bzw. die Tetramerisierung bei der TD erfolgen, bei der Threonin Synthase aus Hefe „Extra-Sekundärstrukturen“ diese Oligomerisierung verhindern und so TSH stets als monomeres Enzym vorkommt. Besonders bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß die genannten „Extra-Strukturen“ in der Unterfamilie 2 der Threonin Synthase hoch konserviert sind. Nur bei drei Vertretern (*E.coli*, *H.influenzae* und *S.marcescens*) fehlt die $\alpha 13$ - $\beta 1$ - $\alpha 14$ Sequenz. Gallagher und Mitarbeiter haben nach der Analyse der Threonin Deaminase (1998) vermutet, daß alle Enzyme des Faltungstyp II über eine identische Architektur des Aktivzentrum verfügen und möglicherweise auch eine ähnliche Quartärstruktur aufweisen. Mit der vorliegenden Arbeit ist jedoch eindeutig geklärt, daß es auf keinen Fall eine gemeinsame Quartärstruktur aller Faltungstyp II Enzyme gibt. Statt dessen ist die Struktur der TSH das erste strukturell

charakterisierte Monomer aller PLP-Enzyme, also sämtlicher bekannter Faltungstypen überhaupt.

Alle drei bislang charakterisierten Faltungstyp II Enzyme enthalten eine regulative Domäne (TD und OASS) bzw. eine zusätzliche Syntheseinheit (TRPS) die in der Literatur hinreichend beschrieben sind (Gallagher *et al.*, 1998; Burkhard *et al.*, 1998; Hyde *et al.*, 1988). Es gibt jedoch keine Hinweise auf eine regulatorische Einheit bei der TSH. Weder ist sie jemals in der Literatur beschrieben worden, noch findet sich irgendein Hinweis in der Struktur selbst. Die Threonin Synthese wird bei Bakterien statt dessen *via Feedback-*Inhibierung der o-Homoserinkinase durch Threonin gesteuert (Thete *et al.*, 1974, Burr *et al.*, 1976). Dieser Umstand erklärt, warum Threonin Synthase keine regulatorische Domäne braucht und auch, warum die Threonin Synthese mit einer monomeren, nicht regulierten TSH keinerlei Effektivitätsverlust erleiden muß.

Im Gegensatz zum Hefe-Enzym ist bei der TS der *Arabidopsis thaliana* sehr wohl eine regulative Einheit vorhanden. Neuere Arbeiten über die allosterische Aktivierung des *A.thaliana* Enzyms durch SAM (Curien *et al.*, 1998; Laber *et al.*, 1999) belegen, daß der stark verlängerte N-Terminus des Pflanzenenzym (Abb. 4.11) für diese Aktivierbarkeit verantwortlich ist. Die Autoren nahmen an, daß der N-Terminus zumindest mitverantwortlich dafür ist, das die TSA als Dimer und nicht, wie TSH, als Monomer vorliegt. Ein detaillierter Strukturvergleich der kürzlich mit Hilfe der MAD-Methode aufgeklärten Struktur der TSA (Thomazeau *et al.*, 2001) ist an dieser Stelle noch nicht möglich, da dessen Koordinaten noch nicht verfügbar sind. Die TSA Struktur ist jedoch ohne den Kofaktor gelöst worden, so daß Teile des Aktivzentrums ungeordnet sind. Auch ist der allosterische Aktivator SAM in der Struktur nicht vorhanden. Ein strukturbasierter Sequenzvergleich von TSH mit den vorhergesagten Strukturelementen der TSA liefert jedoch mögliche Erklärungen für die allosterische Aktivierbarkeit des *Arabidopsis*-Enzyms. Demnach weist die N-terminale Domäne der TSA eine komplett andere Faltung als die der TSH auf. Auch fehlen die Strukturelemente $\alpha 13$, βI und $\alpha 14$ der TSH im Pflanzenenzym vollständig. Beide Regionen bestimmen jedoch entscheidend den Oligomerisierungsgrad im Hefeenzym und wahrscheinlich formen diese beiden Regionen die Dimerisierungsfläche der TSA und sind in die allosterische Aktivierung durch SAM involviert. In der TSA Struktur ist auch eine potentielle SAM-Bindestelle beschrieben. Solche Struktur motive sind bei Methyltransferasen wohlbekannt, von denen über 130 Strukturen in der *pdb* hinterlegt sind. Typisch für diese Regionen sind ein $\alpha\beta\alpha$ -Segment mit einer hochkonservierten Aminosäuresequenz (Cheng *et al.*, 1993). Im Hefeenzym ist jedoch dieses Strukturmotiv nicht erkennbar, in der TSA Struktur jedoch identifizierten die Autoren eine mögliche SAM-Bindestelle auf dem N-Terminus.

Vergleich der Aktivzentren

Der Vergleich des Aktivzentrums der TSH mit den übrigen, strukturell charakterisierten Faltungstyp II Enzymen zeigt sowohl Gemeinsamkeiten der vier Enzyme als auch substantielle Unterschiede.

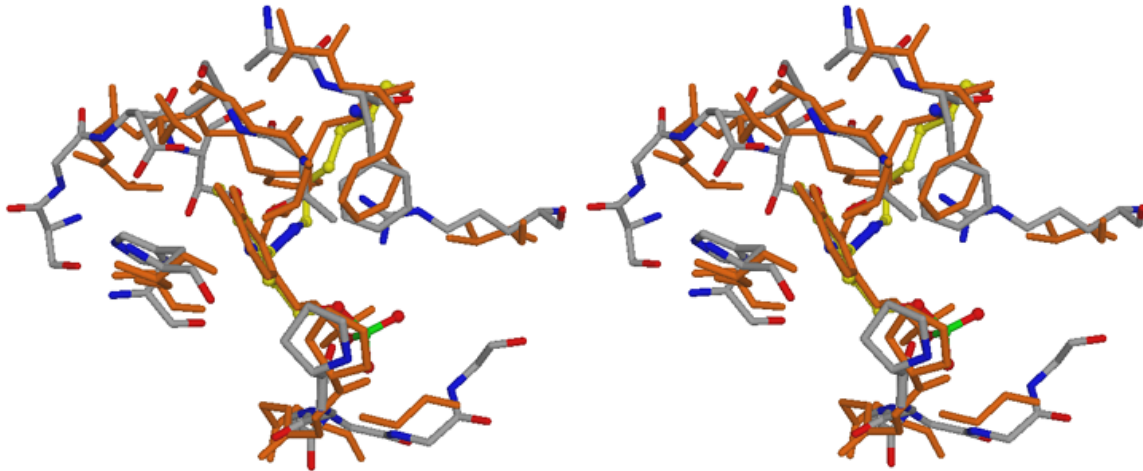


Abb. 5.3

Superposition der Reaktionszentren von TSH (Atome verschiedenfarbig dargestellt) und TD (orange).

In allen vier Strukturen ist der Kofaktor mit der *re*-Seite zum Solvenz hin orientiert. Das von Lys124 gebildete interne Aldimin der TSH findet seine Entsprechung in Lys62 bei der TD, Lys41 bei der OASS und Lys87 bei TRPS β . In allen vier Strukturen stabilisiert eine glycinreiche Region die 5'-Phosphat Gruppe des Kofaktors. So wird in TSH das Phosphat von den Resten Gly277, Asn278, Gly280 und Asp281 verankert, in TD von einem Polyglycin-*Loop*, in OASS von einer Gly-Thr-Gly-Thr Sequenz und in TRSP β schließlich von Gly-Gly-Gly-Ser.

In vielen PLP-Enzymen, insbesondere in denen der α - und γ -Familie, bildet der Pyridinstickstoff des Kofaktors mit einem Asp eine Wasserstoffbrückenbindung (vgl. Abschnitt 2.2). Bei den Enzymen des Faltungstyp II übernimmt jedoch ein Serin (Ser315 in TD, Ser272 in OASS und Ser377 in TRPS β) diese Aufgabe. In der TSH hingegen tritt eine weitere Abweichung auf. Hier wechselwirkt Thr449 mit dem Pyridinstickstoff, wobei die Lage der Hydroxylgruppen von Ser bzw. Thr jedoch weitgehend identisch ist. Das Thr ist auch in allen 30 untersuchten Threonin Synthase Sequenzen konserviert und somit kann diese Konformation als typisch für die TS angesehen werden. Auch bei der Stabilisierung der C3-Hydroxylgruppe des PLP gibt es Abweichungen innerhalb der Faltungstyp II Familie. In der TSH wechselwirkt Asp163 mit der C3-Hydroxylgruppe, wohingegen in TD und auch OASS ein Asn diese Aufgabe übernimmt. In TRPS β schließlich bildet ein Glu die Wasserstoffbrückenbindung zur C3-Hydroxylgruppe.

Eine weitere Gemeinsamkeit der TSH mit den anderen drei Faltungstyp II Enzymen ist das Fehlen jeglicher Wechselwirkung des Pyridinrings des PLP mit den benachbarten Resten in der unmittelbaren Umgebung. Insbesondere gibt es keine Wechselwirkung mit den angrenzenden Ringsystemen. Zusammen mit der Wechselwirkung des positiv geladenen Pyridinstickstoffs mit Thr (TSH) bzw. Ser (TD, OASS, TRPS) reduziert diese Konstruktion in den Faltungstyp II Enzymen die Aufnahmefähigkeit des Pyridinrings für zusätzliche Ladungen und wirkt der Fähigkeit des Kofaktors als Elektronensenke zu agieren entgegen.

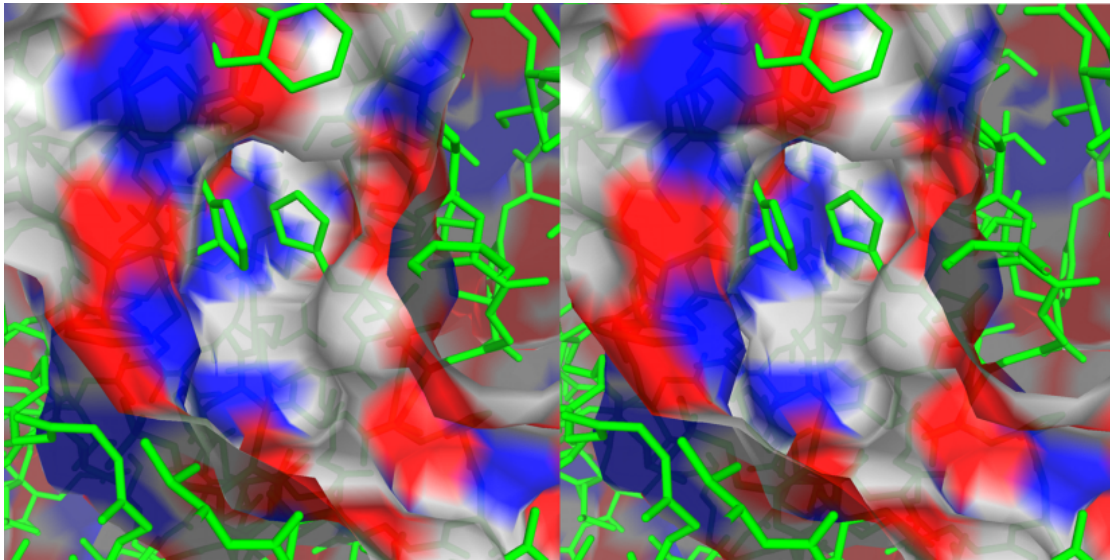


Abb. 5.4

Oberflächendarstellung der aktiven Tasche der TSH mit elektrostatischem Potential. Das atomare Modell der TD ist in grün eingezeichnet.

Ein besonders deutlicher Unterschied der Architektur der Enzyme ist an der Konstruktion der aktiven Tasche zu erkennen und hängt mit der Substratbindung zusammen. Der Vergleich der TSA mit der TD bietet dabei auch ein sehr schönes Beispiel dafür, wie beide Enzyme das sterische und elektrostatische Design ihrer Aktivzentren zur spezifischen Substratselektion nutzen, die in Größe und Ladung stark differieren. Der Eingang zur Aktiven Tasche der TD ist durch verschiedene Interdomänen-Wechselwirkungen, z.B. einer Salzbrücke zwischen Lys117 und Glu240, viel kleiner als bei der TSH. Außerdem wird der Zugang zur aktiven Tasche der TD durch eine Mischung von sauren und basischen Reste gebildet, wohingegen der zur TSA hauptsächlich aus basischen Resten (Lys 222, Lys 228, Lys233, Arg246, Arg319, Lys371) und den Amidgruppen der Hauptkette besteht, die eine positive Oberflächenladung erzeugen und so das Substrat o-Homoserinphosphat förmlich zur aktiven Tasche hinführen. Besonders bemerkenswert ist dabei, daß dort, wo die Phosphatbindetasche der TSH liegt, in der TD ein *Loop* mit den Resten 153-158 diesen Platz blockiert. Es ist daher anzunehmen, daß die Substrat und Reaktionsspezifitäten der Enzyme des Faltungstyps II durch strukturelle Unterschiede ihrer Substratbindestelle bestimmt werden, da die Anordnung der katalytisch wichtigen Reste sehr ähnlich ist.

5.1.4 Vorschlag eines Reaktionsmechanismus für TSH

Der Reaktionsmechanismus der Threonin Synthese ist in der Literatur intensiv diskutiert worden (vgl. Abschnitt 2.4.3), jedoch fehlte bislang das Verständnis, wie die Reaktion auf atomarer Basis im einzelnen bewerkstelligt wird.

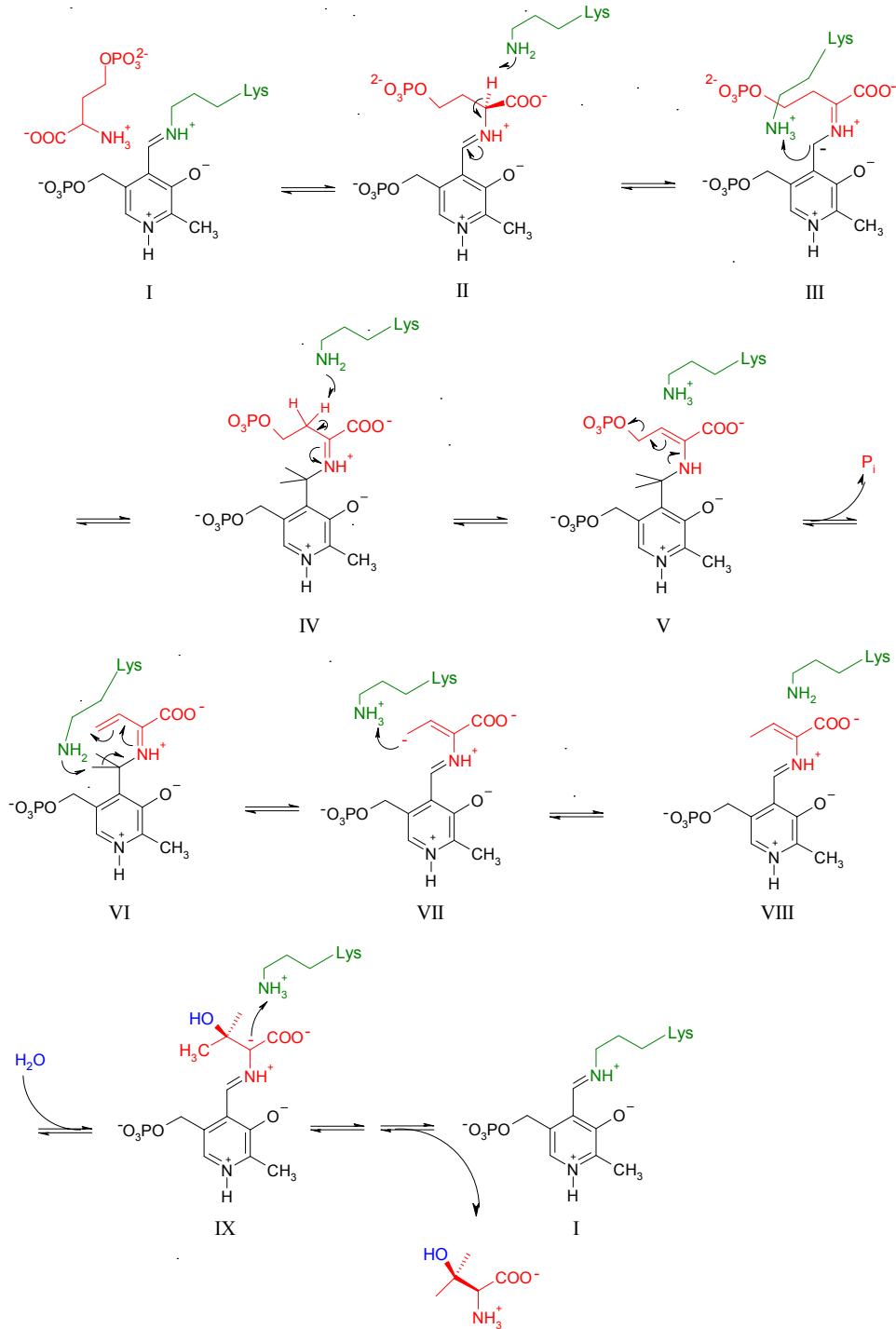


Abb. 5.5

Vorschlag eines Reaktionsmechanismus für die Threonin Synthese aus Hefe, basierend auf der verfeinerten Struktur und der Energie-minimierung des Enzym/Substrat-Komplexes mit *o*-Homoserinphosphat.

In dieser Arbeit konnte durch die Aufklärung der Struktur der Threonin Synthase aus Hefe und der Energieminimierung des Enzym/Substrat-Komplex mit o-Homoserinphosphat erstmals ein detaillierter Reaktions-mechanismus für die TS aufgestellt werden (Abb. 5.5).

Um die Transaldimierung starten zu können, muß die Aminogruppe des Substrats deprotoniert sein, was auf verschiedenen Wegen erreichbar ist. Das Substrat könnte durch ein deprotoniertes internes Aldimin aktiviert werden wie bei der Aminotransferase (Kirsch *et al.*, 1984) oder durch eine zusätzliche Base in der aktiven Tasche wie bei verschiedenen Transsulfuration Enzymen (Clausen *et al.*, 1996). Eine weitere Möglichkeit ist die Annahme eines Gleichgewichts zwischen protonierter und deprotonierter Form des Substrats (Hayashi & Kagamiyama, 1997). Da die ersten beiden Möglichkeiten ausscheiden, ist die letztgenannte die einzig mögliche. Nach der Bildung des externen Aldimins (II) wird der C α Wasserstoff von dem PLP bindenden Lys124 abstrahiert und die C4' Position des PLP-Rings protoniert (III). Die sich anschließende Abstraktion des C β Wasserstoffatoms (IV) sowie die Eliminierung der Phosphatgruppe (V) führt zu einem β,γ ungesättigten Ketimin (VI). Durch Deprotonierung von C4' und dem Protonentransfer auf C γ (VII) wird nach der Addition von Wasser durch Retention der Konfiguration Threonin gebildet. Auffällig am hier vorgestellten Mechanismus ist, das keine quinoiden Formen weiter reagieren, sondern nur die Intermediate, bei denen die Resonanzenergie des Pyridinrings vollständig erhalten ist.

Es liegt eine Fülle unterschiedlicher Daten vor, sowohl struktureller, sequenzieller wie spektroskopischer Art, die den hier vorgeschlagenen Mechanismus stützen. Alle relevanten Positionen, C α , C β und C γ , können von Lys124, das im Mechanismus gezeigt ist, durch geeignete Rotation der Torsionwinkel Chi2, Chi3 und Chi4 erreichen werden. In der aktiven Tasche der TSH finden sich zudem keine anderen geeigneten Aminosäuren, die sterisch in der Lage wären, eine der angegebenen Positionen zu erreichen und die notwendigen Reaktionsschritte auch auszuführen. In detaillierten Untersuchungen mit TS aus *E.coli* (Laber *et al.*, 1994a), das zur selben Unterfamilie wie das Hefe-Enzym gehört und eine hohe Sequenzhomologie zu diesem aufweist, konnten keine Absorptionen um 500 nm oder höher bei der Reaktion mit o-Homoserinphosphat detektiert werden. Dieser Umstand impliziert, daß während der Reaktion keine hochkonjugierte, quinoidale Form präsent ist, die in genau diesen Bereichen absorbieren würde. Die protonierte Schiff-Base, dessen typische Absorption bei ca. 420 nm liegt, ergibt sich ebenfalls aus dem UV/VIS-Spektrum da TSH bei 422 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Die in die Phosphatbindung des Substrats involvierten Reste sind in der gesamten Unterfamilie 2 ausnahmslos konserviert und zu einem sehr hohen Maße auch in der Unterfamilie 1. So ist z.B. Thr164 der TSH in 28 von 30 untersuchten Sequenzen vorhanden und Asn240, Ser241, Arg246 und Asn278 jeweils in 27 von 30 Enzymen. Sie bilden also wahrscheinlich ein in der TS Familie konserviertes Phosphatbindemotiv.

Das Fehlen der quinoiden Intermediate im Mechanismus kann zudem durch die spezielle Anordnung der Aminosäuren in der aktiven Tasche erklärt werden. In den meisten strukturell charakterisierten PLP-Enzymen bildet der Stickstoff des Pyridinrings eine Wasserstoffbrücke zu einem Asp (John, 1996) und ein aromatisches Ringsystem befindet sich etwa parallel zur PLP-Ringebene. Durch diese Anordnung wird die Eigenschaft des PLP, als Elektronensenke fungieren zu können (vgl. 2.1), noch verstärkt, indem Asp die positive Ladung des Stickstoff stabilisiert und Elektronendichte in das parallel liegende Aromatensystem transferiert wird. Der Kofaktor kann so die quinoiden Intermediate besonders effektiv stabilisieren. In TSH ist eine völlig andere Organisation des aktiven Zentrums vorhanden: Statt von einem Asp stabilisiert zu werden, bildet der Pyridinstickstoff eine Wasserstoffbrücke mit dem ungeladenen Thr449, zusätzliche Elektronendichte im Pyridinring kann somit nicht stabilisiert werden. Der im Aktivzentrum gefundene Phenylrest steht nicht parallel, sondern nahezu senkrecht zur PLP-Ringebene und kann somit auch keine zusätzliche Ladung stabilisieren helfen. In der Energieminimierung wurde zudem keine signifikante Drehung der beiden Ringebenen zueinander beobachtet und so kann durch die Anordnung der Aminosäuren in der aktiven Tasche insgesamt keine besondere Stabilisierung möglicher quinoider Formen erfolgen, die somit auch keine wichtige Rolle während der Reaktion spielen können.

Eine weitere Besonderheit der TSH Struktur kann im Vergleich mit OASS und TRPS, den anderen zwei mechanistisch untersuchten Faltungstyp II Molekülen, erklärt werden. Im Gegensatz zu TSH, die ein β,γ *Replacement* katalysiert, führen OASS und TRPS nur eine Reaktion am C β aus, deren mechanistische Details aufgrund struktureller und spektroskopischer Daten erklärt werden konnten. Beiden gemeinsam ist als wichtigstes Merkmal eine Domänenverschiebung während der Katalyse. In der o-Acetylserin Sulfhydrylase werden durch die Bildung des externen Aldimins größere Konformationsänderungen induziert (Burkhard *et al.*, 1999). Der Kofaktor dreht sich um ca. 13° und bewegt dabei die Schiff-Base in Richtung Eingang der aktiven Tasche. Die Domänenverschiebung beinhaltet v.a. die β -Stränge 4 und 5 sowie die α -Helices 3 und 4 der OASS und bringt den sogenannten „Asparagin-Loop“ mit den Aminosäuren Pro67-Thr68-Asn69-Gly70 in die Nähe der Carboxylgruppe des Substrats und bildet gleichzeitig mehrere neue Wasserstoffbrücken aus. Diese Domänenverschiebung hat zwei wichtige Funktionen: Zum einen geht das Enzym von einer offenen in eine geschlossene Konformation über, so daß nur noch kleine Moleküle Zutritt zur aktiven Tasche haben (nämlich das für die Reaktion zusätzlich benötigte Sulfidion), zum anderen wird das Substrat durch den „Asparagin-Loop“ und die neu entstandenen Wasserstoffbrückenbindungen fixiert. Die Autoren nehmen an, daß die Reaktion über ein α -Aminoacrylat verläuft, gebildet in einer *anti*-Eliminierung, das dann mit einem Sulfidion von der „Vorderseite“ her weiter reagiert. Diese Aussagen basieren

auf der Strukturanalyse einer Mutante, bei der das PLP-bindende Lys zu Ala mutiert wurde und einem im Aktivzentrum gefundenen Met, daß das Substrat imitiert (Rege *et al.*, 1996).

In der Tryptophan Synthase liegt eine ähnlich Situation für die β -Reaktion vor wie in der OASS, die durch verschiedene Studien mit gebundenen Liganden (Rhee *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1998) oder auch mit monovalenten Kationen (Perracchi *et al.*, 1995; Rhee *et al.*, 1996) belegt wurde. Auch in der β -Untereinheit der TRPS verläuft die Reaktion über ein α -Aminoacrylat (Ro & Miles, 1999), aber im Gegensatz zu OASS benötigt die Tryptophan Synthase-Reaktion eine Säure/Base Gruppe für die Protonierung der Hydroxyl-Abgangsgruppe. Wie bereits erwähnt, findet auch bei der TRPS während der β -Reaktion eine Domänenverschiebung statt. In diesem Fall bewegt sich die sogenannte „mobile Domäne“ mit den Resten b93-189 (Rhee *et al.*, 1997) bzw. COMM-Domäne mit b102-189 (Schneider *et al.*, 1998), die gleichzeitig die Kontaktfläche zwischen α - und β -Untereinheit der TRPS darstellt. Außerdem dreht sich auch hier der PLP-Ring während der Bildung des α -Aminoacrylats, und zwar um 20° . Die Autoren nehmen an, daß die Domänenverschiebung von der Carboxylgruppe des Substrats induziert wird, ähnlich wie auch in der OASS.

Die beobachteten Domänenverschiebungen in OASS und TRPS sind in den *Model-Experimenten* mit TSH nicht aufgetreten. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Domänenverschiebung ist in der Struktur der TSH und der katalysierten Reaktion zu finden. Der Kanal, der das Molekül durchzieht, wirkt wie ein Trichter, der das Substrat direkt in die aktive Tasche leitet. Aufgrund der Ladung des o-Homoserinphosphats mit zwei negativ geladenen Seitenketten (Phosphat- und Carboxylgruppe) muß dieser Graben relativ breit ausgelegt sein. Außerdem weist er an der Substratbindestelle eine positive Ladung auf. Während der Reaktion wird, anders als z.B. bei der OASS kein zweites Substrat benötigt, sondern statt dessen ein geladenes Phosphat freigesetzt. Diese Tatsache, der relativ große Kanal und die Freisetzung des Phosphats machen daher einen *Open/Close-Mechanismus* wie bei OASS sehr unwahrscheinlich. Erschwerend kommt außerdem hinzu, daß die Domänenorganisation der TSH sehr kompakt ist, und die Interdomänen-Wechselwirkungen relativ stark, so daß sie einer Verschiebung der Domänen zusätzlich im Weg stehen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß, unter Berücksichtigung der besonderen Architektur des aktiven Zentrums, der Identifizierung einer Phosphatbindestasche, der strukturellen Besonderheiten der TSH mit einem relativ großen Kanal und einer kompakten Domänenstruktur, die Reaktion nicht wie bei den verwandten Enzymen abläuft, sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit nach dem hier vorgestellten Schema.

5.2 Threonin Synthase aus *Arabidopsis thaliana*

5.2.1 Expression, Reinigung und Charakterisierung der TSA

Das von der Agrevo AG zur Verfügung gestellte Konstrukt, indem das TSA Gen in einem pET23(+) Vektor inkloniert war, ließ sich leicht in *E.coli* BL21(DE3) Zellen transformieren und führte auch zu einer sehr guten Überexpression des Zielmoleküls, ohne daß größere Mengen eines weiteren Proteins koexprimiert wurden.

Die Reinigung der TSA war jedoch im Vergleich zum Hefeenzym etwas aufwendiger. In diesem Fall konnte keine Säule in negativer Weise benutzt werden und der Reinigungseffekt der ersten Säule (DEAE-Sepharose) war deutlich schwächer als bei TSH. Aus diesem Grund mußte ein zusätzliches Materialien (Hydroxylapatit) eingesetzt werden. In einem ersten Schritt wurde die TSA nach dem Zellaufschluß an die DEAE-Säule gebunden. Wahlweise konnte nun bei langsamen Fluß über Nacht gewaschen oder mit höheren Flußraten sofort weitergearbeitet werden. Das so erhaltene Material zeigte keinerlei Unterschiede, weder während der folgenden Reinigung, noch bei der Kristallisation. Insgesamt lieferte die Reinigung ein sehr sauberes Protein. Die Gelfiltration am Schluß trennte nur noch kleine, nicht proteinhaltige Verunreinigungen ab. Das etablierte Reinigungsschema ist trotz der Verwendung von insgesamt 5 Säulen noch leicht beherrsch- und durchführbar und liefert in Verbindung mit dem verwendeten Klon sehr gute Ausbeuten.

Die Charakterisierung der TSA ergab deutliche Hinweise darauf, daß das Arabidopsis Enzym nicht wie bei TSH in monomerer Form vorliegt, sondern statt dessen als Dimer aktiv ist. Dieser Umstand ist auch unabhängig voneinander von zwei Arbeitsgruppen bestätigt worden (Curien *et al.*, 1998; Laber *et al.*, 1999).

5.2.2 Kristallisation der TSA

Die Kristallisation der TSA war nicht ganz so schwierig wie die von TSH. Die relativ schnell gefundene Bedingung mit Ammoniumsulfat als Präzipitanz ließ sich gut reproduzieren, die Kristallqualität war jedoch mit einer sehr hohen Mosaizität nicht befriedigend. In einer aufwendigen Suche nach besseren Kristallisationsbedingungen konnte erst durch die Verwendung von PEG_{monomethylether}2000, der in keinem Standardkristallisationskit enthalten ist, eine Bedingung gefunden werden, die zu kleinen Kriställchen führte und nur durch Microseeding verbessert werden konnte. Alle eingestellten Parameter sind äußerst sensibel, so führt z.B. nur die Verwendung von 10 mM Tris/HCl bei pH 9,2 zum Erfolg, nicht aber ein pH von 9,0 oder aber eine Konzentration von 50 mM des Puffers. Die Reproduzierbarkeit und Qualität der so erhaltenen Kristalle war ausreichend, um eine intensive Suche nach Schwermetallderivaten zu beginnen. Es mußte jedoch festgestellt werden, daß die Kristalle, insbesondere bei Quecksilberverbindungen, äußerst empfindlich reagierten. So bildeten sich

in kürzester Zeit Risse, die auch nicht mehr zusammenwachsen oder die Kristalle lösten sich ganz auf. Durch die Verwendung sehr niedriger Konzentrationen der Schwermetallverbindungen konnte zwar die Streukraft der Kristalle erhalten werden, jedoch ließ sich so, auch bei *Soak*-Zeiten von Teilweise über 48 Std. kein Derivat detektieren. Auch der Versuch, die Kristalle einzufrieren, um einen hochaufgelösten Datensatz am Synchrotron messen zu können, scheiterte, da in verschiedensten Versuchsreihen kein Cryopufferpuffer gefunden werden konnte, in dem die Kristalle ihre Streukraft nicht verloren und sich auch nicht auflösten.

Auffällige Übereinstimmung beider Kristallisationsbedingungen war allerdings, daß das Enzym nur bei 4°C kristallisiert werden konnte und, daß in beiden Bedingungen eine relativ hohe SAM-Konzentration von 10 mM vorhanden war. Im Gegensatz dazu war es nicht möglich, eine Kristallisationsbedingung ohne den Zusatz von SAM zu identifizieren. Weder bei Raumtemperatur noch bei 4°C kristallisierte TSA ohne den Zusatz von SAM. Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand ist, daß der stark verlängerte N-Terminus, der ja wahrscheinlich für die Aktivierbarkeit durch SAM verantwortlich ist, durch die Zugabe von SAM so geordnet wird, daß er einer erfolgreichen Kristallisation nicht mehr im Wege steht. Genaue Aussagen über diesen Punkt ließen sich jedoch nur bei Kenntnis der TSA-Struktur machen.

Der Versuch, über *Molecular Replacement* (MR) mit Hilfe der TSH-Struktur das *Arabidopsis*-Enzym lösen zu können, schlug fehl. Beide Kristallformen lieferten Lösungen, die nicht interpretierbar waren bzw. so beliebig, daß eine Strukturlösung nicht möglich war.

5.3 Threonin Synthase aus *Thermotoga maritima*

5.3.1 Klonierung, Expression, Reinigung und Charakterisierung der TSTM

Die Klonierung der TSTM war nach der Identifizierung des entsprechenden Genabschnitts nach Standardprotokollen möglich und klappte zuverlässig. Die Wahl des „Suchorganismus“ fiel aufgrund der Ähnlichkeiten bei vielen anderen Proteinen zwischen beiden Organismen auf die *Bazillus*-Spezie.

Die Expression der TSTM war von allen bearbeiteten Threonin Synthasen am schwächsten. Testexpressionen mit verschiedenen Vektorsystemen (pET, pLys, pUBS) zeigten aber keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der exprimierten Menge des Zielmoleküls und so wurde als einfachstes System der pET- Vektor ausgewählt.

Die *Thermotoga maritima* ist ein thermophiler Organismus, der bei Temperaturen um 80°C seine optimale Wachstumsbedingungen findet. Aus diesem Grund wurde nach dem Aufschluß der Zellen eine Hitzedenaturierung durchgeführt, die einen Großteil der *E.coli* Proteine zerstört, die TSTM jedoch unbeschadet läßt. Trotzdem mußte eine DEAE und eine

Phenylsepharose Säule verwendet werden, um eine hohe Reinheit erzielen zu können. Die abschließende Gelfiltration diene v.a. zum Umpuffern und Abtrennen nicht proteinhaltiger Verunreinigungen.

Die biochemische Charakterisierung deutete wie bei der TSH darauf hin, daß auch die TSTM als Monomer vorliegt, obwohl beide Organismen zu verschiedenen Unterfamilien der TS gehören. Beides, Gelfiltrations- und Massenspektrometrieexperimente zeigen jedoch eindeutig in diese Richtung.

5.3.2 Kristallisation TSTM

Auch bei der TSTM war die Kristallisation nicht einfach. Zwar konnte relativ schnell eine Kristallisationsbedingung gefunden werden, die reproduzierbares, kristallines Material lieferte, jedoch führten die aufwendigen Optimierungsversuche nicht zu einer grundlegenden Verbesserung der Kristallqualität. Die Kristalle waren stark verwachsen und mußten mechanisch in kleinere Bruchstücke zerlegt werden. Diese Bruchstücke hatten auf der Drehanode allerdings nur eine begrenzte Streukraft und waren obendrein in der Raumgruppe P1, also ohne jegliche Symmetrie. Außerdem waren die Kristalle nicht stabil, so daß sie sich wenige Tage nach ihrem Entstehen wieder auflösten und als gelber Tropfen in der Reservoirolösung konzentriert blieben. Die zweite gefundene Bedingung lieferte zwar stabile Kristalle, die sich nicht auflösten, jedoch waren diese sehr klein und zeigten auf der Drehanode überhaupt keine Reflexe. Erst am Synchrotron konnte ein Datensatz mit 3 Å Auflösung gemessen und ausgewertet werden. Somit war es auch in diesem Fall nicht möglich, geeignete Derivatdatensätze zu vermessen.

Auffällig ist im Vergleich zu den beiden anderen Threonin Synthesen, daß das Enzym des thermophilen Organismus nur bei Raumtemperatur kristallisierte, das Hefe- und auch das *Arabidopsis* Protein jedoch nur bei 4°C. Eine Erklärung für dieses Verhalten ist jedoch aus den vorliegenden Untersuchungen nicht abzuleiten.

5.4 Ausblick

Die erfolgreiche Strukturaufklärung der Threonin Synthase aus Hefe und die erstmalige Formulierung eines Reaktionsmechanismus in Kenntnis der Umgebung des aktiven Zentrums eröffnen neue Möglichkeiten in der gezielten Suche nach neuen Inhibitoren, die, basierend auf dem vorgestellten Mechanismus, direkt an den beteiligten Aminosäuren angreifen können. Als eine weitere Möglichkeit zum tieferen Verständnis des Wirkmechanismus bekannter Inhibitoren sei die Strukturanalyse von Enzym/Inhibitor Komplexen genannt. In diesem Zusammenhang muß jedoch vor allzu schnellen Resultaten deshalb gewarnt werden, da das Kristallisationsverhalten der TSH eine ausgiebige Suche limitiert.

Die Strukturanalyse des ersten monomeren PLP-Enzyms läßt zudem darauf hoffen, daß ein Vergleich der bislang bekannten PLP-Enzyme ein neues, zumindest aber aktualisiertes Verständnis über den evolutionären Ursprung dieser Enzymklasse ermöglichen wird.

Die erfolgreichen Arbeiten über die Threonin Synthasen der *Arabidopsis* und der *Thermotoga* bilden eine gute Ausgangsbasis, auch die Struktur dieser beiden Enzyme lösen zu können. Von besonderem Interesse sind bei dem Pflanzenenzym die Tatsachen, daß es als Dimer vorkommt und das der verlängerte N-Terminus allosterisch mit SAM aktivierbar ist. In diesem Zusammenhang ist von wissenschaftlichem Interesse, wie und wo im Vergleich zum Hefe Enzym die Dimerisierung stattfindet und wie SAM in Reaktion eingreifen kann (struktureller Eingriff oder direkt in die Reaktion). Außerdem wäre für die Agroindustrie die Frage von Bedeutung, ob sich Inhibitoren finden lassen, die nur die dimere bzw. monomere Threonin Synthase inhibieren.

Das thermophile Enzym ist v.a. deshalb interessant, da es, obwohl deutlich kleiner als das Hefe Enzym, dieselbe Eigenschaft hat wie dieses, nämlich das Vorkommen als Monomer. Insbesondere wäre hier zu klären, ob das Thermotoga-Enzym vergleichbare „Extra-Sekundärstrukturelemente“ aufweist wie das Hefe Enzym und so der Oligomerisierung entgegen steht und der Reaktionsmechanismus dem Hefe-Enzym gleicht.

6 Literatur

- Aas, S.F. & Rognes, S.E., (1990), Nucleotide sequence of the yeast *THR4* gene encoding threonine synthase, *Nucleic Acid Res.*, **18**, 665
- Abrahams, J.P. & Leslie, A.G.W., (1996), Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase, *Acta Cryst. D*, **52**, 30-42
- Alexander, F.W., Sandmeier, E., Mehta, P.K., Christen, P., (1994), Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regiospecific α , β and γ subgroups, *Eur. J. Biochem.*, **219**, 953-960
- Andrews P., (1970), Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration, *Meth. Biochem. Anal.*, **18**, 2-54
- Bacon, D.J., & Anderson, W.F., (1988), A fast algorithm for reading space-filling molecule pictures, *J. Mol. Graph.*, **6**, 219-220
- Barford, D., Hu, S.-H., Johnson, L.N., (1991), Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP, *J. Mol. Biol.*, **218**, 233-260
- Barton, G.J., (1993), ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments, *Prot. Engineering*, **6**, 37-40
- Bender, D.A., (1985), *Amino Acid Metabolism*, S. 146-174, Wiley, Chichester
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N, Bourne, P.E., (2000), The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235-242
- Bernal, J.D., Crowford, D., (1934), X-ray photographs of crystalline pepsin, *Nature*, **133**, 794-795
- Blow, D.M. & Crick, F.H.C., (1959), The treatment of errors in the isomorphous replacement method, *Acta Cryst.*, **12**, 794-802
- Blundell, T.L. & Johnson, L.N., (1994), *Protein Crystallography*, Academic Press, San Diego, USA
- Bradford, M.M., (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254
- Bragg, W.L., (1913), The structure of some crystals as indicated by their diffraction of X-rays, *Proc. Roy. Soc.*, **A89**, 248-277
- Braunstein, A. & Shemyakin, M.M., (1953), The theory of processes of amino acid metabolism catalysed by pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes, *Biokhimiya*, **18**, 393-411
- Brünger, A., (1992), Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures, *Nature*, **355**, 472-475

- Brünger, A., Adams, P.D., Clore, G.M., Delano, W.L., Gros, P., Grosse, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nigles, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., Warren, G.L., (1998), Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Cryst. D*, **54**, 905-921
- Brzovic, P., Litzenberger, H., Greene, R.C., Dunn, M.F., (1990), Reaction mechanism of *Escherichia coli* cystathionine γ -synthase: direct evidence of a pyridoxamine derivative of vinylglyoxylate as a key intermediate in pyridoxal phosphate dependent γ -elimination and γ -replacement reactions, *Biochem.*, **29**, 442-451
- Budisa, N., Steipe, B., Demange, P., Eckerskorn, C., Kellermann, J., Huber, R., (1995), High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*, *Europ. J. Biochem.*, **230**, 788-796
- Burkhard, P., Rao, G.S.J., Hohenester, E., Schnackerz, K.D., Cook, P.F., Jansonius, J.N., (1998), Three-dimensional structure of O-acetylserine sulfhydrylase from *Salmonella typhimurium*, *J. Mol. Biol.*, **283**, 121-33
- Burkhard, P., Tai, C.H., Ristroph, C.M., Cook, P.F., Jansonius, J.N., (1999), Ligand binding induces a large conformational change in O-acetylserine sulfhydrylase from *Salmonella typhimurium*, *J. Mol. Biol.*, **291**, 941-53
- Burr, B., Walker, J., Truffa-Bachi, P., Cohen, G.N., (1976), Homoserine kinase from *Escherichia coli* K12, *J. Biochem.*, **62**, 519-26
- Calvin, N.M. & Hanawalt, P.C., (1988), High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation, *J. Bacteriol.*, **170**, 2796-2801
- Carter, C.W.Jr., & Carter, C.W., (1979), Protein crystallisation using incomplete factorial experiments, *J. Biol. Chem.*, **254**, 12219-12223
- Cheng, X., Kumar, S., Posfai, J., Pflugrath, J.W., (1993), Roberts R.J. Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine, *Cell*, **74**, 299-307
- Christen, P. & Metzler, D.E., (1985), *Transaminases*, John Wiley & Sons, New York
- Clausen, T., Huber, R., Laber, B., Pohlenz, H.-D., Messerschmidt, A., (1996), Crystal structure of the pyridoxal-5'-phosphate dependent cystathionine β -lyase from *E.coli* at 1.83 Å, *J. Mol. Biol.*, **262**, 202-224
- Clausen, T., Laber, B., Messerschmidt, A., (1997), Mode of action of cystathionine α -lyase, *Biol. Chem.*, **378**, 321-326
- Clausen, T., Huber, R., Prade, L., Wahl, M.C., Messerschmidt, A., (1998), Crystal structure of *Escherichia coli* cystathionine gamma-synthase at 1.5 Å resolution, *EMBO J.*, **17**, 6827-38

- Collaborative Computational Project Number 4, (1994), The CCP4-Suite: Programms for protein crystallography, *Acta Cryst. D*, **50**, 760-763
- Curien, G., Dumas, R., Ravanel, S., Douce, R., (1996), Characterization of *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding an S-adenosylmethionine-sensitive threonine synthase, *FEBS Lett.*, **390**, 85-90
- Curien, G., Job, D., Douce, R., Dumas, R., (1998), Allosteric activation of *Arabidopsis* threonine synthase by S-adenosylmethionine, *Biochem.*, **37**, 13212-13221
- Darwin, C.G., (1914), The theory of x-ray reflexion, *Phil. Mag.*, **27**, 315-333
- Doublé, S., (1997), Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination, *Meth. Enzymol.*, **276**, 523-530
- Drenth, J., (1994), *Principles of Protein X-ray Crystallography*, Springer Verlag, Heidelberg
- Dunathan, H.C. & Voet, J.G., (1974), Stereochemical evidence for the evolution of pyridoxal phosphate enzymes of various function from common ancestor, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **71**, 2559-2563
- Edmann, P., (1970), Sequence determination, *Mol. Biol. Biochem. Biophys.*, **8**, 211-255
- Engl, R.A., Huber, R., (1991), Accurate bond and angle parameters for x-ray protein structure refinement, *Acta Cryst. A*, **4**, 392-400
- Esnouf, R.M., (1997), An extensively modified version of MOLSCRIPT that includes greatly enhanced colouring capabilities, *J. Mol. Graph. Model.*, **15**, 132-134
- Ewald, P.P., (1921), Das "reziproke Gitter" in der Strukturtheorie, *Z. Kristallographie*, **56**, 129-156
- Evans, S.V., (1993), SETOR: Hardware lighted three-dimensional solid model representations of macromolecule, *J. Mol. Graphics*, **11**, 134-138
- Farrington, G.K., Kumar, A., Shames, S.L., Ewaskiewicz, J.I., Ash, D.E., Wedler, F.C., (1993), Threonine synthase of *Escherichia coli*: inhibition by classical and slow-binding analogues of homoserine phosphate, *Arch. Biochem. Biophys.*, **307**, 165-174
- Flavin, A. & Kono, T., (1960), Threonine synthase mechanism: studies with isotopic oxygen, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1109-1111
- Flavin, A. & Slaughter, C., (1960a), Purification and properties of threonine synthase of *Neurospora*, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1103-1108
- Flavin, A. & Slaughter, C., (1960b), Threonine synthase mechanism: studies with isotopic hydrogen, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1112-1118
- Ford, G.C., Eichele, G. Jansonius, J.N., (1980), Three-dimensional structure of a pyridoxal-phosphate-dependent enzyme, mitochondrial aspartat aminotransferase, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **4**, 1291-1304

- Friedrich, W., Knipping, P., Laue, M.v., (1912), Interferenz-Erscheinungen bei Röntgenstrahlen, *Sitzungsberichte der mathematisch-physikalischen Klasse der königlichen Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München*, 303-322
- Fuganti, C., (1979), Stereochemistry of the synthesis of L-threonine from O-Phosphono-L-homoserine, *J. C. S. Chem. Comm.*, **7**, 337-339
- Gallagher, D.T., Gilliland, G.L., Xiao, G., Zondlo, J., Fisher, K.E., Chinchilla, D., Eisenstein, E., (1998), Structure and control of pyridoxal phosphate dependent allosteric threonine deaminase, *Structure*, **6**, 465-475
- GCG: Genetics Computer Group (1997), Program manual for the Wisconsin package, version 9.1, Madison, USA
- Giovanelli, J., Mudd, S.H., Datko, A.H., (1980), Sulfur amino acids in plants, *The biochemistry of plants: A comprehensive treatise*, (Stumpf, P.K., Conn, E.E., eds.), **5**, pp. 454-505, Academic Press, New York
- Giovanelli, J., Veluthambi, K., Thompson, G.A., Mudd, S. H., Datko, A.H., (1984), Threonine synthase of *Lemna paucicostata* hegel. 6746, *Plant Physiol.*, **76**, 285-292
- Green, D.W., Ingram, V.M., Perutz, M.F., (1954), The structure of hemoglobin IV. Sign determination by the isomorphous replacement method, *Proc. Roy. Soc. Sect. A*, **225**, 287-307
- Grishin, N.V., Phillips, M.A., Goldsmith, E.J., (1995), Modelling of spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylase, *Protein Sci.*, **4**, 1291-1304
- Guex, N., Peitsch, M.C., (1996), Swiss-Pdb Viewer: a fast and easy-to-use PDB viewer for Macintosh and PC, *PDB Quart. Newslett.*, **77**, 7-10
- György, P., (1934), Vitamin B₂ and the pellagra-like dermatitis of rats, *Nature*, **133**, 448-449
- György, P., (1964), History of Vitamin B₆. Introductory remarks, *Vitamins & Hormones*, **22**, 361-365
- Hanahan, D., (1983), Studies of transformation of *E.coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-558
- Harde, C., Neff, K.-H., Nordhoff, E., Gerbling, K.-P., Laber, B., Pohlentz, H.-D., (1994), Synthesis of homoserin phosphate analogues as potential inhibitors of bacterial threonine synthase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 273-278
- 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
- Hayashi, H., Kagamiyama, H., (1997), Transient-state kinetics of the reaction of aspartate aminotransferase with aspartate at low pH reveals dual routes in the enzyme-substrate association process, *Biochem.*, **36**, 13558-69

- Hendrickson, W.A., Smith, J.L., Phizackerley, R.P., Merrit, E.A., (1988), Crystallographic structure analysis of lamprey haemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation, *Proteins*, **4**, 77-88
- Hoppe, W., (1957a), Die Faltmolekülmethode und ihre Anwendung in der röntgenographischen Konstitutionsanalyse von Biflorin, *Z. Elektrochemie*, **61**, 1076-1083
- Hoppe, W., (1957b), Die Faltmolekülmethode: Eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen, *Acta. Cryst.*, **10**, 750-751
- Huber, R., (1965), Die automatisierte Faltmolekülmethode, *Acta. Cryst.*, **19**, 353-356
- Hünefeld, F., (1840), Der Chemismus in der thierischen Organization, Leipzig
- Huo, X., Viola, R.E., (1996), Functional group characterisation of homoserine kinase from *E.coli*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **330**, 373-379
- Hyde, C.C., Ahmed, S.A., Padlan, E.A., Miles, E.W., Davis, D.R., (1988), Three-dimensional structure of the thryptophane synthase $\alpha_2\beta_2$ multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*, *J. Bio. Chem.*, **263**, 17857-17871
- Jancarik, J. & Kim, S., (1991), Sparse matrix sampling: A screening method for crystallisation of proteins, *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409-411
- Janin, J., (1997), Specific versus non-specific contacts in protein crystals, *Nat. Struc. Biol.*, **4**, 973-974
- Jansonius, J.N., (1998), Structure, evolution and action of vitamin B₆-dependent enzymes, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 759-769
- Jenkins, W.T., Yphantis, D.A., Sizer, I.W., (1959), Glutamic aspartic transaminase, *J. Biol. Chem.*, **234**, 51-57
- John, R.A., (1995), Pyridoxal phosphate-dependent enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1248**, 81-96
- John, R.A., (1998), Pyridoxal phosphate-dependent enzymes, *Comprehensive biological catalysis*, pp.173-200, Academic Press, New York
- Jones, T.A. & Kjølgaard, M., (1991), *O-The Manual*, Uppsala, Schweden
- Jones, T.A., Zou, J.-Y., Cowan, S.W., Kjølgaard, M., (1991), Improved methods for building proteins in electron density maps and location of errors in these models, *Acta Cryst. A*, **47**, 110-119
- Käck, H., Sandmark, J., Gibson, K., Schneider, G., Lindqvist, Y., (1999), Crystal structure of diaminopelargonic acid synthase: evolutionary relationships between pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes, *J. Mol. Biol.*, **291**, 857-876
- Karle, J., (1989), Direct methods in protein crystallography, *Acta Cryst. A*, **45**, 765-781

- Kendrew, J.C., Dickerson, R.E., Strandberg, B.E., Hart, R.G., Davies, D.R., Philipps, D.C., Shore, V.C., (1960), Structure of myoglobin; a three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution, *Nature*, **185**, 422-427
- Kern, A.D., Oliveira, M.A., Coffino, P., Hackert, M.L., (1999), Structure of mammalian decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases, *Structure*, **7**, 567-581
- Kirsch, J.F., Eichele, G., Ford, G.C., Vincent, M.G., Jansonius, J.N., Gehring, H., Christen, P., (1984), Mechanism of action of aspartate aminotransferase proposed on the basis of its spatial structure, *J. Mol. Biol.*, **174**, 497-525
- Kleywegt, G.J. & Read, R.J., (1997), Not your average density, *Structure*, **5**, 1557-1569
- Kleywegt, G.J., (1996), Use of non-crystallographic symmetry in protein structure refinement, *Acta Cryst. D*, **52**, 842-857
- Kraulis, P., (1991), MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of proteins, *J. Appl. Cryst.*, **24**, 946-950
- Kuhn, R., Wendt, G., (1938), Über das aus Reiskleie und Hefe isolierte Adermin (Vitamin B₆), *Chem. Ber.*, **71**, 1118
- La Fortelle, E. de, Irwin, J.J., Bricogne, G., (1997), SHARP: a maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement and phasing program for MIR and MAD methods, *Crystallograph. Comp.*, **7**, 1-9
- Laber, B., Gerbling, K.-P., Harde, C., Neff, K.-H., Nordhoff, E., Pohlenz, H.-D., (1994a), Mechanisms of interaction of *Escherichia coli* threonine synthase with substrates and inhibitors, *Biochem.*, **33**, 3413-3423
- Laber, B., Lindell, S.D., Pohlenz, H.-D., (1994b), Inactivation of *Escherichia coli* threonine synthase by DL-Z-2-amino-5-phosphono-3-pentenoic acid, *Arch. Microbiol.*, **161**, 400-403
- Laber, B., Maurer, W., Hanke, C., Gräfe, S., Ehlert, S., Messerschmidt, A., Clausen, T., (1999), Characterization of recombinant *Arabidopsis thaliana* threonine synthase, *Eur. J. Biochem.*, **263**, 212-221
- Laemmli, U.K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685
- Laskowski, R.A., McArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., (1993), PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291
- Leslie, A.G.W., (1994), *MOSFLM user guide*, MRC Laboratory of molecular biology, Cambidge, UK
- Lu, G., (1997), FINDNCS: a program which automatically find out the NCS operations from heavy atom sites, (in manuscript)

- Madison, J.T. & Thompsón, J.F., (1976), Threonine synthase from higher plants: stimulation by s-adenosylmethionine and inhibition by cysteine, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **71**, 684-691
- Malumbres, M., Mateos, L.M., Lambreras, M.A., Guerrero, C., Martin, J.F., (1994), Analysis and expression of the thrC gen of *Brevibacterium lactofermentum* and characterisation of the encoded threonine synthase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2209-2219
- Matthews, B.W., (1968), Solvent content of protein crystals, *J. Mol. Biol.*, **33**, 491-497
- McPherson, A., (1976), The growth and preliminary investigations of protein and nucleic acid crystals for X-ray diffraction analysis, *Meth. Biochem. Anal.*, **23**, 249-345
- McPherson, A., (1982), *Preparation and analysis of protein crystals*, John Wiley & Sons, New York
- McPherson, A., (1985), Crystallisation of macromolecules: general principles, *Meth. Enzymol.*, **114**, 112-120
- Mehta, P.K. & Christen, P., (2000), The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes, *Adv. Enzym. & Rel. Areas Mol. Biol.*, **74**, 129-184
- Mehta, P.K., Hale, T.I., Christen, P., (1993), Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups, *Eur. J. Biochem.*, **214**, 549-561
- Metzler, D.E., Ikawa, M., Snell, E.E., (1954), A general mechanism for vitamin B₆-catalyzed reactions, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 648-652
- Momany, C., Ernst, S., Ghosh, R., Chang, N.L., Hackert, M.L., (1995), Crystallographic structure of a PLP-dependent ornithine decarboxylase from *Lactobacillus 30a* to 3.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **252**, 643-55
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A., (1987), Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol.*, **155**, 335-350
- Navarza, J., (1994), AmoRe: an automated Package for molecular replacement, *Acta Cryst. A*, **50**, 157-163
- Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Nelson, W.C., Ketchum, K.A., McDonald, L., Utterback, T.R., Malek, J.A., Linher, K.D., Garrett, M.M., Stewart, A.M., Cotton, M.D., Pratt, M.S., Phillips, C.A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Eisen, J.A., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Venter, J.C., Claire, M., Fraser, C.M., (1999), Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*, *Nature*, **399**, 323-329
- Nicholls, A., Bharadwaj, R., Honig, B., (1993), GRASP-graphical representation and analysis of surface properties, *Biophys. J.*, **64**, A166

- Okada, K., Hirotsa, K., Sato, M., Hayashi, H., Kagamiyama, H., (1997), Three dimensional structure of *Escherichia coli* branched-chain amino acid aminotransferase at 2.5 Å resolution, *J. Biochem.*, **122**, 637-641
- Otwinowski, Z. & Minor, W., (1996), Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Meth. Enzymol.*, **276**, 307-326
- Parsot, C., (1986), Evolution of biosynthetic pathways: a common ancestor for threonine synthase, threonine dehydratase and D-serine dehydratase, *EMBO J.*, **5**, 3013-3019
- Parsot, C., (1987), A common origin for enzymes involved in the terminal step of the threonine and tryptophan biosynthetic pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 5207-5210
- Parsot, C., Cossart, P., Saint-Girons, I., Cohen, G.N., (1983), Nucleotide sequence of thrC and of the transcription termination region of the threonine operon in *Escherichia coli* K12, *Nucleic Acid Res.*, **11**, 7331-7344
- Patterson, A.L., (1934), A Fourier series method for determination of the components of interatomic distances in crystals, *Phys. Rev.*, **46**, 372-376
- Peracchi, A., Mozzarelli, A., Rossi, G.L., (1995), Monovalent cations affect dynamic and functional properties of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 complex, *Biochem.*, **34**, 9459-65
- Perutz, M.F., Rossmann, M.G., Cullis, A.F., Muirhead, H., Will, G., North, A.C.T., (1960), Structure of haemoglobin; a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution, *Nature*, **185**, 416-422
- Pieper, M., Betz, M., Budisa, N., Gomis-Ruth, F.X., Bode, W., Tschesche, H., (1997), Expression, purification, characterisation and X-ray analysis of selenomethionine 215 variant of leukocyte collagenase, *J. Prot. Chem.*, **16**, 637-650
- Ramachandran, G.N. & Sasisekharan, V., (1968), Conformation of polypeptides and proteins, *Advan. Protein Chem.*, **23**, 283-437
- Rapp, C., Jung, G., Kugler, M., Loeffler, W., (1988), Rhizocticins - new phosphono-oligopeptides with antifungal activity, *Liebigs Ann. Chem.*, **7**, 655-661
- Ravanel, S., Gakière, B., Job, D., Douce, R., (1998), The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **95**, 7805-7812
- Rege, V.D., Kredich, N.M., Tai, C.H., Karsten, W.E., Schnackerz, K.D., Cook, P.F., (1996), A change in the internal aldimine lysine (K42) in O-acetylserine sulfhydrylase to alanine indicates its importance in transamination and as a general base catalyst, *Biochem.* **35**, 13485-93
- Rhee, S., Parris, K.D., Hyde, C.C., Ahmed, S.A., Miles, E.W., Davies, D.R., (1997), Crystal structures of a mutant (betaK87T) tryptophan synthase alpha2beta2 complex with ligands bound to the active sites of the alpha- and beta-subunits reveal ligand-induced conformational changes, *Biochem.*, **36**, 7664-80

- Rhee, S., Parris, K.D., Ahmed, S.A., Miles, E.W., Davies, D.R., (1996), Exchange of K⁺ or Cs⁺ for Na⁺ induces local and long-range changes in the three-dimensional structure of the tryptophan synthase alpha₂beta₂ complex, *Biochem.*, **35**, 4211-21
- Ro, H.S. & Miles, E.W., (1999), Structure and function of the tryptophan synthase alpha(2)beta(2) complex. Roles of beta subunit histidine 86, *J. Biol. Chem.*, **274**, 36439-45
- Röntgen, W.C., (1895), Über eine neue Art von Strahlung, *Sitzungsberichte der Pysikalisch-Medizinischen Gesellschaft zu Würzburg*, 132-141
- Rossmann, M.G. & Blow, D.M., (1962), The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit, *Acta. Cryst.*, **15**, 24-31
- Saito, K., Kurosawa, M., Murakoshi, I., (1993), Determination of a functional lysine residue of a plant cysteine synthase by site directed mutagenesis and the molecular evolutionary implications, *FEBS Lett.*, **328**, 111-114
- Salzmann, D., Christen, P., Mehta, P.K., Sandmeier, E., (2000), Rates of evolution of pyridoxal-5'-Phosphate-dependent enzymes, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **270**, 576-580
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA
- Sanger, F., Nickler, S., Coulson, A.R., (1977), DNA sequencing with chain terminating inhibitors, *Poc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 5463-5467
- Schneider, G., Käck, H., Lindqvist, Y., (2000), The mainfold of vitamin B₆ dependent enzymes, *Structure*, **8**, R1-R6
- Schneider, T.R., Gerhardt, E., Lee, M., Liang, P.H., Anderson, K.S., Schlichting, I., (1998), Loop closure and intersubunit communication in tryptophan synthase, *Biochem.* **37**, 5394-406
- Schnyder, J., Rottenberg, M., Erismann, K.H., (1975), The synthesis of threonine and thiothreonine from O-phosphohomoserine by extracts prepared from higher plants, *Biochem. Pysiol. Pflanzen*, **167**, 605-608
- Schröder, E., (1991), *Massenspektrometrie*, Springer Verlag, Heidelberg
- Shames, S.L., Ash, D.E., Wedler, F.C., Villafranca, J.J., (1984), Interaction of aspartate and aspartate-derived antimetabolites with the enzymes of the threonine biosynthetic pathway of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **259**, 15331-15339
- Shaw, J.P., Petsko, G.A., Ringe, D., (1997), Determination of the structure of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.9 Å resolution, *Biochem.*, **36**, 1329-1342
- Skarstedt, M.T. & Greer, S.B., (1973), Threonine Synthase of *Bacillus subtilis*. The nature of an associated dehydratase activity, *J. Biol. Chem.*, **248**, 1032-1044

- Snell, E.E., (1945), The vitamin B₆ Group, *J. Biol. Chem.*, **158**, 497-503
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A., (1986), Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130
- Studier, F.W., (1991), Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system, *J. Mol., Biol.*, **219**, 37-44
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W., (1990), Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Meth. Enzymol.*, **185**, 60-89
- Sugio, S., Petsko, G.A., Manning, J.M., Soda, K., Ringe, D., (1995), Crystal structure of a D-amino-acid aminotransferase: how the protein controls stereoselectivity, *Biochem.*, **34**, 9661-9669
- Symington, J., Green, M., Brackmann, K., (1981), Immunoautoradiographic detection of proteins after electrophoretic transfer from gels to diazo-paper: analysis of adenovirus encoded proteins, *Poc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 177-181
- Theze, J., Kleidman, L., St. Girons, I., (1974), Homoserine kinase from *Escherichia coli* K-12: properties, inhibition by L-threonine, and regulation of biosynthesis, *J. Bacteriol.*, **118**, 577-81
- Thoen, Å., Rognes, S.E., Aarnes, H., (1978), Biosynthesis of threonine from homoserine in pea seedlings: II. threonine synthase, *Plant Sci. Lett.*, **13**, 113-119
- Thomazeu, K., Curien, G., Dumas, R., Biou, V., (2001), Crystal structure of threonine synthase from *Arabidopsis thaliana*, *Prot. Science*, **10**, 638-648
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., (1979), Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro-cellulose sheets: procedure and some applications, *Poc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 4350 - 4354
- Ulevitch, R.J., & Kallen, R.G., (1977), Purification and characterisation of pyridoxal 5'-phosphate dependent serine hydroxymethylase from lamb liver and its action upon beta-phenylserines, *Biochem.*, **16**, 5342-50
- Voet D. & Voet J.G., (1992), *Biochemie*, VCH, Weinheim
- Wallsgrave, R.M., Lea, R.J., Mifflin, B., (1983), Intracellular localisation of aspartat kinase and the enzymes of threonine and methionine biosynthesis in green leaves, *Plant Physiol.*, **71**, 780-784
- Watanabe, Y. & Shimura, K., (1956), Biosynthesis of threonine from homoserine, *J. Biochem.*, **43**, 283-294
- Wood, W.B., (1966), Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA, *J. Mol. Biol.*, **16**, 118-133
- Wormser, E. & Pardee, A.B., (1958), Regulation of threonine biosynthesis in *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **78**, 416-432

Zehr, B.D., Savin, T.J., Hall, R.E., (1989), A one-step, low background Coomassie staining procedure for polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **182**, 157-159

7 Anhang

Verwendete Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent	MIR	<i>multiple isomorphous replacement</i>
%(w/v)	Gewichtprozent	MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
A	Ampere	MR	<i>molecular replacement</i>
Å	Ångström (1 Å = 10 ⁻¹⁰ m)	M _r	relative Molekülmasse
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ncs	<i>non crystallographic symmetry</i>
Abb.	Abbildung	NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
ADP	Adenosin-5'-diphosphat	OASS	o-Acetylserin Sulfhydrylase
APS	Ammoniumperoxodisulfat	OD _x	Optische Dichte bei Wellenlänge x
AS	Ammoniumsulfat	p.A.	<i>per analysis</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
bp	Basenpaare	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
CCD	<i>charge coupled device</i>	pdb	<i>protein data base</i>
dATP	3'-Desoxy-adenosin-5'-triphosphat	PEG	Polyethylenglykol
dCTP	3'-Desoxy-cytidin-5'-triphosphat	pH	<i>potentii Hydrogenii</i>
DEAE	Diethylaminoethyl	PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron	PMP	Pyridoxamin-5'-Phosphat
dGTP	3'-Desoxy-guanosin-5'-triphosphat	PVDF	Polyvinylidendifluorid
dITP	3'-Desoxy-inosin-5'-triphosphat	R _r -Wert	relative Laufstrecke
DNA	Desoxyribonukleinsäure	rms	<i>root mean square</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA	RT	Raumtemperatur
DTT	Dithiothreitol	<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
dTTP	3'-Desoxy-thymidin-5'-triphosphat	SAM	S-Adenosylmethionin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
E.C.	<i>Enzyme commission</i>	SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> , Gelfiltration
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'- tetraessigsäure	SeMet	Selenomethionin
FF	<i>fast flow</i>	SIR	<i>single isomorphous replacement</i>
HA	Hydroxylapatit	ssDNA	einzelsträngige DNA
HASYLAB	Hamburger Synchrotron- Strahlenlabor	Std	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1- ethansulfonsäure	<i>T.maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
HIC	<i>hydrophobic interaction chromatography</i>	Tab.	Tabelle
HM	<i>High marker</i>	TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
IC	Ionenchromatographie	TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
i.d.R.	in der Regel	TD	Threonin Deaminase
IEF	Isoelektrische Fokussierung	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
IP	Isoelektrischer Punkt	TFB	<i>Transforming buffer</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalacto- pyranosid	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
K	Kelvin	TRPS	Tryptophan Synthase
kb	kilo Basen	TS	Threonin Synthase
kDa	kilo Dalton	TSA	Threonin Synthase <i>Arabidopsis</i>
KP _i	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	TSH	Threonin Synthase Hefe
LB	Luria-Bertani	TSTM	Threonin Synthase <i>Thermotoga</i>
LM	<i>Low marker</i>	Upm	Umdrehungen pro Minute
m	milli	UV/VIS	Ultravioletter/sichtbarer Bereich elektromagnetischer Strahlung
MAD	<i>Multiple anomalous dispersion</i>	V	Volt
MALDI-MS	<i>matrix assisted laser desorption /ionisation mass spectrometry</i>		
min	Minute(n)		

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Struktur von Pyridoxalphosphat	7	Abb. 4.21: Schematische Darstellung des	
Abb. 2.2: π -Orbitale der PLP Schiff-Base	8	Aktivzentrums TSH	60
Abb. 2.3: PLP-Transaldimierung.....	8	Abb. 4.22: Ausschnitt des Aktivzentrums der TSH.....	61
Abb. 2.4: PLP-Reaktionsspezifitäten	9	Abb. 4.23: Kofaktor mit Elektronendichte.....	62
Abb. 2.5: Faltungstypen der PLP-Enzyme.....	12	Abb. 4.24: Energieminimierung TSH.....	64
Abb. 2.6: Unterteilung des Faltungstyp I	13	Abb. 4.25: DEAE-Sepharose TSA	64
Abb. 2.7: Aspartat-Familie	14	Abb. 4.26: Hydroxylapatit TSA	64
Abb. 2.8: Katabolismus von Threonin	15	Abb. 4.27: Phenyl-Sepharose TSA	64
Abb. 2.9: Reaktion der Threonin Synthase	16	Abb. 4.28: Q-Sepharose TSA	64
Abb. 2.10: Ewald-Konstruktion	20	Abb. 4.29: Gelfiltration TSA	64
Abb. 2.11: Harker-Diagramm.....	23	Abb. 4.30: Reinigungsgel von TSA	65
Abb. 2.12: MAD Experiment	25	Abb. 4.31: UV/VIS-Spektrum von TSA.....	65
Abb. 4.1: DEAE-Sepharose TSH.....	45	Abb. 4.32: Smart-Chromatogramm von TSA	66
Abb. 4.2: Phenyl-Sepharose TSH.....	45	Abb. 4.33: Massenbestimmung von TSA	
Abb. 4.3: Q-Sepharose TSH.....	45	mit Smart.....	66
Abb. 4.4: Gelfiltration TSH	45	Abb. 4.34: Massenbestimmung von TSA	
Abb. 4.5: Reinigungsgel von TSH.....	46	mit SDS-PAGE.....	66
Abb. 4.6: UV/VIS-Spektrum von TSH	46	Abb. 4.35: Kristalle der TSA.....	67
Abb. 4.7: Smart-Chromatogramm von TSH.....	47	Abb. 4.36: Diffraktionsbild TSA	68
Abb. 4.8: Massenbestimmung von TSH		Abb. 4.37: DEAE-Sepharose TSTM.....	70
mit Smart	47	Abb. 4.38: Phenyl-Sepharose TSTM	70
Abb. 4.9: Massenbestimmung von TSH		Abb. 4.39: Gelfiltration TSTM.....	70
mit SDS-PAGE	47	Abb. 4.40: Gel von TSTM.....	71
Abb. 4.10: Isoelektrische Fokussierung von TSH.....	47	Abb. 4.41: UV/VIS-Spektrum von TSTM.....	71
Abb. 4.11: Phylogenetischer Baum der Threonin		Abb. 4.42: Smart-Chromatogramm von TSTM.....	72
Synthasen.....	48	Abb. 4.43: Massenbestimmung von TSTM	
Abb. 4.12: Sequenzvergleich der		mit Smart.....	72
Threonin Synthasen.....	49	Abb. 4.44: Massenbestimmung von TSTM	
Abb. 4.13: Kristall der TSH	51	mit SDS-PAGE.....	72
Abb. 4.14: Diffraktionsbild TSH.....	53	Abb. 4.45: Isoelektrische Fokussierung von TSTM.....	72
Abb. 4.15: Ramachandran Diagramm	55	Abb. 4.46: Kristall der TSTM.....	73
Abb. 4.16: $C\alpha$ -Plot der TSH.....	56	Abb. 4.47: Diffraktionsbild TSTM	74
Abb. 4.17: <i>Ribbon-Plot</i> der TSH	57	Abb. 5.1: Superposition von TSH mit TD	78
Abb. 4.18: Schematischer Aufbau der TSH.....	58	Abb. 5.2: <i>Ribbon-Plot</i> der „Extra-Sekundärstruktur-	
Abb. 4.19: Oberflächendarstellung der TSH.....	59	Elemente	79
Abb. 4.20: Ladungsverteilung auf der		Abb. 5.3: Superposition der Aktivzentren von	
Oberfläche von TSH	59	TSH und TD.....	81
		Abb. 5.4: Oberflächendarstellung der aktiven	
		Tasche von TSH	82
		Abb. 5.5: Reaktionsmechanismus der TSH	83

Buchstabencode der Aminosäuren

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

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Einteilung der PLP-Enzyme nach Sequenzvergleich.....	10	Tab. 4.3: Datensammlung TSH.....	53
Tab. 2.2: Einteilung der PLP-Enzyme nach Faltungstyp.....	13	Tab. 4.4: Verfeinerungsstatistik der TSH.....	54
Tab. 2.3: Kontrolle der Aspatokinase.....	14	Tab. 4.5: Ausbeute der TSA Reinigung.....	65
Tab. 3.1: Verwendete Geräte.....	28	Tab. 4.6: Zellparameter und Kristallisationsbedingungen der TSA.....	68
Tab. 3.2: Verwendete Reinigungsschritte.....	37	Tab. 4.7: Datensammlung TSA.....	69
Tab. 4.1: Ausbeute der TSH Reinigung.....	46	Tab. 4.8: Ausbeute der TSTM Reinigung.....	71
Tab. 4.2: Zellparameter und Kristallisationsbedingungen der TSH.....	52	Tab. 4.9: Zellparameter und Kristallisationsbedingungen der TSTM.....	73
		Tab. 4.10: Datensammlung TMTS.....	75

Factorial solutions 01 bis 48

Nr.	Konz. Puffer [M]	Konz. Salz [M]	Konz.	Präzipitanz:	pH	Bemerkung		
1	0.10	Na Acetat	0.20	CaCl ₂	30.0 %	MPD	4.6	
2	0.10	MES/NaOH	0.10	K/Na-Tartrat	-	-	6.4	
3	-	-	-	-	0.4 M	(NH ₄) ₂ PO ₄	6.4	NH ₄ OH eingestellt
4	0.10	Tris/HCl	-	-	3.0 M	(NH ₄) ₂ SO ₄	8.3	
5	0.10	HEPES/NaOH	0.19	Na-Citrat	19.0 %	MPD	7.5	
6	0.10	Na Acetat	0.20	MgCl ₂	30.0 %	PEG 4000	4.5	not filtered
7	0.10	HEPES/NaOH	1.20	Na-Citrat	-	-	7.9	
8	0.20	Na-Citrat	-	-	2.0 M	(NH ₄) ₂ SO ₄	5.6	H ₂ SO ₄ eingestellt
9	0.10	Na-Citrat	0.20	NH ₄ -Acetat	30.0 %	PEG 400	5.9	
10	0.10	Na Acetat	-	-	1.5 M	(NH ₄) ₂ PO ₄	5.9	NH ₄ OH eingestellt
11	0.10	HEPES/NaOH	0.20	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 M	(K/Na)-Phosphat	6.6	
12	0.10	Tris/HCl	0.20	Na-Citrat	20.0 %	PEG 400	8.9	
13	0.10	HEPES/NaOH	0.20	CaCl ₂	25.0 %	PEG 4000	7.0	not filtered
14	0.10	MES/NaOH	0.20	MgCl ₂	30.0 %	PEG 8000	6.1	not filtered
15	0.10	Na-Citrat	0.19	Li ₂ SO ₄	29.0 %	PEG 4000	5.9	not filtered
16	-	-	0.20	Li ₂ SO ₄	1.0 M	Na-Acetat	8.2	old pH 4.2
17	0.07	Tris/HCl	0.13	(NH ₄) ₂ PO ₄	20.0 %	MPD	6.5	old pH 7.4
18	0.10	Tris/HCl	0.20	NH ₄ -Acetat	2.0 M	(K/Na)-Phosphat	6.6	
19	0.10	Na-Citrat	0.10	(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 8000	6.1	not filtered
20	0.10	MES/NaOH	-	-	30.0 %	MPD	6.2	
21	0.10	HEPES/NaOH	0.20	MgCl ₂	30.0 %	PEG 400	7.1	
22	0.10	Tris/HCl	0.20	Na-Acetat	30.0 %	PEG 4000	8.4	not filtered
23	0.10	Tris/HCl	-	-	1.0 M	K/Na-Tartrat	9.1	
24	0.10	Tris/HCl	0.20	CaCl ₂	-	-	8.4	
25	0.07	Na-Citrat	0.33	NH ₄ -Acetat	20.0 %	MPD	6.4	
26	0.10	MES/NaOH	2.00	Na-Acetat	-	-	6.9	
27	0.10	MES/NaOH	0.20	K/Na-Tartrat	30.0 %	PEG 8000	6.5	not filtered
28	0.10	HEPES/NaOH	1.00	K/Na-Tartrat	-	-	7.7	
29	0.10	Na Acetat	0.20	(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 400	4.8	
30	0.10	HEPES/NaOH	0.10	(NH ₄) ₂ SO ₄	20.0 %	PEG 4000	7.3	not filtered
31	0.10	MES/NaOH	2.00	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	6.8	
32	0.10	MES/NaOH	0.20	NaCl	30.0 %	Ethanol	6.2	
33	0.10	HEPES/NaOH	0.20	MgCl ₂	30.0 %	Ethanol	7.0	
34	0.10	Tris/HCl	0.20	NH ₄ -Acetat	30.0 %	Ethanol	8.2	
35	0.10	Na Acetat	0.20	CaCl ₂	30.0 %	Ethanol	4.5	old pH 5.3
36	0.10	HEPES/NaOH	0.20	Na-Acetat	30.0 %	Ethanol	7.4	
37	0.10	HEPES/NaOH	0.20	MgCl ₂	29.0 %	Isopropanol	6.9	
38	0.10	HEPES/NaOH	-	-	30.0 %	MPD	7.3	
39	0.10	Na Acetat	-	-	2.0 M	Na-Formiat	5.3	
40	0.10	HEPES/NaOH	0.20	Na-Citrat	30.0 %	Isopropanol	7.5	
41	0.10	HEPES/NaOH	-	-	20.0 %	PEG 4000	7.4	not filtered
					10.0 %	Isopropanol		
42	0.10	HEPES/NaOH	-	-	1.0 M	Li ₂ SO ₄	7.5	
43	0.10	Tris/HCl	0.20	Li ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 4000	8.6	not filtered
44	0.10	HEPES/NaOH	0.20	(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 6000	7.2	not filtered
45	0.10	Na Acetat	-	-	1.5 M	Na-Acetat	6.1	
46	-	-	0.10	Na-Citrat	1.0 M	(NH ₄) ₂ PO ₄	4.9	old pH 6.1
47	-	-	-	-	4.0 M	Na-Formiat	8.4	
48	0.10	HEPES/NaOH	-	-	1.2 M	Na-Citrat	7.9	

All solutions contain 0.02% NaN₃

Factorial solutions 49 bis 96

Nr.	Konz. Puffer [M]	Konz. Salz [M]	Konz.	Präzipitanz:	pH	Bemerkung
49	-	0.40	K/Na-Tartrat	-	8.2	
50	0.10	Tris/HCl	2.00 (NH ₄) ₂ SO ₄	-	8.2	
51	0.10	Tris/HCl	0.20 MgCl ₂	30.0 %	MPD	8.3
52	0.10	MES	0.20 Na-Citrat	30.0 %	Isopropanol	6.3 old pH 7.7
53	0.10	Na-Citrat	0.20 NH ₄ -Acetat	30.0 %	PEG 4000	6.4 not filtered
54	0.10	Na Acetat	0.20 NH ₄ -Acetat	30.0 %	PEG 4000	5.7 not filtered
55	0.10	Tris/HCl	0.20 Na-Citrat	30.0 %	PEG 400	8.0 old pH 8.8
56	0.10	HEPES/NaOH	0.20 CaCl ₂	28.0 %	PEG 400	7.2
57	0.10	MES	0.20 (NH ₄) ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 8000	6.3 not filtered
58	0.20	Imidazol/HCl	0.20 NH ₄ -Acetat	30.0 %	MPD	7.1
59	0.10	Tris/HCl	0.20 (NH ₄) ₂ PO ₄	30.0 %	Isopropanol	6.3
60	0.10	Na Acetat	0.20 (NH ₄) ₂ SO ₄	25.0 %	PEG 4000	4.7 not filtered
61	0.10	MES	-	30.0 %	MPD	6.1 old pH 7.3
62	0.10	Na Acetat	0.20 CaCl ₂	30.0 %	Isopropanol	4.5 old pH 5.2
63	0.10	Imidazol/HCl	0.50 Na-Acetat	-	-	7.6
64	0.10	Imidazol/HCl	0.20 NH ₄ -Acetat	30.0 %	MPD	7.2
65	0.10	HEPES/NaOH	0.20 Na-Citrat	18.0 %	Isopropanol	6.6 old pH 7.5
66	0.10	MES	0.20 Na-Acetat	30.0 %	PEG 8000	5.9 old pH 6.5
67	0.10	HEPES/NaOH	0.80 K/Na-Tartrat	-	-	7.6
68	-	0.20	(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 400	5.7
69	-	0.20	(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 4000	6.0 not filtered
70	-	2.00	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	5.8
71	0.10	HEPES/NaOH	-	1.6 M	(K/Na)-Phosphat	9.0 made with KH ₂ PO ₄
72	0.10	Tris/HCl	-	4.0 %	PEG 400	4.8 old pH 8.4
73	0.10	Na Acetat	-	2.0 %	PEG 4000	4.5
74	0.10	HEPES/NaOH	1.02 (NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 %	PEG 4000	7.6
75	0.10	Na-Citrat	-	20.0 %	PEG 4000	8.8 old pH 6.7
			-	20.0 %	Isopropanol	
76	0.10	Tris/HCl	0.20 (NH ₄) ₂ PO ₄	25.0 %	PEG 8000	6.4 not filtered
77	0.10	MES	1.40 Na-Acetat	-	-	6.8
78	0.10	MES	0.20 Mg-Acetat	20.0 %	PEG 8000	6.4 not filtered
79	0.10	Tris/HCl	0.20 NH ₄ -Acetat	30.0 %	Isopropanol	8.3
80	0.10	MES	0.20 Mg-Acetat	30.0 %	MPD	6.4 old pH 7.0
81	0.09	Na-Citrat	0.19 NH ₄ -Acetat	22.0 %	MPD	6.3
82	-	0.20	(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0 %	PEG 8000	6.0 not filtered
83	0.10	Tris/HCl	-	8.0 %	PEG 8000	8.5
84	0.10	Na Acetat	-	8.0 %	PEG 4000	4.7
85	-	0.05	K ₂ HPO ₄	20.0 %	PEG 8000	9.4 not filtered
86	-	-	-	30.0 %	PEG 1000	7.2 old pH 6.5
87	-	0.20	Mg-Formiat	-	-	7.3
88	0.10	MES	0.20 Zn-Acetat	18.0 %	PEG 8000	6.3 not filtered
89	0.10	MES	0.20 Ca-Acetat	18.0 %	PEG 8000	6.5 not filtered
90	0.10	Na Acetat	2.00 (NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	4.5
91	-	1.00	Li ₂ SO ₄	2.0 %	PEG 8000	6.7
92	-	0.86	Li ₂ SO ₄	9.0 %	PEG 8000	6.7
93	0.10	HEPES/NaOH	1.50 Li ₂ SO ₄	-	-	7.7
94	0.10	HEPES/NaOH	0.10 Na-Citrat	40.0 %	MPD	7.0 old pH 7.7
95	0.10	HEPES/NaOH	1.35 Na-Citrat	-	-	7.8
96	0.10	HEPES/NaOH	2.00 (NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 %	PEG 400	7.6

All solutions contain 0.02% NaN₃