

**Strukturelle Untersuchungen an  
1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase  
aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5.  
und  
SoxXA aus *Paracoccus pantotrophus***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
– Dr. rer. nat. –  
des Fachbereichs Chemie an der Universität Dortmund

angefertigt am  
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund  
und  
an den Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg/Saar

vorgelegt von

Tresfore Richard Dambe

Homburg, Dezember 2004



Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2001 bis Dezember 2004 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung Physikalische Biochemie von Herrn Prof. Dr. Roger S. Goody und an den Universitätskliniken des Saarlandes im Fachbereich Biophysik unter der Leitung von Prof. Dr. Axel J. Scheidig durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Roger S. Goody
2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Homburg, den 14. Dezember 2004



---

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>INHALTSVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>V</u></b>
----------------------------------	-----------------

<b><u>ABKÜRZUNGEN</u></b>	<b><u>VIII</u></b>
---------------------------	--------------------

<b><u>1 EINLEITUNG</u></b>	<b><u>1</u></b>
----------------------------	-----------------

<b>1.1 1,5-ANHYDRO-D-FRUCTOSE-REDUKTASE</b>	<b>1</b>
---	----------

1.1.1 BIOKATALYSATOREN IN DER ORGANISCHEN SYNTHESE	1
--	---

1.1.2 1,5-ANHYDRO-D-FRUCTOSE	3
------------------------------	---

1.1.3 1,5-ANHYDRO-D-FRUCTOSE-REDUKTASE AUS <i>S. MORELENSE</i> S-30.7.5.	8
--	---

1.1.4 ZIELSETZUNG	12
-------------------	----

<b>1.2 SOX-PROTEINE</b>	<b>12</b>
-------------------------	-----------

1.2.1 SCHWEFEL OXIDATION IN BAKTERIEN	12
---------------------------------------	----

1.2.2 <i>PARACOCCLUS PANTOTROPHUS</i>	13
---------------------------------------	----

1.2.3 SOX-CLUSTER	14
-------------------	----

1.2.4 REAKTIONSMECHANISMUS ZUR SCHWEFELOXIDATION	17
--	----

1.2.5 ZIELSETZUNG	19
-------------------	----

<b><u>2 MATERIALIEN</u></b>	<b><u>21</u></b>
-----------------------------	------------------

<b>2.1 CHEMIKALIEN</b>	<b>21</b>
------------------------	-----------

<b>2.2 GERÄTE</b>	<b>21</b>
-------------------	-----------

<b>2.3 COMPUTERPROGRAMME</b>	<b>23</b>
------------------------------	-----------

<b><u>3 METHODEN</u></b>	<b><u>24</u></b>
--------------------------	------------------

<b>3.1 PROTEINCHEMISCHE METHODEN</b>	<b>24</b>
--------------------------------------	-----------

3.1.1 KONZENTRIEREN VON PROTEINLÖSUNGEN	24
---	----

---

3.1.2	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINLÖSUNGEN	24
3.1.3	LAGERUNG VON PROTEINLÖSUNGEN	24
<b>3.2</b>	<b>PROTEINKRISTALLISATION</b>	<b>25</b>
3.2.1	EINFÜHRUNG IN DIE KRISTALLISATION	25
3.2.2	KRISTALLISATION MIT DER METHODE DES HÄNGENDEN TROPFENS	26
3.2.3	MONTIEREN VON KRISTALLEN UNTER CRYO-BEDINGUNGEN	26
<b>3.3</b>	<b>RÖNTGENOGRAPHISCHE METHODEN</b>	<b>27</b>
3.3.1	EINLEITUNG IN DIE RÖNTGENDIFFRAKTION	27
3.3.2	DATENSAMMLUNG	36
3.3.3	DATENPROZESSIERUNG	38
3.3.4	MOLEKULARER ERSATZ	39
3.3.5	PHASIERUNG DURCH ANOMALE DISPERSION	40
3.3.6	DICHTE-MODIFIKATION	42
3.3.7	BAUEN EINES ERSTEN MODELLS	44
3.3.8	ERSTELLEN EINES HOMOLOGIEMODELLS	44
3.3.9	VERFEINERUNG EINER STRUKTUR	45
3.3.10	ERSTELLEN VON „TOPOLOGIE-, PARAMETERDATEIEN“	48
3.3.11	SUCHE NACH LÖSUNGSMITTEL MOLEKÜLEN	49
3.3.12	ERRECHNEN VON ELEKTRONENDICHTE	49
3.3.13	DARSTELLEN VON PROTEINMODELL UND ELEKTRONENDICHTE	51
<b>3.4</b>	<b>FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE IM KRISTALL</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>1,5-ANHYDRO-D-FRUCTOSE-REDUKTASE</b>	<b>55</b>
4.1.1	FINDEN VON KRISTALLISATIONSBEDINGUNGEN	55
4.1.2	FLUORESZENZMESSUNGEN IM KRISTALL	57
4.1.3	AUFKLÄREN DER STRUKTUR	61
4.1.4	ALLGEMEINE STRUKTUR	69
4.1.5	VOLLSTÄNDIG OXIDIERTE AFR	81
4.1.6	DINUCLEOTID-BINDUNG	83
4.1.7	AKTIVES ZENTRUM	90

---

<b>4.2 SoxXA</b>	<b>95</b>
4.2.1 KRISTALLISATION	95
4.2.2 STRUKTURAUFKLÄRUNG	96
4.2.3 ALLGEMEINE STRUKTUR	101
4.2.4 AKTIVES ZENTRUM VON SOXXA	105
4.2.5 REAKTIONSMECHANISMUS	109
4.2.6 ELEKTRONENTRANSPORT	114
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>117</b>
<hr/>	
5.1 1,5-ANHYDRO-D-FRUCTOSE-REDUKTASE	117
5.2 SoxXA	118
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>120</b>

---

## Abkürzungen

×g	Erdbeschleunigung
1,5-AF	1,5-Anhydro-D-fructose
1,5-AM	1,5-Anhydro-D-mannitol
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AFR	1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase
ASADH	Aspartat-β-semialdehyd-Dehydrogenase
BIS-TRIS	Bis-(2-hydroxyethyl)-amino-tris-(hydroxymethyl)-methan
<i>BSA</i>	<i>bovin serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
<i>CCD</i>	<i>charged coupled device</i> (Detektor-Typ)
Css	Cysteinpersulfid
Da	Dalton
DESY	<i>Deutsches Elektronen Synchrotron</i>
DTT	Dithiotheritol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
FDH	Formiat-Dehydrogenase
<i>FOM</i>	<i>figure of merit</i> (Gewichtungsfaktor für Phasen)
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFOR	Glucose-Fructose-Oxidoreduktase
MAD	<i>multiple anomalous dispersion</i> (mehrfache anomale Dispersion)
MIR	<i>multiple isomorphous replacement</i> (mehrfacher isomorpher Ersatz)
MME	Monomethylether
MPD	2-Methy-2,4-pentandiol
<i>MR</i>	<i>molecular replacement</i> (molekularer Ersatz)
NAD(P) <sup>+</sup>	Nicotinamid-adeninucleotid(phosphat) (oxidiert)
NAD(P)H	Nicotinamid-adeninucleotid(phosphat) (reduziert)
<i>NCS</i>	<i>non crystallographic symmetry</i> (nicht-kristallographische Symmetrien)
<i>P.</i>	<i>Paracoccus</i>
PEG	Polyethylenglycol
<i>S.</i>	<i>Sinorhizobium</i>

---

SAD	<i>single anomalous dispersion</i> (einfache anomale Dispersion)
SDR	<i>short-chain dehydrogenases/reductases</i>
SIR	<i>single isomorphus replacement</i> (einfacher isomorpher Ersatz)
SLS	<i>Swiss Light Source</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
v/v	Volumenanteil
w/v	Masse pro Volumen

# 1 Einleitung

## 1.1 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase

### 1.1.1 Biokatalysatoren in der organischen Synthese

Die Zahl der Enzyme, die in der chemischen Synthese verwendet werden, wächst ständig (Straathof *et al.*, 2002). Zu enzymatisch katalysierten Reaktionen, über die in der Literatur berichtet wird, zählen unter anderem die asymmetrische Synthese (Nakamura und Matsuda, 1998), die Bildung von C-C Bindungen, Kohlenhydrat-Derivatisierung, Peptidsynthese oder Redoxreaktionen (Leonida, 2001).

Enzyme reagieren dabei gewöhnlich regio- und stereoselektiv unter milden Bedingungen bezogen auf den pH-Wert und die Temperatur (Faber, 1997). Diese Vorteile überwiegen häufig die Nachteile des für die organische Synthese ungewöhnlichen Lösungsmittels Wasser und der manchmal geringen Enzymstabilität. Die hohe Substratspezifität vieler Enzyme schränkt zwar auf der einen Seite die Anwendungsmöglichkeiten der Enzyme ein, auf der anderen Seite macht sie eine aufwendige Schutzgruppenchemie, wie sie häufig mit chemischen Katalysatoren notwendig ist, überflüssig (Toone *et al.*, 1989). Außerdem wird enzymkatalytisch normalerweise kein Racemat produziert, das in der chemischen Katalyse häufig anfällt und meist aufwendig in seine Enantiomere getrennt werden muss, sondern man erhält meist ein Enantiomer in hoher Reinheit.

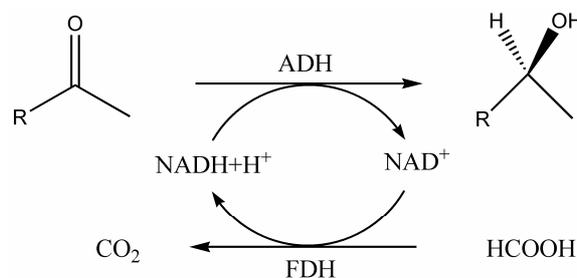
Aufgrund der wachsenden Erkenntnis über Wirkmechanismen von Proteinen und deren Wechselwirkung mit Wirkstoffen auf molekularer Ebene, sind heute Bereiche wie die pharmazeutische Industrie, Kosmetikindustrie, Lebensmittelindustrie oder der Biochemiker im Labor an reinen Enantiomeren interessiert. Für die Wirtschaftlichkeit der Produktion spielt vor allem die enantiomerenreine Synthese eine wichtige Rolle, was ein Vergleich der enantiomerenreinen biokatalytischen und chemisch katalysierten Synthese mit anschließender Racemattrennung von (R)-2-Hydroxy-4-phenylbuttersäure zeigte (Schmidt *et al.*, 1992).

Wie unterschiedlich Enantiomere mit Proteinen und Rezeptoren in Wechselwirkung treten können, sieht man am Beispiel des Duftstoffes Carvon, einem Terpen. Während R(-)-Carvon nach grüner Minze duftet, riecht S(+)-Carvon nach Kümmel (Streitwieser *et al.*, 1994). Ein anderes Beispiel, das traurige Berühmtheit erfuhr, ist das Medikament Contergan® der Fa. Grünenthal, das Ende der Fünfziger Jahre des vorigen Jahrhunderts als Schlafmittel auf den Markt kam. Während das (R)-Enantiomer des Wirkstoffs Thalidomid

((±)-N-(2,6-Dioxo-3-piperidyl)phthalimid) beruhigende Wirkung hat, hat das (S)-Enantiomer teratogene Wirkung, die zu Missbildungen bei Neugeborenen führte (McBride, 1961; Lenz, 1966).

Enzyme der Klasse Oxidoreduktasen katalysieren eine große Anzahl von Redoxreaktionen, darunter die Reduktion von Ketonen und Aldehyden zu enantiomerenreinen Alkoholen (Abbildung 1). Diese Reaktion wird im technischen Maßstab als Biohydrierung bezeichnet (Hummel, 1999). Ein Beispiel für die technische Anwendung bildet die (R)-spezifische NADP(H)-abhängige Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* zu Synthese enantiomerenreinen Hydroxyhexansäure-Estern. Diese werden als chirale Bausteine zur Synthese von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren eingesetzt und finden in der Behandlung von Arteriosklerose oder Hypercholesterolämie ihre Anwendung (Hummel, 1997; Hummel, 1999).

Ein großer Nachteil der Oxidoreduktasen im präparativen Maßstab, ist die Notwendigkeit von Cofaktoren wie die oxidierte und reduzierte Form von Nicotinamide-nucleotid(phosphat) ( $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ ), Flavinadeninucleotid (FAD), Flavinmononucleotid (FMN) oder Pyrroquinolinquinon (PQQ). Diese werden häufig aus Hefe isoliert (Sakai *et al.*, 1973) und danach chemisch (Lehninger, 1957), enzymatisch (Rafter und Colowick, 1957; Hayashi *et al.*, 1979; Suye und Yokoyama, 1985) oder mikrobiologisch modifiziert (Egushi *et al.*, 1983), sind gewöhnlich instabil und stellen einen gewaltigen Kostenfaktor dar. Aus diesem Grund werden sie gewöhnlich *in situ* regeneriert. *In vitro* wird ein zweites Redoxsystem zur Reaktion hinzugeführt, das den Cofaktor wieder in den gewünschten Redoxzustand überführt, wie am Beispiel der gekoppelten Reaktionen von Alkohol-Dehydrogenase (ADH) und Formiat-Dehydrogenase (FDH) gezeigt wurde (Abbildung 1 (Schute *et al.*, 1976; Leonida, 2001)). Dadurch werden nur noch katalytische Mengen des Cofaktors benötigt, und die Kosten können dramatisch gesenkt werden.



**Abbildung 1:** Gekoppelte Enzymreaktion. Ein Keton wird mittels einer Alkohol-Dehydrogenase (ADH) zum Alkohol reduziert. Die Regenerierung des Cofaktors erfolgt über die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  mit Formiat-Dehydrogenase (FDH). Dabei wird Ameisensäure beziehungsweise Formiat zu Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) oxidiert.

Alternativen in der Regenerierung des Cofaktors konnten über den Einsatz ganzer Zellen (Ergan *et al.*, 1984; Chenault und Whitesides, 1987; Ergan *et al.*, 1987) oder einer Rückreaktion mit dem gleichen Enzym (Hummel und Kula, 1989) gezeigt werden.

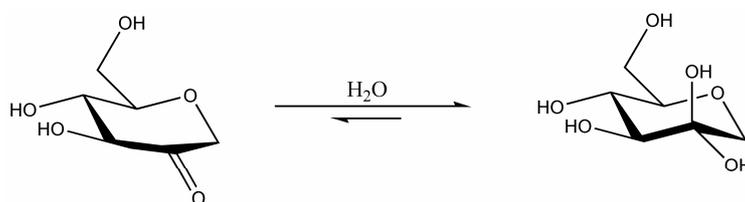
Für die hier röntgenkristallographisch untersuchte 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase (AFR) konnte gezeigt werden, dass sie das Potential hat, als Biokatalysator für 1,5-Anhydro-D-fructose (1,5-AF) und andere Kohlenhydratderivate in der stereoselektiven Reduktion der Keto-Funktion zum Einsatz zu kommen (Kühn, 2004).

### 1.1.2 1,5-Anhydro-D-fructose

1,5-AF (Abbildung 2) wurde 1980 erstmals chemisch synthetisiert (Lichtenthaler *et al.*, 1980). Aufgrund ihrer verschiedenen funktionellen Gruppen, die unterschiedliche Reaktionen eingehen können, ist sie ein attraktiver chiraler Baustein für die Synthese von Feinchemikalien. Allerdings gab es lange Zeit kaum Anwendungen aufgrund der geringen Ausbeuten bei der chemischen Synthese (Andersen *et al.*, 2002). Mit dem Abbau von Glycan durch eine  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glycan-Lyase (Baute *et al.*, 1988) und der Oxidation von 1,5-Anhydroglucitol (1,5-AG) (Freimund *et al.*, 1998) sind heute auch zwei enzymatische Synthesewege von 1,5-AF bekannt. Vor allem durch den Einsatz der  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glycan-Lyase und durch den Einsatz von Stärke als Ausgangsmaterial konnten die Kosten zur Synthese von 1,5-AF deutlich gesenkt werden (Witcoff und Reuben, 1996). Die  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glycan-Lyase wird dabei in *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris* und *Hansenula polymorpha* exprimiert (Bojsen *et al.*, 1999), immobilisiert und in Kombination mit  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Bindung spaltenden Pullulanasen zum Stärkeabbau eingesetzt. Dadurch ist es heute möglich 1,5-AF im Kilogramm Maßstab zu Preisen zu produzieren, die den Preisen der D-Glucose vergleichbar sind (Yu *et al.*, 2004a). In Mutagenitäts- und Toxizitätsstudien hat sich 1,5-AF als unbedenklich erwiesen, was einen Einsatz im Lebensmittelbereich möglich macht, was durch die Anzahl der Patente auf diesem Sektor deutlich wird (siehe <http://ep.espacenet.com/> und <http://www.uspto.gov/index.html>). So wurde 1,5-AF zum Beispiel als kalorienfreier Süßstoff (Yu und Kragh, 1999) oder aufgrund seiner antioxidativen Wirkung zur Konservierung von Lebensmitteln patentiert (Junichi und Hideto, 2003; Kenkou und Mami, 2003). Aufgrund der weiter unten beschriebenen regulativen Wirkung auf den Glycogenhaushalt wird eine Anwendung als orales Antidiabetikum diskutiert (Ahren *et al.*, 2000; Ahren und Yu, 2004). Derivate von 1,5-AF wie Ascopyron P, die bereits effizient durch 1,5-AF-Dehydratasen hergestellt werden können (Thomas *et al.*, 2002; Refdahl und Morgan, 2003), sind aufgrund

ihrer antibakteriellen Eigenschaften ebenfalls als Konservierungsmittel geeignet (Buchter-Larsen *et al.*, 2003; Morgan und Yu, 2003), während bei 1,5-Anhydrohexitolnucleosid-Analoga (Hossian *et al.*, 1997), insbesondere für 1,5-AM Derivate, eine antivirale Wirkung diskutiert wird (Van Aerschot, 2004). Das vielfältige Marktpotential wird unter anderem vom transdisziplinären EU-Projekt NEPSA (*New Products from Starch derived 1,5-Anhydro-D-fructose*) erarbeitet (<http://www.eurice.de/NEPSA/>).

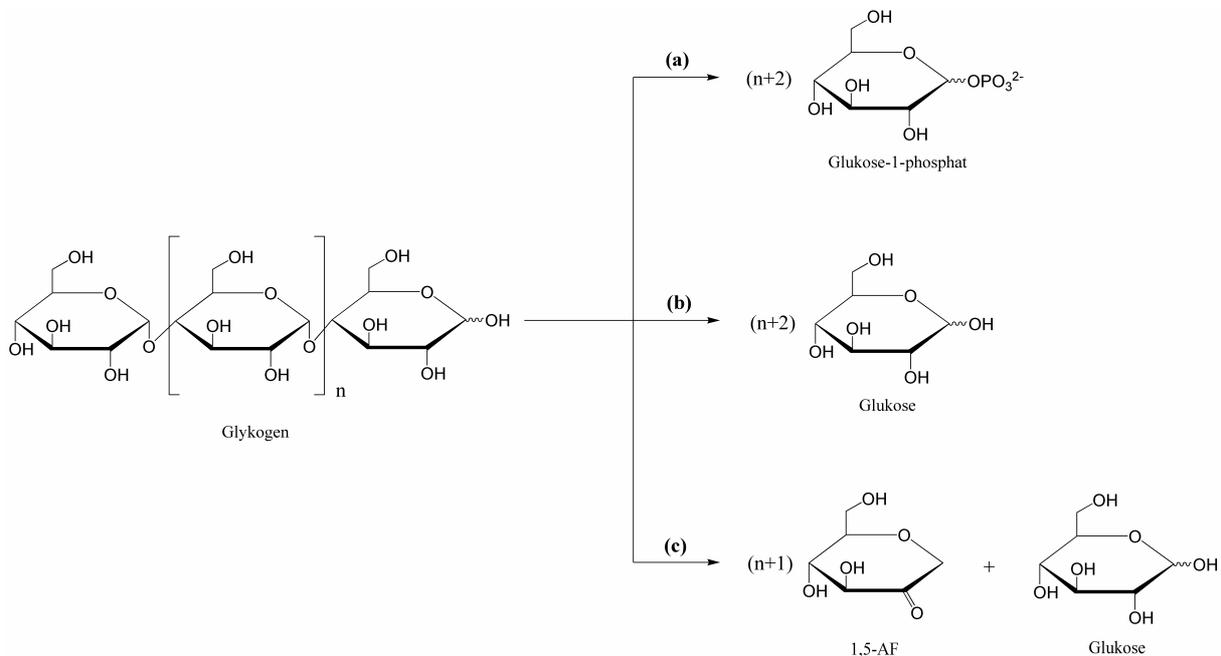
Durch das Fehlen der OH-Gruppe an C1 Position besitzt 1,5-AF keine für Kohlenhydrate typische Form eines zyklischen Halbactals mit all seinen Eigenschaften, wie ein Gleichgewicht zwischen ringoffener und –geschlossener Form. Es handelt sich vielmehr um die Etherstruktur eines  $\beta$ -Tetrahydropyrans, das permanent in der Pyranose Form vorliegt. Die Struktur von 1,5-AF wurde intensiv untersucht (Taguchi *et al.*, 1993; Freimund und Kopper, 1998). Neben geringen Mengen dimerer Formen wurden in wässriger Lösung zwei monomere Formen nachgewiesen, wobei das Gleichgewicht allerdings fast komplett auf der Seite der hydratisierten Form liegt (Abbildung 2 (Andersen *et al.*, 2002)). Eine hydratisierte *gem*-Diol-Form der Carbonyl-Gruppe in Wasser ist nicht außergewöhnlich. So liegt zum Beispiel Formaldehyd in wässriger Lösung nahezu vollständig in der *gem*-Diol-Form vor (Streitwieser *et al.*, 1994). Der Grad der Hydratisierung hängt mit der Stabilität des Carbokations zusammen. Je instabiler das Carbokation ist, desto weniger kann die Carbonylfunktion durch ihre mesomere Form des Carbokations stabilisiert werden und desto weiter wird das Gleichgewicht auf die Seite der hydratisierten Form verschoben (Streitwieser *et al.*, 1994). Bei Kohlenhydratderivaten wie 1,5-AF oder anderen Keto-Aldosen wie Glucoson (Körper und Freimund, 2003) wird durch die polaren OH-Gruppen in direkter Nachbarschaft zur Carbonylgruppe das Carbokation destabilisiert und das Gleichgewicht auf die Seite der hydratisierten Form verschoben.



**Abbildung 2:** In wässriger Lösung wird die Keto-Funktion von 1,5-AF zur *gem*-Diol Funktion hydratisiert. Das Gleichgewicht liegt fast ausschließlich bei der hydratisierten Form (Andersen *et al.*, 2002).

1986 wurde 1,5-AF parallel in einer Morchel Art (Baute *et al.*, 1986; Deffieux *et al.*, 1987) und als Produkt der Oxidation von 1,5-AG durch Membranfraktionen von *Pseudomonas* (Nakamura *et al.*, 1986; Nakamura *et al.*, 1987) identifiziert, und man weiß

seither, dass 1,5-AF auch in anderen biologischen Systemen vorkommt. Bis heute wurde das Zuckerderivat 1,5-AF unter anderem in Bakterien (Shiga *et al.*, 1999), Rotalgen (Yu *et al.*, 1993; Broberg *et al.*, 1999), verschiedenen Pilzen (Deffieux *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 1997), in höheren Pflanzen wie den Samen von Fuchsschwanzgewächsen und den Früchten von Bananengewächsen (Konishi *et al.*, 2000) sowie in Rattenleber Gewebe (Kametani *et al.*, 1996) und menschlichen Zelllinien (Suzuki *et al.*, 1996) identifiziert. Da das Vorkommen für nur wenige taxonomische Gruppen berichtet wurde, wird angenommen, dass 1,5-AF im biologischen Systemen nicht akkumuliert (Baute *et al.*, 1991; Kametani *et al.*, 1996; Broberg *et al.*, 1999) und der Nachweis der geringen Konzentrationen aufgrund geeigneter Methoden schwierig ist (Yu *et al.*, 1999).

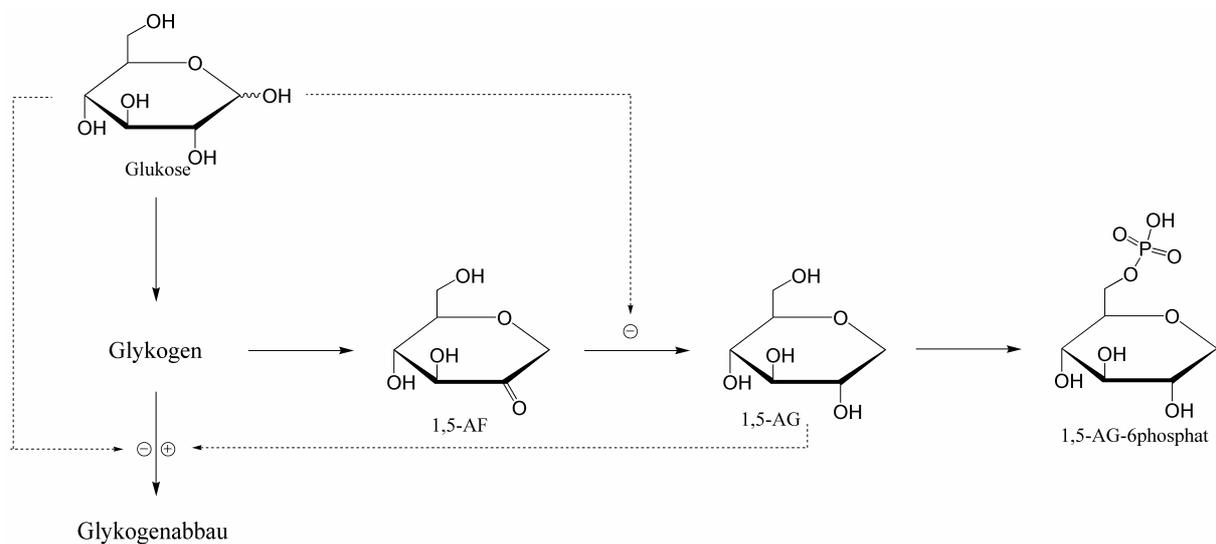


**Abbildung 3:** Der Abbau von Stärke und Glycogen erfolgt über drei Abbauege. Das lineare  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glycan wird durch **(a)** Phosphorylasen zu Glucose-1-phosphat, durch **(b)** Hydrolasen zu Glucose und durch **(c)**  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glycan-Lyasen zu 1,5-AF und Glucose abgebaut.

Bei der Inkubation von Stärke mit Zellextrakten aus Morcheln konnte 1,5-AF nachgewiesen werden (Baute *et al.*, 1988). Dabei werden Maltosaccharide wie Stärke oder Glycogen durch  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glycan-Lyasen teilweise zu 1,5-AF abgebaut (Yu *et al.*, 2004a). Beim Abbau der linearen  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glycanen spalten die  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glycan-Lyasen Glycosylreste vom nicht-reduzierenden Ende der Polysaccharide als 1,5-AF ab und der letzte Rest verbleibt als Glucose (Abbildung 3 (c) (Yu *et al.*, 1993; Yu und Pedersen, 1993)). Neben den bekannten Abbaureaktionen durch Hydrolasen und Phosphorylasen (Abbildung 3 (a)

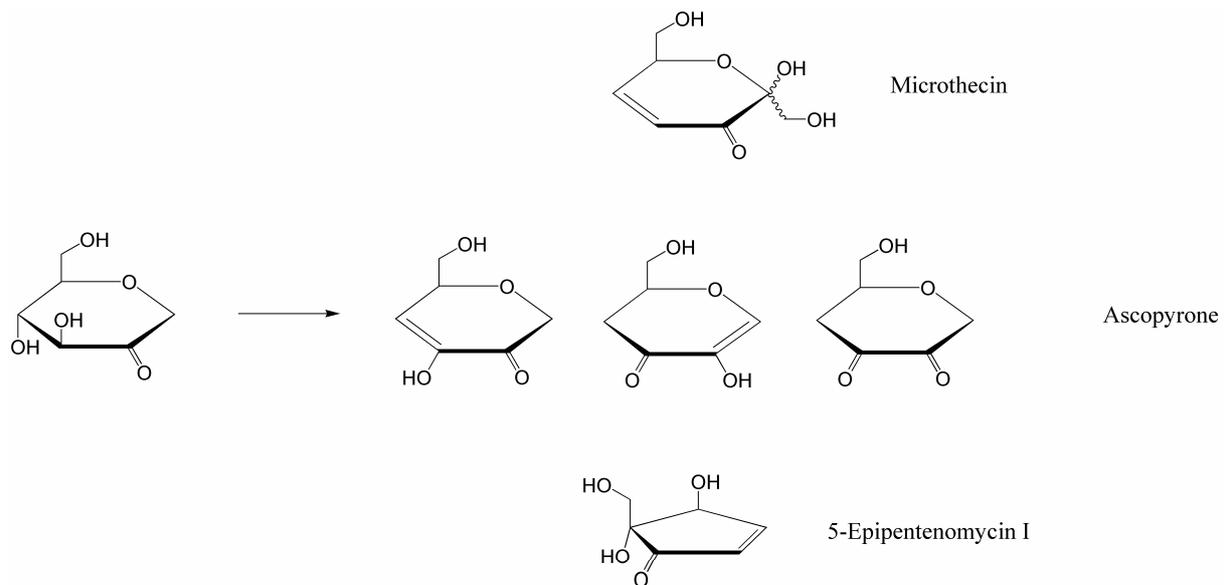
und**(b)**) stellt diese Reaktion den ersten Schritt eines neuen Abbauweges für Glycogen, den so genannten *Third Glycogenolytic Pathway* dar (Kametani *et al.*, 1996).

In Säugern wird im Zuge des *Third Glycogenolytic Pathway* 1,5-AF von einer spezifischen, NADPH-abhängigen 1,5-AF-Reduktase zu 1,5-AG reduziert (Sakuma *et al.*, 1998) und danach direkt mit dem Urin ausgeschieden oder weiter phosphoryliert (Yamanouchi *et al.*, 1992). Der gleiche Metabolismus konnte auch in *E. coli* nachgewiesen werden und dient als Modell des *Third Glycogenolytic Pathway* (Shiga *et al.*, 1999). In *E. coli* konnte im Zuge dieser Studien eine Regulation des Glycogenhaushalts durch 1,5-AG gezeigt werden (Abbildung 4 (Shiga *et al.*, 1999)).



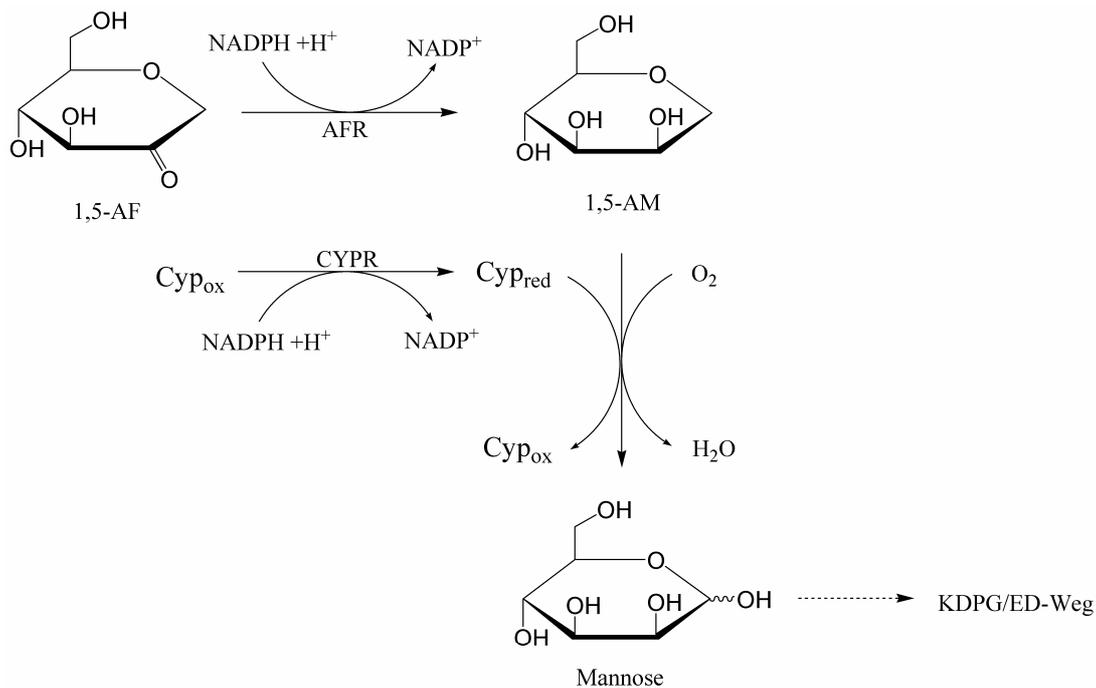
**Abbildung 4:** Regulation des Glycogen-Metabolismus in *E. coli*. + und – bezeichnen, ob die Reaktion durch das entsprechende Metabolit stimuliert oder inhibiert wird (Andersen *et al.*, 2002).

Rotalgen und Pilze produzieren aus 1,5-AF unter Stressbedingungen biologisch aktive Verbindungen (Abbildung 5) wie Microthectin, Pyrone (Deffieux *et al.*, 1987; Baute *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 2004b) oder 5-Epipentenomycin I (Baute *et al.*, 1991; Andersen *et al.*, 2002), die unter anderem antibiotische Wirkung haben (Thomas *et al.*, 2002). Die Bildung dieser biologisch aktiven Substanzen aus Glycogen oder Stärke über 1,5-AF wird im so genannten *Anhydrofructose Pathway* beschrieben (Yu *et al.*, 1995).



**Abbildung 5:** Metabolismus von 1,5-AF in Rotalgen und Pilzen. Die gebildeten funktionellen Verbindungen weisen unter anderem antibiotische Wirkung auf (Andersen *et al.*, 2002).

In *Sinorhizobium morelense* wird 1,5-AF zu 1,5-AM metabolisiert. Der weitere Metabolismus von 1,5-AM durch das Bakterium ist bis heute weitgehend unklar. 1,5-AM wird durch Inkubation mit Zellysate vermutlich zu D-Mannose umgesetzt (Kühn, 2004). Für diese Reaktion wurde eine Monooxygenierung an C1 durch Cytochrom P450 angenommen (Kühn, 2004). Diese Reaktion wurde auch für den Abbau von 1,5-AG in *Trichoderma longibrachiatum* postuliert (Yoshida *et al.*, 2003). Die Mannosepyranose wird bei *Rhizobien* über den KDPG-/Entner-Doudoroff-Weg (Entner und Doudoroff, 1952) in den zentralen Kohlenstoffstoffwechsel überführt (Arias *et al.*, 1982; Stowers, 1985). Eine andere Theorie ist die Verwendung von D-Mannose und deren Derivate in der Zellerkennung. Von D-Mannose und 1,5-AM ist bekannt, dass sie von Lektinen erkannt werden (Schaeffer *et al.*, 1980; Mo *et al.*, 2001). Das spielt eine entscheidende Rolle in der Erkennung zwischen Wirt und Microsymbiont über bakterielle Exo- oder Kapselpolysaccharide mit den Lektinen der Leguminosen (Werner, 1987). Die Zusammensetzung der extrazellulären Polysaccharide ist Spezies-spezifisch und enthält für die Erkennung durch Leguminosen einen besonders hohen Anteil manno-konfigurierter Zucker. AFR könnte so zur Ausbildung dieser Oberflächenstrukturen durch die Bereitstellung von manno-konfiguriertem Zucker beitragen (Kühn, 2004).



**Abbildung 6:** Möglicher Abbau von 1,5-AM in *S. morelense* S-30.7.5. Die unspezifische Monooxygenase Cytochrom P450 (CYP) katalysiert die Hydroxylierung von 1,5-AM an der C1 Position zu D-Mannose. D-Mannose kann über den KDPG-Weg dem Kohlenstoffstoffwechsel zugeführt werden (Entner and Doudoroff, 1952). Die Cytochrom P450 Reduktase (CYPR) regeneriert Cytochrom P450 (Kühn, 2004).

### 1.1.3 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase aus *S. morelense* S-30.7.5.

Im Rahmen ihrer Doktorarbeit konnte Annette Kühn aus Bodenproben des botanischen Gartens der Universität in Saarbrücken (Abbildung 7) einen Organismus identifizieren, der in der Lage war mit 1,5-AF und 1,5-AG als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen und dessen Zelllysat in der Lage war 1,5-AF NADPH-abhängig zu reduzieren (Kühn, 2004). Anhand der 16S rRNA war es möglich, das Bakterium der Spezies der *Sinorhizobium morelense* zuzuordnen (Woese, 1987; Lane, 1991; Rossello-Mora und Amann, 2001). Der Stamm wurde schließlich als *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5. bezeichnet (Abbildung 7, kleines Bild (Kühn, 2004)). Bei *Rhizobiaceae*, zu denen *Sinorhizobium morelense* zählt, handelt es sich um Gram-negative, obligat aerobe Stämme. Die Zellen sind stäbchenförmig, bilden keine Sporen und sind polar, subpolar oder peritrich geißelt. Eine besondere Eigenschaft der *Rhizobiaceae* ist die Anpassungsfähigkeit hinsichtlich Kohlenstoffquelle und physikalisch-chemischen Eigenschaften. Die meisten Vertreter der Familie der *Rhizobiaceae* besitzen die Fähigkeit zur Symbiose mit Leguminosen. Das Prinzip der Symbiose besteht im Fall der Rhizobium-Leguminosen-Symbiose auf der beiderseitigen Nutzung des Elements Stickstoff (Brill, 1975; Brown und Dilworth, 1975; Emerich *et al.*, 1979).

Aufgrund der Neuorganisation der Bakteriensystematik wird seit einiger Zeit eine Umbenennung der *Sinorhizobium morelense* in *Ensifer adhaerens* diskutiert (Sawada *et al.*, 2003; Farrand *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2003), eine abschließende Einteilung steht allerdings zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch aus.



**Abbildung 7:** Botanischer Garten der Universität des Saarlandes in Saarbrücken. Fundort des Bakteriums *S. morelense* S-30.7.5. (kleines Bild).

Die NADPH-abhängige Reduktion von 1,5-AF wurde auch bei den verwandten Spezies *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* und *Mesorhizobium loti* nachgewiesen, was die Vermutung nahe legte, dass es sich bei der genannten Reaktion in *S. morelense* nicht um eine neu erworbene Enzymeigenschaft einer Mutante handelte. Vielmehr wird angenommen, dass es sich um eine generelle Eigenschaft handelt, die unter bestimmten Bedingungen als Funktion des Stoffwechsels innerhalb der *Rhizobiaceae* induziert werden kann (Kühn, 2004).

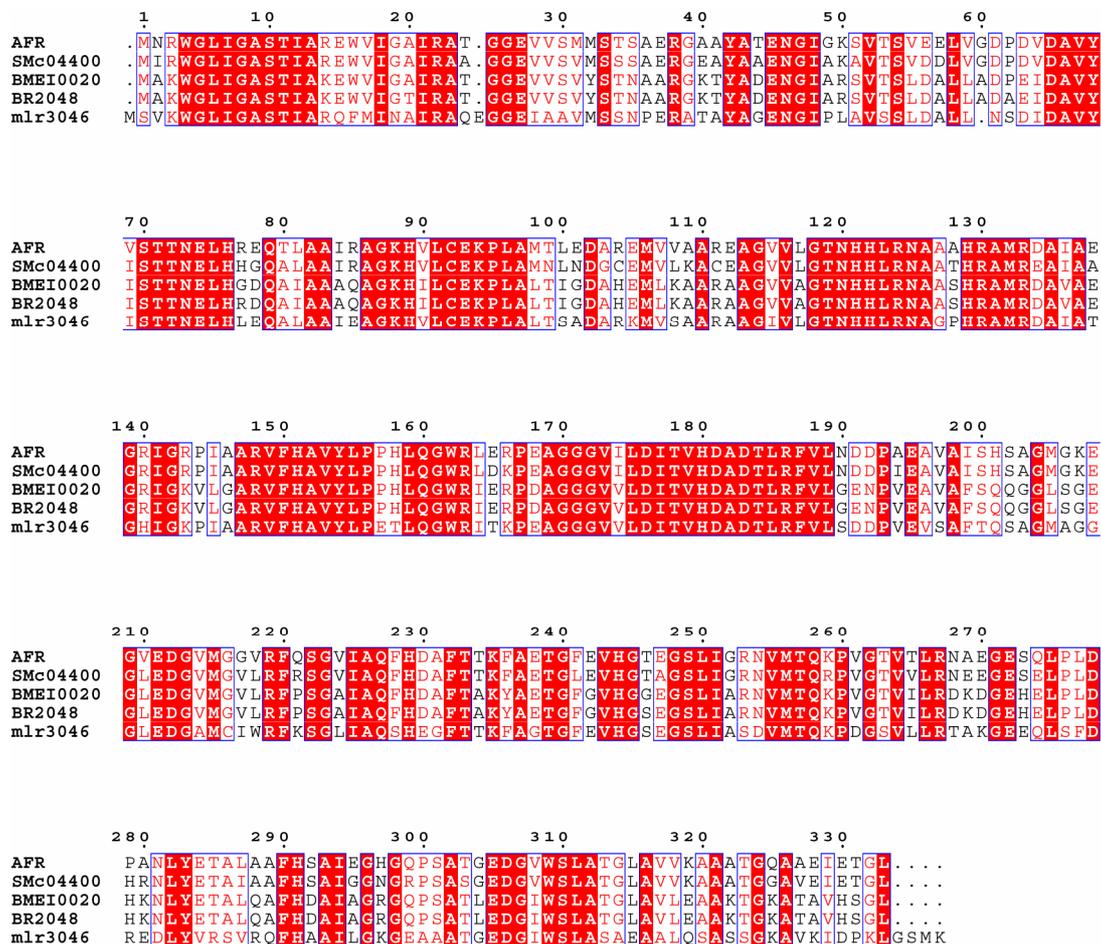
Das Enzym, das in der Lage war NADPH-abhängig 1,5-AF zu reduzieren, konnte aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5. über Anionenaustauschchromatographie, Gelfiltrationschromatographie und Affinitätschromatographie an *Red Sepharose* bis zu einer spezifischen

Aktivität von 490 U/mg Protein angereichert werden und wurde aufgrund seiner Redoxeigenschaften als 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase (AFR) bezeichnet (Kühn, 2004). Es katalysiert die Reduktion von 1,5-AF zu 1,5-AM bei gleichzeitiger Oxidation des Cofaktors NADPH. AFR ist streng NADPH-abhängig; mit dem Cofaktor NADH konnte beim Wildtyp keine Reaktion beobachtet werden. Über die Mutation Ala13Gly konnte die Substratspezifität so geändert werden, dass auch NADH als Cofaktor verwendet werden konnte. MALDI-TOF-Experimente ergaben ein Molekulargewicht von 35.1 kDa, was auch dem theoretischen Molekulargewicht anhand der DNA-Sequenz (35.07 kDa) entsprach. Gelfiltrationsexperimente legten weiterhin die Vermutung nahe, dass es in Abwesenheit von Cofaktor NADP(H) als Monomer vorliegt. Über isoelektrische Fokussierung konnte der pI von AFR auf 4.3 bestimmt werden.

Im Rahmen ihrer Arbeit wurden von Annette Kühn auch die kinetischen Eigenschaften eingehend untersucht (Kühn, 2004). Die optimalen Bedingungen zur Reduktion von 1,5-AF zu 1,5-AM wurden mit BIS-TRIS Puffer in leicht saurem Milieu (pH 6.5) erzielt. Die Rückreaktion der Oxidation lief unter basischen Bedingungen am besten ab. Diese Unterschiede der pH-Optima wurden vielfach für Oxidoreduktasen beschrieben, wie zum Beispiel bei Sorbitol-Dehydrogenasen (Rehg und Torack, 1977; Burnell und Holmes, 1983; Schauder *et al.*, 1995) oder bei Mannitol-Dehydrogenasen (Chase, Jr., 1986; Schneider und Giffhorn, 1989). Hierbei ist anzumerken, dass die Oxidationreaktion um vier Größenordnungen schlechter als die Reduktionsreaktion katalysiert wird (Kühn, 2004). Zur Stabilisierung von AFR oder zur Katalyse waren keine Metallionen notwendig. AFR setzt seine Substrate nach Michaelis-Menten-Kinetik um. Die  $K_M$ -Werte für die natürlichen Substrate konnten auf 0.2 mM für NADPH und 8.4 mM für 1,5-AF bestimmt werden. Das Substratspektrum ist sehr eng, so wurden zwar neben 1,5-AF auch die Analoga wie 3-Keto-1,5-AF und D-Glucosone umgesetzt, allerdings mit einer sehr viel geringeren Aktivität. Die Beobachtung, dass die ebenfalls durch AFR umgesetzten Osone in wässriger Lösung wie 1,5-AF hauptsächlich in der pyranoiden Form vorliegen (Freimund und Kopper, 2004) und von AFR keine linearen Substrate identifiziert werden konnten, legte die Vermutung nahe, dass die Ringstruktur wichtig für die Umsetzung ist (Kühn, 2004).

Das Gen, das für AFR in *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5. codiert, konnte amplifiziert und sequenziert werden. Es codiert für 333 Aminosäuren. Über Datenbanksuchen mit BLAST (Altschul *et al.*, 1997) konnte der ORF *Smc04400* aus *Sinorhizobium meliloti* als Gen mit der höchsten Homologie (77 % identische Reste, 82 % homologe Reste) identifiziert werden (Abbildung 8). Die genaue Funktion dieses Gens ist nicht bekannt, es wird aber eine

Oxidoreduktase Funktion vorhergesagt. Auch andere homologe Gene wurden noch nicht weiter charakterisiert, aber auch für sie werden Oxidoreduktase Funktionen vermutet.



**Abbildung 8:** Sequenzvergleich von AFR mit den vier hypothetischen Proteinen, die in der Datenbank UniProt100 bei einer Suche mit BLAST (Altschul *et al.*, 1997) die höchsten Homologien aufwiesen. Der ORF *SMc04400* aus *Rhizobium meliloti* wies mit 77 % identischen Resten die größte Homologie auf. Die folgenden ORFs gehörten zu einer möglichen Glucose-Fruktose-Oxidoreduktase aus *Brucella melitensis* (BMEI0020), einer möglichen Oxidoreduktase der Gfo/Idh/MocA Familie aus *Brucella suis* (BR2048) und einer möglichen Glucose-Fruktose-Oxidoreduktase aus *Rhizobium loti* (mlr3046). Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW angefertigt (Thompson *et al.*, 1994) und mit dem Programm ESPript graphisch umgesetzt (Gouet *et al.*, 2003).

*Rhizobiaceae* besitzen neben chromosomaler DNA auch 2 Megaplasmide (Galibert *et al.*, 2001). Das kleiner der beiden Plasmide pSymA wurde als Informationsträger der für die Symbiose benötigten Eigenschaften charakterisiert (Capela *et al.*, 2001), während das Plasmid pSymB für antibiotische Resistenzen, die Ausbildung von Exopolysacchariden und verschiedene katabole Enzyme codiert (Finan *et al.*, 2001). Der *Smc04400* in *Sinorhizobium meliloti* ist auf dem Chromosom lokalisiert, weshalb davon ausgegangen wird, dass das Produkt am Grundstoffwechsel der Zelle beteiligt ist. Das *afr* Gen konnte bis jetzt noch nicht im Genom von *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5. lokalisiert werden. Aufgrund der

---

Homologie zu *Smc04400* aus *Sinorhizobium meliloti* geht man allerdings davon aus, dass AFR ebenfalls am Grundstoffwechsel der Zelle beteiligt ist (Kühn, 2004).

### 1.1.4 Zielsetzung

1,5-AF ist ein Kohlenhydratderivat, das vermutlich unter Prokaryonten und Eukaryonten weit verbreitet ist. Die Funktion und der Metabolismus in den einzelnen Organismen sind bis heute noch weitgehend unverstanden. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften sind 1,5-AF und seine Derivate auch für die chemische Industrie als Ausgangsverbindung in der Kohlenhydratchemie von Interesse.

Aus *S. morelense* konnte mit AFR ein Enzym isoliert und charakterisiert werden, das in der Lage ist 1,5-AF stereoselektiv zu 1,5-AM zu reduzieren. Seine außergewöhnlichen katalytischen Fähigkeiten machen AFR zu einem potentiellen Kandidaten für den Einsatz als Biokatalysator in der chemischen Synthese und aufgrund seiner Substratspezifität und der katalysierten Reaktion ist auch ein großtechnischer Einsatz denkbar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die dreidimensionale Struktur von AFR gelöst werden. Zu diesem Zweck sollte das Protein kristallisiert und röntgenographisch untersucht werden. Aufgrund der geringen Sequenzhomologien galt die Strukturaufklärung über molekularen Ersatz als wenig Erfolg versprechend. Deshalb sollten neben nativen Proteinkristallen auch Kristalle mit Selenomethionin substituiertem Protein gezüchtet werden, um die Struktur über anomale Dispersion zu bestimmen.

Von der Struktur erhoffte man sich neue Einblicke in die Substrat- und Cosubstratbindung, sowie neue Erkenntnisse über den Mechanismus der katalysierten Reaktion. Aus diesen Erkenntnissen wäre es zum Beispiel möglich, gezielt Modifikationen am Enzym vorzunehmen, um neue Substrat- oder Cosubstratspezifikationen zu erzielen, die wiederum eine effizientere Biokatalyse gewährleisten würden. Zusätzlich kann das neue Wissen über die AFR auch bei weiteren physiologischen Untersuchungen des seltenen Kohlenhydratderivats 1,5-AF für ein besseres Verständnis sorgen.

## 1.2 Sox-Proteine

### 1.2.1 Schwefel Oxidation in Bakterien

Die biologische Oxidation von Schwefelwasserstoff zu Sulfat ist eine der Hauptreaktionen des globalen Schwefel Zyklus. Reduzierte anorganische Schwefelverbin-

dungen wie Schwefelwasserstoff, Polysulfid, elementarer Schwefel, Sulfit, Thiosulfat oder Polythionate werden exklusiv von Prokaryonten oxidiert, wobei Sulfat das Hauptoxidationsprodukt darstellt. Schwefeloxidation bei Eukaryonten wird durch Symbiose mit lithoautotrophen Bakterien erreicht (Friedrich, 1998).

In Bakterien wird Schwefel von aerob lithotrophen und anaerob phototrophen Bakterien oxidiert. Die Physiologie und Biochemie von schwefeloxidierenden Bakterien wurde mehrfach in Übersichtsartikeln zusammengefasst. Neutrophile chemolithotrophe Bakterien wurden von Kelly (1982; 1997) beschrieben. Harrison Jr. (1984) und Pronk (1990) beschreiben acidophile schwefeloxidierende Bakterien. Mit dem Metabolismus phototropher Bakterien befasst sich ein Übersichtsartikel von Brune (1989). Die Physiologie und Genetik von phototrophen und lithotrophen schwefeloxidierenden Bakterien wurde von Friedrich (1998) diskutiert.

Die Elektronen, die bei der Schwefeloxidation frei werden, werden bei lithotrophen Bakterien sowohl für die aerobe Atmung als auch für die Kohlenstoffdioxid-Fixierung verwendet, während sie in anaerob phototrophen Bakterien hauptsächlich in die Kohlenstoffdioxid-Fixierung fließen (Friedrich *et al.*, 2001). Autotrophe Bakterien fixieren Kohlenstoffdioxid entweder über den reduktiven Pentosephosphat-Zyklus oder über den reduktiven Tricarboxysäure-Zyklus (Friedrich *et al.*, 2001).

Es können zwei Gruppen schwefeloxidierender lithotropher Bakterien unterschieden werden. Die Mitglieder der einen Gruppe sind in der Lage Polythionate zu verwenden, während den Mitgliedern der anderen Gruppe dies verwehrt ist (Kelly *et al.*, 1997; Friedrich, 1998). Auf der Basis physiologischer und biochemischer Daten wurden wenigstens zwei Wege der Schwefeloxidation in Bakterien vorgeschlagen (Kelly *et al.*, 1997):

1. Schwefeloxidationsweg (Sox)
2. S<sub>4</sub> Intermediat-Weg (unter Verwendung von Polythionat)

Friedrich und Mitarbeiter (Friedrich *et al.*, 2001) haben aufgrund genetischer und biochemischer Daten einen gemeinsamen Mechanismus für die Schwefeloxidation lithotropher und phototropher Bakterien nach dem Schwefeloxidationsweg vorgeschlagen (siehe 1.2.4).

## 1.2.2 *Paracoccus pantotrophus*

*Paracoccus pantotrophus* wurde ursprünglich als *Thiosphaera pantotropha* GB17T von (Robertson und Kuehnen, 1983) isoliert und charakterisiert. Die identische 16S rRNA

Nucleotidsequenz und die 86 %ige Homologie auf DNA Basis zu *Paracoccus denitrificans* DSM65 führte zur Umbenennung von *T. pantotropha* zu *P. denitrificans* GB17 (Ludwig *et al.*, 1993). Umordnungen bei den physiologischen, biochemischen und genetischen Unterschieden von verschiedenen *P. denitrificans* Stämmen nach (Wayne *et al.*, 1987), führte zur erneuten Umbenennung zu *P. pantotrophus* GB17 (Rainey *et al.*, 1999).

*P. pantotrophus* ist ein Gram-negatives, neutrophiles und fakultativ lithotrophes Bakterium, das in der Lage ist, mit Thiosulfat oder molekularem Wasserstoff als Energiequelle und mit einer Vielzahl an Kohlenstoffquellen zu wachsen (Rainey *et al.*, 1999). Wie andere *Paracoccus* Stämme ist es nicht in der Lage, mit Sulfit zu wachsen oder Sulfit zu oxidieren (Friedrich und Mitrenga, 1981; Chandra und Friedrich, 1986).

### 1.2.3 Sox-Cluster

In *P. pantotrophus* GB17 konnte die Genregion identifiziert werden (Abbildung 9), die für die Proteine codiert, die für die Oxidation von Thiosulfat notwendig sind (Mittenhuber *et al.*, 1991). Heute gehören 15 Protein codierende Gene zum Sox-Cluster (Friedrich *et al.*, 2001), die durch Thiosulfat induziert werden können (Wodara *et al.*, 1994; Friedrich *et al.*, 2000; Rother *et al.*, 2001). Sieben dieser Gene, *soxXYZABCD*, codieren für Proteine die *in vitro* für die Schwefeloxidation essentiell sind (Rother *et al.*, 2001). Vor diesen Genen liegen vier weitere codierende Gene. ORF1 und ORF2 sind dabei im Vergleich zu den anderen Genen divergent orientiert. Die Gene *shxV* und *shxW* (Bardischewsky und Friedrich, 2001) liegen zwischen ORF1 und *soxX* (Abbildung 9). Hinter dem Gen *soxD* liegen mit *soxEFGH* vier weitere Gene, die für Proteine codieren. Die Funktion der Genprodukte wird im Folgenden detaillierter vorgestellt.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des Sox-Clusters von *P. pantotrophus*. Die Genprodukte der zentralen Gene *soxXYZABCD* sind *in vitro* notwendig um reduzierte Schwefelverbindungen zu oxidieren. Die physiologische Funktion der flankierenden Gene ORF1, ORF2, *shxVW* und *soxEFGH* ist weitgehend noch nicht verstanden.

Die Proteine des Sox-Clusters konnten im Periplasma nachgewiesen werden (Friedrich *et al.*, 2000). Die meisten Proteine des Sox-Clusters besitzen Signalsequenzen für den periplasmatischen Transport, die dem Sec oder Tat Transportsystem zugeordnet werden konnten (Friedrich *et al.*, 2001). Die Tat Signalpeptide zeigen ein charakteristisches *Twin-Arginin*-Motiv. Proteine, die über dieses System transportiert werden, nehmen schon im

Cytosol die richtige Faltung ein, und werden danach in das Periplasma transportiert. (Berks, 1996; Weiner *et al.*, 1998; Bogsch *et al.*, 1998). Zu den Sox Proteinen, die ein *Twin-Arginin*-Motiv im Signalpeptid besitzen und vermutlich über das Tat System transportiert werden gehören SoxY, SoxB, SoxC, SoxF, SoxG und SoxH. SoxZ besitzt keine Signalsequenz, ist aber dennoch im Periplasma zu finden. Es wird vermutet, dass SoxZ im Cytosol einen Komplex mit SoxY eingeht und mit diesem „huckepack“ durch die cytosolische Membran transportiert wird. Einen ähnlichen Cotransport hat man auch bei heterodimeren Hydrogenasen aus *Escherichia coli* (Rodrigue *et al.*, 1999) oder *Ralstonia eutropha* (Bernhard *et al.*, 2000) beobachtet.

Wie schon erwähnt, besteht der Sox-Cluster aus 15 Genen (Abbildung 9). Produkte von sieben dieser Gene codieren für vier Proteine, SoxXA, SoxYZ, SoxB und SoxCD, die *in vitro* für die Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen notwendig sind. Diese Proteine waren Ziel verschiedener Untersuchungen und konnten eingehend charakterisiert werden.

**SoxXA** ist ein heterodimeres *c*-typ Cytochrom. Es besteht aus einer Monohäm-Untereinheit SoxX mit einem Molekulargewicht von 14.8 kDa und einer Dihäm-Untereinheit SoxA, die ein Molekulargewicht von 30.5 kDa besitzt. Im homologen Enzym SoxAX aus *Rhodovulum sulfidofilum* wurde an Cys248, dem axialen Liganden einer Häm-Gruppe, ein Cysteinpersulfid (Cys-S-S-H) als posttranslationale Modifikation über EPR nachgewiesen (Cheesman *et al.*, 2001) und anhand der Kristallstruktur bestätigt (Bamford *et al.*, 2002b). Dies nährte die Vermutung, dass SoxXA als *c*-typ Cytochrom mit insgesamt drei Häm-Gruppen nicht nur als Elektronenspeicher funktioniert, sondern enzymatische Aktivität besitzt.

**SoxYZ** besteht aus den Untereinheiten SoxY und SoxZ, für die aus der Aminosäuresequenz ein theoretisches Molekulargewicht von 10 977 Da bzw. 11 718 Da vorhergesagt werden. Beide Proteine besitzen weder einen Cofaktor noch konnten koordinierte Metallionen nachgewiesen werden (Friedrich *et al.*, 2000). Den C-Terminus von SoxY bildet eine konservierte Region mit der Sequenz (V/I)KV(T/S)(V/I)GGCGG (Quentmeier und Friedrich, 2001). MALDI-Experimente von SoxY zeigten neben der erwarteten Spezies bei 10977 Da weitere Massen, denen kovalent gebundene Schwefelverbindungen zugeordnet wurden. Diese posttranslationale Modifikationen werden am einzigen Cystein, Cys138, am C-terminalen Ende von SoxY vermutet (Quentmeier and Friedrich, 2001). Neben assoziiertem SoxYZ Heterodimer konnte über native Gelelektrophorese auch ein heterotetramerer Komplex SoxY<sub>2</sub>Z<sub>2</sub>, sowie assoziierte homodimere Komplexe SoxYY und SoxZZ nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten die

kovalent gebundene Formen SoxY-Z und SoxY-Y, wobei das „-“ hier und im Folgenden die kovalente Bindung zwischen den Monomeren darstellen soll, über denaturierende Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Eine Anreicherung der kovalent gebundenen SoxY-Y Spezies wurde durch SoxB katalysiert (Quentmeier *et al.*, 2003).

**SoxB** enthält zwei Mangan Atome und hat ein Molekulargewicht von 58.6 kDa. SoxB wird eine Eigenschaft als Hydrolase zugeschrieben (Wodara *et al.*, 1994). SoxYZ und SoxB sind heute die einzigen Proteine des Sox-Clusters für die eine direkte Wechselwirkung nachgewiesen werden konnte (Quentmeier *et al.*, 2003).

**SoxCD** bildet ein  $\alpha_2\beta_2$  Heterotetramer mit einem Molekulargewicht von insgesamt 190 kDa. Die SoxC Untereinheit ist ein Molybdänprotein, das Homologien (30.7 % Sequenzidentität) zur Hühner Leber Sulfitoxidase aufweist (Kisker *et al.*, 1997; Wodara *et al.*, 1997). Die SoxD Untereinheit bildet ein Dihäm *c*-typ Cytochrom. SoxCD wird bei der Schwefeloxidation nach dem Sox-Weg ein Großteil der Oxidation und der Produktion von Elektronen zugeschrieben. Ein Fehlen von SoxCD *in vitro* reduziert die Elektronenausbeute pro Mol Thiosulfat von acht auf zwei Mol Elektronen. Die Wirkungsweise und die Funktionen der Untereinheiten sind allerdings noch wenig verstanden. Interessanterweise zeigt ein SoxCD Komplex, der um die C-terminale Cytochrom *c* Untereinheit von SoxD verkürzt wurde, volle Aktivität (persönliche Mitteilung Prof. Friedrich).

Während die zentralen Produkte des Sox-Clusters intensiv untersucht wurden, ist über die peripheren Proteine nur wenig bekannt. Nur wenige wurden eingehend *in vivo* oder *in vitro* untersucht. Von vielen kann lediglich durch Homologien der Aminosäuresequenzen zu bekannten Proteinen eine Funktion vermutet werden. So wird ORF1 eine Funktion als Transkriptionsregulator der ArsA Familie zugeschrieben. ORF2 hat Homologien zu Thioredoxinen. Bei SoxE handelt es sich um ein weiteres Dihäm *c*-typ Cytochrom. Eine Funktion von SoxE bei der Schwefeloxidation konnte bis jetzt nicht zugewiesen werden. SoxG und SoxH zeigen untereinander Homologien, weisen eine entfernte Verwandtschaft zu Penicillinasen und Glyoxalasen auf und besitzen jeweils Zink-Bindungsmotive. Physiologische Funktionen konnten den genannten Enzymen bis jetzt nicht zugeordnet werden.

Für ShxV wird ein Protein mit 6 Transmembranhelices vorhergesagt, die einen Kanal bilden. Es zeigt Homologien zu CcdA von *P. pantotrophus*, das bei der Biosynthese von *c*-typ Cytochromen involviert ist. ShxV defiziente Mutanten sind nicht mehr in der Lage lithotroph mit Thiosulfat als Elektronenquelle zu wachsen. Einen Einfluss auf die Bildung von Cytochrom *c* kann bei diesen Mutanten nicht beobachtet werden, was auf eine

unterschiedliche Funktion im Vergleich zu CcdA schließen lässt (Bardischewsky and Friedrich, 2001).

Für ShxW wurde eine Funktion als periplasmatisches Thioredoxin vorhergesagt, das an einer Redoxreaktion beteiligt ist, oder für den Transport von Reduktionsmitteln verantwortlich ist (Bardischewsky and Friedrich, 2001).

*soxF* codiert für ein monomeres Flavoprotein. Die Primärsequenz zeigt Homologien zu FccB, das Flavoprotein des Flavo-cytochrom *c*-Sulfid-Dehydrogenase Komplexes des phototrophen Bakteriums *Allochromatium vinosum* (Wodara *et al.*, 1997). Allerdings zeigt SoxF keine Sulfid-Dehydrogenase-Aktivität und scheint nicht mit einem Cytochrom *c* assoziiert zu sein (Rother *et al.*, 2001), wie für Flavo-cytochrom *c*-Sulfid-Dehydrogenase gezeigt wurde.

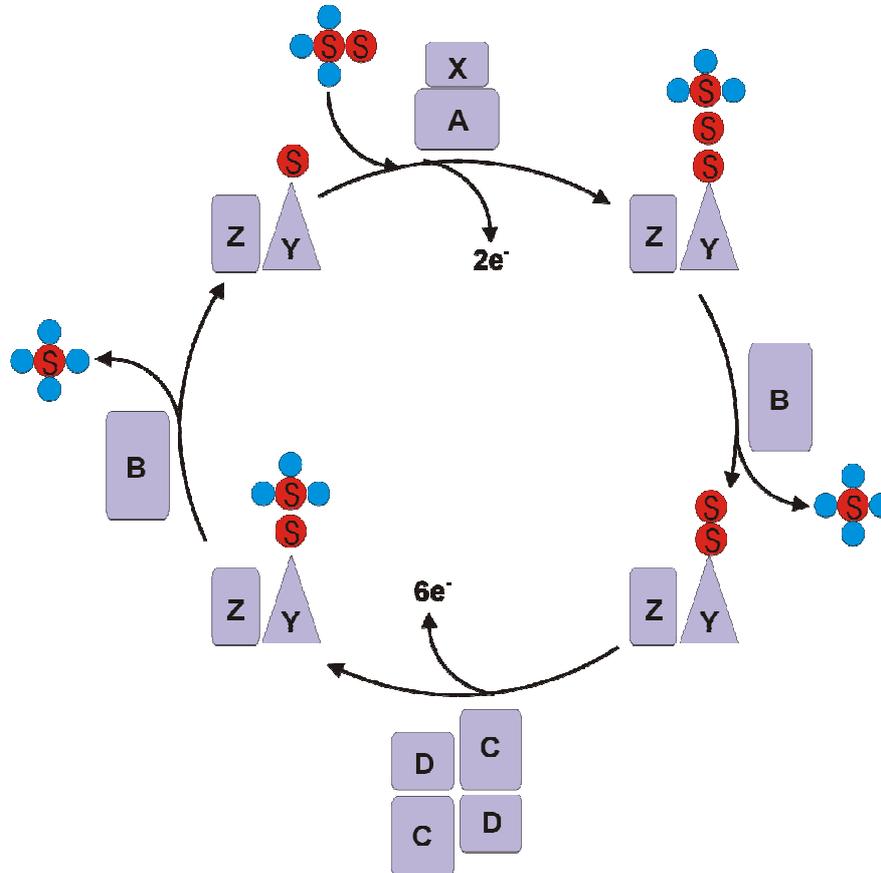
#### 1.2.4 Reaktionsmechanismus zur Schwefeloxidation

Die Proteine des Sox-Clusters sind in *P. pantotrophus* im Periplasma lokalisiert. Sie oxidieren reduzierte Schwefelverbindungen zu Sulfat. Die gewonnenen Elektronen werden *in vivo* der Atmungskette zugeführt (Friedrich, 1998). Der direkte Elektronenakzeptor, der die Elektronen zwischen dem Sox System und der Atmungskette vermittelt ist bis heute unbekannt.

*In vitro* sind die vier Proteine SoxXA, SoxYZ, SoxB und SoxCD aus dem Sox-Cluster notwendig um Pferdeherz Cytochrom *c* zu reduzieren. Diese vier Proteine sind in der Lage neben Thiosulfat auch Sulfid, molekularen Schwefel und Sulfit umzusetzen. Diese Substratvielfalt überrascht, da die genannten Verbindungen weder isosterisch noch isoelektronisch sind. Zusätzlich unterscheiden sich die Verbindungen in Reaktivität und pK<sub>a</sub>-Wert. Das setzt für die beteiligten Enzyme eine große Flexibilität in Bezug auf die Substrate voraus.

MALDI-Experimente von SoxYZ führten zu der Annahme einer posttranslationalen Modifikation an Cys138 am C-terminalen Ende von SoxY (Quentmeier and Friedrich, 2001). Die Unterschiede in der theoretischen Masse von SoxY und den beobachteten Massen wurden an Cys138 kovalent gebundenen Schwefelverbindungen zugeschrieben. Diese Beobachtungen zusammen mit der Tatsache, dass bei der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen zu Sulfat *in vitro* kein Zwischenprodukt detektiert wurde, führte zu der Annahme, dass die Schwefeloxidation durch das Sox System proteingebunden an SoxY stattfindet (Friedrich *et al.*, 2000).

Die Gruppe um Prof. Friedrich hat einen Reaktionsmechanismus für die Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen (hier Thiosulfat) zu Sulfat vorgeschlagen (Friedrich *et al.*, 2001), der in Abbildung 10 dargestellt ist. Die kovalente Bindung der reduzierten Schwefelverbindung und SoxY wird durch das *c*-typ Cytochrom Enzym SoxXA katalysiert. Bei dieser Reaktion werden zwei Elektronen gewonnen. SoxYZ bringt nun die kovalent gebundene Schwefelverbindung in einer Art *Shuttle* zu den anderen Enzymen, die an der Schwefeloxidation beteiligt sind. Das Dimangan-Protein SoxB soll dabei das gebundene Thiosulfat unter Freisetzen eines ersten Sulfations hydrolysieren. Der Hauptoxidationsschritt soll von SoxCD ausgeführt werden. Pro Mol eingesetztem Thiosulfat konnten 8 Mol Elektronen in der Reaktion *in vitro* nachgewiesen werden. Nach dem vorgeschlagenen Mechanismus sollen zwei Elektronen bei der kovalenten Bindung von Thiosulfat an SoxY frei werden. Die restlichen sechs Elektronen, werden der Oxidation des Cysteinpersulfids durch SoxCD zugeschrieben. Eine Reduktion von Pferdeherz Cytochrom *c* kann *in vitro* auch von den Proteinen SoxXA, SoxYZ und SoxB alleine, in Abwesenheit von SoxCD beobachtet werden. Allerdings werden bei dieser Reaktion nur zwei Elektronen nachgewiesen. Das erhärtet die Annahme, dass SoxCD den Hauptoxidationsschritt katalysiert. Ein weiterer Hydrolyseschritt von SoxB unter Freisetzung von Sulfat regeneriert SoxYZ.



**Abbildung 10:** Modell für den Reaktionsmechanismus der Schwefeloxidation in *P. pantotrophus* am Beispiel von Thiosulfat.

Der vorgeschlagene Mechanismus ist eine stark vereinfachte Betrachtung der Schwefeloxidation durch das Sox System. Einige Beobachtungen können anhand des vorgeschlagenen Mechanismus nicht erklärt werden: (i) Aus der Periplasmafraktion isoliertes SoxYZ liegt neben heterodimer assoziierter Form auch über Disulfidbindung kovalent verknüpft vor. Der vorgeschlagene Mechanismus (Abbildung 10) berücksichtigt lediglich die reduzierte Cystein-Form. Versuche, bei denen die Disulfidbindung von SoxYZ mittels TCEP reduziert wurde, zeigten *in vitro* eine um 92 % verminderte Reaktivität (Quentmeier and Friedrich, 2001). (ii) Keine der oben beschriebenen Reaktionen konnte isoliert nachgewiesen werden. (iii) Bis heute konnte lediglich die Interaktion von SoxYZ mit SoxB nachgewiesen werden (Quentmeier *et al.*, 2003), Wechselwirkungen zwischen anderen Proteinen des Sox-Clusters konnten noch nicht gezeigt werden. (iv) Der Sox-Cluster codiert für wenigstens 15 Genprodukte; der beschriebene Reaktionsmechanismus berücksichtigt lediglich sieben Genprodukte, die vier funktionelle Enzyme (SoxXA, SoxYZ, SoxB, SoxCD) bilden. Es ist also davon auszugehen, dass der Mechanismus an einigen Punkten überarbeitet werden muss. Die Strukturen der einzelnen Enzyme können dabei helfen, tiefere Einblicke in den Mechanismus zu erhalten.

### 1.2.5 Zielsetzung

Die Schwefeloxidation in Bakterien zur Energiegewinnung ist noch nicht vollständig verstanden. Das aerob lithotrophe Bakterium *P. pantotrophus* oxidiert reduzierte Schwefelverbindungen nach dem Schwefeloxidationsweg (Sox). Zu den Proteinen des Sox-Clusters gehören 15 strukturelle Gene. *In vitro* sind bei der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen sieben Gene notwendig, die vier Proteine bilden. Die Gruppe um Prof. Friedrich hat eine Reaktionssequenz für die Schwefeloxidation von reduzierten Schwefelverbindungen aufgestellt. Von dieser Reaktionssequenz wird vermutet, dass sie proteingebunden an SoxYZ stattfindet. SoxXA spielt in dieser Reaktionssequenz eine Schlüsselrolle. Es wird vermutet, dass SoxXA die kovalente Bindung zwischen der reduzierten Schwefelverbindung und SoxYZ katalysiert. Diese Katalyse ist umso interessanter, da eine Vielzahl reduzierter Schwefelverbindungen wie Schwefelwasserstoff, Polysulfid, elementarer Schwefel, Sulfit, Thiosulfat als Substrat dienen können. Diese Verbindungen sind weder isosterisch noch isoelektronisch und unterscheiden sich weiter in  $pK_a$  und Reaktivität.

---

Im Rahmen dieser Arbeit sollte SoxXA kristallisiert und die Struktur über Röntgenstrukturanalyse gelöst werden. Anhand der Struktur erhoffte man sich Einsichten in die Reaktion, die von dem *c*-typ Cytochrom SoxXA katalysiert wird. Ferner erhoffte man sich weitere Erkenntnisse über die Natur der Schwefeloxidation in aerob lithotrophen Bakterien, die reduzierte Schwefelverbindungen nach dem Sox Weg oxidieren.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien

MES	Fluka (Neu-Ulm)
tri-Natriumcitrat	Fluka (Neu-Ulm)
[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ]Cl <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich (München)
ZnSO <sub>4</sub>	Fluka (Neu-Ulm)
PEG 5000 MME	Fluka (Neu-Ulm)
PEG 1500	Fluka (Neu-Ulm)
Bradford Lösung	Pierce – Perbo (Bonn)
BIS-TRIS	Fluka (Neu-Ulm)
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fluka (Neu-Ulm)
MgSO <sub>4</sub>	Fluka (Neu-Ulm)
Crystal Screen™	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
Crystal Screen 2™	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
Additive Screen 1	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
Additive Screen 2	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
Additive Screen 3	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
NADPH	
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Ammoniumacetat	Fluka (Neu-Ulm)
DTT	BioVectra – BTS Biotech (Leon-Rot)
1,5-Anhydro-D-Fructose	Danisco (Kopenhagen, Dänemark)

### 2.2 Geräte

#### Proteinchemische Arbeiten

Dialyseknöpfe	10-400 µL	Hampton Research (Aliso Viejo, USA)
Konzentrator	Amicon Ultra und Microcon	Millipor Amicon (Witten)
Küvetten	1.5 mL Plastibrand Einmalküvetten	Brand (Wertheim)
Pipetten	2 µL, 10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL	Gilson International B.V. (Bad Camberg)
Spektrometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences (Freiburg)
Zentrifugen	Haereus Biofuge primoR mit Winkelrotor MiniSpin	Kendro (Langenselbold) Eppendorf (Hamburg)

**Kristallisation**

Nylonschleifen	0.05-0.1 – 0.4-0.5 mm	Hampton Research
Deckgläser	Ø 22 mm	Fa. Roth (Karlsruhe)
Kristallisationsbox	Linbro Zellkultur Box	ICN (Eschwege)
Siliconpaste	Baysilone Paste mittelviskos	Fa. Bayer (Leverkusen)

**Datenaufnahme**

Röntgenquelle	FR591	Enraf-Nonius (Delft, Niederlande)
	Xcalibur Enhance ULTRA	Oxford Diffraction (Köln)
	ID14-2	ESRF (Grenoble, Frankreich)
	X06SA	SLS (Villigen, Schweiz)
	BW6	DESY (Hamburg)
Detektoren	XCalibur Onyx CCD, 165 mm	Oxford Diffraction (Köln)
	MAR Image Plate, 345 mm	Mar Research (Norderstedt)
	MarCCD, 165 mm	Mar Research (Norderstedt)
	Quantum 4R	ADSC (Poway, USA)
Cryo-System	Cryojet XL	Oxford Diffraction (Köln)
	Cryostream	Oxford Cryosystems (Oxford, Großbritannien)

**Fluoreszenzmessungen**

Filter	diverse	Ocean Optics (Duiven, Niederlande)
Fluoreszenzdetektor		Ocean Optics (Duiven, Niederlande)
Glasfaser	diverse	Ocean Optics (Duiven, Niederlande)
Laser	Helium/Cadmium Dual Mode	Soliton (Gliching)

**Datenauswertung**

Computer	Octane	SGI (Mountain View, USA)
	mit Pentium 4 Prozessor (2.6 MHz)	HJP (Kirkel)
	mit Pentium 4 Prozessor (3.2 MHz)	Dell (Langen)

---

## 2.3 Computerprogramme

APBS	Version 0.3.1
ARP/WRAP	Version 5.0 – 6.1
CCP4 Programmpaket	Version 4.1-5.0.2
CHOOCH	Version 4.01
CNS	Version 1.1
Crysalis	Version 1.171.21 beta (Oxford Diffraction, Köln)
EMBOSS Programmpaket	Version 2.7.1
ESPrpt	Version 2.2
MAPMAN	Version 7.4
MAPS	Version 0.1
MOLMOL	Version 2K.2
MOSFLM	Version 6.2.3
O	Version 8-9.03
OOIbase32	Version 2.0.1.4
PROCHECK	Version 3.5
PRODRG	<a href="http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html">http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html</a>
PyMOL	Versionen 0.90-0.97
RESOLVE	Version 2.0.6
SEQUOIA	Version 0.9.7
SHARP/autoSHARP	Version 2.0.1
SHELXC, D und E	Version 97-2
SwissModeller	<a href="http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html">http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html</a>
T-COFFEE	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html">http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html</a>
XDS	Versionen der Jahre 2001-2004

## 3 Methoden

### 3.1 Proteinchemische Methoden

#### 3.1.1 Konzentrieren von Proteinlösungen

Die Proteinlösungen mussten vor der Kristallisation konzentriert werden. Je nach Proteinmenge und Volumen der Proteinlösung wurde eine Microcon Einheit oder eine Amicon Ultra Einheit verwendet. Bei der Microcon Einheit wurde durch Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge (4 °C, 12000×g) bis auf das gewünschte Volumen eingengt. Das Konzentrieren mit der Amicon Ultra Einheit erfolgte in einer Haereus Biofuge (4 °C, 3000×g).

#### 3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Sie beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie-Brilliantblau G-250 in saurem Milieu in Gegenwart von Protein von 465 nm nach 595 nm.

Je nach Proteinkonzentration wurde 1-10 µL Proteinlösung auf 100 µL mit Wasser aufgefüllt und mit 900 µL Bradford Reagenz gemischt. Nach ca. 10 min Inkubationszeit wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt, und die Konzentration der eingesetzten Proteinlösung mittels einer Eichgeraden von *bovin serum albumin* (BSA) bestimmt.

#### 3.1.3 Lagerung von Proteinlösungen

Zur Langzeitlagerung von Proteinlösungen wurde das konzentrierte Protein aliquotiert und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Danach wurden die Proteinaliquots bei -80 °C aufbewahrt.

Da AFR durch Einfrieren seine Aktivität verliert (persönliche Mitteilung Annette Kühn), wurde dieses Enzym bei 4 °C in verdünnter Lösung (1-3 mg/mL) über mehrere Wochen gelagert und erst kurz vor der Kristallisation konzentriert (siehe 3.1.1).

## 3.2 Proteinkristallisation

### 3.2.1 Einführung in die Kristallisation

Ein Kristall ist ein Festkörper, bei dem die Bausteine in streng regelmäßiger, periodischer Struktur, dem Kristallgitter, angeordnet sind (Borchard-Ott, 1997). In der Proteinkristallisation wird versucht, durch kontrollierte Präzipitation, ein gelöstes Protein in den kristallinen Zustand zu überführen. Um eine Aussage über die physiologisch relevante Struktur des Proteins treffen zu können, ist es notwendig, dass bei diesem Vorgang das Protein nicht denaturiert wird. Die Löslichkeit eines Proteins hängt mit der Wechselwirkung zu Wasser- und Puffermolekülen zusammen. Die Wassermoleküle treten mit den polaren und geladenen Gruppen an der Proteinoberfläche in Wechselwirkung. Sind weitere Ionen oder polare Moleküle z.B. durch das Fällungsmittel vorhanden, so konkurrieren diese mit dem Protein um die Wassermoleküle. Dadurch steht dem Protein weniger Wasser zur Verfügung, was die Löslichkeit senkt. Neben der Art und Konzentration des Fällungsmittels sind die Proteinkonzentration, die Temperatur und der pH-Wert entscheidende Faktoren, die die Kristallbildung und deren Wachstum stark beeinflussen (McPherson, 1985b).

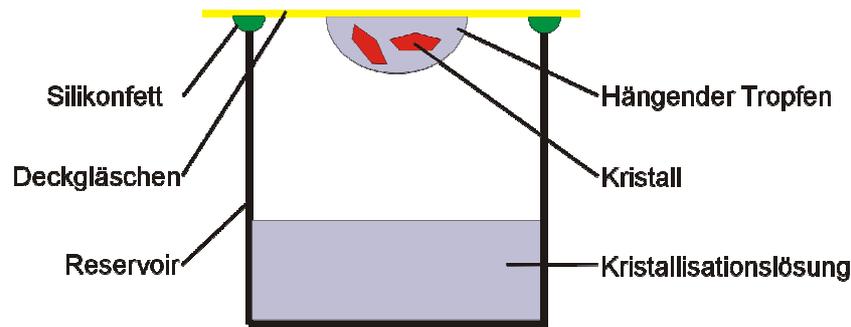
Bei den Fällungsmitteln unterscheidet man grundsätzlich 3 Arten:

- Salze wie Natriumchlorid, Natriumsulfat, Natriumphosphat, Ammoniumsulfat oder Lithiumsulfat im Konzentrationsbereich von 0.2 – 3 M.
- Organische Lösungsmittel wie Ethanol, iso-Propanol, 2-Methy-2,4-pentandiol (MPD) oder Hexandiol im Bereich von 5 – 30 % (v/v).
- Polymere wie Polyethylenglycole (PEG) oder Polyamine mit verschiedenen Molekulargewichten im Bereich von 5 – 30 % (w/v) (McPherson, 1985c).

Das Finden initialer Kristallisationsbedingungen ist bis heute von der Methode des *trial and error* bestimmt (Jancarik und Kim, 1991). Das bedeutet, dass am Anfang der Kristallisation viele Bedingungen getestet werden, in der Hoffnung, dass sich bei der einen oder anderen Bedingung Kristalle bilden. Sind initiale Kristallisationsbedingungen gefunden, so wird über gezielte Variation von pH-Wert, Wahl des Fällungsmittels, Fällungsmittelkonzentration, Salzkonzentration und Temperatur versucht, die Kristallisationsbedingung zu verbessern. Über die Jahre wurden praktische und theoretische Aspekte der Kristallographie in einer Reihe von Übersichtsartikeln zusammengefasst (McPherson, 1985a; McPherson, 1990; Stura *et al.*, 1994; Cudney *et al.*, 1994; Kundrot, 1997; Kundrot, 2004).

### 3.2.2 Kristallisation mit der Methode des hängenden Tropfens

Bei der Methode des hängenden Tropfens wird einer Proteinlösung durch Luftdiffusion langsam Wasser entzogen. Dadurch steigt sowohl die Proteinkonzentration, als auch die Konzentration der im Tropfen befindlichen Salze und Fällungsmittel langsam an. Im Idealfall wird dadurch ein Zustand erreicht, bei dem das Protein kristallisiert.



**Abbildung 11:** Schematischer Aufbau eines Kristallisationsexperiments nach der Methode des hängenden Tropfens.

Ein Kristallisationsansatz ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt. Auf einem Glasplättchen wurden 1  $\mu\text{L}$  Proteinlösung mit 1  $\mu\text{L}$  Kristallisationslösung gemischt und über ein Reservoir mit 500  $\mu\text{L}$  Kristallisationslösung einer Linbro Kulturschale gelegt. Die Ränder des Reservoirs wurden mit Silikonfett abgedichtet, wodurch ein abgeschlossenes System im Reservoir der Linbro Platte entsteht, und sich ein Gleichgewicht zwischen Kristallisationslösung und hängendem Tropfen ausbilden kann. Im hängenden Tropfen ist am Anfang die Puffer-, Fällungsmittel- und Salzkonzentration im Vergleich zur Kristallisationslösung durch das Mischen mit der Proteinlösung halb so groß. Dadurch kommt es im luftdicht abgeschlossenen Reservoir zur Luftdiffusion. Dem Tropfen wird somit langsam so viel Wasser entzogen, bis die Konzentrationen im Tropfen und in der Kristallisationslösung ausgeglichen sind. Durch die langsame Veränderung der Konzentration des Tropfens kann eine Bedingung erreicht werden, bei der die Kristallisation einsetzt (McPherson, 1990).

### 3.2.3 Montieren von Kristallen unter Cryo-Bedingungen

Die Datensammlung (siehe 3.3.2) von Kristallen erfolgte in der Regel in eingefrorenem Zustand bei tiefen Temperaturen (100 K). Das Messen bei niedriger Temperatur hatte verschiedene Vorteile, die die Datenqualität im Wesentlichen verbesserte (Rodgers, 1997). Zum einen war der durch die ionisierende Röntgenstrahlung induzierte

Strahlschaden geringer (primärer Strahlschaden) (Garman und Double, 2003). Im eingefrorenen Zustand war es zudem den durch den primären Strahlschaden entstandenen Radikalen nicht möglich durch den Kristall zu diffundieren und so weitere Schäden im Protein zu produzieren (sekundärer Strahlschaden). Zum anderen wurden Molekülschwingungen und Konformationsänderungen der Moleküle im Kristall reduziert, was zu größerer Ordnung führte und somit sowohl die Auflösung als auch die Qualität der errechneten Elektronendichte verbesserte.

Um Kristalle bei tiefen Temperaturen messen zu können, wurde eine Lösung (Cryo-Lösung) verwendet, die Eisbildung verhinderte und glasartig gefror (Rodgers, 1997). Dazu wurden verschiedene Zusätze wie Glycerin, diverse Zucker oder organische Lösungsmittel zur Kristallisationslösung gegeben.

Ca. 5  $\mu\text{L}$  der Cryo-Lösung wurden zum Kristallisationstropfen gegeben und normalerweise für einige Sekunden bis Minuten inkubiert. Danach wurden die Kristalle in einer Nylonschleife (Fa. Hampton Research) entsprechender Größe montiert und direkt in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Die Lagerung der montierten Kristalle bis zur Messung erfolgte ebenfalls in flüssigem Stickstoff (Garman and Double, 2003).

### **3.3 Röntgenographische Methoden**

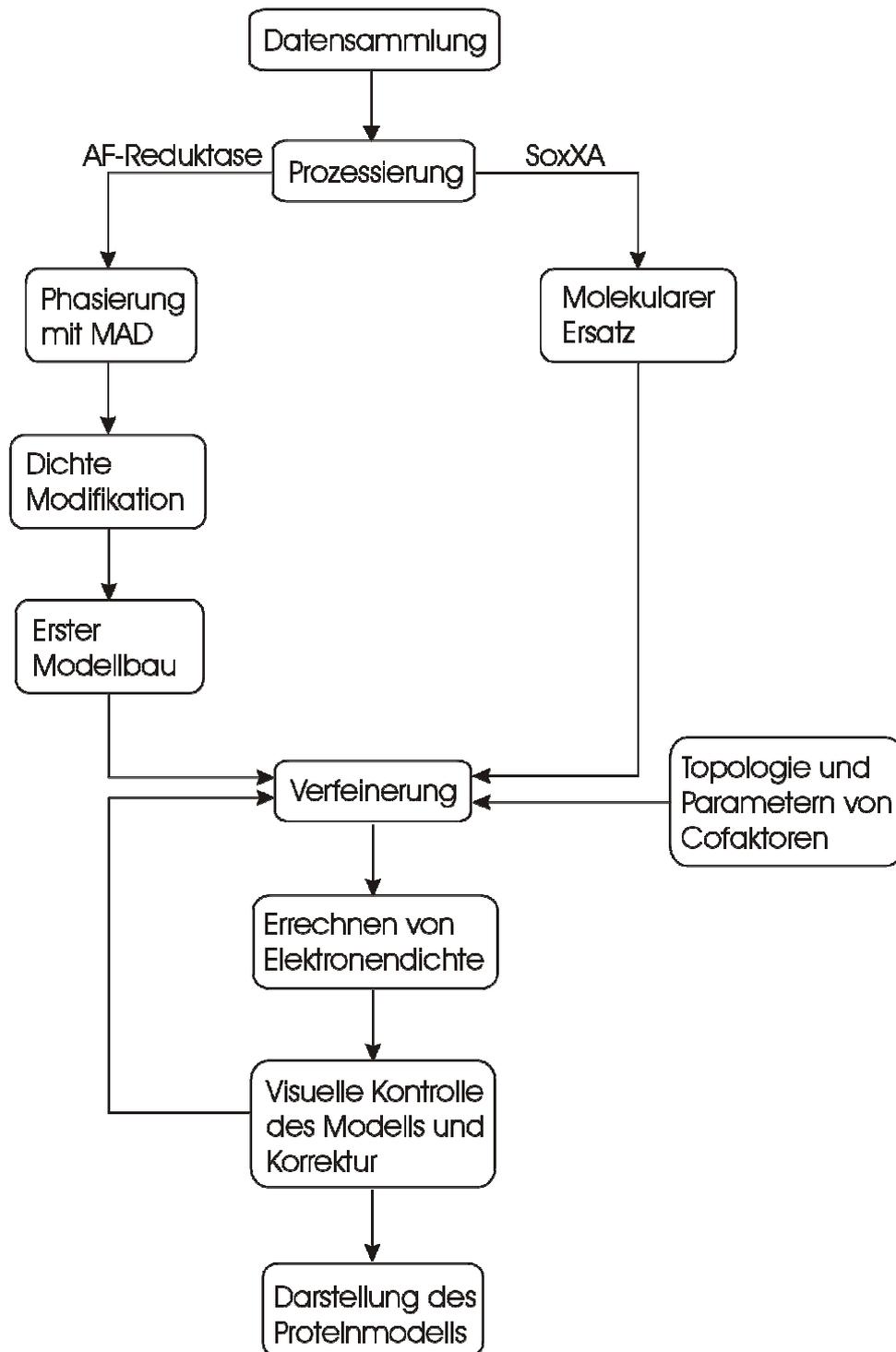
#### **3.3.1 Einleitung in die Röntgendiffraktion**

Trifft ein Lichtstrahl Materie kommt es zu Diffraktion. Im Alltag mit sichtbarem Licht werden diese gestreuten Bilder mit einer Linse wieder rekonstruiert. So ist es möglich ein Abbild von einem Objekt auf einem Schirm darzustellen. Zur Abbildung von Objekten spielt die Wellenlänge eine entscheidende Bedeutung. Die Wellenlänge darf nicht größer sein als das zu betrachtende Objekt, um von diesem gebeugt zu werden. Sichtbares Licht hat eine Wellenlänge von 400 bis 700 nm, und ist daher ungeeignet Strukturen von Proteinen darzustellen und einzelne Atome aufzulösen, die einen mittleren Abstand von 0.1 bis 0.15 nm besitzen. Um Proteine mit atomarer Auflösung abbilden zu können, muss Licht mit einer Wellenlänge in der Größenordnung 0.1 nm verwendet werden. Dabei handelt es sich um weiche Röntgenstrahlung. Für Röntgenstrahlung in diesem Wellenlängenbereich gibt es allerdings keine Linsen. Es lässt sich also kein direktes Abbild von einem Protein, mit einem Versuchsaufbau, wie wir ihn aus dem Alltag mit Linsen kennen, erzeugen. Um ein detailliertes Proteinmodell zu erhalten, ist ein aufwendigeres Vorgehen notwendig.

---

In Abbildung 12 ist ein Flussdiagramm zur Lösung von Kristallstrukturen dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Wege zum Lösen von Strukturen beschrrieben. Zum einen wurde eine Struktur (SoxXA) über molekularen Ersatz gelöst. Eine zweite Struktur (AFR) konnte über die Phasierung durch anomale Dispersion gelöst werden. Im Folgenden werden theoretische Aspekte der Kristallographie erläutert, bevor auf die einzelnen Schritte der Strukturaufklärung näher eingegangen wird.

In den letzten Jahren hat sich die Röntgenstrukturanalyse zu einer sehr wichtigen, wenn nicht der wichtigsten Methode zur Aufklärung von Proteinstrukturen entwickelt. Im gleichen Zeitraum kam auch sehr viel Literatur auf den Markt, die sich mit praktischen und theoretischen Aspekten der Röntgenstrukturanalyse befasst. Rhodes (2000) versucht in seiner Monographie auch Nicht-Kristallographen die Kristallographie verständlich zu machen, während Drenth (1994) tiefer in die Theorie um die Röntgenstrukturanalyse einsteigt. McRee (1999) befasst sich in seinem Buch hauptsächlich mit praktischen Aspekten der Strukturaufklärung mit Hilfe der Röntgenkristallographie. Weitere gute Übersichtsartikel zu theoretischen und praktischen Aspekten der Röntgenstrukturanalyse finden sich unter anderem in den Bänden 114, 115, 276, 277, 368 und 374 der Reihe *Methods in Enzymology*.



**Abbildung 12:** Flussdiagramm zum Lösen einer Kristallstruktur. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Struktur (SoxXA) über molekularen Ersatz (MR) und eine Struktur (AF-Reduktase) über anomale Dispersion (SAD) gelöst.

### 3.3.1.1 Aufbau von Kristallen

Um Diffraction an einem Proteinkristall zu beschreiben, ist ein grundsätzliches Verständnis von Kristallgittern und Symmetrien notwendig. Eine ausführliche Beschreibung über Symmetrien, Kristallsysteme und Raum- und Punktgruppen kann an anderer Stelle

gefunden werden (Borchard-Ott, 1997). Hier soll lediglich auf die Erläuterung einiger häufig in Zusammenhang mit der Proteinkristallographie vorkommender Begriffe beschränkt werden.

Ein Kristall ist ein in alle 3 Raumrichtungen regelmäßiger, periodischer Körper. Er ist aus Einheitszellen aufgebaut, die durch Translation im Raum den gesamten Kristall aufbauen. Die Einheitszelle wird durch die Zellparameter  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  beschrieben. Die Einheitszelle kann je nach Raumgruppe in verschiedene asymmetrische Einheiten unterteilt werden. In der Raumgruppe sind Eigenschaften des Kristallgitters und Symmetrieelemente zusammengefasst. Von diesen Symmetriekonstruktionen gibt es genau 230 Stück. In der Proteinkristallographie reduziert sich diese Zahl aufgrund der Chiralität der Bauelemente auf 65. Mit der Elektronendichte der asymmetrischen Einheit, den Zellparametern und der Raumgruppe kann die Einheitszelle und somit die Elektronendichte des gesamten Kristalls beschrieben werden. Die asymmetrische Einheit ist die kleinste kristallographische Einheit im Kristall. Die asymmetrische Einheit kann wiederum aus mehreren Elementen (Molekülen) aufgebaut sein. Diese können auch über Symmetrieelemente ineinander überführbar sein. Diese Symmetrieelemente sind allerdings nicht mehr kristallographisch und heißen deshalb nicht-kristallographische-Symmetrien (*non crystallographic symmetries, NCS*).

### 3.3.1.2 Diffraktion

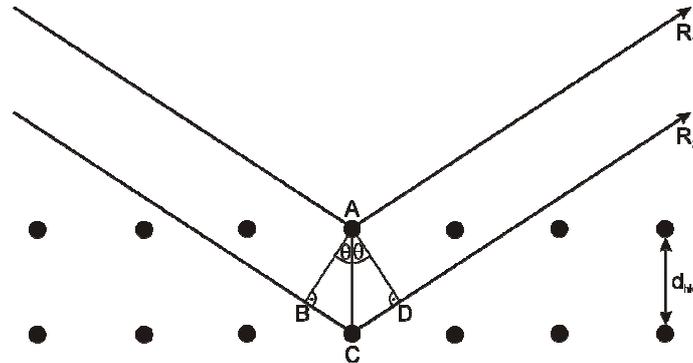
Trifft ein Lichtstrahl auf einen schmalen Spalt so erwartet man, dass auf einem Schirm eine schmale Linie abgebildet wird. Verkleinert man den Spalt auf die Dimension der Wellenlänge des Lichts, das auf den Spalt trifft, so beobachtet man neben der abgebildeten Linie in gewissem Abstand weitere Linien parallel zur ersten, gebeugte Strahlen. Dieses Phänomen nennt man Diffraktion oder Beugung. Es tritt durch positive und negative Interferenzen der gebeugten Lichtwellen auf.

Verwendet man anstatt des Spalts ein zweidimensionales Gitter, so beobachtet man ein zweidimensionales Muster aus Punkten auf dem Schirm, ein Beugungsbild oder Diffraktionsbild. Die Diffraktion am dreidimensionalen Kristallgitter wird durch das Bragg'sche Gesetz beschrieben. W. H. Bragg und W. L. Bragg beschrieben die Diffraktion an einem Kristallgitter als Reflexion an einer Schar paralleler Atomebenen im Kristall (Abbildung 13). Die Röntgenstrahlen  $R_1$  und  $R_2$  mit der Wellenlänge  $\lambda$  treffen im Winkel  $\theta$  auf benachbarte Gitterebenen. Der Winkel zwischen Gitterebene und reflektiertem Strahl beträgt ebenfalls  $\theta$ . Der Strahl  $R_2$  legt die gleiche Strecke wie der Strahl  $R_1$  plus die Strecke  $\overline{BCD}$

zurück. Damit die zwei Strahlen  $R_1$  und  $R_2$  konstruktiv interferieren müssen sie in Phase sein, das heißt die Strecke  $\overline{BCD}$  muss  $\lambda$  oder ein Vielfaches von  $\lambda$  sein (Gleichung 1).

$$\overline{BCD} = n\lambda \quad \text{Gleichung 1}$$

$\lambda$  Wellenlänge der verwendeten Strahlung



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der Diffraction gemäß dem Bragg'schen Gesetz. Röntgenstrahlen, die von benachbarten Gitterebenen mit Abstand  $d$  gestreut werden, haben einen Gangunterschied von  $2d_{hkl} \cdot \sin\theta$ . Positive Interferenz tritt auf, wenn dieser Gangunterschied ein Vielfaches  $n$  der Wellenlänge des einfallenden Strahles  $\lambda$  entspricht.

Die Strecken  $\overline{BC}$  und  $\overline{CD}$  sind gleich lang und lassen sich über trigonometrische Beziehungen folgendermaßen ausdrücken:

$$\overline{BC} = \overline{CD} = d_{hkl} \cdot \sin\theta \quad \text{Gleichung 2}$$

$d_{hkl}$  Abstand zwischen den Gitterebenen  
 $\theta$  Winkel zwischen Strahl und Gitterebene

Verknüpft man die Gleichungen 1 und 2 so erhält man das Bragg'sche Gesetz (Gleichung 3):

$$2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin\theta = n \cdot \lambda \quad \text{Gleichung 3}$$

$d_{hkl}$  Abstand zwischen den Gitterebenen  
 $\theta$  Winkel zwischen Strahl und Gitterebene  
 $\lambda$  Wellenlänge der verwendeten Strahlung

Das bedeutet, für eine bestimmte Ebenenschar mit dem Abstand  $d_{hkl}$  kommt es nur in bestimmten Winkeln zu konstruktiven Interferenzen. Für alle anderen Winkel löschen sich die reflektierten Strahlen durch destruktive Interferenzen aus. Es kann so jedem Reflex genau eine Ebenenschar und umgekehrt jeder Ebenenschar ein Reflex zugeordnet werden.

Die Ebenenscharen zur Beschreibung des Bragg'schen Gesetzes sind Gitterebenen des Kristalls. Diese Gitterebenen teilen die Achsen  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$  in feste Bestandteile  $h$ ,  $k$  und  $l$  von gleicher Größe. Es ist also möglich jeden Reflex mit dem Zahlentriplet  $hkl$  zu beschreiben. Diese nennt man Miller'sche Indices.

### 3.3.1.3 Reziprokes Gitter

Die Einheitszelle beschreibt im Kristall ein definiertes Gitter mit den Vektoren  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$  im realen Raum. Zur Beschreibung der Röntgendiffraktion wird das reale Kristallgitter in ein reziprokes Gitter mit den Vektoren  $\vec{a}^*$ ,  $\vec{b}^*$  und  $\vec{c}^*$  umgesetzt. Beide Gitter sind dreidimensional und über die mathematischen Beziehungen in den Gleichungen 4, 5 und 6 definiert.

$$\vec{a}^* = \frac{\vec{b} \times \vec{c}}{\vec{a} \cdot (\vec{b} \times \vec{c})}; \vec{b}^* = \frac{\vec{c} \times \vec{a}}{\vec{b} \cdot (\vec{c} \times \vec{a})}; \vec{c}^* = \frac{\vec{a} \times \vec{b}}{\vec{c} \cdot (\vec{a} \times \vec{b})} \quad \text{Gleichung 4, 5, 6}$$

$$\begin{array}{ll} \vec{a}, \vec{b}, \vec{c} & \text{Einheitsvektoren im realen Raum} \\ \vec{a}^*, \vec{b}^*, \vec{c}^* & \text{Einheitsvektoren im reziproken Raum} \end{array}$$

Diffraction von Röntgenstrahlen an einer Gitterebenschicht  $hkl$  des realen Gitters (siehe 3.3.1.2) erzeugt im reziproken Raum einen Streuvektor  $\vec{s}$ , der senkrecht auf der Ebenenschicht steht und die Länge  $1/d_{hkl}$  besitzt. Der Reziproke Raum und die Streuvektoren sind über die Laue Beziehung (Gleichung 7) miteinander verknüpft (Drenth, 1994).

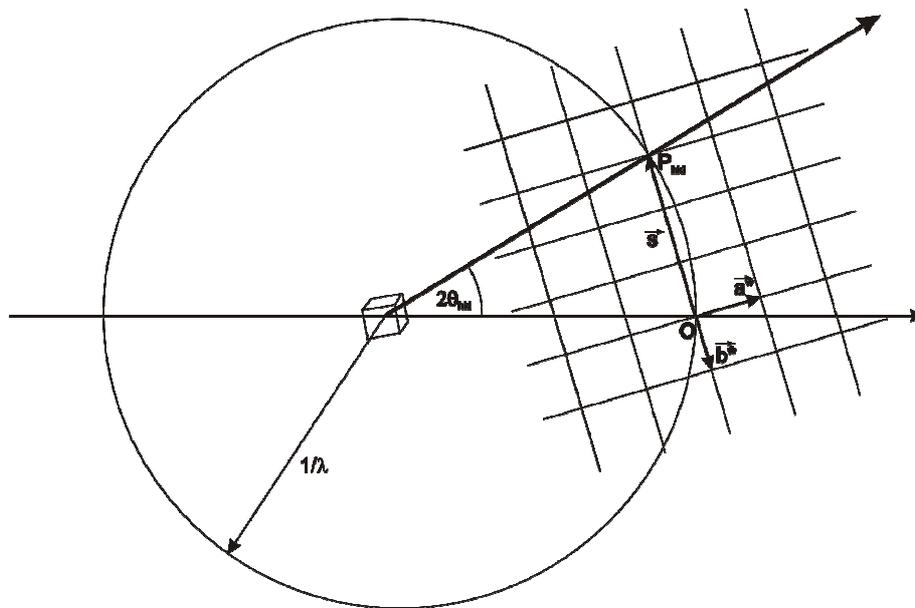
$$\vec{s} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^* \quad \text{Gleichung 7}$$

$$\begin{array}{ll} \vec{s} & \text{Streuvektor} \\ \vec{a}^*, \vec{b}^*, \vec{c}^* & \text{Einheitsvektoren im reziproken Raum} \end{array}$$

Das Konstrukt des reziproken Gitters ist lediglich ein imaginäres Gitter und existiert in der Realität nicht. Es hilft aber, Diffraction durch Röntgenstrahlung am Einkristall zu verdeutlichen.

Die Elwald-Konstruktion (Abbildung 14) kombiniert die Bragg'sche Gleichung und die Laue Beziehung und verdeutlicht den Zusammenhang zwischen realem und reziproken Gitter und das Auftreten von Röntgenreflexen. Um einen Kristall wird eine Kugel mit dem Radius  $1/\lambda$  gespannt, die Ewaldkugel. Als Ursprung des reziproken Gitters wird der

Schnittpunkt des Primärstrahls mit der Elwald-Kugeloberfläche definiert. Die Bragg'sche Gleichung ist immer dann erfüllt, wenn ein Gitterpunkt  $P_{hkl}$  mit dem Streuvektor  $\vec{s}$  auf der Kugeloberfläche zu liegen kommt. Da  $\vec{s}$  über eine Gitterebenschar definiert ist kann jeder Reflex im reziproken Raum mit den Miller'schen Indices  $h$ ,  $k$  und  $l$  der Gitterebenen im realen Raum beschrieben werden.



**Abbildung 14:** Ewald Konstruktion. Ein Kristall bildet das Zentrum einer Kugel mit dem Radius  $1/\lambda$ . Wird der Kristall während einer Messung rotiert, so rotiert mit ihm das reziproke Gitter mit den Einheitsvektoren  $\vec{a}^*$ ,  $\vec{b}^*$  und  $\vec{c}^*$ . Fällt ein Gitterpunkt  $P_{hkl}$  mit dem Streuvektor  $\vec{s}$  auf die Kugeloberfläche der Ewaldkugel so ist die Bragg'sche Gleichung (Gleichung 3) erfüllt und es kommt zu einem Reflex.

### 3.3.1.4 Fourier Transformation

Jedem Reflex kann ein Strukturfaktor  $F_{hkl}$  zugeordnet werden. Da es sich bei einem Reflex um gebeugte Röntgenstrahlung handelt, also um eine elektromagnetische Welle, enthält ein Strukturfaktor neben der Koordinate im reziproken Raum eine Phase und eine Amplitude. Die Koordinaten im reziproken Raum sind die Miller'schen Indices  $h$ ,  $k$  und  $l$ . Auf der anderen Seite kann die Elektronendichte als periodische Funktion, als Wellenfunktion, dargestellt werden. Über eine Fourier Transformation (Gleichung 8) sind Elektronendichte im realen Raum und Strukturfaktoren im reziproken Raum miteinander verknüpft.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad \text{Gleichung 8}$$

$\rho(x, y, z)$	Elektronendichte
$V$	Volumen der Einheitszelle
$F_{hkl}$	Strukturfaktoren
$h, k, l$	Miller'sche Indices

Im Strukturfaktor eines Reflexes sind Anteile vom gesamten Kristall, das heißt von der gesamten Elektronendichte enthalten. Das heißt, die Gesamtheit der Strukturfaktoren, enthalten alle Informationen zur Elektronendichte im Kristall. Man muss daher einen kompletten Datensatz heranziehen, um die Elektronendichte eines Kristalls zu errechnen.

Kennt man die Amplitude und die Phase von allen Reflexen, so kann über eine Fourier Transformation die Elektronendichte errechnet werden. Die Amplituden der Strukturfaktoren sind dabei direkt proportional zu den Quadratwurzeln der gemessenen Intensitäten der Reflexe. Die Phasen können nicht gemessen werden, und müssen auf anderem Weg bestimmt werden. Dieses Problem wird als Phasenproblem in der Kristallographie bezeichnet und in einem späteren Kapitel (siehe 3.3.1.6) behandelt.

### 3.3.1.5 Patterson Funktion

Bei der Patterson Funktion oder Patterson Synthese (Gleichung 9) handelt es sich im Grunde um eine Fourier Synthese ohne Phasenanteil.

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}^2| e^{-2\pi i(hu+kv+lw)} \quad \text{Gleichung 9}$$

$V$	Volumen der Einheitszelle
$F_{hkl}$	Strukturfaktoren
$h, k, l$	Miller'sche Indices

Während bei einer Fourier Funktion die Elektronendichte berechnet werden kann, werden über die Patterson Funktion Vektoren zwischen Atomen berechnet. Mit anderen Worten: durch den fehlenden Phasenanteil geht auch die Information der Position der Atome verloren. Es können nur noch Abstände und die relative Lage der Atome zueinander bestimmt werden. Da es mehr Vektoren zwischen Atomen als Atome selbst gibt, ist diese errechnete Karte sehr viel komplizierter. Sie hat aber den Vorteil, dass sie ausschließlich aus gemessenen Daten errechnet werden kann. Es gibt daher verschiedene Bereiche bei der Strukturlösung, bei denen man sich der Patterson Funktion bedient.

### ***Self-Rotation Patterson Function***

Mit der *Self-Rotation Patterson Function* werden Abstände der Atome innerhalb eines Moleküls dargestellt. Sie kann helfen, die relative Orientierung zweier Moleküle zueinander zu bestimmen. Mit der *Self-Rotation Patterson Function* können *NCS* bestimmt werden. Ein weiterer wichtiger Anwendungsbereich ist bei der Suche nach Lösungen bei der Phasierung durch molekularen Ersatz (siehe 3.3.4).

### ***Difference Patterson Function***

Die *Difference Patterson Function* (Gleichung 10) stellt eine Patterson Funktion der Amplitudendifferenzen zweier Datensätze dar.

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |\Delta F_{hkl}^2| e^{-2\pi i(hu + kv + lw)} \quad \text{Gleichung 10}$$

$V$	Volumen der Einheitszelle
$\Delta F_{hkl}$	Differenz der Strukturfaktoren nativem Datensatz und Derivat
$h, k, l$	Miller'sche Indices

Angewendet wird diese Funktion bei der Phasierung über anomale Dispersion oder isomorphen Ersatz.  $\Delta F$  stellt dabei die Differenz zwischen nativem Datensatz und Derivat bzw. die Amplitudenunterschiede durch anomale Dispersion dar. Es lassen sich so Abstände zwischen den Schweratomen bzw. anomal streuenden Atomen und deren relative Lage zueinander darstellen. Da in der Regel nur wenige Schweratome im Derivat gebunden sind bzw. wenige anomal streuende Atome vorliegen, kann man aus deren Abständen und der relativen Lage zueinander die Substruktur konstruieren, mit der dann der gemessene Datensatz phasiert werden kann.

#### **3.3.1.6 Phasenproblem**

Kennt man die genaue Wellengleichung der Strukturfaktoren so kann über die Fourier Transformation die Elektronendichte im Proteinkristall an jedem Punkt errechnet werden. Die Wellengleichungen der Strukturfaktoren werden durch drei Parameter bestimmt:

- Die Wellenlänge ist durch das Experiment bestimmt.
- Die Amplitude ist proportional zum Quadrat der Intensität der Reflexe.
- Die Phase kann nicht gemessen werden.

Dieses ‚Nicht-Messen-Können‘ der Phase nennt man in der Kristallographie das Phasenproblem. Die Phase jeder einzelnen Wellengleichung/jedes einzelnen Reflexes muss über weitere Experimente bestimmt werden. Finden von Phasen stellt in der Proteinkristallographie vielleicht das größte Problem auf dem Weg zur Struktur dar. Im Allgemeinen stehen hierfür drei Möglichkeiten zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methoden des molekularen Ersatzes (*molecular replacement* (MR), siehe 3.3.4) und der anomalen Dispersion (*multiple anomalous dispersion* (MAD), *single anomalous dispersion* (SAD), siehe 3.3.5) angewendet. Eine weitere Möglichkeit ist die des isomorphen Ersatzes (*multiple isomorphous replacement* (MIR), *single isomorphous replacement* (SIR)). Hierbei werden verschiedene isomorphe Kristalle, das heißt Kristalle mit gleicher Raumgruppe, gleichen Zellparametern und gleicher Packung, vermessen, die eine unterschiedliche Elektronendichteverteilung besitzen. Diese Unterschiede in der Elektronendichteverteilung erreicht man, indem man Kristalle in Schwermetall-Lösungen tränkt. Bindet ein Schwermetall an einer definierten Stelle im Kristall ändert sich die lokale Elektronendichteverteilung so stark, dass man den Effekt als unterschiedliche Intensitätsverteilung im Diffraktionsbild messen kann.

Ist es möglich für jeden Reflex neben der gemessenen Intensität auch einen Phasewert zu bestimmen, kann anschließend über eine Fourier Transformation die Elektronendichte errechnet werden.

## 3.3.2 Datensammlung

### 3.3.2.1 Röntgenquellen

Von entscheidender Bedeutung für die Qualität der gemessenen Datensätze ist die Art der Röntgenquelle. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kristalle in der Regel an einer rotierenden Anode oder an einer so genannten *sealed tube* Röntgenquelle getestet. Das Prinzip beider Röntgenquellen ist ähnlich. Elektronen werden unter einer hohen Spannung beschleunigt und auf eine Kupfer Anode geschossen. Dabei werden Elektronen aus einer inneren K-Schale der Kupferatome geschlagen. Beim wieder Auffüllen dieser Schale durch Elektronen aus der L-Schale wird Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von genau 1.54 Å freigesetzt, die für das Röntgenexperiment verwendet werden kann (Drenth, 1994).

Gesamte Datensätze wurden in der Regel an einem Synchrotron aufgenommen. Hier wird die Röntgenstrahlung über beschleunigte Ladungen erzeugt. Elektronen werden in einem Speicherring durch Magnete abgelenkt. Dies stellt eine Radialbeschleunigung dar, bei der,

wie bei jeder Beschleunigung von Ladungen, elektromagnetische Wellen freigesetzt werden. Über ein System von Röntgenspiegeln kann aus dem breiten Spektrum elektromagnetischer Wellen monochromatisches Licht beliebiger Wellenlänge ausgeblendet werden. Synchrotron Röntgenstrahlung hat im Vergleich zu Röntgenstrahlung einer Heimquelle mehrere wesentliche Vorteile. Zum einen ist Synchrotron Röntgenstrahlung wesentlich intensiver, was die Zeit für die Aufnahme eines Röntgenexperiments um einen Faktor von bis zu 3000 verkürzt. Zum anderen ist Synchrotronstrahlung wesentlich brillanter, das heißt Synchrotron Strahlung besitzt einen höheren Photonenfluss bezogen auf Strahlquerschnitt und Strahldivergenz. Als Folge einer höheren Brillanz werden die gebeugten Strahlen auf einen kleineren Punkt fokussiert, was zu einem günstigeren Signal zu Rausch Verhältnis führt (Drenth, 1994; McRee, 1999; Rhodes, 2000).

Experimente zur anomalen Dispersion (siehe 3.3.5) können nur an einem Synchrotron durchgeführt werden, da hierfür in der Regel Datensätze bei unterschiedlicher Wellenlänge aufgenommen werden müssen, was mit einer Kupferanode nicht möglich ist.

### 3.3.2.2 Detektor

Als Detektor zur Datenaufnahme wurde in der Regel ein *CCD*-Detektor (*charged coupled device*) verwendet. *CCD*-Detektoren sind Photonen Zähler. Sie können Ladungen speichern, die direkt proportional ist zur Photonenanzahl, die auf den Detektor einfällt. *CCD*-Detektoren zeichnen sich durch hohe Sensitivität, hohe Dynamik und kurze Auslesezeiten aus, so dass sie für schnelle Datensammlungen an Synchrotrons geeignet sind (Drenth, 1994; McRee, 1999).

### 3.3.2.3 Durchführung der Messung

Die Datensammlung erfolgte an einem Einkreis-Goniometer. Während der Datensammlung wurde der Kristall im Röntgenstrahl kontinuierlich um die eigene Achse ( $\varphi$ ) gedreht. Diese steht senkrecht zum Röntgenstrahl.

Ein Datensatz setzte sich aus vielen Bildern zusammen. Die Aufnahme eines Bildes erfolgte unter Drehung des Goniometerkopfes um einen Winkel  $\Delta\varphi$ . Der Drehwinkel für ein Bild hing vor allem von der Mosaizität der Kristalle (McRee, 1999) und der Divergenz des Röntgenstrahls ab. Beides macht sich in der Ausdehnung der Reflexe bemerkbar. Der Drehwinkel  $\Delta\varphi$  wurde so gewählt, dass die Anzahl der auf dem Detektor sich räumlich überlappenden Reflexe möglichst gering war. Gleichzeitig wurde versucht eine gewisse

Anzahl von Reflexen komplett auf einem Bild aufzunehmen. Das war wichtig, um später die einzelnen Bilder besser aufeinander skalieren zu können. Der Abstand zwischen Kristall und Detektor wurde so gewählt, dass, auf der einen Seite, alle gebeugten Strahlen detektiert wurden, auf der anderen Seite, wurde versucht, einen ausreichenden Abstand zu wählen, damit es nicht zu Überlappungen eng zusammenliegender Reflexe kam.

Die Startwinkel bei der Datenmessung und die Gesamtzahl der Bilder für einen Datensatz wurde mit dem Programm XPLAN aus dem XDS Programm Paket (Kabsch, 1993) oder mit der Programmfunktion ‚Strategy‘ des Programms MOSFLM (Leslie, 1992) bestimmt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass am Ende der Messung ein möglichst vollständiger Datensatz vorlag.

Alle Datensätze wurden bei 100 K aufgenommen. Diese tiefe Temperatur minimierte den Strahlschaden, welcher durch die ionisierende Röntgenstrahlung induziert wird (siehe 3.2.3) (Garman und Schneider, 1997). Temperaturkonstanz wurde durch ein Cryo-System erreicht. Hierbei wurde flüssiger Stickstoff verdampft und über eine Cryo-Düse auf den Kristall geblasen, wobei ein Temperatursensor am Ausgang der Düse die Temperatur regelte. Umgeben war der Cryo-Strom von einem warmen trockenen Stickstoffstrom, der die Eisbildung auf dem Kristall durch gefrorenes Kondenswasser verhinderte (Garman and Schneider, 1997).

Die Belichtungszeit für ein Bild war ein sensitiver Parameter in der Datensammlung. Zum einen war die Intensität der Reflexe proportional zur Belichtungszeit. Auf der anderen Seite führte eine zu lange Belichtungszeit in Verbindung mit hoher Strahlintensität am Synchrotron, trotz Messungen bei einer Temperatur von 100 K, zu Strahlschaden im Kristall. Die Belichtungszeit am Synchrotron war somit ein Kompromiss aus gutem Signal zu Rausch Verhältnis bei hoher Auflösung und Minimierung des Strahlschadens.

### **3.3.3 Datenprozessierung**

Die Datenprozessierung besteht im Allgemeinen aus vier Unterpunkten (Otwinowski und Minor, 1997). In einem ersten Schritt wird versucht aus der Lage der Reflexe mit hoher Intensität einiger weniger Bildern die Raumgruppe mit den Zellparametern und die Orientierung des Kristalls relativ im Raum, die Orientierungsmatrix, zu bestimmen. In einem zweiten Schritt werden die Zellparameter verfeinert. Hierzu werden weitere Reflexe von weiteren Bildern hinzugezogen. In einem dritten Schritt wird jedem Reflex des gesamten Datensatzes sein dazugehöriger hkl-Wert zugeordnet und in einer Datei mit den gemessenen

Intensitäten und deren Messfehler abgelegt. In einem letzten Schritt werden die Reflexe der Einzelbilder und mehrfach gemessene Reflexe skaliert. Die Qualität der gemessenen Daten kann zu diesem Zeitpunkt anhand des  $R_{sym}$ -Faktors (Gleichung 11) bestimmt werden. Dabei werden die Intensitäten symmetrieverwandter Reflexe, die theoretisch die gleiche Intensität haben sollten miteinander verglichen. Ein kleiner Wert signalisiert eine gute Übereinstimmung der Intensitäten der symmetrieverwandten Reflexe und somit einen guten Datensatz.

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)} \quad \text{Gleichung 11}$$

$R_{sym}$	Abweichung der Intensität mehrfach gemessener Reflexe
$I_i$	Intensitäten des gemessenen Reflexes hkl
$\bar{I}$	mittlere Intensität der Reflexe hkl

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Programme MOSFLM (Leslie, 1992) in Kombination mit SCALA (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) und das Programm Packet XDS in Kombination mit XSCALE (Kabsch, 1993) zur Datenprozessierung verwendet.

Die Konvertierung der verschiedenen Dateiformate erfolgte mit den Programmen MTZ2VARIOUS, F2MTZ (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) und XDSCONV (XDS Programm Packet, (Kabsch und Sander, 1983)).

### 3.3.4 Molekularer Ersatz

Ein entscheidendes Problem der Strukturlösung über Röntgenkristallographie ist die Lösung des Phasenproblems (siehe 3.3.1.5). Ein eleganter Ansatz zur Lösung des Problems ist der molekulare Ersatz (Lattman, 1985; Rhodes, 2000). Bei einer Fourier Synthese hängen die Strukturfaktoren und mit ihnen die Amplituden und Phasen von den Atompositionen in der Einheitszelle ab. Mit einem isomorphen Modell des Kristalls ist es so möglich die gesuchte Struktur zu lösen, indem man die experimentell bestimmten Amplituden mit den aus dem isomorphen Modell errechneten Phasen kombiniert (Gleichung 12).

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{obs}^2| e^{-2\pi i(hx + ky + lz - \alpha_{calc})} \quad \text{Gleichung 12}$$

$\rho(x, y, z)$	Elektronendichte
$V$	Volumen der Einheitszelle
$ F_{hkl}^2 $	Betrag der Strukturaktoren (Strukturamplituden)
$h, k, l$	Miller'sche Indices
$\alpha$	Phasenwert des Reflexes hkl

Kleinere Abweichungen von Modell zu gesuchter Struktur können dann bei der Verfeinerung (siehe 3.3.9) korrigiert werden. Voraussetzung für ein erfolgreiches Experiment mit molekularem Ersatz ist ein Protein, das zu der zu lösenden Struktur sehr ähnlich ist. Da die Struktur dieses Moleküls nicht zwangsläufig in der gleichen Kristallpackung gelöst wurde wie das zu suchende Molekül, ist eine 6-dimensionale Suche (Rotation und Translation) des Phasierungsmodells in der asymmetrischen Einheit notwendig, die man molekularen Ersatz nennt.

Um die Suche zu beschleunigen wird die 6-dimensionale Suche in zwei 3-dimensionale Suchen unterteilt. In einem ersten Schritt, der Rotationssuche, wird die richtige Orientierung des Modells gesucht. Hierzu wird das Phasierungsmodell im Raum rotiert, eine ortsunabhängige Patterson Karte (siehe 3.3.1.5) errechnet und mit der Patterson Karte aus den experimentellen Daten verglichen. Die Orientierungen mit den besten Korrelationen zwischen den beiden Patterson Funktionen werden in einem zweiten Schritt einer Translationssuche unterzogen. Hierbei wird die Position des vororientierten Phasierungsmodells in der asymmetrischen Einheit gesucht. Eine detaillierte Beschreibung der Theorie kann an anderer Stelle gefunden werden (Lattman, 1985; Drenth, 1994; McRee, 1999; Rhodes, 2000).

Praktisch wurde der molekulare Ersatz mit dem Programm MOLREP (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) durchgeführt. Bei Angabe von einer Reflexdatei und eines Phasierungsmodells führt es automatisch zuerst eine Rotationssuche durch. Mit den besten Rotationslösungen folgt automatisch eine Translationssuche.

### 3.3.5 Phasierung durch anomale Dispersion

Schweratome besitzen die Fähigkeit Röntgenstrahlung einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren. In der Nähe der Absorptionskante streuen diese Atome anomal (Rhodes, 2000). Als Konsequenz haben Friedel Paare, die nach dem Friedel Gesetz gleich sein müssten (Drenth, 1994; Rhodes, 2000), nicht mehr die gleiche Intensität (anomale Differenzen). Zusätzlich unterscheidet sich in der Nähe der Absorptionskante je nach Wellenlänge auch die Intensitätsverteilung der Datensätze (dispersive Differenzen). Anhand dieser

Intensitätsunterschiede können über *Difference Patterson Functionen* (Gleichung 10) die Abstandsvektoren der anomal streuenden Atome untereinander bestimmt werden. Mit diesen Vektoren ist es möglich die Substruktur der anomal streuenden Atome zu lösen und daraus die Phasen für den gesamten Datensatz zu bestimmen (Hendrickson und Ogata, 1997).

Die Intensitätsunterschiede der Friedel Paare bzw. die Intensitätsunterschiede bei unterschiedlichen Wellenlängen hängen neben dem Atomtyp auch von der Anzahl der anomal streuenden Atome und deren Umgebung ab. Man kann das anomale Streuverhalten mit den anomalen Streufaktoren  $f'$  und  $f''$  beschreiben (Hendrickson and Ogata, 1997; Gonzalez *et al.*, 1999). Diese lassen sich aus einem Röntgenfluoreszenzspektrum mit Hilfe der Kramers-Kronig-Beziehung (Evans und Pettifer, 2001) herleiten (Gleichung 13).

$$f'(\omega) = \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{\omega' f''(\omega') \partial \omega'}{\omega^2 - \omega'^2} \quad \text{Gleichung 13}$$

$f'$	reeller Anteil der Änderung der anomalen Streuung
$f''$	imaginärer Anteil der anomalen Streuung
$\omega$	Energie der Röntgenstrahlung

Die größten Intensitätsunterschiede erhält man für maximales  $f''$  (beim Fluoreszenzmaximum) und minimales  $f'$  (am Wendepunkt der Fluoreszenzkurve). Am Fluoreszenzmaximum und am Wendepunkt des Fluoreszenzspektrums werden normalerweise Datensätze aufgenommen (Walsh *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 1999). Zusätzliche Datensätze, die als Referenz für dispersive Differenzen dienen, werden häufig bei weiter entfernt liegender hoher oder niedriger Wellenlänge aufgenommen (Gonzalez *et al.*, 1999). Dort ist der Wert für  $f'$  nahe 0. Je nach Anzahl der Datensätze unterscheidet man zwischen SAD (*single anomalous dispersion*) und MAD (*multiple anomalous dispersion*). Für eine ausführliche Beschreibung der Theorie und der physikalischen Grundlagen muss auf weitere Literatur verwiesen werden (Hendrickson *et al.*, 1985; Drenth, 1994; Hendrickson and Ogata, 1997; Hauptman, 1997).

Die Auswertung des Fluoreszenzspektrums hinsichtlich Absorptionsmaximum, Wendepunkt und Berechnen von  $f'$  und  $f''$  erfolgte mit dem Programm Chooch (Evans and Pettifer, 2001). Da die Intensitätsunterschiede bei der anomalen Dispersion nur sehr gering waren, und für einen vollständigen Datensatz doppelt so viele Reflexe notwendig waren, wurden sehr kurze Belichtungszeiten (2 sec) gewählt, um auf der einen Seite den Strahlenschaden so gering wie möglich zu halten und auf der anderen Seite möglichst viele Reflexe mehrfach messen zu können.

Aus den prozessierten Daten (siehe 3.3.3) wurde mit dem Programm SHELXC (Sheldrick, 2003) die anomalen Beiträge berechnet. Aus diesen anomalen Beiträgen konnten mit dem Programm SHELXD (Schneider und Sheldrick, 2002) die initialen Positionen der anomal streuenden Atome in der asymmetrischen Einheit bestimmt werden. In einer ersten Dichte-Modifizierung mit SHELXE (Sheldrick, 2002) wurden die Positionen der anomal streuenden Atome verfeinert. Die Eingabe zu den Programmen der SHELX Reihe erfolgte über die graphische Eingabemaske HKL2MAP (Pape und Schneider, 2003).

Der eigentliche Schritt der Phasierung erfolgte mit dem Programm SHARP/autoSHARP (de La Fortelle und Bricogne, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein SAD Experiment an der Fluoreszenzkante von Selen durchgeführt. Als Eingabe dienten neben dem Datensatz am Fluoreszenzmaximum die verfeinerten Positionen der anomal streuenden Atome aus SHELXE (Sheldrick, 2002). Anschließend an die Phasierung führte autoSHARP verschiedene Dichte-Modifikationen (siehe 3.3.6) durch. Als Ausgabe erhielt man eine Datei, die neben den gemessenen Intensitäten einen Satz an Phasen und deren Fehler enthielt, womit eine erste Elektronendichte errechnet und ein erstes Proteinmodell gebaut werden konnte (siehe 3.3.7).

### 3.3.6 Dichte-Modifikation

Der erste Satz an Phasen ist lediglich eine grobe Abschätzung und mit einem sehr großen Fehler behaftet. Die daraus errechnete Elektronendichte ist daher in der Regel noch nicht sehr gut und meist schwer zu interpretieren. Ein erster Schritt der Verbesserung der Phasen wird durch eine so genannte Dichte-Modifikation (*density modification*) erreicht. Hierbei wird die Elektronendichte im realen Raum in Bezug auf chemisches und proteinchemisches Wissen modifiziert und von der modifizierten Elektronendichte ein Satz an verbesserten Phasen errechnet (Drenth, 1994; McRee, 1999).

#### *Solvent Flattening*

Man kann sich einen Proteinkristall vereinfacht aus zwei Bereichen aufgebaut vorstellen. Ein Bereich mit geordneter, hoher Elektronendichte, dem Protein, und ein Bereich mit ungeordneter, niedriger Elektronendichte, dem Lösungsmittel. *solvent flattening* versucht die Elektronendichte in den Lösungsmittelbereichen abzusinken und im gleichen Maß die Elektronendichte in den Proteinbereichen anzuheben.

Die Anzahl der Moleküle pro asymmetrische Einheit kann über den Matthews Parameter (Gleichung 14, (Matthews, 1968)) bestimmt werden. Matthews fand heraus, dass das Verhältnis zwischen Volumen der Einheitszelle und Molekulargewicht des kristallisierten Proteins bei den meisten Kristallen zwischen 1.7 und 3.5 Å<sup>3</sup>/Da liegt. Die häufigsten Werte liegen dabei um 2.2 Å<sup>3</sup>/Da.

$$V_M = \frac{\text{Einheitszellvolumen}}{MW \cdot N} \quad \text{Gleichung 14}$$

$V_M$	Matthew Parameter
$MW$	Molekulargewicht
$N$	Anzahl der Moleküle pro Einheitszelle

Kennt man die Anzahl der Moleküle in der Einheitszelle, so kann man anhand der durchschnittlichen Dichte von Protein den Protein- und Lösungsmittelanteil im Kristall abschätzen (Gleichung 15).

$$V_P = \frac{\text{Proteinmasse in der Einheitszelle}}{\text{Protein Dichte} \cdot \text{Einheitszellvolumen}} \quad \text{Gleichung 15}$$

Eigentlich wird bei der Dichte-Modifikation nicht zwischen Aminosäuren Bereichen und Nicht-Aminosäuren Bereichen unterschieden, sondern zwischen geordneten und nicht geordneten Bereichen. So können zum einen Bereiche des Proteins ungeordnet sein, deren Dichte dann heruntergeregelt wird. Zum anderen gibt es auch geordnete Lösungsmittelbereiche, deren Elektronendichte beim *solvent flattening* angehoben wird. Diese Formel diente daher lediglich als Startpunkt, um Dichte-Modifikationen durchzuführen. Der wahre Proteingehalt, beziehungsweise der Gehalt an geordneten und ungeordneten Bereichen im Protein musste über Dichte-Modifikationen bei unterschiedlichem Proteingehalt ermittelt werden (Wang, 1985; Carter und Xiang, 1997).

### ***Histogram Matching***

*Histogram matching* ist eine Technik aus der Bildbearbeitung. Die Grundidee ist, das Histogramm der Elektronendichteverteilung der errechneten Elektronendichte einer bekannten „Standard-“Elektronendichteverteilung von Proteinen anzupassen. *Histogram matching* wird nur auf den Proteinbereich angewendet (Zhang und Main, 1990; McRee, 1999).

### ***Weiter Dichte-Modifikationen***

Neben den oben genannten Dichte-Modifikationen, die auf chemischem und proteinchemischem Wissen beruhen, gibt es eine Reihe weiterer Dichte-Modifikationstechniken, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht eingesetzt wurden.

Befinden sich mehr als ein gleiches Molekül in der asymmetrischen Einheit so kann die Elektronendichte der unterschiedlichen Moleküle gemittelt werden. Dies wird *NCS averaging* (*NCS Mittelung*) genannt (Vellieux und Read, 1997).

Eine weitere Methode zur Verbesserung der Phasen ist die Ausweitung der Phasen hin zu höheren Auflösungen (*phase extension*). Liegen neben den phasierten Daten zusätzlich isomorphe Daten mit höherer Auflösung vor, so kann der Satz an Phasen auf die unphasierten Daten mit hoher Auflösung ausgedehnt werden. Mit der dadurch entstandenen stärker konturierten Elektronendichtekarte können verbesserte Phaseninformationen erhalten werden.

Nach der Phasierung von AFR durch anomale Dispersion (siehe 3.3.5) führte das Programm SHARP/autoSHARP (de La Fortelle and Bricogne, 1997) *histogram matching* und *solvent flattening* als Dichte-Modifikationen mit den Programmen SOLOMON (Abrahams und Leslie, 1996) und DM (Cowtan, 1994) durch.

### **3.3.7 Bauen eines ersten Modells**

In die nach der Dichte-Modifikation erhaltene Elektronendichte musste als nächster Schritt ein Proteinmodell gebaut werden. Es gibt verschiedene Programme, die die Interpretation der Elektronendichte zu diesem Zeitpunkt erleichtern, und ein erstes Proteinmodell automatisch erstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Programm RESOLVE (Terwilliger, 2003a; Terwilliger, 2003b; Terwilliger, 2003c) verwendet, um eine erste Elektronendichteinterpretation zu erhalten. Unter Angabe von Strukturfaktoren nach der Dichte-Modifikation und der Proteinsequenz wurde von RESOLVE ein erstes unvollständiges Proteinmodell gebaut.

### **3.3.8 Erstellen eines Homologiemodells**

Unter einem Struktur-Homologiemodell versteht man eine dreidimensionale Strukturvorhersage anhand eines Sequenzvergleichs mit einem Protein von dem die Struktur bekannt ist. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm T-Coffee

([www.embnet.com/software/TCoffee.html](http://www.embnet.com/software/TCoffee.html), (Notredame *et al.*, 2000)) durchgeführt. Mit dem erhaltenen Sequenzvergleich wurde mit SwissModell ([www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html](http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html), (Peitsch, 1995; Guex und Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003)) ein dreidimensionales Homologiemodell erstellt, welches als Startpunkt für die Verfeinerung der Struktur diene.

### 3.3.9 Verfeinerung einer Struktur

Hinter der Verfeinerung einer Struktur steckt die Idee, durch zusätzliche Informationen das Modell iterativ zu verbessern (Rhodes, 2000). Durch ein verbessertes Modell können über eine reverse Fourier Transformation die Phasenwerte genauer bestimmt werden, was nach erneuter Fourier Transformation mit den experimentellen Amplituden und errechneten (verbesserten) Phasen zu besserer Elektronendichte führt. Diese bessere Elektronendichte kann wiederum genauer interpretiert werden, und somit kann das Modell weiter verbessert werden. Zur Verfeinerung gehören sowohl Schritte, die durch Computerprogramme ausgeführt werden, als auch die visuelle Kontrolle und die Verbesserung der Struktur durch Modellieren per Hand. Diese beiden Schritte wurden in der Regel im Wechsel durchgeführt.

Die am weitesten verbreitete Verfeinerungsmethode in der Proteinkristallographie ist die *least square* Methode (Drenth, 1994). Hierbei wird eine Funktion gesucht, die die gemessenen Daten am besten beschreibt. Praktisch wird das über eine Minimierung des Unterschieds zwischen Modell-Strukturamplituden und gemessenen Strukturamplituden erreicht. Eine mathematische Beschreibung dieser Verfeinerung zeigt Gleichung 16. Ein Gewichtungsfaktor ( $w_{hkl}$ ) sorgt dafür, dass Daten, die akkurat gemessen wurden stärkeren Einfluss haben, als Daten, die mit einem großen Fehler behaftet sind. Das Quadrat der Differenz der Strukturamplituden sorgt dafür, dass die Unterschiede als positiver Beitrag in die Berechnung eingehen (Drenth, 1994).

$$\Phi = \sum_{hkl} w_{hkl} (|F_o| - |F_c|)^2 \quad \text{Gleichung 16}$$

$ F_o $	gemessene Strukturamplituden
$ F_c $	berechnete Strukturamplituden
$w_{hkl}$	Gewichtungsfaktor

Verfeinert wird gegen die Position, Temperaturfaktor und Besetzung der einzelnen Atome. Um bei dieser Methode das globale Minimum zu finden, ist es notwendig das Modell

schon sehr nah der wahren Struktur angenähert zu haben. Anderenfalls wird in ein lokales Minimum verfeinert, aus dem die Programme in der Regel nicht mehr herausfinden. Der maximale Abstand, den man vom globalen Minimum entfernt sein darf, um dieses noch zu finden, nennt man Konvergenzradius. Man kann den Konvergenzradius vergrößern, indem man chemisches Wissen als *constrains* und *restrains* in das Modell einfließen lässt (Rhodes, 2000). Ein *constrain* ist ein fester Wert für einen bestimmten Parameter (zum Beispiel die Besetzung aller Atome wird auf genau 1.0 gesetzt). Unter einem *restrain* versteht man eine einschränkende Bedingung für einen Parameter (zum Beispiel die optimale C-C-Bindungslänge ist 1.54 Å, eine Abweichung davon ist möglich).

Die am häufigsten angewendete Verfeinerungsmethode im Rahmen dieser Arbeit war die Energieminimierung. Parameter die die Energie eines Proteins beeinflussen wurden mit *restrains* belegt. Das heißt, Bindungslängen, Bindungswinkel, Torsionswinkel, Konformationsenergien, nicht kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen oder van der Waals Wechselwirkungen, nicht kristallographische Symmetrien, Beweglichkeitsunterschiede benachbarter Moleküle oder chirale Gruppen hatten einen Idealwert, der über die Konformationen und der Chemie kleiner Moleküle ermittelt wurde (Engh und Huber, 1991). Jede Abweichung von diesem Idealwert wurde mit Strafergie bedacht (Rhodes, 2000).

Die Energierterme wurden mit den kristallographischen Termen (Atomposition, Beweglichkeit und Besetzung) kombiniert und nach der *least square* Methode das gewichtete Minimum berechnet (Gleichung 17).

$$\Phi = \sum_{hkl} w_{hkl} (|F_o| - |F_c|)^2 + \sum_i w_i (|d_{ideal}| - |d_{Modell}|)^2 + \sum_i w_i (|\phi_{ideal}| - |\phi_{Modell}|)^2 + \dots$$

**Gleichung 17**

$ F_o $	gemessene Strukturamplituden
$ F_c $	berechnete Strukturamplituden
$w_{hkl}$	Gewichtungsfaktor
$d$	Bindungslängen
$\phi$	Bindungswinkel

War das Modell am Anfang der Verfeinerung noch mit sehr großen Fehlern behaftet und die Elektronendichte, die mit den Phasen von diesem fehlerhaften Modell errechnet wurde, nicht gut genug, um fehlerfrei interpretiert werden zu können, so wurde die Methode des *simulated annealing* zur Verfeinerung gewählt (Brunger *et al.*, 1990). Dabei handelte es sich um eine Methode, die durch Molekuldynamik Bewegungen des Moleküls simuliert. Man heizt das Modell theoretisch stark auf, was zu stärkeren Bewegungen im Molekül führt.

Dadurch erhoffte man sich ein Anheben über lokale Minima. Durch folgendes langsames Abkühlen konnte das Molekül dann die Konformation mit der geringsten Energie einnehmen (Kirkpatrick *et al.*, 1983; Brunger, 1988). Ein weiterer Vorteil, der vor allem bei der Verfeinerung durch molekularen Ersatz zum tragen kam, war die Minimierung des Einflusses des Suchmodells bei der Phasierung (Brunger, 1993).

### ***TLS-Verfeinerung***

Man spricht von anisotroper Schwingung, wenn Atome in den drei Raumrichtungen nicht gleich stark schwingen. Für die anisotrope Beschreibung eines Atoms benötigt man sechs Variable, wohingegen die isotrope Beschreibung lediglich vier Variablen benötigt. Bei einer sehr hohen Auflösung (ab ca. 1.5 Å) ist es aufgrund der Menge der gesammelten Daten (Observablen) möglich, jedes Atom anisotrop zu verfeinern. Bei niedrigerer Auflösung ist das Verhältnis zwischen Observablen und verfeinerten Parametern nicht groß genug, um eine solche anisotrope Verfeinerung zu rechtfertigen. Da die Atome im Protein kovalent verbunden sind, sind deren Schwingungen nicht unabhängig. Somit kann einen Teil der anisotropen Schwingung als anisotrope Schwingung ganzer Domänen oder Untereinheiten beschrieben werden (Winn *et al.*, 2001). Die Atomgruppen, die bei einer solchen Beschreibung zusammengefasst werden, werden als TLS-Gruppen bezeichnet, und als starre Körper im Kristall betrachtet. Eine detaillierte Beschreibung der TLS-Parameterisierung und deren Theorie kann bei Schomaker und Trueblood (1968) gefunden werden. Eine Zusammenfassung findet sich bei Howlin (1989) und Schomaker und Trueblood (1998).

Bei den Verfeinerungen von SoxXA und AFR, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden jeweils die Untereinheiten SoxX und SoxA bzw. ein Monomer AFR als TLS Gruppe definiert, und deren anisotrope Schwingungen in die Verfeinerung mit REFMAC5 integriert (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).

### ***R-Faktor***

Um die Qualität eines Modells zu überprüfen, wird in der Kristallographie der *R-Faktor* (*residual index*, Gleichung 18) verwendet (Drenth, 1994).

$$R = \frac{\sum \| |F_{obs}| - |F_{calc}| \|}{\sum |F_{obs}|}$$

Gleichung 18

$|F_{obs}|$  gemessene Strukturamplituden  
 $|F_{calc}|$  berechnete Strukturamplituden

Dabei werden die gemessenen Strukturamplituden  $|F_{obs}|$ , die proportional zu den Quadratwurzeln der gemessenen Intensitäten sind, mit den errechneten Strukturamplituden  $|F_{calc}|$  des gegenwärtigen Modells verglichen. Da errechnete und gemessene Strukturaktoren im Laufe der Verfeinerung mit verbesserten Modellen konvergieren sollten, sollte auch der *R*-Faktor im Laufe der Verfeinerung kleiner werden. Am Ende der Verfeinerung ist der *R*-Faktor ein Maß dafür, wie gut das verfeinerte Modell durch die gemessenen Daten beschrieben wird.

Am Anfang der Verfeinerung wurden 5 % der Reflexe eines Datensatzes zufällig ausgewählt und markiert, die für die gesamte Verfeinerung nicht herangezogen wurden. Ein Vergleich von gemessenen und errechneten Strukturamplituden dieser markierten Reflexe ergibt den freien *R*-Faktor (Brunger, 1992; Brunger, 1997). Da jeder Reflex Informationen der gesamten Struktur enthält, sollten sich Änderungen die das Modell besser beschreiben auch in den Reflexen zeigen, die zur Verfeinerung nicht herangezogen wurden. Neben dem *R*-Faktor sollte sich also auch der freie *R*-Faktor verbessern (Kleywegt und Brunger, 1996). So ist es möglich, den Einfluss eines fehlerhaften Modells während der Verfeinerung zu kontrollieren.

### 3.3.10 Erstellen von „Topologie-, Parameterdateien“

Während der Verfeinerung der Struktur (siehe 3.3.9) fließen chemisches und proteinchemische Wissen (Engh and Huber, 1991) als zusätzliche Observablen in die Modellverfeinerung mit ein. Welche Atome des Modells miteinander verknüpft sind, Bindungslängen, Bindungswinkel, planare Gruppen, Torsionswinkel und Ladungen sind in so genannten Topologie- und Parameterdateien beschrieben. Für die Standardamino-säuren und häufig vorkommenden Molekülen werden Bibliotheken der oben genannten Werte mit den einzelnen Verfeinerungsprogrammen mitgeliefert. Für selten vorkommende Moleküle oder bei Konflikten mit anderen Programmen wurden die Topologie- und Parameterdateien über den PRODRG-Server (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html>) (Schüttelkopf und Van Aalten, 2004) für unterschiedliche Programme erstellt. Für kleine Moleküle kann über diesen Server aus einer Koordinatendatei des gewünschten Moleküls im .pdb-Format energieoptimierte Topologie- und Parameterdateien errechnet werden.

### 3.3.11 Suche nach Lösungsmittel Molekülen

Neben Cofaktoren und Substraten sind auch Lösungsmittelmoleküle, wie Wasser, Ionen oder Additive fest am Protein gebunden und somit Teil des geordneten Kristallgitters. Zur vollständigen Beschreibung der Kristallstruktur ist es daher notwendig, neben den Aminosäuren, Cofaktoren und Substraten auch die geordneten Lösungsmittelmoleküle in das Modell zu integrieren.

Die Suche nach Wassermolekülen wurde mit dem Programm ARP/WARP (Perrakis *et al.*, 2001) durchgeführt. Dieses Programm sucht im realen Raum nach nicht interpretierter Elektronendichte, in die es Sauerstoffatome setzt, wenn die Umgebungsbedingungen günstig sind. Für gewöhnlich erfolgte nach 100 platzierten Sauerstoffatome eine Verfeinerung des gesamten Modells mit REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) (siehe 3.3.9). Bei jedem Schritt wurden die Wassermoleküle aus dem Modell entfernt, die nach dem Verfeinerungsschritt nicht durch ausreichend Elektronendichte beschrieben wurden.

Weiterhin wurde am Ende der Suche am Bildschirm mit dem Grafikprogramm O (Jones *et al.*, 1991) überprüft, ob die Wassermoleküle durch Elektronendichte beschrieben wurden und ob sie durch Wasserstoffbrückenbindungen am Protein koordiniert sein konnten.

### 3.3.12 Errechnen von Elektronendichte

Aus den Strukturfaktoren bestehend aus den Strukturamplituden und Phasen konnte über eine so genannte Fourier Transformation (Gleichung 8) eine Elektronendichtekarte errechnet werden (Drenth, 1994; Rhodes, 2000). Da im Laufe der Phasierung und Verfeinerung sehr viele chemische und proteinchemische Annahmen (Engh and Huber, 1991) in den Phasenwert mit eingeflossen waren (siehe 3.3.4, 3.3.6, 3.3.7, 3.3.9 und 3.3.10), war es wichtig, den Einfluss des Modells zu berücksichtigen und zu minimieren. Diese Annahmen wurden zunächst gemacht, da Intensitäten und Phasen, soweit sie experimentell bestimmt wurden, mit einem Messfehler behaftet waren, und die Elektronendichte am Anfang der Strukturaufklärung nicht gut genug war, um fehlerfrei interpretiert werden zu können. Aus diesen Gründen wurden verschiedene Elektronendichtekarten verwendet, um auf der einen Seite die Qualität der Elektronendichte zu optimieren und auf der anderen Seite den Einfluss des Modells zu minimieren.

Für Datensätze mit experimentell über SAD bestimmten Phasenwerten (siehe 3.3.5) wurde eine Elektronendichte in einer *figure of merit (FOM)* gewichteten Elektronendichtekarte errechnet. Bei dieser wurden experimentelle Strukturamplituden und

Phasen verwendet. Die Genauigkeit der Phasen (*FOM*) oder Hendrickson-Lattman-Koeffizienten (Hendrickson und Lattman, 1970) diente als Gewichtungsfaktor bei der Berechnung der Elektronendichte. Je akkurater die Phasen bestimmt wurden, desto mehr Gewicht wurde diesen Struktur Faktoren bei der Berechnung eingeräumt.

Lagen sowohl errechnete Phasen als auch experimentelle Phasen vor, so wurden diese kombiniert. Dadurch wurde erreicht, dass zum einen die Elektronendichte verbessert wurde, zum anderen aber der Modelleinfluss begrenzt blieb. Das war vor allem bei Auflösungen schlechter als ca. 3 Å wichtig, da bei dieser Auflösung der Modelleinfluss leicht die Elektronendichte bestimmen kann.

Bei Datensätzen, bei denen keine experimentellen Phasen vorlagen, wie zum Beispiel bei Strukturen, die durch molekularen Ersatz gelöst wurden, wurde bei der Verfeinerung, im Modellbau und zur Kontrolle des Proteinmodells im wesentlichen zwei weitere Elektronendichtekarten eingesetzt. Bei der  $F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte handelte es sich um eine Differenzkarte. Hierzu werden vom Modell ausgehend berechnete (*calculated*) Strukturamplituden  $|F_c|$  von den experimentell bestimmten (*observed*) Strukturamplituden  $|F_o|$  subtrahiert und mit den aus dem Modell berechneten Phasen eine Elektronendichtekarte errechnet. Durch die Differenzbildung zwischen observierten und berechneten Struktur Faktoren wird Elektronendichte, durch die das Modell nicht beschrieben wird, als positive Elektronendichte dargestellt. Positionen, die durch das Modell falsch beschrieben werden, werden als negative Elektronendichte dargestellt. Neben der  $F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte kam eine  $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte zum Einsatz. Eine  $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte ist eine Kombination aus einer einfachen  $F_o$ - und einer  $F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte. Durch diese Kombination wird der Einfluss des Modells verringert (Drenth, 1994).

Ein zusätzlicher Gewichtungsfaktor wurde in Form der so genannten SigmaA Gewichtung eingeführt (Srinivasan, 1966; Read, 1986). Er berücksichtigt zusätzlich die Messungenauigkeit bei den Intensitäten. Die verwendeten Elektronendichten wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$2F_o-F_c$ -Elektronendichte

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |2mF_o - DF_c| e^{-2\pi i(hx+ky+lz-\alpha_{calc})} \quad \text{Gleichung 19}$$

und  $F_o$ - $F_c$ -Elektronendichte

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |mF_o - DF_c| e^{-2\pi i(hx+ky+lz-\alpha_{calc})} \quad \text{Gleichung 20}$$

$\rho(x,y,z)$	Elektronendichte am Ort $x,y,z$
$V$	Volumen der Einheitszelle
$F_o$	experimentelle Strukturamplituden
$F_c$	berechnete Strukturamplituden
$h, k, l$	Miller'sche Indices
$\alpha$	Phasenwert des Reflexes $hkl$
$m, D$	Gewichtungsfaktoren

Da jeder Reflex Informationen der gesamten Struktur enthält, sollten alle Reflexe zur Berechnung der Elektronendichtekarte herangezogen werden, um Fehler in der berechneten Elektronendichte zu vermeiden, die durch das Fehlen von Reflexen entstehen. Auch die Reflexe, die zur Berechnung des freien  $R$ -Faktors markiert wurden, wurden bei der Berechnung der Elektronendichtekarte einbezogen. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Vorgehen keinen ernsthaften Einfluss auf die Berechnung des freien  $R$ -Faktors hatte (Kleywegt and Brunger, 1996).

Die Berechnung der Elektronendichte wurde hauptsächlich mit dem Programm FFT (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) durchgeführt. Normalerweise wurde die Kartengröße so gewählt, dass sie das gesamte Modell in der .pdb-Datei abdeckte. Wurde mit dem Programm CNS (Brunger *et al.*, 1998) verfeinert, so wurde auch die Elektronendichte mit dem Programm CNS berechnet. Die Elektronendichte, die mit CNS berechnet wurde, wurde mit dem Programm MAPMAN (Kleywegt und Jones, 1996b) in ein Format umgewandelt, das von dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) gelesen werden konnte.

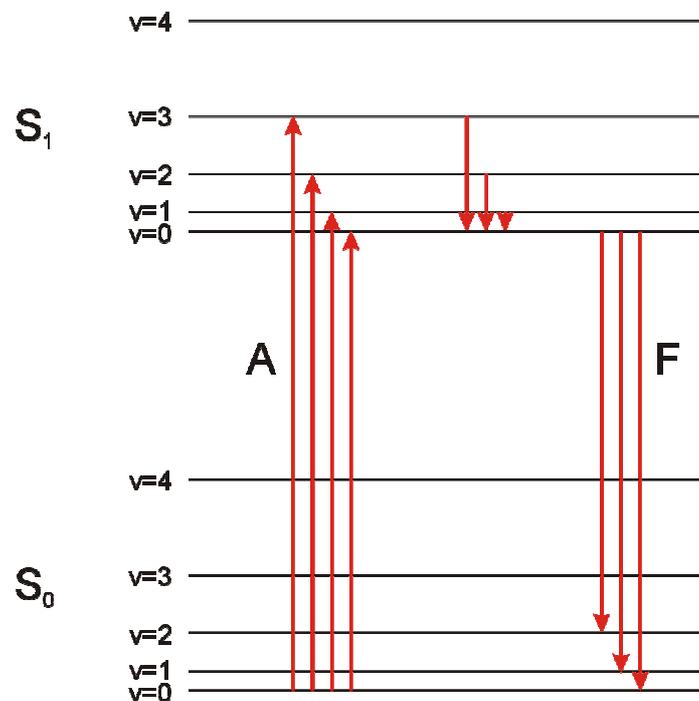
### 3.3.13 Darstellen von Proteinmodell und Elektronendichte

Die einzelnen Schritte der Verfeinerung wurden visuell kontrolliert. Hierzu wurden die errechnete Elektronendichtekarte und die Proteinmodelle in das Programm O (Jones *et al.*, 1991) eingeladen. Mit dem Programm O wurden zudem auch Korrekturen am Proteinmodell (z.B. Verschieben von Aminosäuren oder Ändern der Torsionswinkel) durchgeführt.

Die Interpretation des fertigen Modells und das Anfertigen von Abbildungen erfolgten in der Regel mit dem Programm PyMOL (DeLano, 2002).

### 3.4 Fluoreszenzspektroskopie im Kristall

Wird ein Molekül photochemisch angeregt (Abbildung 15 A), kann es auf verschiedene Weisen wieder in seinen energetischen Grundzustand gelangen. Neben der strahlungslosen Relaxation, bei der die Energie als Schwingungsenergie an das Lösungsmittel abgegeben wird, kann das Molekül die Energie in Form eines Lichtphotons abgeben. Die Photonen, die bei einem Übergang vom angeregten Singulettzustand  $S_1$  zum Grundzustand  $S_0$  frei werden, können als Fluoreszenz gemessen werden (Abbildung 15 F). Die Lebensdauer des  $S_1$  Zustands ist mit  $10^{-9}$  bis  $10^{-7}$  in der gleichen Größenordnung oder sogar länger als Diffusion, Rotation oder Konformationsänderungen von biologischen Makromolekülen, was die Fluoreszenz für die Messung solcher Prozesse besonders attraktiv macht. Abbildung 15 zeigt ein Energieniveauschema zur Veranschaulichung der Fluoreszenz (Lottspeich und Zorbas, 1998; Winter und Noll, 1998).



**Abbildung 15:** Energieniveauschema zur Darstellung von Fluoreszenz. Durch Absorption von Licht ändert sich der Zustand eines Moleküls vom elektronischen Grundzustand  $S_0$  zum angeregten Zustand  $S_1$  (A). Aufgrund des Franck-Condon-Prinzips erfolgt diese Anregung aus dem Schwingungsgrundzustand in einen höheren Schwingungszustand z.B.  $v=1, 2, 3$ . Nach Relaxation in den Schwingungsgrundzustand  $v=0$  des elektronisch angeregten Zustands  $S_1$  kommt es bei weiterer Relaxation in den elektronischen Zustand  $S_0$  zur Emission eines Photons, der Fluoreszenz (F)

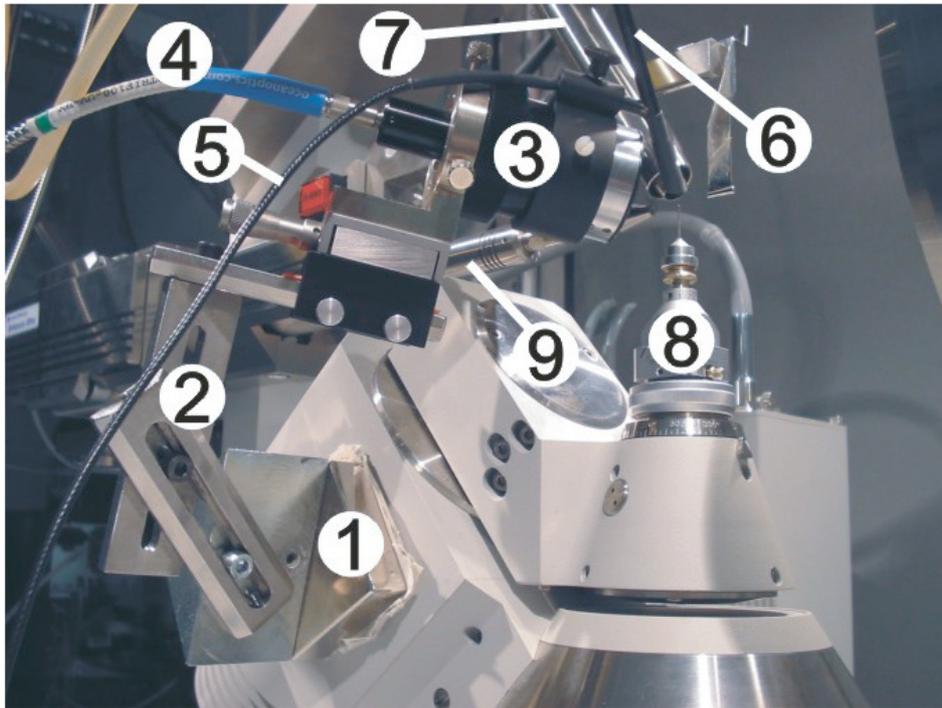
Im elektronischen Grundzustand  $S_0$  liegen die Moleküle fast ausschließlich im Schwingungsgrundzustand  $v=0$  vor. Bei Anregung durch Licht in den elektronischen Zustand  $S_1$  kommt es aufgrund der Trägheit der Atomkerne zur Besetzung höherer Schwingungszustände ( $v=1, 2, 3, \dots$ ) (Franck-Condon-Prinzip (Atkins, 1990)), die aufgrund thermischer Äquilibrierung in den Schwingungszustand  $v=0$  im  $S_1$  Zustand relaxieren. Von

---

dem  $S_1/v=0$  Zustand kommt es dann unter Emission eines Photons (Fluoreszenz) zur Relaxation in den elektronischen Grundzustand  $S_0$ . Als Konsequenz des Franck-Condon-Prinzips ist das Emissionsspektrum im Vergleich zum Absorptionsspektrum zu niedrigerer Energie verschoben (Rotverschiebung).

Die Fluoreszenzspektroskopie ist im Vergleich zur Absorptionsspektroskopie sehr viel empfindlicher, was bei kleinen Probenmengen wie einem Proteinkristall entscheidend für die Detektion eines Signals sein kann (Lottspeich and Zorbas, 1998). Außerdem emittiert der Fluorophor in alle Richtungen, was bedeutet, dass das Fluoreszenzsignal in jeder Orientierung relativ zum Anregungsstrahl gemessen werden kann. Durch geeignete Messanordnung kann erreicht werden, dass im Wesentlichen nur Licht detektiert wird, das von der Probe erzeugt wird. Dadurch kann verhindert werden, dass der Anregungsstrahl die Messung beeinflusst, wie es bei der Absorptionsspektroskopie vorkommen kann. Bei Messungen in der Küvette kommen solche Effekte in der Regel nicht vor. Wenn jeder Kristall allerdings immer wieder neu im Lichtstrahl ausgerichtet werden muss, kann durch eine nichtlineare Ausrichtung von Lichtquelle – Kristall – Detektor Streulicht vom Anregungsstrahl die Messung beeinflussen (persönliche Mitteilung von Björn Klink). Beim im Labor gewählten Aufbau für Fluoreszenzmessungen können diese Probleme minimiert werden.

Bei diesem Fluoreszenzspektrometer handelte es sich um eine in unserem Labor von Björn Klink entwickelte Konstruktion, die speziell für die Fluoreszenzmessung im Kristall gebaut wurde. Der Aufbau ist in Abbildung 16 zu sehen.



**Abbildung 16:** Aufbau zur Fluoreszenzmessung im Kristall. Das Spiegelobjektiv (3) zeigt mit seiner Optik auf den Kristall, der in einer Nylonschleife montiert auf dem Goniometerkopf (8) einer Röntgenanlage (9) sitzt. Das Anregungslicht und Fluoreszenzsignal wird über Glasfaserkabel (4) von der Laser-Quelle bzw. zum Detektor geleitet (nicht abgebildet). Die Messung kann bei Raumtemperatur im feuchten Luftstrom eines „Humidifiers“ (5, 6) oder unter Cryo-Bedingungen mit einer Cryo-Düse (7) erfolgen. Der Aufbau wird über einen Magnethalter (1) am Goniometer befestigt und kann über Justage an (2) auf den Kristall fokussiert werden.

Als Lichtquelle für die Anregung diente ein He-Cd-Laser, der UV-Licht bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 325$  nm produziert. Das Licht wurde über Glasfasern zum Objektiv gebracht, das es dann auf den Kristall fokussiert. Das emittierte Licht wurde über das gleiche Objektiv und weitere Glasfasern zum Detektor geleitet, wo das Spektrum detektiert wurde. Die Datenaufnahme wurde von der Software OOIbase32 der Fa. Ocean Optics gesteuert. Bei der Aufnahme von Fluoreszenzspektren bei Raumtemperatur wurde der Kristall im Feuchtluftstrom eines *Humidifiers* vor dem Austrocknen geschützt. Im Fall der Fluoreszenzmessung bei 100 K wurde der Kristall analog der Datenaufnahme eines Röntgenexperiments über eine Cryo-Düse auf 100 K gekühlt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

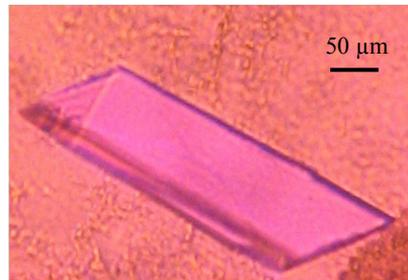
### 4.1 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase

#### 4.1.1 Finden von Kristallisationsbedingungen

Das Protein 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase (AFR) wurde von Annette Kühn rekombinant in *E. coli* exprimiert und gereinigt (Kühn, 2004) und zur Kristallisation in Chargen zu 1.5 bis 3 mg/mL in AFR Lagerungspuffer (20 mM BIS-TRIS, pH 7.0) zur Verfügung gestellt. Auch Protein mit Substitution von Methionin durch Selenomethionin wurde von Annette Kühn hergestellt. Hierbei wurde ein spezielles Selenomethionin-Medium zur Anzucht der Bakterien verwendet. Die Reinigung erfolgte unter streng reduzierenden Bedingungen mit 2 mM DTT, wodurch verhindert werden sollte, dass Selenomethionin oxidiert wurde. Da im Zeitraum der Kristallisation noch keine Stabilisierung zum Einfrieren der Proteinlösung bekannt war und das Einfrieren des Proteins in Lagerungspuffer zu einem Aktivitätsverlust führte (persönliche Mitteilung von Annette Kühn), wurde das Protein bis zur Kristallisation bei 4 °C gelagert. Zur Kristallisation wurden Proteinchargen eingesetzt, die bis zu vier Wochen alt waren. Vor der Kristallisation wurde AFR mit Amicon Ultra Konzentrationseinheiten durch Zentrifugation (4 °C, 3000×g, siehe 3.1.1) auf ca. 20 mg/mL ( $\Delta 570$  nM) konzentriert. Zur Stabilisierung von AFR in konzentrierter Lösung und zur Strukturaufklärung mit Cofaktor wurde der konzentrierten Proteinlösung NADPH bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt. Das konzentrierte Protein wurde direkt zur Kristallisation eingesetzt.

Auf einem Deckplättchen wurden 1  $\mu$ L Proteinlösung (20 mg/mL AFR in 20 mM BIS-TRIS pH 7.0, 1 mM NADPH) mit 1  $\mu$ L Reserviörlösung gemischt und das Deckplättchen zur Kristallisation mit der Methode des hängenden Tropfens luftdicht über einer Kammer gefüllt mit Reserviörlösung einer Linbro Kulturplatte gelegt (siehe 3.2.2). Initiale Kristallisationsbedingungen wurden mit *Crystal Screen* (Jancarik and Kim, 1991), *Crystal Screen 2* und *Peg/Ion Screen* der Fa. Hampton Research gesucht. Mit Puffer 9 des *Crystal Screens* (100 mM tri-Natriumcitrat pH 5.6, 200 mM Ammoniumacetat, 30 % (w/v) PEG4000) konnten erste Kristalle erhalten werden. Danach wurden unter Variation der Art des Fällungsmittel, der Fällungsmittelkonzentration, der Art des Salzes, der Salzkonzentration und pH-Wertes versucht die Kristallisation zu verbessern (Cudney *et al.*, 1994). Da das Protein nicht eingefroren und auch nur in verdünnter Form gelagert werden konnte, war es nur

schwer möglich, gezielt einzelne Bedingungen direkt miteinander zu vergleichen, was die Optimierung der Kristallisationsbedingungen erschwerte. Verbesserte Kristallisation wurde mit der Kristallisationslösung bestehend aus 100 mM tri-Natriumcitrat pH 5.6, 200 mM Ammoniumacetat und 30 % (w/v) PEG5000 MME erzielt (siehe Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Kristall von AFR, der unter den verfeinerten Kristallisationsbedingungen (100 mM tri-Natriumcitrat pH 5.6, 200 mM Ammoniumacetat, 30 % (w/v) PEG5000 MME) gezüchtet werden konnte.

Wildtyp-AFR kristallisierte in Gegenwart von NADPH je nach Proteincharge nach drei bis zehn Tagen zu kompakten Stäbchen von bis zu  $250 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$ . Zur Datenaufnahme unter Cryo-Bedingungen (siehe 3.2.3) wurde zu den Kristallisationstropfen ca. 5 µL Cryo-Lösung (100 mM tri-Natriumcitrat pH 5.6, 200 mM Ammoniumacetat, 30 % (w/v) PEG5000 MME, 10 mM NADPH, 7 % (v/v) Glycerin) gegeben, die Kristalle in Nylonschleifen der entsprechenden Größe der Fa. Hampton Research montiert und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren.

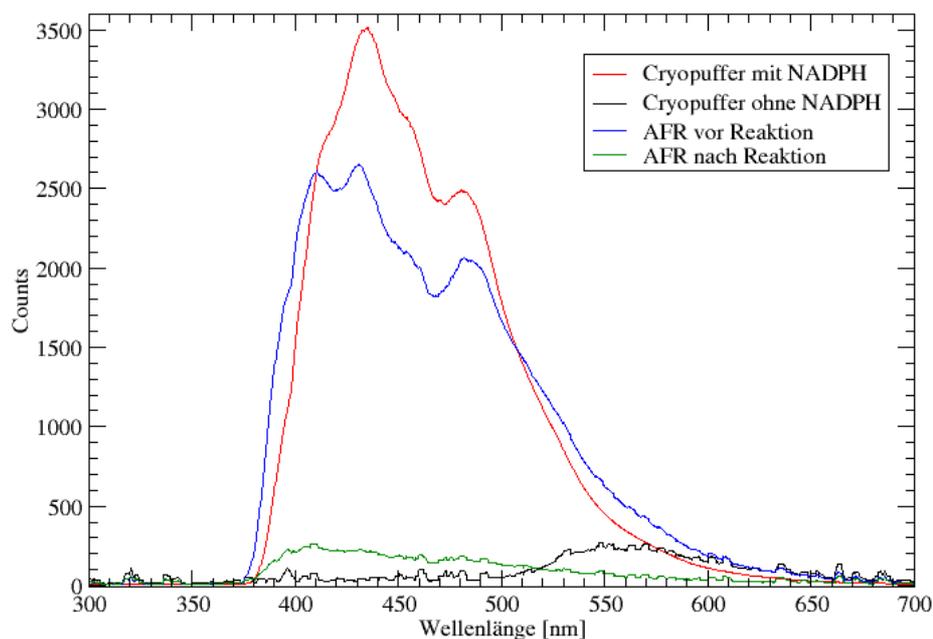
Bei Experimenten zur Reaktion im Kristall wurde auf den Cofaktor NADPH in der Cryo-Lösung verzichtet und stattdessen das natürliche Substrat 1,5-Anhydro-D-fructose (1,5-AF) der Cryo-Lösung zugegeben. Die Kristalle wurden in AF-Cryo-Lösung (100 mM tri-Natriumcitrat pH 5.6, 200 mM Ammoniumacetat, 30 % (w/v) PEG5000 MME, 5-25 mM 1,5-AF, 7 % (v/v) Glycerin) überführt und darin gewaschen, bevor sie in Nylonschleifen der Fa. Hampton Research in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.

Zur Kristallisation von Selenomethionin modifizierter AFR wurde dem Proteinpuffer 10 mM DTT zugesetzt, um eine Oxidation des redoxempfindlichen Selenomethionins zu verhindern. Kristalle von AFR(Se-Met) konnten unter den gleichen Bedingungen wie Wildtyp-Kristalle gezüchtet werden (100 mM tri-Natriumcitrat pH 5.6, 200 mM Ammoniumacetat, 30 % (w/v) PEG5000 MME), hatten die gleiche Form wie Wildtyp-Kristalle, waren jedoch etwas kleiner als Wildtyp-Kristalle ( $150 \times 60 \times 60 \mu\text{m}^3$ ) und wuchsen erst nach ca. drei Monaten.

### 4.1.2 Fluoreszenzmessungen im Kristall

Die reduzierten Formen der Dinucleotid-Cofaktoren NADH und NADPH sind in der Lage, Licht bei 340 nm zu absorbieren, während die oxidierten Formen  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  dies nicht machen. In gleicher Weise emittieren die reduzierten Cofaktoren Licht bei einer Wellenlänge von 445 nm, wenn sie bei 340 nm angeregt werden als Fluoreszenz, während die oxidierten Cofaktoren keine Fluoreszenz zeigen (Bourgeois *et al.*, 2002). In der Biochemie wird das unterschiedliche Fluoreszenzverhalten zu qualitativen und quantitativen Untersuchungen von Cofaktorbinding (Delabar *et al.*, 1982; Chumachenko *et al.*, 1990), Konformationsänderungen (Rimet *et al.*, 1991; Hillar *et al.*, 1994) oder der kinetischen Untersuchung von Oxidations- und Reduktionsreaktionen von NAD(H)- und NADP(H)-abhängigen Enzymen verwendet (Yuan und Hammes, 1986; Appleman *et al.*, 1988; Johansson *et al.*, 2002). Im Falle der AFR wurde der Oxidationszustand des Cofaktors NADP(H) in den Kristallen qualitativ untersucht.

AFR wurde in Anwesenheit von NADPH als Cofaktor kristallisiert (siehe 4.1.1). Unter den Kristallisationsbedingungen von AFR (aerobe Bedingungen, pH 5.6) ist die reduzierte Form des Cofaktors im Vergleich zur oxidierten Form destabilisiert (Leonida, 2001). Es stellte sich daher die Frage, ob während der Kristallisation NADPH oxidiert wurde und in den Kristallen  $\text{NADP}^+$  vorlag, oder ob NADPH lange genug stabil war und eventuell durch AFR soweit stabilisiert wurde, dass in den Kristallen NADPH zu finden war. Um diese Frage zu klären, wurden Fluoreszenzspektren von Kristallen und eingefrorenen Lösungen aufgenommen (Abbildung 11, Tabelle 1, siehe auch Kapitel 3.4).



**Abbildung 18:** Fluoreszenzspektren von AFR mit Cofaktor unter Cryo-Bedingungen (100 K). Der Kristall zeigt vor der Reaktion ca. 0.1 % der Fluoreszenzintensität verglichen mit dem Cofaktor in Lösung. Nach vollständiger Oxidation mit 1,5-AF wurden auch die letzten Reste des Cofaktors oxidiert und es war kaum noch Fluoreszenz zu erkennen. Die Integrationszeiten und Fluoreszenzmaxima sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Fluoreszenzmessungen der AFR unter Cryo-Bedingungen (100 K) und bei Raumtemperatur

Probe	Fluoreszenzmaximum [nm]	Integrationszeit [msec]	Fluoreszenzsignal [counts]
Cryo-Lösung mit NADPH	440, 480	60	3500
Cryo-Lösung ohne NADPH	550	4000	270
AFR vor Reaktion	410, 430, 480	3000	2700
AFR nach Reaktion	410	3000	260
AFR bei Raumtemperatur	440, 470, 490	2500	1200

Eine exakte quantitative Analyse der Spektren ist ohne das Wissen über das Fluoreszenzverhalten im Kristall nicht möglich. Es müssten die Einflüsse wie zum Beispiel die Quantenausbeute in gebundener und ungebundener Form, die Reflexion an der Kristalloberfläche, die Quantenausbeute in konzentrierten Systemen, Deaktivierungsprozesse oder Absorption des Anregungslichtes und des Fluoreszenzlichtes im Kristall eingehend untersucht werden. Eine Abschätzung der Größenordnungen hingegen sollte dennoch möglich

sein. Hierzu wurde die Konzentration von Cofaktor im Kristall über Gleichung 21 auf ca. 15 mM bestimmt und ein Tropfen einer frisch angesetzten NADPH Referenzlösung (1 mM NADPH, 100 mM Natriumcitrat pH 5.6, 200 mM Ammoniumacetat, 30 % (w/v) PEG5000) in einer Nylonschleife der Fa. Hampton eingefroren und vermessen (Abbildung 18, rote Kurve). Für die NADPH Referenzlösung waren lediglich 1/50 der Zeit verglichen mit AFR Kristallen erforderlich um ein vergleichbares Spektrum aufzunehmen. Man konnte also davon ausgehen, dass im Kristall noch etwa 0.1 % des Cofaktors in der reduzierten Form vorlag. In der Kristallstruktur sollte dieser Anteil reduzierten Cofaktors nicht zu sehen sein.

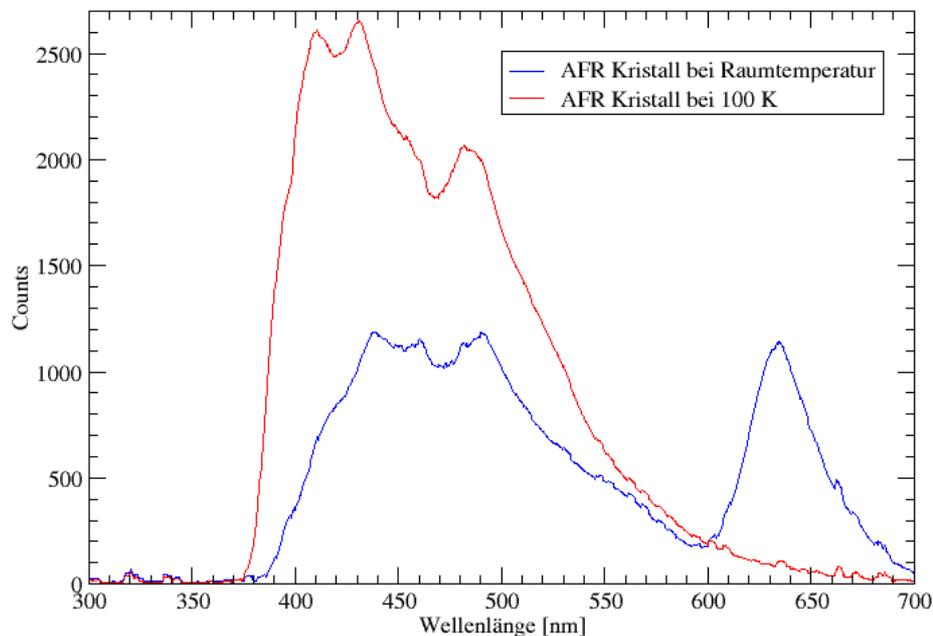
$$c[M] = \frac{n}{V \cdot N_A}$$

**Gleichung 21**

$n$  Anzahl der Moleküle in der Einheitszelle  
 $V$  Volumen der Einheitszelle  
 $N_A$  Avogadro Zahl

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine vollständige Reduktion des Cofaktors im Kristall mit dem natürlichen Substrat von AFR 1,5-AF möglich war. Hierzu wurde der Kristall in AF-Cryo-Lösung (100 mM tri-Natriumcitrat pH 5.6, 200 mM Ammoniumacetat, 30 % (w/v) PEG5000 MME, 5-25 mM 1,5-AF, 7 % (v/v) Glycerin) getränkt, wieder eingefroren und die Fluoreszenz gemessen (Abbildung 18, grüne Kurve). Im Vergleich zu unbehandelten Kristallen fiel die Fluoreszenz nochmals ab, was auf eine weitere Oxidation des Cofaktors hindeutete.

In weiteren Versuchen wurde untersucht, wie sich die Fluoreszenz im Kristall unter Cryo-Bedingungen (100 K) und bei Raumtemperatur verhält (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Fluoreszenzspektren von AFR mit gebundenem Cofaktor unter Cryo-Bedingungen und bei Raumtemperatur.

Auffällig hierbei ist der Verschiebung der Maxima von 410 und 430 nm bei 100 K auf 440 und 470 nm bei Raumtemperatur (Abbildung 19). Eine Rotverschiebung des Spektrums von NADPH bei ansteigender Temperatur wurde auch in Komplex mit LDH beobachtet (Winer *et al.*, 1959). Diese Rotverschiebung wird durch die größere Anzahl an zu erreichenden Vibrationszuständen bei höherer Temperatur erklärt (Lakowsky, 1999; Bourgeois *et al.*, 2002). Die Messung der Fluoreszenzänderung zwischen oxidiertes und reduziertes Form des Cofaktors ist auch bei Raumtemperatur möglich. Hierbei konnte ebenfalls ein deutlicher Abfall der Fluoreszenz nach Reaktion mit 1,5-AF beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Quantenausbeute sollte unter Cryo-Bedingungen im Vergleich zu den Messungen bei Raumtemperatur aufgrund geringerer thermaler Relaxation höher sein (Winer *et al.*, 1959; Lakowsky, 1999). Anhand der aufgenommenen Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen ist diese Theorie hier schwer nachzuvollziehen. Die gemessenen Kristalle und die schwierige Fokussierung der Optik auf den Kristall machten es schwer, quantitative Aussagen zu treffen.

Die erzielten Ergebnisse verdeutlichen zum einen, dass AFR unter den gegebenen Kristallisationsbedingungen hauptsächlich in oxidiertes Form vorliegt. Weiterhin kann gesagt werden, dass AFR im Kristallverbund weiterhin aktiv ist und dass die kristallisierte Form von

AFR eine physiologische Relevanz besitzt. Reaktionen im Kristall wurden auch schon für andere Enzyme beschrieben. So konnten zum Beispiel die Hydrolyse von GTP zu GDP durch p21 im Kristall nachgewiesen (Schlichting *et al.*, 1990; Scheidig, 1994) oder die Oxidation von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat durch die Isocitrat-Dehydrogenase (Cohen *et al.*, 1997; Stoddard *et al.*, 1998) im Kristall beobachtet werden. Eine Übersicht der mit Hilfe der kinetischen Kristallographie untersuchten Systeme und Techniken ist bei Wilmouth *et al.* (2000) zu finden.

Ein Austausch von Cofaktor im Kristall konnte nicht beobachtet werden. Kristalle wurden in frisch angesetzter Cryo-Lösung (100 mM tri-Natriumcitrat pH 5.6, 200 mM Ammoniumacetat, 30 % (w/v) PEG5000 MME, 10 mM NADPH, 7 % (v/v) Glycerin) getränkt und danach in Cryo-Lösung ohne NADPH mehrfach gewaschen ohne einen Anstieg der Fluoreszenz zu zeigen. Dies deutete darauf hin, dass im Kristall der Cofaktor NADP(H) fest gebunden war. Ein Austausch des Cofaktors hat möglicherweise eine Konformationsänderung zur Folge, die den Kristall zerstören würde.

Hinweise, dass während der Kristallisation schon ein Großteil des NADPH oxidiert wurde, gab auch der Vergleich der Strukturen zwischen unbehandelten Kristallen und vollständig oxidierten Kristallen (siehe 4.1.5).

### **4.1.3 Aufklären der Struktur**

#### **4.1.3.1 Phasierung durch SAD**

Am Anfang wurde mit BLAST (Altschul *et al.*, 1997) in der PDB-Datenbank (Berman *et al.*, 2000) nach Sequenz-verwandten Proteinen mit bekannter Struktur gesucht. Das Ergebnis mit der höchsten Homologie war Glucose-Fructose-Oxidoreduktase (GFOR) mit 24 % Sequenzidentität. Erste Versuche die Struktur über molekularen Ersatz mit dem N-terminal um 34 Aminosäuren verkürztem homologen Enzym GFOR (PDB Eintrag 1OFG) (Kingston *et al.*, 1996) als Suchmodell zu lösen, schlugen jedoch fehl.

Da die Reproduktion der Kristalle schwierig war und in der Zeit, während der die Struktur gelöst wurde, keine Röntgenanlage in der Abteilung zur Verfügung stand, um eine große Anzahl von Kristallen für multiplen isomorphen Ersatz (MIR) zu testen, wurde die Methode der anomalen Dispersion mit Selenomethionin zum Lösen der Struktur gewählt. Selen ist ein sehr gut anomal streuendes Element, und durch die Tatsache, dass es über Selenomethionin an definierten Stellen im Protein eingebaut werden kann, ist die Phasierung einer Struktur über die anomale Dispersion von Selen über die letzten Jahre zu einer beliebten

Methode geworden (Hendrickson and Ogata, 1997). Voraussetzung für die Aufnahme von Daten anomal streuender Elemente ist eine Anlage mit variabler Wellenlänge (Drenth, 1994). Durch den Bau neuer Synchrotrons und den Ausbau bestehender Synchrotrons, bei denen durch die neue Technik auch eine weniger fehlerbehaftete Datensammlung möglich ist, wurden in den letzten Jahren die Bedingungen für die Phasierung über anomale Dispersion sehr verbessert (Hendrickson, 1999).

AFR sollte mit seinen neun Methioninen auf 333 Aminosäuren bei einer Substitution zu Selenomethionin ein ausreichend starkes anomales Signal zur Phasierung liefern. Es wurde daher Selenomethionin substituiertes Protein in *E. coli* exprimiert, gereinigt (Kühn, 2004) und kristallisiert (siehe 4.1.1). Die Datenaufnahme erfolgte an der Strahlungsquelle X06SA an der SLS (*Swiss Light Source*, Paul-Scherrer-Institut, Villigen Schweiz). An dieser Strahlenquelle war es möglich, die Wellenlänge zu variieren und Daten zur anomalen Dispersion aufzunehmen. Je nach Anzahl der Datensätze unterscheidet man zwischen SAD (*single anomalous diffraction*) oder MAD (*multiple anomalous diffraction*). Auf der einen Seite sind bei MAD durch die Aufnahme bei unterschiedlichen Wellenlängen mehr anomale Daten vorhanden. Dazu kommen durch den Vergleich der Daten bei unterschiedlichen Wellenlängen dispersive Differenzen, die neben den anomalen Differenzen zur Phasierung hinzugezogen werden können. Auf der anderen Seite kommt es bei langen Datenaufnahmen mit dem gleichen Kristall zu Strahlschaden (siehe 3.2.3), der die Datenqualität verschlechtert. Es kann daher sinnvoll sein, nur einen Datensatz zur Phasierung zu verwenden, der noch keinen oder einen sehr geringen Strahlschaden aufweist und bei dem die Intensitäten der Reflexe akkurat gemessen worden sind. Die Struktur von AFR wurde über SAD gelöst. Zur Bestimmen der Wellenlänge zur Aufnahme des Datensatzes wurde ein Röntgenfluoreszenzspektrum vom Kristall aufgenommen, und das Fluoreszenzmaximum mit dem Programm CHOOCH (Evans and Pettifer, 2001) bestimmt. Am Fluoreszenzmaximum (0.9788 Å) wurden die Daten aufgenommen und mit dem Programm MOSFLM prozessiert (Leslie, 1992). Selenomethionin substituiertes AFR kristallisierte in der Raumgruppe  $P2_1$  (Hahn, 2002) mit den Zellparametern  $a=97.24$  Å,  $b=86.40$  Å,  $c=153.26$  Å und  $\beta=96.93$  °. Der Vergleich symmetrieäquivalenter Reflexe (Drenth, 1994) ergab einen  $R_{\text{sym}}$  von 9.2 % (Tabelle 2, Datensatz afr38-wl). Eine genaue Angabe über die Anzahl der AFR Moleküle pro asymmetrischer Einheit durch eine Analyse des Matthews Koeffizienten (Matthews, 1968) lies sich zu diesem Zeitpunkt nicht machen. Bei einer Annahme von fünf bis acht Proteinmolekülen pro asymmetrische Einheit lag der Wassergehalt im Kristall zwischen 42 % und 63 %, Werte die in Proteinkristallen als „normal“ anzusehen sind.

Im folgenden Schritt mussten die Positionen der anomal streuenden Selen Atome im Kristall gesucht werden. Die dazu verwendeten Programme gehörten zum SHELX Programmpacket und wurden über die graphische Benutzeroberfläche HKL2MAP (Pape and Schneider, 2003) gesteuert. SHELXC (Sheldrick, 2003) bestimmte die anomalen Differenzen und legte sie in einer Datei ab. Aus den anomalen Differenzen konnte SHELXD (Schneider and Sheldrick, 2002) eine Substruktur der Selenatome bestimmen. Die potentiellen Lösungen wurden von SHELXD mit einem Korrelationskoeffizienten bewertet. Der Korrelationskoeffizient der richtigen Lösung lag bei 44 %, während die falschen Lösungen einen Korrelationskoeffizienten von 17 bis 22 % aufwiesen. Die initialen Positionen wurden mit dem Programm SHELXE verfeinert. Dazu wurden aus den Schweratompositionen mittels SHELXE die Phasen der Daten errechnet und eine Dichte-Modifikation durchgeführt (Sheldrick, 2002). Ferner konnte durch diese Dichte-Modifikation das Händigkeitsproblem gelöst werden. Die Lösung, die über anomale Dispersion bestimmt wurde, bedingt einen zweiten Satz an anomal streuenden Positionen, die sich zu den gefundenen Positionen wie Bild und Spiegelbild verhalten. Während der Korrelationskoeffizient der richtigen Lösung nach der Dichte-Modifikation auf 64 % anstieg, fiel der Korrelationskoeffizient des Spiegelbildes auf 35 % ab.

Die eigentliche Phasierung wurde mit dem Programm SHARP/autoSHARP durchgeführt (de La Fortelle and Bricogne, 1997). Dieses Programm ist zwar generell auch in der Lage, die Positionen der anomal streuenden Elemente zu finden, mit den anomalen Daten von afr38-wl, war SHARP/autoSHARP allerdings nicht in der Lage die Selenpositionen zu finden. Es musste daher der oben beschriebene „Umweg“ über SHELX gegangen werden, um die Selenpositionen zu bestimmen. Mit den in SHELXE verfeinerten Selenpositionen war SHARP/autoSHARP in der Lage den Datensatz afr38-wl zu phasieren. Die *phasing power* nach vier Runden SHARP betrug 0.915. Daran anschließend führte SHARP/autoSHARP eine Dichte-Modifikation mit 48 % Lösungsmittelgehalt durch an dessen Ende ein Korrelationskoeffizient von 65 % stand. In der aus den phasierten Daten errechneten Elektronendichtekarte (siehe 3.3.12) konnte an vielen Stellen die Hauptkette erkannt und verfolgt werden. Seitenketten konnten anhand der Elektronendichte meist noch nicht zugeordnet werden.

Erste Schritte im Modellbau wurden mit dem Programm RESOLVE und dessen automatischer Modellbaufunktion vorgenommen (Terwilliger, 2003a; Terwilliger, 2003b; Terwilliger, 2003c). RESOLVE war in der Lage Fragmente in die phasierte Elektronendichte zu bauen. Aufgrund struktureller Homologien von AFR zu GFOR konnten sechs AFR

Moleküle in den Fragmenten erkannt werden. Allerdings waren auch bei vielen Fragmenten die Seitenketten falsch zugeordnet, oder die Kette zeigte in die falsche Richtung.

Über den Server SwissModell (<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>) (Peitsch, 1995; Guex and Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003) wurde ein Homologiemodell von GFOR mit der Sequenz der AFR erstellt (siehe 3.3.8). Über das von RESOLVE generierte Modell konnten per Hand die sechs Monomere des GFOR Homologiemodells gelegt werden. Erste Verfeinerungsschritte durch *rigid body refinement* und Energieminimierung mit REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) (siehe 3.3.9) führten zu einem *R*-Faktor von 48.5 % und einem freien *R*-Faktor von 49.2 % (Brunger, 1997). Auch nach diesen ersten Verfeinerungsschritten war zu erkennen, dass viele Bereiche des GFOR Homologiemodells noch nicht richtig in der Elektronendichte zu liegen kamen. Im folgenden Schritt wurden die C<sub>α</sub> Atome des Homologiemodells manuell am Bildschirm an die richtigen Positionen in der Elektronendichtekarte geschoben. Nach erneuter Verfeinerung durch *rigid body refinement* und Energieminimierung mit REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) fiel der *R*-Faktor auf 35.5 % und der freie *R*-Faktor auf 39.2 %. Danach wurden die Seitenketten mit der Hand an die richtige Position gedreht und Bereiche korrigiert, die in den vorigen Schritten noch nicht eindeutig der Elektronendichte zugeordnet werden konnte. Unterbrochen wurden diese Korrekturen immer wieder von Verfeinerungsschritten mit *simulated annealing* und Energieminimierung durch das Programm CNS (Brunger *et al.*, 1998). Am Ende dieser Verfeinerungsschritte fiel der *R*-Faktor auf 30.6 %, der freie *R*-Faktor auf 31.4 %.

In der F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>-Elektronendichtekarte noch uninterpretierte Elektronendichte konnte dem Cofaktor NADP<sup>+</sup> zugeordnet werden. Nach Einsetzen von NADP<sup>+</sup>, weiteren Modellierungen von Hand gefolgt von *simulated annealing* und Energieminimierung durch das Programm CNS (Brunger *et al.*, 1998) fiel der *R*-Faktor auf 26.9 % und der freie *R*-Faktor auf 29.3 %.

In allen Verfeinerungsschritten mit dem Datensatz afr38-wl sowie den berechneten Elektronendichtekarten wurden die aus dem Modell berechneten Phasen mit den experimentellen Phasen kombiniert. So konnte der Modelleinfluss beim Lösen der Struktur herabgesetzt werden. Der Modelleinfluss auf den freien *R*-Faktor wurde ausgeschlossen, indem darauf geachtet wurde, dass jedes Programm mit demselben Satz an Reflexen zur Berechnung des freien *R*-Faktors arbeitete (Kleywegt and Brunger, 1996).

#### 4.1.3.2 Verfeinerung der Struktur bei hoher Auflösung

In den folgenden Verfeinerungsschritten wurde auf einen Wildtyp-Kristall (WT-NADP<sup>+</sup>, afr61) zurückgegriffen. Die Kristallisationsexperimente wurden mit NADPH als Cofaktor angesetzt. Unter den gefundenen Kristallisationsbedingungen (pH 5.6) war allerdings die oxidierte Form des Cofaktors NADP<sup>+</sup> stabiler als die reduzierte Form NADPH (LOWRY *et al.*, 1961; Wong und Whitesides, 1981; Leonida, 2001). Aufgrund von Fluoreszenzexperimenten (siehe 4.1.2) und dem Vergleich mit der Struktur von Datensatz afr71, bei dem der Kristall zur vollständigen Oxidation des Cofaktors in Substrat getränkt wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass bereits ein Großteil des NADPH zu NADP<sup>+</sup> oxidiert wurde. Der Datensatz afr61 wurde daher mit NADP<sup>+</sup> als Cofaktor verfeinert. Von dem Kristall afr61 konnte an der Datenquelle ID14-2 am ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*, Grenoble Frankreich) ein Datensatz mit einer maximalen Auflösung von 2.2 Å aufgenommen werden (Tabelle 2). Die Prozessierung erfolgte mit XDS (Kabsch, 1993). Der Wildtyp von AFR kristallisierte wie die Selenomethionin substituierte AFR in der Raumgruppe P2<sub>1</sub> (Hahn, 2002). Die Zellparameter lagen mit a=96.93 Å, b=84.68 Å, c=150.35 Å und β=96.10 ° im gleichen Bereich wie bei dem Selenomethionin substituierten AFR-Kristall (Tabelle 2). Um den Modelleinfluss auf den freien R-Faktor auszuschließen (Brunger, 1997), wurden soweit möglich die gleichen Reflexe zur Berechnung des freien R-Faktors wie bei Datensatz afr38-wl gewählt. Für den hohen Auflösungsbereich wurden neue Reflexe zusätzlich ausgewählt.

Das Modell, das im letzten Verfeinerungsschritt des Datensatzes afr38-wl generiert wurde, diente als Startpunkt der Verfeinerung mit dem neuen Datensatz. Nach *rigid body refinement*, *simulated annealing* (Kirkpatrick *et al.*, 1983; Brunger *et al.*, 1990) und Energieminimierung mit dem Programm CNS (Brunger *et al.*, 1998) fiel der R-Faktor von anfänglich 40.0 % auf 30.4 %, und der freie R-Faktor fiel von 40.74 % auf 31.0 %

Im Folgenden wurden TLS-Gruppen zur Verfeinerung eingeführt (siehe 3.3.9) (Winn *et al.*, 2001). Diese TLS-Verfeinerung ermöglichte einen anisotropen Schwingungsanteil der TLS Gruppen in die Verfeinerung einfließen zu lassen. Als TLS-Gruppe wurde ein AFR Monomer gewählt, wodurch es somit zu einer Verfeinerung mit sechs TLS-Gruppen kam. Eine Energieminimierung mit diesen Gruppen durch das Programm REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) kombiniert mit weiteren Korrekturen von Hand ließen den R-Faktor auf 23.0 % und den freien R-Faktor auf 27.8 % fallen.

Bei der abschließenden Suche nach Lösungsmittelmolekülen mit ARP/WRAP (Perrakis *et al.*, 2001) konnten 1811 Wassermoleküle identifiziert werden. Außerdem wurde

noch uninterpretierte Elektronendichte in den aktiven Zentren als Acetationen interpretiert. Am Ende der Verfeinerung des Modells von AFR mit NADP<sup>+</sup>, Acetat und Wasser ergab sich ein *R*-Faktor von 17.3 % und ein freier *R*-Faktor von 24.6 % (Brunger, 1997).

#### 4.1.3.3 Verfeinerung nach vollständiger Oxidation des Co-Faktors

An der Röntgenquelle X06SA (SLS, *Swiss Light Source*, Paul-Scherrer-Institut, Villigen Schweiz) wurde ein Kristall gemessen, der vor dem Einfrieren in AF-Cryo-Lösung (siehe 4.1.1) getränkt wurde (Datensatz afr71, Tabelle 2). Fluoreszenzmessungen (siehe 4.1.2) ließen den Schluss zu, dass es sich hierbei um einen AFR Kristall mit vollständig oxidiertem Cofaktor handelte. Der Kristalle streute bis 2.4 Å. Die Prozessierung des Datensatzes WT-NADP<sup>+</sup>-AF (afr71) wurde mit dem Programm XDS (Kabsch, 1993) durchgeführt. Wie bei Kristall afr61 kristallisiert Kristall afr71 in der Raumgruppe P2<sub>1</sub> (Hahn, 2002) mit den Zellparametern  $a=96.69 \text{ \AA}$ ,  $b=86.28 \text{ \AA}$ ,  $c=152.28 \text{ \AA}$  und  $\beta=96.90^\circ$ . Die ähnlichen Zellparameter überraschten nicht, da eine Änderung der Kristallpackung in der kurzen Inkubationszeit in AF-Cryo-Lösung nicht zu erwarten war.

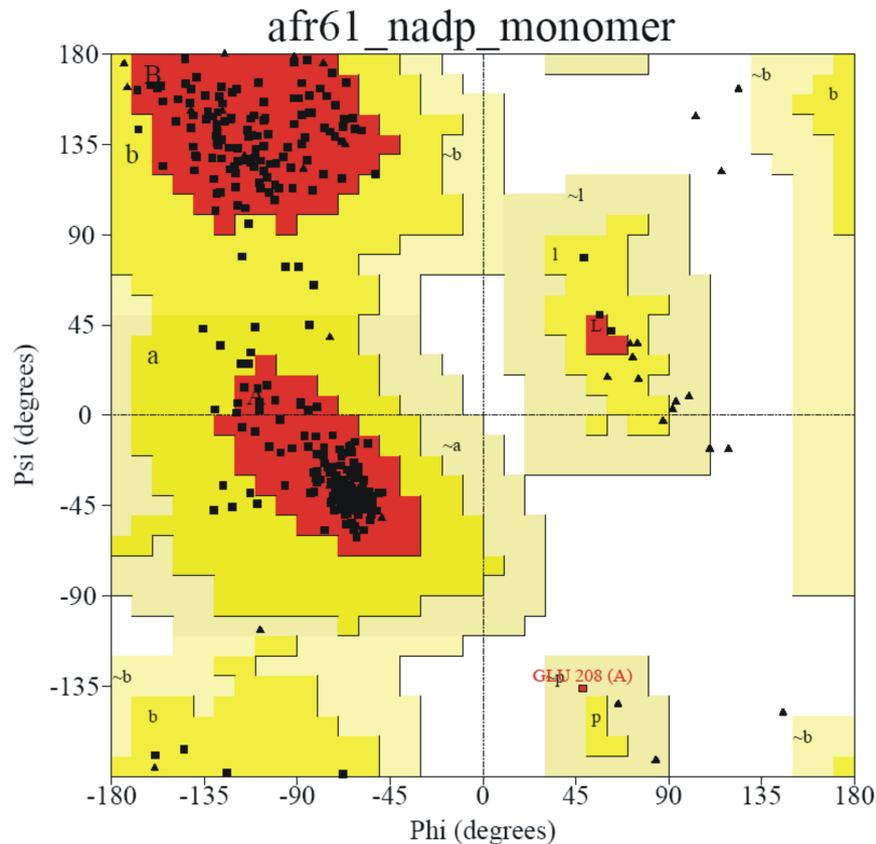
Als Startmodell zur Strukturaufklärung diente das Modell am Ende der Verfeinerung mit Datensatz afr61 ohne Lösungsmittelmoleküle. Die Verfeinerung lief analog zur Verfeinerung des Datensatzes afr61. Die abschließende Suche nach Lösungsmittelmolekülen ergab 1284 Wassermoleküle und endete bei einem *R*-Faktor von 17.3 % und einem freien *R*-Faktor von 24.5 % (Brunger, 1997).

Alle Daten zur Strukturaufklärung sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Statistiken der einzelnen Datensätze der AFR

<b>Datenstatistik</b>	WT-NADP <sup>+</sup> (afr61)	Se-Met (afr38-wl)	WT-NADP <sup>+</sup> -AF (afr71)
Beamline	Grenoble ID14-2	Villigen X06SA	Villigen X06SA
Temperatur (K)	100	100	100
Detektor	ADSC Q4 CCD	MarCCD	MarCCD
Wellenlänge (Å)	0.9771	0.9788	0.9793
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>
Zelldimensionen			
a (Å)	96.93	97.24	96.69
b (Å)	84.68	86.40	86.28
c (Å)	150.35	153.26	152.28
β (°)	96.10	96.93	96.90
maximale Auflösung (Å)	2.20	2.60	2.40
maximale Auflösungsschale	2.3-2.2	2.7-2.6	2.5-2.4
Anzahl der gemessenen Reflexe	1166141	580344	341689
Redundanz	9.8	3.8	3.7
$R_{\text{sym}}$ (%) <sup>1</sup>	7.7 (40.2)	9.2 (44.5)	8.2 (61.8)
$I/\sigma$ (I) <sup>1</sup>	10.8 (3.3)	11.3 (3.3)	16.1 (4.9)
$B$ -Faktor nach Wilson Plot (Å <sup>2</sup> )	39.8	44.4	46.7
Phasing Power (vor Dichte-Modifikation)		0.915	
FOM azentrisch/zentrisch (vor Dichte-Modifikation)		0.27/0.10	
<b>Verfeinerungsstatistik</b>			
Auflösungsbereich (Å)	120 – 2.2	120 – 2.6	120 – 2.4
Anzahl der einzigartigen Reflexe	118884	149896	90099
Vollständigkeit der Daten (%) <sup>1</sup>	96.6 (89.8)	99.6 (100)	97.3 (92.6)
$R$ -Faktor /freier $R$ -Faktor (%)	17.3/24.6	26.9/29.3	16.9/25.0
Ramachandran-Plot			
bevorzugt, erlaubte, großzügig (%)	90.8, 8.9, 0.4		
r.m.s.d. auf Bindungslängen (Å)	0.027		0.017
r.m.s.d. auf Bindungswinkel (°)	2.1		1.72
$B$ -Faktor und r.m.s.d. (Å <sup>2</sup> )	38.9		46.2

<sup>1</sup> Werte in Klammern entsprechen der maximalen Auflösungsschale

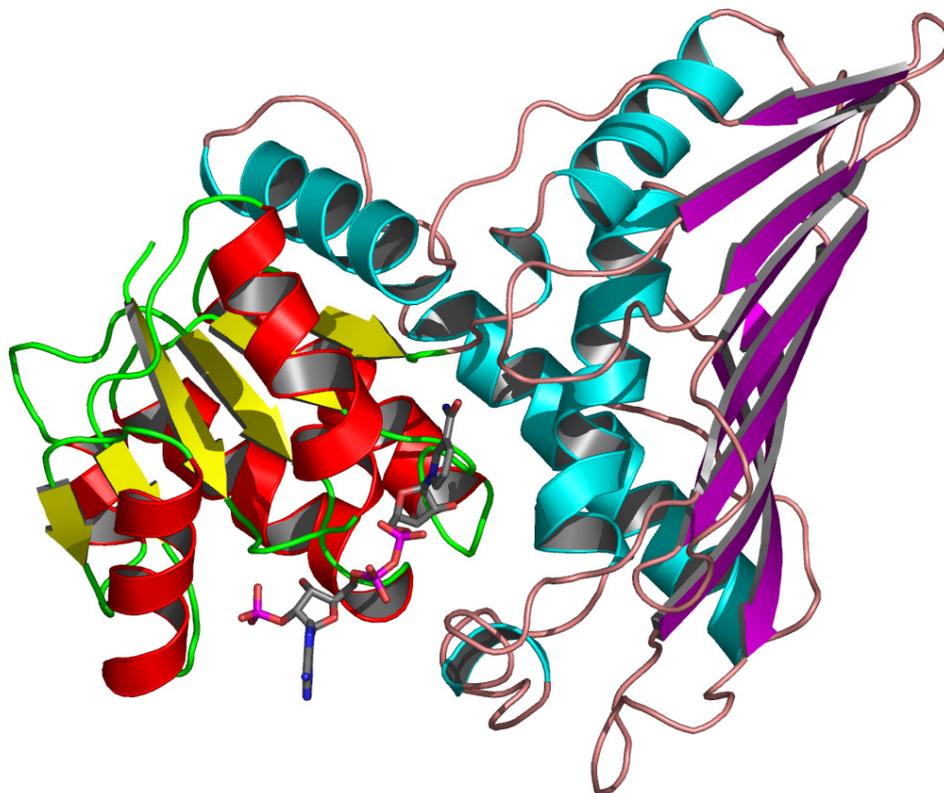


**Abbildung 20:** Ramachandran-Plot (Ramakrishnan und Ramachandran, 1965) von AFR. In diesem Plot werden die Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  gegeneinander aufgetragen. Aus sterischen Gründen sind für nicht-Glycinreste nur bestimmte Kombinationen erlaubt. Die roten Bereiche beschreiben die favorisierten Bereiche, erlaubte Bereiche sind gelb markiert, großzügig erlaubte Bereiche sind beige markiert, verbotene Bereiche sind weiß markiert. Winkelkombinationen, die von  $\alpha$ -Helices eingenommen werden können sind mit A, a und  $\sim a$  bezeichnet,  $\beta$ -Faltblattbereiche sind mit B, b und  $\sim b$  bezeichnet, linksgängige Helices sind mit L, l und  $\sim l$  bezeichnet und  $\pi$ -helikale Bereiche sind mit p und  $\sim p$  bezeichnet. (■) kennzeichnen nicht-Glycinreste, während (▲) Glycinreste beschreiben. Die Analyse der Torsionswinkel und die Darstellung im Ramachandran-Plot erfolgten mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

Neben den  $R$ -Faktoren diente auch der Ramachandran-Plot (Abbildung 20) als Qualitätskontrolle der Struktur (Ramakrishnan and Ramachandran, 1965). Für die darin aufgetragenen Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  der Hauptkette sind aus sterischen Gründen nur bestimmte Bereiche erlaubt (Morris *et al.*, 1992; Kleywegt und Jones, 1996a). Glycinreste haben diese Beschränkung aufgrund der fehlenden Seitenkette nicht. Für die verfeinerte Struktur des Datensatzes afr61 wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) der Ramachandran-Plot dargestellt. Bei dieser Struktur liegen 90.8 % in den favorisierten Bereichen (rot), 8.9 % in den erlaubten Bereichen (gelb) und 0.4 % in den großzügig erlaubten Bereichen (beige). Diese Werte können für eine Struktur mit einer Auflösung von 2.2 Å und einem freien  $R$ -Faktor von 24.6 % als normal angesehen werden (Kleywegt and Jones, 1996a).

#### 4.1.4 Allgemeine Struktur

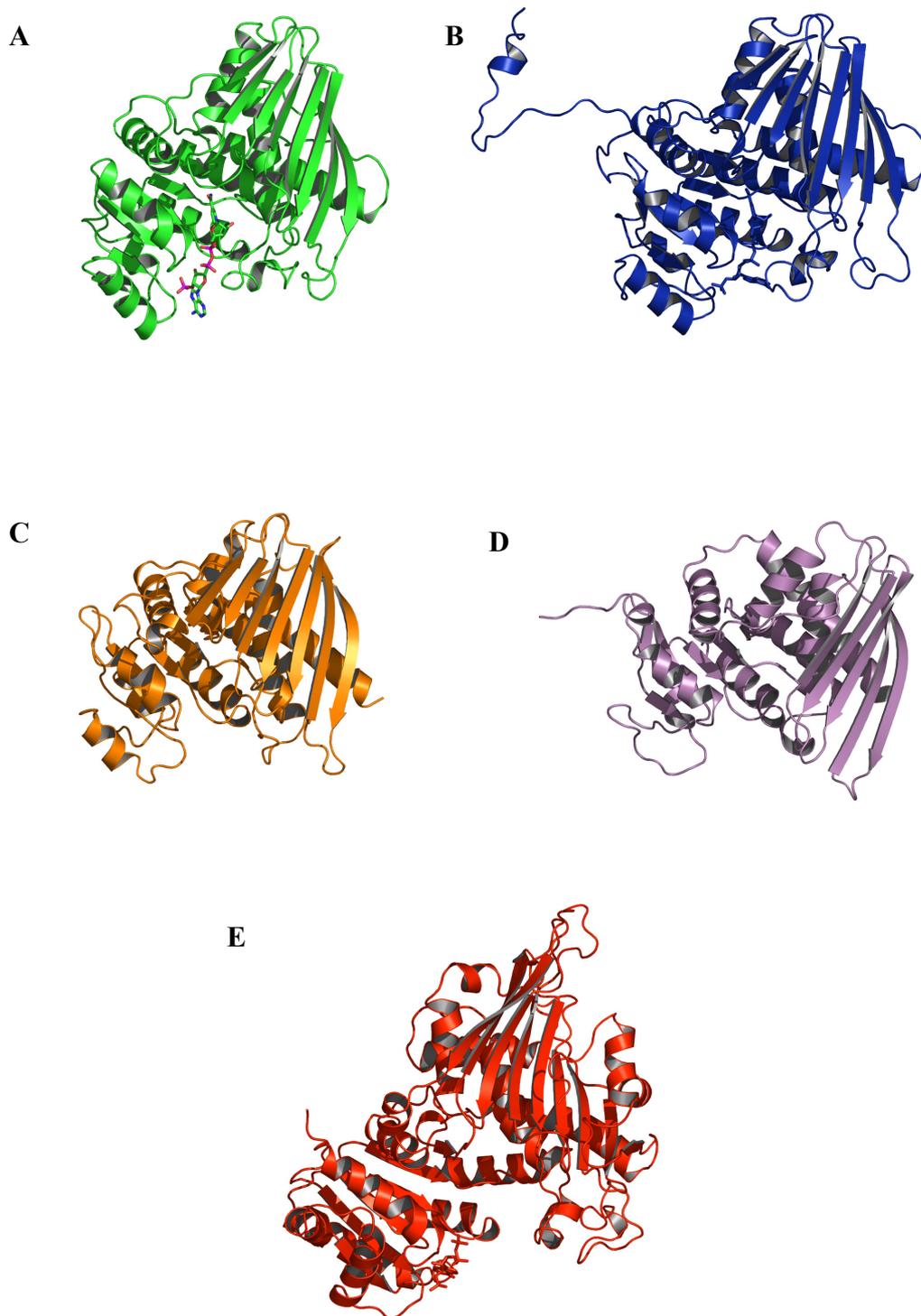
AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. kristallisierte in Gegenwart von Cofaktor NADPH in der Raumgruppe  $P2_1$  (Hahn, 2002) mit den Zellparametern  $a=96.93$ ,  $b=84.68$ ,  $c=150.35$  und  $\beta=96.10$ . Fluoreszenzexperimente (siehe 4.1.2) ließen den Schluss zu, dass während der Kristallisation ein Großteil des eingesetzten NADPH bereits zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert wurde und somit in der Kristallstruktur  $\text{NADP}^+$  zu sehen war. Pro asymmetrische Einheit waren sechs Monomere AFR zu finden, die als Dimere arrangiert waren. Auf diese Dimerenbildung wird später in diesem Kapitel näher eingegangen. Die r.m.s.d. aller Atome der Moleküle B bis F auf das Molekül A war ca.  $0.4 \text{ \AA}$ , was bedeutete, dass die sechs Moleküle nahezu identische Konformation besitzen. Im Folgenden wird daher nur noch Molekül A näher diskutiert. In der Kristallstruktur konnten den Aminosäuren 2-333 durchgehend Elektronendichte zugeordnet werden. Neben den Aminosäuren konnten jedem Molekül AFR ein Molekül  $\text{NADP}^+$  und je ein Acetat-Molekül im aktiven Zentrum Elektronendichte zugeordnet werden. Auf die Cosubstratbindung und das aktive Zentrum wird später näher eingegangen (siehe 4.1.6 und 4.1.7).



**Abbildung 21:** Struktur von AFR. AFR besteht aus einer N-terminalen Domäne mit Rossmann-Faltung (rote Helices, gelbes  $\beta$ -Faltblatt) und einer C-terminalen Domäne (türkisene Helices, violettes  $\beta$ -Faltblatt). Zwischen den zwei Domänen bindet  $\text{NADP}^+$  (Stäbchen Darstellung) in einer tiefen Tasche.

In Abbildung 21 sind die Sekundärstrukturelemente von einem Monomer AFR dargestellt. AFR besteht aus zwei strukturellen Domänen, zwischen denen in einer tiefen Spalte die Dinucleotid-Bindungstasche und das aktive Zentrum liegen. Die N-terminale Domäne (Reste 1-120) zeigt ein typisches  $\alpha/\beta$  Dinucleotid-Bindungsmotiv, eine so genannte Rossmann-Faltung (Buehner *et al.*, 1973). Die größere C-terminale Domäne (Reste 121-333) hat ebenfalls  $\alpha/\beta$ -Struktur und zeigt strukturelle Homologien zu Mitgliedern der Familie der Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-ähnlichen Proteine (Buehner *et al.*, 1974b) in der SCOP Datenbank (Brenner *et al.*, 1996). Proteine dieser Familie liegen häufig als Dimere oder Tetramere vor, wobei das begrenzende  $\beta$ -Faltblatt einen wichtigen Kontakt zwischen zwei Monomeren darstellt. Eine DALI Suche (Holm und Sander, 1993) nach verwandten Strukturen in der PDB-Datenbank (Berman *et al.*, 2000) ergab die größten Homologien zu GFOR (PDB-Code 1OFG, *Z-Score* 38.7), einer möglichen Oxidoreduktase (1TLT, 30.9) und Biliverdin-IX $\alpha$ -Reduktase (1GCU, 25.1). Ein Sequenzvergleich zeigte trotz der engen strukturellen Homologie (Abbildung 22) eine eher geringe Identität der Primärstruktur (Abbildung 23). Vor allem in der C-terminalen Domäne waren die Sequenzhomologien so gering, dass Programme wie T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) oder ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), die ausschließlich Sequenzen vergleichen können, keine guten Ergebnisse lieferten. Für den Sequenzvergleich (Abbildung 23) wurde auf einen strukturbasierten Vergleich mit dem Programm SEQUOIA (Bruns *et al.*, 1999) zurückgegriffen. Die Ergebnisse der DALI Analyse (Holm and Sander, 1993) sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Eukaryontische AFR (Sakuma *et al.*, 1998; Konishi *et al.*, 2000) und die hier betrachtete AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. besitzen wahrscheinlich keine strukturellen Homologien. Während das bakterielle Enzym eine Rossmann-Faltung besitzt, hat die eukaryontische AFR Homologien zu verschiedenen Proteinen der Proteinfamilie der Aldose-Reduktase (Harrison *et al.*, 1994) und besitzt wahrscheinlich dessen charakteristischen  $\alpha/\beta$ -Fass Faltung (Triosephosphat-Isomerase-Fass, TIM-barrel) (Jez *et al.*, 1997).

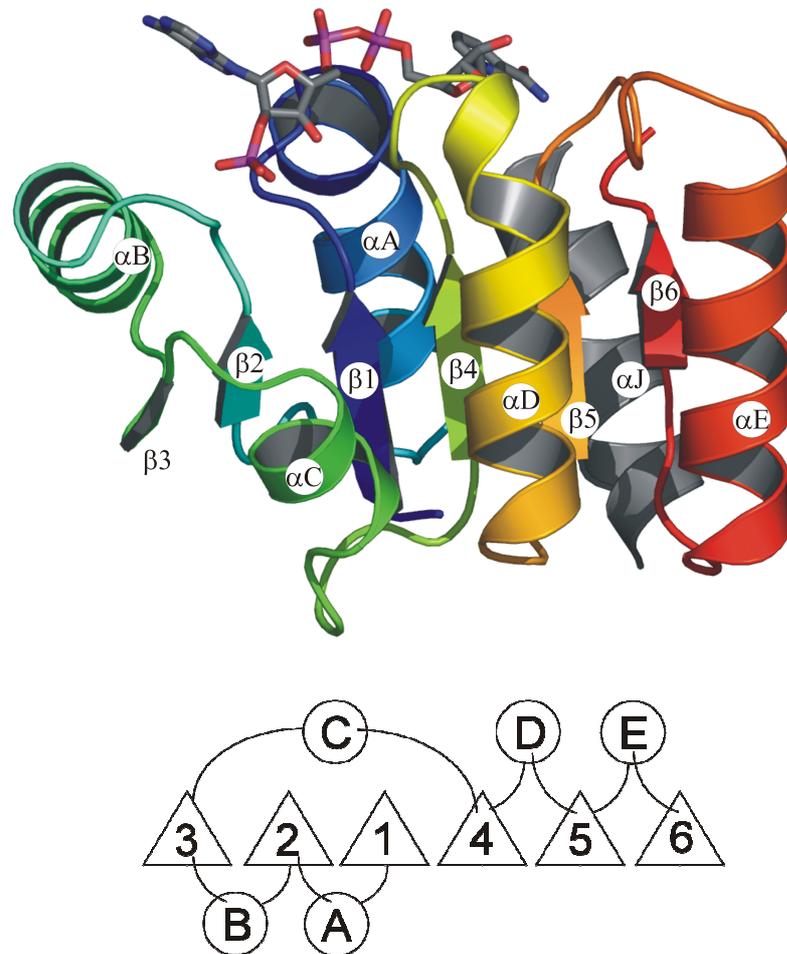


**Abbildung 22:** Strukturvergleich der Proteine mit den engsten strukturellen Homologien zu AFR (A). Obwohl die Sequenzen zu GFOR (10FG, B), einer potentiellen Oxidoreduktase aus *E. coli* (1TLT, C), Biliverdin-IX $\alpha$ -Reduktase (1GCU, D) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1DPG, E) sehr unterschiedlich sind (Abbildung 23, Tabelle 3), sind die Strukturen sehr ähnlich.



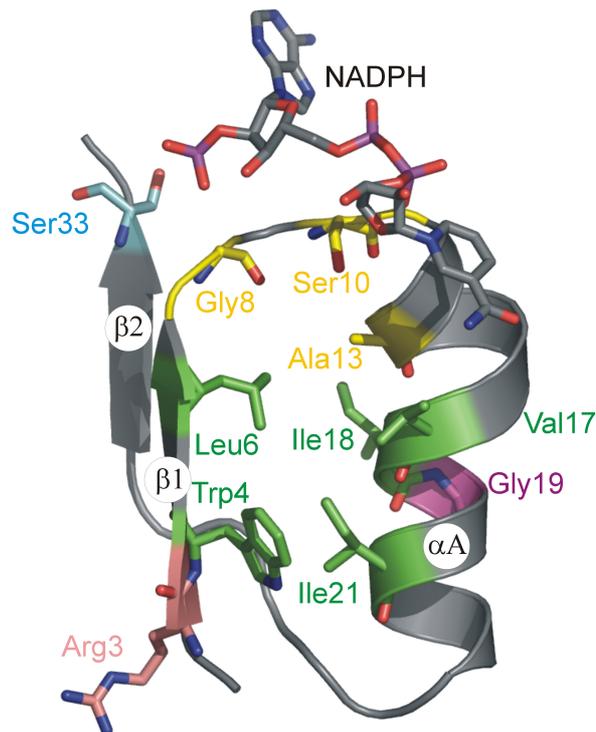
#### 4.1.4.1 Dinucleotid-Bindungsdomäne

Wie oben erwähnt, weist die N-terminale Domäne ein typisches Dinucleotid-Bindungsmotiv auf. Dieses besteht aus zwei  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$  Motiven (Abbildung 24), die ein sechssträngiges paralleles  $\beta$ -Faltblatt bilden umgeben von insgesamt sechs Helices. Vier Helices ( $\alpha A$ ,  $\alpha B$ ,  $\alpha D$ ,  $\alpha E$ ) stammen dabei aus den  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$  Motiven, Helix  $\alpha C$  verbindet die zwei Motive und eine sechste Helix ( $\alpha J$ ) kommt aus der C-terminalen Domäne. AFR folgt der klassische Rossmann-Faltung (Abbildung 24) und startet in der Mitte des  $\beta$ -Faltblatts mit dem ersten  $\beta$ -Strang ( $\beta 1$ ) und bewegt sich dann nach links ( $\beta 2$  und  $\beta 3$ ). Die Verbindung zwischen den Strängen  $\beta 1$ - $\beta 2$  und  $\beta 2$ - $\beta 3$  erfolgt durch die Helices  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ . Diese beiden Helices liegen auf der gleichen Seite des  $\beta$ -Faltblatts. Vom C-Terminus von  $\beta 3$  bewegt sich die Kette über Helix  $\alpha C$  zurück zur Mitte des  $\beta$ -Faltblatts zum Start des zweiten  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$  Motivs. Das zweite Motiv läuft analog dem ersten Motiv nach rechts. In der zweiten Hälfte komplettieren die  $\beta$ -Stränge  $\beta 4$ - $\beta 6$ , die über zwei weitere Helices ( $\alpha D$  und  $\alpha E$ ) verbunden sind, das sechssträngige parallele  $\beta$ -Faltblatt. Zwischen den Motiven entsteht so eine pseudo-zwei-zählige Achse (Bellamacina, 1996).



**Abbildung 24:** Die N-terminale Domäne (Reste 1-120) von AFR hat eine Rossmann-Faltung. Sie besteht aus einem zentralen  $\beta$ -Faltblatt, das auf jeder Seite von 3 Helices flankiert ist. Oben ist eine Ribbon-Darstellung gewählt, die die Sekundärstrukturelemente vom N-Terminus zum C-Terminus der Domäne in den Regenbogenfarben von blau nach rot einfärbt. Die Helix  $\alpha J$  stammt aus der C-terminalen Domäne. Das an AFR gebundene  $\text{NADP}^+$  wird als Stäbchen dargestellt. Unten ist die Rossmann-Faltungsdomäne topologisch dargestellt. Die sechs  $\beta$ -Stränge (Dreiecke) sind nach ihrem Erscheinen in der Primärstruktur durchnummeriert, die  $\alpha$ -Helices (Kreise) nach ihrem Erscheinen in der Primärstruktur mit den Buchstaben A-E bezeichnet.

Obwohl die Rossmann-Faltung in der Natur der Dinucleotid-bindenden Proteine weit verbreitet ist, unterscheiden sich die einzelnen Proteine doch stark in ihrer Primärstruktur. Dies führt sowohl zu Unterschieden in den Loop-Regionen, als auch zu zusätzlichen Sekundärstrukturelementen wie zum Beispiel zusätzliche Helices oder ein vergrößertes  $\beta$ -Faltblatt (Wierenga *et al.*, 1986). Trotz der niedrigen Sequenzhomologie zwischen Proteinen mit Rossmann-Faltung konnte von Rossmann (1974) und Bellamacina (1996) eine so genannte „Fingerprint-Region“ identifiziert werden, die vier konservierte Regionen mit Struktur-Funktions-Beziehung aufweist (Abbildung 25). Diese Fingerprint-Region ist ca. 30 bis 35 Aminosäuren lang und schließt die  $\beta$ -Stränge  $\beta 1$  und  $\beta 2$  und die verbindende Helix  $\alpha A$  ein (Abbildung 25). Bei AFR bilden die Reste 3 bis 33 die Fingerprint-Region.

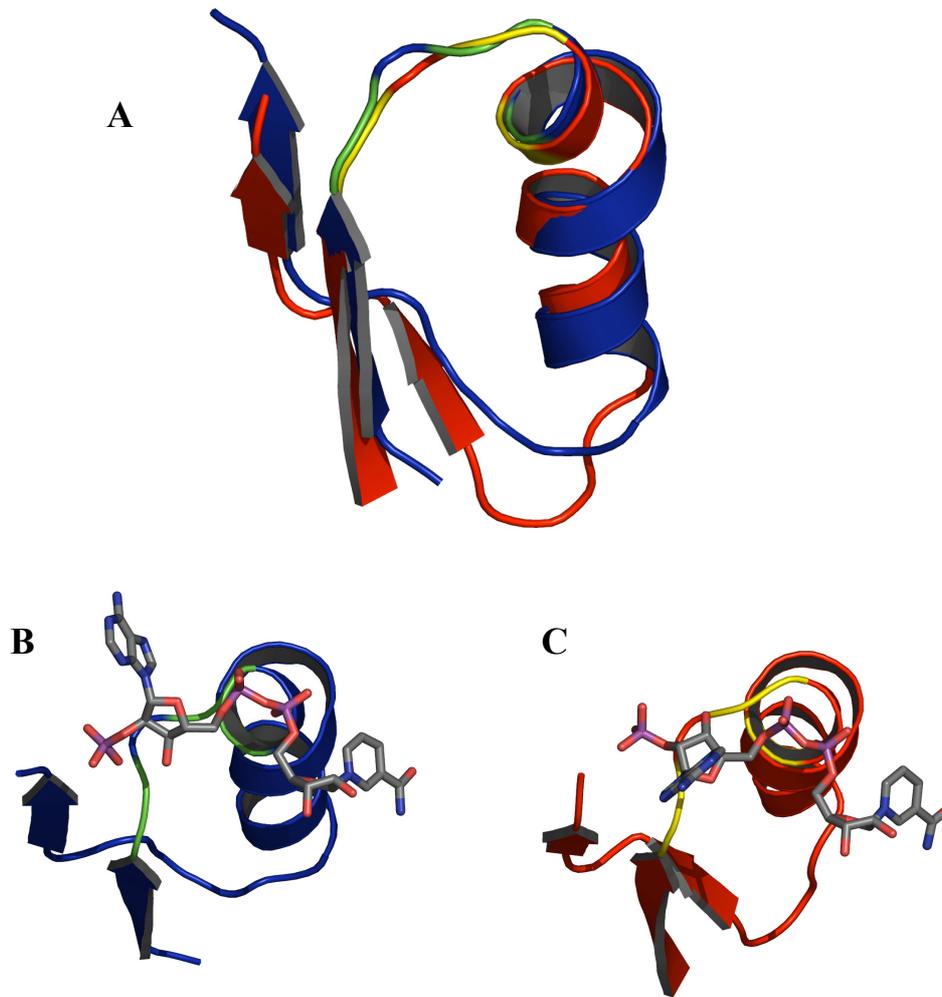


**Abbildung 25:** Fingerprint-Region am N-Terminus von AFR. Die vier beschriebenen Bereiche des Motivs sind rosa, grün, gelb und cyan gefärbt und die Aminosäuren als Stäbchen dargestellt. Gly19 (violett) ist wahrscheinlich für den Knick der Helix  $\alpha A$  verantwortlich. Das in der AFR gebundene  $\text{NADP}^+$  ist als Stäbchen in grau dargestellt.

Zentrales Motiv in der Fingerprint-Region ist bei NAD(H)- und NADP(H)-bindenden Proteinen eine Glycin-reiche Region zwischen  $\beta 1$  und  $\alpha A$  mit einer Konsensussequenz GXGXXG, wobei G für ein Glycin und X für jede beliebige Aminosäure stehen (Bellamacina, 1996). Die geringe Sequenzhomologie zwischen Dinucleotid-bindenden Proteinen führte zu einer Erweiterung der Konsensussequenz für verschiedene Proteinfamilien. So postulierte z. B. Jörnvall (1995) für die *Short Chain Dehydrogenase/Reductase* (SDR) Familie GXXXGXG als Konsensussequenz oder Hanukoglu und Gutfinger (1989) GXGXXA für NADP(H)-bindende Proteine. Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass im Bereich zwischen dem  $\beta$ -Strang  $\beta 1$  und dem N-Terminus der Helix  $\alpha A$  vermehrt Glycinreste auftauchen. Die ersten beiden Glycine liegen dabei direkt am Anfang und am Ende des Loops zwischen  $\beta 1$  und  $\alpha A$ . Der dritte Glycinrest ist auf Helix  $\alpha A$  lokalisiert und zeigt in Richtung  $\beta$ -Faltblatt. Bei AFR findet sich in dieser Region die Sequenz GASTIA (Reste 8-13, gelb, Abbildung 25). Lediglich der erste Glycinrest ist konserviert. An den Stellen des zweiten Glycinrestes findet sich ein Serinrest. Ala13 ist bei NADP(H)-bindenden Proteinen wiederum konserviert (Hanukoglu und Gutfinger, 1989).

Die Funktion der einzelnen konservierten Glycinreste in der Fingerprint-Region ist weitgehend verstanden (Wierenga *et al.*, 1985; Bellamacina, 1996). Das erste Glycin ist wichtig für eine enge Biegung des Loops zwischen  $\beta$ -Strang  $\beta 1$  und  $\alpha$ -Helix  $\alpha A$ ; es ist bei Proteinen mit Rossmann-Faltung weitgehend konserviert. Bei AFR sind die Torsionswinkel mit  $\varphi = 130^\circ$  und  $\psi = 135^\circ$  in einem Bereich, die von Aminosäuren mit Seitenketten nicht eingenommen werden können (Ramakrishnan and Ramachandran, 1965). Die Konformation des Loops wäre somit durch eine andere Aminosäure an dieser Stelle nicht zu erreichen.

Der zweite konservierte Glycinrest erlaubt aufgrund der fehlenden Seitenkette einen engen Kontakt zwischen der Protein Hauptkette und dem Pyrophosphat des Cofaktors (Bellamacina, 1996). Dadurch kann die negativ geladene Pyrophosphatgruppe mit dem positiven Ende des Helix-Dipols der Helix  $\alpha A$  in Wechselwirkung treten (Hol *et al.*, 1978). Bei NADP<sup>+</sup> bindendem 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (Phillips *et al.*, 1995) ist dieses Glycin durch Alanin ersetzt. Dadurch wird zwar die Faltung in der Loop-Region nicht beeinflusst, die Seitenkette verhindert jedoch eine Annäherung der Pyrophosphatgruppe an den N-Terminus der Pyrophosphat bindenden Helix (Phillips *et al.*, 1995). Im FAD bindendem Loop der NADPH-Peroxidase ist der zweite Glycinrest durch Serin ersetzt (Stehle *et al.*, 1991). Auch bei AFR ist an Stelle des zweiten Glycinrestes ein Serin zu finden. Übereinander legen der Strukturen von AFR und GFOR zeigt, dass ein Serinrest direkt vor  $\alpha$ -Helix  $\alpha A$  nur wenig Einfluss auf die Konformation des Loops hat (Abbildung 26 A). Durch die Seitenkette wird jedoch verhindert, dass die Pyrophosphatgruppe direkt über der Helix zu liegen kommt (Abbildung 26 B und C). Der Gly $\rightarrow$ Ser Austausch an Position 10 von AFR hat wahrscheinlich Einfluss auf die Stärke der Substratbindung und eventuell auch auf die Substratspezifität für NADPH, was aber durch Mutationsstudien hinterfragt werden müsste.



**Abbildung 26:** Übereinandergelagerte Fingerprint-Regionen der homologen Enzyme AFR (blau) und GFOR (rot). Die Positionen Gly8, Ser10 und Ala13 bei AFR sind grün eingefärbt, bei GFOR sind die analogen Positionen des GXGXXA Motivs Gly38, Gly40 und Ala43 gelb eingefärbt. (A) Die Loop-Region zwischen Faltblatt  $\beta 1$  und  $\alpha A$  hat trotz der unterschiedlichen Primärstruktur beider Proteine eine sehr ähnliche Faltung. Durch die Seitenkette Ser10 bei AFR (B) wird verhindert, dass die Pyrophosphatgruppe genau über der Helix zu liegen kommt. Bei GFOR (C) ist am Ende des Loops Gly40 zu finden. Dadurch kann die Pyrophosphatgruppe direkt über der Helix positioniert werden. Die Regionen wurden mit dem Programm MAPS übereinander gelegt (Zhang *et al.*, 2003).

Der dritte Glycinrest ist bei NAD(H)-bindenden Proteinen für eine dichte Packung zwischen den Sekundärstrukturelementen  $\beta 1$  und  $\alpha A$  wichtig. Bei AFR, aber auch bei anderen NADP(H)-bindenden Proteinen wie GFOR (Kingston *et al.*, 1996) oder Glutathion-Reduktase (Karplus und Schulz, 1989) findet sich an dieser Stelle ein Alaninrest (Hanukoglu und Gutfinger, 1989). Die Substitution des dritten Glycinrestes durch Alanin zerstört wahrscheinlich die dichte Packung zwischen  $\alpha$ -Helix  $\alpha A$  und dem  $\beta$ -Faltblatt. Dadurch wird die NADP(H)-Bindungstasche aufgeweitet und so Platz für die 2'-Phosphatgruppe geschaffen (Rao und Rossmann, 1973). Eine Mutation des Alanins an Position 13 zu Glycin hatte für AFR zur Folge, dass neben NADPH auch NADH als Cosubstrat eingesetzt werden konnte

(Kühn, 2004). Auf die Mutationen von AFR in der Fingerprint-Region wird ausführlich in Kapitel 4.1.6 eingegangen.

Die Kontaktfläche zwischen  $\alpha$ -Helix  $\alpha A$  und dem  $\beta$ -Strang  $\beta 1$  wird bei AFR von sperrigen hydrophoben Resten gebildet (Trp4, Leu6, Val17, Ile21; grün; Abbildung 25). Bei NAD(H)-bindenden Proteinen sind zwischen diesen Sekundärstrukturelementen kleine hydrophobe Reste zu finden, die einen engen Kontakt zwischen Helix und  $\beta$ -Faltblatt gewähren sollen (Bellamacina, 1996; Kleiger und Eisenberg, 2002). Die sperrigeren hydrophoben Reste in der AFR verhindern zusammen mit dem Rest Ala13 ein zu starkes Annähern von Helix und  $\beta$ -Faltblatt und schaffen so möglicherweise Platz für die 2'-Phosphatgruppe des von AFR bevorzugten Cofaktors NADPH.

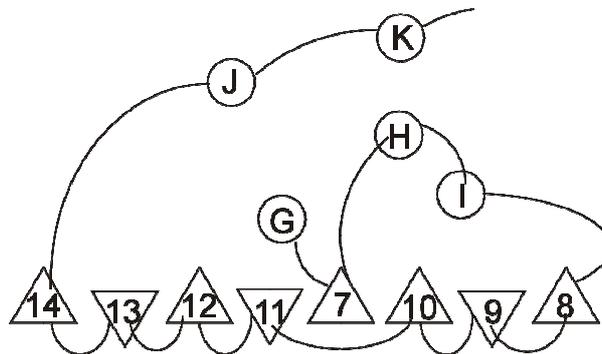
Am C-Terminus von  $\beta$ -Strang  $\beta 2$  ist bei NAD(H)-bindenden Proteinen ein saurer Rest konserviert. Dieses Aspartat oder Glutamat bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zur 2'-Hydroxylgruppe der Adenin-Ribose. In AFR ist diese saure Aminosäure durch einen Serinrest ersetzt (Ser33, cyan, Abbildung 25), der mit der 2'-Phosphatgruppe in Wechselwirkung tritt. Auch in anderen NADP(H)-bindenden Proteinen wie Glutathion-Reduktase (Karplus and Schulz, 1989) oder GFOR (Kingston *et al.*, 1996) findet sich an dieser Stelle ein neutraler oder basischer Rest.

In  $\alpha$ -Helices addiert sich das Dipolmoment der Peptidbindung über die gerichtete Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (Hol *et al.*, 1978). Das positive Potential am N-Terminus der  $\alpha$ -Helix  $\alpha A$  wird bei Proteinen mit Rossmann-Faltung der Kompensation der negativen Ladung der Pyrophosphatgruppe zugeschrieben (Hol *et al.*, 1978; Wierenga *et al.*, 1985). In AFR zeigt die  $\alpha$ -Helix  $\alpha A$  einen Knick am N-terminalen Ende. Auch andere Proteine der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Familie wie GFOR (Kingston *et al.*, 1996), Aspartat- $\beta$ -semialdehyd-Dehydrogenase (ASADH (Hadfield *et al.*, 1999)) oder Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH, (Rowland *et al.*, 1994)) zeigen diesen Knick in der äquivalenten Helix. Dieser ist bei den genannten Proteinen auf einen Prolinrest in der Helix zurückzuführen, der das Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerk der  $\alpha$ -Helix unterbricht. Dadurch kommt es zu einer „Insertion“ eines zusätzlichen Restes in die Helix (Rowland *et al.*, 1994; Kingston *et al.*, 1996). Bei AFR befindet sich an der Stelle des Prolins ein Glycinrest. Dieser Knick bei AFR und den anderen Enzymen der GAPDH Familie ist erforderlich, damit die negativ geladene Pyrophosphatgruppe über der Helix  $\alpha A$  zu liegen kommt und so über eine Wechselwirkung mit dem positiv geladenen Ende des  $\alpha$ -Helix Dipol an AFR gebunden wird. Durch die zusätzliche Aminosäure in der zweiten Windung der Helix und den dadurch induzierten Knick in der Helix wird das Wasserstoffbrückenbindungs-

Netzwerk der  $\alpha$ -Helix unterbrochen, was den Dipolcharakter der Helix schwächt. In welchem Maße der Dipol durch diesen Knick gestört ist, lässt sich anhand der Struktur allerdings nicht sagen.

#### 4.1.4.2 C-Terminale Domäne

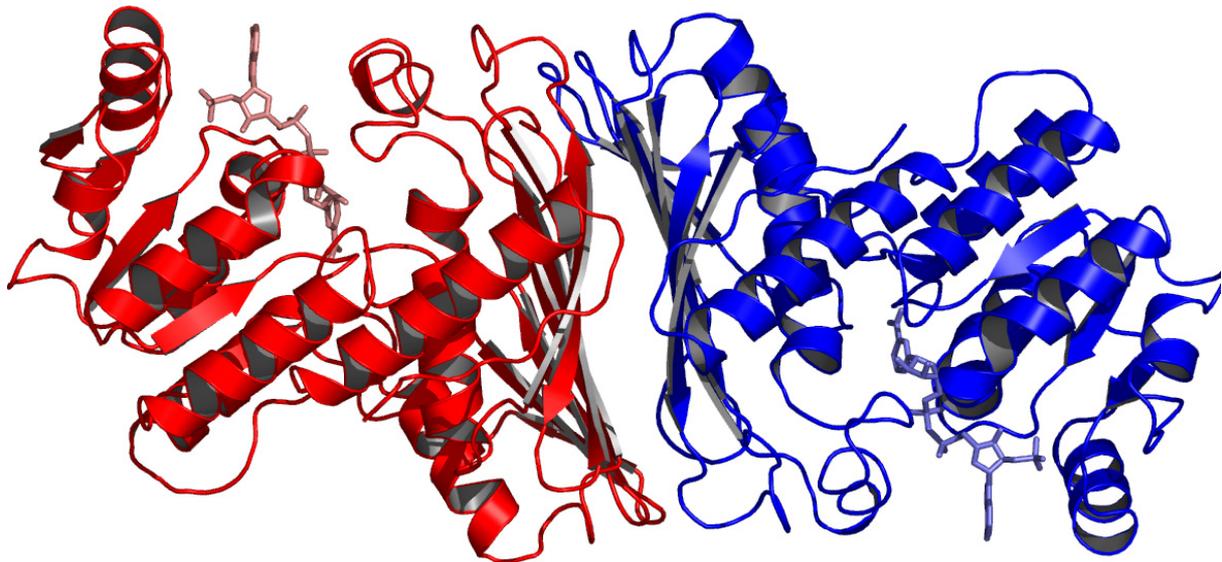
Abbildung 27 zeigt die Topologie der C-terminalen Domäne (Reste 121-333). Sie weist als charakteristisches Merkmal ein großes, meist antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt (violett in Abbildung 21) auf, das AFR auf einer Seite begrenzt. Neben diesem  $\beta$ -Faltblatt gehören fünf weitere  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ G- $\alpha$ K) zu dieser C-terminalen Domäne. Die Helices  $\alpha$ H und  $\alpha$ K liegen an der Spalte zwischen den beiden Domänen und partizipieren zum einen an der Cosubstrat- und Substratbindung und zum anderen beherbergen sie Aminosäurereste, die vermutlich an der Substratumsetzung beteiligt sind. Helix  $\alpha$ G interagiert mit dem C-terminalen  $\beta$ -Faltblatt, während Helix  $\alpha$ J, wie weiter oben beschrieben wurde, mit dem  $\beta$ -Faltblatt der N-terminalen Domäne in Wechselwirkung tritt.



**Abbildung 27:** Topologiediagramm der C-terminalen Domäne (Reste 121-333). Dominierendes Motiv ist das acht-strängige  $\beta$ -Faltblatt (Dreiecke), das AFR auf der einen Seite begrenzt. Die  $\beta$ -Stränge sind nach ihrem Vorkommen in der Primärstruktur von 7 startend durchnummeriert. Die  $\alpha$ -Helices (Kreise) liegen im inneren von AFR und sind mit den Buchstaben G bis K bezeichnet.

Strukturell verwandte Enzyme, die ebenfalls aus einer N-terminalen Rossmann-Faltungdomäne und einer C-terminalen GAPDH-Domäne mit begrenzendem  $\beta$ -Faltblatt bestehen (Buehner *et al.*, 1974a), liegen in der Zelle als Monomere, wie im Fall von Biliverdin-IX $\alpha$ -Reduktase (Whitby *et al.*, 2002), aber auch als Dimere oder Tetramere, wie G6PDH (Rowland *et al.*, 1994) bzw. GFOR (Kingston *et al.*, 1996) vor. Die Oligomerisierung bei diesen Molekülen erfolgt unter anderem über das C-terminale  $\beta$ -Faltblatt. Gelfiltrationsexperimente mit AFR in Abwesenheit von Cofaktor führten zu dem Ergebnis, dass AFR ohne NADP(H) als Monomer vorliegt (Kühn, 2004). In der Kristallstruktur, in Gegenwart von Cofaktor NADP<sup>+</sup> bilden sich Kristallkontakte über das C-terminale  $\beta$ -Faltblatt von AFR

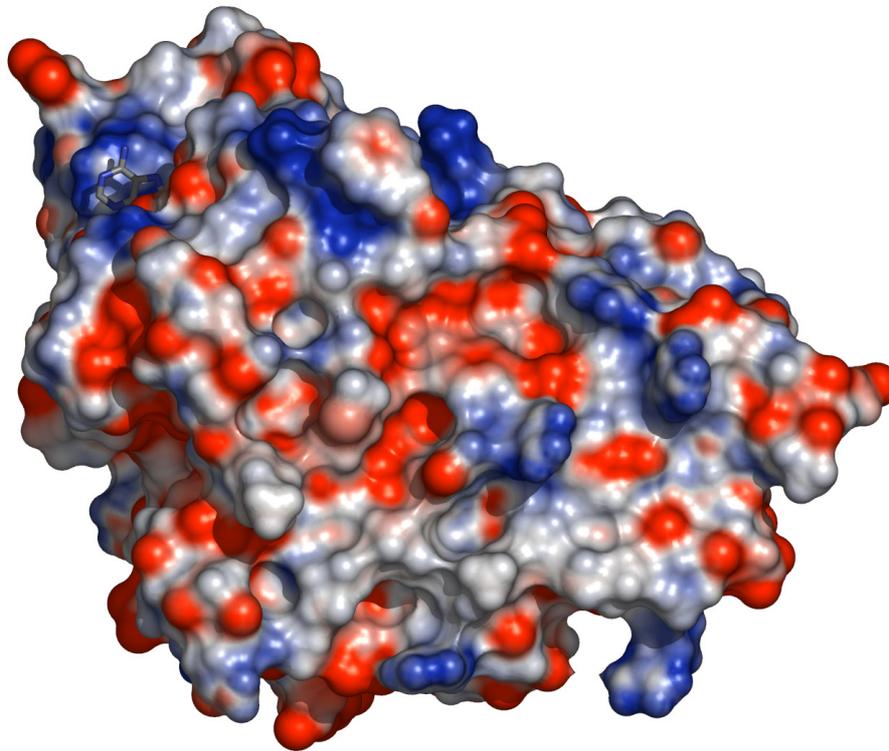
(Abbildung 28). Die Kontaktfläche konnte mit dem Programm AERIMOL (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) auf  $1800 \text{ \AA}^2$  berechnet werden (Lee und Richards, 1971), was etwa 13 % der Gesamtoberfläche von AFR ausmacht.



**Abbildung 28:** Ein Kristallkontakt von zwei Monomeren AFR wird über das große  $\beta$ -Faltblatt der C-terminalen Domäne gebildet. Die von diesem Kristallkontakt bedeckte Oberfläche beträgt  $1800 \text{ \AA}^2$  pro Molekül AFR. Die gemessenen AFR-Kristalle bestehen aus drei der „kristallographischen Dimere“. In Lösung liegt AFR jedoch als Monomer vor (Kühn, 2004).

Das große C-terminale  $\beta$ -Faltblatt ist auf der Innenseite hauptsächlich hydrophob, und steht in Kontakt mit den Helices  $\alpha G$ ,  $\alpha I$  und  $\alpha K$  der C-terminalen Domäne. Auf der Außenseite finden sich große geladene Reste, wie Arginin oder Glutamat, welche für Protein-Protein-Wechselwirkungen zunächst eher ungünstig sind (Abbildung 29). Diese Beobachtungen bekräftigen die Aussage, dass AFR in Lösung als Monomer vorliegt (Kühn, 2004). Zum einen geht durch deren Fixierung in der Kristallpackung im Gegensatz zur frei beweglichen Form Entropie verloren, zum anderen sind sie gewöhnlich in Lösung sehr gut solvatisiert, und es ist Energie notwendig, um diese Hydrathülle durch andere koordinierenden Moleküle wie zum Beispiel ein Protein zu ersetzen (Longenecker *et al.*, 2001; Derewenda, 2004). Handelt es sich dagegen um von der Natur gewollte Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen, können durch gezielte Wechselwirkungen zwischen geladenen Resten ein Energiegewinn bedeuten und die Komplexierung im Vergleich zum Monomer begünstigen. Bei der großen Kontaktfläche zwischen zwei AFR Molekülen über das C-terminale  $\beta$ -Faltblatt stellt sich die Frage, ob es sich um ein wirkliches Dimer oder lediglich um einen Kristallartefakt handelt.

Der Cofaktor liegt in einer tiefen Tasche zwischen den zwei Domänen. Zusätzlich wirkt der Loop zwischen Strang  $\beta 7$  und Helix  $\alpha H$  als „Deckel“ für diese Tasche. Zum Austausch des oxidierten Cofaktors muss dieser „Deckel“ angehoben werden, was eine Konformationsänderung von AFR zur Folge hat. Eine Konformationsänderung wurde auch für andere NADP(H)-bindende Proteine wie Dihydrofolat-Dehydrogenase oder ASADH beschrieben (Rimet *et al.*, 1991; Hadfield *et al.*, 2001; Naylor *et al.*, 2001). Diese Konformationsänderung bei Cofaktorbindung könnte Einfluss auf Dimerisierung haben. Bei Zugabe von NADP(H) könnten sich die Dimere bilden, die in der Kristallstruktur beobachtet werden. Umgekehrt könnte die Dimerisierung den Austausch des Cofaktors regulieren.

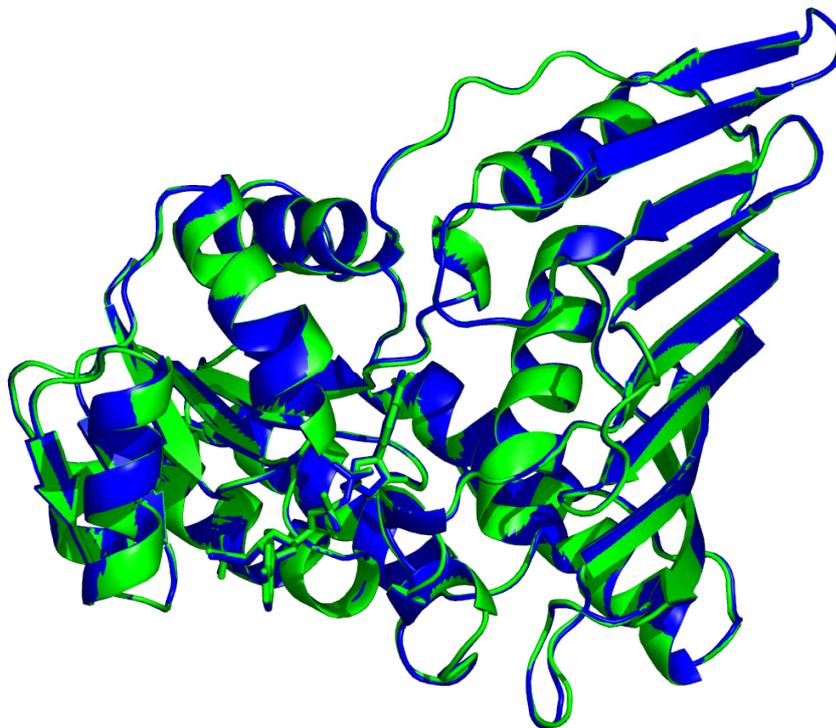


**Abbildung 29:** Elektrostatistische Potentialoberfläche des C-terminalen  $\beta$ -Faltblatts von AFR errechnet mit dem Programm APBS (Baker *et al.*, 2001) und dargestellt mit dem Programm PyMOL (DeLano, 2002). Positive Potentialbereiche sind blau dargestellt, negativ geladene Bereiche rot.

#### 4.1.5 Vollständig oxidierte AFR

Alle Kristalle der AFR, mit denen röntgenographische Untersuchungen vorgenommen wurden, wuchsen in Gegenwart von 0.5 mM NADPH (siehe 4.2.1). Zur Stabilisierung der Kristalle wurde auch der AFR-Cryo-Lösung 10 mM NADPH zugegeben (siehe 4.2.1). Im leicht sauren Bereich, wie bei den Kristallisationsbedingungen (pH 5.6) ist die reduzierte Form des Cofaktors NADPH im Vergleich zur oxidierten Form (NADP<sup>+</sup>) destabilisiert (Oppenheimer und Kaplan, 1974; Hentall *et al.*, 2001). Über Fluoreszenzexperimente konnte

gezeigt werden, dass im Kristall schon ein Großteil des Cofaktors in oxidiertem Form vorlag (siehe 4.1.2). Auch Zugabe von frischem NADPH durch die Cryo-Lösung konnte den Anteil von reduziertem Cofaktor nicht erhöhen. Durch Tränken der Kristalle in AF-Cryo-Lösung mit natürlichem Substrat (5 mM 1,5-AF in 100 mM tri-Natriumcitrat pH 5.6, 200 mM Ammoniumacetat, 30 % (w/v) PEG5000 MME, 7 % (v/v) Glycerin) konnte zudem über Fluoreszenzmessungen gezeigt werden, dass auch in kristallisierter Form eine Reduktionsreaktion katalysiert wird (siehe 4.1.2). In Abbildung 30 sind die Strukturen von mit 1,5-AF getränktem Kristall (grün) und ohne Substrat eingefrorenem Kristall (blau) übereinander gelegt. Die beiden Strukturen weisen eine r.m.s.d. für alle Atome von 0.364 auf, das heißt sie sind im Wesentlichen identisch. Die Kristallstruktur mit vollständig oxidiertem Cofaktor diente als weiterer Hinweis, dass im Laufe der Kristallisation schon ein Großteil des eingesetzten NADPH oxidiert worden war.



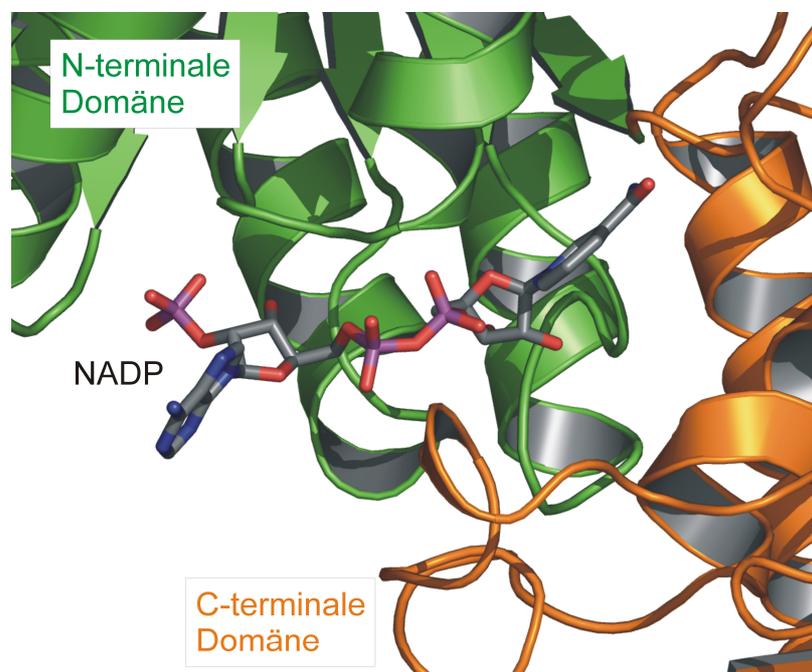
**Abbildung 30:** Vergleich der Strukturen von mit 1,5-AF getränktem AFR-Kristallen (grün) und unbehandelten Kristallen (blau). Die Strukturen sind mit einer r.m.s.d. für alle Atome von 0.346 nahezu identisch.

Das Ziel entweder das Substrat 1,5-AF oder das Produkt 1,5-Anhydro-D-mannitol (1,5-AM) im aktiven Zentrum zu binden konnte nicht realisiert werden. Bei der vollständig oxidierten Form von AFR war im vermuteten aktiven Zentrum, wie schon bei den

unbehandelten Kristallen, ein Acetat gebunden. Aktivitätsmessungen der AFR in Lösung ergaben in Acetatpuffer eine auf 1/4 abgefallene Reaktivität im Vergleich zu BIS-TRIS (Kühn, 2004). Es könnte daher sein, dass Acetat ähnlich an das aktive Zentrum bindet, wie das Substrat 1,5-AF und so das Enzym kompetitiv hemmt. Aufschlüsse darüber könnten weitere Kinetikmessungen oder das Entfernen von Acetat aus den Kristallen bringen.

#### 4.1.6 Dinucleotid-Bindung

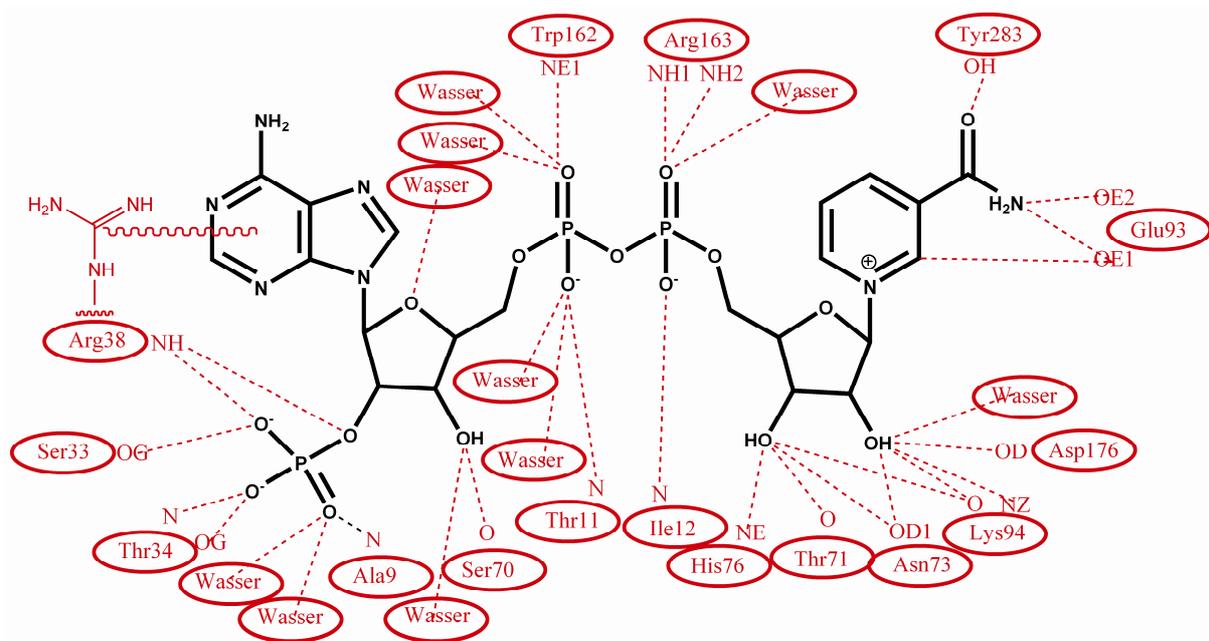
Kristalle von AFR wurden in Gegenwart von 0.5 mM NADPH kristallisiert. Die Elektronendichte zeigte zwischen der N-terminalen und C-terminalen Domäne deutlich zusätzliche Elektronendichte, die dem Cofaktor NADP(H) zugeordnet werden konnte. Fluoreszenzmessungen am Kristall ließen den Schluss zu, dass es sich dabei um oxidierten Cofaktor NADP<sup>+</sup> handelte. Dieser liegt in gestreckter Position in einer tiefen Tasche zwischen den Domänen. Der Adeninring und der Nicotinamidring sind jeweils in *anti*-Stellung bezüglich der glycosidischen Bindung zu finden. Die Sauerstoffatome der Pyrophosphatbrücke sind *stacked* angeordnet (Abbildung 31).



**Abbildung 31:** Die NADP(H)-Bindungstasche liegt zwischen der N-terminalen- und C-terminalen Domäne von AFR. NADP<sup>+</sup> wird von AFR in gestreckter Form gebunden. Die Basen liegen in *anti*-Stellung bezüglich ihrer glycosidischen Bindung zu den Riboseeinheiten

Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen NADP<sup>+</sup> und Protein sind in Abbildung 32 schematisch dargestellt. Zwischen NADP<sup>+</sup> und AFR bestehen 24 potentielle Wasserstoff-

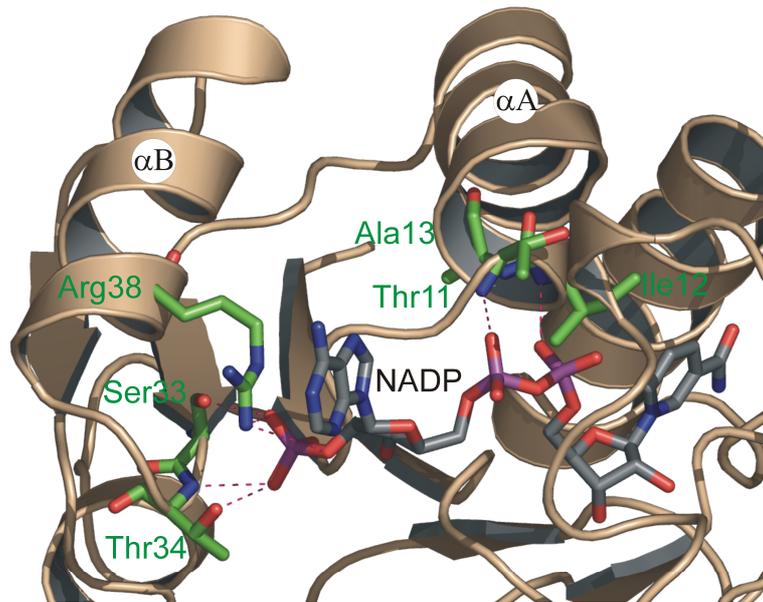
brückenbindungen und zusätzlich 10 weitere potentielle Wasserstoffbrückenbindungen zu geordneten Wassermolekülen. Im Vergleich zu anderen NADP(H)-abhängigen Dehydrogenasen ist die Anzahl der direkten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und Cofaktor sehr hoch. In Glutathion-Reduktase z. B. liegen lediglich 11 direkte Wasserstoffbrückenbindungen vor (Karplus and Schulz, 1989).



**Abbildung 32:** Wasserstoffbrückenbindungen zwischen NADP<sup>+</sup> und AFR. Der Cofaktor ist schematisch als Linien in schwarz dargestellt. Die Aminosäurereste bzw. Wassermoleküle, die Wasserstoffbrückenbindungen zu NADP<sup>+</sup> ausbilden sind in roten Ellipsen dargestellt. Die Atome, die Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, sind rot dargestellt, aber nicht eingekreist. Arg38 koordiniert die Adeningruppe über  $\pi$ -Wechselwirkungen.

#### 4.1.6.1 Bindung der ADP-Einheit

Die Sauerstoffatome der Pyrophosphatgruppe bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit Hauptkettenatomen der Reste Thr11 und Ile12 am N-Terminus der  $\alpha$ -Helix  $\alpha$ A (Abbildung 33). Eine wichtige Wechselwirkung wird über den Dipol der Helix  $\alpha$ A vermittelt. Eine solche Wechselwirkung zwischen N-terminalem Ende einer Helix und Substrat ist nicht unüblich. Auch andere Enzyme wie die Triosephosphat-Isomerase (TIM) (Alber *et al.*, 1981), Subtilisin (Drenth *et al.*, 1972) und Papain (Drenth *et al.*, 1976) besitzen Helices, die Substrate binden. In Aspartat-amino-Transferase (Kirsch *et al.*, 1984) und Glycogen-Phosphorylase (Johnson *et al.*, 1980) ist jeweils eine Helix an der Bindung der Phosphatgruppe des Pyridoxalphosphat beteiligt.



**Abbildung 33:** Die ADP-Einheit wird über diverse Wasserstoffbrückenbindungen an AFR gebunden. Thr11 und Ile12 binden über Hauptkettenatome an die Pyrophosphatgruppe von  $\text{NADP}^+$ . Ser33, Thr34 und Arg38 bilden eine Bindungstasche für die 2'-Phosphatgruppe der ADP-Ribose. Arg38 kompensiert mit seiner positiven Ladung teilweise die negative Ladung der Phosphatgruppe. Ala13 ist für den Kontakt der Helix  $\alpha\text{A}$  an das zentrale  $\beta$ -Faltblatt der Rossmann-Faltung verantwortlich und ist für die Cofaktorspezifität für  $\text{NADP(H)}$  wichtig.

Jede Peptideinheit einer Helix besitzt aufgrund der positiven Partialladung des Amidstickstoffs und der negativen Partialladung des Amidsauerstoffs ein Dipolmoment. Durch das regelmäßige Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen und der geregelten Orientierung der Dipole innerhalb der Helix addieren sich diese zu einem Dipolmoment mit etwa einer halben positiven Ladung am N-Terminus und einer halben negativen Ladung am C-Terminus (Hol *et al.*, 1978). Die positive Ladung am N-Terminus der  $\alpha$ -Helix kann so mit der negativen Pyrophosphatgruppe des  $\text{NADPH}$  in Wechselwirkung treten. Bei AFR weist die  $\alpha$ -Helix  $\alpha\text{A}$  einen Knick in der zweiten Windung auf (Abbildung 25). Dieser Knick wird durch eine zusätzliche Aminosäure in dieser Windung hervorgerufen. GFOR (Kingston *et al.*, 1996), ASADH (Hadfield *et al.*, 2001) oder G6PDH (Rowland *et al.*, 1994) zeigen einen ähnlichen Knick in der entsprechenden Helix. Bei diesen Enzymen wird das Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerk durch ein Prolin unterbrochen, was die Aufnahme einer zusätzlichen Aminosäure in die Helix ermöglicht. Bei AFR findet sich an analoger Position ein Glycinrest (Abbildung 25). Der Knick der Helix führt dazu, dass der N-Terminus der Helix auf die Pyrophosphatgruppe des Cofaktors zeigt. Durch diesen Knick ist das Dipolmoment der Helix sicher nicht so groß, und somit die Kompensation der negativen Ladungen der Pyrophosphatgruppe nicht so gut, wie bei Proteinen mit gerader Helix. Diese

Tatsache wird eventuell durch die große Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen NADPH und AFR aufgefangen.

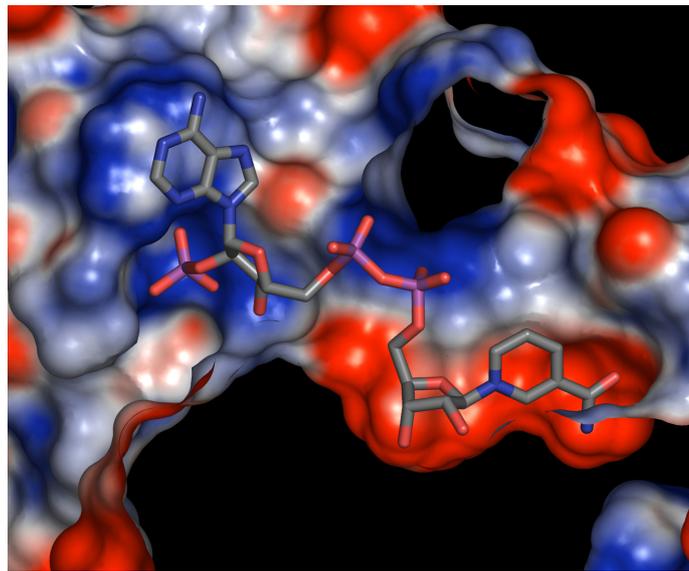
Die Packung zwischen Helix  $\alpha A$  und dem  $\beta$ -Faltblatt wird für die Spezifität zwischen NAD(H) und NADP(H) verantwortlich gemacht. Für NADP(H)-bindende Proteine wurde für die erste Windung ein Alanin als konservierter Rest postuliert (Hanukoglu and Gutfinger, 1989; Scrutton *et al.*, 1990; Baker *et al.*, 1992). Bei AFR findet sich an dieser Stelle Ala13 (Abbildung 25). Für NAD(H) bindende Enzyme ist ein engerer Kontakt zwischen Helix  $\alpha A$  und  $\beta$ -Faltblatt notwendig, weswegen bei diesen ein Glycinrest konserviert ist (Bellamacina, 1996; Kleiger and Eisenberg, 2002). Eine Mutation Ala13Gly machte aus der ausschließlich NADPH-abhängigen AFR ein Enzym, das neben dem natürlichen Cosubstrat auch NADH umsetzen konnte. Allerdings war die Affinität von NADH mit einem  $K_M$  Wert von 2 mM um zwei Größenordnungen schlechter als die von NADPH ( $K_M=0.02$  mM) (Kühn, 2004). Ala $\rightarrow$ Gly Mutationen an gleicher Stelle führten auch bei Glutathion-Reduktase zu verbesserter Affinität zu NADH (Scrutton *et al.*, 1990; Mittl *et al.*, 1993).

Während die eine Seite der Pyrophosphatgruppe an den N-Terminus der  $\alpha$ -Helix  $\alpha A$  der N-terminalen Domäne bindet, tritt sie auf der anderen Seite mit dem Loop zwischen  $\beta$ -Strang  $\beta 7$  und Helix  $\alpha G$  der C-terminalen Domäne in Wechselwirkung. Dieser Loop bildet in der Kristallstruktur einen Deckel über der Dinucleotid-Bindungstasche. Dadurch wird es bei Nucleotidaustausch notwendig, dass AFR eine Konformationsänderung eingehen muss.

Wichtig für die Cofaktorerkennung und die Präferenz von AFR zu NADPH ist die Umgebung um die 2'-Phosphatgruppe der Adeninribose. Die Phosphatgruppe bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu den Seitenketten der Reste Ser33, Thr34 und Arg38, sowie zu Hauptkettenatomen von Ala9 und Thr34 (Abbildung 32). Ser33 liegt am C-Terminus von  $\beta$ -Strang  $\beta 2$  und gehört zum Fingerprint-Motiv (siehe 4.1.4.1) (Wierenga *et al.*, 1986; Bellamacina, 1996). Bei NAD(H) abhängigen Proteinen wird diese Position von einer negativ geladenen Seitenkette besetzt (Bellamacina, 1996). Diese kann mit der 2'-Hydroxylgruppe der Adeninribose von NAD(H) in Wechselwirkung treten. Ein saurer Rest an dieser Stelle bei AFR würde mit seiner negativen Ladung jedoch die 2'-Phosphatgruppe der Adeninribose vom bevorzugten Cofaktor NADPH abstoßen. Eine Substitution zu Serin umgeht diese Abstoßung. Auch in anderen NADP(H)-abhängigen Proteine wie GFOR (Kingston *et al.*, 1996) oder Biliverdin-Reduktase (Kikuchi *et al.*, 2001) ist der saure Rest durch einen Serin- bzw. Valinrest ersetzt.

Wiegert *et al.* (1997) zeigten die Bedeutung dieses Restes am C-Terminus des  $\beta$ -Strangs  $\beta 2$  für GFOR. Diese GFOR Mutante verlor die Präferenz zu NADP(H) und zeigte

auch mit NAD(H) als Cofaktoraktivität. Eine analoge Mutation des Ser33Asp bei der AFR ergab ein inaktives Enzym (Kühn, 2004). Die negative Ladung und die Größe der Seitenkette des Aspartat verhinderten eine Bindung der 2'-Phosphatgruppe der Adeninribose, was einen Verlust der Bindung von NADPH zur Folge hat. Eine Reaktion von AFR mit NADH wurde wahrscheinlich durch die allgemeine Struktur verhindert, die keine Bindung von NADH zulässt. Hier wäre interessant, wie sich eine Doppelmutante Ala13Gly/Ser33Asp verhält. Durch die Ala13Gly Mutation wird eine duale Cosubstratspezifität ermöglicht, die dann durch die Mutation Ser33Asp in eine NADH Spezifität umgewandelt werden sollte.



**Abbildung 34:** Elektrostatische Potentialoberfläche von AFR im Bereich der NADP<sup>+</sup>-Bindung. Die Potentialoberfläche wurde über ein Zusatzmodul des Programms PyMOL (DeLano, 2002) mit dem Programm APBS errechnet (Baker *et al.*, 2001). Positive Potentiale sind blau eingefärbt, während negative Potentiale rot dargestellt sind. Die negative Ladung der 2'-Phosphatgruppe wird durch positive Ladung im Bereich von Arg38 kompensiert. Die negative Ladung der Pyrophosphatgruppe kann durch den N-Terminus der Helix  $\alpha$ A kompensiert werden.

Eine weitere wichtige Wechselwirkung zwischen dem Cofaktor NADP(H) und AFR wird wahrscheinlich über Arg38 vermittelt. Die stark basische Guanidiniumgruppe ist mit seiner positiven Ladung in der Lage, die negative Ladung der 2'-Phosphatgruppe zu kompensieren (Abbildung 34). Die Kompensation der negativen Ladung der 2'-Phosphatgruppe durch einen basischen Rest wird auch in anderen NADP(H)-abhängigen Enzymen wie Carbonyl-Reduktase, GDP Fucose-Synthetase und GDP Mannose-4,6-Dehydratase beobachtet (Tanaka *et al.*, 1996; Somers *et al.*, 1998; Somoza *et al.*, 2000). Zusätzlich ist die Guanidiniumgruppe von Arg38 in der Lage, mit seinen  $\pi$ -Elektronen mit dem aromatischen Adeninring in Wechselwirkung zu treten und diesen zu koordinieren. Diese  $\pi$ -Wechselwirkung mit Arg38 ist die einzige beobachtete Wechselwirkung des Adeninrings

mit AFR oder koordinierten Wassermolekülen. Interessanterweise sind die *B*-Faktoren des Adeninrings ähnlich hoch wie der Rest des Proteins, was auf eine feste Koordination des aromatischen Adeninrings durch die  $\pi$ -Wechselwirkung mit der Guanidiniumgruppe schließen lässt.

NAD(H)- und NADP(H)-abhängige Enzyme werden technisch zur Herstellung chiraler Verbindungen verwendet (Liese *et al.*, 2000; Leonida, 2001). Aufgrund der hohen Cofaktorkosten wird unter anderem versucht, den Cofaktor über eine gekoppelte Enzymreaktion zu regenerieren (Peters, 1998; Liese *et al.*, 2000). Trotz der möglichen Regeneration des Cofaktors ist für den Einsatz in der Biokatalyse der Einsatz von NAD(H) als Cofaktor dem Einsatz von NADP(H) vorzuziehen. Ein Blick auf die Preise der Cofaktoren macht dies deutlich (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Katalogpreise für Cofaktoren (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, 2004)

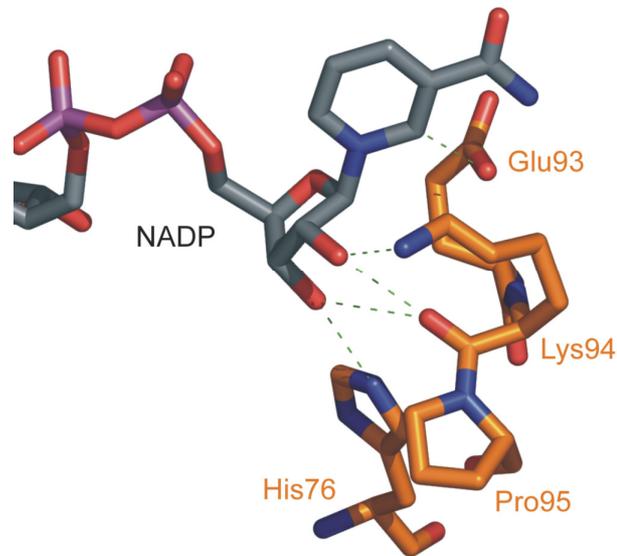
Cofaktor	Preis [€] pro g
NAD <sup>+</sup>	30
NADH	78
NADP <sup>+</sup>	344
NADPH	880

Die Preisunterschiede lassen sich anhand der Herstellung der Cofaktoren erklären. NAD<sup>+</sup> wird zurzeit aus Hefe gewonnen (Sakai *et al.*, 1973). Dieses wird durch enzymatische Phosphorylierung mittels NAD<sup>+</sup>-Kinase zu NADP<sup>+</sup> umgesetzt (Hayashi *et al.*, 1979; Murata *et al.*, 1979). Die reduzierten Cosubstrate werden chemisch (Lehninger, 1957), enzymatisch (Rafter and Colowick, 1957; Suye and Yokoyama, 1985) oder mikrobiologisch (Egushi *et al.*, 1983) erhalten. Neben den Preisen spricht auch die größere Stabilität von NAD(H) im Vergleich zu NADP(H) für dessen Verwendung (Oppenheimer and Kaplan, 1974; Chenault and Whitesides, 1987). Die Verwendung von NADH als Cofaktor wäre für den Einsatz von AFR als Biokatalysator erstrebenswert. Bei Glutathion-Reduktase (Scrutton *et al.*, 1990; Mittl *et al.*, 1994), G6PDH (Levy *et al.*, 1996), Isopropylmalat-Dehydrogenase (Chen *et al.*, 1996) oder Isocitrat-Dehydrogenase (Chen *et al.*, 1997) konnten erfolgreich die Cosubstratspezifität von NADP(H) zu NAD(H) geändert werden. Es zeigte sich bei diesen Beispielen, dass meistens mehrere Mutationen notwendig waren, um die Coenzym-spezifität zu ändern. Ähnliches könnte für AFR zutreffen. Mutationskandidaten wären die oben diskutierten Positionen Ala13, Ser33, Thr34 und Arg38. Eine verbesserte Cofaktorbindung könnte auch

eine Mutation Ser10Gly bewirken, wodurch das für NADP(H)-bindende Protein charakteristische Glycin-reiche Motiv GXGXXA zwischen  $\beta$ -Faltblattstrang  $\beta$ 1 und Helix  $\alpha$ A (Hanukoglu and Gutfinger, 1989) gebildet werden würde.

#### 4.1.6.2 Bindung der Nicotinamid-Ribose-Einheit

Der Nicotinamidring und die dazugehörige Ribose finden sich am Boden einer tiefen Aushöhlung zwischen N-terminaler und C-terminaler Domäne und bilden diverse Wasserstoffbrückenbindungen zu AFR aus (Abbildung 32). Die Nicotinamid-Ribose-Einheit bindet an den Loop zwischen  $\beta$ -Strang  $\beta$ 5 und Helix  $\alpha$ E. Dieser Loop beherbergt ein funktionelles Motiv E<sub>93</sub>KP<sub>95</sub> (Kingston *et al.*, 1996), das wiederum Teil eines bei Zucker Dehydrogenasen konserviertes Motiv A<sub>86</sub>GKHVXCEKP<sub>95</sub> (Wiegert *et al.*, 1997) ist. Glu93 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu der Carboxamidgruppe des Nicotinamidrings. Außerdem nähert sich die Carboxyl-Gruppe bis auf 2.9 Å an C2 des Nicotinamidrings (Abbildung 35), was auf eine CH $\cdots$ O Wasserstoffbrückenbindung schließen lässt (Duax *et al.*, 2003). Solche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen CH-Gruppen und Carbonyl-Gruppen bzw. Carboxyl-Gruppen scheinen nichts Außergewöhnliches zu sein, wurden aber lange Zeit nicht näher beachtet (Weiss *et al.*, 2001; Senes *et al.*, 2001). Pierce *et al.* (2002) berichtet, dass auch Substrate über CH $\cdots$ O Wasserstoffbrückenbindung an Enzyme gebunden sein können. Quantenmechanische Untersuchungen ergaben einen doppelt so großen Energiegewinn für die CH $\cdots$ O Wasserstoffbrückenbindung eines Nicotinamidrings an C2 Position von -46.72 kJ/mol verglichen mit der Dimerisierung von Wasser (-23.07 kJ/mol) (Pierce *et al.*, 2002), was der Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung entspricht. Es scheint, dass die CH $\cdots$ O Wasserstoffbrückenbindung zwischen Glu93 und dem Nicotinamidring ganz entscheidend für die Stabilität die Bindung des Cofaktors an AFR verantwortlich ist.



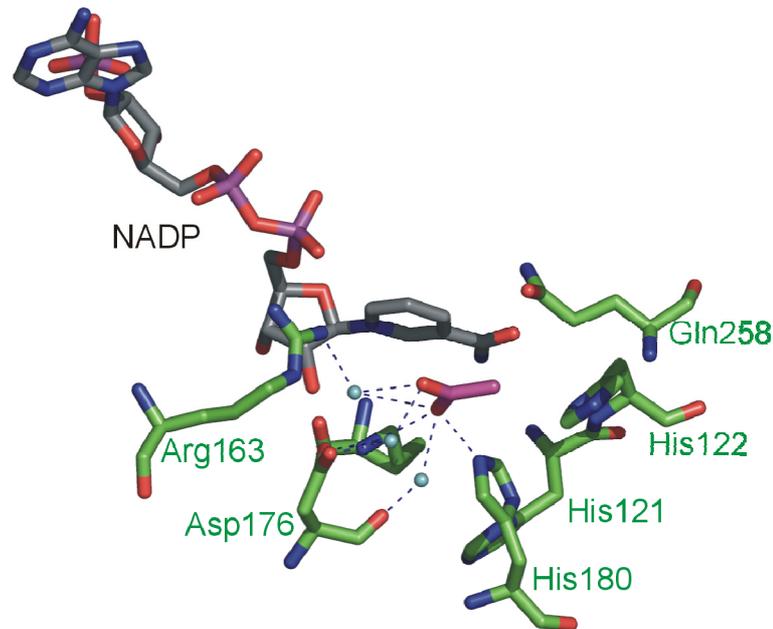
**Abbildung 35:** Bindung der Nicotinamid-Ribose-Einheit von NADP<sup>+</sup> an AFR. Das charakteristische E<sub>93</sub>KP<sub>95</sub>-Motiv bildet Wasserstoffbrückenbindungen zur Riboseuntereinheit. Eine CH···O Brücke wird von der Carboxyl-Gruppe von Glu93 zu C2 des Nicotinamidrings gebildet. Der in Zucker Dehydrogenasen konservierte Rest His76 bindet an die 3'-OH Gruppe der Nicotinamid-Ribose.

Lys94 bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu den 2'- und 3'-OH Gruppen der Nicotinamid-Ribose aus. Außerdem ist es an der Bindung des Substrates beteiligt, worauf im folgenden Kapitel (siehe 4.1.7) näher eingegangen wird. Die Peptidbindung zwischen Lys94 und Pro95 ist eine *cis*-Peptidbindung, die für die korrekte Positionierung des Nicotinamidrings notwendig ist (Naylor *et al.*, 2001). Mutationsstudien an Pro149 der G6PDH, der analogen Position zu Pro95 bei AFR zeigten ferner die Notwendigkeit der *cis*-Peptidbindung an dieser Position für die Substratbindung und die Umsetzung des Substrates (Vought *et al.*, 2000).

Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zu der 3'-OH Gruppe wird von His76 ausgebildet (Abbildung 35), das in Proteinen der *GFO/IDH/MocA*-Proteinfamilie konserviert ist (Arimitsu *et al.*, 1999; Asada *et al.*, 2000).

#### 4.1.7 Aktives Zentrum

Aufgrund der beobachteten Reaktion von AFR, der Übertragung eines Hydrids des reduzierten Nicotinamids auf das Substrats 1,5-AF, wurde das aktive Zentrum in der Nähe des Nicotinamidrings vermutet. Dieser liegt am Grund einer ca. 15 Å tiefen Aushöhlung zwischen der N-terminalen und C-terminalen Domäne.



**Abbildung 36:** Aktives Zentrum von AFR. NADP<sup>+</sup> (Kohlenstoff - grau) ist über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der N-terminalen und C-terminalen Domäne gebunden. Im aktiven Zentrum ist ein Acetat gebunden (violett). Lys94 ist Teil des konservierten EKP-Motivs. His180 könnte als Basenkatalysator für die Reduktion der 1,5-AF dienen. Die Reste Arg163 und Asp176 könnten wie Lys94 an der Substratbindung beteiligt sein. His121 und His122 könnten über Wasserstoffbrückenbindungen mit His180 in Wechselwirkung treten. Gln258 könnte bei der Reaktion zur Gluco-Konfiguration an der Substratbindung beteiligt sein.

In der Kristallstruktur findet sich in der großen lösungsmittelzugänglichen Tasche des aktiven Zentrums neben diversen Wassermolekülen auch ein Acetat (Abbildung 36). Dieses wird über Wasserstoffbrückenbindungen eines Sauerstoffatoms an die Reste Lys94 und His180 koordiniert. Das andere Sauerstoffatom koordiniert über Wassermoleküle an die Reste Arg163 und Asp176. His121 und His122 liegen 3.0 Å bzw. 3.3 Å von His180 entfernt und können über Wasserstoffbrückenbindungen mit diesem in Wechselwirkung treten.

Die Hydridübertragung von NAD(P)H auf eine Carbonyl-Gruppe unter Produktion eines Alkohols erfordert eine Polarisierung des Carbonyl-Kohlenstoffs. Unter den Alkohol-Dehydrogenasen haben sich sowohl ein Metallionen abhängiger Mechanismus mit Zink (*medium chain dehydrogenases/reductases*) und Eisen (*long chain dehydrogenases/reductases*), als auch eine Säure-Base-Katalyse ohne Metallion (*short chain dehydrogenases/reductases* - SDR) etabliert (Hummel, 1997; Radianingtyas und Wright, 2003). Die Gruppe der SDR ist gut untersucht, und der Mechanismus weitgehend verstanden (Filling *et al.*, 2002). Ein Tyrosinrest wirkt dabei als Base. Er überträgt ein Proton auf die Carbonyl-Gruppe des Substrates. Da der pK<sub>a</sub>-Wert eines Tyrosinrestes unter physiologischen Bedingungen mit ca. 10 zu hoch liegt um als Base zu agieren, ist ein basischer Rest, wie ein Arginin oder Lysin in der Nähe notwendig, um den pK<sub>a</sub>-Wert zu senken. Zusammen mit einem Serinrest, der das Substrat stabilisiert, bilden diese beiden Reste eine katalytische Triade (Ghosh *et al.*, 1995).

Auch in GFOR (Kingston *et al.*, 1996) oder Biliverdin-IX $\alpha$ -Reduktase (Whitby *et al.*, 2002), die strukturelle Homologien zu AFR aufweisen, wurde ein Tyrosin in Kombination mit einem basischen Rest als aktives Zentrum nachgewiesen. Diese Enzyme unterscheiden sich hinsichtlich der Primärstruktur im Vergleich zu SDR, und auch die aktiven Reste liegen in der Sequenz in unterschiedlichen Bereichen. Die räumliche Anordnung dieser Reste lässt aber auf einen ähnlichen Mechanismus schließen.

ASADH (Alber *et al.*, 1981) und GAPDH (Buehner *et al.*, 1973) sind strukturell mit AFR verwandt. Diese Aldehyd-Dehydrogenasen haben einen zu SDR unterschiedlichen Reaktionsmechanismus. Die Reaktion läuft hier in zwei Stufen proteingebunden an einem Cysteinrest ab. Als Basenkatalysator findet man bei der Hydridübertragung anstelle eines Tyrosinrestes einen Histidinrest (Didierjean *et al.*, 2003).

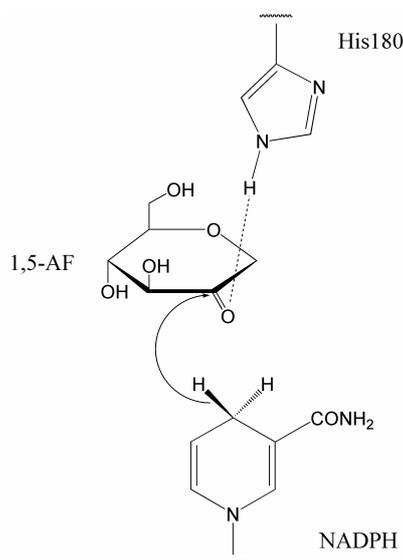
In AFR könnte die Basenkatalyse von His180 übernommen werden (Abbildung 36, Abbildung 37). Er liegt an äquivalenter Position wie Tyr217 in GFOR. Ein Histidinrest im aktiven Zentrum findet man auch bei der Malat-Dehydrogenase (Birktoft und Banaszak, 1983), die im Zitronensäurezyklus Malat zu Oxalacetat oxidiert (Voet und Voet, 1995) und der an der Fermentation beteiligten Lactat-Dehydrogenase, die Pyruvat zu Lactat reduziert (Voet and Voet, 1995). Diese Proteine besitzen analog zu AFR keinen Cysteinrest im aktiven Zentrum wie die oben beschriebenen ASADH (Alber *et al.*, 1981) und GAPDH (Buehner *et al.*, 1973), weshalb man davon ausgehen kann, dass diese ihre Substrate nicht über eine kovalente Zwischenstufe oxidieren bzw. reduzieren. Neben diesen gut charakterisierten Enzymen, zeigen Sequenzvergleiche, dass auch die Inositol-Dehydrogenase und MocA der *GFO/IDH/MocA*-Proteinfamilie im aktiven Zentrum einen Histidinrest anstelle eines Tyrosinrestes besitzen.

Wie oben beschrieben benötigen SDR und andere Tyrosin-abhängige Oxidoreduktasen einen basischen Rest in der Nähe des Tyrosins, um den pK<sub>a</sub>-Wert so weit abzusenken, dass er eine Säuren-Basen-Katalyse ausführen kann (Jornvall *et al.*, 1995; Radianingtyas and Wright, 2003). Bei GFOR ist die einzige basische Aminosäure, die diese Aufgabe erfüllen kann Lys129 (Kingston *et al.*, 1996). Dieses ist Teil des weiter oben beschriebenen EKP-Motivs (siehe 4.1.6.2) und in AFR als E<sub>93</sub>KP<sub>95</sub> konserviert. Eine Mutation von Lys94 zu Gly bewirkte einen Anstieg des K<sub>M</sub>-Wertes für das Substrat 1,5-AF auf das Dreifache verglichen zum Wildtyp, was auf eine Beteiligung von Lys94 an der Substratbindung schließen lässt (Kühn, 2004). Interessanterweise wurde kein Verlust an spezifischer Aktivität der Mutante Lys94Gly im Vergleich zum Wildtyp beobachtet (Kühn, 2004), was gegen eine Beteiligung von Lys94 an der Substratumsetzung spricht. Eine Erklärung wäre, dass der Basen-Katalysator His180

durch seinen im Vergleich zu Tyrosin niedrigen  $pK_a$ -Wert alleine in der Lage ist, die Reaktion zu katalysieren.

Für 1,5-AF besteht in wässriger Lösung ein Gleichgewicht zwischen der Keto-Form und der hydratisierten *gem*-Diol Form (Abbildung 2 (Andersen *et al.*, 2002)). Eine Vorhersage, welche dieser Formen von AFR umgesetzt wird, ist sehr schwierig. Da die Oxidationreaktion sehr viel schlechter abläuft als die Reduktionsreaktion wird angenommen, dass die Substrate für Oxidationsreaktion 1,5-AM und Reduktionsreaktion 1,5-AF sich strukturell signifikant unterscheiden müssen, und das natürliche Substrat 1,5-AF sehr viel besser gebunden wird. Dies würde dafür sprechen, dass die Keto-Form von 1,5-AF als Substrat für AFR dient, da diese sich stärker als die *gem*-Diol Form von 1,5-AM unterscheidet. Affinitäts- und Kinetikstudien, die diese These bestätigen oder widerlegen könnten, stehen noch aus.

Aufgrund der oben gemachten Annahmen wurde ein Mechanismus für AFR vorgeschlagen, der eine Basenkatalyse durch His180 vorsieht. Die Reaktion könnte wie in Abbildung 37 gezeigt ablaufen. His180 aktiviert durch Protonenübertragung die Carbonylgruppe der 1,5-AF. Auf die aktivierte Carbonylfunktion kann ein Hydridion von NADPH übertragen werden.



**Abbildung 37:** Möglicher Mechanismus der Reduktion von 1,5-AF durch AFR. Die katalytische Base His180 aktiviert durch Protonierung die Carbonylgruppe des Substrates. NADPH überträgt ein Hydridion auf die *si*-Seite des C2 von 1,5-AF.

Ob weitere Reste an der Katalyse beteiligt sind, und welche Funktion sie einnehmen würden, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gesagt werden. Kandidaten für die Beteiligung wären His121 und His122, die über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem vorgeschlagenen

---

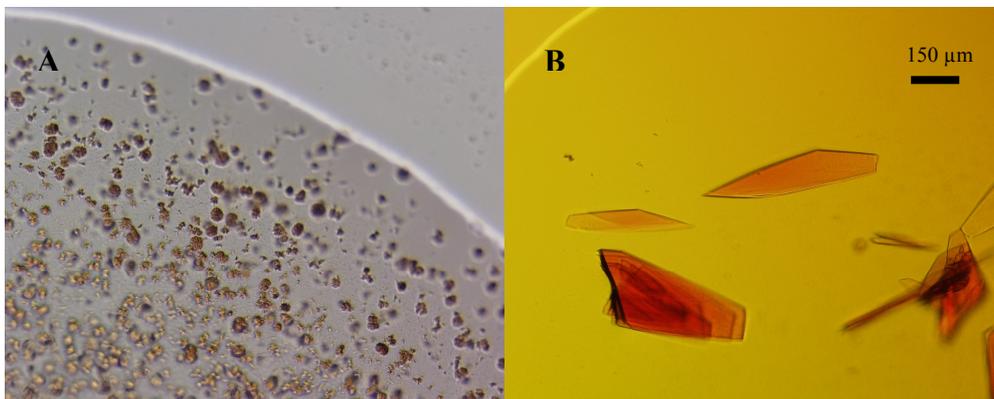
Basenkatalysator His180 in Wechselwirkung treten können. Neben Lys94 könnten auch die Reste Arg136 und Asp176 an der Substratbindung beteiligt sein. Sie koordinieren in der beschriebenen Kristallstruktur das gebundene Acetation über Wassermoleküle und es wäre vorstellbar, dass sie auch ein 1,5-AF Molekül koordinieren könnten. In wie weit diese Reste an der Katalyse beteiligt sind, könnte über Mutationsstudien beantwortet werden.

## 4.2 SoxXA

### 4.2.1 Kristallisation

Das Protein SoxXA wurde aus *P. pantotrophus* im Arbeitskreis von Prof. Friedrich gereinigt (Friedrich *et al.*, 2000) und für die Durchführung der Strukturanalyse mittels Einkristall-Röntgendiffraktion in unterschiedlichen Puffern und in Konzentrationen von 10-40 mg/mL zur Verfügung gestellt. Um für die Kristallisation immer die gleichen Ausgangsbedingungen zu haben, wurde jede Proteincharge gegen SoxXA Proteinpuffer (10 mM BIS-TRIS, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) dialysiert, die Proteinkonzentration anhand der Methode nach Bradford bestimmt (siehe 3.1.2) und mit Proteinpuffer auf eine Konzentration von 6 mg/mL verdünnt. Zur Lagerung wurde SoxXA aliquotiert, in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bei -80 °C bis zur Kristallisation gelagert (siehe 3.1.3).

Zur Strukturaufklärung wurde SoxXA mit der Methode des hängenden Tropfens bei 18 °C kristallisiert (siehe 3.2.2). Erste Kristallisationsexperimente wurden mit *Crystal Screen*, *Crystal Screen 2* und *PEG/Ion Screen* durchgeführt. Das Ziel der initialen Experimente war es, mindestens eine Bedingung zu finden, von der ausgehend durch gezielte Variation der Bedingungen die Kristallisation optimiert werden konnte.



**Abbildung 38:** Ergebnisse der Kristallisationsexperimente von SoxXA. (A) Mit initialen Kristallisationsbedingungen (0.01 M ZnSO<sub>4</sub>, 0.1 M MES pH 6.5, 25 % (v/v) PEG 550) wurden Spherolite erhalten. Dabei handelt es sich um ver wachsene Mikrokristalle, die igelartige Agglomerate bilden. (B) Unter verfeinerten Kristallisationsbedingungen (100 mM MES pH 5.6, 4-7 % (w/v) PEG 1500, 4-8 mM ZnSO<sub>4</sub> und 75 mM [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub>) wuchsen nach etwa drei Tagen SoxXA Kristalle zu dünnen Plättchen. Neben einzelnen Kristallen bildeten sich auch viele ver wachsene Kristallbüschel.

Bei Bedingung 27 aus *Crystal Screen 2* (0.01 M ZnSO<sub>4</sub>, 0.1 M MES pH 6.5, 25 % (v/v) PEG 550) wurden nach wenigen Tagen sehr kleine, ver wachsene Kristalle, so genannte Spherolite, beobachtet (Abbildung 38 A). Nachdem initiale Bedingungen gefunden waren, wurde durch Variation der Art des Fällungsmittel, der Fällungsmittelkonzentration, der Art des Salzes, der Salzkonzentration und des pH-Wertes versucht, die Kristallisation zu

verbessern. Zusätzlich wurden unterschiedliche Additive mit den *Additive Screens 1-3* der Fa. Hampton Research (Cudney *et al.*, 1994; Trakhanov und Quioco, 1995) auf ihren Einfluss auf die Kristallisation getestet. Die besten Kristalle (Abbildung 38 **B**) wurden schließlich mit SoxXA Kristallisationslösung (100 mM MES pH 5.6, 4-7 % (w/v) PEG 1500, 4-8 mM ZnSO<sub>4</sub> und 75 mM [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub>) erhalten. Sie wuchsen nach etwa drei Tagen zu dünnen Plättchen mit einer Größe bis zu 700 × 400 × 30 μm<sup>3</sup>. Die meisten der Kristalle unter diesen Bedingungen bildeten verwachsene Kristallbüschel (Abbildung 38 **B**). Unter diesen Bedingungen wurden aber auch Einkristalle erhalten, die zur Strukturaufklärung verwendet werden konnten.

Zur Montage der Kristalle für röntgenographische Untersuchungen wurden zu den Kristallisationstropfen ca. 5 μL SoxXA-Cryo-Lösung (100 mM MES pH 5.6, 4-7 % (w/v) PEG 1500, 4-8 mM ZnSO<sub>4</sub> und 75 mM [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub>, 25 % (v/v) Glycerin) gegeben (siehe 3.2.3). Nach einer kurzen Inkubationszeit von 30 sec bis 5 min wurden die Kristalle in Nylonschleifen der Fa. Hampton Research montiert und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Bis zur Datensammlung wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff gelagert

## 4.2.2 Strukturaufklärung

Im Laufe der Strukturaufklärung wurden Datensätze von mehreren Kristalle an unterschiedlichen Synchrotron Röntgenquellen (Deutsches Elektronen Synchrotron (DESY), Hamburg, Deutschland; *Swiss Light Source* (SLS), Villigen, Schweiz; *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF), Grenoble, Frankreich) aufgenommen. Schon bei der Datenaufnahme und bei der Prozessierung der ersten Bilder mit MOSFLM (Leslie, 1992) fiel auf, dass bei allen Kristallen mehrere Gitter vorlagen. Auch bei Kristallen, deren Morphologie auf einen Einkristall schließen lies, zeigten sich im Diffraktionsexperiment Reflexe, die nicht dem vorhergesagten Gitter zugeordnet werden konnten. In manchen Orientierungen überlagerten sich die Reflexe zusätzlich, so dass deren Intensitäten mit größeren Fehlern behaftet waren als die Reflexe, die klar voneinander getrennt werden konnten. Zu Beginn wurde versucht, die Struktur über anomale Dispersion der Eisenatome zu lösen (siehe 3.3.5), wozu Datensätze bei unterschiedlichen Wellenlängen an der K-Kante für Eisenatome aufgenommen wurden. Bei anomaler Dispersion sind die Intensitätsunterschiede zwischen Friedel-Paaren sehr gering, und die Intensitäten der Reflexe müssen daher sehr genau bestimmt werden. Durch die überlagerten Gitter und die dadurch resultierenden teilweise überlagerten Reflexe konnten die betroffenen Intensitäten wahrscheinlich nicht genau genug

bestimmt werden, um die Daten über anomale Dispersion der Eisenatome zu phasieren. Letztendlich konnte die Struktur erst durch molekularen Ersatz gelöst werden. Im Folgenden wird nur noch der Datensatz betrachtet, mit dem die Struktur erfolgreich über molekularen Ersatz gelöst werden konnte.

Die Datensammlung des SoxXA Einkristalls erfolgte an der Synchrotron Röntgenquellen DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron, Hamburg) an den Messeinrichtungen BW6 mit einem MarCCD Detektor bei einer Wellenlänge von 1.737 Å bis zu einer Auflösung von 1.92 Å. Die Daten wurden mit dem Programmpaket XDS (Kabsch, 1993) prozessiert und skaliert und waren zu 93.0 % komplett. SoxXA aus *P. pantotrophus* kristallisiert in der Raumgruppe  $P2_1$  (Hahn, 2002) mit den Zellparametern  $a=42.86$  Å,  $b=180.01$  Å,  $c=117.93$  Å und  $\beta=92.83$  °. Der  $R_{\text{sym}}$  lag bei 8.5 %, wobei die überlagerten Gitter Einfluss auf den  $R_{\text{sym}}$  haben konnten, da zum einen die Intensitäten der überlagerten Reflexe nicht exakt bestimmt werden konnten und zum anderen die Möglichkeit bestand, dass während des Prozessiervorgangs in ein anderes Gitter „gesprungen“ wurde, was zu fehlerhaften Intensitäten führen würde. Die Analyse des Matthews Parameters (Matthews, 1968) lies auf 4 Moleküle SoxXA pro asymmetrische Einheit schließen (Gleichung 14). Die Datenstatistiken sind nochmals in Tabelle 5 zusammengefasst.

Zur Phasierung über molekularen Ersatz (siehe 3.3.4) diente ein Heterodimer SoxXA aus *R. sulfidophilum* ohne Häm-Gruppen als Suchmodell (PDB-Eintrag 1H33). Mit dem Programm MOLREP (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) konnten vier Lösungen gefunden werden.

Nach dem Austausch der Reste zu SoxXA aus *P. pantotrophus* erfolgten erste Verfeinerungsschritte, indem das Modell und die Elektronendichte mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) dargestellt wurde, und das Modell per Hand an die Elektronendichte angepasst wurde. Durch weitere Verfeinerung durch *simulated annealing* und Energieminimierung mit dem Programm CNS (Brunger *et al.*, 1998) konnte der  $R$ -Faktor von 48.0 % auf 34.3 % verbessert werden. Der freie  $R$ -Faktor (Brunger, 1992) fiel von 47.1 % auf 36.5 %

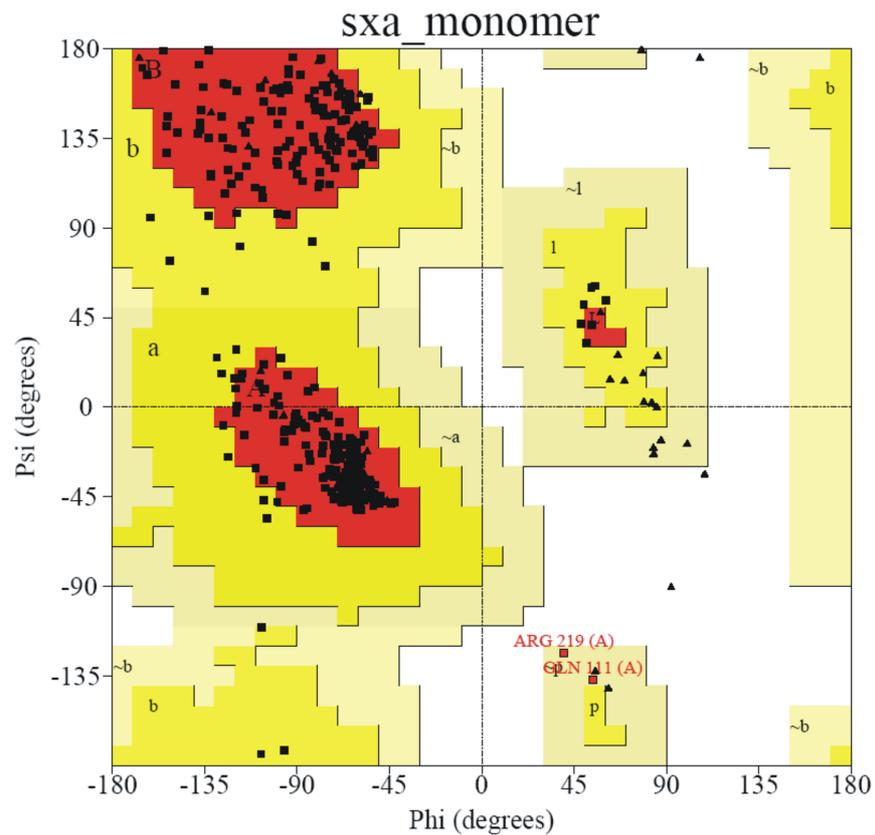
Die Elektronendichte zeigte zu diesem Zeitpunkt noch nicht interpretierte Bereiche, in die die noch fehlenden Häm-Gruppen gelegt werden konnten. Die Topologie- und Parameter-Dateien für die  $c$ -Typ Häm-Gruppen für die Verfeinerung mit CNS, wurden von Roman Fedorow (MPI Dortmund) übernommen. Des Weiteren konnten am N-Terminus Elektronendichte für drei weitere Aminosäuren gesehen werden. Diese Aminosäuren wurden dem Modell hinzugefügt. In weiteren Zyklen von Modellbau per Hand und Verfeinerung

durch *simulated annealing* und Energieminimierung mit dem Programm CNS verbesserte sich der *R*-Faktor weiter auf 33.6 %, der freie *R*-Faktor auf 35.7 %.

Weitere Verfeinerungsschritte der Struktur erfolgten mit dem Programm REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994). Die .cif Datei für die Häm-Gruppen, die analog zu den Topologie- und Parameter-Dateien in CNS die Häm-Gruppe chemisch beschreibt, war bereits in der CCP4 Bibliothek vorhanden, und musste daher nicht extern generiert werden. Nach Energieminimierung mit REFMAC5 wurden TLS Gruppen für jedes SoxX und SoxA festgelegt. Bei vier SoxXA Molekülen pro asymmetrische Einheit ergaben sich acht TLS Gruppen. Nach optimieren der TLS Parameter und weiteren Energieminimierungsschritten verbesserten sich der *R*-Faktor weiter auf 23.2 % und der freie *R*-Faktor auf 26.7 %.

In einem letzten Schritt der Strukturaufklärung wurden mit dem Programm ARP/WRAP (Perrakis *et al.*, 2001) koordinierte Lösungsmittelmoleküle gesucht (siehe 3.3.11). Die potentiellen Lösungsmittelmoleküle wurden mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) auf ihre Richtigkeit überprüft. Es wurden insgesamt 2151 Wassermoleküle pro asymmetrischer Einheit gefunden werden. Der *R*-Faktor der fertigen Struktur betrug 15.9 %, der freie *R*-Faktor 21.1 % (Brunger, 1992; Kleywegt and Brunger, 1996).

Als Kontrolle der Struktur diente neben den *R*-Faktoren auch der Ramachandran-Plot (Ramakrishnan and Ramachandran, 1965) in Abbildung 39, in dem die Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  des Peptidrückgrates gegeneinander aufgetragen werden. Aus sterischen Gründen sind für Aminosäuren mit Seitenketten nur bestimmte Winkel erlaubt (Morris *et al.*, 1992; Kleywegt and Jones, 1996a). Bei Glycinresten besteht diese sterische Hinderung nicht, weshalb sie auch andere Torsionswinkelkombinationen einnehmen können. Sekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter erlauben unterschiedliche Kombinationen, so dass es im Ramachandran-Plot zu verschiedenen Bereichen mit favorisierten und erlaubten  $\phi/\psi$ -Kombinationen kommt (Abbildung 39, rote und gelbe Bereiche). Bei SoxXA liegen 91.7 % der Torsionswinkelkombinationen der nicht-Glycinreste im favorisierten (roten) Bereich, 7.7 % liegen im erlaubten (gelben) Bereich und 0.6 % liegen im großzügig erlaubten (beige) Bereich. Diese Werte können für eine Struktur bei 1.9 Å maximaler Auflösung und einem freien *R*-Faktor von ca. 20 % als normal angesehen werden (Kleywegt and Jones, 1996a).



**Abbildung 39:** Ramachandran-Plot (Ramakrishnan and Ramachandran, 1965) von SoxXA. In diesem werden die Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  gegeneinander aufgetragen. Aus sterischen Gründen sind für nicht-Glycinreste nur bestimmte Kombinationen erlaubt. Die roten Bereiche beschreiben die favorisierten Bereiche, erlaubte Bereiche sind gelb markiert, großzügig erlaubte Bereiche sind beige markiert, verbotene Bereiche sind weiß markiert. Winkelkombinationen, die von  $\alpha$ -Helices eingenommen werden können sind mit A, a und  $\sim$ a bezeichnet,  $\beta$ -Faltblattbereiche sind mit B, b und  $\sim$ b bezeichnet, linksgängige Helices sind mit L, l und  $\sim$ l bezeichnet und  $\pi$ -helikale Bereiche sind mit p und  $\sim$ p bezeichnet. (■) kennzeichnen nicht-Glycinreste, während (▲) Glycinreste beschreiben. Die Analyse der Torsionswinkel und die Darstellung im Ramachandran-Plot erfolgten mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

**Tabelle 5:** Daten- und Verfeinerungsstatistiken für SoxXA

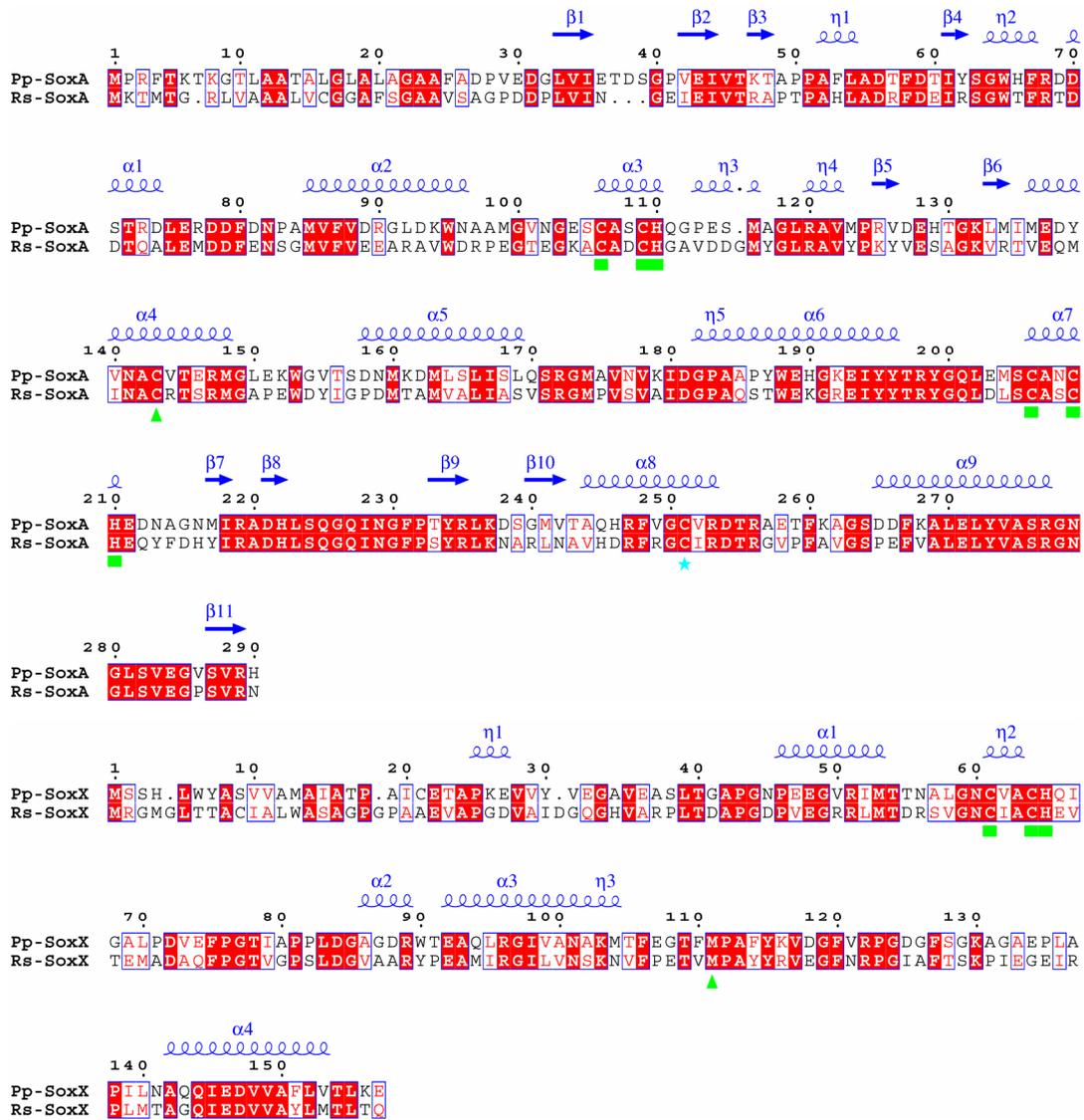
<b>Datenstatistik</b>	
Beamline	BW6/ DESY (Hamburg)
Temperatur (K)	100
Detektor	MarCCD
Wellenlänge (Å)	1.737
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>
Zelldimensionen	
a (Å)	42.86
b (Å)	180.01
c (Å)	117.93
β (°)	92.83
maximale Auflösung (Å)	1.92
höchste Auflösungsschale	2.0-1.92
Anzahl der gemessenen Reflexe	631082
Redundanz	5.2
$R_{\text{sym}}$ (%) <sup>1</sup>	8.5 (15.2)
$I/\sigma$ (I) <sup>1</sup>	12.6 (5.9)
$B$ -Faktor nach Wilson Plot (Å <sup>2</sup> )	23.8
<b>Verfeinerungsstatistik</b>	
Auflösungsbereich (Å)	19.5-1.92
Anzahl der einzigartigen Reflexe	120519
Vollständigkeit der Daten (%) <sup>1</sup>	93.7 (62.6)
$R$ -Faktor /freier $R$ -Faktor (%)	15.8 / 21.1
Ramachandran-Plot	
bevorzugt, erlaubte, großzügig (%)	91.7, 7.7, 0.6
r.m.s.d. auf Bindungslängen (Å)	0.014
r.m.s.d. auf Bindungswinkel (°)	1.5

<sup>1</sup> Werte in Klammern entsprechen der maximalen Auflösungsschale

### 4.2.3 Allgemeine Struktur

Wie oben bereits erwähnt, kristallisiert SoxXA aus *P. pantotrophus* in der Raumgruppe  $P2_1$  (Hahn, 2002) mit den Zellparametern  $a=42.86 \text{ \AA}$ ,  $b=180.01 \text{ \AA}$ ,  $c=117.93 \text{ \AA}$  und  $\beta=92.83^\circ$ . Die asymmetrische Einheit enthält vier Moleküle SoxXA. Das heterodimere Enzym SoxXA besteht aus einer Monohäm Cytochrom *c* Untereinheit SoxX und einer Dihäm Cytochrom *c* Untereinheit SoxA. Die Elektronendichte von SoxXA umfasste für SoxA die Reste 27 bis 290 und für SoxX die Reste 21 bis 157. Die N-Termini von SoxA und SoxX waren wahrscheinlich aufgrund von Unordnung nicht sichtbar. Neben den Peptidketten SoxA und SoxX konnten drei *c*-Typ Häm-Gruppen identifiziert werden, von denen zwei kovalent an SoxA gebunden wurden, und eine Häm-Gruppe kovalent mit SoxX verknüpft war. Weiterhin konnten 12 Zink Atome identifiziert werden, die an Kristallkontakten beteiligt waren. Zusätzliche Elektronendichte zwischen Cys251 und dem Eisen einer Häm-Gruppe war auf eine posttranslationale Modifikation zurückzuführen, auf die in Kapitel 4.2.4 näher eingegangen wird.

SoxXA aus *P. pantotrophus* zeigt Homologien in der Primär- (Abbildung 40) und Tertiärstruktur (Tabelle 6) zu SoxAX aus dem phototrophen maritimen Bakterium *R. sulfidophilum* (Bamford *et al.*, 2002b). Die Nomenklatur für die Häm-Gruppen und die Cytochrom *c* Domänen wurde daher analog der von Bamford *et al.* (2002b) für SoxAX aus *R. sulfidophilum* vorgeschlagenen Nomenklatur übernommen. Die Häm-Gruppen von SoxA wurden bezüglich des Vorkommens des CxxCH-Motivs, an das die Häm-Gruppe kovalent verknüpft war, in der Primärstruktur Häm1 und Häm2 bezeichnet. Die Häm-Gruppe von SoxX wurde Häm3 genannt (Abbildung 41). Die erste *c*-Typ Cytochrom Domäne von SoxA, SoxAN, liegt in der Primärstruktur in der Nähe des N-Terminus (Reste 82 bis 181) und die zweite, SoxAC, ist in der Primärstruktur in der Nähe des C-Terminus (Reste 182 bis 180) zu finden. Die Cytochrom *c* Domäne von SoxX und die zwei Cytochrom *c* Domänen SoxAC und SoxAN von SoxA befinden sich fast in einer Reihe, was zu einer gestreckten Form von SoxXA führt. Die ungefähren Abmessungen des SoxXA Komplexes sind  $34 \times 40 \times 77 \text{ \AA}^3$  (Abbildung 41).



**Abbildung 40:** Sequenzvergleich zwischen SoxXA aus *P. pantotrophus* (Pp) und *R. sulfidophilum* (Rs). Über der Sequenz sind die Sekundärstrukturelemente von SoxXA aus *P. pantotrophus* angegeben. Die Häm-Gruppen bindenden CxxCH-Motive sind mit grünen Balken markiert, während der zweite axiale Rest von Häm1 und Häm3 als (▲) gekennzeichnet ist. Das aktive Zentrum an Cys251 ist als (★) gekennzeichnet.

**Tabelle 6:** Vergleich der Strukturen von SoxXA aus *P. pantotrophus* und SoxAX aus *R. sulfidophilum* mit dem Programm DALI (Holm and Sander, 1993).

	Z-Score	LALI <sup>1</sup>	r.m.s.d. <sup>2</sup>	%IDE <sup>3</sup>
SoxA	41.5	259	0.9	56
SoxX	23.3	133	1.0	49

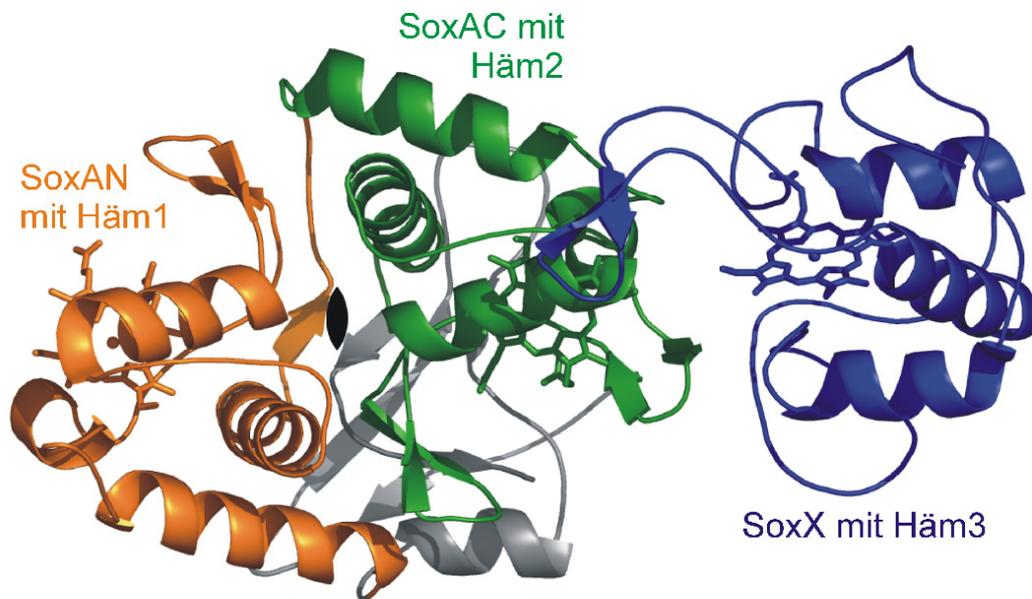
<sup>1</sup>Anzahl der C<sub>α</sub>-Atome, die verglichen werden konnten

<sup>2</sup>Abweichung der unter <sup>1</sup> verglichenen C<sub>α</sub>-Atome

<sup>3</sup>Anteil der identischen Aminosäuren

Jede der drei Cytochrom *c* Domänen enthält eine Häm-Gruppe, die über ein CxxCH-Motiv kovalent an das Protein gebunden ist. Dieses CxxCH-Motiv dient als Erkennungssequenz für *c*-Typ Cytochrome und ist daher charakteristisch (Wood, 1983;

Wood, 1991; Barker und Ferguson, 1999). Der Histidinrest dieses Motivs bildet mit einem Stickstoff Atom des Imidazol Rings einen axialen Liganden des Eisens der Häm-Gruppe.



**Abbildung 41:** Bänderdarstellung von SoxXA. SoxXA ist ein Heterodimer bestehend aus SoxX (blau) und SoxA. SoxA besteht aus zwei Cytochrom *c* Domänen, einer N-terminalen SoxAN (orange) und einer C-terminalen SoxAC (grün). SoxAN und SoxAC können durch eine Drehung um eine zwei-zählige Achse (⊙) aufeinander gelegt werden. Der N- und C-Terminus von SoxA (beide in grau dargestellt) sind nicht Teil der typischen Cytochrom *c* Domänen. Die Häm-Gruppen sind als Stäbchen dargestellt.

#### 4.2.3.1 SoxA Untereinheit

SoxA ist physiologisch und strukturell verwandt mit SoxA aus *R. sulfidophilum* (Bamford *et al.*, 2002b). Zu anderen Proteinen mit zwei Cytochrom *c* Domänen (Fulop *et al.*, 1995; Kadziola und Larsen, 1997) wurden keine strukturellen Homologien gefunden. Die Cytochrom *c* Domänen SoxAN (Reste 81 bis 180) und SoxAC (Reste 181 bis 280) können durch eine Drehung um eine zwei-zählige Achse übereinander gelegt werden (Abbildung 41). Dabei sind SoxAN und SoxAC strukturell sehr ähnlich mit einem r.m.s.d der 60 % strukturell übereinstimmenden  $C_{\alpha}$ -Atome von 1.5 Å (Programm MAPS (Zhang *et al.*, 2003)). Die N-terminale Region (Reste 27-80) und die C-terminale Region (281-290) zeigen keine bekannte Domänenfaltung, interagieren aber intensiv mit der SoxAC Domäne und könnten so diese spezielle Dihäm Cytochrom *c* Faltung analog zu SoxAX aus *R. sulfidophilum* stabilisieren (Bamford *et al.*, 2002b).

Das Histidin des CxxCH Häm-Bindungsmotivs bildet jeweils einen axialen Liganden der Häm-Eisenatome. Der zweite axiale Ligand wird von je einem Cystein gebildet (Cys143 und Cys251). Zwischen Cys251 und dem Häm-Eisen wurde zusätzliche Elektronendichte

beobachtet, die als posttranslationale Modifikation des Cystein zu Cysteinpersulfid (Cys-S-SH) interpretiert wurde (siehe auch 4.2.4). Aufgrund dieser posttranslationalen Modifikation wurde angenommen, dass das aktive Zentrum von SoxXA an Häm2 lokalisiert ist, was durch spektroskopische Daten und die Kristallstruktur von SoxAX aus *R. sulfidophilum* bekräftigt wurde (Cheesman *et al.*, 2001; Bamford *et al.*, 2002b).

Das Vorkommen von Cysteinat als Häm-Eisenliganden ist ungewöhnlich und wurde neben SoxAX aus *R. sulfidophilum* (Bamford *et al.*, 2002b) nur in Cystathionin  $\beta$ -Synthetase, Cytochrom P450 und dem Kohlenstoffmonooxid Sensor CoxA beschrieben (Ojha *et al.*, 2000). Neben Cystathionin  $\beta$ -Synthetase (Meier *et al.*, 2001) ist SoxXA das einzig beschriebene Häm-Protein mit Histidin/Cystein Eisenligation. Von SoxXA wird angenommen, dass es nicht nur ein Elektronentransporter ist oder eine Speicherfunktion für Elektronen hat, sondern außerdem enzymatisch aktiv ist. An Häm2 bildet Cys251 wahrscheinlich das aktive Zentrum von SoxXA. Die vorgeschlagene Reaktion katalysiert die Bindungsbildung zwischen Cys138 von SoxY und einer reduzierten Schwefelverbindung (Abbildung 10 und Kapitel 4.2.5). Der vorgeschlagene Mechanismus für diese Reaktion läuft über eine kovalente Zwischenstufe, für die Cys251 vorgeschlagen wurde (Cheesman *et al.*, 2001; Bamford *et al.*, 2002a). Auch bei Cystathionin  $\beta$ -Synthetase wird die Bildung einer Schwefelbindung katalysiert. Ob diese Reaktion auch über eine kovalente Zwischenstufe mit einer Disulfidbindung abläuft, ist nicht bekannt (Ojha *et al.*, 2000).

Als Grund für das Vorkommen von Multihäm-Proteinen wird unter anderem die Möglichkeit der räumlichen Annäherung und der relativen Anordnung der Häm-Gruppen zueinander diskutiert (Barker and Ferguson, 1999). Dadurch ist es möglich, spezielle Eigenschaften für diese Proteine zu erreichen. In Elektronentransportproteinen kann durch die richtige Anordnung der Häm-Gruppen eine Art „molekularer Draht“ erreicht werden, der Elektronen über größere Strecken durch ein Protein zu wandern erlaubt (Taylor *et al.*, 1999; Bamford *et al.*, 1999). Die relative Orientierung der Cytochrom *c* Domänen SoxAN und SoxAC führen allerdings dazu, dass die Häm-Gruppen einen Abstand von ca. 24 Å haben, was für ein Tunneln der Elektronen zwischen Häm1 und Häm2 ohne zusätzliche Cofaktoren zu groß ist (Page *et al.*, 2003). Auf den Elektronentransport in SoxXA wird in Kapitel 4.2.6 ausführlich eingegangen.

Sequenzvergleiche mit SoxA aus *Rhodospseudomonas palustris*, *Chlorobium limicola* oder *Starkea novella* zeigen das Fehlen des Häm1-Bindungsmotivs CxxCH, was eine Häm-Bindung verhindert (Bamford *et al.*, 2002a; Kappler *et al.*, 2004). An Stelle der Häm-Bindung kommt es zu einer Disulfidbindung zwischen dem verbleibendem Cystein des Häm-

Bindungsmotivs und dem konservierten Cystein, das bei SoxA aus *P. pantotrophus* einen axialen Liganden für das Eisen darstellt (Klarskov *et al.*, 1998; Kappler *et al.*, 2004).

Biochemische und biophysikalische Untersuchungen konnten SoxAN bis heute keine Funktion zuordnen, und auch anhand der Struktur konnte keine Funktion abgeleitet werden. Der Abstand zwischen Häm1 und Häm2 ist zu groß, als dass zwischen diesen prostetischen Gruppen Elektronen tunneln könnten. Außerdem ist Häm1 nicht über alle Organismen mit einem Sox System konserviert, was Unterschiede in der physiologischen Funktion von SoxXA in den verschiedenen Organismen bedeuten würde.

#### 4.2.3.2 SoxX Untereinheit

Bei SoxX handelt es sich um ein Monohäm Cytochrom *c* (Murzin *et al.*, 1995). Die axialen Liganden des Häm3-Eisens werden von His65 des CxxCH-Motivs und Met111 gebildet. Bei einer Histidin-Methionin Koordination ist im Vergleich zu einer Histidin-Histidin Koordination der oxidierte Zustand des *c*-Typ Cytochroms destabilisiert. Dadurch kommt es zu einem relativ positiven Potential bei dieser Klasse an *c*-Typ Cytochromen, weshalb diese häufig in Elektronentransportketten zum Einsatz kommen (Barker and Ferguson, 1999). Neben der axialen Koordination haben aber auch andere Faktoren wie Lösungsmittelzugang (Tezcan *et al.*, 1998) oder die kovalente Bindung der Häm-Gruppe einen Einfluss auf das Redoxpotential (Barker and Ferguson, 1999). Für Häm3 wird eine Funktion im Elektronentransport oder als Elektronenspeicher diskutiert (siehe 4.2.6).

#### 4.2.4 Aktives Zentrum von SoxXA

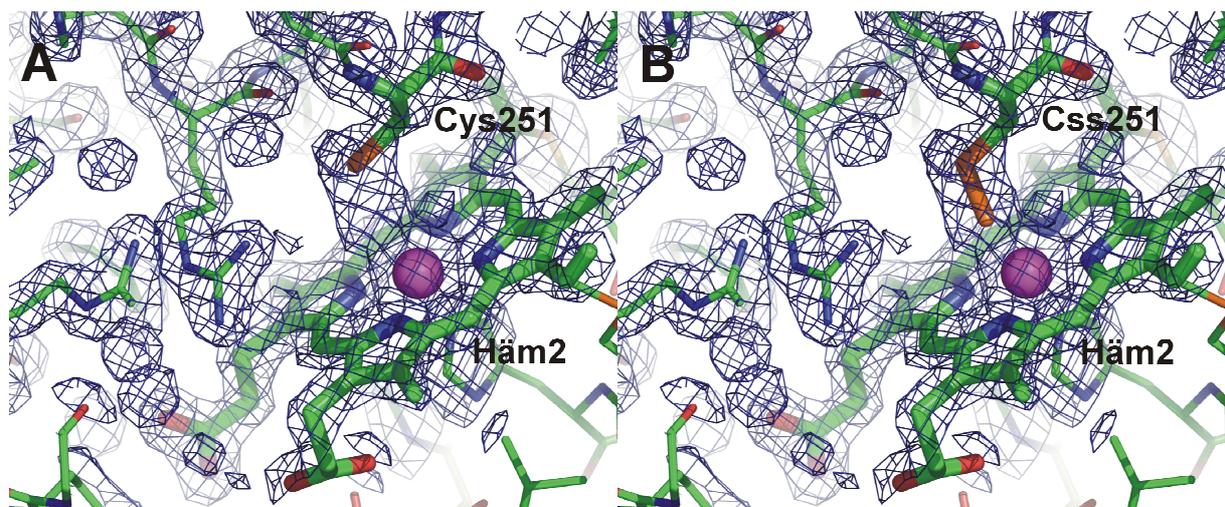
SoxXA oxidiert im Ensemble mit den anderen Enzymen des Sox-Clusters reduzierte Schwefelverbindungen *in vitro* zu Sulfat (Friedrich *et al.*, 2000). Nachgewiesen wird diese Oxidation zurzeit durch die Reduktion von Pferdeherz Cytochrom *c* (Wodara *et al.*, 1997). Für diese Oxidations wurde in der Gruppe um Prof. Friedrich ein Reaktionszyklus vorgeschlagen (Abbildung 10 (Friedrich *et al.*, 2001)). Dieser Prozess der Schwefeloxidation ist bis heute noch nicht im Detail verstanden. Es war zum Beispiel noch nicht möglich die einzelnen Reaktionen dieses Zyklus getrennt zu betrachten.

Frühere Experimente (Friedrich *et al.*, 2000) schlugen für SoxXA in diesem Zyklus Enzymaktivität vor. Es soll verschiedene reduzierte Schwefelverbindungen an das Thiol eines Cysteinrestes von SoxY kovalent binden. In der vorgeschlagenen Reaktion werden zwei Elektronen frei, die *in vitro* auf Pferdeherz Cytochrom C übertragen werden. Auch diese

Reaktion ist wie die Reaktionen der anderen Sox-Proteine noch nicht im Detail verstanden. Man geht davon aus, dass das aktive Zentrum von Häm2 und seinen axialen Liganden gebildet wird (Abbildung 41 (Cheesman *et al.*, 2001; Bamford *et al.*, 2002b)). Es gibt bis heute allerdings keinen experimentellen Beweis, ob auch die zwei anderen Häm-Gruppen in den Elektronentransfer involviert sind, und ob die vorgeschlagene Reaktion wirklich katalysiert wird.

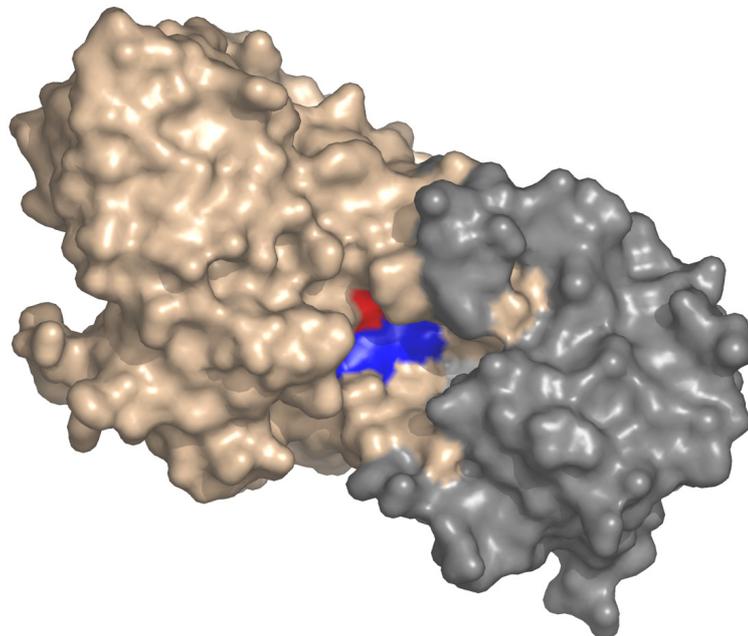
Spektroskopische Analysen von SoxAX aus *R. sulfidophilum* schlagen ein Cysteinpersulfid (Cys-S-SH) als posttranslationale Modifikation an Position 248 von SoxA als axialen Liganden von Häm2 vor (Cheesman *et al.*, 2001), was auch durch die Kristallstruktur bestätigt wurde (Bamford *et al.*, 2002b). In SoxA aus *P. pantotrophus* kann man ebenfalls zusätzliche Elektronendichte zwischen dem äquivalenten Thiol von Cys251 und dem Eisen der Häm2-Gruppe beobachten (Abbildung 42 A). Mit einem Cysteinpersulfid an Position 251 (Css251, Abbildung 42 B) analog zu der vorgeschlagenen posttranslationalen Modifikation bei SoxA in *R. sulfidophilum*, konnte die Elektronendichte hinreichend beschrieben werden.

Eine andere denkbare posttranslationale Modifikation mit nahezu identischer Geometrie wäre eine Oxidation des Thiols zu Cystein Sulfensäure (Cys-S-OH). Das Sauerstoffatom ist allerdings nicht elektronenreich genug, um die Elektronendichte zwischen Häm2 und Cys251 ausreichend zu beschreiben. Andere mögliche posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Cysteinsulfonsäure (Cys-S-SO<sub>2</sub>OH) konnten schon aufgrund ihrer erwarteten Geometrie ausgeschlossen werden. Somit blieb Cysteinpersulfid als mögliche posttranslationale Modifikation.



**Abbildung 42:** Phasengewichtete Elektronendichtekarte ( $2mF_o-DF_c$ ) um das vorgeschlagene aktive Zentrum. (A) Das Modell beschreibt die Elektronendichte mit einem Cysteinrest an Position 251 nicht ausreichend. (B) Mit einer posttranslationalen Modifikation des Cysteins an Position 251 zu Cysteinpersulfid (Css251) wird die Elektronendichte hinreichend beschrieben.

Das aktive Zentrum liegt am Boden einer großen von außen zugänglichen breiten Furche zwischen den Untereinheiten SoxX und SoxA (Abbildung 43). Mit einem Durchmesser von bis zu 20 Å bietet die Tasche Platz für sehr große Substrate, wie die Wechselwirkung mit Proteinen. Auf die möglichen Wechselwirkungen mit Proteinen und auf einen möglichen Reaktionsmechanismus wird in Kapitel 4.2.5 näher eingegangen. In der Tasche gibt es aber auch schmale Spalten und Vertiefungen, die genügend Koordinationsstellen für kleine Substrate, wie sie anorganische Schwefelverbindungen sind, darstellen können. Ferner könnten diese Spalten und Vertiefungen auch für die Spezifität hinsichtlich der Aminosäuresequenz bei der Wechselwirkung mit anderen Proteinen verantwortlich sein.

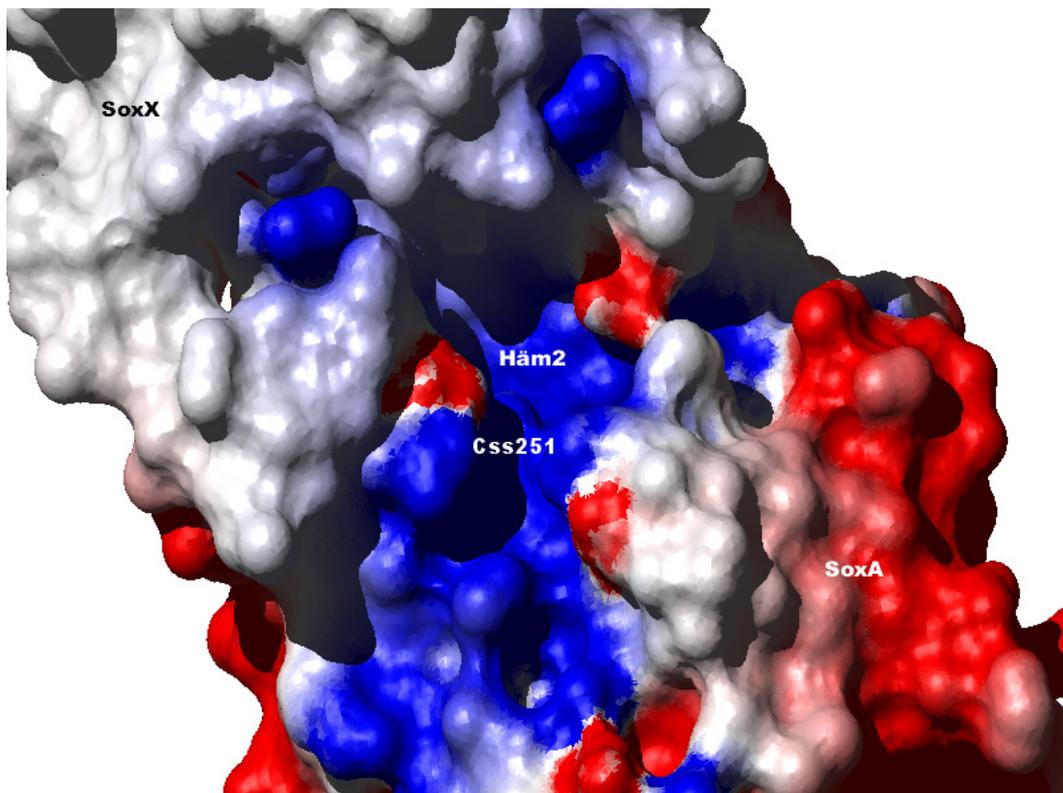


**Abbildung 43:** Oberflächendarstellung von SoxXA. Die Häm2-Gruppe (blau) und der posttranslational modifizierte Rest Cys251 (rot) bilden das aktive Zentrum. Es liegt am Boden einer breiten Furche zwischen den Untereinheiten SoxX (grau) und SoxA (braun).

In direkter Nachbarschaft zum aktiven Zentrum kann man mehrere basische Aminosäuren finden, die um das aktive Zentrum um Häm2 ein positives Oberflächenpotential bilden (Abbildung 44). Betrachtet man die möglichen Substrate Thiosulfat, Sulfit, molekularer Schwefel und Sulfid so liegen mit Ausnahme des molekularen Schwefels alle anderen unter physiologischen Bedingungen anionisch, das heißt mindestens einfach negativ geladen vor (Tabelle 7). Eine positive Ladung um das aktive Zentrum, wie sie bei SoxXA gefunden wird, ermöglicht die Annäherung des negativen Substrats an das aktive Zentrum.

**Tabelle 7:**  $pK_A$  Werte der möglichen Substrate der Oxidation durch das Sox System (Holleman und Wiberg, 1995).

	$pK_{A1}$	$pK_{A2}$
Thiosulfat	0.6	1.7
Sulfit	1.8	7.0
molekularer Schwefel	—	—
Sulfid	7.0	12.9



**Abbildung 44:** Oberflächenpotential Darstellung um das aktive Zentrum von SoxXA. Bereiche mit positivem Oberflächenpotential sind blau dargestellt, Bereiche mit negativem Oberflächenpotential sind rot eingefärbt. Um das aktive Zentrum um Häm2 finden sich viele basische Reste, die für ein positives Oberflächenpotential verantwortlich sind. Das Potential wurde mit dem Programm MOLMOL errechnet und graphisch umgesetzt (Koradi *et al.*, 1996).

Eine außergewöhnliche Eigenschaft des Sox Systems aus *P. pantotrophus* ist die Umsetzung einer Vielfalt von Substraten. Neben Thiosulfat wurde gezeigt, dass SoxXA, SoxYZ, SoxB und SoxCD in der Lage sind *in vitro* auch Sulfit, Sulfid und molekularen Schwefel umzusetzen (Friedrich *et al.*, 2000; Rother *et al.*, 2001). Die Zahl der produzierten und über Pferdeherz Cytochrom *c* nachgewiesenen Elektronen richtet sich dabei nach der Oxidationsstufe der Schwefelsubstrate. Die maximale Ausbeute von acht Elektronen konnte pro Molekül Thiosulfat erreicht werden; pro Schwefel- bzw. Sulfidatom konnten je vier Elektronen nachgewiesen werden. Die unvollständige Elektronenausbeute bei Sulfid konnte

allerdings bis heute nicht geklärt werden (Rother *et al.*, 2001). Neben der Zahl an produzierten Elektronen unterscheiden sich die unterschiedlichen Substrate Sulfid, Schwefel, Thiosulfat und Sulfit auch hinsichtlich der Umsatzgeschwindigkeit in einem Verhältnis von 1 : 0.63 : 0.39 : 0.17 (Rother *et al.*, 2001). Da bei dem vorgeschlagenen Reaktionszyklus für das Sox System die kovalente Verknüpfung der reduzierten Schwefelverbindung an SoxYZ eine zentrale Rolle spielt, sollte SoxXA, das diese Reaktion katalysieren soll, wenigstens einen Einfluss auf die unterschiedlichen Umsatzgeschwindigkeiten haben. Die Unterschiede könnten sowohl mit einer unterschiedlichen Affinität des Substrats zu SoxXA als auch mit unterschiedlichen Umsatzgeschwindigkeiten stehen. Diese Frage ausschließlich anhand der Struktur zu klären, ist nicht möglich und es müssten weitere biochemische Daten gesammelt werden.

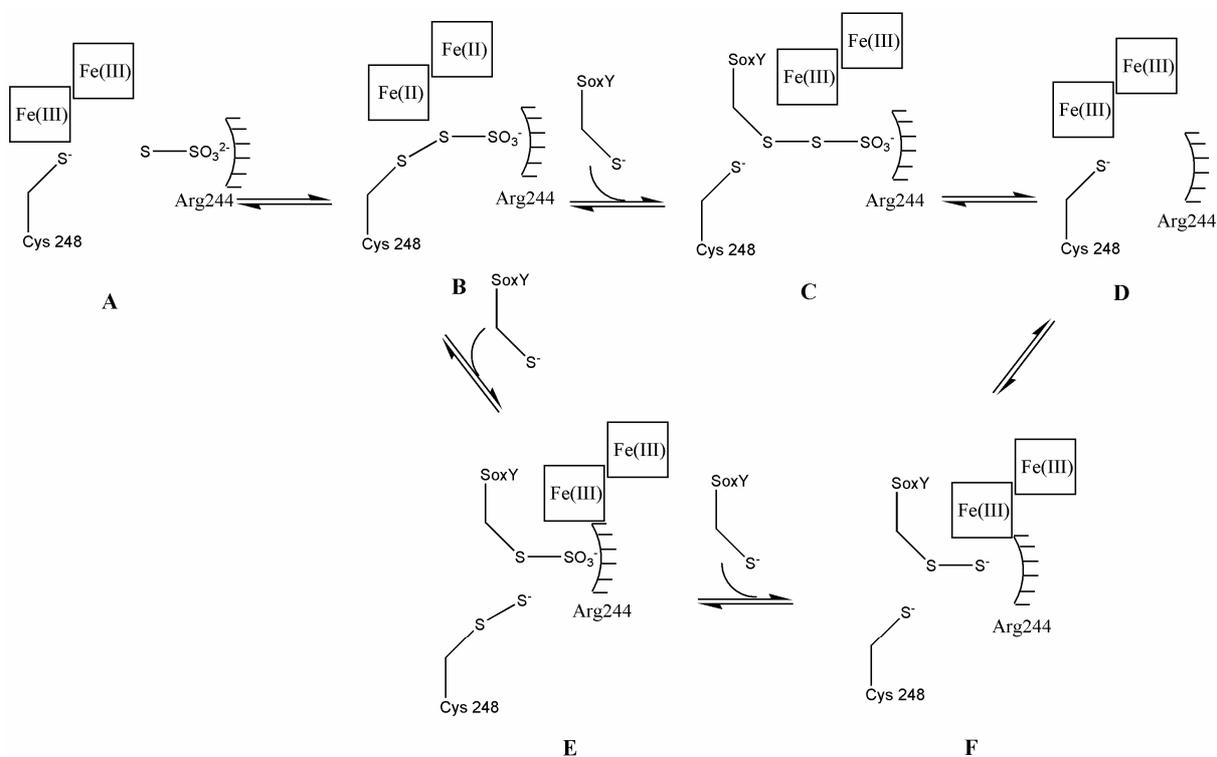
#### 4.2.5 Reaktionsmechanismus

Wie schon mehrfach erwähnt sind die Reaktionen zur Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen zu Sulfat durch lithotrophe und phototrophe Bakterien durch die Enzyme des Sox-Clusters zurzeit noch nicht vollständig verstanden. Auch war es bis heute nicht möglich, die Teilreaktionen getrennt voneinander zu untersuchen. Bei den Experimenten *in vitro* wurde die Reduktion von Pferdeherz Cytochrom *c* als Indikator für die Oxidation der reduzierten Schwefelverbindung und die Produktion von Elektronen verwendet. Von Prof. Friedrich wurde eine Hypothese zur Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen durch die Proteine des Sox-Clusters aufgestellt. SoxYZ spielt darin eine zentrale Rolle, da es mit den anderen Proteinen in Wechselwirkung tritt (Abbildung 10). Massenspektrometrische Untersuchungen lassen vermuten, dass Schwefelverbindungen in unterschiedlichen Oxidationsstufen an das Thiol von Cystein 138 von SoxY kovalent gebunden sind (Quentmeier and Friedrich, 2001). Für SoxXA wurde vorgeschlagen, die kovalente Verknüpfung unterschiedlichen Schwefelsubstrate an Cys138 von SoxY zu katalysieren.

Die Gruppe um Bamford und Berks hat einen Mechanismus vorgeschlagen, in dem SoxYZ als ein Heterodimer wirkt (Abbildung 45 (Bamford *et al.*, 2002b)). Bei diesem Reaktionsmechanismus wird in einem ersten Schritt die reduzierte Schwefelverbindung kovalent an SoxXA gebunden (**A**→**B**). Bei dieser kovalenten Verknüpfung werden zwei Elektronen frei, die *in vitro* an Pferdeherz Cytochrom C übertragen werden. SoxY tritt mit SoxXA in Wechselwirkung und die Thiosulfatgruppe wird auf einen Cysteinrest von SoxY übertragen (**B**→**C**). In einem letzten Schritt wird der Grundzustand von SoxXA wieder

hergestellt indem SoxY abdiffundiert. Alternativ zu dieser Reaktionssequenz schlägt die Gruppe um Bamford und Berks einen Transfer der Thiosulfat Gruppe in zwei Schritten auf zwei verschiedene SoxY Moleküle vor (**B**→**E**→**F**→**D**). Über diese Nebenreaktion kann das beobachtete Cysteinpersulfid im aktiven Zentrum erklärt werden (**E**).

Für das Sox-System aus *P. pantotrophus* wurden neben Thiosulfat weitere reduzierte Schwefelverbindungen wie Sulfit, Sulfid und molekulare Schwefel als Elektronenquellen für Pferdeherz Cytochrom *c* nachgewiesen (Friedrich *et al.*, 2000; Rother *et al.*, 2001). Die Übertragung eines Sulfids auf SoxY könnte analog der in Schritt **E**→**F** in Abbildung 45 beschriebenen Reaktion ablaufen.



**Abbildung 45:** Vorgeschlagener Mechanismus der kovalenten Verknüpfung von Thiosulfat durch SoxXA an SoxYZ. Thiosulfat bindet kovalent an das aktive Zentrum von SoxXA (**A**→**B**). SoxYZ dient als Substrat für SoxXA und die gebildeten Elektronen werden an einen Elektronenakzeptor übertragen (**B**→**C**). Durch Freisetzen von SoxY wird SoxXA wieder in seine Ursprungsform zurückversetzt (**C**→**D**). Alternativ kann eine Übertragung in zwei Schritten erfolgen. Hierbei werden eine Sulfidgruppe (**B**→**E**) und eine Sulfidgruppe (**E**→**F**) nacheinander auf zwei verschiedene SoxY Moleküle übertragen. Schritt **E** zeigt dabei das in der Kristallstruktur beobachtete Cysteinpersulfid (Bamford *et al.*, 2002b).

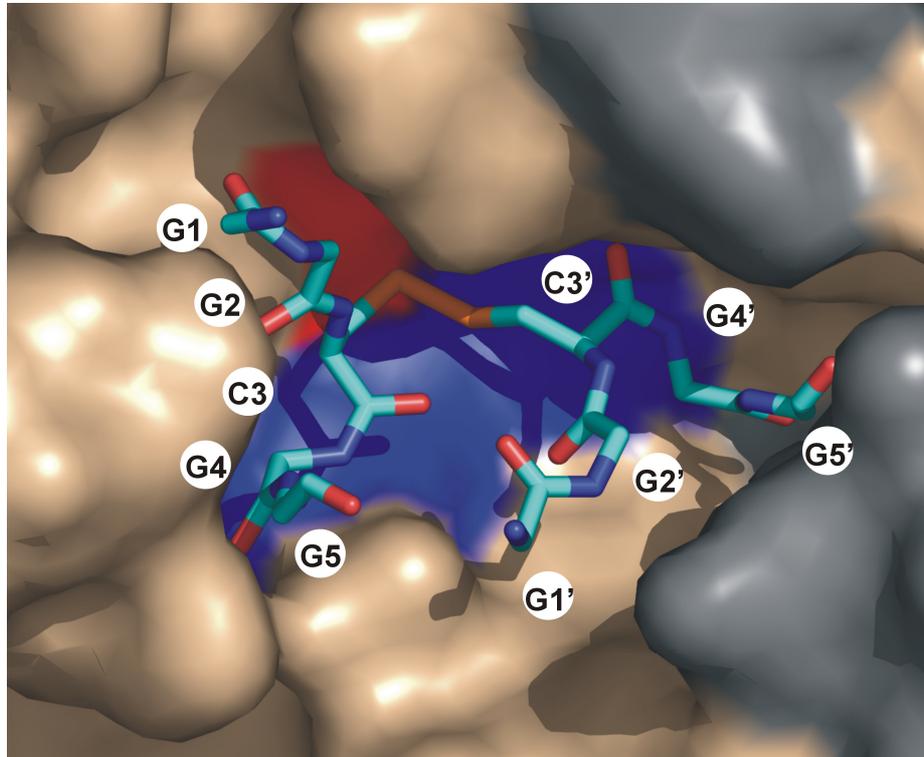
Für SoxYZ werden unterschiedliche quaternäre Strukturen beschrieben: eine tetramere Form mit nicht kovalent assoziierten Untereinheiten, Sox(YZ)<sub>2</sub> und verschiedene über Disulfidbindungen verbundene Dimere wie SoxY-Y, SoxY-Z und SoxZ-Z (Quentmeier *et al.*, 2003). Inkubation von gereinigtem und ansonsten unbehandeltem SoxYZ mit SoxB reduziert den Anteil von kovalent verbundenem heterodimerem SoxY-Z und erhöht den Anteil kovalent

verbundenem SoxY-Y Homodimer (Quentmeier *et al.*, 2003). Zusätzlich weisen massenspektrometrische Untersuchungen von SoxYZ auf verschiedene Schwefelverbindungen hin, die kovalent an SoxY gebunden sind. Von diesen posttranslationalen Modifikationen wird angenommen, dass sie an Cys138 von SoxY gebunden sind, da dies der einzige Cysteinrest in SoxY ist (Quentmeier and Friedrich, 2001). Inkubation mit Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) reduziert die Disulfidbindungen und führt zu homogenem, „nacktem“ SoxY ohne posttranslationalen Modifikationen. Interessanterweise zeigt TCEP behandeltes SoxYZ einen Aktivitätsverlust von 92 % im Vergleich zu SoxYZ, das nach der Anreicherung unbehandelt blieb. Deshalb stellte sich die Frage, ob in irgendeiner Art und Weise modifiziertes SoxYZ als Substrat für SoxXA dienen kann. Die „größte posttranslationale Modifikation“ an Cys138 von SoxY wäre eine Disulfidbindung zu einem anderen Protein. Es wurde daher untersucht, ob die Tasche um das aktive Zentrum groß genug ist, um 2 Peptide, die durch eine Disulfidbindung verbunden sind, zu beherbergen. Cys138 von SoxY sitzt in einem Glycin-reichen Motiv am C-Terminus (-GGCGG). Es wird angenommen, dass dieser Teil flexibel ist. Das über eine Disulfidbindung verbundene dimere Pentapeptid (GGCGG)<sub>2</sub> diene als Modell für ein SoxY-Y homodimeres Substrat.

Das dimere Pentapeptid wurde per Hand in die Tasche am aktiven Zentrum gelegt, wobei die Disulfidbindung in Wechselwirkungsnähe zu dem terminalen Schwefel des Cysteinpersulfid im aktiven Zentrum lag. Danach wurden die Bindungslängen, die Bindungswinkel und die Torsionswinkel über die Funktion der Strukturidealisierung des Programms REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) auf Idealwerte gesetzt. Diese Funktion optimierte die Struktur des Peptidmodells ohne Kristallographie Term, sondern lediglich nach energetischen Gesichtspunkten.

Abbildung 46 zeigt eine Möglichkeit, wie das kovalent verbundene dimere Pentapeptid in die Tasche gelegt werden kann, wobei die Disulfidbindung in Wechselwirkungsabstand zum aktiven Zentrum am terminalen Schwefel des Cys251 von SoxA liegt. Diese Konformation des Substratmodells muss nicht zwangsläufig richtig sein. Es gibt auch andere Möglichkeiten, wie dieses Substratanalogon in die Tasche des aktiven Zentrums gelegt werden kann. Man konnte mit diesen Experimenten aber zeigen, dass die Tasche um das aktive Zentrum groß genug ist, um ein mögliches SoxY-Y Homodimer als Substrat aufzunehmen. Wie weiter oben erwähnt, wurden auch andere posttranslationale Modifikationen an SoxY beobachtet. Bis auf die kovalente Verknüpfung zu SoxZ handelt es sich dabei ausschließlich um die Bindung kleiner anorganischer Schwefelverbindungen. Da diese alle kleiner sind als das Pentapeptid GGCGG fände auch in dieser Weise modifiziertes

SoxY ausreichend Platz, um in der Tasche um das aktive Zentrum zu binden. Welches das wahre Substrat für SoxXA ist, und wie dieses am aktiven Zentrum bindet, muss über weitere Experimente (unter anderem Cokristallisation) geklärt werden.

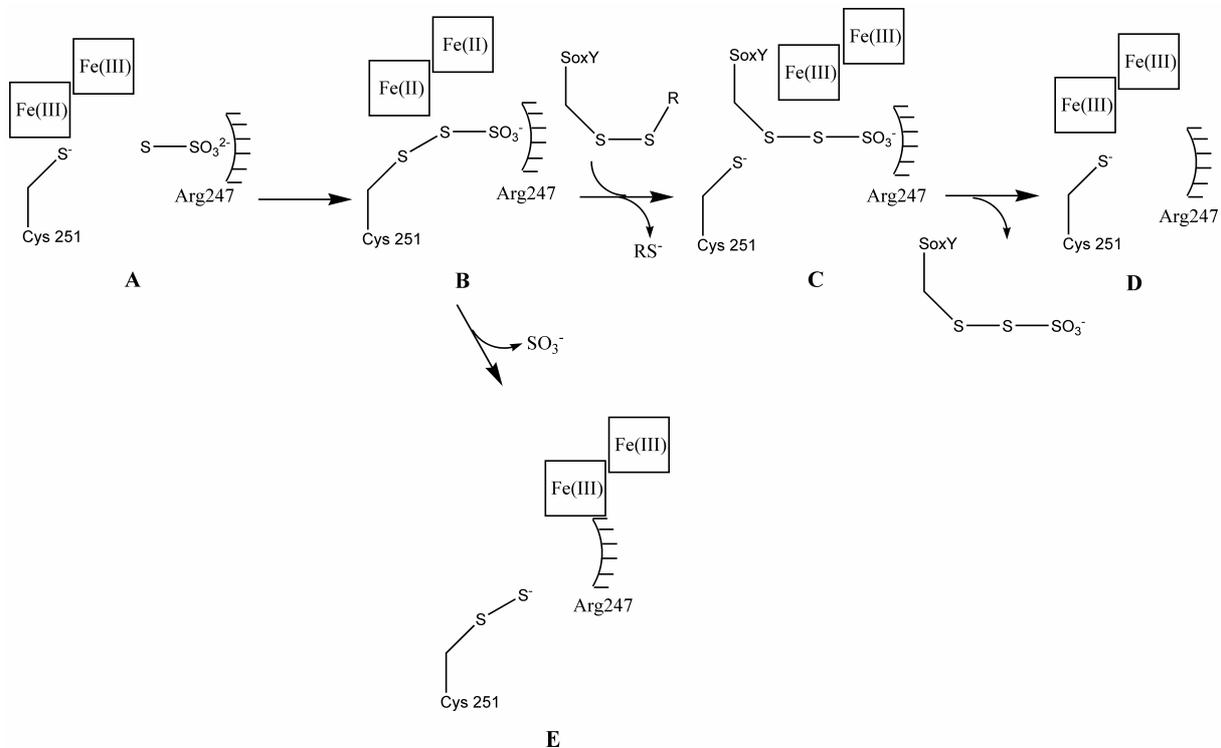


**Abbildung 46:** Oberflächendarstellung der Tasche um das aktive Zentrum von SoxXA in die das dimere Pentapeptid  $(GGCGG)_2$  (Stäbchen Präsentation) in einer möglichen Orientierung gelegt wurde. Das Pentapeptid stellt den C-Terminus von SoxY dar. Die Tasche liegt zwischen den Untereinheiten SoxX (grau) und SoxA (braun). Das aktive Zentrum wird von Häm2 (blau) und Cys251 (rot) gebildet. Die Orientierung des Substratanalogon stellt nur eine Möglichkeit von vielen dar. Es zeigt sich, dass in der Tasche um das aktive Zentrum ausreichend Platz ist, damit ein kovalent verbundenes SoxY-Y Homodimer als Substrat agieren kann.

Für den Fall, dass zwei kovalent verbundene SoxY-Moleküle als Substrat dienen, die in einer ähnlichen Form, wie das gezeigte dimere Pentapeptid  $(GGCGG)_2$  in die Tasche um das aktive Zentrum binden, wäre das aktive Zentrum für weitere kleine Moleküle nicht mehr zugänglich (Abbildung 46). Für dieses Szenario müsste eine sequenzielle Reaktion angenommen werden:

1. In einem ersten Schritt bindet die reduzierte Schwefelverbindung an das aktive Zentrum
2. Der Komplex zwischen SoxXA und SoxY-YZ<sub>2</sub> wird gebildet.
3. Die Schwefel Verbindung wird auf SoxY übertragen.

Aufgrund der beschriebenen Beobachtungen bezüglich an Cys138 posttranslational modifiziertem SoxY und dessen mögliche Wechselwirkung mit SoxXA wird im Folgenden ein alternativer Mechanismus für die Reaktion von SoxXA vorgestellt (Abbildung 47).



**Abbildung 47:** Vorschlag für einen alternativen Mechanismus. Ein posttranslational modifiziertes SoxY dient als Substrat für SoxXA. Die Elektronen, die bei der Bildung der kovalenten Bindung zwischen dem Thiosulfat und Cys251 (A→B) gebildet werden, werden im Enzym gelagert. In einem zweiten Schritt bindet posttranslational modifiziertes SoxY an das aktive Zentrum und die Thiosulfat Gruppe wird in einer Substitutionsreaktion übertragen. Dabei wird die posttranslationale Modifikation  $RS^-$  frei (B→C). SoxXA wird durch Abdiffundieren von  $SoxY-S-SO_3^-$  wieder regeneriert (C→D). In einer Nebenreaktion wird kovalent an SoxXA gebundenes Thiosulfat unter der Freisetzung von Sulfid reaktiv abgebaut (B→E). Das Resultat ist das beobachtete Cysteinpersulfid im aktiven Zentrum an Position 251 von SoxA (E).

In einem ersten Schritt (A→B) wird die reduzierte Schwefelverbindung (hier Thiosulfat) kovalent an das aktive Zentrum von SoxXA gebunden. Dabei werden zwei Elektronen frei, die im Enzym SoxXA gespeichert werden. Danach bindet posttranslational modifiziertes  $SoxY-S-S-R$  an SoxXA und in einer Substitutionsreaktion wird die Thiosulfatgruppe auf SoxY übertragen. Gleichzeitig wird die posttranslationale Modifikation von SoxY  $RS^-$  freigesetzt (B→C). In diesem Schritt werden die gespeicherten Elektronen den Produkten wieder zugeführt. In einem letzten Schritt diffundiert  $SoxYZ$  mit kovalent gebundenem Thiosulfat aus der Tasche und das aktive Zentrum von SoxXA wird so regeneriert (C→D). Die in der Kristallstruktur beobachtete posttranslationale Modifikation Cysteinpersulfid an Position 251 von SoxA könnte durch reaktiven Abbau entstehen (E).

In diesem alternativen Vorschlag für den Mechanismus oxidiert SoxXA ebenfalls eine reduziert Schwefelverbindung. Im Gegensatz zum Vorschlag von Bamford und Berks (Abbildung 45 (Bamford *et al.*, 2002b)), bei dem die gewonnenen Elektronen einem externen Elektronenakzeptor wie Pferdeherz Cytochrom *c in vitro* zugeführt werden, fließen sie hier in die Abgangsgruppe RS<sup>-</sup>.

Während der Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat durch SoxXA, SoxYZ, SoxB und SoxCD werden insgesamt acht Elektronen frei, für die *in vitro* Pferdeherz Cytochrom *c* als finaler Elektronenakzeptor dient. In der vorgeschlagenen Reaktionshypothese werden dabei sechs Elektronen durch die Oxidation mit SoxCD gebildet (Abbildung 10 (Friedrich *et al.*, 2000)). Für die verbleibenden zwei Elektronen wurde vorgeschlagen, dass sie während der kovalenten Verknüpfung von Thiosulfat an SoxY katalysiert durch SoxXA entstehen. In dem hier vorgeschlagenen alternativen Reaktionsmechanismus werden die gebildeten Elektronen auf das Produkt RS<sup>-</sup> übertragen, und stehen nicht mehr zur Reduktion von Pferdeherz Cytochrom *c in vitro* zur Verfügung. Die beiden Elektronen müssen in einer anderen Reaktion gebildet werden. Für den Fall, dass kovalent verknüpftes SoxY-Y Homodimer oder SoxY-YZ<sub>2</sub> Heterotetramer als Substrat für SoxXA dient, müsste eine andere Reaktion, die die Bildung der Disulfidbindung zwischen SoxY-Y katalysiert die Elektronen generieren. Um diese Frage zu klären, müssten der Reaktionszyklus (Abbildung 10) detaillierter untersucht und die Reaktionen im Einzelnen betrachtet werden.

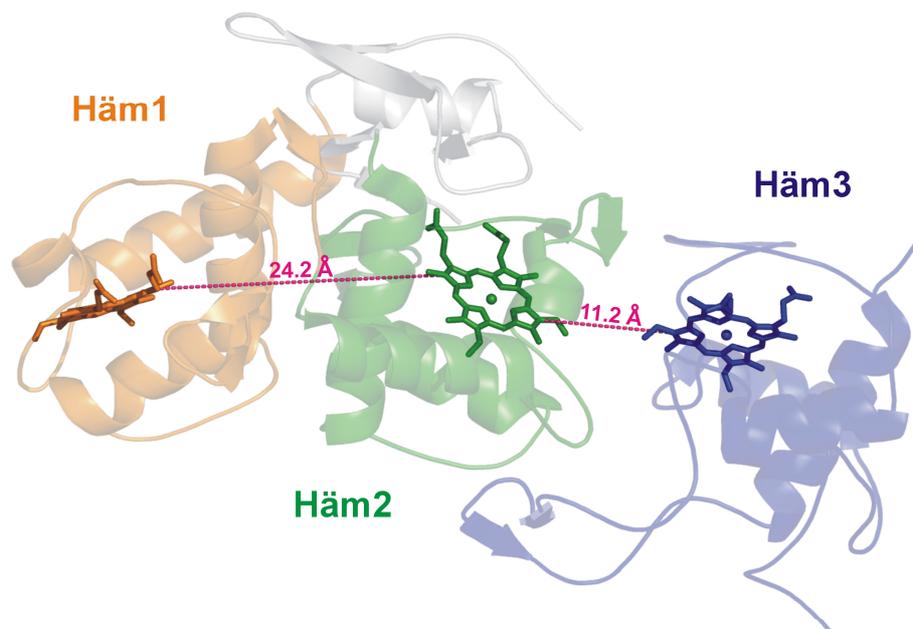
#### 4.2.6 Elektronentransport

Ganz egal, welchen der beiden vorgestellten Mechanismen (Abbildung 45 und Abbildung 47) man für den Schwefeltransfer betrachtet, im ersten Schritt werden in beiden Vorschlägen zwei Elektronen erzeugt. Erst danach unterscheidet sich bei den Mechanismen das Ziel der Elektronen. Die Kristallstruktur von SoxXA könnte Einblicke in den Elektronentransport innerhalb von SoxXA liefern. In dem vorgeschlagenen alternativen Mechanismus (Abbildung 47) werden im ersten Schritt zwei Elektronen erzeugt, die dann in SoxXA zwischengelagert und letztendlich auf die Abgangsgruppe RS<sup>-</sup> übertragen werden. Die möglichen Elektronenspeicher in SoxXA sind die Häm-Gruppen, wobei jede Häm-Gruppe in der Lage ist, ein Elektron aufzunehmen. Um die beiden erzeugten Elektronen zu speichern sind somit zwei Häm-Gruppen erforderlich. Zwei mögliche Wege sind für den Elektronentransport innerhalb von SoxXA ausgehend vom aktiven Zentrum bei Häm2 möglich (Abbildung 48). Der erste Weg führt zu Häm1, der zweite Weg führt zu Häm3. Über

kurze Distanzen bis 14 Å wurde ein Tunneln der Elektronen durch verschiedene Proteine beobachtet, ohne dass weitere Cofaktoren notwendig waren (Page *et al.*, 1999). In Tabelle 8 sind die Häm-Häm Abstände und Winkel zwischen den Häm-Gruppen zusammengefasst.

**Tabelle 8:** Beziehungen der Häm-Gruppen untereinander

	Häm1-Häm2	Häm2-Häm3
Fe-Fe Abstand [Å]	31.7	19.6
Porphorinring Abstand [Å]	24.2	11.2
Winkel zwischen Ebenen [°]	52.6	105.5



**Abbildung 48:** Geometrische Anordnung der Häm-Gruppen. Der Abstand zwischen Häm1 und Häm2 ist mit 24.2 Å für einen Elektronentransport ohne zusätzliche Cofaktoren zu groß. Der Abstand zwischen Häm2 und Häm3 liegt mit 11.2 Å in einem Bereich, durch den Elektronen ohne zusätzliche Cofaktoren tunneln können (Page *et al.*, 1999). Es ist deshalb anzunehmen, dass die Elektronen, die bei der oxidativen Verknüpfung von reduzierten Schwefelverbindungen an SoxY erzeugt werden, an Häm3 gespeichert werden, oder über Häm 3 abgeführt werden.

Mit einem Abstand des Porphorinring von etwa 25 Å zwischen Häm1 und Häm2 ist es eher unwahrscheinlich, dass der Elektronentransport auf dieser Route ohne zusätzliche Cofaktoren abläuft. Es scheint wahrscheinlicher, dass die Elektronen zu SoxX transportiert und dort gespeichert werden. Der Abstand zwischen Häm2 und Häm3 beträgt lediglich 11.3 Å.

---

Ähnliche Überlegungen können für den Mechanismus, den die Gruppe um Bamford und Berks vorgeschlagen haben, gemacht werden (Abbildung 45 (Bamford *et al.*, 2002a)). In diesem Zusammenhang ist auch erwähnenswert, dass der natürliche Elektronenakzeptor zurzeit noch unbekannt ist. Die Elektronen können vom aktiven Zentrum zum nahe gelegenen Häm3 transportiert werden und von dort auf einen Elektronenakzeptor übertragen werden. Eine Alternative wäre, dass die Elektronen bei Häm2 und Häm3 gespeichert werden, bis die Verknüpfung der reduzierten Schwefelverbindung mit SoxY komplett ist. Nachdem SoxY aus der Tasche um das aktive Zentrum abdiffundiert und das aktive Zentrum wieder zugänglich ist, könnte ein Elektronenakzeptor die Elektronen über Häm2 aufnehmen. Auch für diesen Mechanismus würde die Route über Häm1 zusätzliche Cofaktoren benötigen.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1 1,5-Anhydro-D-Fructose-Reduktase

1,5-Anhydro-D-Fructose-Reduktase (AFR) aus *S. morelense* S-30.7.5. ist ein Enzym, das in der Lage ist, unter Oxidation von NADPH das Kohlenhydratderivat 1,5-Anhydro-D-fructose (1,5-AF) zu 1,5-Anhydro-D-mannitol (1,5-AM) zu reduzieren. Obwohl AFR und ihre Substrate und Produkte (1,5-AF und 1,5-AM) eingehend untersucht und charakterisiert wurden, sind noch viele Fragen hinsichtlich Physiologie, Funktion und Mechanismus ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, das Protein AFR in Gegenwart von Cofaktor NADPH zu kristallisieren. Anhand von Fluoreszenzmessungen am Kristall konnte gezeigt werden, dass während der Kristallisation ein Großteil des Cofaktors bereits zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert worden war. Über Kristalle mit Selenomethionin substituierten Protein war es möglich, die Struktur von AFR anhand anomaler Dispersion aufzuklären. AFR besitzt zwei Domänen, eine N-terminale Domäne mit Rossmann-Faltung und eine  $\alpha/\beta$  C-terminale Domäne. AFR zeigt strukturelle Homologien zu Proteinen der GAPDH-Proteinfamilie in der SCOP-Datenbank (Murzin *et al.*, 1995). Trotz der geringen Sequenzidentität von 24 % ist AFR strukturell sehr ähnlich zur GFOR. Dagegen werden aufgrund fehlender Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz, keine strukturellen Homologien zu bisher charakterisierten eukaryontischen AFRn aus Schweineleber, Banane oder Fuchsschwanzgewächssamen erwartet.

Anhand der Struktur wurde die Natur der Cofaktorbindung der Rossmann-Faltungsdomäne untersucht. Zentrales Motiv der Rossmann-Faltungsdomäne ist ein so genanntes Fingerprint-Motiv, das bei Proteinen mit Rossmann-Faltung konserviert ist. AFR weist in diesem Fingerprint-Motiv eine ungewöhnlich hohe Zahl an Abweichungen von der Konsensussequenz auf. Es konnte aber anhand der Struktur gezeigt werden, dass der Cofaktor  $\text{NADP}^+$  trotz dieser Besonderheiten in gewohnter Form an die Rossmann-Faltungsdomäne bindet und die Vielzahl an Abweichungen von der Konsensussequenz scheinbar nur geringen Einfluss auf die Struktur der Rossmann-Faltungsdomäne von AFR und deren Bindungseigenschaften zum Cofaktor zu haben scheint. Welche Auswirkungen die Abweichungen im Fingerprint-Motiv im Einzelnen auf die Struktur und die Bindungseigenschaften zum Cofaktor haben, muss über Mutationsstudien zukünftig untersucht werden.

Aufgrund seiner engen Substratspezifität und der stereoselektiv katalysierten Reaktion hat AFR das Potential als Biokatalysator in der Kohlenhydratchemie eingesetzt zu werden. Aus Kostengründen ist eine Umwandlung der Cosubstratspezifität hin zu NADH-abhängiger Reduktion von Interesse. Die Struktur kann dabei als Ausgangspunkt für gezielte Mutationen dienen, um die Cosubstratspezifität diesbezüglich zu ändern.

Die C-terminale Domäne ist in strukturell homologen Proteinen der GAPDH-Proteinfamilie bei der Oligomerisierung beteiligt. In AFR-Kristallen wird über das C-terminale  $\beta$ -Faltblatt ein wichtiger Kristallkontakt vermittelt, der hinsichtlich seiner physiologischen Relevanz allerdings noch weiter untersucht werden muss.

Im aktiven Zentrum von AFR wird aufgrund von Vergleichen der Aminosäuresequenz und Struktur zu homologen Enzymen His180, anstelle eines bei NAD(H)- und NADP(H)-abhängigen Oxidoreduktasen weit verbreiteten Tyrosinrestes als Basenkatalysator erwartet. Die Reste Arg163 und Asp176 könnten aufgrund ihrer Lage an der Substratbindung beteiligt und für das enge Substratspektrum verantwortlich sein. Inwieweit der Austausch von Tyrosin durch ein Histidin im aktiven Zentrum Einfluss auf die Katalyse hat, und für die Funktion von AFR wichtig ist, müssen weitere Experimente zeigen.

## 5.2 SoxXA

*P. pantotrophus* ist in der Lage unter aerob-lithotrophen Bedingungen mit reduzierten Schwefelverbindungen als Elektronenquelle zu wachsen. Die Genregion, die für diese Fähigkeit verantwortlich ist, konnte identifiziert und charakterisiert werden. Sie besteht aus 15 Genen, von denen sieben für Proteine und Proteinkomplexe codieren, die *in vitro* notwendig sind, um reduzierte Schwefelverbindungen zu oxidieren. SoxXA nimmt in dem zurzeit diskutierten Mechanismus eine Schlüsselstellung ein, da es die kovalente Verknüpfung unterschiedlicher reduzierter Schwefelverbindungen an SoxYZ katalysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte SoxXA kristallisiert und mit Hilfe des homologen Enzyms SoxAX aus *R. sulfidophilum* die Struktur über molekularen Ersatz gelöst werden. SoxXA besitzt 2 Untereinheiten, ein Dihäm Cytochrom *c* SoxA und ein Monohäm Cytochrom *c* SoxX. Die Häm-Gruppen sind jeweils über Cytochrom *c* typische CxxCH-Motive kovalent an das Protein gebunden.

Das aktive Zentrum wird an Häm2 erwartet. Hier konnte auch eine posttranslationale Modifikation an Cys251 identifiziert werden, was ein Cysteinpersulfid im aktiven Zentrum zur Konsequenz hatte.

Das aktive Zentrum liegt in einer Tasche zwischen den Untereinheiten SoxX und SoxA. Aufgrund der Beobachtung von Dimeren des vermuteten Substrats SoxY im Periplasma von *P. pantotrophus* wurde untersucht, ob die Tasche, die das aktive Zentrum beherbergt, genug Raum bietet, um dimeres SoxY-Y als Substrat zu beherbergen, was der Fall ist. Aufgrund dieser Tatsache und verschiedener biochemischer Experimente wurde zum bestehenden Mechanismusvorschlag von Bamford *et al.* (2002b) eine Alternative formuliert. In dieser wirkt SoxY-Y Dimer anstatt SoxY Monomer als Substrat und tauscht in einer Substitutionsreaktion ein SoxY gegen eine reduzierte Schwefelverbindung aus. Bei dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus werden keine Elektronen der Atmungskette zugeführt. Bei beiden vorgeschlagenen Mechanismen werden Elektronen produziert. Die Unterschiede der Mechanismen bestehen unter anderem in den finalen Elektronenakzeptoren. Während im Mechanismusvorschlag von Bamford *et al.* (2002b) die Elektronen der Atmungskette zugeführt werden, fließen sie in dem hier vorgestellten Mechanismus in die Reaktionsprodukte zurück. Die produzierten Elektronen müssen kurzfristig im Enzym gespeichert werden, bzw. müssen an einen Elektronenakzeptor übertragen werden. Abmessungen zwischen den Häm-Gruppen haben ergeben, dass für eine solche Speicherfunktion oder als Zwischenstufe beim Elektronentransport Häm3 besser geeignet ist als Häm1.

Anhand der Kristallstruktur von SoxXA lässt sich nicht zweifelsfrei ableiten, wie der wahre Mechanismus der Schwefeloxidation durch das Sox-System zu formulieren ist. Um diese Frage zu beantworten, müssten weitere Experimente unternommen werden. Unter anderem ist geplant, die anderen Enzyme, die an der Schwefeloxidation durch den Sox-Zyklus beteiligt sind strukturell zu untersuchen. Insbesondere ist es aber von Nöten die Einzelreaktionen des Sox-Zyklus getrennt zu betrachten, um tiefere Einblicke in die Schwefeloxidation durch das Sox-System zu erhalten.

## 6 Literaturverzeichnis

Abrahams J.P. und Leslie A.G.W. (1996) Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase. *Acta Crystallographica Section D*, **52**, 30-42.

Ahren B., Holst J.J. und Yu S. (2000) 1,5-Anhydro-D-fructose increases glucose tolerance by increasing glucagon-like peptide-1 and insulin in mice. *Eur J Pharmacol*, **397**, 219-225.

Ahren, B. and Yu, S (2004) Use of a cyclic ether for the preparation of medicaments affecting glucose tolerance. US Pat. Appl. 20020198158

Alber T., Banner D.W., Bloomer A.C., Petsko G.A., Phillips D., Rivers P.S. und Wilson I.A. (1981) On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triose phosphate isomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **293**, 159-171.

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. und Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.

Andersen S.M., Lundt I., Marcussen J. und Yu S. (2002) 1,5-Anhydro-D-fructose; a versatile chiral building block: biochemistry and chemistry. *Carbohydr Res*, **337**, 873-890.

Appleman J.R., Howell E.E., Kraut J., Kuhl M. und Blakley R.L. (1988) Role of aspartate 27 in the binding of methotrexate to dihydrofolate reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **263**, 9187-9198.

Arias A., Gardiol A. und Martinez-Drets G. (1982) Transport and catabolism of D-mannose in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, **151**, 1069-1072.

Arimitsu E., Aoki S., Ishikura S., Nakanishi K., Matsuura K. und Hara A. (1999) Cloning and sequencing of the cDNA species for mammalian dimeric dihydrodiol dehydrogenases. *Biochem J*, **342 Pt 3**, 721-728.

Asada Y., Aoki S., Ishikura S., Usami N. und Hara A. (2000) Roles of His-79 and Tyr-180 of D-xylose/dihydrodiol dehydrogenase in catalytic function. *Biochem Biophys Res Commun*, **278**, 333-337.

Atkins P.W. (1990). *Physikalische Chemie*. 2.korrigierter Nachdruck der 1. Auflage. Edition VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Deutschland.

Baker N.A., Sept D., Joseph S., Holst M.J. und McCammon J.A. (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10037-10041.

Baker P.J., Britton K.L., Rice D.W., Rob A. und Stillman T.J. (1992) Structural consequences of sequence patterns in the fingerprint region of the nucleotide binding fold. Implications for nucleotide specificity. *J Mol Biol*, **228**, 662-671.

Bamford V., Dobbin P.S., Richardson D.J. und Hemmings A.M. (1999) Open conformation of a flavocytochrome c3 fumarate reductase. *Nat Struct Biol*, **6**, 1104-1107.

Bamford V.A., Berks B.C. und Hemmings A.M. (2002a) Novel domain packing in the crystal structure of a thiosulphate-oxidizing enzyme. *Biochem Soc Trans*, **30**, 638-642.

Bamford V.A., Bruno S., Rasmussen T., ppia-Ayme C., Cheesman M.R., Berks B.C. und Hemmings A.M. (2002b) Structural basis for the oxidation of thiosulfate by a sulfur cycle enzyme. *EMBO J*, **21**, 5599-5610.

Bardischewsky F. und Friedrich C.G. (2001) The shxVW locus is essential for oxidation of inorganic sulfur and molecular hydrogen by *Paracoccus pantotrophus* GB17: a novel function for lithotrophy. *FEMS Microbiol Lett*, **202**, 215-220.

Barker P.D. und Ferguson S.J. (1999) Still a puzzle: why is haem covalently attached in c-type cytochromes? *Structure Fold Des*, **7**, R281-R290.

Baute M.A., Baute R. und Deffieux G. (1988) Fungal enzymic activity degrading 1,4-[alpha]-glucans to 1,5--anhydrofructose. *Phytochemistry*, **27**, 3401-3403.

Baute M.A., Deffieux G. und Baute R. (1986) Bioconversion of carbohydrates to unusual pyrone compounds in fungi: Occurrence of microthecin in morels. *Phytochemistry*, **25**, 1472-1473.

Baute M.A., Deffieux G., Baute R., Badoc A., Vercauteren J., Leger J.M. und Neveu A. (1991) Fungal enzymic activity degrading 1,4-[alpha]-glucans to echinosporin (5-epipentenomycin I). *Phytochemistry*, **30**, 1419-1423.

Baute R., Baute M.A. und Deffieux G. (1987) Proposed pathway to the pyrones cortalcerone and microthecin in fungi. *Phytochemistry*, **26**, 1395-1397.

Bellamacina C.R. (1996) The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB J*, **10**, 1257-1269.

Berks B.C. (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol*, **22**, 393-404.

Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N. und Bourne P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, **28**, 235-242.

Bernhard M., Friedrich B. und Siddiqui R.A. (2000) *Ralstonia eutropha* TF93 is blocked in tat-mediated protein export. *J Bacteriol*, **182**, 581-588.

Birktoft J.J. und Banaszak L.J. (1983) The presence of a histidine-aspartic acid pair in the active site of 2-hydroxyacid dehydrogenases. X-ray refinement of cytoplasmic malate dehydrogenase. *J Biol Chem*, **258**, 472-482.

Bogsch E.G., Sargent F., Stanley N.R., Berks B.C., Robinson C. und Palmer T. (1998) An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J Biol Chem*, **273**, 18003-18006.

Bojsen K., Yu S., Kragh K.M. und Marcussen J. (1999) A group of alpha-1,4-glucan lyases and their genes from the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: purification, cloning, and heterologous expression. *Biochim Biophys Acta*, **1430**, 396-402.

- Borchard-Ott W. (1997). *Kristallographie - Eine Einführung für Naturwissenschaftler*. 5th Edition. Edition Springer, Berlin ; Heidelberg.
- Bourgeois D., Vernede X., Adam V., Fioravanti E. und Ursby T. (2002) A microspectrophotometer for UV-visible absorption and fluorescence studies of protein crystals. *Journal of Applied Crystallography*, **35**, 319-326.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brenner S.E., Chothia C., Hubbard T.J. und Murzin A.G. (1996) Understanding protein structure: using scop for fold interpretation. *Methods Enzymol*, **266**, 635-643.
- Brill W.J. (1975) Regulation and genetics of bacterial nitrogen fixation. *Annu Rev Microbiol*, **29**, 109-129.
- Broberg A., Kenne L. und Pedersen M. (1999) Analysis of 1,5-anhydro-D-fructose, microthecin, and 4-deoxy-glycero-hexo-2,3-diulose in algae using gas chromatography-mass spectrometry in selected ion monitoring mode. *Anal Biochem*, **268**, 35-42.
- Brown C.M. und Dilworth M.J. (1975) Ammonia assimilation by rhizobium cultures and bacteroids. *J Gen Microbiol*, **86**, 39-48.
- Brune D.C. (1989) Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. *Biochim Biophys Acta*, **975**, 189-221.
- Brunger A. (1993) Assessment of phase accuracy by cross validation: the free R value. Methods and applications. *Acta Crystallographica Section D*, **49**, 24-36.
- Brunger A.T. (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, **355**, 472-474.
- Brunger A.T. (1988) Crystallographic refinement by simulated annealing. Application to a 2.8 Å resolution structure of aspartate aminotransferase. *J Mol Biol*, **203**, 803-816.
- Brunger A.T., Adams P.D., Clore G.M., DeLano W.L., Gros P., Grosse-Kunstleve R.W., Jiang J.S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N.S., Read R.J., Rice L.M., Simonson T. und Warren G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54 ( Pt 5)**, 905-921.
- Brunger A.T., Krukowski A. und Erickson J.W. (1990) Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing. *Acta Crystallographica Section A*, **46**, 585-593.
- Brunger A.T. (1997). Free R value: Cross-validation in crystallography. *Methods in Enzymology*, **277**. Academic Press, pp. 366-396.
- Bruns C.M., Hubatsch I., Ridderstrom M., Mannervik B. und Tainer J.A. (1999) Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products. *J Mol Biol*, **288**, 427-439.

- Buchter-Larsen, A., Morgan, A. J., and Yu, S (2003) Ascopyrone synthase, 1,5-anhydro-D-fructose-dehydratase, process. US Pat.
- Buehner M., Ford G.C., Moras D., Olsen K.W. und Rossman M.G. (1973) D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: three-dimensional structure and evolutionary significance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **70**, 3052-3054.
- Buehner M., Ford G.C., Moras D., Olsen K.W. und Rossmann M.G. (1974a) Structure determination of crystalline lobster D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Mol Biol*, **82**, 563-585.
- Buehner M., Ford G.C., Olsen K.W., Moras D. und Rossman M.G. (1974b) Three-dimensional structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Mol Biol*, **90**, 25-49.
- Burnell J.N. und Holmes R.S. (1983) Purification and properties of sorbitol dehydrogenase from mouse liver. *Int J Biochem*, **15**, 507-511.
- Capela D., Barloy-Hubler F., Gouzy J., Bothe G., Ampe F., Batut J., Boistard P., Becker A., Boutry M., Cadieu E., Dreano S., Gloux S., Godrie T., Goffeau A., Kahn D., Kiss E., Lelaure V., Masuy D., Pohl T., Portetelle D., Puhler A., Purnelle B., Ramsperger U., Renard C., Thebault P., Vandenbol M., Weidner S. und Galibert F. (2001) Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9877-9882.
- Carter J. and Xiang S. (1997). Phase improvement using conditional probability methods: Maximum entropy solvent flattening and phase permutation. *Methods in Enzymology*, **277**. Academic Press, pp. 79-109.
- Chandra T.S. und Friedrich C.G. (1986) Tn5-induced mutations affecting sulfur-oxidizing ability (Sox) of *Thiosphaera pantotropha*. *J Bacteriol*, **166**, 446-452.
- Chase T., Jr. (1986) Mannitol-1-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Chemical properties and binding of substrates. *Biochem J*, **239**, 435-443.
- Cheesman M.R., Little P.J. und Berks B.C. (2001) Novel heme ligation in a c-type cytochrome involved in thiosulfate oxidation: EPR and MCD of SoxAX from *Rhodovulum sulfidophilum*. *Biochemistry*, **40**, 10562-10569.
- Chen R., Greer A. und Dean A.M. (1996) Redesigning secondary structure to invert coenzyme specificity in isopropylmalate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12171-12176.
- Chen R., Greer A.F. und Dean A.M. (1997) Structural constraints in protein engineering--the coenzyme specificity of *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase. *Eur J Biochem*, **250**, 578-582.
- Chenault H.K. und Whitesides G.M. (1987) Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl Biochem Biotechnol*, **14**, 147-197.
- Chumachenko Y.V., Sytnik A.I. und Demchenko A.P. (1990) The interaction of rabbit muscle aldolase with NADH. *Biochim Biophys Acta*, **1038**, 274-276.

Cohen B.E., Stoddard B.L. und Koshland D.E., Jr. (1997) Caged NADP and NAD. Synthesis and characterization of functionally distinct caged compounds. *Biochemistry*, **36**, 9035-9044.

Collaborative Computational Project Number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **50**, 760-763.

Cowtan K. (1994) DM. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography*, **31**, 34-38.

Cudney R., Patel S., Weisgraber K., Newhouse Y. und McPherson A. (1994) Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta Crystallographica Section D*, **50**, 414-423.

de La Fortelle E. and Bricogne G. (1997). Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods in Enzymology*, **276**. Academic Press, pp. 472-494.

Deffieux G., Baute R., Baute M.A., Atfani M. und Carpy A. (1987) 1,5--anhydrofructose, the precursor of the pyrone microthecin in *morchella vulgaris*. *Phytochemistry*, **26**, 1391-1393.

Delabar J.M., Martin S.R. und Bayley P.M. (1982) The binding of NADH and NADPH to bovine-liver glutamate dehydrogenase. Spectroscopic characterisation. *Eur J Biochem*, **127**, 367-374.

DeLano W.L. (2002). *DeLano Scientific*. <http://www.pymol.org>, San Carlos, CA, USA.

Derewenda Z.S. (2004) Rational protein crystallization by mutational surface engineering. *Structure (Camb)*, **12**, 529-535.

Didierjean C., Corbier C., Fatih M., Favier F., Boschi-Muller S., Branlant G. und Aubry A. (2003) Crystal structure of two ternary complexes of phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* with NAD and D-glyceraldehyde 3-phosphate. *J Biol Chem*, **278**, 12968-12976.

Drenth J. (1994). *Principles in Protein Crystallography*. 1st Edition. Edition Springer-Verlag, Inc., New York, USA.

Drenth J., Hol W.G., Jansonius J.N. und Koekoek R. (1972) A comparison of the three-dimensional structures of subtilisin BPN' and subtilisin novo. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **36**, 107-116.

Drenth J., Kalk K.H. und Swen H.M. (1976) Binding of chloromethyl ketone substrate analogues to crystalline papain. *Biochemistry*, **15**, 3731-3738.

Duax W.L., Pletnev V., Addlagatta A., Bruenn J. und Weeks C.M. (2003) Rational proteomics I. Fingerprint identification and cofactor specificity in the short-chain oxidoreductase (SCOR) enzyme family. *Proteins*, **53**, 931-943.

Egushi S.Y., Nishio N. und Nagai S. (1983) NADPH production from NADP+ by a formate-utilizing methanogenic bacterium. *Agric Biol Chem*, **47**, 2941-2943.

- Emerich D.W., Ruiz-Argueso T., Ching T.M. und Evans H.J. (1979) Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. *J Bacteriol*, **137**, 153-160.
- Engh R.A. und Huber R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallographica Section A*, **47**, 392-400.
- Entner N. und Doudoroff M. (1952) Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J Biol Chem*, **196**, 853-862.
- Ergan F., Thomas D. und Chang T.M. (1984) Selection and microencapsulation of an "NADH-oxidizing" bacterium and its use for NAD regeneration. *Appl Biochem Biotechnol*, **10**, 61-71.
- Ergan F., Thomas D. und Chang T.M. (1987) Immobilization of the bacterium *Leuconostoc mesenteroides* with NADH-oxidase function in matrix-supported microcapsules for continuous cofactor regeneration. *Ann N Y Acad Sci*, **501**, 372-376.
- Evans G. und Pettifer R.F. (2001) CHOOCH: a program for deriving anomalous-scattering factors from X-ray fluorescence spectra. *Journal of Applied Crystallography*, **34**, 82-86.
- Faber K. (1997). *Biotransformations in Organic Chemistry*. 3rd. Edition Springer-Verlag, Berlin.
- Farrand S.K., Van Berkum P.B. und Oger P. (2003) *Agrobacterium* is a definable genus of the family Rhizobiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, **53**, 1681-1687.
- Filling C., Berndt K.D., Benach J., Knapp S., Prozorovski T., Nordling E., Ladenstein R., Jornvall H. und Oppermann U. (2002) Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem*, **277**, 25677-25684.
- Finan T.M., Weidner S., Wong K., Buhrmester J., Chain P., Vorholter F.J., Hernandez-Lucas I., Becker A., Cowie A., Gouzy J., Golding B. und Puhler A. (2001) The complete sequence of the 1,683-kb pSymb megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9889-9894.
- Freimund S., Huwig A., Giffhorn F. und Kopper S. (1998) Rare Keto-Aldoses from Enzymatic Oxidation: Substrates and Oxidation Products of Pyranose 2-Oxidase. *Chem Eur J*, **4**, 2442-2455.
- Freimund S. und Kopper S. (2004) The composition of 2-keto aldoses in organic solvents as determined by NMR spectroscopy. *Carbohydr Res*, **339**, 217-220.
- Freimund S. und Kopper S. (1998) Dimeric structures of 1,5-anhydro--fructose. *Carbohydrate Research*, **308**, 195-200.
- Friedrich C.G. (1998) Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. *Adv Microb Physiol*, **39**, 235-289.
- Friedrich C.G. und Mitrenga G. (1981) Oxidation of thiosulfate by *Paracoccus denitrificans* and other hydrogen bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **10**, 209-212.

- Friedrich C.G., Quentmeier A., Bardischewsky F., Rother D., Kraft R., Kostka S. und Prinz H. (2000) Novel genes coding for lithotrophic sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J Bacteriol*, **182**, 4677-4687.
- Friedrich C.G., Rother D., Bardischewsky F., Quentmeier A. und Fischer J. (2001) Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl Environ Microbiol*, **67**, 2873-2882.
- Fulop V., Ridout C.J., Greenwood C. und Hajdu J. (1995) Crystal structure of the di-haem cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure*, **3**, 1225-1233.
- Galibert F., Finan T.M., Long S.R., Puhler A., Abola P., Ampe F., Barloy-Hubler F., Barnett M.J., Becker A., Boistard P., Bothe G., Boutry M., Bowser L., Buhrmester J., Cadieu E., Capela D., Chain P., Cowie A., Davis R.W., Dreano S., Federspiel N.A., Fisher R.F., Gloux S., Godrie T., Goffeau A., Golding B., Gouzy J., Gurjal M., Hernandez-Lucas I., Hong A., Huizar L., Hyman R.W., Jones T., Kahn D., Kahn M.L., Kalman S., Keating D.H., Kiss E., Komp C., Lelaure V., Masuy D., Palm C., Peck M.C., Pohl T.M., Portetelle D., Purnelle B., Ramsperger U., Surzycki R., Thebault P., Vandenbol M., Vorholter F.J., Weidner S., Wells D.H., Wong K., Yeh K.C. und Batut J. (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, **293**, 668-672.
- Garman E.F. und Doublet S. (2003). Cryocooling of Macromolecular Crystals: Optimization Methods. *Methods in Enzymology*, **368**. Academic Press, pp. 188-216.
- Garman E.F. und Schneider T.R. (1997) Macromolecular Cryocrystallography. *J Appl Cryst*, **30**, 211-237.
- Ghosh D., Pletnev V.Z., Zhu D.W., Wawrzak Z., Duax W.L., Pangborn W., Labrie F. und Lin S.X. (1995) Structure of human estrogenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase at 2.20 Å resolution. *Structure*, **3**, 503-513.
- Gonzalez A., Pedelacq J.D., Sola M., Gomis-Ruth F.X., Coll M., Samama J.P. und Benini S. (1999) Two-wavelength MAD phasing: in search of the optimal choice of wavelengths. *Acta Crystallographica Section D*, **55**, 1449-1458.
- Gouet P., Robert X. und Courcelle E. (2003) ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3320-3323.
- Guex N. und Peitsch M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.
- Hadfield A., Kryger G., Ouyang J., Petsko G.A., Ringe D. und Viola R. (1999) Structure of aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*, a key enzyme in the aspartate family of amino acid biosynthesis. *J Mol Biol*, **289**, 991-1002.
- Hadfield A., Shammas C., Kryger G., Ringe D., Petsko G.A., Ouyang J. und Viola R.E. (2001) Active site analysis of the potential antimicrobial target aspartate semialdehyde dehydrogenase. *Biochemistry*, **40**, 14475-14483.
- Hahn T. (2002). *International Tables for Crystallography*. 5th. Edition Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.

- Hanukoglu I. und Gutfinger T. (1989) cDNA sequence of adrenodoxin reductase. Identification of NADP-binding sites in oxidoreductases. *Eur J Biochem*, **180**, 479-484.
- Harrison A.P., Jr. (1984) The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Annu Rev Microbiol*, **38**, 265-292.
- Harrison D.H., Bohren K.M., Ringe D., Petsko G.A. und Gabbay K.H. (1994) An anion binding site in human aldose reductase: mechanistic implications for the binding of citrate, cacodylate, and glucose 6-phosphate. *Biochemistry*, **33**, 2011-2020.
- Hauptman H.A. (1997). Shake-and-bake: An algorithm for automatic solution ab initio of crystal structures. *Methods in Enzymology*, **277**. Academic Press, pp. 3-13.
- Hayashi T., Tanaka Y. und Kawashima K. (1979) Immobilization of microbial cells containing NAD-kinase. *Biotechnol Bioeng*, **21**, 1019-1030.
- Hendrickson W.A. und Lattman E.E. (1970) Representation of phase probability distributions for simplified combination of independent phase information. *Acta Crystallographica Section B*, **26**, 136-143.
- Hendrickson W. (1999) Maturation of MAD phasing for the determination of macromolecular structures. *Journal of Synchrotron Radiation*, **6**, 845-851.
- Hendrickson W.A. and Ogata C.M. (1997). Phase determination from multiwavelength anomalous diffraction measurements. *Methods in Enzymology*, **276**. Academic Press, pp. 494-523.
- Hendrickson W.A., Smith J.L., and Sheriff S. (1985). Direct phase determination based on anomalous scattering. *Methods in Enzymology*, **115**. Academic Press, pp. 41-55.
- Hentall P.L., Flowers N. und Bugg T.D. (2001) Enhanced acid stability of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) analogue. *Chem Commun (Camb)*, 2098-2099.
- Hillar A., Nicholls P., Switala J. und Loewen P.C. (1994) NADPH binding and control of catalase compound II formation: comparison of bovine, yeast, and Escherichia coli enzymes. *Biochem J*, **300 ( Pt 2)**, 531-539.
- Hol W.G., van Duijnen P.T. und Berendsen H.J. (1978) The alpha-helix dipole and the properties of proteins. *Nature*, **273**, 443-446.
- Holleman A.F. and Wiberg E. (1995). *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. 34. Edition.
- Holm L. und Sander C. (1993) Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J Mol Biol*, **233**, 123-138.
- Hossian N., Rozenski J., De Clercq E. und Herdewijn P. (1997) Synthesis and Antiviral Activity of the alpha-Analogues of 1,5-Anhydrohexitol Nucleosides (1,5-Anhydro-2,3-dideoxy-D-ribohexitol Nucleosides). *J Org Chem*, **62**, 2442-2447.
- Howlin B., Moss D.S. und Harris G.W. (1989) Segmented anisotropic refinement of bovine ribonuclease A by the application of the rigid-body TLS model. *Acta Crystallographica Section A*, **45**, 851-861.

- Hummel W. (1999) Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *Trends Biotechnol*, **17**, 487-492.
- Hummel W. (1997) New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **58**, 145-184.
- Hummel W. und Kula M.R. (1989) Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur J Biochem*, **184**, 1-13.
- Jancarik J. und Kim S.H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography*, **24**, 409-411.
- Jez J.M., Bennett M.J., Schlegel B.P., Lewis M. und Penning T.M. (1997) Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem J*, **326 ( Pt 3)**, 625-636.
- Johansson C., Pedersen A., Karlsson B.G. und Rydstrom J. (2002) Redox-sensitive loops D and E regulate NADP(H) binding in domain III and domain I-domain III interactions in proton-translocating Escherichia coli transhydrogenase. *Eur J Biochem*, **269**, 4505-4515.
- Johnson L.N., Jenkins J.A., Wilson K.S., Stura E.A. und Zanotti G. (1980) Proposals for the catalytic mechanism of glycogen phosphorylase beta prompted by crystallographic studies on glucose 1-phosphate binding. *J Mol Biol*, **140**, 565-580.
- Jones T.A., Zou J.Y., Cowan S.W. und Kjeldgaard M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and locations of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, **47**, 110-119.
- Jornvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., Gonzalezduarte R., Jeffery J. und Ghosh D. (1995) Short-Chain Dehydrogenases Reductases (Sdr). *Biochemistry*, **34**, 6003-6013.
- Junichi, A. and Hideto, I. (2003) Bacterial growth regulators or inhibitors with the use of 1,5-D-anhydrofructose. US Pat. Appl. 2003161862
- Kabsch W. (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography*, **26**, 795-800.
- Kabsch W. und Sander C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577-2637.
- Kadziola A. und Larsen S. (1997) Crystal structure of the dihaem cytochrome c4 from Pseudomonas stutzeri determined at 2.2A resolution. *Structure*, **5**, 203-216.
- Kametani S., Shiga Y. und Akanuma H. (1996) Hepatic production of 1,5-anhydrofructose and 1,5-anhydroglucitol in rat by the third glycogenolytic pathway. *Eur J Biochem*, **242**, 832-838.
- Kappler U., guey-Zinsou K.F., Hanson G.R., Bernhardt P.V. und McEwan A.G. (2004) Cytochrome c551 from Starkeya novella: characterization, spectroscopic properties, and phylogeny of a diheme protein of the SoxAX family. *J Biol Chem*, **279**, 6252-6260.
- Karplus P.A. und Schulz G.E. (1989) Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2 A resolution. *J Mol Biol*, **210**, 163-180.

- Kelly D.P. (1982) Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulphur. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **298**, 499-528.
- Kelly D.P., Shergill J.K., Lu W.P. und Wood A.P. (1997) Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **71**, 95-107.
- Kenkou, M. and Mami, F. (2003) Process for producing foods having good keeping qualities and food keeping agents. US Pat. Appl. 2003152676
- Kikuchi A., Park S.Y., Miyatake H., Sun D., Sato M., Yoshida T. und Shiro Y. (2001) Crystal structure of rat biliverdin reductase. *Nat Struct Biol*, **8**, 221-225.
- Kingston R.L., Scopes R.K. und Baker E.N. (1996) The structure of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*: an osmoprotective periplasmic enzyme containing non-dissociable NADP. *Structure*, **4**, 1413-1428.
- Kirkpatrick S., Gelatt C.D. und Vecchi M.P.Jr. (1983) Optimization by Simulated Annealing. *Science*, **220**, 680.
- Kirsch J.F., Eichele G., Ford G.C., Vincent M.G., Jansonius J.N., Gehring H. und Christen P. (1984) Mechanism of action of aspartate aminotransferase proposed on the basis of its spatial structure. *J Mol Biol*, **174**, 497-525.
- Kisker C., Schindelin H., Pacheco A., Wehbi W.A., Garrett R.M., Rajagopalan K.V., Enemark J.H. und Rees D.C. (1997) Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell*, **91**, 973-983.
- Klarskov K., Verte F., Van D.G., Meyer T.E., Cusanovich M.A. und Van B.J. (1998) The primary structure of soluble cytochrome c-551 from the phototrophic green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*, strain Tassajara, reveals a novel c-type cytochrome. *Biochemistry*, **37**, 10555-10562.
- Kleiger G. und Eisenberg D. (2002) GXXXG and GXXXA motifs stabilize FAD and NAD(P)-binding Rossmann folds through C(alpha)-H... O hydrogen bonds and van der waals interactions. *J Mol Biol*, **323**, 69-76.
- Kleywegt G.J. und Brunger A.T. (1996) Checking your imagination: applications of the free R value. *Structure*, **4**, 897-904.
- Kleywegt G.J. und Jones T.A. (1996a) Phi/psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure*, **4**, 1395-1400.
- Kleywegt G.J. und Jones T.A. (1996b) xdlMAPMAN and xdlDATAMAN - Programs for Reformatting, Analysis and Manipulation of Biomacromolecular Electron-Density Maps and Reflection Data Sets. *Acta Crystallographica Section D*, **52**, 826-828.
- Konishi Y., Hashima K. und Kishida K. (2000) Increases in 1,5-anhydroglucitol levels in germinating amaranth seeds and in ripening banana. *Biosci Biotechnol Biochem*, **64**, 2462-2465.
- Köpper S. und Freimund S. (2003) The Composition of Keto Aldoses in Aqueous Solution as Determined by NMR Spectroscopy. *Helvetica Chimica Acta*, **86**, 827-843.

Koradi R., Billeter M. und Wuthrich K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph*, **14**, 51-55.

Kühn, A. M. (2004) 1,5-Anhydro-D-fruktose-Reduktase aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5: Isolierung, Charakterisierung, Überexpression in *E.coli* sowie Verwendung als neuer Biokatalysator. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken

Kundrot C.E. (2004) Which strategy for a protein crystallization project? *Cell Mol Life Sci*, **61**, 525-536.

Kundrot C.E. (1997). Preparation and crystallization of RNA: A sparse matrix approach. *Methods in Enzymology*, **276**. Academic Press, pp. 143-157.

Lakowsky J.R. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd. Edition Kluwer/Plenum, New York.

Lane D.J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. In Stackebrandt,E. und Goodfellow,M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* Wiley & Sons, New York, USA, pp. 115-175.

Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S. und Thornton J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, **26**, 283-291.

Lattman E. (1985). Use of the rotation and translation functions. *Methods in Enzymology*, **115**. Academic Press, pp. 55-77.

Lee B. und Richards F.M. (1971) The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J Mol Biol*, **55**, 379-400.

Lehninger A.L. (1957). Preparation of reduced DPN (chemical method). *Methods in Enzymology*, **Volume 3**. Academic Press, pp. 885-887.

Lenz W. (1966) Malformations caused by drugs in pregnancy. *Am J Dis Child*, **112**, 99-106.

Leonida M.D. (2001) Redox enzymes used in chiral syntheses coupled to coenzyme regeneration. *Curr Med Chem*, **8**, 345-369.

Leslie A.G.W. (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography*, **26**.

Levy H.R., Vought V.E., Yin X. und Adams M.J. (1996) Identification of an arginine residue in the dual coenzyme-specific glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* that plays a key role in binding NADP<sup>+</sup> but not NAD<sup>+</sup>. *Arch Biochem Biophys*, **326**, 145-151.

Lichtenthaler F.W., El Ashry E.S.H. und Gockel V.H. (1980) A convenient access to 1,5-anhydroketoses. *Tetrahedron Letters*, **21**, 1429-1432.

Liese A., Seelbach K., and Wandrey C. (2000). *Industrial Biotransformations*. 1st. Edition VCH Verlag, Weinheim, Deutschland.

- Longenecker K.L., Garrard S.M., Sheffield P.J. und Derewenda Z.S. (2001) Protein crystallization by rational mutagenesis of surface residues: Lys to Ala mutations promote crystallization of RhoGDI. *Acta Crystallographica Section D*, **57**, 679-688.
- Lottspeich F. and Zorbas H. (1998). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, Deutschland.
- LOWRY O.H., PASSONNEAU J.V. und ROCK M.K. (1961) The stability of pyridine nucleotides. *J Biol Chem*, **236**, 2756-2759.
- Ludwig W., Mittenhuber G. und Friedrich C.G. (1993) Transfer of Thiosphaera pantotropha to Paracoccus denitrificans. *Int J Syst Bacteriol*, **43**, 363-367.
- Matthews B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, **33**, 491-497.
- McBride W.G. (1961) Thalidomide and congenital abnormalities. *The Lancet*, **2**, 1358.
- McPherson A. (1990) Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur J Biochem*, **189**, 1-23.
- McPherson A. (1985b). Crystallization of proteins by variation of pH or temperature. *Methods in Enzymology*, **114**. Academic Press, pp. 125-127.
- McPherson A. (1985c). Use of polyethylene glycol in the crystallization of macromolecules. *Methods in Enzymology*, **114**. Academic Press, pp. 120-125.
- McPherson A. (1985a). Crystallization of macromolecules: General principles. *Methods in Enzymology*, **114**. Academic Press, pp. 112-120.
- McRee D.E. (1999). *Practical Protein Crystallography*. 2nd Edition. Edition Academic Press, San Diego USA.
- Meier M., Janosik M., Kery V., Kraus J.P. und Burkhard P. (2001) Structure of human cystathionine beta-synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein. *EMBO J*, **20**, 3910-3916.
- Mittenhuber G., Sonomoto K., Egert M. und Friedrich C.G. (1991) Identification of the DNA region responsible for sulfur-oxidizing ability of Thiosphaera pantotropha. *J Bacteriol*, **173**, 7340-7344.
- Mittl P.R., Berry A., Scrutton N.S., Perham R.N. und Schulz G.E. (1993) Structural differences between wild-type NADP-dependent glutathione reductase from Escherichia coli and a redesigned NAD-dependent mutant. *J Mol Biol*, **231**, 191-195.
- Mittl P.R., Berry A., Scrutton N.S., Perham R.N. und Schulz G.E. (1994) Anatomy of an engineered NAD-binding site. *Protein Sci*, **3**, 1504-1514.
- Mo H., Winter H.C., Van Damme E.J., Peumans W.J., Misaki A. und Goldstein I.J. (2001) Carbohydrate binding properties of banana (Musa acuminata) lectin I. Novel recognition of internal alpha1,3-linked glucosyl residues. *Eur J Biochem*, **268**, 2609-2615.
- Morgan, A. J. and Yu, S (2003) Process Ascopyrone. US Pat. Appl. 2003232417

- Morris A.L., MacArthur M.W., Hutchinson E.G. und Thornton J.M. (1992) Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*, **12**, 345-364.
- Murata K., Kato J. und Chibata I. (1979) Continuous production of NADP by immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cells. *Biotechnol Bioeng*, **21**, 887-895.
- Murzin A.G., Brenner S.E., Hubbard T. und Chothia C. (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol*, **247**, 536-540.
- Nakamura K. und Matsuda T. (1998) Asymmetric reduction of ketones by the acetone powder of *Geotrichum candidum*. *J Org Chem*, **63**, 8957-8964.
- Nakamura, T., Akanuma, H., Naito, A., Yabuuchi, M., Takahashi, A., Tajima, S., Hashiba, M., and Kato, K. (1987) Method of quantitative assay for 1,5-anhydroglucitol. Eur Pat. Appl. EP213279
- Nakamura T., Naito A., Takahashi Y. und Akanuma H. (1986) Oxidation of 1,5-anhydro-D-glucitol to 1,5-anhydro-D-fructose catalyzed by an enzyme from bacterial membranes. *J Biochem (Tokyo)*, **99**, 607-613.
- Naylor C.E., Gover S., Basak A.K., Cosgrove M.S., Levy H.R. und Adams M.J. (2001) NADP<sup>+</sup> and NAD<sup>+</sup> binding to the dual coenzyme specific enzyme *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase: different interdomain hinge angles are seen in different binary and ternary complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 635-648.
- Notredame C., Higgins D.G. und Heringa J. (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*, **302**, 205-217.
- Ojha S., Hwang J., Kabil O., Penner-Hahn J.E. und Banerjee R. (2000) Characterization of the heme in human cystathionine beta-synthase by X-ray absorption and electron paramagnetic resonance spectroscopies. *Biochemistry*, **39**, 10542-10547.
- Oppenheimer N.J. und Kaplan N.O. (1974) Structure of the primary acid rearrangement product of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). *Biochemistry*, **13**, 4675-4685.
- Otwinowski Z. und Minor W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology*, **276**. Academic Press, pp. 307-326.
- Page C.C., Moser C.C., Chen X. und Dutton P.L. (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature*, **402**, 47-52.
- Page C.C., Moser C.C. und Dutton P.L. (2003) Mechanism for electron transfer within and between proteins. *Curr Opin Chem Biol*, **7**, 551-556.
- Pape T. und Schneider T.R. (2003) HKL2MAP. *personal communication*.
- Peitsch M.C. (1995) Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology*, **13**, 658-660.
- Perrakis A., Harkiolaki M., Wilson K.S. und Lamzin V.S. (2001) ARP/wARP and molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 1445-1450.

- Peters J. (1998). Dehydrogenases-Characteristics, design of reactions, conditions and applications. In Rehm,H.J., Reed,G., Pühler,A. und Stadler,P. (Eds.), *Biotechnology Biotransformations I*, **2nd edition**. Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland, pp. 392-474.
- Phillips C., Gover S. und Adams M.J. (1995) Structure of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Refined at 2 Å Resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **D51**, 290-304.
- Pierce A.C., Sandretto K.L. und Bemis G.W. (2002) Kinase inhibitors and the case for CH...O hydrogen bonds in protein-ligand binding. *Proteins*, **49**, 567-576.
- Pronk J.T., Meulenber R., Hazeu W., Bos P. und Kuenen J.G. (1990) Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiology Letters*, **75**, 293-306.
- Quentmeier A. und Friedrich C.G. (2001) The cysteine residue of the SoxY protein as the active site of protein-bound sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *FEBS Lett*, **503**, 168-172.
- Quentmeier A., Hellwig P., Bardischewsky F., Grelle G., Kraft R. und Friedrich C.G. (2003) Sulfur oxidation in *Paracoccus pantotrophus*: interaction of the sulfur-binding protein SoxYZ with the dimanganese SoxB protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **312**, 1011-1018.
- Radianingtyas H. und Wright P.C. (2003) Alcohol dehydrogenases from thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 593-616.
- Rafter G.W. and Colowick S.P. (1957). Enzymatic preparation of DPNH and TPNH. *Methods in Enzymology*, **Volume 3**. Academic Press, pp. 887-890.
- Rainey F.A., Kelly D.P., Stackebrandt E., Burghardt J., Hiraishi A., Katayama Y. und Wood A.P. (1999) A re-evaluation of the taxonomy of *Paracoccus denitrificans* and a proposal for the combination *Paracoccus pantotrophus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*, **49 Pt 2**, 645-651.
- Rajashankar K.R., Solorzano V., Kniewel R. und Lima C.D. (2004) Crystal Structure of a Putative Oxidoreductase (Virulence Factor Mvim Homolog). *To be published*.
- Ramakrishnan C. und Ramachandran G.N. (1965) Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units. *Biophys J*, **5**, 909-933.
- Rao S.T. und Rossmann M.G. (1973) Comparison of super-secondary structures in proteins. *J Mol Biol*, **76**, 241-256.
- Read R. (1986) Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Crystallographica Section A*, **42**, 140-149.
- Refdahl, C. and Morgan, A. J. (2003) Ascopyrone P synthase. US Pat. Appl. 2003170832
- Rehg J.E. und Torack R.M. (1977) Partial purification and characterization of sorbitol dehydrogenase from rat brain. *J Neurochem*, **28**, 655-660.

- Rhodes G. (2000). *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*. 2nd Edition. Edition Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo.
- Rimet O., Chauvet M., Sarrazin M. und Bourdeaux M. (1991) Conformational change induced by coenzyme binding to bovine liver dihydrofolate reductase: a spectrofluorimetric study. *Biochim Biophys Acta*, **1076**, 435-438.
- Robertson L.A. und Kuehnen J.G. (1983) *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov.: a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulfur bacterium. *J Gen Microbiol*, **129**, 2847-2855.
- Rodgers D.W. (1997). Practical cryocrystallography. *Methods in Enzymology*, **276**. Academic Press, pp. 183-203.
- Rodrigue A., Chanal A., Beck K., Muller M. und Wu L.F. (1999) Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *J Biol Chem*, **274**, 13223-13228.
- Rossello-Mora R. und Amann R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, **25**, 39-67.
- Rossmann M.G., Moras D. und Olsen K.W. (1974) Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, **250**, 194-199.
- Rother D., Henrich H.J., Quentmeier A., Bardischewsky F. und Friedrich C.G. (2001) Novel genes of the sox gene cluster, mutagenesis of the flavoprotein SoxF, and evidence for a general sulfur-oxidizing system in *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J Bacteriol*, **183**, 4499-4508.
- Rowland P., Basak A.K., Gover S., Levy H.R. und Adams M.J. (1994) The three-dimensional structure of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. *Structure*, **2**, 1073-1087.
- Sakai T., Uchida T. und Chibata I. (1973) Accumulation of nicotinamide adenin dinucleotide in baker's yeast by secondary culture. *Agric Biol Chem*, **37**, 1049-1056.
- Sakuma M., Kametani S. und Akanuma H. (1998) Purification and some properties of a hepatic NADPH-dependent reductase that specifically acts on 1,5-anhydro-D-fructose. *J Biochem (Tokyo)*, **123**, 189-193.
- Sawada H., Kuykendall L.D. und Young J.M. (2003) Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol*, **49**, 155-179.
- Schaeffer A.J., Amundsen S.K. und Jones J.M. (1980) Effect of carbohydrates on adherence of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells. *Infect Immun*, **30**, 531-537.
- Schauder S., Schneider K.H. und Giffhorn F. (1995) Polyol metabolism of *Rhodobacter sphaeroides*: biochemical characterization of a short-chain sorbitol dehydrogenase. *Microbiology*, **141 ( Pt 8)**, 1857-1863.

- Scheidig A.J. (1994) Crystallographic studies on p21(H-ras) using the synchrotron Laue method: improvement of crystal quality and monitoring of the GTPase reaction at different time points. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **50**, 512-520.
- Schlichting I., Almo S.C., Rapp G., Wilson K., Petratos K., Lentfer A., Wittinghofer A., Kabsch W., Pai E.F., Petsko G.A. und . (1990) Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature*, **345**, 309-315.
- Schmidt E., Blaser H.U., Fauqueux P.F., Sedlmeier G., and Spindler F. (1992). *Microbial Reagents in organic synthesis*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Schneider K.H. und Giffhorn F. (1989) Purification and properties of a polyol dehydrogenase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur J Biochem*, **184**, 15-19.
- Schneider T.R. und Sheldrick G.M. (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**, 1772-1779.
- Schomaker V. und Trueblood K.N. (1968) On the rigid-body motion of molecules in crystals. *Acta Crystallographica Section B*, **24**, 63-76.
- Schomaker V. und Trueblood K.N. (1998) Correlation of Internal Torsional Motion with Overall Molecular Motion in Crystals. *Acta Crystallographica Section B*, **54**, 507-514.
- Schute H., Flossdorf J., Sahm H. und Kula M.R. (1976) Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur J Biochem*, **62**, 151-160.
- Schuttelkopf A.W. und Van Aalten D.M. (2004) PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**, 1355-1363.
- Schwede T., Kopp J., Guex N. und Peitsch M.C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3381-3385.
- Scrutton N.S., Berry A. und Perham R.N. (1990) Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature*, **343**, 38-43.
- Senes A., Ubarretxena-Belandia I. und Engelman D.M. (2001) The Calpha ---H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9056-9061.
- Sheldrick G.M. (2003) SHELXC. *Universität Göttingen*.
- Sheldrick G.M. (2002) Macromolecular phasing with SHELXE. *Z Kristallogr*, **217**, 644-650.
- Shiga Y., Kametani S., Kadokura T. und Akanuma H. (1999) 1,5-Anhydroglucitol promotes glycogenolysis in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)*, **125**, 166-172.
- Somers W.S., Stahl M.L. und Sullivan F.X. (1998) GDP-fucose synthetase from *Escherichia coli*: structure of a unique member of the short-chain dehydrogenase/reductase family that catalyzes two distinct reactions at the same active site. *Structure*, **6**, 1601-1612.

- Somoza J.R., Menon S., Schmidt H., Joseph-McCarthy D., Dessen A., Stahl M.L., Somers W.S. und Sullivan F.X. (2000) Structural and kinetic analysis of Escherichia coli GDP-mannose 4,6 dehydratase provides insights into the enzyme's catalytic mechanism and regulation by GDP-fucose. *Structure Fold Des*, **8**, 123-135.
- Srinivasan R. (1966) Weighting functions for use in the early stage of structure analysis when a part of the structure is known. *Acta Crystallographica*, **20**, 143-144.
- Stehle T., Ahmed S.A., Claiborne A. und Schulz G.E. (1991) Structure of NADH peroxidase from Streptococcus faecalis 10C1 refined at 2.16 Å resolution. *J Mol Biol*, **221**, 1325-1344.
- Stoddard B.L., Cohen B.E., Brubaker M., Mesecar A.D. und Koshland D.E., Jr. (1998) Millisecond Laue structures of an enzyme-product complex using photocaged substrate analogs. *Nat Struct Biol*, **5**, 891-897.
- Stowers M.D. (1985) Carbon metabolism in Rhizobium species. *Annu Rev Microbiol*, **39**, 89-108.
- Straathof A.J., Panke S. und Schmid A. (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol*, **13**, 548-556.
- Streitwieser A., Heathcock C.H., and Kosower E.M. (1994). *Organische Chemie*. 2nd. Edition VCH, Weinheim, Deutschland.
- Stura E.A., Satterthwait A.C., Calvo J.C., Kaslow D.C. und Wilson I.A. (1994) Reverse screening. *Acta Crystallographica Section D*, **50**, 448-455.
- Sun D., Sato M., Yoshida T., Shimizu H., Miyatake H., Adachi S., Shiro Y. und Kikuchi A. (2000) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a rat biliverdin reductase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56 ( Pt 9)**, 1180-1182.
- Suye S. und Yokoyama S. (1985) NADPH production from NADP<sup>+</sup> using malic enzyme of *Achromobacter parvulus* IFO-13182. *Enzyme and Microbial Technology*, **7**, 418-424.
- Suzuki M., Kametani S., Uchida K. und Akanuma H. (1996) Production of 1,5-anhydroglucitol from 1,5-anhydrofructose in erythroleukemia cells. *Eur J Biochem*, **240**, 23-29.
- Taguchi T., Haruna M. und Okuda J. (1993) Effects of 1,5-anhydro-D-fructose on selected glucose-metabolizing enzymes. *Biotechnol Appl Biochem*, **18 ( Pt 3)**, 275-283.
- Tanaka N., Nonaka T., Nakanishi M., Deyashiki Y., Hara A. und Mitsui Y. (1996) Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 Å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family. *Structure*, **4**, 33-45.
- Taylor P., Pealing S.L., Reid G.A., Chapman S.K. und Walkinshaw M.D. (1999) Structural and mechanistic mapping of a unique fumarate reductase. *Nat Struct Biol*, **6**, 1108-1112.
- Terwilliger T. (2003a) Automated main-chain model building by template matching and iterative fragment extension. *Acta Crystallographica Section D*, **59**, 38-44.

- Terwilliger T. (2003b) Automated side-chain model building and sequence assignment by template matching. *Acta Crystallographica Section D*, **59**, 45-49.
- Terwilliger T. (2003c) Improving macromolecular atomic models at moderate resolution by automated iterative model building, statistical density modification and refinement. *Acta Crystallographica Section D*, **59**, 1174-1182.
- Tezcan F.A., Winkler J.R. und Gray H.B. (1998) Effects of Ligation and Folding on Reduction Potential of Heme Proteins. *J Am Chem Soc*, **120**, 13383-13388.
- Thomas L.V., Yu S., Ingram R.E., Refdahl C., Elsser D. und ves-Broughton J. (2002) Ascopyrone P, a novel antibacterial derived from fungi. *J Appl Microbiol*, **93**, 697-705.
- Thompson J.D., Higgins D.G. und Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.
- Toone E.J., Simon E.S., Bednarski M.D. und George M. (1989) Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Tetrahedron*, **45**, 5365-5422.
- Trakhanov S. und Quiococho F.A. (1995) Influence of divalent cations in protein crystallization. *Protein Sci*, **4**, 1914-1919.
- Van Aerschot, A. (2004) Alcylylated hexitol nucleoside analogues and oligomers thereof. US Pat.
- Vellieux F.M.D. and Read R.J. (1997). Noncrystallographic symmetry averaging in phase refinement and extension. *Methods in Enzymology*, **277**. Academic Press, pp. 18-53.
- Voet D. and Voet J.G. (1995). *Biochemistry*. 2nd Edition. Edition John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Vought V., Ciccone T., Davino M.H., Fairbairn L., Lin Y., Cosgrove M.S., Adams M.J. und Levy H.R. (2000) Delineation of the roles of amino acids involved in the catalytic functions of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, **39**, 15012-15021.
- Walsh M.A., Evans G., Sanishvili R., Dementieva I. und Joachimiak A. (1999) MAD data collection - current trends. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55 ( Pt 10)**, 1726-1732.
- Wang B.C. (1985). Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography. *Methods in Enzymology*, **115**. Academic Press, pp. 90-112.
- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimnot P.A.D., Kandler O., Krichevsky M., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P. und Trüpper H.G. (1987) Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int J Syst Bacteriol*, **37**, 463-464.
- Weiner J.H., Bilous P.T., Shaw G.M., Lubitz S.P., Frost L., Thomas G.H., Cole J.A. und Turner R.J. (1998) A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell*, **93**, 93-101.

- Weiss M.S., Brandl M., Suhnel J., Pal D. und Hilgenfeld R. (2001) More hydrogen bonds for the (structural) biologist. *Trends Biochem Sci*, **26**, 521-523.
- Werner D. (1987). *Pflanzliche und mikrobielle Symbiosen*. 1st. Edition Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.
- Whitby F.G., Phillips J.D., Hill C.P., McCoubrey W. und Maines M.D. (2002) Crystal structure of a biliverdin IXalpha reductase enzyme-cofactor complex. *J Mol Biol*, **319**, 1199-1210.
- Wiegert T., Sahn H. und Sprenger G.A. (1997) The substitution of a single amino acid residue (Ser-116 --> Asp) alters NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* into a glucose dehydrogenase with dual coenzyme specificity. *J Biol Chem*, **272**, 13126-13133.
- Wierenga R.K., De Maeyer M.C.H. und Hol W.G. (1985) Interaction of Pyrophosphate Moieties with alpha Helixes in Dinucleotide Binding Proteins. *Biochemistry*, **24**, 1346-1357.
- Wierenga R.K., Terpstra P. und Hol W.G. (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol*, **187**, 101-107.
- Wilmouth R.C., Clifton I.J. und Neutze R. (2000) Recent successes in time-resolved protein crystallography. *Nat Prod Rep*, **17**, 527-533.
- Winer A.D., Schwert G.W. und Millar D.B. (1959) Lactic dehydrogenase. VI. Fluorimetric measurements of the complex of enzyme and reduced diphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem*, **234**, 1149-1154.
- Winn M.D., Isupov M.N. und Murshudov G.N. (2001) Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 122-133.
- Winter R. and Noll F. (1998). *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Teubner Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Witcoff H.A. and Reuben B.G. (1996). *Industrial Organic Chemistry*.
- Wodara C., Bardischewsky F. und Friedrich C.G. (1997) Cloning and characterization of sulfite dehydrogenase, two c-type cytochromes, and a flavoprotein of *Paracoccus denitrificans* GB17: essential role of sulfite dehydrogenase in lithotrophic sulfur oxidation. *J Bacteriol*, **179**, 5014-5023.
- Wodara C., Kostka S., Egert M., Kelly D.P. und Friedrich C.G. (1994) Identification and sequence analysis of the soxB gene essential for sulfur oxidation of *Paracoccus denitrificans* GB17. *J Bacteriol*, **176**, 6188-6191.
- Woese C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, **51**, 221-271.
- Wong C.H. und Whitesides G.M. (1981) Enzyme-catalyzed organic synthesis: NAD(P)H cofactor regeneration by using glucose-6-phosphate and the glucose-5-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Am Chem Soc*, **103**, 4890-4899.

- Wood P.M. (1983) Why do c-type cytochromes exist? *FEBS Lett*, **164**, 223-226.
- Wood P.M. (1991) Why do c-type cytochromes exist? Reprise. *Biochim Biophys Acta*, **1058**, 5-7.
- Yamanouchi T., Tachibana Y., Akanuma H., Minoda S., Shinohara T., Moromizato H., Miyashita H. und Akaoka I. (1992) Origin and disposal of 1,5-anhydroglucitol, a major polyol in the human body. *Am J Physiol*, **263**, E268-E273.
- Yoshida N., Uchida E., Katsuragi T. und Tani Y. (2003) A novel NAD-dependent dehydrogenase, highly specific for 1,5-anhydro-D-glucitol, from *Trichoderma longibrachiatum* strain 11-3. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 2603-2607.
- Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A. und Sawada H. (2003) Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **53**, 1689-1695.
- Yu, S and Kragh, K. M. (1999) Methods of synthesis of sugar 1,5-anhydro-D-fructose (variants), antioxidant, sweetening agent. Eur Pat. Appl. RU2140988
- Yu S. und Pedersen M. (1993) Alpha-1,4-glucan lyase, a new class of starch/glycogen-degrading enzymes. II Subcellular localisation and partial aminoacid sequence. *Planta*, **191**, 137-142.
- Yu, S, Pedersen, M., and Kenne, L. (2004a) Glycan lyase producing 1,5-anhydrofructose. US Pat. Appl. 5695970
- Yu S., Ahmad T., Kenne L. und Pedersen M. (1995) alpha-1,4-Glucan lyase, a new class of starch/glycogen degrading enzyme. III. Substrate specificity, mode of action, and cleavage mechanism. *Biochim Biophys Acta*, **1244**, 1-9.
- Yu S., Bojsen K., Svensson B. und Marcussen J. (1999) alpha-1,4-glucan lyases producing 1,5-anhydro-D-fructose from starch and glycogen have sequence similarity to alpha-glucosidases. *Biochim Biophys Acta*, **1433**, 1-15.
- Yu S., Christensen T.M., Kragh K.M., Bojsen K. und Marcussen J. (1997) Efficient purification, characterization and partial amino acid sequencing of two alpha-1,4-glucan lyases from fungi. *Biochim Biophys Acta*, **1339**, 311-320.
- Yu S., Kenne L. und Pedersen M. (1993) Alpha-1,4-glucan lyase, a new class of starch/glycogen degrading enzyme. I. Efficient purification and characterization from red seaweeds. *Biochim Biophys Acta*, **1156**, 313-320.
- Yu S., Refdahl C. und Lundt I. (2004b) Enzymatic description of the anhydrofructose pathway of glycogen degradation; I. Identification and purification of anhydrofructose dehydratase, ascopyrone tautomerase and alpha-1,4-glucan lyase in the fungus *Anthracoobia melaloma*. *Biochim Biophys Acta*, **1672**, 120-129.
- Yuan Z.Y. und Hammes G.G. (1986) Fluorescence studies of chicken liver fatty acid synthase. Segmental flexibility and distance measurements. *J Biol Chem*, **261**, 13643-13651.

---

Zhang K.Y.J. und Main P. (1990) The use of Sayre's equation with solvent flattening and histogram matching for phase extension and refinement of protein structures. *Acta Crystallographica Section A*, **46**, 377-381.

Zhang Z., Lindstam M., Unge J., Peterson C. und Lu G. (2003) Potential for dramatic improvement in sequence alignment against structures of remote homologous proteins by extracting structural information from multiple structure alignment. *J Mol Biol*, **332**, 127-142.

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Axel J. Scheidig, für die Betreuung dieser Arbeit. Während der gesamten Zeit war er mir geduldiger Lehrer, der mich in der Proteinchemie und Proteinkristallographie unterrichtete und der immer ein offenes Ohr für unzählige Fragen und Probleme hatte.

Weiterer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Roger S. Goody, der mir die Möglichkeit gab, einen Großteil meiner praktischen Arbeit in der Abteilung für Physikalische Biochemie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund zu absolvieren und sich bereit erklärte meine Arbeit als Erstgutachter zu bewerten.

Prof. Dr. Peter Bayer möchte ich für die Kooperation in der NMR-Spektroskopie danken, die zwar (noch) nicht von Erfolg gekrönt war, aber bei der ich sehr viel lernte. Außerdem bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung während meiner Zeit in Dortmund.

Bei meinen Kollegen der Abteilung III des MPI in Dortmund möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre und die fruchtbaren Diskussionen rund um die Arbeit bedanken. Besonderer Dank gilt dabei Diana Jahnert, Dr. Janina Cramer, Dr. Liliana Wielitzek, Dr. Silke Huber, Dr. Paul Rothwell, Dr. Pascal Lang, Dr. Frederic Pileur, Dr. Thomas Durek und Dr. Goran Pljevaljčić, die den Laboralltag in vielerlei Hinsicht bereichern haben und mit denen man sich auch abseits des Labors über „Gott und die Welt“ unterhalten konnte.

Danke auch an die damalige kristallographische Abteilung des MPI in Dortmund für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft am Computer und in kristallographischen Fragen. Besonders erwähnen möchte ich hier Dr. Ingrid Vetter, PD Dr. Ilme Schlichting und Dr. Wulf Blankenfeld, die für Fragen immer ein offenes Ohr und Lösungsvorschläge hatten.

Der gleiche Dank geht natürlich auch an meine Kollegen in Homburg Frau Ulrike Denne, Birgit Herrmann, Dr. Ardina Grüber, Yvonne Carius, Ana Obada, Björn Klink, Mario Schu, Stefan Werner, Dr. Stefan Szedlacsek und Dr. Peter Haebel, die in den neuen Laborräumen die Arbeit zum Laufen brachten und die Arbeit in der „alten Heimat“ in vielerlei Hinsicht angenehm gestalten und immer noch gestalten.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Annette Kühn für die Bereitstellung der AFR zur Kristallisation, die anregenden Diskussionen rund um Reduktasen und Reduktase-fremde Themen und die vielen Ratschläge, die beim Schreiben dieser Arbeit sehr geholfen haben.

Die Gruppe um Professor C. G. Friedrich stellte den Proteinkomplex SoxXA zur Kristallisation zur Verfügung und hatte für Fragen, die die Schwefeloxidation in Bakterien betrafen immer ein offenes Ohr, wofür ich mich herzlich bedanke.

Last, but not least möchte ich mich bei meinen Eltern, Inge und Tresfore Leo Dambe, sowie bei meinem Bruder Renato Dambe bedanken, die mich jederzeit unterstützten und die immer für mich da waren.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben:

Name                      Tresfore Richard Dambe  
Geburtsdatum            22. Juli 1974  
Geburtsort                Neunkirchen /Saar  
Staatsangehörigkeit    deutsch

## Lebenslauf:

09/80 – 07/84      Grundschule in Homburg Schwarzenbach.  
09/84 – 06/93      Gymnasium Johanneum in Homburg/Saar.  
06/93                Allgemeine Hochschulreife.  
09/93 – 10/94      Zivildienst in der Werkstatt für psychisch kranke Erwachsene der Caritas  
in Blieskastel/Saar.  
10/94 – 09/96      Grundstudium der Chemie an der Universität in Freiburg.  
09/96                Vordiplom.  
09/96 – 06/97      Studium der Chemie an UMIST (Manchester, Großbritannien) mit  
Abschluss Bachelor of Science (B.Sc.).  
09/96 – 04/97      Praktische Arbeiten zur „Bachelor of Science Thesis“ im „Michael Barber  
Centre for Mass Spectrometry“ unter der Aufsicht von Prof. Ph.D. Simon  
J. Gaskell.  
Thema: Characterisation of Proteins by Edman degradation in the Gas  
Phase  
10/97 – 10/00      Hauptstudium der Chemie an der Universität in Freiburg mit Abschluss  
Diplom.  
12/99 – 10/00      Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie und Biochemie der  
Universität Freiburg in der Abteilung von Georg E. Schulz.  
Thema: Mutation, Expression, Reinigung und Kristallisation der  
Mono(ADP-Ribosyl)transferase ART2.2 aus *Rattus norvegicus*  
01/00 – 04/03      Praktische Arbeiten zur Promotion am Max-Planck-Institut in Dortmund  
04/03 –              Praktische Arbeiten zur Promotion an den Universitätskliniken des  
Saarlandes in Homburg