

Röntgenkristallographische Studien an Nukleotidkofaktor- bindenden Enzymen

Dissertation
zur
Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Clemens Grimm

aus Frankfurt am Main

Marburg an der Lahn, im Oktober 2001

Inhalt

Einleitung	1
1 Die Kristallstruktur der S-Adenosylmethionin:tRNA-Ribosyltransferase/Isomerase: Ein neues Faltungsmuster bei RNA-bindenden Proteinen	
1.1 Einleitung	
1.1.1 <i>Bakterienruhr und Shigellen</i>	3
1.1.2 <i>Die Rolle des Queuinstoffwechsels bei Ruhrerregern</i>	6
1.1.3 <i>Reaktionsweg der Queu-Biosynthese</i>	7
1.1.4 <i>Das QueA-Enzym</i>	9
1.1.5 <i>Das Phasenproblem in der Röntgenstrukturanalyse und seine Lösung mit der Methode der anomalen Dispersion bei multiplen Wellenlängen</i>	11
1.2. Material und Methoden	
1.2.1 <i>Klonierung von queA-Genen</i>	13
1.2.2 <i>Expression und Reinigung</i>	15
1.2.3 <i>Präparation eines Selenomethionylderivates des QueA-Proteins und Optimierung des Verfahrens</i>	16
1.2.4 <i>Kristallisation</i>	18
1.2.5 <i>Erste Röntgenbeugungsexperimente und Datenprozessierung</i>	19
1.2.6 <i>MAD-Experimente und Phasenbestimmung</i>	20
1.2.7 <i>Dichtemodifikation zur Phasenverbesserung und Modellbau</i>	22
1.2.8 <i>Reinigung chemisch synthetisierter RNA</i>	24
1.3 Ergebnisse	
1.3.1 <i>Überexpression und Proteinreinigung</i>	25
1.3.2 <i>Kristallisation und röntgenkristallographische Bewertung der Kristallqualität</i>	27
1.3.3 <i>Schweratomderivatkristalle des QueA-Proteins und MAD-Experimente</i>	31
1.3.4 <i>Modellbau</i>	36
1.3.5 <i>Grundstruktur und Topologie des QueA-Enzyms</i>	37
1.3.6 <i>Konservierte Reste und elektrostatische Eigenschaften</i>	42
1.3.7 <i>Kokristallisationsexperimente mit Oligoribonukleotiden</i>	45
1.4 Diskussion	
1.4.1 <i>Schwierigkeiten der Strukturbestimmung und Modellqualität</i>	50
1.4.2 <i>RNA-Bindestelle und aktives Zentrum</i>	56
1.4.3 <i>Vergleich mit bekannten Strukturen</i>	59
1.4.4 <i>Fazit und Ausblick</i>	63

2 Die Struktur der 3α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase aus <i>Comamonas testosteroni</i>: Ein neuartiges Oligomerisierungsmuster bei kurz-kettigen Dehydrogenasen	
2.1 Einleitung	
2.1.1 <i>Das Bakterium Comamonas testosteroni</i>	65
2.1.2 <i>Kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen und die Rossmann-Faltung</i>	66
2.1.3 <i>Die 3α-HSDH – der bisherige Stand des Wissens</i>	67
2.1.4 <i>Kristallographische Phasenbestimmung mit der Methode des Molekularen Ersatzes</i>	68
2.2 Material und Methoden	69
2.2.1 <i>Kristallisation</i>	70
2.2.2 <i>Datensammlung und Datenprozessierung</i>	71
2.2.3 <i>Strukturbestimmung und Verfeinerung</i>	72
2.3 Ergebnisse	
2.3.1 <i>Grundstruktur und Topologie</i>	76
2.3.2 <i>Quartärstruktur</i>	79
2.3.3 <i>Katalytisches Zentrum und NAD⁺-Bindung</i>	82
2.3.4 <i>Substratbindeschleife</i>	84
2.4 Diskussion und Ausblick	86
3 Zusammenfassung	88
4 Abkürzungsverzeichnis	90
5 Bildnachweis	92
6 Literatur	93
Danksagung	101
Anhang: Sequenzvergleich von QueA-Enzymen aus verschiedenen Organismen	102

Einleitung

In den letzten Jahren hat sich das Interesse, gezielt Wirkstoffe auf bestimmte Enzyme zuzuschneiden und andererseits gezielte Veränderungen an Enzymen vorzunehmen, um diese besonderen Anforderungen anzupassen, massiv gesteigert. Voraussetzung für solch präzise Eingriffe in biologische Systeme ist die Kenntnis einer möglichst genauen räumlichen Struktur des Zielenzyms. Der nicht zuletzt durch verschiedene Genomprojekte möglich gewordene Schub an Proteinstrukturaufklärungen und das daraus gewonnene Wissen liefert die Basis für ein solches molekulares Design. Dass auch mit den heute zur Verfügung stehenden technischen und wissenschaftlichen Mitteln eine Proteinstrukturaufklärung nicht nur reine Routine darstellt, zeigt auch der Verlauf dieser Arbeit.

Es werden die Strukturen zweier Nukleotidkofaktor-bindender Proteine vorgestellt: Die S-Adenosylmethionin:tRNA-Ribosyltransferase/Isomerase (QueA) ist zum einen ein hochinteressantes Protein, weil es bei der Expression beinahe aller wichtigen Virulenzfaktoren des Bakterienruhrerregers *Shigella* eine zentrale Rolle spielt. Es ist dort Teil eines Stoffwechselweges, der zur Einführung der modifizierten Base Queosin in bestimmte tRNA-Moleküle führt. Andererseits ist die vom QueA-Enzym katalysierte Reaktion so außergewöhnlich, dass die Möglichkeit, diese auf molekularer Ebene zu ergründen, alleine den hier getriebenen Aufwand rechtfertigen würde.

Die 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Reduktase (3α -HSDH) ist ein Enzym, das beim Abbau verschiedener Steroide eine Schlüsselstellung einnimmt. Diese biochemisch hochstabilen Substanzen belasten nicht zuletzt durch ihren breiten Einsatz in der Intensivtierhaltung unsere Umwelt und scheinen sogar auf dem Umweg über Flüsse und Meere in Form von Speisefisch den Weg in unsere Nahrung zurückzufinden. Unter diesem Gesichtspunkt scheint eine nähere Beschäftigung mit diesem katabolen Enzym mehr als sinnvoll. Leider gelang eine Darstellung von steroid-substrathaltigen Komplexkristallen mit der 3α -HSDH bislang nicht. Die vorgestellte Kristallstruktur entschädigt jedoch durch die Demonstration eines unerwarteten und bislang unbekanntem Oligomerisierungsverhaltens.

1. Die Kristallstruktur der S-Adenosylmethionin:tRNA-Ribosyltransferase/Isomerase: Ein neues Faltungsmuster bei RNA-bindenden Proteinen

1.1 Einleitung

1.1.1 Bakterienruhr und Shigellen

Shigellen wurden erstmals durch SHIGA im Jahre 1898 als Erreger der Ruhr nachgewiesen. Die Gattung *Shigella* umfasst vier Arten, *Shigella dysenteriae* mit vorwiegend tropischem und subtropischem Verbreitungsgebiet, *S. boydii* mit Hauptvorkommen in Nordafrika und Vorderasien und die weltweit verbreiteten Arten *S. sonnei* (Abb. 1) und *S. flexneri* (Abb. 2). Bei Shigellen handelt es sich um gramnegative, unbewegliche und ungeißelte Enterobakterien.

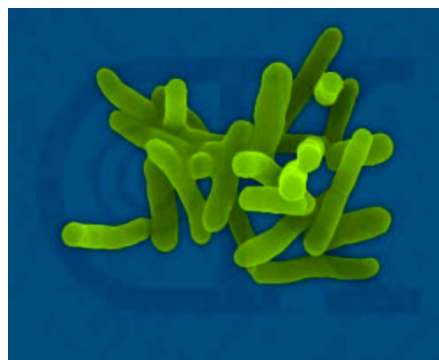


Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Zellen des Bakteriums *S. sonnei*.

Pathogenese: Nach peroraler Aufnahme vermehrt sich der Erreger im Dünndarm, so dass bei einer Erkrankung nach 24-36 Stunden ein Titer von 10^7 bis 10^9 Bakterien pro μl Darminhalt erreicht wird. Eine außergewöhnlich geringe Dosis von 10-100 aufgenommenen Keimen ist ausreichend, um eine Infektion auszulösen. Die Krank-

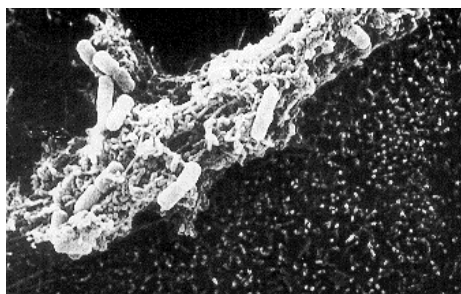


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Zellen von *S. flexneri* die sich an die Oberfläche von Caco-2-Zellen angeheftet haben.

heit tritt dann durch eine katarrhalische Entzündung der Dickdarmschleimhaut, die mit wässrigen Durchfällen einhergeht, in Erscheinung. Bei einem leichten Krankheitsverlauf, der vor allem für Infektionen mit *S. sonnei* typisch ist, treten keine weiteren pathologischen Veränderungen auf. Bei schwereren Verläufen führen die Entzündungsprozesse zu Epithelnekrosen und Geschwüren des Dickdarms, die Blutungen

und, bei ausgedehnten Läsionen, Darmdurchbrüche zur Folge haben können (Brandis & Pulverer 1988). Die Auslösung dieser pathologischen Vorgänge scheint mit der Fähigkeit von Shigellen in Verbindung zu stehen, durch rezeptorvermittelte Endozytose von der basolateralen Seite (Mounier, Vasselon et al. 1992) in die Dickdarmepithelzellen des Wirtsorganismus einzudringen und sich dort zu vermehren (LaBrec, Schneider et al. 1964; Clerk & Sansonetti 1987). Dieser Vorgang hängt von einem nichtkonjugativen, 230 kbp großem Plasmid ab, das für einen Großteil der Virulenzfaktoren kodiert. Die pathogenen Eigenschaften von Shigellen sind zwingend an dieses Virulenzplasmid gekoppelt (Sansonetti, Kopecko et al. 1982). Die zunächst das endozytierte Bakterium umgebende Vakuole löst sich innerhalb einer Stunde auf, so dass eine rasche Vermehrung der Erreger im Zytoplasma (Sansonetti, Ryter et al. 1986) mit einhergehendem schnellem Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration und erhöhtem Pyruvat Spiegel möglich ist. Die nach dem Tod der Epithelzelle freigesetzten Shigellen können nun erneut benachbarte Zellen infizieren, so dass sich beim weiteren intra- und interzellulären Vordringen zunächst kleine Abszesse und dann auch großflächige Läsionen bilden (Kadurugamuwa, Rhode et al. 1991). Beim Vordringen der Erreger wird an der Lamina propria eine schwere Entzündungsreaktion hervorgerufen, ein Durchdringen der Lamina propria scheint jedoch nur selten aufzutreten, weshalb Bakterämien nicht zum üblichen Symptombild der Shigellose gehören. *S. dysenteriae* (Typ I), das besonders schwere Krankheitsverläufe verursacht, ist in der Lage, ein Exotoxin, das sogenannte Shigatoxin zu produzieren. Shigatoxin scheint sowohl neuro- als auch zytotoxische Wirkungen auszuüben und inaktiviert durch Abspaltung einer Adeninbase von der 28S-rRNA irreversibel die 60S-Untereinheit des Säugetierribosoms.

Klinische Erscheinungen, Epidemiologie: Leichte Durchfälle treten erstmals nach einer Inkubationszeit von zwei bis sieben Tagen auf. Innerhalb von weiteren zwei Tagen stellt sich dann ein wässriger Durchfall ein, dem in schweren Fällen Schleim, Eiter und Blut beigemischt sein können. Krampfartige Schmerzen und Fieber können auftreten. Im Verlauf der Krankheit tritt eine Dehydrierung auf, die schwer von den toxischen Wirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem und das zentrale Nervensystem zu unterscheiden ist. Darmblutungen und –durchbrüche sowie Bauchfellentzündungen stellen lebensbedrohliche Komplikationen dar. Ein sich an die akuten Erscheinungen anschließender chronischer Krankheitsverlauf ist möglich. Ty-

pisch sind hier schmerzhafte Gelenkschwellungen, der sogenannte Ruhrreumatismus. Infektionen mit *S. dysenteriae* zeigen oft einen gravierenderen Verlauf als solche mit den drei anderen Arten der Gattung. Ein wesentlicher Faktor für den Krankheitsverlauf ist auch der allgemeine Gesundheitszustand des Infizierten, weshalb sich bakterielle Ruhrerkrankungen in Kriegsgebieten und in den Entwicklungsländern konzentrieren (Brandis & Pulverer 1988). Eine besondere Gefährdung besteht für Kleinkinder. So erfährt in den Entwicklungsländern durchschnittlich jedes Kind bis zum dritten Lebensjahr zwei Ruhrattacken. Jährlich fallen mehr als 500000 Kinder *Shigella*-bedingten Erkrankungen zum Opfer (Katz 1986). Größere Epidemien sind hauptsächlich aus den Entwicklungsländern der Tropen bekannt, die Verbreitung erfolgt vorwiegend durch direkten Kontakt, Fliegen sowie Kontamination von Gewässern durch Ausscheider. Die Bakterienruhr erscheint in Gebieten der gemäßigten Zone hauptsächlich in der warmen Jahreszeit (Brandis & Pulverer 1988). In der Bundesrepublik Deutschland wurden im Jahr 1999 1601 Erkrankungen gemeldet, aufgrund von Daten aus Berlin und den neuen Bundesländern ist anzunehmen, dass 86% der Erkrankungen in anderen Ländern erworben wurden, wobei Ägypten mit 120 Fällen, Tunesien mit 115 Fällen und die Dominikanische Republik mit 31 Fällen die Statistik anführen (Robert-Koch-Institut 2000). Unmittelbar nach dem zweiten Weltkrieg im Jahr 1947 betrug die Zahl der Erkrankten etwa 4000 und fiel dann auf ein Minimum von etwa 500 im Jahr 1970 ab (Brandis & Pulverer 1988). Der seit diesem Zeitpunkt zu beobachtende Wiederanstieg der Infektionsfälle scheint auf die gestiegene Reiseaktivität in der Bundesrepublik zurückzuführen zu sein. Die Bekämpfung der akuten Krankheitserscheinungen durch Antibiotikatherapie unter Einsatz von u. a. Azithromycin und Ciprofloxazin wird durch das vermehrte Auftreten multiresistenter *Shigella*-Stämme erschwert (Khan, Seas et al. 1997). Dies lässt eine Suche nach alternativen Wirkstoffen sinnvoll erscheinen.

1.1.2 Die Rolle des Queuinstoffwechsels bei Ruhrerregern

Die modifizierte Base Queuin („Q-Base“, 7-4,5-cis-Dihydroxy-1-cyclopenten-3-yl-aminomethyl-7-deazaguanin) tritt an der Wobbelposition des Antikodons (Position 34) von tRNA-Molekülen, die für die Aminosäuren Asp, Asn, His und Tyr spezifisch sind, auf. Queuin wird oft auch als „hypermodifizierte“ Base bezeichnet, um dem Ausmaß der eingeführten Veränderung im Vergleich zu beispielsweise häufiger anzutreffenden methylierten Basen Rechnung zu tragen. Das momentane Bild der biochemischen Funktion von Q ist bislang noch unvollständig, es wird aber allgemein akzeptiert, dass die Einführung von Q im Antikodonbereich der tRNA eine Feinabstimmung des Translationsapparates ermöglicht, was zum Beispiel durch den Befund belegt wird, dass ein Q-Mangel bei *E. coli* durch Deletion des *tgt*-Gens die Fehlerrate bei der Erkennung des Stop-Kodons UAG erhöht (Frey, McCloskey et al. 1988). So lassen sich zwanglos Beziehungen der Q-Biosynthese zu Vorgängen wie der eukaryontischen Zellentwicklung (Okada, Shindo-Okada et al. 1978; Owenby, Stulberg et al. 1979; Kersten & Kesten 1990), der Proteinbiosynthese (Jacks, Madhani et al. 1988; Hatfield, Feng et al. 1989; Carlson, Kwon et al. 1999), der tierischen Tyrosinbiosynthese (Marks & Farkas 1997), der Krebsentstehung (Okada, Shindo-Okada et al. 1978; Emmerich, Zubrod et al. 1985; Huang, Wu et al. 1992; Baranowski, Dirheimer et al. 1994) und der rasterschubabhängigen Translation retroviraler Proteine (Jacks, Madhani et al. 1988; Hatfield, Feng et al. 1989; Carlson, Kwon et al. 1999) herstellen. Im Rahmen dieser Arbeit war besonders die Erkenntnis von Bedeutung, dass eine intakte Q-Biosynthese für die Pathogenität von Shigellen essentiell ist. Wie gezeigt werden konnte, weisen mutierte *Shigella*-Stämme mit einem fehlenden Gen der Q-Biosynthese eine signifikant reduzierte Pathogenität infolge der ineffizienten *virF*-mRNA-Translation (Durand, Okada et al. 1994) auf. Da das VirF-Protein direkt oder indirekt als positiver Regulator auf beinahe alle Pathogenitätsgene, die durch das große Virulenzplasmid von *Shigella* codiert werden, wirkt, führt eine verringerte intrazelluläre Konzentration dieses Proteins in Mutanten der Q-Biosynthese zu einer reduzierten Bildung der meisten Virulenzfaktoren. Trotz dieses signifikanten Einflusses auf das Pathogenitätsverhalten wird die allgemeine Vitalität von Shigellen und anderen Bakterien offensichtlich nur wenig durch einen Defekt des Q-Stoffwechsels

beeinträchtigt. Deshalb erscheinen die Enzyme der Q-Biosynthese als sinnvolle Ziele („Targets“) für ein *de novo*-Design spezifischer Inhibitoren zur Bekämpfung der Shigellose.

1.1.3 Reaktionsweg der Queuin-Biosynthese

Die Fähigkeit zur *de novo*-Synthese der Q-Base ist auf Eubakterien beschränkt. Queuin kann deshalb unter Umständen als ein essentieller Nährstoff für Eukaryonten angesehen werden, jedoch zeigen Queuin-frei ernährte Mäuse unter Laborbedingungen keine Mangelerscheinungen. Der bakterielle Q-Biosyntheseweg (Abb. 3) beginnt außerhalb der tRNA mit Guanosintriphosphat (GTP), das zum Q-Vorläufer 7-Aminomethyl-7-deazaguanin (preQ₁) umgesetzt wird. Dieser Prozess wird bislang

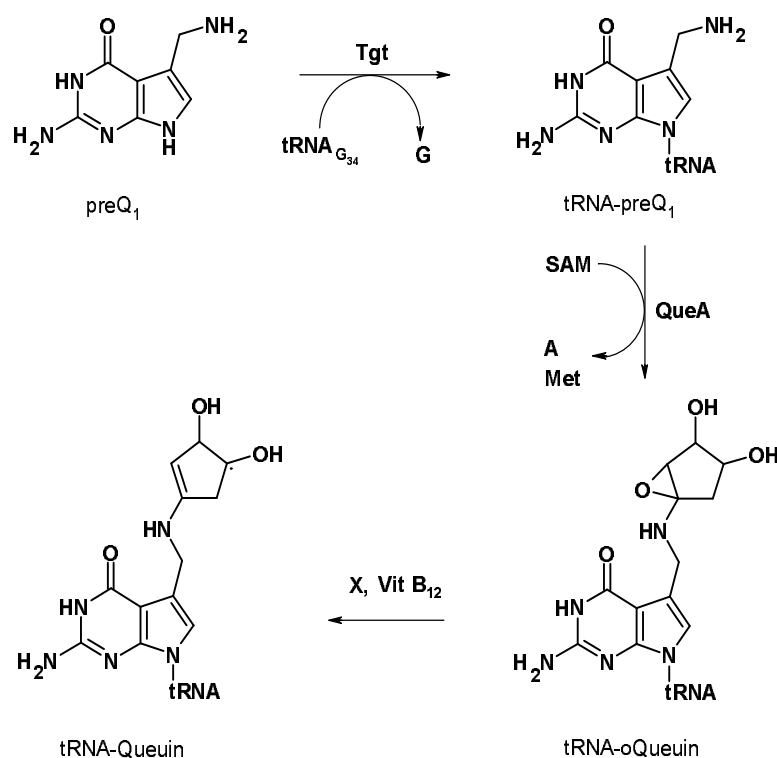


Abbildung 3: Reaktionsweg der Queuin-Biosynthese. Zur Erläuterung, siehe Text.

nur ansatzweise verstanden (Slany & Kersten 1994). Das Enzym tRNA-Guanintransglykosylase (Tgt) katalysiert dann den Basenaustausch von Guanin 34 an der Wobbel-Position von für Asp, Asn, His und Tyr spezifischen tRNA-Molekülen (Okada & Nishimura 1979, Okada, 1979 #30) gegen preQ1. Daraufhin wird der Ribosylrest von S-Adenosylmethionin (SAM) auf das tRNA-gebundene preQ1 übertragen und zum Intermediat Epoxy-Queuin (oQ) isomerisiert. Dieser Reaktionsschritt wird von der S-Adenosylmethionin:tRNA-Ribosyltransferase/Isomerase (QueA; Slany, Bosl et al. 1993) katalysiert. Schließlich wird die Epoxygruppe von einem bislang unbekanntem Kofaktor-B₁₂-abhängigen Enzym (Abb. 3) zur Doppelbindung reduziert, so dass die tRNA-gebundene Q-Base entsteht (Frey, McCloskey et al. 1988).

Während die Struktur des Tgt-Enzyms seit längerem bekannt ist (Romier, Reuter et al. 1996), und momentan als Target für die de novo-Synthese von anti-Shigellose-Wirkstoffen dient, blieb die Struktur aller anderen Enzyme des Q-Biosynthesewegs bislang unaufgeklärt.

1.1.4 Das QueA-Enzym

Das *queA*-Gen ist, abgesehen vom *tgt*-Gen, bis heute das einzige Gen der Q-Biosynthese, das kloniert und identifiziert werden konnte (Reuter, Slany et al. 1991). Sein Genprodukt ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von knapp 40 kDa und stellt bisher das einzige bekannte Enzym dar, das den Riboseresest von SAM auf ein Substrat überträgt (Slany, Bosl et al. 1993). Eine neuere Studie (Kinzie, Them et al. 2000) schlägt aufgrund von Daten aus NMR-spektroskopischen Untersuchungen mit ^{13}C -markiertem Substrat den folgenden Reaktionsmechanismus vor. Die Reaktion beginnt mit der enzymkatalysierten Deprotonierung des SAM-Kosubstrates, die zum Schwefel-Ylid I (Abb. 4) führt. Dieses kollabiert unter Ringöffnung und Abspaltung des Adeninrestes zum Vinyl-Schwefel-Übergangszustand II. Die Aminogruppe des tRNA-gebundenen preQ₁ kann nun an C-4' (entspricht C-1 im Nummerierungssystem des oQ-Reaktionsproduktes) nukleophil angreifen und erneut ein Schwefel-Ylid III ausbilden, das durch Angriff an Kohlenstoff C-1' (entspricht C-3 im Nummerierungssystem des oQ-Reaktionsproduktes) den Ringschluss zum Alkoxy-Zyklus IV herbeiführt. Der S_N2-Angriff des Alkoxy-Sauerstoffatoms auf das benachbarte Kohlenstoffatom führt zur Eliminierung von Methionin unter Ausbildung der Epoxygruppe von oQ. Dieses Modell wird zum einen durch Hinweise aus der bestehenden Literatur gestützt, dass die Umwandlung von SAM im alkali-

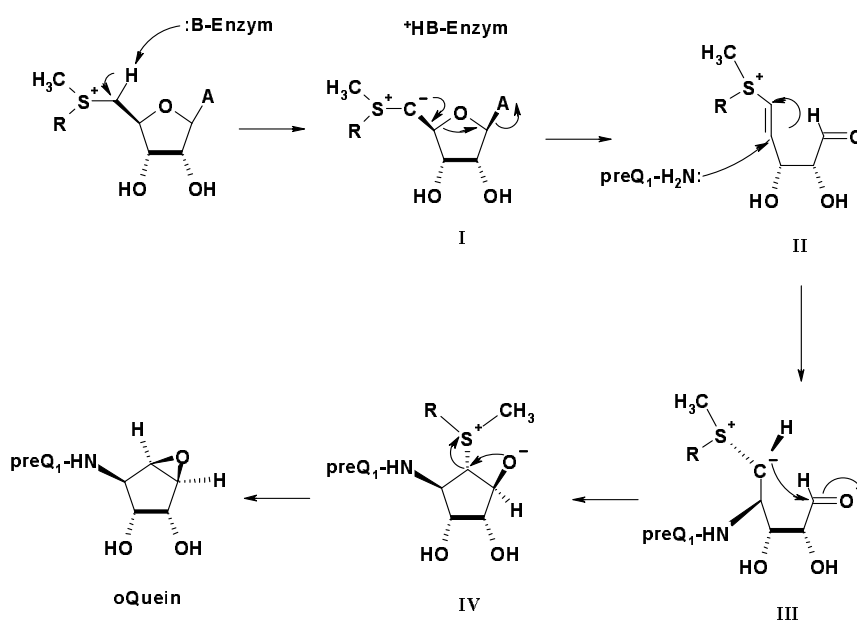


Abbildung 4: Postulierter Reaktionsmechanismus des QueA-Enzyms. Zur Erläuterung siehe Text.

schen Milieu zu Pentosylmethionin unter Adeninabspaltung auf der Deprotonierung von C-5' mit nachfolgender Ringöffnung und Ausbildung der Vinyl-Schwefelspezies II beruht (Walsh 1979) und zum anderen durch bekannte Beispiele, in denen die nukleophile Addition an Vinyl-Schwefelspezies und nachfolgende intramolekulare Kondensation des entstehenden Schwefel-Ylides mit einer Carbonylfunktion zur Bildung von Epoxyden führt (Fava 1985).

1.1.5 Das Phasenproblem in der Röntgenstrukturanalyse und seine Lösung mit der Methode der anomalen Dispersion bei multiplen Wellenlängen

Die mathematische Operation, die von den experimentell bestimmten Daten - in aller Regel in Form von Reflexintensitäten mit Hilfe von Beugungsbildern (siehe Abb. 20) ermittelt – zur molekularbiologisch interpretierbaren Elektronendichte $\rho(x, y, z)$ führt, hat die Form einer Fouriertransformation:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V_{Cell}} \sum_{h,k,l} |F_{h,k,l}| e^{i[-2\pi(hx+ky+lz)+\varphi_{h,k,l}]}$$

hierbei bedeuten x, y und z die Raumkoordinaten der Einheitszelle, V_{Cell} das Zellvolumen, $|F_{h,k,l}|$ die mit dem Temperaturfaktor behaftete Strukturfaktoramplitude des Reflexes (h, k, l) und $\varphi_{h, k, l}$ den Phasenwinkel des entsprechenden Reflexes. Das Quadrat der Strukturfaktoramplitude eines Reflexes ist seiner Intensität direkt proportional, so dass diese Größe experimentell zugänglich ist. Bedauerlicherweise existiert aber keine praxistaugliche experimentelle Methode, um die Phasenwinkel direkt

zu bestimmen. Die Ermittlung von Phaseninformation mit Hilfe indirekter Verfahren¹ ist somit ein zentraler Punkt in der Proteinkristallographie.

Heute ist aufgrund der breiten Verfügbarkeit von Synchrotronstrahlungsquellen mit kontinuierlich einstellbarer Wellenlänge das Verfahren der anomalen Dispersion bei multiplen Wellenlängen (Multiple wavelength Anomalous Dispersion, MAD), das vor über zwölf Jahren (Murthy, Hendrickson et al. 1988; Guss, Merritt et al. 1988; Hendrickson, Smith et al. 1988) erstmals erfolgreich angewendet wurde, das Mittel der Wahl. Dabei werden Datensätze bei verschiedenen Wellenlängen im Bereich des Absorptionsmaximums eines im Kristall enthaltenen Schweratoms aufgenommen. Durch das Absorptionsverhalten tritt eine variable Phasenverschiebung auf, die als anomale Dispersion bezeichnet wird. Diese äußert sich experimentell dadurch, dass bestimmte symmetrieverwandte Reflexe, die sogenannten Friedelpaare, die unter normalen Umständen identische Intensitäten aufweisen, voneinander unterschiedliche Intensitäten annehmen. Dieser Intensitätsunterschied, der als anomale Differenz des entsprechenden Reflexes bzw. Friedelpaares bezeichnet wird, enthält Information, die zur Phasenbestimmung genutzt werden kann. Die Messung bei einer Wellenlänge ist in der Regel nicht ausreichend, da die so gewonnene Phaseninformation mit einer Zweideutigkeit behaftet ist, die mit Hilfe von mehrfachen Experimenten bei unterschiedlicher Wellenlänge aufgelöst werden kann.

Da in Proteinen nur selten Schwermetalle enthalten sind, und das anomale Signal von Schwefel in der Praxis meist zu schwach ist, muss für ein erfolgreiches MAD-Experiment oft ein künstliches Derivat des untersuchten Proteins angefertigt werden. Dies geschieht meist durch Einführung von Selenomethioninresten anstelle von Methioninseitenketten (Hendrickson, Horton et al. 1990) oder durch Eindiffundieren von Schwermetallsalzen in den Kristall („Soaking“).

Die Bestimmung der Phaseninformation des Proteinkristalls setzt zunächst die Lokalisation einer ausreichenden Anzahl von Schweratompositionen voraus. Dazu stehen verschiedene automatische Algorithmen zur Verfügung. Sie werden in Verfahren, die eine direkte Phasenbestimmung für die Schweratomsubstruktur anstreben, und Verfahren, die sogenannte Patterson-Karten zur Substrukturbestimmung benutzen, unterteilt. Eine (anomale Differenz-) Patterson-Karte kann gewonnen werden, wenn in

¹ In letzter Zeit gewinnen auch sogenannte direkte Verfahren, deren Anwendung bislang auf die Röntgenkristallographie kleiner Moleküle beschränkt war, eine gewisse Bedeutung in der makromolekularen Kristallographie.

der obigen Formel statt Strukturfaktoramplituden Reflexintensitäten (anomale Differenzen) eingesetzt und die unbekannt Phasen zu Null angenommen werden. Eine solche Pattersonkarte enthält zwar keine Information über absolute räumliche Koordinaten, sehr wohl aber über relative Abstände. Das klassische Verfahren besteht in der Schweratomlokalisierung durch manuelle Inspektion von anomalen Differenz-Patterson-Karten.

1.2. Material und Methoden

1.2.1 Klonierung von *queA*-Genen

Die kodierenden Regionen der verschiedenen *queA*-Gene wurden mittels der Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) von der entsprechenden chromosomalen DNA amplifiziert. Als Templat für das *queA*-Gen von *Synechocystis* sp. diente das Cosmid cs0165 (Kaneko, Sato et al. 1996), für das von *Rickettsia prowazekii* diente DNA aus dem λ -Phagen F1339 (Andersson, Zomorodipour et al 1998). Chromosomale DNA der verschiedenen Organismen wurde – mit Ausnahme der in der Dank-sagung erwähnten Schenkungen – von der Deutschen Sammlung für Mikroorganis-

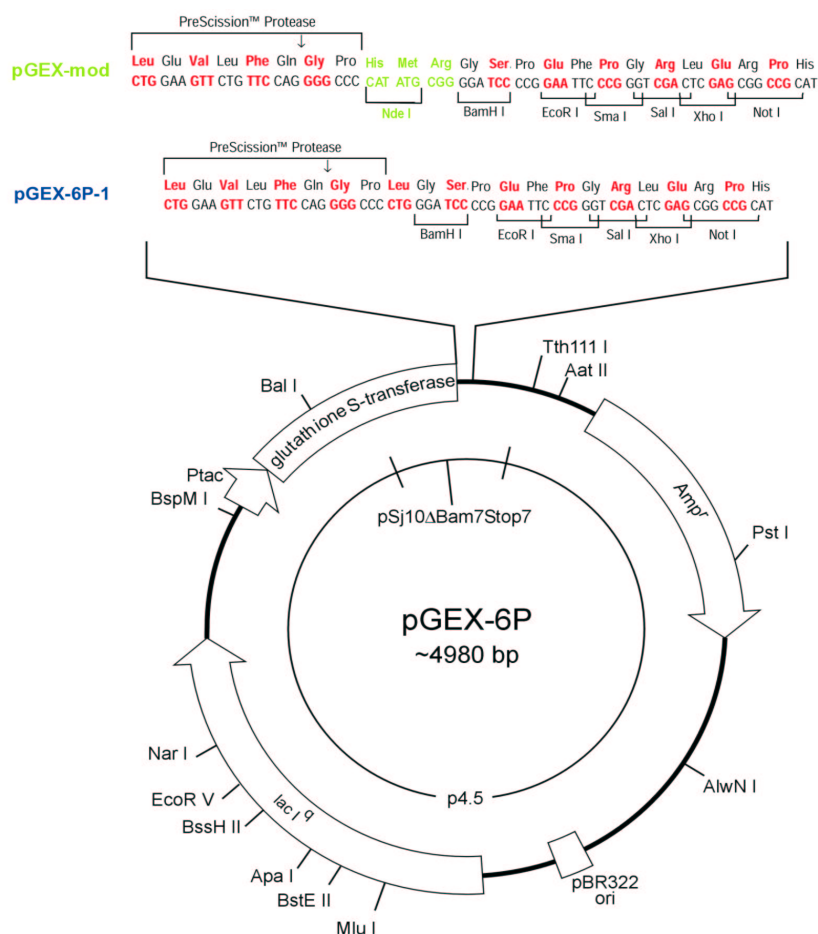


Abbildung 5: pGEX-mod, ein an die Bedürfnisse der Proteinkristallographie angepasstes Derivat des Vektors pGEX-6P-1. Die Einführung einer *NdeI*-Schnittstelle unmittelbar nach dem für die Erkennungssequenz der PreScission-Protease kodierenden Bereich bietet nicht nur die Möglichkeit, ein kloniertes Insert durch Herausschneiden und Religieren in eine Vielzahl weiterer Expressionvektoren zu überführen, sondern reduziert auch die Zahl der Aminosäurereste zwischen dem n-terminalen Methionin des Zielproteinanteils und der PreScission-Proteaseschnittstelle auf drei gegenüber fünf bei pGEX-6P-1.

men und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Im Fall der *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium acetobutylicum*, *Aquifex aeolicus*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Synechocystis* sp. und *Rickettsia prowazekii* *queA*-Gene wurden die resultierenden PCR-Produkte in die *multiple cloning site* (MCS) des Überexpressionsvektors pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia, Schweden) eingeführt. Dabei wurde unmittelbar vor bzw. nach dem natürlichen Startkodon eine *Bam*HI-Schnittstelle (mittels 5'-Primer) und unmittelbar nach dem natürlichen Stoppkodon eine *Eco*RI-Schnittstelle (mittels 3'-Primer) eingeführt. Daraus resultierten GST- (kodierend für die *Schistosoma japonicum* Glutathion-S-Transferase) *queA*-Fusionsgene (Smith & Johnson 1988), deren Genprodukte aus einer aminoterminalen GST-Domäne und einem carboxyterminalen QueA-Anteil bestanden, und die durch die hochspezifische Erkennungssequenz für PreScission-Protease (Amersham Pharmacia, Schweden) getrennt waren. Diese Art von Genkonstrukt hatte zufolge, dass das daraus überexprimierte und mit PreScission-Protease vom GST-Rest getrennte Genprodukt fünf zusätzliche N-terminale Aminosäurereste besaß. Im Verlauf dieser Arbeit wurde der Vektor pGEX6P-1 durch Einführung einer *Nde*I-Restriktionsschnittstelle zwischen der für PreScission-Protease-Erkennungssequenz kodierenden Region und der *Bam*HI-Schnittstelle der MCS (Abb. 5) abgewandelt (pGEX-mod). Dadurch konnten nun Genkonstrukte erstellt werden, bei denen zwischen der PreScission-Protease-Schnittstelle und dem *queA*-Gen lediglich drei zusätzliche Basentriplets lagen, so dass das proteasebehandelte Genprodukt dieses Konstrukts nur zwei zusätzliche Reste im Vergleich zum natürlichen *queA*-Genprodukt (mit N-terminalem Methionin) aufweist. Ein solches Konstrukt bietet darüber hinaus die Möglichkeit, das inserierte Gen in andere gängige Expressionsvektoren, wie pXC35 (hitzeinduzierbare Proteinexpression), pTYB12 (selbstspaltendes Fusionsprotein) und pET21a(+) ohne Notwendigkeit eines PCR-Zwischenschrittes, umzusetzen. Die Sequenzen aller inserierten Gene der in dieser Arbeit konstruierten Vektoren wurden mit Hilfe eines Sequenzierautomaten der Marke ABI 370 (Perkin-Elmer, USA) überprüft, um unerwünschte Mutationen infolge der durchgeführten PCR auszuschließen.

1.2.2 Expression und Reinigung

E. coli-Zellen des Stammes BL21(DE3)(pLysS) (Novagen, UK), die mit dem entsprechenden Überexpressionsvektor transformiert worden waren, wurden in 2l-Erlenmeierkolben mit jeweils 1l LB-Medium (Miller 1972) und 10 mg/l Chloramphenicol sowie 100 mg/l Ampicillin bei 303 K und 300 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Sobald die Kultur eine optische Dichte von 0,8 bei 600 nm Wellenlänge² (OD₆₀₀) erreicht hatte, wurde die Expression des Fusionsgens durch die Zugabe von Isopropyl-1-Thio- β -D-Galaktosid (IPTG) bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mM induziert. Nach einer zusätzlichen Inkubationsperiode von vier Stunden wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet und in 15 μ l Lysepuffer [50 mM Tris/HCl pH 8,5, 5 mM Dithiothreitol (DTT) mit 1 Tablette „Complete“-Proteaseinhibitorgemisch (EDTA-frei, Roche Mannheim) und 150 μ g DNase I (Roche Mannheim)] resuspendiert und unmittelbar darauf bei 255 K tiefgefroren. Nach dem Auftauen der Zellen und Inkubation bei 293 K für 25 Minuten war eine vollständige Lyse der Zellen zu beobachten. Die festen Zellbestandteile wurden dann durch Zentrifugation des Lysates bei 10000g sedimentiert und der Überstand bei 293 K für eine Stunde mit 2,5 ml Glutathionsepharose 4B pro Liter Kulturvolumen (Amersham Pharmacia, Schweden) inkubiert. Danach wurde die Glutathionsepharose 4B durch einen kurzen Zentrifugationsschritt bei 4000g sedimentiert, der resultierende Überstand entfernt und das Sediment in Waschpuffer (50 mM Tris pH 8,5, 100 mM NaCl, 2 mM DTT) resuspendiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt, dann wurde die Glutathionsepharose 4B in 1 ml Schneidepuffer (50 mM Tris pH 8,5, 100 mM NaCl, 2 mM DTT und 50 U/ml PreScission-Protease, Amersham Pharmacia, Schweden) pro 1 ml Glutathionsepharose 4B aufgenommen und bei 293 K über Nacht bei leichtem Schütteln inkubiert. Der Schneidepuffer, der nun das QueA-Protein enthielt, das vom Sepharosematerial-gebundenen GST-Rest durch die Einwirkung der PreScission-Protease losgeschnitten worden war, konnte dann durch einfache Filtration mit Chromatographiesäulchen für Einmalgebrauch (Millipore, Deutschland) ab-

² Physikalisch gesehen handelt es sich bei den so gemessenen Werten nicht um Absorptionen oder „optische Dichten“, da hier Lichtverlust vorwiegend durch Streuung an den Zellen hervorgerufen wird (bei 600 nm besitzen Zellen von *E. coli* ein Absorptionsminimum). Die angegebenen Werte sind deshalb strahlengang- und damit in gewissem Umfang auch geräteabhängig!

getrennt werden. Durch Spülen mit Waschpuffer wurde das restliche frei gelöste QueA-Protein quantitativ aus dem Chromatographiematerial wiedergewonnen. Die so hergestellte Proteinlösung wies typischerweise einen Gehalt von mehr als 80% QueA am Gesamtprotein auf, wie mittels SDS-Gelelektrophorese abgeschätzt werden konnte. Für die weitere Aufbereitung wurde die Lösung zunächst in Centricon 30-Ultrafiltrationsröhrchen (Amicon, USA) ankonzentriert und dann auf eine „HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade“-Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia, Schweden) aufgetragen. Die Säule wurde mit Gelfiltrationspuffer (50 mM Tris pH 8.5, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA) voräquilibriert und eluiert; Fraktionen, die das QueA-Protein enthielten, wurden vereinigt, durch Ultrafiltration ankonzentriert und umgepuffert (10 mM Tris pH 8,5, 2,5mM DTT, 50 mM NaCl), so dass eine Endkonzentration zwischen 15 g/l und 30 g/l erreicht wurde. Die so erhaltene QueA-Proteinpräparation enthielt in keinem Fall mehr als 5% Verunreinigungen durch anderes Protein, wie mittels SDS-Gelelektrophorese abgeschätzt wurde. Die Gelfiltration wurde auf einem Äkta Explorer-FPLC-System (Amersham Pharmacia, Schweden) bei Raumtemperatur ausgeführt. Die Proteinausbeute war mit ungefähr 10 mg QueA pro Liter *E. coli*-Kulturvolumen für alle untersuchten Organismen vergleichbar. Davon ausgenommen waren lediglich *R. prowazekii*, *Haem. influenzae* und *H. pylori*, von denen kein lösliches QueA-Protein gewonnen werden konnte. Die Identität der gereinigten Proteine wurde durch N-terminale Proteinsequenzierung bestätigt.

1.2.3 Präparation eines Selenomethionylderivates des QueA-Proteins und Optimierung des Verfahrens

Für Multi-Wellenlängen-Beugungsexperimente unter Nutzung anomaler Differenzen (MAD) wurde ein Selenomethionylderivat (Hendrickson, Horton et al. 1990) des QueA-Proteins aus *B. subtilis* hergestellt. Zu diesem Zweck wurden Zellen des *met⁻E. coli*-Stammes B834(DE3)(plysS) (Novagen, UK) mit dem *B. subtilis queA* beinhaltenen Derivat des Vektors pGEX-6P-1 transformiert und bei 303 K in 1l glucosehaltigem (10 g/l) Minimalmedium herangezogen. Das Medium enthielt als Supplemente

Biotin, Thiamin (je 2 g/l) und L-Methionin (500 g/l). Nachdem die Kultur eine OD_{600} von 0,6 erreicht hatte, wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und in 1l des obigen Mediums, jedoch ohne Methioninsupplementierung, resuspendiert. Nach einer Stunde im Schüttler wurde dann 50 mg DL-Selenomethionin zugegeben und nach weiteren 30 Minuten die Selenomethionyl-QueA-Expression durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mM induziert. Die Expression des Fusionsproteins wurde über weitere 8 Stunden fortgesetzt, wobei schließlich eine OD_{600} von etwa 2,5 erreicht wurde, die Zellen wurden dann geerntet. Da im Verlauf dieser Arbeit erhebliche Probleme beim Lösen der Kristallstruktur auftraten, wurden erhöhte Mengen an derivatisiertem Protein benötigt. Aus diesem Grund wurde eine verbesserte Methode ausgearbeitet, bei der die Kultur der *E. coli*-Zellen in einem Vollmedium definierter Zusammensetzung erfolgte. Dazu wurden die Zellen in einer Lösung, die 10,5 g/l Dikaliumhydrogenphosphat, 50 g/l Kaliumdihydrogenphosphat, 0,5 g/l Natriumcitrat, 1 g/l Ammoniumsulfat, 10 mg/l Magnesiumsulfat, 2 mg/l Kalziumchlorid, 2 mg/l Eisensulfat, 1 g/l Glucose sowie je 1 mg/l der organischen Basen Adenin, Guanin, Thymin, Uracil, je 1 µg/l der Vitamine Riboflavin, Niacinamid, Pyridoxinhydrochlorid, Thiamin und Biotin und schließlich je 40 mg/l der Aminosäuren Gly, Glu, Gln, Asp, Asn, Ala, Ile, Leu, Val, Cys, Ser, Thr, Arg, Lys, Pro, Tyr, Trp, Phe und Met enthielt zunächst bei 303K bis zu einer OD_{600} von 1,0 geschüttelt und dann durch Zentrifugation sedimentiert. Danach wurden die Zellen im gleichen Medium, jedoch ohne Methioninzusatz resuspendiert und für eine weitere Stunde inkubiert. Dann wurde 50 mg L-Selenomethionin (Acros Biochemicals) zugegeben und nach weiteren 30 Minuten die Selenomethionyl-QueA-Expression durch Zusatz von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mM induziert. Nach 10 Stunden Induktion unter aeroben Bedingungen wurden eine OD_{600} von mehr als 5 erreicht.

Die Prozedur der Proteinreinigung und Kristallisation des Proteinderivates war identisch mit der für natives Protein, jedoch wurde zur Verhinderung von Oxidation allen Puffern 5 mM DTT zugesetzt.

1.2.4 Kristallisation

Alle Kristallisationsexperimente ohne Zusatz von RNA wurden sowohl bei 277 K als auch 293 K in VDX-Platten (Hampton Research, USA) mit der Technik des hängenden Tropfens ausgeführt. Dabei wird ein an einem mikroskopischen Deckglas hängender proteinhaltiger Tropfen über einem Reservoir luftdicht mit Silikonfett versiegelt. Über Diffusion durch die Gasphase kommt es zu einer Gleichgewichtseinstellung zwischen Reservoirlösung und Tropfen. Für erste Screeningversuche wurden grundsätzlich die 98 Lösungen des Crystal Screen und Crystal Screen II-Kit der Firma Hampton Research, USA verwendet. Dazu wurde 1 μl Proteinlösung (15 g l^{-1} QueA-Protein in 10 mM Tris/HCl pH 8,5 mit 5 mM SAM) mit 1 μl Reservoirlösung gemischt und gegen 0,5 μl Reservoirlösung äquilibriert. Für die Herstellung von größeren Mengen an Kristallen höchster Qualität des QueA-Proteins aus *B. subtilis* unter verfeinerten Bedingungen wurde die Methode des sitzenden Tropfens in Chrysem-Platten (Hampton Research, USA) angewandt, dabei wurden bis zu 20 μl Proteinlösung mit 20 μl Reservoirlösung gemischt.

Bei Kokristallisationsexperimenten wurde zunächst eine Mischung aus 15 g/l QueA-Protein mit 5 mM Magnesiumchlorid und 2,5 mM SAM und der 1,5fachen bis 3fachen molaren Menge des QueA-Proteins an RNA für 5 Minuten bei 30°C vorinkubiert. Dann wurde 1 μl dieser vorinkubierten RNA/Proteinlösung mit 1 μl Reservoirlösung gemischt und gegen 0,5 μl auf Eis vorgekühlter Reservoirlösung bei 277 K äquilibriert. Für erste Screeningversuche wurden hier über die 98 Lösungen des Crystal Screen und Crystal Screen II-Kit hinaus auch der speziell für den Einsatz von Nukleinsäuren konzipierte Natrix-Kit der Firma Hampton Research, USA verwendet.

1.2.5 Erste Röntgenbeugungsexperimente und Datenprozessierung

Kristalle wurden zunächst im Hause auf ihre Fähigkeit, Röntgenstrahlen zu beugen, getestet. Dazu wurde ein Rigaku RU-300 Drehanodengenerator mit einem R-AXIS IV Flächendetektorsystem und Fokussierspiegel der Firma MSC, USA verwendet. Der Generator wurde mit 100 mA Anodenstrom bei 50 kV betrieben, der Kristall wurde während des Experiments unter Tieftemperaturbedingungen durch ein X-Stream Tieftemperatursystem der Firma MSC bei einer Temperatur von 100 K im Stickstoffstrom gehalten. Weitere Experimente wurden an den Synchrotronstrahlungsmessplätzen BW7A des DESYs, Hamburg, 5.2R des ELETTRA (Triest) und ID13 des ESRF, Grenoble durchgeführt.

Anfänglich diente bei den Messungen eine Lösung von 30 % PEG 4000, 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 200 mM Ammoniumsulfat und 5 % Glycerin als Tieftemperaturpuffer. Deutlich Verbesserungen wurden dadurch erzielt, dass die Kristalle nicht wie bis dahin üblich, von der Mutterlauge in den Schutzpuffer überführt, sondern im Mutterlauge-Tropfen langsam und schrittweise unter ständiger, vorsichtiger Durchmischung zunächst mit einer Lösung aus 32 % PEG 4000, 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 200 mM Ammoniumsulfat und 8 % Glycerin versetzt wurden. Dann wurde das Gemisch aus Mutterlauge und Kälteschutzpuffer bis auf einen Rest vom Kristall abgenommen und das Verfahren wiederholt. Diese gesamte Prozedur wurde dann mit einer Lösung aus 35 % PEG 4000, 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 200 mM Ammoniumsulfat und 15 % Glycerin erneut durchgeführt, so dass eine langsame, kontinuierliche Erhöhung der Kälteschutzmittelkonzentration gewährleistet war. Zur Anwendung dieses Verfahrens wurden die Kristalle in Chrysem-Platten (Hampton-Research, USA) gezogen.

Die Datenprozessierung wurde zunächst mit dem Programm MOSFLM unter Verwendung des DPS-Autoindizierungsalgorithmus (Powell 1999) durchgeführt, die Skalierung erfolgte dann mit dem Programm SCALA aus dem CCP4-Programmpaket (CCP4 1994). Da mit dem kommerziellen Programmpaket HKL-Suite (Rohdatenprozessierung mit DENZO und XDISP, Skalierung der Daten mit SCALEPACK) (Otwinowski & Minor 1997) insbesondere in den unteren Auflösungsstufen ein signifikant besserer R-Faktor erreicht werden konnte, wurde in späteren Versuchen schließlich dieses zur Datenprozessierung verwendet.

1.2.6 MAD-Experimente und Phasenbestimmung

Kristalle des Selenomethionyl-QueA-Derivates wurden mit dem gleichen Verfahren in Kälteschutzpuffer überführt, wie es bereits für Kristalle nativen QueA-Proteins beschrieben wurde, und an der Messstation ID29 des ESRF montiert. Bei späteren Experimenten wurde auch die Station ID14-4 benutzt. Dann wurde zunächst ein Röntgenfluoreszenz-Wellenlängenspektrum in einem die K-Absorptionskante von Selen (12,657 keV) umschließenden Bereich aufgenommen. Vor der Aufnahme der Datensätze wurde der im Stickstoffstrom eines Tieftemperatursystems der Fa. Oxford Cryosystems auf 100 K gekühlte Kristall soweit entlang der ϕ -Achse verschoben, dass ein bislang unbelichteter Kristallabschnitt in das Strahlzentrum gelangte. Ein erster Datensatz wurde am Maximum des Fluoreszenzspektrums aufgenommen, dann ein zweiter Datensatz am Wendpunkt des Spektrums und ein dritter Datensatz schließlich energetisch deutlich oberhalb der Absorptionskante (siehe Tab. 3). Dazu wurde mit der STRATEGY-Routine in MOSFLM der ideale Startwinkel für eine Messung über einen Winkelbereich von 90° bestimmt. Alle Datensätze wurden mit $0,5^\circ$ Teilrotation pro Bild bei einem Abstand der Mar-CCD-Kamera (Xray Research, Norderstedt) zum Kristall von 250 mm aufgenommen. Für ein Bild wurde der jeweilige $0,5^\circ$ Winkelbereich dreimal abgefahren sowie der CCD-Detektor jeweils dreimal ausgelesen und die Einzelbelichtungen dann zu einem Bild kombiniert, um Schwankungen der Strahleigenschaften auszugleichen.

Native Kristalle der QueA aus *B. subtilis* wurden für 4 Stunden in einem Stabilisierungspuffer (35 % PEG 4000, 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 200 mM NH_4SO_4) einer Konzentration von 1mM Methylquecksilberazetat ausgesetzt und dann auf die gleiche Weise wie zuvor für native Kristalle beschrieben, in Kälteschutzpuffer überführt, und im 100K-Stickstoffstrom eines Tieftemperatursystems der Fa. Oxford Cryosystems auf der Messstation ID14-4 des ESRF montiert. Bei einem Abstand von 183 mm der röntgenlichtempfindlichen Fläche des ADSC-Quantum-4-CCD-Detektorsystems zum Kristall wurden 110° -Datensätze mit $0,5^\circ$ Rotation pro Aufnahme bei Wellenlängen von 0,9999 Å, 1,009 Å, 0,9393 Å und 0,9919 Å gesammelt. Da die Feinabstimmung der Röntgenoptik aufgrund eines Defekts unmittelbar vor der Messung verlorengegangen war, mussten für viele Parameter Schätzwerte benutzt werden, die Detektor-Kristall-Distanz wurde jedoch nach der Messung anhand von

Pulveraufnahmen exakt bestimmt. Auf die gleiche Weise wurden drei Datensätze eines für 12 Stunden in Stabilisierungspuffer mit 1mM Kaliumgoldcyanid gesoakten Kristalls bei Wellenlängen von 1.04023 Å, 1.03979 Å und 0.953736 Å aufgenommen. Die Rohdatensätze wurden mit DENZO prozessiert und mit SCALEPACK unter getrennter Behandlung der Friedelpaare (Option ANOMALOUS) skaliert. Die Suche nach 16 erwarteten Selenpositionen anhand der drei aufgenommenen Datensätze des selenomethioninhaltigen Kristalls erfolgte mit dem Programm SOLVE (Terwilliger & Berendzen 1999) unter Vorgabe von Tabellenwerten als Anfangswerte für die anomalen Streufaktoren F und F' im Auflösungsbereich von 30 Å – 3,5 Å. Um eine lokale Skalierung innerhalb von SOLVE zu ermöglichen, wurde in den eingegebenen Datensätzen auf eine Vereinigung verwandter oder symmetrieverwandter Reflexe bei der Skalierung in SCALEPACK verzichtet (Option „NO MERGE ORIGINAL INDEX“). Es gelang so, erste Koordinaten für 14 Selenpositionen und mit der gewonnenen Phaseninformation eine erste Elektronendichtekarte zu erhalten, die mit dem Programm RESOLVE (Terwilliger & Berendzen 1999) unter Einbeziehung einer Solvenskorrektur weiter bearbeitet wurde. Die gefundenen Schweratompositionen wurden mit dem Programm SHARP (De La Fortelle & Bricogne 1997) zusammen mit Skalierungsfaktoren und anderen Parametern weiter verfeinert. In einem ersten Zyklus wurde hier zunächst neben den Raumkoordinaten auch der Besetzungsgrad (engl. occupancy) und dann der isotrope B-Faktor freigegeben, in weiteren Zyklen wurden daraufhin auch die anomalen Streufaktoren in die Verfeinerung miteinbezogen und für 12 starkbesetzte Schweratompositionen ein anisotroper B-Faktor eingeführt. Desweiteren konnten in einer Dichtekarte der anomalen Differenzen zwei weitere Selenatompositionen ausgemacht und ebenfalls miteinbezogen werden.

Mit den aus dem Selenomethionyl-MAD-Experiment gewonnenen Phasen wurden dann mit dem Programm FFT des CCP4-Programmpaketes (CCP4 1994) die anomalen Differenzen des bei 0,999 Å aufgenommenen Datensatzes des mit Methylquecksilberazetat derivatisierten Kristalles fouriertransformiert. In der so erhaltenen Karte der anomalen Differenzen im Realraum konnten vier Quecksilberatome lokalisiert werden. Auf die zuvor beschriebene Weise wurden auch die Daten des Quecksilberderivates in SHARP zur Gewinnung weiterer Phaseninformation herangezogen. In diese Verfeinerung der MAD-Daten wurde externe Phaseninformation aus dem Selenomethioninexperiment miteinbezogen.

1.2.7 Dichtemodifikation zur Phasenverbesserung und Modellbau

Die mit Hilfe des Programms SHARP aus den MAD-Experimenten mit Selenomethionyl- und Quecksilberderivaten gewonnenen Phasen wurden unter Nutzung des Programms SIGMAA aus dem CCP4-Programmpaket (CCP4 1994) kombiniert. Den kombinierten Phasen wurden die Strukturamplituden des an der Messstation ID29 des ESRF gewonnenen nativen, bis 2,7 Å aufgelösten Datensatzes zugeordnet. Der so gewonnene, bis zu einer Auflösung von 3,3 Å phasiierte Datensatz wurde mit dem Programm DM aus dem CCP4-Programmpaket (CCP4 1994) zur Solvenskorrektur und Anwendung anderer Verfahren der Dichtemodifikation weiterbearbeitet. In einem 15 Zyklen langen Lauf mit DM wurde zunächst eine Phasenerweiterung auf die volle Auflösung von 2,7 Å unter Verwendung der Optionen zur Solvenskorrektur (SOLV), Histogrammstatistik (HIST) und Anwendung dieser Verfahren auf getrennte Auflösungsbereiche (MULT) durchgeführt. In einem weiteren, 50 Zyklen langen Lauf mit DM wurde zusätzlich zu den oben genannten Optionen noch eine Dichtemittlung (AVER) für die beiden in der asymmetrischen Einheit vorhandenen Moleküle angewandt. Masken für die Solvenskorrektur und Dichtemittlung wurden zunächst unter Nutzung der eingebauten Programmroutinen in DM automatisch generiert, später aber von aus dem Strukturmodell abgeleiteten Schablonen manuell mit dem Programm NCSMASK aus dem CCP4-Programmpaket (CCP4 1994) generiert.

Von dem so gewonnen phasiierten und modifizierten Datensatz wurde mit dem Programm FFT aus dem CCP4-Programmpaket eine Elektronendichtekarte errechnet, in die unter Nutzung der „Baton_Build“-Funktion des Programms O (Jones & Kjeldgaard 1997) zunächst eine C α -Spur gebaut wurde, die 60% der im Protein enthaltenen 346 Reste eines Monomers umfasste. Wenn möglich, wurden dabei Helices unter Verwendung einer Modellhelix als Vorlage modelliert. Dann wurden der Proteinsequenz entsprechend und unter Orientierung anhand der Selenpositionen und der mit dem Programm PSIPRED (McGuffin, Bryson et al. 2000) vorhergesagten Sekundärstrukturelemente in beiden Monomeren jeweils etwa 65 Aminosäureseitenketten eingebaut und eine erste automatische Verfeinerung mittels Gradientenmethode mit dem Programm CNS (Brünger, Adams et al. 1998) durchgeführt. Das verfeinerte Modell wurde mit dem Programm CNS dann in den Reziprokrum zurücktransformiert, dem gewonnenen Datensatz Gewichte mit dem Programm SIGMAA durch

Vergleich der Strukturamplituden des Modells mit den experimentell bestimmten Amplituden zugeordnet, und die Modellinformation zu der aus den MAD-Experimenten gewonnenen Phaseninformation hinzukombiniert. Dabei dominierte besonders im unteren Auflösungsbereich die experimentelle Phaseninformation, in höheren Auflösungsschalen nahm der Beitrag der Modellphasen jedoch deutlich zu (Tab. 1).

Wie zuvor beschrieben, wurde dann eine Solvenskorrektur und Dichtemodifikation mit DM durchgeführt und die erhaltene, verbesserte Elektronendichtekarte zur Validierung und weiteren manuellen Verbesserung des Modells in O verwendet. In mehr als 10 solcher Zyklen aus manueller und automatischer Verfeinerung konnten schließlich etwa 40% der gesamten Sequenzinformation Modellbereichen mit ausreichender Sicherheit zugeordnet werden, weitere 30% aufgrund von schlecht interpretierbarer oder fehlender Dichte nur unter Vorbehalt. Das restliche Modell konnte nur als C α -Spur gebaut werden, und für 51 von insgesamt 346 Aminosäureresten konnte keine Elektronendichte beobachtet werden. Diese Reste fehlen im Modell.

Auflösungsbereich [Å]	Anzahl Reflexe	Exp. Phasen	Modellphasen	kombiniert
158.11-11.80	166	0.9162	0.7013	0.9547
11.80-8.36	368	0.9198	0.8221	0.9602
8.36-6.83	502	0.9353	0.7383	0.9554
6.83-5.91	618	0.9384	0.6912	0.9515
5.91-5.29	697	0.9327	0.6654	0.9484
5.29-4.83	796	0.9230	0.7163	0.9459
4.83-4.47	864	0.9099	0.7163	0.9423
4.47-4.18	935	0.9015	0.7234	0.9358
4.18-3.94	1009	0.8764	0.6994	0.9177
3.94-3.74	1042	0.8320	0.6974	0.8871
3.74-3.57	1127	0.7461	0.7245	0.8488
3.57-3.42	1180	0.6680	0.6920	0.8040
3.42-3.28	1229	0.5455	0.6338	0.7261
3.28-3.16	1289	0.3783	0.6392	0.6871
3.16-3.05	1313	0.3209	0.5713	0.6215
3.05-2.96	1335	0.2554	0.5933	0.6197
2.96-2.87	1000	0.2129	0.6468	0.6602

Tabelle 1: Statistik der Phasengütefaktoren, aufgeschlüsselt nach der Auflösung und den Beiträgen der experimentellen Phasen aus den MAD-Experimenten (3. Spalte) und den aus dem verfeinerten Modell gewonnenen Phasen (4. Spalte). Die letzte Spalte zeigt die Phasengüte der kombinierten experimentellen und modellabhängigen Phaseninformation.

1.2.8 Reinigung chemisch synthetisierter RNA

Chemisch synthetisierte RNA wurde bei der Firma Eurogenetch, Belgien in HPLC- und gelgereinigter Qualität gekauft. Der hohe Grad an verbleibenden Verunreinigungen machte eine weitere Reinigung mittels denaturierender PAA-Gelelektrophorese erforderlich. Ein 3 mm dickes Gel wurde aus einer Lösung von 127 g Harnstoff in 159 ml Acrylamidmischung (38 % (w/v) Acrylamid mit 2% (w/v) Bisacrylamid, in Wasser gelöst) und 28 ml 10fach konzentriertem TBE-Puffer (108 g/l Tris, 55 g/l Borsäure und 9,3 g/l EDTA) unter Zusatz von 1,3 ml einer 25prozentigen (w/v) Ammoniumpersulfatlösung und 36 µl TEMED gegossen und über Nacht bei 277 K auspolymerisiert. Die zu reinigende RNA wurde für fünf Minuten in 100 – 350 µl denaturierendem Auftragspuffer (2,5 ml 10fach konzentrierte TBE-Pufferlösung, 25 g Harnstoff, 10 mg Bromphenolblau und 10 mg Xylencyanol, Wasser ad 50 ml) gekocht und eine Gesamtmenge von nicht mehr als 1,5 mg RNA auf ein 25 cm breites Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit TBE-Laufpuffer für eine Dauer von 15-25 Stunden bei 1000 V und 277 K Umgebungstemperatur betrieben. Die RNA-Banden wurden dann durch ihren Schattenwurf in ultraviolettem Licht auf einem fluoreszenzbeschichteten Schirm sichtbar gemacht und die größte Bande mit einem Skalpell aus dem restlichen Gel ausgeschnitten. Der so gewonnene RNA-haltige Gelabschnitt wurde zerkleinert und die RNA über Nacht im dreifachen Volumen TBE-Puffer daraus eluiert. Aus dem Eluat wurden restliche PAA-Gelpartikel mittels Filtration abgetrennt und die RNA durch Zusatz von 1/10 Volumeneinheiten 3M Natriumazetatpuffer pH 4,5 und 2,5 Volumeneinheiten absolutem Ethanol bei 193 K gefällt. Die durch Zentrifugation sedimentierte RNA wurde dann dreimal mit 70 prozentigem (v/v) Ethanol in den zur Zentrifugation verwendeten Corex-Röhrchen gewaschen und an der Luft getrocknet. Danach konnte sie durch Lösen in einer geringen Menge Wasser aus den Zentrifugenröhrchen entfernt und zur Lagerung in 1,5 ml Eppendorf-Probengefäßen erneut gefällt und getrocknet werden. Durch die Verwendung autoklavierter Gefäße und autoklavierten Wassers, Tragen von Handschuhen und größtmöglicher Reinlichkeit im Umgang mit den RNA-Präparationen wurde der hohen Anfälligkeit gegen RNase-Abbau Rechnung getragen, auf den Einsatz von Proteaseinhibitoren wurde jedoch im Hinblick auf mögliche störende Interferenzen bei Kokristallisationsexperimenten verzichtet.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Überexpression und Proteinreinigung

Um die Chance einer erfolgreichen Strukturaufklärung zu maximieren, wurde die zuvor bereits bei der Strukturaufklärung des Tgt-Ezyms (Romier, Reuter et al. 1996) erfolgreiche Strategie angewandt, verschiedene Orthologe des Zielenzym für Kristallisationsversuche zu klonieren und zu reinigen. Es wurden die *queA*-Gene aus insgesamt 12 verschiedenen Organismen verwandt. Die Ergebnisse der kristallographischen Versuche mit den transgen überproduzierten und gereinigten Genprodukten sollen im weiteren beschrieben werden.

Die *queA*-Gene der eubakteriellen Organismen *Aquifex aeolicus*, *Bacillus subtilis*, *Borrelia burgdorferi*, *Clostridium acetobutylicum*, *Deinococcus radiodurans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Rickettsia prowazekii*, *Staphylococcus aureus*, *Synechocystis sp.* und *Thermotoga maritima* wurden als GST- (kodierend für *Schistosoma japonicum* Glutathion-S-Transferase) Fusionsgene (Smith & Johnson 1988) kloniert und in *E. coli* überexprimiert. Alle Fusionsgene führten zur Produktion großer Mengen löslichen Fusionsproteins, mit Ausnahme derer, die die

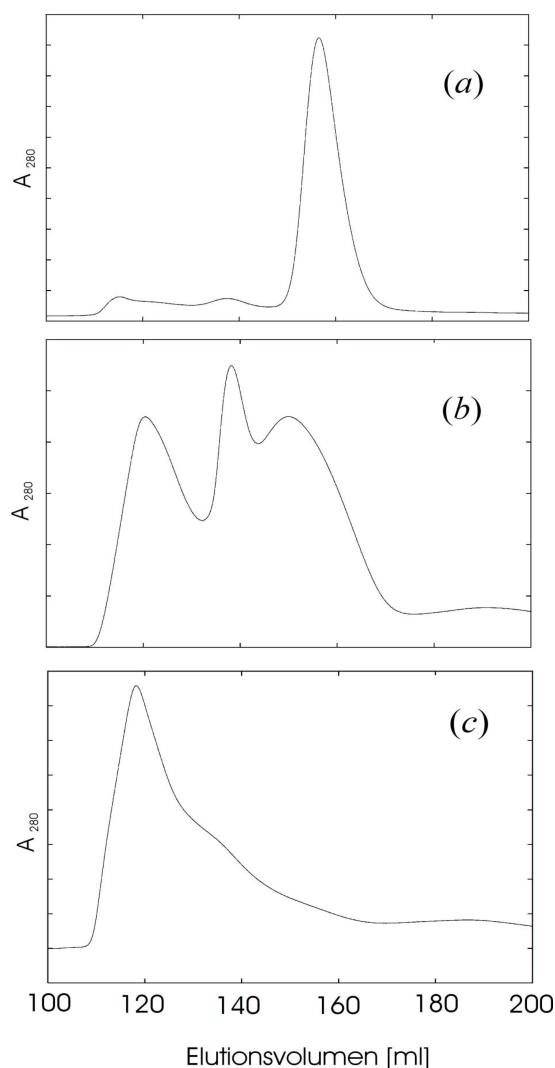


Abbildung 6: Die Elutionsprofile von Gelfiltrationsläufen mit QueA-Protein aus drei verschiedenen Organismen. (a) Das Elutionsvolumen von QueA aus *E. coli* entspricht einem Molekulargewicht von annähernd 40 kDa, was auf einen monomeren Zustand dieses Proteins schließen lässt. Ein identisches Verhalten konnte für QueA aus *C. acetobutylicum*, *D. radiodurans*, *H. influenzae*, *S. aureus* und *B. subtilis* beobachtet werden. (b) QueA aus *Synechocystis sp.* bildet offensichtlich stabile Aggregate, da das Elutionsprofil neben einem dem monomeren Zustand entsprechenden Maximum noch zwei weitere Maxima aufweist, die Oligomerisierungszuständen höherer Ordnung zuzuordnen sind. (c) Das Elutionsprofil von QueA aus *A. aeolicus* zeigt ein Maximum mit einer langen Schleppe. Dieses Maximum befindet sich in der Nähe des Ausschlussvolumens des verwendeten Säulenmaterials und korrespondiert mit einem Molekulargewicht von deutlich über 100 kDa. Diese Profilform weist auf ein reversibles Aggregationsverhalten hin.

Gene von *B. burgdorferi*, *H. pylori* und *R. prowazekii* enthielten. Während das GST-R-*prowazekii queA*-Fusionsgen nicht in nachweisbaren Mengen exprimiert wurde, führten die zwei anderen Konstrukte zur Produktion unlöslichen Fusionsproteins. Im Falle des *B. burgdorferi queA*-Gens war das Fusionsprotein verkürzt. Dies stellte sich als Folge einer Rasterschubmutation, ausgelöst durch die Deletion einer Base des *queA*-Gens auf der chromosomalen DNA des verwendeten Typusstammes von *B. burgdorferi* (DSM4680) heraus. Diese Deletion befindet sich auch in der Sequenz des kompletten Genoms von *B. burgdorferi* (Fraser, Casjens et al. 1997). Die QueA-Proteine dieser drei Organismen wurden im weiteren nicht mehr berücksichtigt. Die GST-Anteile der anderen Fusionsproteine ermöglichten die Reinigung über Affinitätschromatographie mittels Glutathionsepharosematerials. Nachdem die Fusionsproteine an die Sepharose gebunden hatten, wurde der QueA-Anteil proteolytisch abgespalten und eluiert. Schließlich wurde das gelöste QueA-Protein mittels Filtration vom GST-haltigen Glutathionsepharosematerial abgetrennt und mittels Gelfiltrationsmethoden, wie zuvor beschrieben, weiter gereinigt, um auch Restverunreinigungen zu beseitigen. Infolge der Eigenheiten der angewendeten Überexpressionsstrategie enthielt jedes der bearbeiteten QueA-Proteine zwei oder fünf zusätzliche Aminosäurereste am N-Terminus. Die QueA-Proteine von *C. acetobutylicum*, *D. radiodurans*, *E. coli*, *Haem. influenzae*, *S. aureus* und *B. subtilis* wiesen auf der Gelfiltrationssäule ein Migrationsverhalten auf, das einem monomeren Zustand dieser Proteinmoleküle entspricht, und sich im Elutionsprofil durch das Vorhandensein eines Hauptmaximums bemerkbar machte (Abb. 6a). Als Vergleich für die Bewertung dienten Testläufe mit bestimmten Standardproteinen (hier nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigte das Elutionsprofil des QueA-Proteins von *Synechocystis* sp. drei Hauptmaxima (Abb. 6b), was darauf hinweist, dass dieses Protein über die Anwesenheit von monomeren Proteinmolekülen hinaus auch stabile Aggregate höherer Ordnung bilden kann. Die QueA-Proteine von *A. aeolicus* und *T. maritima* eluierten bei einem Volumen, das nicht mehr im empfohlenen Trennbereich der verwendeten Säule lag. Dementsprechend war ein Molekulargewicht von über 100 kDa anzunehmen. Bei beiden Proteinen war im Elutionsprofil ein dem Maximum folgender Schmiereffekt (Abb. 6c) zu beobachten. Dies weist auf eine Tendenz dieser Proteine hin, reversibel zu aggregieren, was zuvor bereits beim Tgt-Enzym von *E. coli* beobachtet wurde (Reuter & Ficner 1995).

1.3.2 Kristallisation und röntgenkristallographische Bewertung der Kristallqualität

Alle neun gereinigten orthologen QueA-Proteine wurden einem „sparse matrix“ Kristallisationsscreening (Cudney, Patel et al. 1994) unter Verwendung kommerziell erhältlicher Kits unterworfen. Anschließend wurden weitere Screenings ausgeführt, sowohl um bereits gefundene Kristallisationsbedingungen zu verfeinern, als auch weitere neue Kristallisationsbedingungen zu finden. Für alle QueA-Proteine wurden Screenings mit Ammoniumsulfat, Lithiumsulfat, Natriumchlorid, Kalium/Natriumphosphat, Natriumformiat, Natriumzitat und PEG

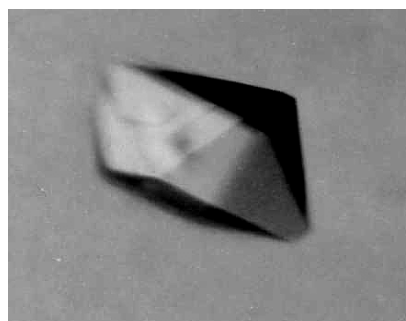


Abbildung 7: Kristall des QueA-Proteins aus *E. coli* (siehe Text).

verschiedener Molekulargewichte als Fällungsmittel durchgeführt. Sowohl verschiedene pH-Werte als auch Präzipitanskonzentrationen und der Einfluss verschiedener Additive wie z. B. Salze, Zucker, Alkohole und Detergenzien wurde in jedem Fall systematisch getestet. Die Ergebnisse dieser ausgedehnten Bemühungen waren Kristalle fünf verschiedener Formen, die von den QueA-Proteinen aus *T. maritima*, *Haem. influenzae*, *E. coli* und *B. subtilis* erhalten werden konnten.

Das QueA-Protein aus *T. maritima* bildete nach einer Zeitdauer von mehr als drei Wochen dünne Plättchen bei einer Temperatur von 293K mit 30 % PEG 4000 als Fällungsmittel und 200 mM NaCl als Additiv im pH-Bereich zwischen 6,0 und 8,5. Die

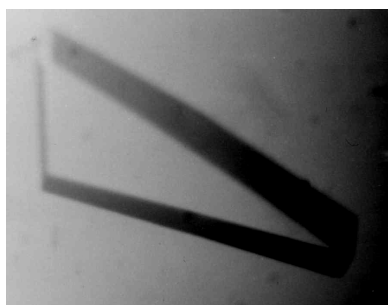


Abbildung 8: Kristall des QueA-Proteins aus *B. subtilis* (siehe Text).

Kristalle waren in einer Proteinhaut eingeschlossen und besaßen Dimensionen von ungefähr $0,1 \times 0,1 \times 0,01 \text{ mm}^3$. Trotz intensiver Bemühungen gelang es nicht, diese Kristalle nennenswert zu vergrößern.

Nach vier bis fünf Wochen lieferte das QueA-Protein aus *T. maritima* kubische Kristalle mit einer Kantenlänge vom 0,1 mm im pH-Bereich von 7,5 bis 9,0 unter Verwendung von 5% bis 10% PEG 8000 als Fällungsmittel.

Bei Fällungsmittelkonzentrationen von 3% bis 7% konnten nach 6 Monaten kubische Kristalle mit einer Kantenlänge von bis zu 0,4 mm erhalten werden. Am hauseigenen Drehanodengenerator konnte mit diesen Kristallen keine Röntgen-

beugung nachgewiesen werden. Ebenso zeigten Kristalle der QueA aus *Haem. influenzae*, die bei 277 K mit 15 % PEG 4000 sowie 100 mM 3-(Cyclohexylamino)-1-Propansulfonsäure (CHES; pH 9.0) und 100 mM Kalziumazetat als Reservoirlösung gezogen wurden, keine Röntgenbeugung am hauseigenen Generator. Die Größe der getesteten Kristalle betrug annähernd $0,15 \times 0,1 \times 0,1 \text{ mm}^3$.

Kleine Kristalle der *E. coli* QueA erschienen zunächst innerhalb eines Zeitraums von zwei Wochen bei 277 K in Anwesenheit von 28 % PEG 4000 und 200 mM Li_2SO_4 mit 100 mM Tris-HCl pH 8,5 als Puffersubstanz im Reservoir. Die Abmessungen dieser Kristalle konnten deutlich vergrößert werden, wenn sie in einem Tropfen aus 2 μl Proteinlösung (deren Konzentration auf 50 g/l erhöht wurde) und 1,33 μl Reservoirlösung mit 17 % PEG 4000, 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 200 mM MgCl_2 und 1,23 μM β -Octyl-D-glucosid (0,05 % der kritischen Mizellenkonzentration) gezogen wurden. Nach etwa zwei Monaten erreichten die Kristalle eine Größe von annähernd $0,5 \times 0,1 \times 0,1 \text{ mm}^3$ (Abb. 7). Versuche zur Beschleunigung des Kristallwachstums durch Seedingverfahren blieben erfolglos. Unter Verwendung des hauseigenen Generators beugten die so erhaltenen Kristalle bis 12 Å. Trotz intensiver Bemühungen konnten die Kristalle nicht verbessert werden.

Innerhalb von zwei Tagen konnten mit einer Reservoirlösung aus 30 % PEG 4000, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 und 200 mM Ammoniumsulfat sowohl bei 277 K als auch bei 293 K kleine plättchenartige Kristalle der *B. subtilis* QueA erhalten werden. Durch Reduktion der Fällungsmittelkonzentration auf bis zu 24% und Erhöhung der Tropfen-

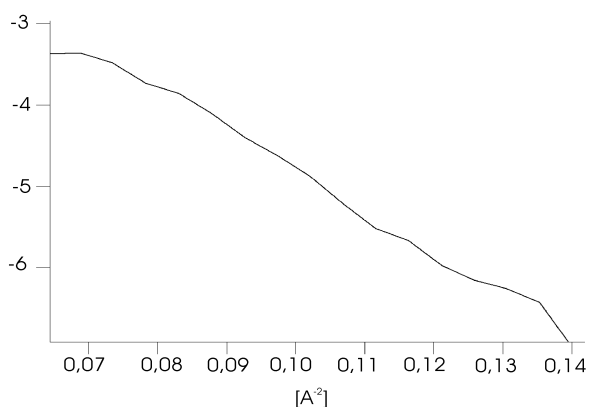


Abbildung 9: Wilson-Diagramm des nativen Synchrotron-datensatzes der QueA.

fenggröße auf bis zu 40 μl (20 μl Proteinlösung mit 20 μl Reservoirlösung) konnten schließlich Plättchen mit Kantenlängen von mehr als $1,0 \times 1,0 \text{ mm}^2$ und einer Dicke von bis zu 0,15 mm erreicht werden (Abb. 8). Es konnte beobachtet werden, dass eine Erhöhung des pH-Wertes bis 9,5 sich zu-

gunsten der Plättchendicke auswirkte, aber zulasten der Kristallqualität ging. Als Kompromiss wurde deshalb schließlich ein pH-Wert von 7,5 für die Produktion von Kristallen höchster Qualität gewählt.

Zunächst konnte mit diesen Kristallen am hauseigenen Generator nur Beugung bis etwa 8 Å erreicht werden, unter Verwendung von Synchrotronstrahlung der MAD-Strahlstationen 5.2R des ELETTRA (Triest) und BW7A des DESY (Hamburg) wurde das Beugungslimit bis auf etwa 5 Å erhöht.

Durch weitere Feinstabstimmung der Kristallisationsbedingungen, aber vor allem durch weitere Versuche zur Verbesserung der Tieftemperaturbedingungen, konnte die Beugungsqualität schließlich soweit verbessert werden, dass mit qualitativ hochwertiger Synchrotronstrahlung des ESRF, Grenoble Reflexe deutlich unterhalb von 3 Å messbar wurden. Die Statistik eines solchen, an Messstation ID29 des ESRF aufgenommenen Datensatzes zeigt Tab. 1. Allen Datensätzen gemeinsam ist, dass der aus dem Wilson-Diagramm (Abb. 9) abgeleitete B-Faktor mit einem Wert von etwa 96 Å² außergewöhnlich hoch ist.

Eine wesentliche Verbesserung im Verlauf der Kristalloptimierung brachte zunächst die Verwendung von Paratone-N (Hampton Research, USA) als Tieftemperaturschutzmittel. Nachteilig erwies sich in diesem Zusammenhang aber die sehr schlechte

Auflösung (Å)		30 – 2,7
Wellenlänge (Å)		0,9393
Anzahl beobachteter Reflexe		826222
Anzahl symmetrieunabh. Refl.		41787
Vollständigkeit	insgesamt	99,9%
	äußere Schale	99,7%
R_{sym}*	insgesamt	5,3%
	äußere Schale	33,9%
I/σ	insgesamt	27,9
	äußere Schale	2,6
Zellkonstanten (Å)		
	a, b	101,5
	c	153,4

Tabelle 2: Statistik des nativen Datensatzes, aufgenommen an Messstation ID29 des ESRF, April 2001

*R_{sym} = $\sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, wobei I die beobachtete Intensität und $\langle I \rangle$ die mittlere Intensität für mehrfache Messung bedeutet

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Ein Durchbruch wurde schließlich dadurch erzielt, dass die Kristalle nicht, wie bisher üblich, von der Mutterlauge in den Kälteschutzpuffer überführt, sondern im Mutterlauge-Tropfen langsam und schrittweise unter ständiger, vorsichtiger Durchmischung mit einem Schutzpuffer aus 35 % PEG 4000, 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 200 mM Ammoniumsulfat und 15 % Glycerin versetzt wurden. Diese Prozedur wurde solange fortgesetzt, bis eine ungefähre Endkonzentration von mehr als 10% Glycerin im

Tropfen erreicht war. Das Verfahren ließ sich durch die Verwendung einer Zwischenkonzentration mit lediglich 32 % PEG 4000 plus 8 % Glycerin und Anwendung der Kristallisationsmethode des sitzenden Tropfens erleichtern. Das Reflexprofil und die Kristallmosaizität konnte unter Verwendung dieses Verfahrens reproduzierbar verbessert werden.

1.3.3 Schweratomderivatkristalle des QueA-Proteins und MAD-Experimente

Ein Selenomethionylderivat des QueA-Proteins aus *B. subtilis* wurde hergestellt und der Erfolg des Seleneinbaus in das gereinigte Protein mittels Elektrospray-Massenspektroskopie überprüft. Dabei wurde zwischen dem nativen und dem derivativen QueA-Protein eine Massendifferenz von 379 Da festgestellt (Abb. 10), was dem

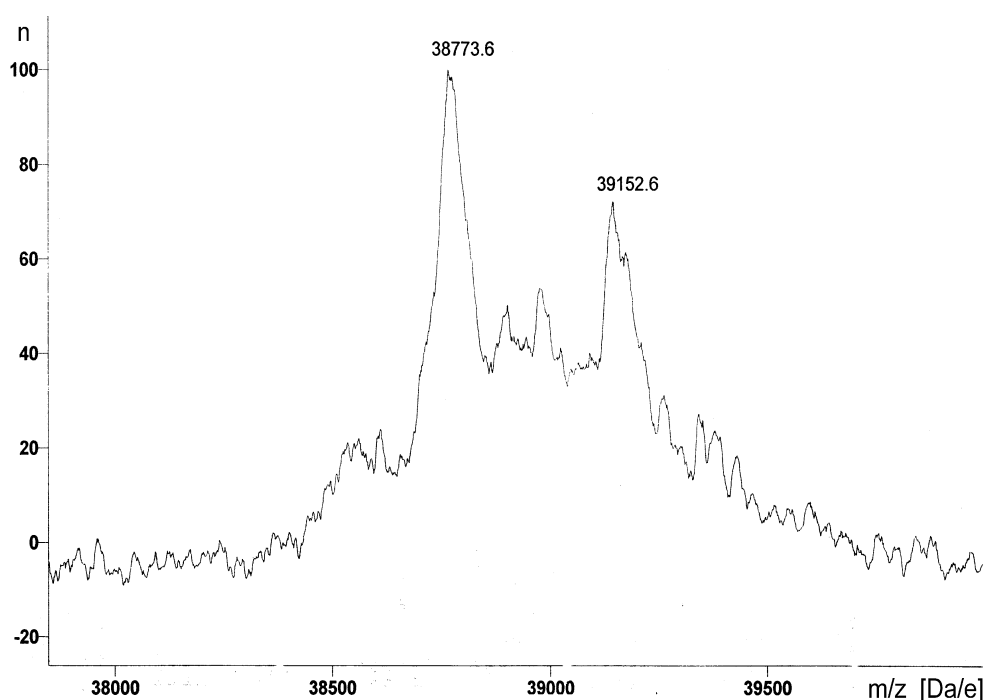


Abbildung 10: Massenspektrum eines Gemischs von nativem QueA-Protein aus *B. subtilis* und dem entsprechenden Selenomethionylderivat. Die zwei größten Maxima stehen zueinander in einer Entfernung, die 379 Da/e bzw. einer Massedifferenz von 379 Da ($z=1e$) entspricht.

Austausch aller Methionin-Schwefelatome gegen Selenatome entspricht. Die aus diesem Selenomethionylderivat erhaltenen Kristalle waren morphologisch zu Kristallen aus nativem QueA-Enzym identisch und zeigten sowohl in den gemessenen Zellkonstanten als auch in der Auflösungsgrenze ihres Beugungsbildes keine signifikanten Unterschiede zu nativen Kristallen. Zusätzlich wurden Kokristallisations- und Soakingexperimente mit verschiedenen Schwermetallsalzen unternommen. Dabei stellte sich heraus, dass die Kristalle hohe Konzentrationen (1 mM und mehr) verschiedener Quecksilber- und Goldsalze, die der Mutterlauge zugesetzt waren, tolerierten, ohne dass die Auflösungsgrenze ihres Beugungsbildes oder die Kristallmosaizität zu stark beeinträchtigt wurden.

An der Synchrotronmessstation ID14-1 des ESRF, Grenoble wurde im Februar 2000 zunächst ein Kristall des Selenomethionylderivates vermessen. Der Datenqualität nach zu urteilen, hätte eine Bestimmung von Schweratompositionen prinzipiell im Bereich des Möglichen gelegen, jedoch blieb die Suche nach den Selenpositionen erfolglos. Ein auffälliges Merkmal dieses Datensatzes bei der Bearbeitung mit den Programmen SOLVE und SHARP war, dass die Verfeinerung der anomalen Streufaktoren F und F' nicht konvergierte. Da bei der Messung Probleme mit extremen Verschiebungen der Strahlposition auftraten, ist anzunehmen, dass während der Aufnahme der Datensätze die Konstanz der Wellenlänge nicht in dem für ein MAD-Experiment notwendigen Maß gewährleistet war. Im April 2001 wurde deshalb erneut ein MAD-Experiment mit Selenomethionylderivatkristallen an der Messstation ID29 durchgeführt, Tab. 3 zeigt die Statistik des Drei-Wellenlängenexperiments. Dieses erlaubte eine erste Bestimmung der Phasen, so dass nach einer Solvenskorrektur eine interpretierbare Elektronendichtekarte erhalten wurde, in der Helices und Faltblattstrukturen erkennbar waren. Ebenfalls an dieser Messstation wurde auch ein Experiment mit anomaler Dispersion bei nur einer Wellenlänge mit einem für 4 Stunden in 1mM Methylquecksilberazetat „gesoakten“ Kristall durchgeführt, die Statistik dieses Experiments ist in Tab. 4 dargestellt. Das ursprünglich für dieses Quecksilberderivat vorgesehene Drei-Wellenlängenexperiment konnte nicht durchgeführt werden, da bereits in den letzten Bildern des ersten Datensatzes eine rapide Abnahme der Beugungsqualität des Kristalls festzustellen war. Diese Qualitätsabnahme war mit hoher Wahrscheinlichkeit auf ungenügende Wärmeabfuhr infolge ungünstiger Positionierung des Kristalls im Tieftemperatur-Stickstoffstrom zurückzuführen. Eine Dichtekarte der anomalen Differenzen (siehe Abb. 19), die von diesem Datensatz mit Hilfe der über das Selenomethionylderivat erhaltenen Phasen erstellt wurde, zeigte vier klare Maxima pro asymmetrischer Einheit, deren Koordinaten im Programm SHARP im Zusammenhang mit dem ebenfalls an Messstation ID29 aufgenommenen nativen Datensatz (Statistik siehe Tab. 2) zur Phasenberechnung unter Nutzung isomorpher und anomaler Differenzen benutzt wurden. Da auch in einer Elektronendichtekarte, bei der diese zusätzlichen Phaseninformation genutzt wurde, größere Bereiche nicht oder nur schwer interpretierbar waren, wurden an einem weiteren Termin an der Messstation ID14-4 des ESRF weitere mit Methylquecksilberazetat „gesoakte“ Kristalle vermessen. Hier gelang die Durchführung zweier MAD-

Experimente mit je vier Wellenlängen. Dieser für ein Quecksilberderivat unübliche Aufwand wurde getrieben, da unmittelbar vor der Messung ein Defekt der Steuer-elektronik der Messstation einen Verlust der Feinabstimmung der Röntgenoptik zu-folge hatte und ein Röntgenfluoreszenz-Wellenlängenscan zur Bestimmung des Schweratom-Absorptionsmaximums nicht mehr möglich war. Um auch einer gerin-gen Unsicherheit in der eingestellten Wellenlänge Rechnung zu tragen, wurde ein zweites Experiment mit leicht variierten Werten für die verschiedenen Wellenlängen durchgeführt. Das MAD-Experiment, das bei der Phasierung mit SHARP die besse-ren Phasengütefaktoren lieferte, wurde dann in die weiteren Phasenberechnungen einbezogen. Die Statistik dieses Experiments, bei dem erwartungsgemäß vier Queck-silberpositionen in der asymmetrischen Einheit gefunden wurden, ist in Tab. 4 darge-stellt. Die Dichtekarte der anomalen Differenzen des am Absorptionsmaximum für Goldatome aufgenommenen Datensatzes eines mit Kaliumgoldzyanid „gesoakten“ Kristalls zeigte keine Maxima, die aufgrund ihrer Größe und Form gebundenen Goldatomen zugeordnet werden konnten.

<i>Datensammlung</i>				
Experiment		$\lambda 1$ (Maximum)	$\lambda 2$ (Wendepunkt)	$\lambda 3$ (Entfernt)
Auflösung (Å)		70 – 2,9	70 – 2,9	70 – 2,9
Wellenlänge (Å)		0,9787	0,9789	0,9205
Gesamtzahl beobachteter Reflexe		333103	449558	391809
Anzahl symmetrieunabh. Reflexe		33321	33456	33623
Vollständigkeit	insgesamt	98,7%	99,0%	99,4%
	äußere Schale	93,7%	92,9%	100,0%
R_{sym}*	insgesamt	4,2%	4,6%	3,8%
	äußere Schale	30,5%	36,4%	27,1%
I/σ	insgesamt	17,2	17,4	19,1
	äußere Schale	1,9	1,6	2,9
Zellparameter (Å)				
a, b			101,4	
c			153,2	
<i>Phasenberechnung</i>				
PhP† zentrisch (isomorpher Beitrag)		3,74	3,04	0,00
PhP azentrisch (isomorpher Beitrag)		5,95	4,41	0,00
PhP azentrisch (anomaler Beitrag)		3,49	2,86	2,94
FOM‡, zentrische Refl.	insgesamt		0,633	
	äußere Schale		0,204	
FOM, azentrische Refl.	insgesamt		0,576	
	äußere Schale		0,067	
Anzahl Schweratompositionen in der asymmetrischen Einheit			16	

Tabelle 3: Statistik des Selenomethionyl-MAD-Experiments an Messstation ID29 des ESRF, April 2001

*R_{sym} = $\sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, wobei I die beobachtete Intensität und $\langle I \rangle$ die mittlere Intensität für mehrfache Messung bedeutet

†PhP, Phasierungskraft (Phasing power) ist der quadratische Mittelwert($|F_h|/E$), wobei $|F_h|$ die Amplitude der Schweratomstrukturfaktoren und E den sog. „residual lack of closure error“ darstellt.

‡FOM, Phasengütefaktoren (figure of merit).

<i>Datensammlung</i>				
Experiment	$\lambda 1$ (Maximum)	$\lambda 2$ (Wendepunkt)	$\lambda 3$ (Entfernt)	$\lambda 4$ (Entfernt)
Auflösung (Å)	70 – 3,3	70 – 3,3	70 – 3,3	70 – 3,3
Wellenlänge (Å)	0,9999	1,009	0,9393	0,9919
Gesamtzahl beobachteter Reflexe	519435	516259	515575	519040
Anzahl symmetrieunabh. Reflexe	12380	12300	12654	12913
Vollständigkeit	insgesamt	99,5%	99,5%	99,2%
	äußere Schale	99,4%	99,5%	97,5%
R_{sym}*	insgesamt	6,5%	5,8%	7,4%
	äußere Schale	26,1%	21,84%	43,0%
I/σ	insgesamt	19,6	15,1	17,9
	äußere Schale	5,9	6,2	4,4
Zellkonstanten (Å)				
	a, b		101,3	
	c		152,1	
<i>Phasenberechnung</i>				
PhP† zentrisch (isomorpher Beitrag)	1,81	0,05	0,00	0,45
PhP azentrisch (isomorpher Beitrag)	2,65	0,60	0,00	0,13
PhP azentrisch (anomaler Beitrag)	2,60	2,72	2,20	1,70
FOM‡, zentrische Refl.	insgesamt		0,478	
	äußere Sch.		0,163	
FOM, azentrische Refl.	insgesamt		0,331	
	äußere Sch.		0,077	
Anzahl Schweratompositionen in der asymmetrischen Einheit			4	

Tabelle 4: Statistik des Quecksilber-MAD-Experiments an Messstation ID14-4 des ESRF, April 2001. Die Auflösung der Datensätze wurde auf 3,3 Å begrenzt, da aufgrund statistischer Indikatoren des Programms SOLVE jenseits dieser Grenze keine verwertbare Phaseninformation mehr zu erwarten war.

* $R_{sym} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, wobei I die beobachtete Intensität und $\langle I \rangle$ die mittlere Intensität für mehrfache Messung bedeutet

†PhP, Phasierungskraft (Phasing power) ist der quadratische Mittelwert ($|F_h|/E$), wobei $|F_h|$ die Amplitude der Schweratomstrukturfaktoren und E den sog. „residual lack of closure error“ darstellt.

1.3.4 Modellbau

Die aus den MAD-Experimenten mit Selenomethionyl- und Quecksilberderivaten gewonnene Phaseninformation wurde zur Berechnung einer solvenskorrigierten Dichte kombiniert. Diese Dichte wies einen gut definierten Kernbereich, der im wesentlichen von fünf Strängen eines ausgedehnten β -Faltblatts und drei α -Helices gebildet wurde, auf. Ein großer Teil der restlichen Dichte war nur schlecht definiert oder nicht interpretierbar. Eine besondere Schwierigkeit bei der Dichteinterpretation und der Zuordnung der Aminosäuresequenz waren häufige Lücken und fehlende Schleifenbereiche. Relativ ausgedehnte Bereiche der Dichte waren schlecht definiert oder fehlten offensichtlich ganz. Solche schlecht definierten Bereiche konnten besser sichtbar gemacht werden, indem wiederholt Phasen des Teilmodells zu den experimentellen Phasen hinzukombiniert wurden. Diese trugen insbesondere zur Qualität höherer Auflösungsschalen bei (Tab. 1). So gelang schließlich auch in Regionen mit fragmentierter Dichte eine Interpretation, wobei jedoch für die N-terminalen Reste 18-27, die Reste 152-160 und weitere 15 Reste, die sich vermutlich im C-terminalen Bereich des Proteins befinden, keine Seitenketten gebaut werden konnten, so dass dort das Modell lediglich aus einer Poly-Alaninspur besteht. Am N-Terminus, am C-Terminus und im Bereich, der die zwei Domänen des Proteins verbindet und einem mutmaßlichen Schleifenbereich sind insgesamt 51 Reste keiner eindeutig definierten Elektronendichte zuweisbar (Siehe Anhang). Insbesondere im C-terminalen Bereich des Proteins besteht aufgrund der schlechten Strukturinformation und Modellgeometrie zudem eine gewisse Unsicherheit über die korrekte Zuordnung der Sequenzinformation zur Elektronendichte. Der aus dem Wilson-Diagramm (Abb. 9) abgeleitete extrem hohe B-Faktor findet seine Entsprechung im mittleren B-Faktor des Modells, der mit $90,4 \text{ \AA}^2$ außergewöhnlich hoch ist. Damit einher geht ein erhöhter R-Faktor, der von 61,8% beim Anfangsmodell auf 38,9% und einen freien R-Faktor von 46,1% beim finalen Modell unter Einführung einer Solvens- und anisotropen Gesamt-B-Faktorkorrektur gesenkt werden konnte. Dieser hohe verbleibende R-Faktor ist offensichtlich eine Folge der relativ großen inneren Unordnung der QueA-Kristalle..

1.3.5 Grundstruktur und Topologie des QueA-Enzyms

Das Modell des QueA-Proteins präsentiert sich als langgestreckte, in zwei voneinander abgesetzte Domänen gegliederte Struktur (Abb. 12). Die Reste 68 bis 169 bilden die kleinere der beiden Domänen, die übrigen Aminosäurereste bilden die zweite, etwa dreimal so große Domäne aus. Diese Grundstruktur lässt sich auch unschwer aus der experimentellen Elektronendichte (Abb. 13 und 14) erkennen. Sowohl der N- als auch der C-Terminus (beide sind kristallographisch unsichtbar) befinden sich offenbar im Bereich der großen Domäne. Die kleine Domäne faltet in eine 6+1strängige β -Fasstruktur, die ähnlich in trypsinartigen pankreatischen Serinproteasen (Birktoft & Blow 1972), in bakteriellen Serinproteasen wie der α -Lytischen Protease (Fujinaga,

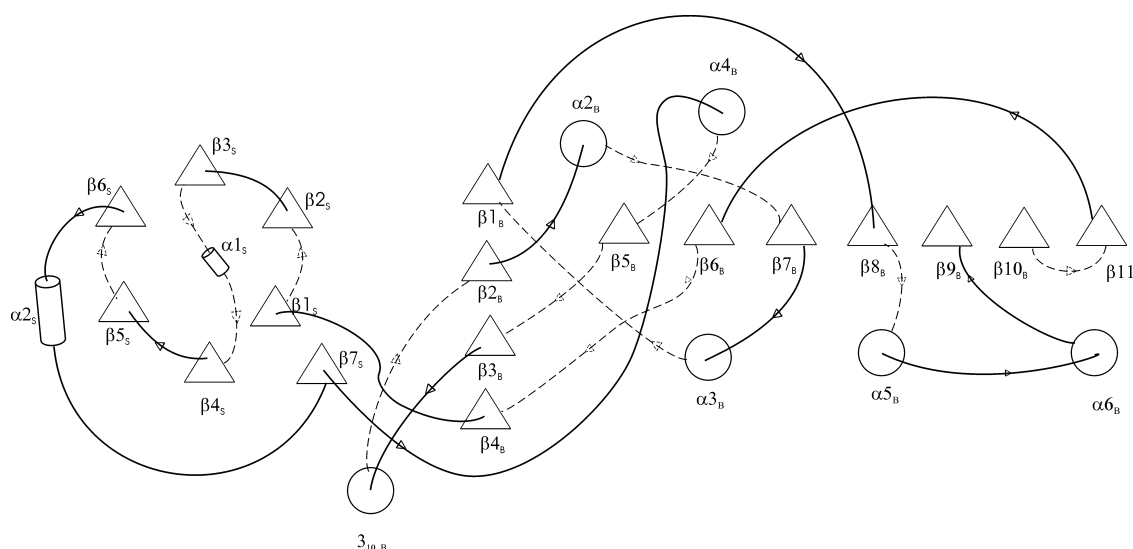


Abbildung 11: Topologieschema der Faltung des QueA-Proteins. β -Stränge sind durch Dreiecke, Helices durch Kreise (in der Aufsicht) bzw. durch Zylinder (In der Seitenansicht) symbolisiert. Der N-terminus scheint im Bereich von Strang β_{10B} , der C-terminus im Bereich von Strang β_{9B} zu münden. Die tatsächlichen Termini sind kristallographisch nicht sichtbar, besonders in diesem Bereich besteht eine relativ hohe Unsicherheit über die Topologie des Faltungsverlaufs.

Delbaere et al. 1985), aber auch in viralen Proteinen wie dem Sindbis-Virus-Nukleocapsid-Kernprotein (Choi, Tong et al. 1991) und der humanen Rhinovirus 3C-Protease (Matthews, Smith et al. 1994) gefunden wird. Die Benennung der Sekundärstrukturelemente der kleinen Domäne erfolgt hier in der Reihenfolge ihres Auftretens in der Polypeptidkette. Die Stränge β_{1s} - β_{3s} bilden ein über Schleifen verknüpftes antiparalleles Faltblatt, das über Helix α_{1s} mit einem weiteren solchen Faltblatt aus den Strängen β_{4s} - β_{6s} verknüpft ist (Abb. 11). Beide Faltblätter formen gemeinsam die erwähnte β -Fasstruktur, der –verbunden über Helix α_{2s} – ein siebter

Strang $\beta 7_s$ hinzugefügt ist und der in Richtung der großen Domäne zurückfaltet. Die Helices $\alpha 1_s$ und $\alpha 2_s$ formen auf beiden Enden des Fasses eine Art Deckel. Die weitere Verbindung zur großen Domäne durch die Reste 161-183 ist kristallographisch unsichtbar. Die Benennung der Sekundärstrukturelemente der großen Domäne erfolgt nach ihrer räumlichen Anordnung vom Molekülinneren nach außen, da die topologische Abfolge der Strukturelemente der großen Domäne insbesondere im Bereich der Termini zum Teil mit einer gewissen Unsicherheit behaftet ist. Ein kleineres Faltblatt aus den Strängen $\beta 1_B$ - $\beta 4_B$ (von denen vermutlich drei antiparallel und zwei parallelen verlaufen) bildet zusammen mit Helix $3_{10 B}$ die Kontaktfläche zur kleinen Domäne. Die Stränge $\beta 3_B$ und $\beta 4_B$ dieses Faltblattes gehen direkt über in die Stränge $\beta 5_B$ - $\beta 6_B$, die zusammen mit den Strängen $\beta 7_B$ - $\beta 11_B$ ein weiteres ausgedehntes Faltblatt formen. Die Stränge $\beta 5_B$ - $\beta 8_B$ verlaufen parallel, die Stränge $\beta 9_B$ - $\beta 11_B$ scheinen dagegen antiparallel zu verlaufen. Dieses große β -Faltblatt wird auf der Oberseite von den Helices $\alpha 2_B$ und $\alpha 4_B$, auf der Unterseite von den Helices $\alpha 3_B$, $\alpha 5_B$ und $\alpha 6_B$ flankiert. Die Eigenheiten des Faltungsmusters werden näher in Teil 1.4 besprochen.

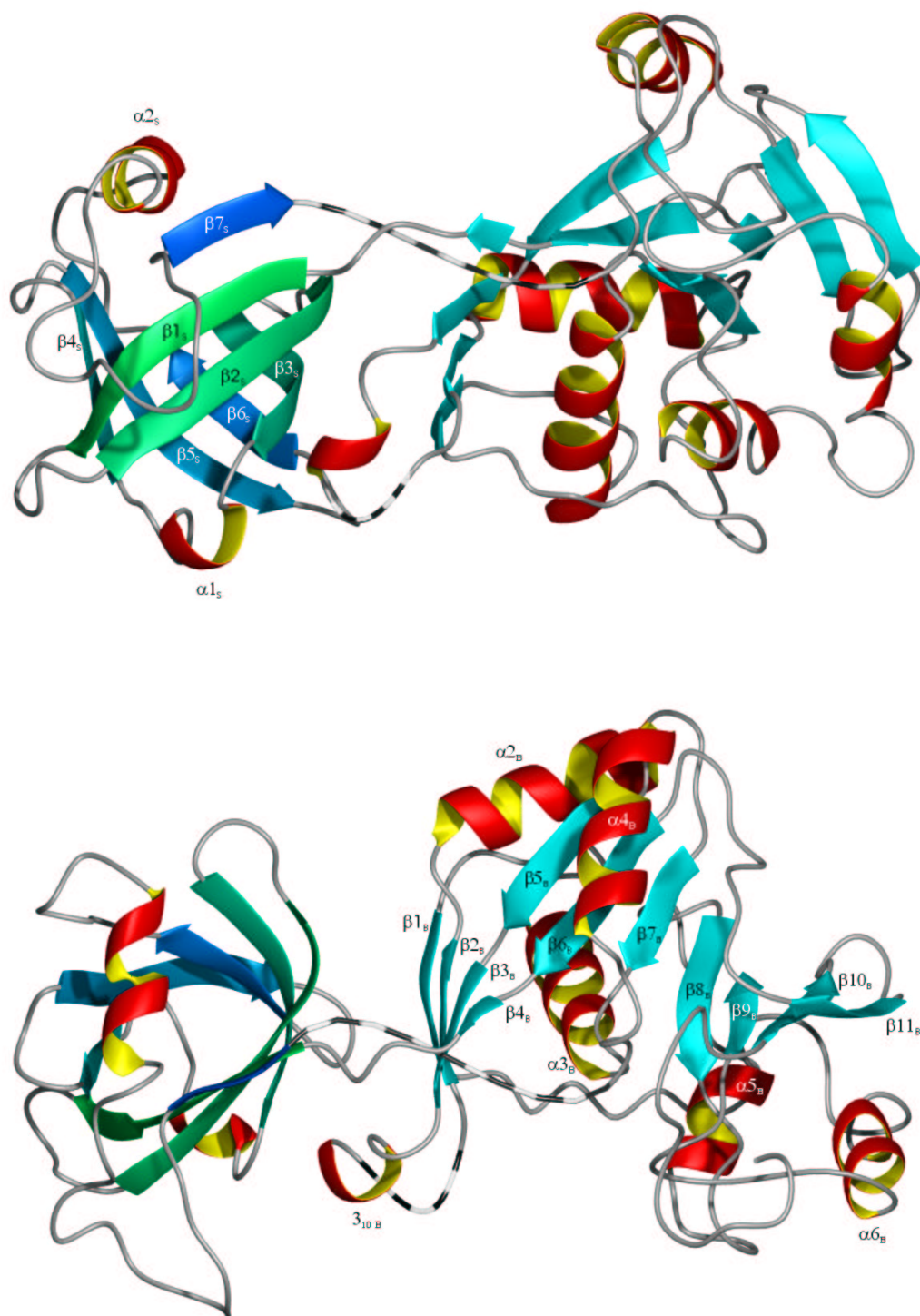


Abbildung 12: Banddarstellung der Kristallstruktur des QueA-Enzyms. Die untere Ansicht ist gegenüber der oberen um 90° in der Horizontalen gedreht. Der Übersichtlichkeit halber sind die Strukturelemente der kleinen Domäne lediglich in der oberen Ansicht, die Strukturelemente der großen Domäne dagegen lediglich in der unteren Ansicht beschriftet. Helices sind rot/gelb und β -Stränge in Cyantönen dargestellt. Um den Faltungsverlauf in der kleinen Domäne zu illustrieren, ist hier die Farbgebung der sieben β -Stränge in der Reihenfolge ihres Vorkommens in der Polypeptidkette von grünlich (N-terminal) bis bläulich (C-terminal) variiert. In der Struktur fehlende Bereiche sind durch gestrichelte Verbindungselemente angedeutet.

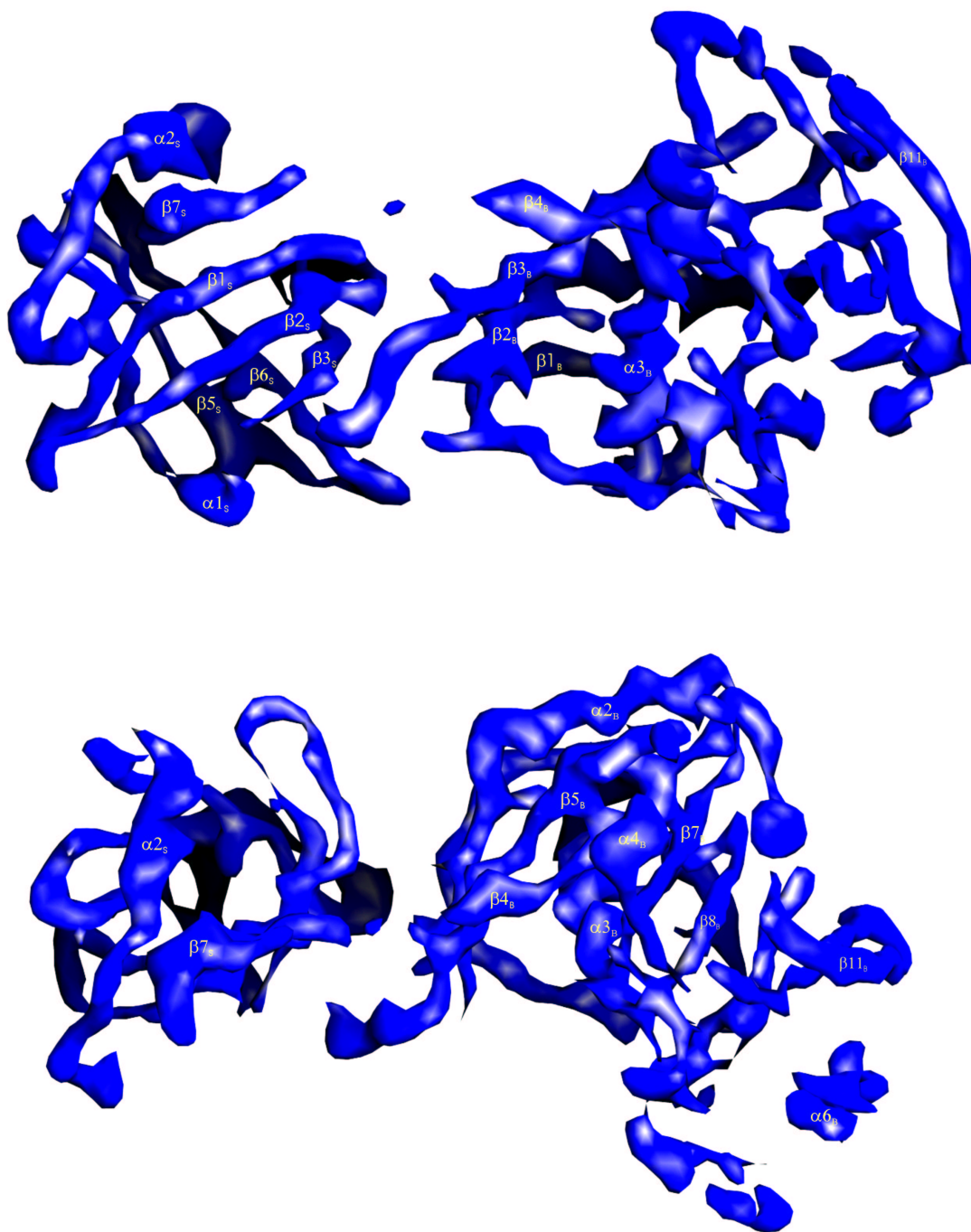


Abbildung 13: Elektronendichtekontur der Kristallstruktur auf $1,8\sigma$ -Niveau bei 3,0 Å Auflösung. Die dargestellte Dichte basiert ausschließlich auf experimenteller Information aus den Se- und Hg-MAD-Experimenten. Die Phasierung wurde mit SHARP vorgenommen, anschließend wurden 10 Zyklen Dichtemodifikation in DM gerechnet. Die untere Ansicht ist gegenüber der oberen um 90° in der Horizontalen gedreht. Beide Ansichten entsprechen der Darstellung in Abb. 12. Einige deutlich erkennbare Strukturelemente sind beschriftet. Für eine Stereodarstellung dieser Abbildung siehe Abb. 14.

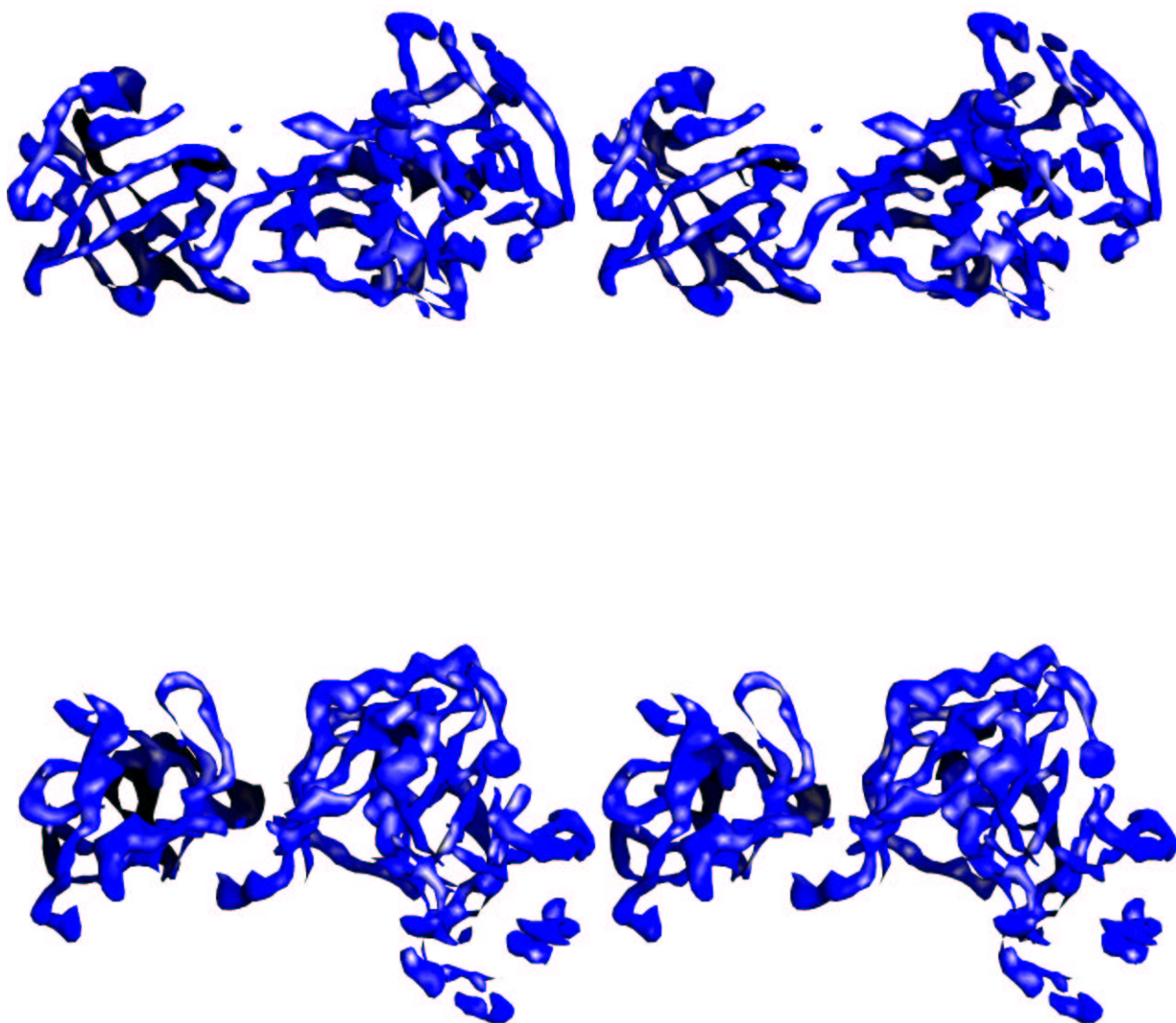


Abbildung 14: Elektronendichtekontur der Kristallstruktur auf $1,8\sigma$ -Niveau bei 3,0 Å Auflösung in Stereodarstellung. Zur Erläuterung siehe Abb. 13.

1.3.6 Konservierte Reste und elektrostatische Eigenschaften

Betrachtet man eine Schemadarstellung des QueA-Kristallstrukturmodells, das ausschließlich streng konservierte Aminosäurereste zeigt (Abb. 16, siehe auch Sequenzvergleich im Anhang), so fällt auf, dass sich alle diese konservierten Reste auf eine Seite des Moleküls konzentrieren. Im Bereich der kleinen Domäne befinden sich lediglich zwei konservierte Reste, Pro¹⁵³ und Pro¹⁵⁵, die in der ausgedehnten Schleifenregion zwischen Helix $\alpha 2_s$ und Strang $\beta 7_s$ (vgl. Abb. 12) lokalisiert sind. Blickt man von der kleinen in Richtung der großen Domäne, so sind die nächsten konservierten Reste in der Furche zwischen den beiden Domänen anzutreffen. Es handelt sich da-

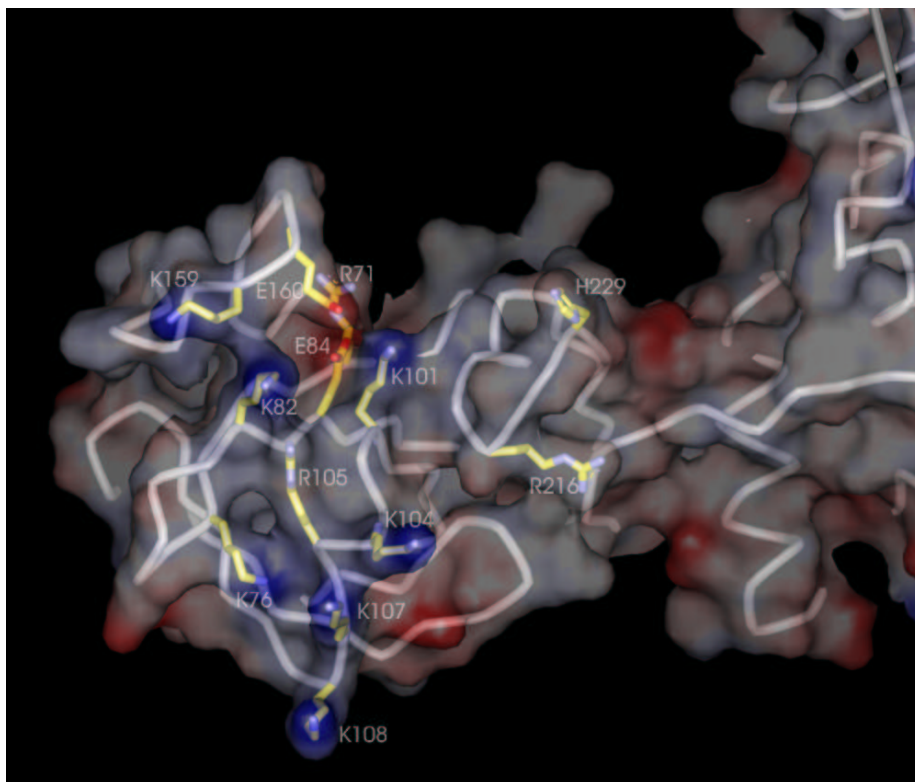


Abbildung 15: Ein Gebiet basischer Reste auf der Oberfläche der kleinen Domäne im Bereich der Stränge $\beta 1_s$, $\beta 2_s$, $\beta 3_s$ und Helix $\alpha 1_s$. Dargestellt sind das $C\alpha$ -Rückgrad, einige interessante Seitenketten in diesem Bereich und die solvenzugängliche Oberfläche, auf die die Seitenkettenladungen projiziert wurden. Man blickt in etwa entlang der Achse der β -Fassstruktur, auf den durch Helix $\alpha 1_s$ gebildeten Deckel.

bei um His²⁰⁹, das Strang $\beta 3_B$ entspringt, und Gly²¹³, das in Helix 3_{10B} lokalisiert ist. Glu²³¹ auf der N-terminalen Seite von Strang $\beta 2_B$ formt eine Salzbrücke zu Arg²⁶² in Helix $\alpha 3_B$. Hinter Helix $\alpha 3_B$ beginnt ein Bereich, der an der Moleküloberfläche die höchste Dichte konservierter Resten enthält. Dieser Oberflächenbereich wird im wesentlichen durch eine Seite von Helix $\alpha 3_B$, die N-terminale Spitze von Helix $\alpha 5_B$ so-

wie der Schleifenregion zwischen Helix α_{5B} und Strang β_{8B} gebildet. Etwa im Zentrum dieser Ansammlung konservierter Reste sitzt His³⁰³, umgeben von Asp³⁰¹, Glu²⁶⁵, Ser³⁰⁷, Thr²³⁹, Thr²⁵⁸, Tyr³²⁶ und Pro³⁰⁵. Am Rand dieses Bereichs befinden sich die streng konservierte hydrophoben Reste Ala¹⁸⁴ und Leu¹⁸⁶.

In der kleinen Domäne im Bereich der Stränge β_{1s} , β_{2s} und β_{3s} sowie Helix α_{1s} befindet sich ein Gebiet basischer Reste an der Moleküloberfläche (Abb. 15). Dieser basische Bereich wird im wesentlichen durch die Lysinreste 76, 82, 101, 104, 107, 108, 159 und Arg¹⁰⁵ gebildet. Am Rand dieses Gebiets befinden sich Glu⁸⁴, Glu¹⁶⁰ und Arg⁷¹, in der Furche zwischen beiden Domänen sind die Reste His²²⁹ und Arg²¹⁶ benachbart. Dagegen wird die gegenüberliegende Moleküloberfläche im Bereich der Stränge β_{4s} , β_{5s} und β_{6s} , Helix α_{2s} sowie eines Großteil der beiden Faltblätter der großen Domäne zusammen mit Helix α_{2B} , Helix α_{4B} und Helix α_{6B} durch saure Reste dominiert. Dem Molekül kann demnach ein ausgeprägter Dipolcharakter zugeschrieben werden, wobei jedoch nicht außer acht werden darf, dass mehr als 50 Seitenketten nicht zugeordnet werden können, so dass genauere Betrachtungen des elektrostatischen Verhaltens noch nicht möglich sind.

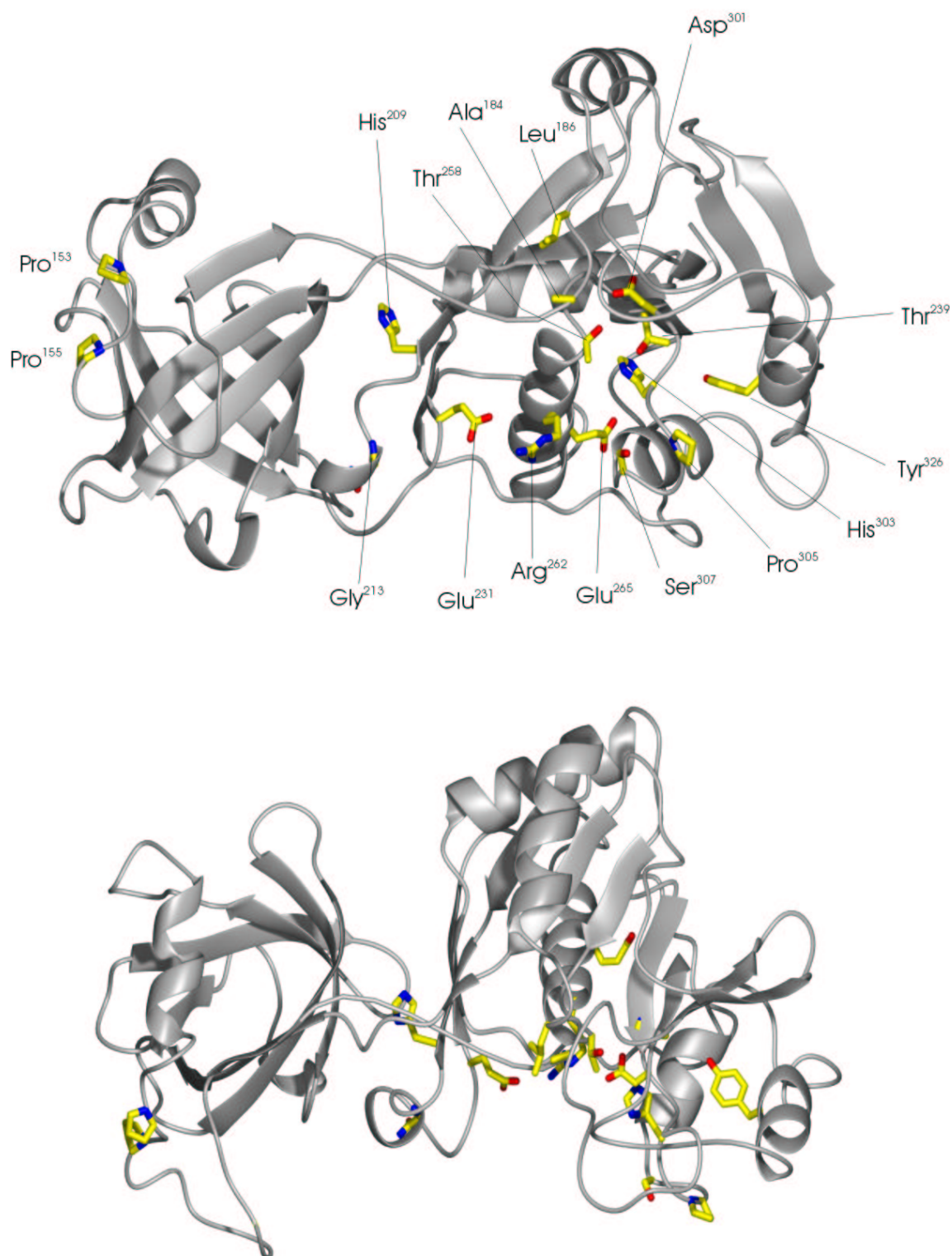
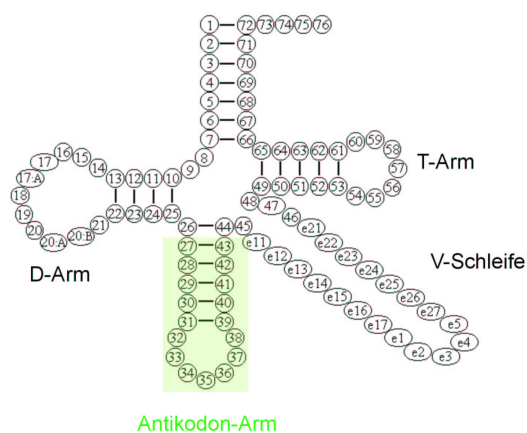


Abbildung 16: Darstellung der über 22 Organismen streng konservierten Reste des QueA-Enzyms. Die untere Ansicht ist gegenüber der oberen um 90° in der Horizontalen gedreht. In der unteren Ansicht ist zu erkennen, dass sich sämtliche streng konservierten Reste auf einer Seite des Enzyms konzentrieren.

1.3.7 Kokristallisationsexperimente mit Oligoribonukleotiden

Drei 13, 15 und 17 Nukleotide große, chemisch synthetisierte Oligoribonukleotide, die die tRNA^{ASP}-Antikodonstammschleife von *E. coli* repräsentieren (Abb. 17), wurden mittels PAA-Gelelektrophorese bis zur Homogenität gereinigt (Abb. 18). In Anwesenheit des Kosubstrates SAM wurde jeweils ein Kristallisationsscreening durchgeführt. Unter einer Vielzahl von Bedingungen konnte dabei Kristallbildung (Tab. 5) beobachtet werden, aber nur wenige Bedingungen führten nach weiterer Optimierung zu Kristallen, die eine für nachfolgende Untersuchungen ausreichende Größe besaßen. Mit QueA-Protein aus *Haem. influenzae* (10 g/l) und dem doppelten molaren Überschuss an Oligoribonukleotid 1 wuchsen bei Verwen-



tRNA^{ASP,21} (*E. coli*), Antikodon-Armbereich:

5'-A₂₆CCUGCCU₃₃G₃₄U₃₅CACGCAGGG₄₄-3'

RNA-Oligomer 1:

5'-CCUGCCU₃₃G₃₄U₃₅CACGCAGG-3'

RNA-Oligomer 2:

5'-CUGCCU₃₃G₃₄U₃₅CACGCAG-3'

RNA-Oligomer 3:

5'-GGCCU₃₃G₃₄U₃₅CACGCC-3'

Abbildung 17: Sequenz der für die Kokristallisation verwendeten Oligoribonukleotide. Oben im Bild ist das Faltungsschema der tRNA^{ASP,21} aus *E. coli* dargestellt. Von der unten angegebenen Sequenz des Antikodon-Armes wurden drei Oligoribonukleotide unterschiedlicher Länge abgeleitet, von denen eine Bindung an das QueA-Protein zu erwarten ist. Die endständigen Ribonukleotide von Oligomer 3 sind entgegen der natürlichen tRNA-Sequenz abgewandelt, um eine stabilere Basenpaarung zu erreichen. Der Antikodonbereich ist rot eingefärbt.

dung einer Reservoirlösung mit 0,2 M Ammoniumazetat, 0,1 M Natriumzitat pH 5,6 und PEG4000 im Konzentrationsbereich zwischen 25% und 34% nach zwei Monaten Kristalle mit ungefähren Dimensionen von 0,1x0,1x0,1 mm³, die dem Mutterlaugetrophen unversehrt und einzeln entnommen werden konnten. Nach dreifachem Waschen in Reservoirlösung wurden mehrere Kristalle in SDS-Probenpuffer aufgelöst und ihre Zusammensetzung mittels SDS-Gelelektrophorese und nachfolgender Silberfärbung untersucht. Dabei konnte nur eine auf der Elektrophoresepufferfront laufende Bande, die von RNA stammen muss, sichtbar gemacht werden. Demnach

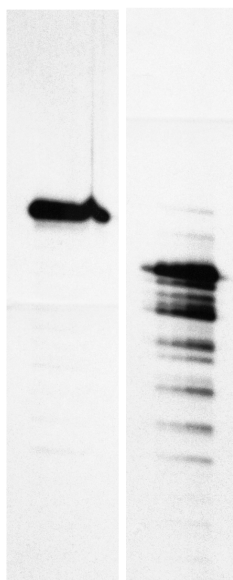


Abbildung 18: Autoradiographische Aufnahmen zweier denaturierender PAA-Gele. Links gelgereinigtes Oligoribonukleotid 2, rechts Oligoribonukleotid 3 ohne Reinigung

handelt es sich hierbei um reine RNA-Kristalle. Eine Vielzahl kleiner Kristalle (etwa 10 μm im Durchmesser) konnten nach zwei Tagen erhalten werden, wenn 2 μl einer vorinkubierten Lösung aus 15

g/l *B. subtilis* QueA-Protein mit dem 1,5 bis 4fachen molaren Anteil von O₂-RNA, 2,5 mM SAM und 5mM Magnesiumazetat mit 2 μl einer Reservoirlösung aus 7%-16% (w/v) PEG8000, 50 mM MES pH 5,5, 0,2M Kaliumchlorid und 0,1M Magnesiumazetat gemischt und inkubiert wurden. Diese schnell erschienen Kristalle (Abb. 19 rechts) verschwanden im Verlauf von zwei

Monaten zugunsten von Nadeln mit über 1 mm Länge und hexaedrisch erscheinendem Profil mit etwa 20 μm Durchmesser (Abb. 19 links). Die so erhaltenen Nadeln zeigten eine Tendenz zu büschelartigen Verwachsungen, es war jedoch möglich, durch Zerbrechen solcher Kristallbüschel Einkristalle zu gewinnen. Wie zuvor beschrieben, wurde die Zusammensetzung eines solchen Kristalls mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht. Dabei wurde in der Silberfärbung neben einer auf Front laufenden Bande auch eine Bande sichtbar, die die gleichen Laufeigenschaften wie das QueA-Protein aus *B. subtilis* aufwies. Es kann demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um RNA-Protein-Kokristalle handelt. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass an der Oberfläche eines Kristalls prinzipiell auch amorph präzipitiertes Protein oder präzipitierte RNA durch alle Waschschrirte mitgeschleppt werden kann, was zu einem falsch positiven Ergebnis bei der Untersuchung auf das Vorliegen von Kokristallen führen kann. Einzelne solche Nadeln wurden zum Testen auf ihre Tauglichkeit für Röntgenbeugungsexperimente in einen

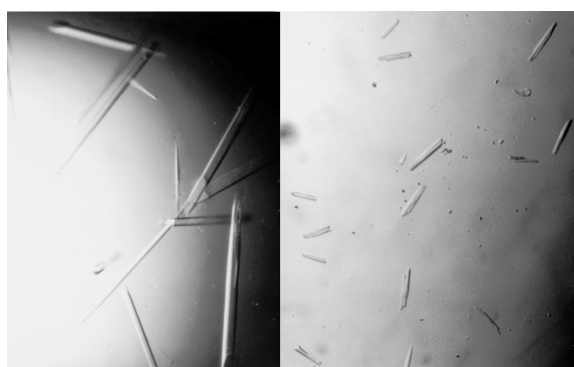


Abbildung 19: Kristalle des QueA-Proteins aus *B. subtilis*, gezogen in Anwesenheit des 1,5fachen molaren Überschusses an Oligoribonukleotid 2, 2,5 mM SAM und 5mM Magnesiumazetat über einer Reservoirlösung aus 12% (w/v) PEG8000, 50 mM MES pH 5,5, 0,2 M Kaliumchlorid und 0,1 M Magnesiumazetat nach zehn Tagen (rechts) und drei Monaten (links) Inkubation bei 277 K. Die rechte Abb. ist stärker als die linke vergrößert.

Kälteschutzpuffer aus Reservoirlösung mit 10% Glycerin überführt. Am hauseigenen Drehanodengenerator konnte an den auf 100 K gekühlten Kristallen keine Röntgenbeugung mehr beobachtet werden. Direkt in der Mutterlauge gekühlte Kristalle zeigten durchweg deutliche Reflexe mit einer Auflösungsgrenze von bis zu 4 Å, jedoch auch starke Eisringe im Beugungsbild. Ein 14 Wochen alter Kristall, der so direkt in der Mutterlauge im Stickstoffstrom auf 100 K gekühlt wurde, zeigte keine Eisringe, was wahrscheinlich auf einen Konzentrationseffekt infolge von Verdunstung zurückzuführen war, so dass die Mutterlauge alleine bereits einen ausreichenden Kälteschutzeffekt sicherstellte. Von diesem Kristall wurde ein unvollständiger Datensatz zu Testzwecken und zur Feststellung der Raumgruppe und Zellparameter gesammelt. Das flächenzentrierte Gitter dieses Kristalls gehörte dem orthorhombischen Kristallsystem an und zeigte Zellachsen von $a=32,3$ Å, $b=124,4$ Å und $c=195,9$ Å. Die Mosaizität lag bei etwa $0,8^\circ$, die Messung von 30 Bildern mit einer Rotation von je $0,5^\circ$, die mit DENZO prozessiert und mit SCALEPACK skaliert und zu einem Datensatz vereinigt wurden, führte zu einer Vollständigkeit von insgesamt 46% bei einer oberen Auflösungsgrenze von 5,2 Å, wobei der R_{sym} -Faktor in der äußeren von acht Auflösungsschalen bei 36% und das Verhältnis von I/σ bei 3,2 lag. Für den gesamten Datensatz lag der R_{sym} -Faktor bei 9,6% und das Verhältnis I/σ bei 12,1.

Bedingungen	Beschreibung, Organismus
0,02 M Kalziumchlorid 0,1 M Natriumazetat pH 4,6 30% (v/v) 2-Methyl-2,4-pentandiol	Ec:O1:3, Bs:O1:2, Ca:O1:2
0,2 M Ammoniumazetat 0,1 M tri-Natrium Citrate pH 5,6 30% (w/v) PEG 4000	Hi:O1:2
30% (w/v) PEG4000 0,1 M HEPES pH 7,5 28% (v/v) PEG 400	Hi:O1:3
0,2 M Ammoniumsulfat 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5 30% (w/v) PEG 8000	Ec:O3:1, Hi:O3:1, Ca:O3:2
0,2 M Lithiumsulfat 0,1 M Tris-Hydrochlorid pH 8,5 30% PEG 4000	Ec:O1:2
0,2 M Magnesiumazetat 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5 20% PEG 8000	Bs:O1 :2, Bs :O3 :1
0,2 M Magnesiumazetat 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5 30% (v/v) 2-Methyl-2,4-pentandiol	Ca:O3:1
0,2 M Natriumacetat 0,1 M Tris-Hydrochlorid pH 8,5, 30% (w/v) PEG 4000	Bs:O3:2
0,2 M Natriumacetat 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5 30% (w/v) PEG 8000	Hi:O1:1
0,1 M HEPES pH 7,5 10% (v/v) Iso-Propanol 20% (w/v) PEG 4000	Bs:O1:2
0,2 M Kalziumazetat 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5 18% (w/v) PEG 8000	Bs:O1:2, Bs:O3:2, Ca:O3:2
0,01 M Hexadecyltrimethylammoniumbromid 0,5 M Natriumchlorid 0,01 M Magnesiumchlorid	Bs:O3:3
2,0 M Ammoniumsulfat 5% (v/v) Iso-Propanol 0,2 M Ammoniumsulfat	Ec:O3:1
0,1 M Natriumazetat pH 4,6 30% (w/v) PEGMME 2000	Hi:O1:3
0,2 M Kaliumnatriumtartrat 0,1 M Trinatriumcitrat pH 5,6 2,0 M Ammoniumsulfat	Hi :O1 :2
0,1 M MES pH 6,5 12% (w/v) PEG 20,000	Bs:O3:1

Tabelle 5a: Ergebnisse der Kokristallisationsversuche des QueA-Proteins verschiedener Organismen mit drei unterschiedlichen Oligoribonukleotiden. 1 - Einkristalle <15 µm, 2 - Einkristalle <50 µm, 3 - Polykristalline Klumpen, 4 - verwachsene Nadeln; Ec - QueA aus *E. coli*, Hi - QueA aus *Haem. influenzae*, Bs, QueA aus *B. subtilis*, Ca – QueA aus *C. acetobutylicum*;

O1 –Oligoribonukleotid 1, Sequenz: 5'-CCUGCCUGUCACGCAGG-3'

O3 –Oligoribonukleotid 3, Sequenz: 5'-GGCCUGUCACGCC-3'

Bedingungen	Beschreibung, Organismus
0,2 M Ammoniumsulfat 0,1 M MES pH 6,5 30% (w/v) PEGMME 5000	Hi:O1:4, Bs:O3:2, Ca:O3:2
0,01 M Zinksulfat 0,1 M MES pH 6,5 25% (w/v) PEGMME 550	Hi:O3:1
0,5 M Ammoniumsulfate 0,1 M HEPES pH 7,5 30% (v/v) MPD	Ca :O3 :3
0,1 M HEPES pH 7,5 2,0 M Ammoniumformiat	Hi :O3 :2
0,1 M HEPES pH 7,5 4,3 M Natriumchlorid	Hi:O3:1
0,1 M HEPES pH 7,5 20% (w/v) PEG 10,000	Ca:O3:1
0,2 M Magnesiumchlorid 0,1 M Tris pH 8,5 3,4 M 1,6 Hexandiol	Hi :O1 :2, Bs :O1 :2, BsO3:1, Ca:O1:3, Ca:O3:1
1,5 M Ammoniumsulfat 0,1 M Tris pH 8,5 12% (v/v) Glyzerin	Bs:O3:1
1,6 M Ammoniumsulfat 0,1 M MES pH 6,5 10% (v/v) Dioxan	Ca :O3 :3
0,05 M Zäsiumchlorid 0,1 M MES pH 6,5 30% (v/v) Jeffamin M-600	Ca :O3 :1
0,2 M Kaliumchlorid 0,1M Magnesiumazetat 0,05 M Natriumcacodylat pH 6,5 30% (w/v)PEG 8000	Bs:O2:2
0,005 M Magnesiumsulfat 0,05 M Tris-Hydrochlorid pH 8,5 35% (w/v) 1,6-Hexandiol	BS:O2:2

Tabelle 5b: Ergebnisse der Kokristallisationsversuche des QueA-Proteins verschiedener Organismen mit drei unterschiedlichen Oligoribonukleotiden. 1 - Einkrisalle <15 µm, 2 - Einkristalle <50 µm, 3 - Polykristalline Klumpen, 4 - verwachsene Nadeln; Ec - QueA aus *E. coli*, Hi - QueA aus *Haem. influenzae*, Bs, QueA aus *B. subtilis*, Ca – QueA aus *C. acetobutylicum*;

O1 –Oligoribonukleotid 1, Sequenz: 5'-CCUGCCUGUCACGCAGG-3'

O2 –Oligoribonukleotid 2, Sequenz: 5'-CUGCCUGUCACGCAG-3'

O3 –Oligoribonukleotid 3, Sequenz: 5'-GGCCUGUCACGCC-3'

1.4 Diskussion

1.4.1 Schwierigkeiten der Strukturbestimmung und Modellqualität

Der Weg zu dem hier vorgestellten und bislang noch als vorläufig zu bezeichnenden Kristallstrukturmodell des QueA-Enzyms war mit immer wiederkehrenden Schwierigkeiten gepflastert. Erste Studien am QueA-Protein aus *E. coli* im Hinblick auf eine Kristallstrukturaufklärung wurden bereits durch Romier (Romier 1997) durchgeführt, blieben aber ohne konkreten Erfolg, ein Kristallisationscreening lieferte hier zwar Kristalle, diese zeigten jedoch keine Röntgenbeugung. Aufgrund dieses Vorwissens wurde in der vorliegenden Arbeit die Strategie verfolgt, orthologe QueA-Proteine auch aus verschiedenen anderen Organismen zu klonieren und zu exprimieren, um unter Nutzung der natürlichen Variation der Proteineigenschaften doch Kristalle des QueA-Enzyms zu erhalten, die eine erfolgreiche Strukturaufklärung ermöglichen. Obwohl 12 eubakterielle *queA*-Gene kloniert wurden und von diesen neun verschiedene QueA-GST-Fusionsproteine erfolgreich löslich exprimiert und der QueA-Anteil gereinigt werden konnte, wurden trotz des sehr großen Aufwands bei den Kristallisationscreenings und bei der Optimierung erhaltener Anfangsbedingungen nur vier Kristallformen erhalten, die äußerlich für eine Strukturbestimmung erfolgversprechend aussahen. Davon erfüllte jedoch keine Kristallform bei der Prüfung mit Röntgenstrahlung die üblicherweise gestellten Anforderungen hinsichtlich der äußeren Beugungsgrenze und der Qualität des Reflexprofils. Im Hinblick auf die jüngsten Errungenschaften bei der Technik von Synchrotronstrahlungseinrichtungen, insbesondere bei der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble wurde dennoch eine Strukturaufklärung am QueA-Protein von *B. subtilis*, dessen Kristalle qualitativ einen Grenzfall darstellten, gewagt. Nach anfänglichen enttäuschenden Versuchen an der Messstation 5.2R der ELETTRA-Synchrotronstrahlungseinrichtung in Triest und der Messstation BW6 des DESY in Hamburg konnte erstmals an der Mikrofokussmessstation ID13 des ESRF ein brauchbarer Datensatz mit einer effektiven Auflösung von etwa 3,4 Å aufgenommen werden. Durch weitere Verbesserung der Tieftemperaturbedingungen konnten schließlich visuell vorselektierte Kristalle so montiert werden, dass sie reproduzierbar bis 3 Å oder besser an verschiedenen Messstationen des ESRF beugten, so dass erfolgreiche MAD-

Experimente möglich waren (Abb. 20). Charakteristisches Merkmal aller Datensätze war ein aus dem Wilson-Plot zu entnehmender extrem hoher Gesamt-B-Faktor von 90-100 Å². Bei Betrachtung der Beugungsbilder spiegelt sich diese Eigenschaft darin wieder, dass niedrigaufgelöste Reflexe überbelichtet oder an der Grenze zur Überbelichtung aufgenommen wurden, wogegen durch den rapiden Abfall der Re-

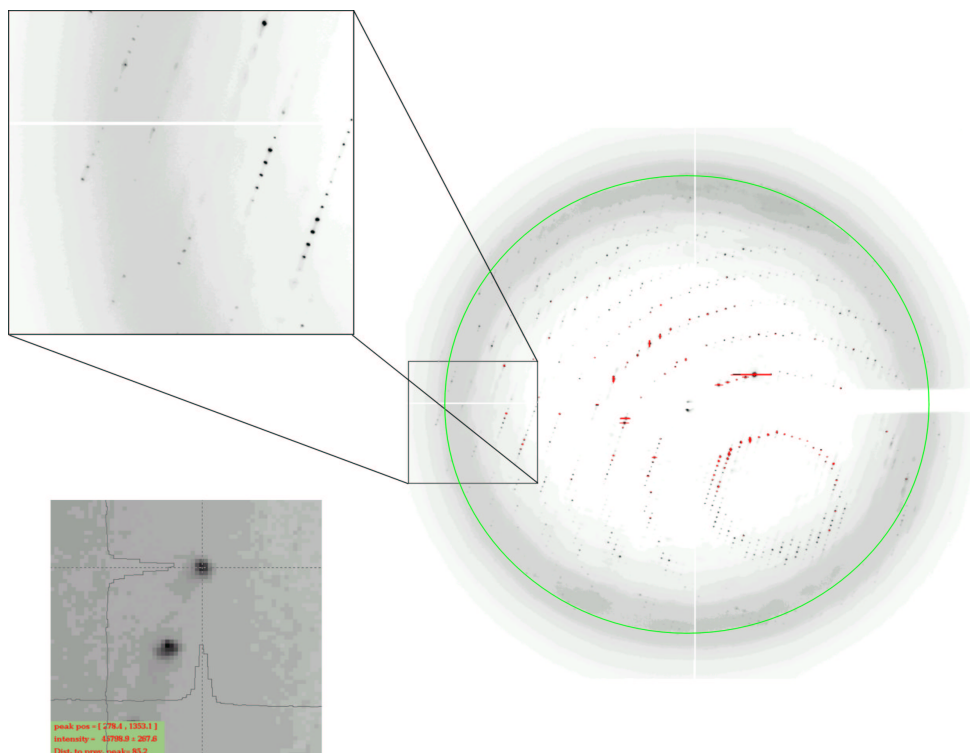


Abbildung 20: Beugungsbild eines tiefgekühlten nativen Kristalls der QueA, aufgenommen an Messtation ID14-4 des ESRF. Rechts ist das gesamte Beugungsbild dargestellt, überbelichtete Bildpunkte sind rot eingefärbt. Horizontales und vertikales Ausbluten stark überbelichteter Reflexe ist ein typisches Phänomen bei Detektoren, die nach dem Prinzip der Ladungskopplung (CCD) arbeiten. Der grüne Ring markiert die 3 Å-Auflösungsgrenze. Links oben eine Ausschnittvergrößerung, darunter eine weitere Vergrößerung, die zwei Reflexe bei 3 Å Auflösung zusammen mit dem zum oberen Reflex gehörenden Profil zeigt.

flexintensität bereits jenseits einer Auflösung von 4 Å Reflexe visuell kaum noch erkennbar waren. Um den Grenzen des Dynamikumfangs der verwendeten CCD-Detektoren Rechnung zu tragen, wurden deshalb bei nativen Datensätzen getrennte Durchläufe für hohe und niedrige Auflösung gemessen. Das nahezu perfekte Reflexprofil belegt die ansonsten hervorragende Qualität der tiefgekühlten Kristalle. Anfängliche Befürchtungen, dass eine Lokalisierung der acht Selenatome pro Molekül aufgrund des hohen B-Faktors nicht möglich sein könnte, bewahrheiteten sich nicht, jedoch verlief die Verfeinerung der MAD-Experimente mit Hilfe des Computerprogramms SHARP (De La Fortelle & Bricogne, 1997) ungewöhnlich problematisch. Der Konvergenzradius war minimal, so dass alle Anfangsbedingungen sehr sorgfältig

gewählt werden mussten, und zur Stützung der Verfeinerung externe Daten aus anderen, bereits verfeinerten MAD-Experimenten, bzw. Anfangsphasen von SOLVE herangezogen werden mussten. Obwohl der prinzipielle Erfolg der MAD-Experimente sofort anhand der ersten Elektronendichtekarten ersichtlich war, ergaben sich während des Modellbaus aufgrund der über weite Strecken fragmentierten und schlecht interpretierbaren Elektronendichte Probleme, die es notwendig machten, zusätzliche experimentelle Information hinzuzuziehen. Aus diesem Grunde wurden weitere MAD-Experimente unternommen, und die MAD-Daten eines Quecksilberderivates miteinbezogen. All diese experimentellen Anstrengungen ermöglichten es schließlich, ein überwiegend komplettes Modell des QueA-Enzyms zu bauen, das jedoch bereichsweise, insbesondere bei der Sequenzzuordnung mit Unsicherheiten behaftet ist. Gestützt wird das Modell nicht zuletzt aber durch die Lokalisierung der acht Methioninseitenketten durch das anomale Signal der Selenatome (Abb. 21) und die zwanglose Positionierung zweier Cysteinreste in direkter Nachbarschaft zu den Schweratompositionen des Quecksilberderivats. Ein weiterer Beleg für die überwiegende Richtigkeit des Modells ist auch die streckenweise nahezu identische Übereinstimmung der Sekundärstrukturvorhersage mit PSIPRED (McGuffin, Bryson et al. 2000) mit der tatsächlichen Sekundärstrukturzuordnung im Kristallstrukturmodell. Bei der Bewertung all dieser Faktoren darf selbstverständlich nicht außer acht gelassen werden, dass es sich nicht um unabhängige Indikatoren zur Bewertung der Modellgüte handelt, sondern dass die angesprochenen Faktoren auch eine wichtige Informationsquelle beim Bau des Modells waren. Im großen und ganzen kann davon ausgegangen werden, dass alle hier gezeigten Sekundärstrukturelemente, d. h. β -Stränge, Helices und größere Schleifenbereiche tatsächlich an den angenommenen Raumpositionen vorhanden sind, da diese zu einem großen Teil eindeutig in der rein experimentellen Elektronendichte (Abb. 13 und 14) erkennbar sind. Lediglich die Verbindung der Elemente und damit ihre Abfolge entlang der Polypeptidkette ist stellenweise mit einer mehr oder minder großen Unsicherheit behaftet (siehe die stark fragmentierte Dichte im rechten Teil der großen Domäne in Abb 13 und 14 und den Sequenzvergleich im Anhang). Damit korrespondiert zwangsweise auch die erwähnte Unsicherheit in der Zuordnung der Sequenzinformation. Als schwierige Modellbereiche in diesem Sinne sind besonders äußere Randbereiche der großen Domäne im mutmaßlichen Gebiet der Termini der Polypeptidkette und einige Schleifenbereiche

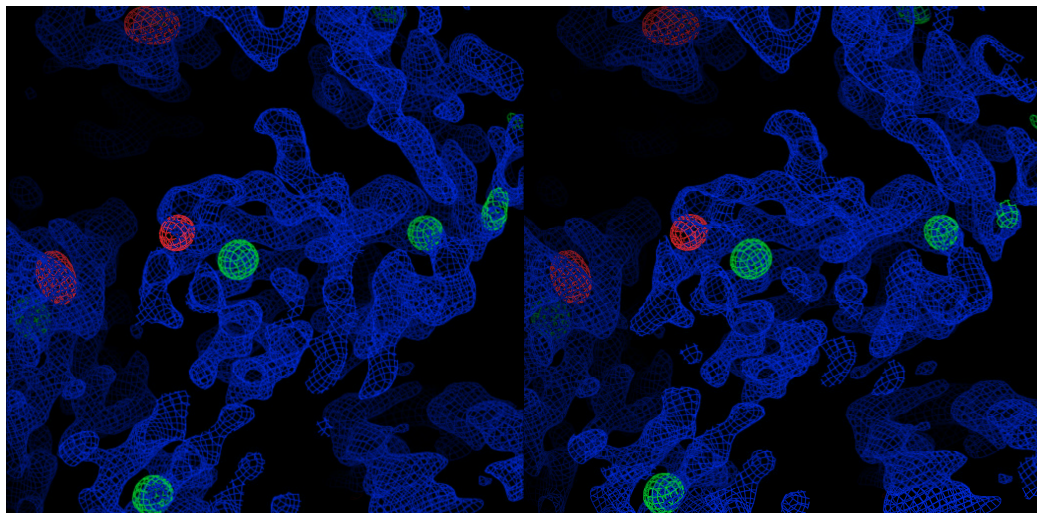


Abbildung 21: Stereodarstellung der aus den experimentellen und den Modellphasen gewonnenen Elektronendichte, konturiert auf 1σ -Niveau (blau). Überlagert ist die anomale Differenzkarte der Peak-Wellenlänge des Quecksilber-MAD-Experiments (rot) und des Selenomethionyl-MAD-Experiments (grün) auf jeweils 6σ -Niveau.

im Gebiet zwischen den beiden Domänen mit den angrenzenden Regionen zu nennen. Dahingegen sind einige Bereiche im Kern des Moleküls sehr gut definiert und weisen eine gute Übereinstimmung des verfeinerten Modells mit der von experimenteller Information dominierten Elektronendichte auf (Abb. 21, 22 sowie auch Abb. 13 und 14). Die zuvor geschilderten Probleme lassen sich möglicherweise auf eine außergewöhnlich hohe Flexibilität des QueA-Enzyms zurückführen. Zwar muss prinzipiell davon ausgegangen werden, dass hohe B-Faktoren in röntgenkristallographischen Datensätzen hauptsächlich mit der Eigenart der Kristallpackung und eventuell damit verbunden Kristallfehlern in Verbindung stehen, so dass eine direkte Korrelation von B-Faktor und intrinsischen Moleküleigenschaften nicht möglich ist. Betrachtet man jedoch alle vorliegenden Ergebnisse gemeinsam, so liegt der Schluss³ nahe, dass die durchweg sichtbaren niedrigen Auflösungsgrenzen oder die gänzlich fehlende Röntgenbeugung aller erhaltenen QueA-Kristalle sowie die geringe Kristalli-

³ Die Röntgenkristallographie ist an sich eine schlecht geeignete Methode, um Flexibilität von Molekülen und Molekülbereichen zu messen. Man kann davon ausgehen, dass atomare B-Faktoren hauptsächlich von Art und Güte der Kristallpackung bestimmt werden, wobei diese jedoch eine gewisse Aussagekraft bei relativen Betrachtungen innerhalb eines Moleküls haben. Betrachtet man jedoch die aus vielen Kristallisationsversuchen gewonnenen Erfahrungen so scheint es prinzipiell von Vorteil, wenn die kristallographisch untersuchten Partikel kompakt, rigide und u. U. auch hochsymmetrisch sind. Beispielsweise gelingt die Herstellung hochwertiger und geordneter Kristalle aus so komplexen, aber gleichwohl kompakten und rigiden Partikeln wie Ribosomen und Viren, während die Kristallisation von offensichtlich flexiblen spleißosomalen Partikeln, die in Komplexität, Zusammensetzung und Größe vergleichbar sind, bislang aussichtslos erscheint.

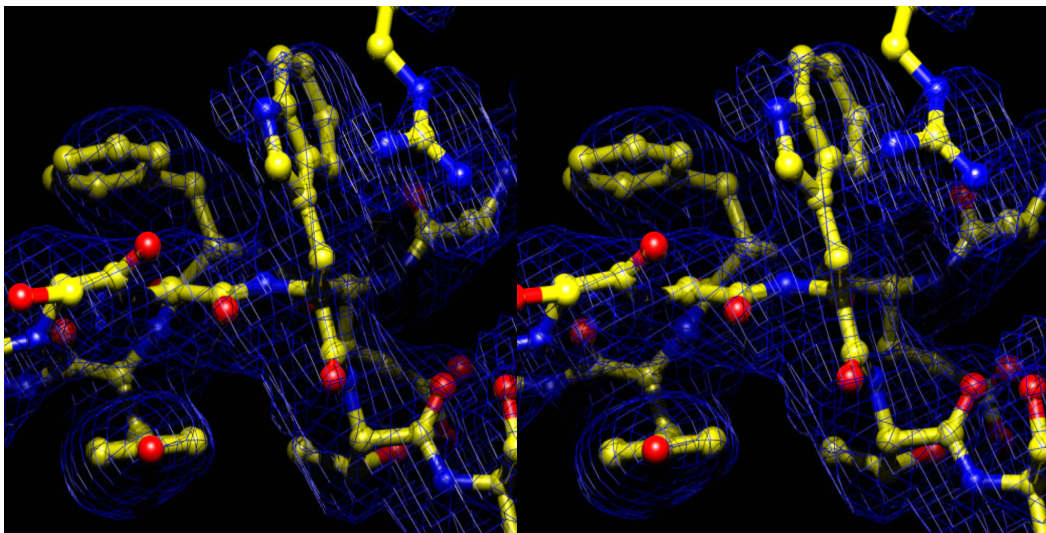


Abbildung 22: Stereoabbildung eines Ausschnitts aus dem Modell des QueA-Enzyms mit der zugehörigen Elektronendichte, berechnet mit einer Kombination aus Modell- und experimentellen Phasen und konturiert auf 1σ -Niveau. Gezeigt ist eine planare und senkrechte Stapelung aromatischer Reste durch Trp²⁸¹, Arg²¹⁶, und Phe²³². Phe²³² und Tyr²³³ umfassen zangenartig die benachbarte Polypeptidkette.

sationsneigung des QueA-Proteins möglicherweise auch auf spezifische Moleküleigenschaften zurückzuführen ist. Für eine starke Beweglichkeit des Moleküls spricht auch der Aufbau des Molekülmodells (Abb. 12). Dieses stellt sich als langgestreckte Struktur dar, die in zwei deutlich voneinander abgesetzte Domänen gegliedert ist. Die Art der Verbindung zwischen beiden Domänen erweckt den Anschein eines Gelenkes und legt insbesondere auch bei Betrachtung der in diesem Bereich schwachen oder nicht sichtbaren Elektronendichte (Abb. 13 und 14) den Schluss nahe, dass eine Bewegung der beiden Domänen gegeneinander auch eine Rolle bei der Substratbindung und Katalyse spielen könnte. Weiterhin sticht der hohe Anteil von Schleifenbereichen im Molekül ins Auge. Dabei muss berücksichtigt werden, dass wahrscheinlich der überwiegende Teil der kristallographisch unsichtbaren Proteinbereiche ebenfalls aus Schleifenbereichen besteht, so dass deren Anteil vermutlich noch weitaus höher als direkt aus dem Modell ersichtlich ist. Die Tatsache, dass sich besonders ausgehende Schleifenregionen und flexible, unsichtbare Proteinanteile in einem Molekülbereich konzentrieren, der viele konservierte Reste und das erwähnte basische Gebiet enthält und sich über die Furche zwischen beiden Domänen erstreckt (siehe Abb. 15 und 16), lässt darauf schließen, dass auch die Flexibilität solcher Schleifenregionen eine Rolle bei der Substratbindung und Enzymtätigkeit spielt, die keinesfalls vernachlässigt werden darf. Flexible und scheinbar übergroße Schleifenbereiche sind sicher

keine reinen Launen der Natur, sondern zweckmäßige und unentbehrliche Strukturelemente. Das folgt nicht nur aus den Gesetzmäßigkeiten der Evolutionsbiologie, nach denen unnötige und energetisch aufwendige Anteile eines Organismus keinen dauerhaften Bestand haben sollten, sondern wird im vorliegenden Fall auch durch das Vorkommen der streng konservierten Reste Pro¹⁵³ und Pro¹⁵⁵ in der großen Schleife zwischen Helix $\alpha 2_s$ und Strang $\beta 7_s$ der kleinen Domäne belegt. Zweifellos schränken diese beiden Proline die Zahl der Freiheitsgrade der Polypeptidkette so ein, dass eine bestimmte, für die Aktivität des Enzyms unerlässliche Konformation der betreffenden Schleife eingehalten wird. Die Tatsache, dass die erwähnte Schleife in den Einflussbereich des positiven Potentialfeldes des Moleküls (siehe Abb. 15 und 17) hineinragt, verleitet zu der Annahme, dass auch sie eine Rolle bei der tRNA-Bindung spielt.

1.4.2 RNA-Bindestelle und aktives Zentrum

Der ausgeprägte Dipolcharakter des QueA-Enzyms liefert starke Hinweise auf den wahrscheinlichen Ort der Bindung des tRNA-Substrates. Es kann kaum bezweifelt werden dass sich die RNA-Bindestelle im Bereich des erwähnten basischen Gebiets befindet. Ein Dipolverhalten wurde auch für das Tgt-Enzym (Romier, Reuter et al. 1996) beschrieben. Ebenso ist eine Ansammlung basischer Reste im Bereich der Bindestelle für weitere RNA-bindende Proteine wie Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (Aberg, Yaremchuk et al. 1997; Desogus, Todone et al. 2000) des *E. coli*-Rho-Faktors (Briercheck, Wood et al. 1998) oder ribosomale Proteine wie z. B. *Thermus thermophilus* S15 (Berglund, Rak et al. 1997) bekannt. Dieses Dipolverhalten erscheint sinnvoll, wenn man sich vor Augen hält, dass sowohl das QueA-Enzym als auch die Substrat-tRNA relativ hochmolekulare Teilchen darstellen, die in geringer Kopienzahl in der Zelle vorkommen. Die Frequenz des diffusionsbedingten zufälligen Zusammentreffens von Enzym und Substrat ist also ohne lenkende Kräfte relativ gering. Eine Substratbindung und damit Enzymreaktion kann aber nur dann ablaufen, wenn Enzym und Substrat zueinander richtig orientiert sind. Würde die Natur hier auf den reinen Zufall vertrauen, wäre die enzymatische Aktivität denkbar gering. Eine Umorientierung von Enzym und Substrat ist aufgrund der Größe als auch sperrigen Form beider Partner mit nicht zu vernachlässigenden hydrodynamischen Kräften verbunden. Der hier vorgefundene elektrische Dipolcharakter kann möglicherweise diese Schwierigkeit überwinden und würde die Reaktionspartner bereits bei der gegenseitigen Annäherung aufgrund der Fernwirkung des elektrostatischen Feldes in eine günstige Position lenken. Er ist auch geeignet, eine diffusionsbedingte Begrenzung der Enzymaktivität zu überwinden, wie er im vorliegenden Fall aufgrund der geringen molaren Konzentration und der hohen molekularen Masse des tRNA-Substrates vorliegen könnte. Ein derartiger Effekt ist bereits bei unterschiedlichen Enzymen vielfach diskutiert worden (Cudd & Fridovich 1982; Getzoff, Tainer et al. 1983; Klapper, Hagstrom et al. 1986; Sussman, Harel et al. 1991; Desideri, Falconi et al. 1992; Tan, Truong et al. 1993; Radic, Kirchhoff et al. 1997).

Ein starkes Dipolmoment verursacht im elektrischen Feld, das das Nukleinsäuresubstrat mit sich führt, ein ebenso starkes Drehmoment, das unter Überwindung hydrodynamischer Kräfte die korrekte Positionierung der Bindestelle des Enzyms sicher-

stellt. Theoretische Modelle für eine solche Orientierungssteuerung sind verfügbar (Antosiewicz & McCammon 1995; Antosiewicz, Briggs et al. 1996). Die Dominanz negativer Ladungen an der Gesamtproteinoberfläche verhindert die Ausbildung stabiler Enzym-tRNA-Komplexe, die sicherlich die Funktion der tRNA im Rahmen einer effektiven Translation beeinträchtigen würde. Experimentelle Arbeiten (Mueller & Slany 1995), die eine Interaktion des QueA-Enzyms mit Substrat-tRNA zwar durch RNA-„Footprint“-Analysen, nicht aber durch „Bandshift“-Experimente nachweisen konnten, belegen die Kurzlebigkeit solcher Komplexe. Zur Ausbildung des positiven elektrostatischen Feldes trägt wesentlich ein Gebiet vorwiegend basischer Reste mit einer Dominanz von Lysinseitenketten im Bereich der Stränge β_{1s} , β_{2s} , β_{3s} und Helix α_{1s} auf der Oberfläche der kleinen Domäne bei (siehe Abb. 15). Betrachtet man diesen basischen Bereich im Sequenzvergleich (siehe Anhang), so fällt auf, dass keiner der basischen Reste streng konserviert ist, dass aber auch bei allen anderen Organismen in diesem Bereich eine Häufung basischer Reste auftritt. Es scheint demnach so, als ob an dieser Stelle, die möglicherweise wesentlich zur RNA-Bindung beiträgt, keine hochspezifischen Interaktionen stattfinden, sondern vielmehr rein elektrostatische Wechselwirkungen im Vordergrund stehen. Auch diese Beobachtung deckt sich mit den Befunden aus den RNA-Footprinting-Experimenten (Mueller & Slany 1995), die eine großflächige Interaktion im Bereich der Antikodonschleife und der Dihydrouridinschleife belegen. Die spezifische Erkennung von Substrat-tRNA scheint sich jedoch auf eine enge Region der Antikodonschleife und dort möglicherweise nur auf die zwei Basen preQ₁³⁴ (u. U. auch G³⁴) und U³⁵ zu beschränken.

Es ist anzunehmen, dass das eigentliche katalytische Zentrum in einer Gegend lokalisiert ist, in der gehäuft konservierte Reste vorkommen. Demnach wäre dies im Einflussbereich der großen Domäne (Abb. 16). Dem Reaktionsmechanismus des QueA-Enzyms zufolge wäre die Existenz einer katalytischen Base zu fordern, die aller Voraussicht nach streng konserviert ist. Hier fällt besonders His²⁰⁹ ins Auge, das sich in der Furche zwischen beiden Domänen und in räumlicher Nähe sowohl zu der basischen Region auf der kleinen Domäne als auch zu der konservierten Region auf der großen Domäne befindet. Ebenso käme hier His³⁰³ in Betracht, das sich im Zentrum der Ansammlung konservierter Reste befindet. Die größere Entfernung dieses Restes zur kleinen Domäne spiegelt nicht notwendigerweise die Situation in einer Komplexstruktur mit tRNA-Substrat wieder, da aufgrund der Flexibilität des Enzyms grö-

ßere strukturelle Umlagerungen nicht ausgeschlossen sind. Vielmehr erscheint eine erhebliche Bewegung der beiden Domänen relativ zueinander sogar als wahrscheinlich.

1.4.3 Vergleich mit bekannten Strukturen

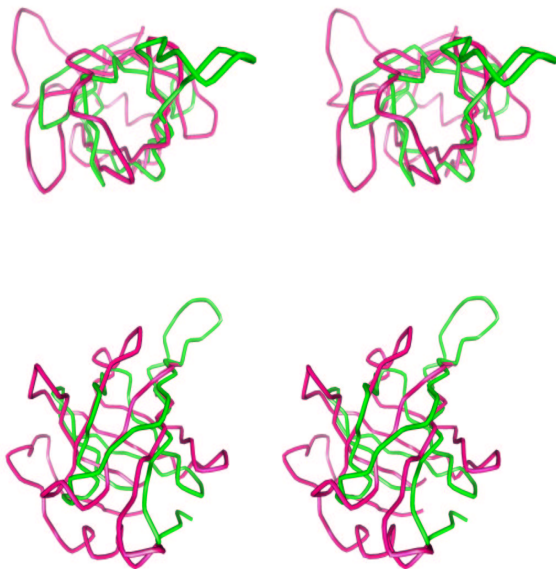


Abbildung 23: Stereodarstellung der Strukturüberlagerung der kleinen Domäne des QueA-Enzyms (rot) mit den Resten 15-84 der humanen Rhinovirus 3C-Protease (grün). Die Strukturüberlagerung wurde mit dem Programm MULTI_GA_FIT berechnet. Oben blickt man entlang der Achse des Fassmotivs, unten ist eine um 90° in der Horizontalen gedrehte Ansicht gezeigt.

Um zu überprüfen, ob mit der hier vorgestellten Struktur des QueA-Enzyms ein neues Faltungsmuster vorliegt, wurde eine Datenbanksuche mit dem Programm DALI (Holm & Sander 1993) durchgeführt. Dazu wurde sowohl mit dem gesamten Strukturmodell als auch mit beiden Domänen getrennt eine Suchanfrage gestellt. Während die Anfrage mit der großen Domäne alleine keine Struktur mit signifikanter Ähnlichkeit (d. h. mit einem Bewertungsfaktor Z größer oder gleich 2,0) lieferte, wurde bei der Anfrage mit dem Gesamtmodell oder dem Modell der kleinen Domäne als ähnlichste Struktur das Kristallstrukturmodell der humanen Rhinovirus 3C-Protease (PDB-Identifizierungscode 1CQQ, (Matthews, Smith et al. 1994)) identifiziert. Bei der Anfrage mit der kleinen Domäne alleine ergab sich dabei ein Bewertungsfaktor von $Z=3,9$, es wurden 66 Aminosäurereste von 91 in der Anfrage enthaltenen Reste als äquivalent zur in der Datenbank gefundenen Struktur identifiziert. Die Sequenzidentität innerhalb dieser 66 Reste lag bei 12%, was einer Sequenzidentität von nur 8,7% für alle 91 Reste der kleinen Domäne entspricht. Eine Überlagerung der Reste 15-84 der humanen Rhinovirus 3C-Protease mit der kleinen Domäne des QueA-Enzyms (Abb. 23) mit Hilfe des Programms MULTI_GA_FIT (May & Johnson 1994; May & Johnson 1995) ergab für 37 als äquivalent erkannte Reste eine mittlere quadratische Abweichung der Koordinaten der α -Atome von 1,8 Å. Vergleicht man die Strukturen des QueA-Enzyms und der humanen Rhinovirus 3C-Protease (Abb. 24), so wird auf den ersten Blick deutlich, worauf die Ähnlichkeit der beiden Proteine beruht: Beide Strukturen weisen ein β -Fass-Faltungsmuster auf. Während im QueA-Enzym nur die kleine Domäne ein

Um zu überprüfen, ob mit der hier vorgestellten Struktur des QueA-Enzyms ein neues Faltungsmuster vorliegt, wurde eine Datenbanksuche mit dem Programm DALI (Holm & Sander 1993) durchgeführt. Dazu wurde sowohl mit dem gesamten Strukturmodell als auch mit beiden Domänen getrennt eine Suchanfrage gestellt. Während die Anfrage mit der großen Domäne alleine keine Struktur mit signifikanter Ähnlichkeit (d. h. mit einem Bewertungsfaktor Z größer oder gleich 2,0) lieferte, wurde bei der Anfrage mit dem Gesamtmodell oder dem Modell der kleinen Domäne als ähnlichste Struktur das Kristallstrukturmodell der humanen Rhinovirus 3C-Protease (PDB-Identifizierungscode 1CQQ, (Matthews, Smith et al. 1994)) identifiziert. Bei der Anfrage mit der kleinen Domäne alleine ergab sich dabei ein Bewertungsfaktor von $Z=3,9$, es wurden 66 Aminosäurereste von 91 in der Anfrage enthaltenen Reste als äquivalent zur in der Datenbank gefundenen Struktur identifiziert. Die Sequenzidentität innerhalb dieser 66 Reste lag bei 12%, was einer Sequenzidentität von nur 8,7% für alle 91 Reste der kleinen Domäne entspricht. Eine Überlagerung der Reste 15-84 der humanen Rhinovirus 3C-Protease mit der kleinen Domäne des QueA-Enzyms (Abb. 23) mit Hilfe des Programms MULTI_GA_FIT (May & Johnson 1994; May & Johnson 1995) ergab für 37 als äquivalent erkannte Reste eine mittlere quadratische Abweichung der Koordinaten der α -Atome von 1,8 Å. Vergleicht man die Strukturen des QueA-Enzyms und der humanen Rhinovirus 3C-Protease (Abb. 24), so wird auf den ersten Blick deutlich, worauf die Ähnlichkeit der beiden Proteine beruht: Beide Strukturen weisen ein β -Fass-Faltungsmuster auf. Während im QueA-Enzym nur die kleine Domäne ein

derartiges Faltungsmuster besitzt, besteht die Grundstruktur der humanen Rhinovirus 3C-Protease aus zwei solchen Motiven. Es verwundert deshalb nicht, wenn die Suche mit DALI noch weitere Strukturen als Ergebnis liefert, die ebenfalls β -Fassmotive aufweisen. Neben Strukturen von verwandten Proteinen der humanen Rhinovirus 3C-Protease sind dies unter anderem die Strukturen der F1-ATPase aus *Bacillus* PS3 (Shirakihara, Leslie et al. 1997, PDB-Identifizierungscode 1SKY, Bewertungsfaktor $Z=3,7$) und des Translationsinitiationsfaktors IF2/EIF5B aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Roll-Mecak, Cao et al. 2000, PDB-Identifizierungscode 1G7S, Bewertungsfaktor $Z=3,5$). Alle hier gefundenen Ähnlichkeiten betreffen jedoch nur die grundlegende Art der Faltung, die Strukturen selbst sind nur schlecht überlagerbar und von einer Homologie kann auch aufgrund der geringen Sequenzidentität nicht sicher ausgegangen werden..

Ein besonders interessanter Aspekt der hier als ähnlichste Struktur gefundenen humanen Rhinovirus 3C-Protease ist die Tatsache, dass diese, wie auch weitere verwandte virale Proteine neben einer proteolytisch aktiven Stelle noch eine unabhängige RNA-Bindestelle besitzt (Leong, Walker et al. 1993; Matthews, Smith et al. 1994; Walker, Leong et al. 1995). Im oberen Teil von Abb. 24 erstreckt sich die mutmaßliche RNA-Bindestelle des QueA-Enzyms auf der dem Betrachter zugewandten Seite von der Furche zwischen beiden Domänen bis zum unteren Deckel der Fassstruktur der kleinen Domäne. Im unteren Teil der Abb. 24 ist eine Ansicht der Struktur der humanen Rhinovirus 3C-Protease dargestellt, die die linke Domäne in eine der oben dargestellten kleinen Domäne des QueA-Enzyms vergleichbare Orientierung bringt. Hier befindet sich die RNA-Bindestelle ebenfalls im Bereich der Furche zwischen den beiden Domänen, aber auf der dem Betrachter abgewandten Seite, in der Nähe der oben sichtbaren großen Helix und der ebenfalls oben befindlichen großen Schleifenregion. Aufgrund dieser unterschiedlichen Lokalisierung der RNA-Bindestelle lässt sich eine funktionale und auch strukturelle Homologie im Sinne einer phylogenetischen Verwandtschaft beider Proteine sicherlich ausschließen. Dieser Schluss wird umso zwingender, wenn man berücksichtigt, dass sich die strukturelle Ähnlichkeit beider Proteine auf ein ähnliches Faltungsmuster der kleinen Domäne des QueA-Enzyms und des Faltungsmusters der beiden Domänen der humanen Rhinovirus 3C-Protease beschränkt ist, die große Domäne des QueA-Enzyms jedoch eine gänzlich neue Faltung aufweist. Es ist aber durchaus naheliegend, bei der Art und

Weise, in der bei beiden Proteinen die RNA-Bindung erfolgt, von einer Analogie im Sinne einer konvergenten Entwicklung zu sprechen, da diese Bindung vermutlich in beiden Fällen in einer Furche zwischen zwei Domänen in ungefähr vergleichbarer Position im Bereich ähnlicher β -Fasstrukturen stattfindet.

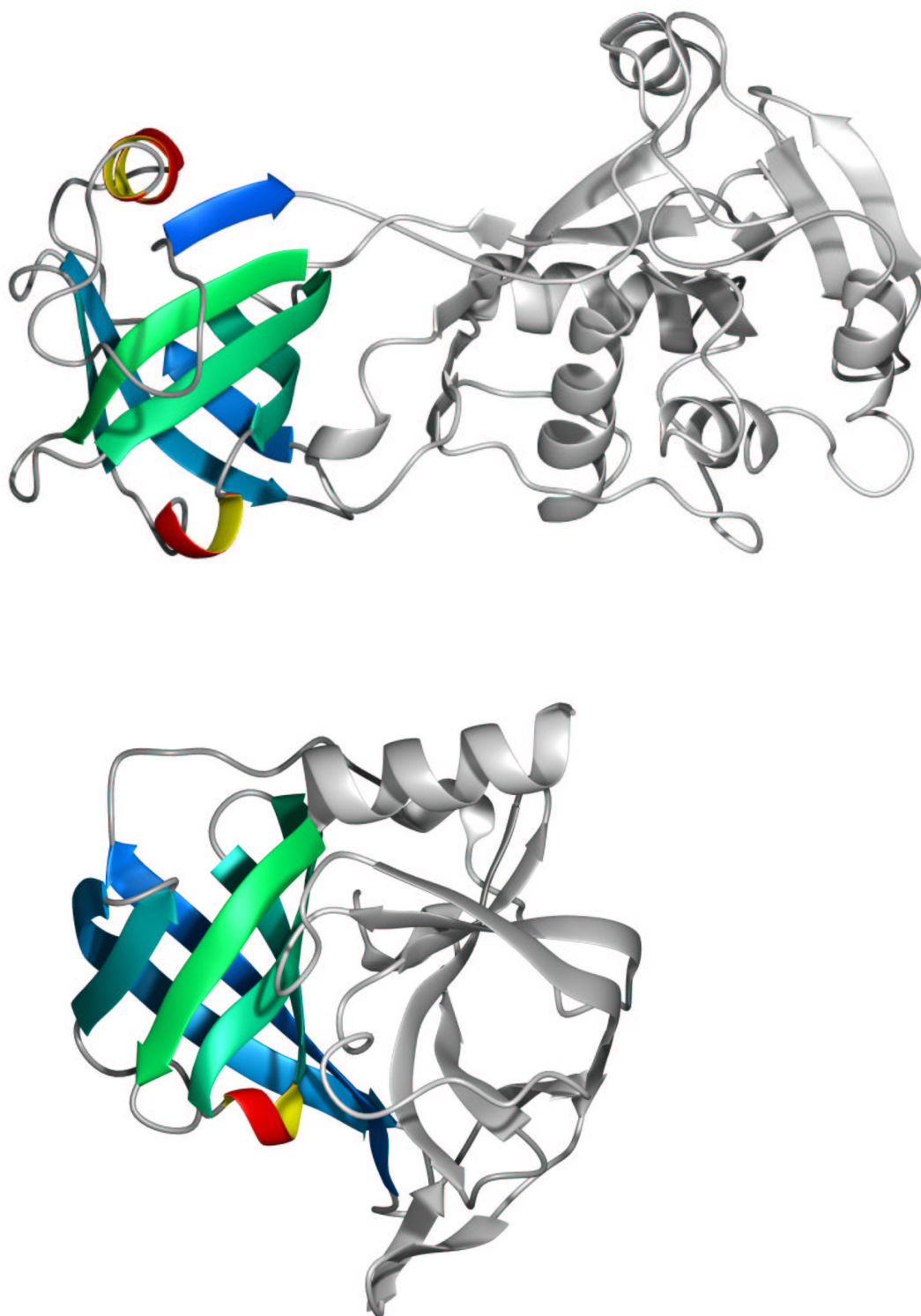


Abbildung 24: Vergleich des Faltungsmusters des QueA-Enzyms mit dem Faltungsmuster der humanen Rhinovirus 3C-Protease. Nur die kleine Domäne des QueA-Enzyms und die vergleichbare N-terminale Domäne der humanen Rhinovirus 3C-Protease sind farbig dargestellt. Die Farbe der β -Stränge variiert in beiden Modellen von grün (N-terminal) bis blau (C-terminal)

1.4.4 Fazit und Ausblick

Wie aufgrund der fehlenden Sequenzhomologie zu anderen Proteinen erwartet wurde, besitzt das QueA-Enzym eine neue Proteinfaltung, die jedoch im Bereich der kleinen Domäne bereits bekannte Elemente enthält. Dennoch kann auch die 6+1strängige β -Fasstruktur der kleinen Domäne aufgrund ihrer strukturellen Eigenheiten und aufgrund ihres Kontexts in der restlichen Struktur in gewisser Weise als neuartig gelten. Die ausgeprägten elektrostatischen Eigenschaften des Proteins zusammen mit der auffälligen Verteilung konservierter Reste geben relativ schlüssige Hinweise auf die Region, in der die Substratbindung stattfindet und wo zumindest grob lokalisiert das aktive Zentrum anzunehmen ist. Eines der wesentlichsten Merkmale des QueA-Enzyms scheint seine strukturelle Flexibilität zu sein. Vermutlich steht diese Eigenheit des Proteins mit dem überwiegenden Teil der Probleme in Verbindung, die bei der Strukturaufklärung dieses Enzyms immer wieder auftraten. Aufgrund dieser Probleme kann die hier vorläufig vorgestellte Struktur auch noch nicht als endgültig abgeschlossen angesehen werden. Weitere experimentelle Befunde sind notwendig, um das bestehende Modell zu sichern und zu ergänzen. Eine nahe liegende Möglichkeit ist, die zwei Domänen getrennt zu exprimieren, um so kleinere, rigidere und kompaktere Partikel zu erhalten, die wahrscheinlich in Kristallisationsexperimenten ein günstigeres Verhalten zeigen werden. Des Weiteren ist es sicherlich lohnend, die begonnenen Protein-RNA-Kokristallisationsexperimente fortzusetzen, die bereits -gemessen an ihrer Größe- gut beugende Kristalle geliefert haben. Eine Komplexstruktur mit tRNA-Substrat verspräche insbesondere als Ergänzung zur Apo-Struktur einen höheren wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn. Zieht man darüber hinaus in Betracht, dass Kokristallisations- und Soakingexperimente mit SAM alleine nicht zu einer kofaktorhaltigen Kristallstruktur geführt haben, muss davon ausgegangen werden, dass erfolgreiche Inhibitorstudien im Rahmen eines rationalen Wirkstoffdesigns u. U. nur mit Hilfe von Kristallen ternärer Komplexe betrieben werden können.

Die Tatsache, dass ausgeprägte konformative Flexibilität ein so großes Hindernis bei der Strukturaufklärung darstellt, hat sicherlich eine eingehendere Untersuchung dieses Phänomens bisher verhindert. Das Fortschreiten der methodischen Möglichkeiten, das auch bei dieser Arbeit eine Strukturlösung erst möglich gemacht hat, bietet

die Chance, in diesen Bereich der Enzymchemie und Strukturbiologie weiter vorzudringen, was mit Sicherheit auch mit der Entdeckung neuer Proteinfaltungsmuster verbunden sein wird.

2 Die Kristallstruktur der 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase aus *Comamonas testosteroni*: Ein neueartiges Oligomerisierungsmuster bei kurzkettigen Dehydrogenasen

2.1 Einleitung

2.1.1 Das Bakterium *Comamonas testosteroni*

Gram-negative Bakterien der Gattung *Comamonas* können aus Boden- Schlamm- und Wasserproben isoliert werden. Die streng aeroben nichtfermentativ und chemoorganotroph lebenden Organismen greifen selten Zucker an, und wachsen bevorzugt in Medien, die Aminosäuren oder andere organische Säuren enthalten (Willems, deVos et al. 1992). *Comamonas testosteroni* besitzt die Fähigkeit, Steroide als alleinige Stickstoffquelle einzusetzen (Talalay, Dobson et al. 1952) und könnte deshalb ein probates Mittel sein, diese stabilen Verbindungen aus der Umwelt zu entfernen. In Anwesenheit von Testosteron induziert dieser Organismus die Expression einer Gruppe von Genen, die für Enzyme des Steroid-Abbaus kodieren (Möbus, Jahn et al. 1997). Eines dieser Enzyme ist die 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase (3 α -HSDH). Dementsprechend erhöht sich in Gegenwart steroidalere Induktoren nicht nur signifikant die Resistenz von *C. testosteroni* gegenüber dem Steroidantibiotikum Fusidinsäure, sondern auch die Effizienz der Metabolisierung von bestimmten Insektiziden (Oppermann, Belai et al. 1996).

2.1.2 Kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen und die Rossmann-Faltung

Die 3 α -HSDH von *Comamonas testosteroni* (Oppermann & Maser 1996) gehört zur Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR). Obwohl die Identität der Aminosäuresequenzen in dieser Familie sich

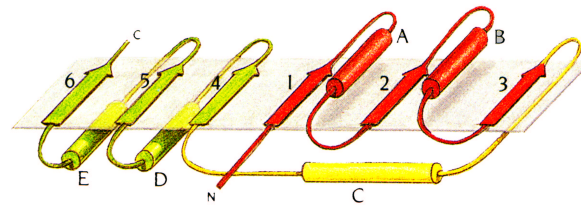


Abbildung 25: Schema der Rossmann-Faltung. Das zentrale, parallele β -Faltblatt ist als Ebene angedeutet.

typischerweise im Bereich von 15%-30% bewegt, zeigen diese Enzyme eine verhältnismäßig hohe strukturelle Ähnlichkeit. Die Grundstruktur der SDR baut auf einem typischen Dinukleotid-Bindemotiv, das Rossmann-Faltung genannt wird, auf. Dieses besteht aus $\beta\alpha\beta$ -Einheiten, die so angeordnet sind, dass ein zentrales paralleles β -Faltblatt von zwei Reihen α -Helices auf jeder Seite flankiert wird. Das Faltungsmuster kann in zwei symmetrische Hälften unterteilt werden, die Helices der N-terminalen Hälfte liegen oberhalb, die Helices der C-terminalen Hälfte unterhalb der Ebene des zentralen β -Faltblattes. Helix αC verbindet beide Hälften (Abb. 25) (Rossmann, Liljas et al. 1975). Die überwiegende Zahl der SDR bildet unter physiologischen Bedingungen entweder Homodimere oder Homotetramere. Ein gemeinsames Merkmal aller SDR ist die Abhängigkeit von den Nukleotidkofaktoren NAD(H) bzw. NADP(H) (Jornvall, Persson et al. 1995). Der ungefähre Ort der Bindung des Nukleotidkofaktors befindet sich im beschriebenen Schema an der C-terminalen Flanke des zentralen β -Faltblattes.

2.1.3 Die 3 α -HSDH – der bisherige Stand des Wissens

Die 3 α -HSDH vermittelt die Oxidation einer Hydroxylgruppe bzw. Reduktion einer Carbonylfunktion an Position 3 des Steroidgrundgerüsts bei unterschiedlichsten C₁₉-₂₇-Steroiden. Diese Reaktion besitzt bei der Initiation des Abbaus der an sich sehr inerten Steroidsubstrate eine zentrale Bedeutung. Darüber hinaus akzeptiert das Enzym noch ein breites Spektrum xenobiotischer Verbindungen, wie z. B. das Therapeutikum Metyrapon oder das signifikant kleinere Molekül p-Nitrobenzaldehyd als Substrat (Möbus & Maser 1998). Die Primärstruktur der 3 α -HSDH von *Comamonas testosteroni* weist zwei für Mitglieder der SDR-Familie typische Sequenzmotive auf. Dies ist zum einen das N-terminale Gly⁸-X-X-X-Gly¹²-X-Gly¹⁴-Kofaktorbindemotiv

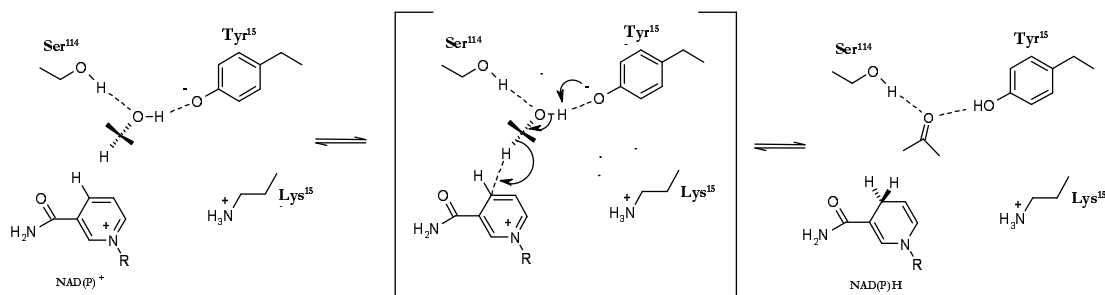


Abbildung 26: Vorgeschlagenes Schema des gemeinsamen Reaktionsmechanismus der SDR-Familie. Die Reste der katalytischen Triade sind entsprechend der 3 α -HSDH-Struktur nummeriert. Zur weiteren Erläuterung siehe Text.

und zum anderen ein Tyr¹⁵⁵-X-X-X-Lys¹⁵⁹-Motiv (Möbus & Maser 1998), das in der Raumstruktur im aktiven Zentrum lokalisiert ist und im Zusammenspiel mit dem hochkonservierten Aminosäurerest Ser¹¹⁴ eine katalytische Triade bildet (die Bezifferung der Aminosäurereste entspricht der Primärstruktur der 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni*). Wahrscheinlich alle SDR besitzen einen gemeinsamen, grundlegenden Reaktionsmechanismus (Abb. 26), der streng geordnet verläuft und mit der Bindung des Nukleotidkofaktors beginnt. Die darauffolgende Bindung des Hydroxyl- oder Carbonylsubstrates bedingt eine konformative Umformung der sogenannten Substrat-Bindeschleife, die ansonsten in den meisten apo-SDR hochflexibel und in vielen Fällen kristallographisch unsichtbar ist, zu einem wohlgeordneten Zustand. In diesem Zustand bedeckt sie das Substrat und schirmt es ebenso wie das katalytische Zentrum vom umgebenden Medium ab. Der sich nun anschließende Transfer eines Hydridions wird von einem Protonentransfer über den Tyrosinrest der katalytischen Triade

begleitet. Der Serinrest der katalytischen Triade hat dabei hauptsächlich die Aufgabe, das Substrat korrekt zu orientieren und den Übergangszustand zu stabilisieren. Alternativ wurde für die Funktion des Serinrests vorgeschlagen, dass er eine untergeordnete Rolle als katalytische Base zusammen mit dem Tyrosinrest der katalytischen Triade spielt (Winberg, Brendskag et al. 1999). Das Lysin der katalytischen Triade hat zum einen ebenfalls die Aufgabe, das Substrat über Wasserstoffbrückenbindungen richtig zu orientieren und zum anderen, den pK_s-Wert des katalytischen Tyrosins über elektrostatische Wechselwirkungen zu senken (Ghosh, Wawrzak et al. 1994; Auerbach, Herrmann et al. 1997; Benach, Atrian et al. 1999).

In folgenden wird die Kristallstruktur von *C. testosteroni* 3 α -HSDH sowohl in der Apo-Form als auch im Komplex mit gebundenem NAD⁺ vorgestellt.

2.1.4 Kristallographische Phasenbestimmung mit der Methode des Molekularen Ersatzes

Eine gängige Beobachtung in der Strukturbiologie ist, dass homologe Proteine mit nur geringer Sequenzidentität oft eine erstaunlich hohe strukturelle Übereinstimmung besitzen. Dieses Phänomen kann man sich für die Kristallstrukturlösung homologer Proteine zunutze machen, um Phaseninformation durch korrektes räumliches Platzieren des Modells einer bereits bekannten Struktur zu erzeugen. Dabei ist zunächst die Aufgabe zu bewältigen, das Strukturmodell dem Kristallgitter entsprechend zu orientieren. Um den Rechenaufwand gering zu halten, wird die Suche nach Rotationswinkeln von der Suche nach Translationskoordinaten entkoppelt (Rossmann & Blow 1962; Rossmann 1990). Zunächst sucht man Maxima der Rotationsfunktion

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \iiint_{x,y,z} P(x, y, z) P_r(x_r, y_r, z_r) dx dy dz$$

wobei α , β , und γ die üblicherweise als Eulersche Winkel ausgedrückten Rotationskoordinaten des Suchmodells und P die Patterson-Funktion (siehe Kap. 1) des zu phasierenden Datensatzes sowie P_r die Pattersonfunktion des in den Reziprokraum transformierten Suchmodells darstellt. Innerhalb der gefundenen potentiellen Lösungen der Rotationsfunktion werden dann Lösungen der Translationsfunktion

$$T(\vec{t}) = \int_V P_x(\vec{u}, \vec{t}) P(\vec{u}) d\vec{u}$$

gesucht. Diese besitzt ein Maximum, wenn der intermolekulare Vektor \vec{t} mit dem tatsächlichen intermolekularen Vektor übereinstimmt, da dann die sogenannte Cross-Patterson-Funktion P_x mit der beobachteten Pattersonfunktion P übereinstimmt. Die Wahl des Integrationsvolumens V ist dabei ein Parameter, der u. U. durch Ausprobieren optimiert werden muss.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Kristallisation

Heterolog überproduzierte, gereinigte 3 α -HSDH aus *C. testosteronei* wurde von Herrn Prof. Dr. E. Maser bereitgestellt (Möbus & Maser 1998). Alle Kristallisationsexperimente wurden nach der Methode des hängenden Tropfens in Zellkulturschalen der Fa. Linbro durchgeführt. Die Ausgangsbedingungen für alle weitergehenden Experimente wurden mit Hilfe der Standardscreening-Kits Nr. I und II der Fa. Hampton Research ermittelt. Dazu wurde jeweils 1,5 μ l Proteinlösung (5 g/l 3 α -HSDH in 10 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 0,1 mM Dithiothreitol) mit der gleichen Menge Reservoirlösung gemischt und über dem Reservoir abgedichtet befestigt. Das Screening wurde jeweils bei 4 °C und 18° C ausgeführt. Nach einer Woche waren in dem bei 4 °C ausgeführten Screening in Bedingung Nr. 22 (30 % PEG 4000, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 0,2 M Natriumazetat) kleine Einkristalle sichtbar. Diese Bedingung konnte weiter optimiert werden (25 % - 30 % PEG 4000, 0,1 M Cacodylatpuffer bei pH 6,5 und 0,2 M Ammoniumazetat), so dass innerhalb eines Zeitraums von drei Wochen Einkristalle von Dimensionen bis zu 0,3 mm \times 0,3 mm \times 0,4 mm heranwuchsen. Eine weitere Verbesserung wurde mit Hilfe der Technik des Makroseedings bei gleichzeitiger Erniedrigung der Präzipitanskonzentration auf 20% erreicht, so dass schließlich Kristalle in der Größenordnung von etwa 0,5 mm \times 0,5 mm \times 0,8 mm erhalten wurden. Für die Kokristallisation des binären Komplexes wurde der Proteinlösung 2,5 mM NAD⁺ zugesetzt. Für Kokristallisationsexperimente mit Steroidsubstraten wurde die Reservoirlösung, die dem NAD⁺/NADH-haltigen Proteintropfen zugegeben wurde, mit Steroid gesättigt und zusätzlich noch eine geringe Menge kristallines Substrat zugegeben, die über die gesamte Dauer des Kristallisationsexperiments nicht verschwand. Das Substrat Metyrapon wurde in einer Konzentration von 100 mM der Reservoirlösung zugesetzt. Für Soakingexperimente wurden Steroidsubstrate im Überschuss zusammen mit 2,5 mM NAD⁺ bzw. NADH einem Stabilisierungspuffer aus 35 % PEG 4000, 0,1 M Cacodylatpuffer bei pH 6,5 und 0,2 M Ammoniumazetat zugesetzt. Die Kristalle wurden darin sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 277 K über Nacht belassen.

2.2.2 Datensammlung und Datenprozessierung

Alle Datensätze wurden auf dem hauseigenen Drehanodengenerator der Fa. Rigaku/MSK, ausgestattet mit einer Spiegeloptik der Fa. MSC/Yale und einem RAXIS IV Flächendetektor gesammelt. Dabei wurden die üblichen Betriebsbedingungen von 50 kV Anodenspannung und 100 mA Anodenstrom eingehalten. Der zu messende Kristall wurde in einer Nylonfaseröse der Fa. Hampton-Research befestigt und bei einer Temperatur von 100 K im Stickstoffgasstrom schockgefroren. Der hierbei notwendige Kryopuffer wurde aus Reservoirlösung durch Zusatz von 20% (v/v) Glycerin hergestellt. Die Rohdatenindizierung und -Prozessierung wurde mit Hilfe der Programme XDISP und DENZO (Otwinowski & Minor 1997) der Fa. HKL-Research vorgenommen. Die vorprozessierten Daten wurden dann mit Hilfe des Programms SCALEPACK (Otwinowski & Minor 1997) skaliert und zu einem Datensatz vereinigt.

2.2.3 Strukturbestimmung und Verfeinerung

Anfangsphasen für den nativen Datensatz wurden mit Hilfe der Methode des molekularen Ersatzes (Rossmann & Blow 1962) bestimmt. Dazu wurde das Programm AMoRe (Navaza 1994) aus der CCP4-Programmsammlung (CCP4 1994) eingesetzt. Die Patterson-Rotations- und Translationssuche wurde mit den Raumkoordinaten der Poly-Alaninspur eines Monomers der Tropinonreduktase II (Zugriffscodename der „Protein Data Bank“, PDB: 2AE1) (Nakajima, Yamashita et al. 1998) nach Entfernung von Helix α C und der Substratbindeschleife durchgeführt. Die beste aus der Rotationssuche resultierende Lösung (Tab. 7) wurde als fixe Lösung für die Translationssuche des zweiten Monomers vorgegeben⁴. Die dann aus der Translationssuche resultierende beste Lösung (Tab. 8) war im Hinblick auf Korrelationsfaktor und R-Faktor klar von allen anderen Lösungen abgesetzt. Aus zwei Monomeren, die ent-

⁴ In der hier vorliegenden Raumgruppe P1 sind die drei Translationskoordinaten frei wählbar, das zweite Monomer ist aber relativ zum ersten Monomer korrekt zu positionieren

sprechend den erhaltenen Lösungen orientiert wurden, konnte ein sinnvolles Dimer aufgebaut werden. Dieses Modell wurde dann einer Verfeinerung nach dem RIGID-Protokoll in CNS (Brünger, Adams et al. 1998) unterworfen, dem sich eine Verfeinerung nach dem ANNEAL-Protokoll mit einer Starttemperatur von 3000K anschloss. Hier wurden Daten im Auflösungsbereich von jeweils 8 Å bis 3,5 Å bzw. 8 Å bis 2 Å verwendet. Diese Verfeinerungen wurden unter Auferlegung von Einschränkungen der Freiheitsgrade durch die vorhandene zweifache nichtkristallographische Symmetrie ("NCS-restraints") gerechnet. Nach einer ersten visuellen Inspektion des so erhaltenen Anfangsmodells zusammen mit der unter Zuhilfenahme der Modellphasen gerechneten Elektronendichtekarte wurden 110 Aminosäurereste, die sterische Probleme im Bereich der Dimerisierungs- und Kristallkontakte verursachten, entfernt. Die restlichen Seitenketten wurden entsprechend der Primärstruktur der 3 α -HSDH ausgetauscht. Dabei wurde nach Möglichkeit bei der Wahl der Konformation die Strukturinformation aus homologen bekannten SDR-Strukturen berücksichtigt. Nach diesen manuellen Korrekturen wurde eine weitere Verfeinerung nach dem ANNEAL-Protokoll und eine individuelle Verfeinerung der B-Faktoren mit CNS (Daten im Auflösungsbereich von 8 Å bis 1,68 Å) durchgeführt und anschliessend $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ und $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarten gerechnet. Aufgrund der schlechten Qualität und Interpretierbarkeit dieser Dichtekarten wurden verschiedene Techniken der Dichtemodifikation (zweifache Mittelung NCS-verwandter Dichtebereiche, Solvensglättung, "histogram matching" - eine aus der Bildbearbeitung stammende statistische Methode und Phasenerweiterung) mit dem Programm DM aus der CCP4-Programmsammlung angewandt. Dazu wurden Anfangsphasen aus dem vorhandenen Rohmodell in CNS errechnet und eine Abschätzung der Phasengütefaktoren (FOM, "figure of merit") mit dem Programm SIGMAA des CCP4-Paketes generiert. Für die NCS-Mittelung wurden Erste Molekülmasken von einem Monomer und für die Solvensglättung vom dimeren Molekül mit dem Programm MAMA (Kleywegt & Jones 1994) erstellt, nachdem Bereiche mit voraussichtlich fehlenden Modellteilen mit Platzhalteratomen gefüllt wurden. Nach 35 Verfeinerungszyklen mit DM wurde die resultierende Elektronendichtekarte zusammen mit dem Modell erneut manuell inspiziert. Nach insgesamt vier dieser Verfeinerungszyklen mit Dichtemittlung und manueller Inspektion konnte das gesamte Proteinmodell gebaut werden, eine Region im Bereich der Reste 188 bis 208 ausgenommen. In diesem Bereich, der offenbar ei-

ner Schleifenregion angehört, konnte keine zuzuordnende Elektronendichte beobachtet werden. In diesem Stadium wurden auch Wassermoleküle unter Zuhilfenahme des entsprechenden CNS-Protokolls eingebaut. Nun wurde eine Solvenskorrektur eingeführt und unter Zuhilfenahme aller verfügbaren Daten im Auflösungsbereich von 99 Å bis 1,68 Å eine Verfeinerung nach dem ANNEAL-Protokoll mit einer Starttemperatur von 1000K und eine individuelle isotrope B-Faktorverfeinerung mit CNS gerechnet. Die Beschränkungen der Freiheitsgrade durch NCS wurden auf dieser Stufe fallengelassen. Nach Einbau von insgesamt 405 Wassermolekülen, einigen weiteren manuellen Korrekturen und erneuter automatischer Verfeinerung mit CNS unter Einbeziehung einer anisotropen Gesamt-B-Faktorverfeinerung konnte schließlich ein R/R_{free} -Faktor von 20,0%/22,9% erreicht werden.

Das Apo-3 α -HSDH-Modell wurde als Anfangsmodell für Verfeinerungen gegen alle Datensätze verwendet, die von Kristallen gesammelt wurden, die in Anwesenheit von NAD⁺ oder zusätzlichen Substraten gewachsen waren. Dazu wurde jeweils eine bei 1500K gestartete Verfeinerung nach dem ANNEAL-Protokoll und anschließend eine individuelle isotrope B-Faktorverfeinerung mit Solvenskorrektur unter Verwendung von Daten über den gesamten verfügbaren Auflösungsbereich ausgeführt. Die aus dem verfeinerten Modell resultierenden $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ und $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ – Elektronendichtekarten wurden dann auf Dichtebereiche hin untersucht, die möglicherweise von gebundenen Substrat stammen könnten. In die bei NAD⁺-haltigen Kristallen im Bereich der Substratbindetasche sichtbar gewordene Dichte wurde ein NAD⁺-Modell eingepasst. Das auf diese Weise erhaltene Modell des binären Komplexes wurde dann ebenfalls einer bei 1500K gestarteten Verfeinerung nach dem ANNEAL-Protokoll und einer individuellen isotropen B-Faktorverfeinerung mit Solvenskorrektur unterworfen und bedurfte danach keiner weiteren manuellen Verfeinerung mehr. Die dazu notwendigen Modell- Parameter- und Topologiedateien wurden der „Hetero-compound Information Centre - Uppsala (HIC-Up)“-Datenbank (Kleywegt & Jones, 1998) entnommen.

Die Qualität der verfeinerten Modelle wurde anhand der mit PROCHECK (Laskowski, MacArthur et al. 1993) erstellten Ramachandran-Diagramme sowie der im Programm O (Jones & Kjeldgaard 1997) zur Verfügung stehenden Rotameranalyse überprüft.

		Apoprotein	Binärer Komplex
<i>Datensammlung</i>			
Auflösung	(Å)	50 - 1,65	50 - 1,95
Wellenlänge	(Å)	1,5418	1,5418
Temperatur	(K)	100	100
Raumgruppe		<i>P</i> 1	<i>P</i> 1
Zellparameter	(Å)	<i>a</i> = 43,3 <i>b</i> = 46,2 <i>c</i> = 65,3	<i>a</i> = 42,8 <i>b</i> = 46,2 <i>c</i> = 65,0
	(°)	α = 106,5 β = 106,6 γ = 98,8	α = 107,5 β = 106,3 γ = 97,6
Gesamtzahl beobachteter Reflexe		374072	233945
Anzahl symmetrieunabh. Reflexe		50140	30053
Vollständigkeit (%)	insgesamt äußere Schale	97,7 74,0	93,3 90,5
R_{sym}-Faktor^a (%)	insgesamt äußere Schale	4,3 27,1	4,2 27,5
<i>Modellverfeinerung</i>			
R-Faktor^b	(%)	20,0	18,5
R_{free}-Faktor^b	(%)	22,9	22,0
Abweichung v. d. Idealgeometrie:			
Bindungslängen	(Å)	0,005	0,006
Bindungswinkel	(°)	1,2	1,3

Tabelle 6: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung der 3 α -HSDH-Modelle.

^aR_{sym} = $\Sigma |I - \langle I \rangle| / \Sigma I$, wobei *I* die beobachtete Intensität und $\langle I \rangle$ die mittlere Intensität für mehrfache Messung bedeutet

^bR-Faktor = $\Sigma |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \Sigma |F_{\text{obs}}|$, wobei *F_{obs}* und *F_{calc}* die beobachteten und berechneten Strukturfaktoren sind.

Nr.	α	β	γ	corr
1	315.65	92.13	266.30	8.4
2	109.97	107.36	229.52	7.8
3	43.50	29.00	269.00	7.3
4	270.78	76.97	79.10	7.3
5	222.34	108.95	63.57	7.3
6	58.94	150.29	149.29	7.3
7	233.89	121.26	43.14	7.2
8	303.32	92.59	260.45	7.2
9	216.00	149.01	21.16	7.0
10	119.78	127.54	61.25	6.8

Tabelle 7: Statistik des molekularen Ersatzes: Suche nach Lösungen der Rotationsfunktion. Die zehn besten Lösungen sind als Ausgabe des Programms AMORE angegeben, die endgültigen Lösungen sind fett gedruckt. Der Sigma-Wert der Rotationsfunktion ist 1,73.

α	β	γ	tx	ty	tz	corr	R
222.34	108.95	63.57	0.4000	0.0541	0.4708	17.6	52.7
95.18	77.79	52.45	0.5694	0.8683	0.6529	11.4	54.9
58.94	150.29	149.29	0.6131	0.2077	0.6778	11.3	54.8
279.35	138.26	257.63	0.8500	0.9000	0.7410	11.2	54.5
303.32	92.59	260.45	0.1054	0.8608	0.1718	11.0	54.6
350.25	139.20	338.23	0.0250	0.8860	0.2738	10.9	54.1
236.35	51.79	297.20	0.7913	0.0008	0.7179	10.7	54.6
233.78	106.53	117.32	0.1645	0.0538	0.9078	10.6	54.1
109.97	107.36	229.52	0.8683	0.0065	0.1130	10.5	54.6
233.89	121.26	43.14	0.5348	0.0427	0.1931	10.5	54.7

Tabelle 8: Statistik des molekularen Ersatzes: Suche nach Lösungen der Translationsfunktion. Die zehn besten Lösungen sind als Ausgabe des Programms AMORE angegeben, die endgültigen Lösungen sind fett gedruckt. Der Sigma-Wert der Rotationsfunktion ist 1,73. Die beste Lösung aus der Rotationsuche wurde fixiert vorgegeben und das zweite Molekül innerhalb der 30 besten Lösungen der Rotationsfunktion gesucht. Die erste Lösung, die bei der Rotationsuche an Position 5 erschien, hebt sich im Hinblick auf Korrelationsfaktor (corr) und R-Faktor deutlich vom Rest der Lösungen ab und erwies sich im Verlauf der Strukturverfeinerung als richtig. Der Sigma-Wert der Translationsfunktion ist 1,41.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Grundstruktur und Topologie

Die Strukturen der 3 α -HSDH sowohl in der Apo- als auch der NAD⁺-haltigen Form wurden mit der Methode des molekularen Ersatzes unter Zuhilfenahme von Tropinonreduktase II (Nakajima, Yamashita et al. 1998) als Suchmodell gelöst. Die Modelle der Strukturen wurden bei einer Auflösung von 1,68 Å bzw. 1,95 Å verfeinert und weisen eine gute Stereochemie mit 91% aller Reste in der „besonders bevorzugten“

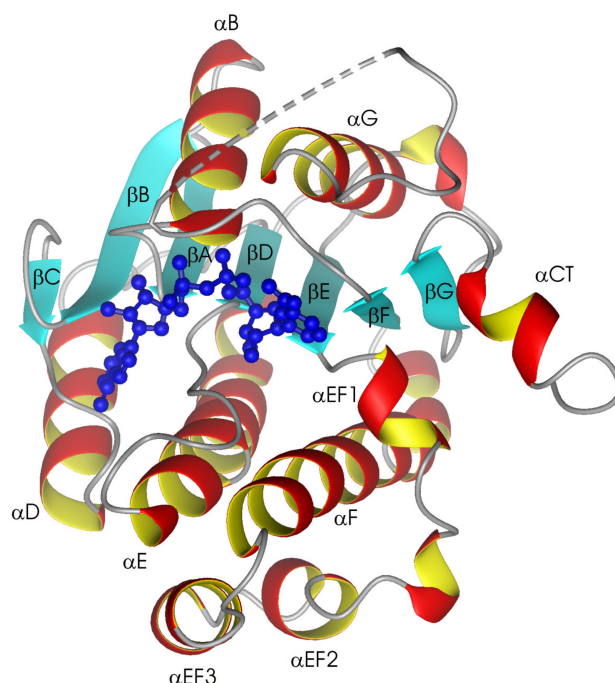


Abbildung 27: Das Modell der Kristallstruktur eines Monomers der 3 α -HSDH mit gebundenem NAD⁺. Die ungeordnete, kristallographisch unsichtbare Substratbindeschleife ist gestrichelt dargestellt.

Region im Ramachandran-Diagramm auf. Keine Reste befanden sich im „verbotenen“ Bereich des Ramachandran-Diagramms. Eine Zusammenfassung der Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistik ist Tab. 6 zu entnehmen. Ein Vergleich der Apo- und der NAD⁺-Kostruktur zeigt, abgesehen vom Kofaktor, keine signifikanten Unterschiede. Demnach hat die NAD⁺-Bindung keinen Einfluss auf die Konformation der 3 α -HSDH. Eine Ausnahme stellt unter Umständen die kristallographisch nicht

sichtbare Substrat-Bindeschleife dar. Hier waren in der Kostruktur drei Reste aus dem Randbereich der Schleife zusätzlich zu sehen.

Die Kristallstruktur weist ein Homodimer in der asymmetrischen Einheit auf, welches dem physiologisch aktiven Zustand des Enzyms entspricht (Maser, Möbus et al. 2000). Obwohl die monomere Untereinheit der 3 α -HSDH (Abb. 27) die typische SDR-Architektur aufweist, unterscheiden sie in Hinsicht auf ihre Topologie doch bestimmte Details von anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie. Das kanonische Strukturmotiv aller SDR-Enzyme ist ein Dinukletid-bindendes Faltungsmuster (Abb. 25), die sogenannte Rossmann-Faltung. Diese besteht aus $\beta\alpha\beta$ -Einheiten, die ein zentrales, sechssträngiges Faltblatt formen, das auf beiden Seiten von α -Helices umgeben ist (Rossmann, Liljas et al. 1975). Alle Mitglieder der SDR-Familie besitzen über dieses Faltungsmuster hinaus am Carboxyterminus mindestens eine weitere α -Helix (α G) und einen siebten β -Strang (β G). Abb. 31 zeigt die Faltungstopologie der 3 α -HSDH im Vergleich mit der zweier weiterer repräsentativer Mitglieder der SDR-Familie. Das Rossmann-Faltungsmotiv, das sich vom Aminoterminus bis zum Strang β F erstreckt, ist offensichtlich in der 3 α -HSDH verkürzt, da hier Helix α C fehlt und Strang β C nur als rudimentärer Rest vorhanden ist. Eine ähnliche Verkürzung des letzteren Strukturelementes ist ebenfalls in den Strukturen der Dihydropterinreduktase (Varughese, Skinner et al. 1992) und der GDP-Fucose-Synthetase (Somers, Stahl et al. 1998) zu finden. Andererseits ist in der 3 α -HSDH-Struktur innerhalb des Rossmann-Faltungsmotivs eine Insertion von 28 Aminosäureresten zwischen Strang β E und Helix α F (Abb. 31, Abb. 27) zu bemerken, die eine vorwiegend α -helikale Subdomäne ausbildet. Diese Insertion, die keine Entsprechung in anderen SDR-Strukturen findet, hat auch einen entscheidenden Einfluss auf das Oligomerisierungsverhalten der 3 α -HSDH; dies wird im folgenden weiter ausgeführt werden.

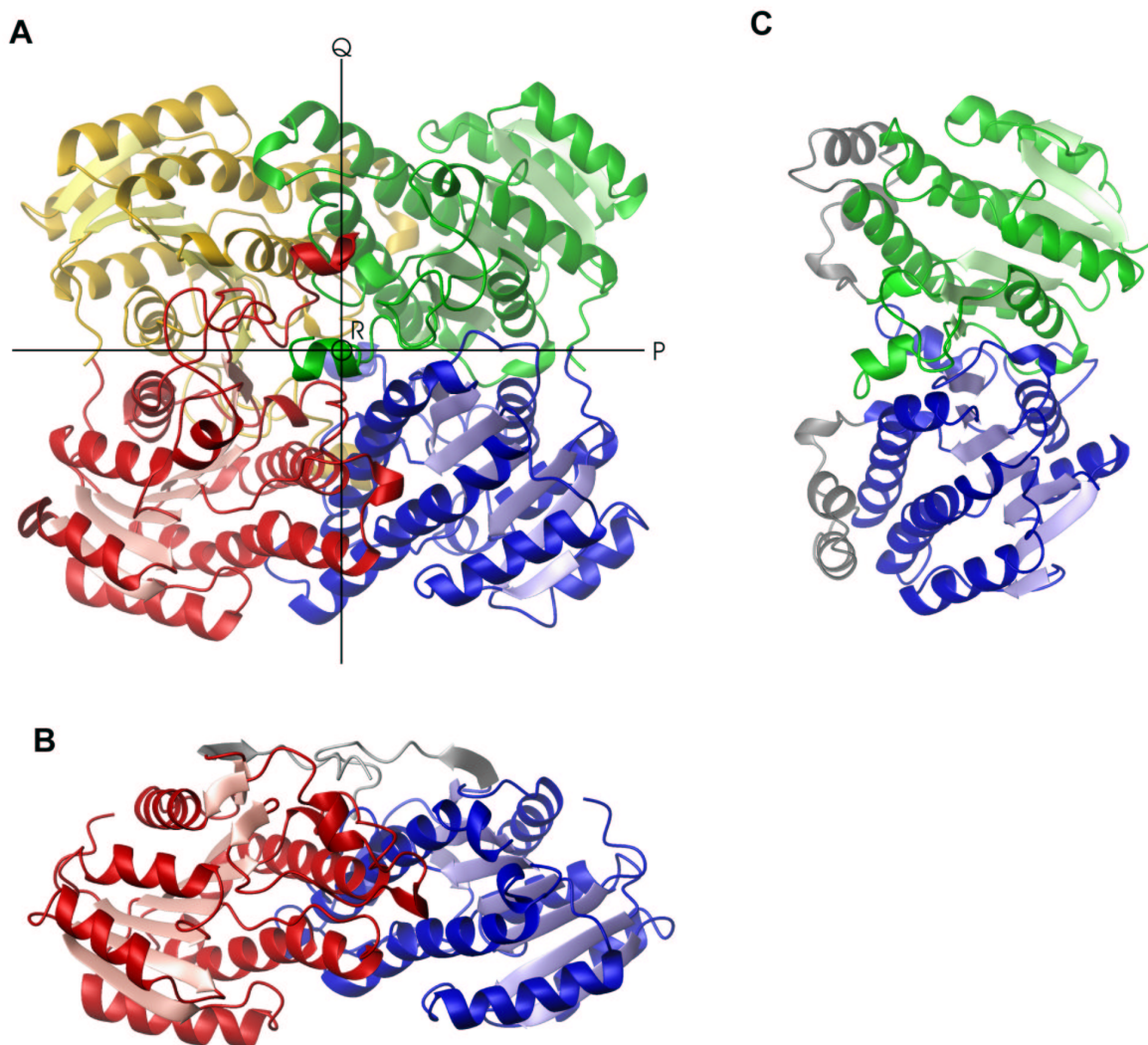


Abbildung 28: Vergleich der Oligomerisierungsmuster von (A) der homotetrameren $3\alpha,20\beta$ -HSDH aus *S. hydrogenans*, (B) der homodimeren Alkoholdehydrogenase aus *D. lebanonensis*, und (C) der homodimeren 3α -HSDH aus *C. testosteronei*. Über den vier Untereinheiten der $3\alpha,20\beta$ -HSDH sind die P- Q- und R-Achsen dargestellt, die aus der 222-Punktgruppensymmetrie homotetramerer SDR-Enzyme resultieren. Die Hauptkontaktflächen stellt sowohl die zur P-Achse als auch die zur Q-Achse gehörige Kontaktfläche dar. Die Symmetrieachse des ADH-Dimers entspricht der Q-Achse der $3\alpha,20\beta$ -HSDH. Das zentrale β -Faltblatt der ADH besitzt am Carboxyterminus einen achten parallelen β -Strang, der in grau dargestellt ist. Dieser fehlt bei der Mehrzahl der bekannten SDR-Strukturen und ist mit einer Oligomerisierung über die zur P-Achse gehörige Kontaktfläche nicht vereinbar. In der homodimeren 3α -HSDH tritt die Dimerisierung über eine Symmetrieachse auf, die der P-Achse der $3\alpha,20\beta$ -HSDH entspricht. Bei der 3α -HSDH wird eine Tetramerisierung ganz offensichtlich durch eine 28 Aminosäuren große Insertion zwischen Strang β E und Helix α F (dargestellt in grau) verhindert.

2.3.2 Quartärstruktur

Die Quartärstruktur der HSDH konnte mittels Gelfiltrationsmethoden eindeutig als Homodimer identifiziert werden (Maser, Möbus et al. 2000). Um die räumliche Anordnung der Untereinheiten der 3 α -HSDH näher zu erläutern, soll zunächst auf die Quartärstruktur homotetramerer SDRs eingegangen werden, um die speziellen Eigenheiten der 3 α -HSDH im Vergleich deutlich zu machen. Alle Strukturen homotetramerer SDRs, die bislang aufgeklärt wurden, zeigen zwei Hauptkontaktflächen der Untereinheiten, die über zwei aufeinander senkrecht stehende, zweizählige nichtkristallographische Symmetrieachsen miteinander verwandt sind (Abb. 28).

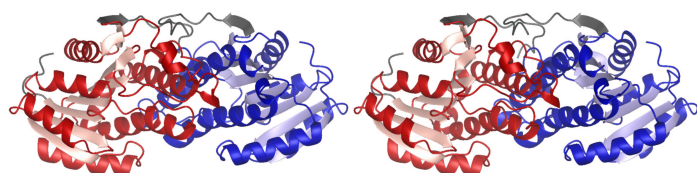


Abbildung 29: Stereoansicht eines Dimers der ADH aus *D. lebanonensis*

Diese Symmetrieachsen sollen im weiteren als P und Q bezeichnet werden (Ghosh, Wawrzak et al. 1994; Tanaka, Nonaka et al. 1996). Eine dritte zweizählige Symmetrieachse, die in Abb 28 senkrecht zur Papierebene steht, wird zwangsläufig von den P- und Q-Achsen generiert und als R-Achse bezeichnet. Die zur P-Achse gehörende Kontaktfläche wird hauptsächlich von den α G-Helices und von Interaktionen zwischen Seitenketten und Proteinrückgrad der β G-Stränge zweier benachbarter Untereinheiten bestimmt. Die zur Q-Achse gehörende Kontaktfläche besteht hauptsächlich aus einem Vierhelixbündel, das sich aus den Helices α E und α F der zwei benachbarten Untereinheiten aufbaut.

Alle bislang bekannten Strukturen homodimerer SDRs weisen eine Dimerisierung über eine Kontaktfläche auf, die der zur Q-Achse gehörenden Kontaktfläche homotetramerer SDRs entspricht (Abb. 28, Abb. 29). Dieser Dimerisierungsmodus ist jedoch in der 3 α -HSDH durch die erwähnte 28 Aminosäure große Insertion in das klassische Rossmann-Faltungsmotiv zwischen Strang β E und Helix

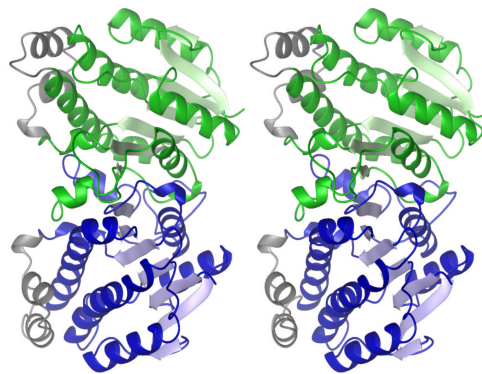


Abbildung 30: Stereoansicht eines Dimers der 3 α -HSDH

Eigenheiten der 3 α -HSDH im Vergleich deutlich zu machen. Alle Strukturen homotetramerer SDRs, die bislang aufgeklärt wurden, zeigen zwei Hauptkontaktflächen der Untereinheiten, die über zwei aufeinander senkrecht stehende, zweizählige nichtkristallographische Symmetrieachsen miteinander verwandt sind (Abb. 28). Diese Symmetrieachsen sollen im weiteren als P und Q bezeichnet werden (Ghosh, Wawrzak et al. 1994; Tanaka, Nonaka et al. 1996). Eine dritte zweizählige Symmetrieachse, die in Abb 28 senkrecht zur Papierebene steht, wird zwangsläufig von den P- und Q-Achsen generiert und als R-Achse bezeichnet. Die zur P-Achse gehörende Kontaktfläche wird hauptsächlich von den α G-Helices und von Interaktionen zwischen Seitenketten und Proteinrückgrad der β G-Stränge zweier benachbarter Untereinheiten bestimmt. Die zur Q-Achse gehörende Kontaktfläche besteht hauptsächlich aus einem Vierhelixbündel, das sich aus den Helices α E und α F der zwei benachbarten Untereinheiten aufbaut.

α F (der in Abb. 28 und 30 grau eingefärbte Sektor) sterisch gehindert. Diese Insertion, die hauptsächlich aus α -helikalen Abschnitten besteht, maskiert die zur Rossmann-Faltung gehörenden Helices α E und α F und macht damit die Bildung eines Vierhelixbündels nach dem zuvor beschriebenen Muster unmöglich. Dementsprechend muss die Dimerisierung in der 3 α -HSDH über die zur P-Achse gehörende Kontaktfläche stattfinden. Die Kontakte zwischen den Untereinheiten innerhalb des Dimers entstehen bei der 3 α -HSDH sowohl durch Interaktionen von Seitenkette zu Seitenkette beider β G-Stränge als auch durch die parallele Packung beider α G-Helices gegeneinander (Abb. 31 C, Abb. 37). Darüber hinaus ermöglicht die carboxyterminale Helix α CT der einen Untereinheit eine enge Packung mit Helix α F der jeweiligen anderen Untereinheit. Die Möglichkeit einer derartigen Dimerisierung über die zur P-Achse gehörende Kontaktfläche wurde zwar diskutiert (Krook, Ghosh et al. 1993), konnte aber bislang nicht in einer Kristallstruktur beobachtet werden. Dieser neuartige Oligomerisierungskontakt lässt sich klar von reinen Kristallkontakten (Abb. 32) unterscheiden, da die im Dimerisierungskontakt abgeschirmte, im monomeren Zustand aber solvenszugängliche Fläche (etwa 1900 Å^2 pro Monomer) weit größer ist als die abgeschirmte Fläche jedes der drei beobachteten Hauptkristallkontakte (zwischen 160 Å^2 und 280 Å^2 , Tab. 9).

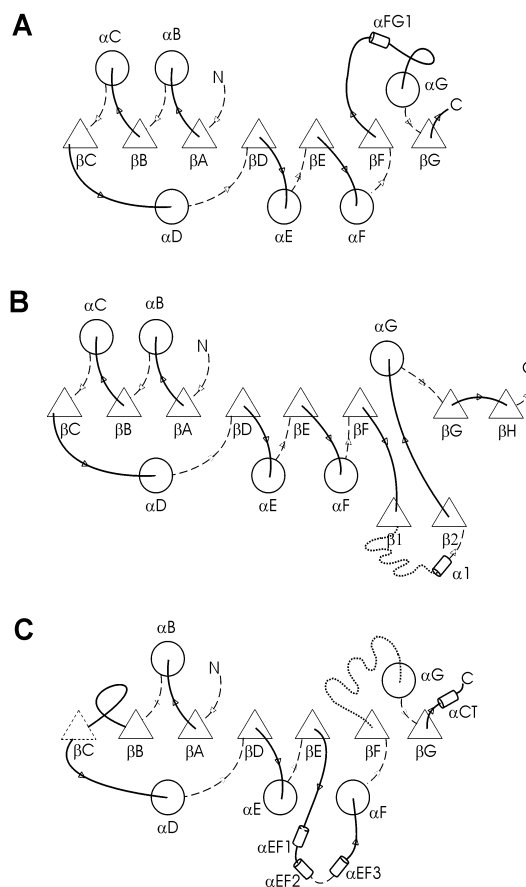


Abbildung 31: Vergleich der Faltungstopologien der Kristallstrukturen von (A) 3 α ,20- β -HSDH aus *Streptomyces hydrogenans* (10), (B) Alkoholdehydrogenase aus *Drosophila lebanonensis* (34), und (C) 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni*. Zur Erläuterung siehe Text.

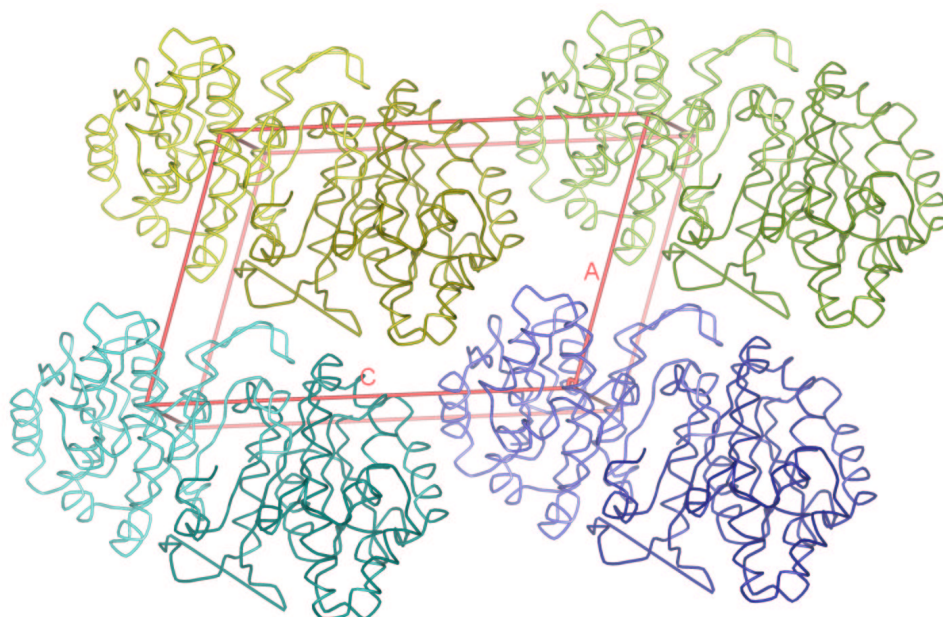


Abbildung 32: Ansicht der Packung der 3 α -HSD-Kristalle. Dargestellt sind durch die a- und c-Achse des Gitters symmetrieverwandte Moleküle. Die zwei Untereinheiten eines Dimers sind jeweils hell und dunkel im gleichen Farbton dargestellt. Klar zu erkennen ist die wesentlich größere Fläche des Dimerisierungskontaktes gegenüber den Kristallkontakten. Siehe dazu auch Tab. 9.

Symmetrieoperation	Kontaktfläche der symmetrieverwandten Moleküle (Å^2), bezogen auf ein Monomer
Translation entlang Zellachse a	158
Translation entlang Zellachse b	281
Translation entlang Zellachse c	266
NCS der beiden Monomere	1906

Tabelle 9: Größe verschiedener Kontaktflächen symmetrieverwandter Moleküle in Kristallen der 3 α -HSDH.

2.3.3 Katalytisches Zentrum und NAD⁺-Bindung

Die drei Aminosäurereste Ser¹¹⁴, Tyr¹⁵⁵ und Lys¹⁵⁹ der 3 α -HSDH bilden eine für die katalytische Aktivität des Enzyms essentielle Triade und sind innerhalb der SDR-Familie hochkonserviert. Die räumliche Anordnung dieser drei Reste in der Struktur der 3 α -HSDH (Abb. 34) ist nahezu identisch mit der Anordnung in anderen SDR mit bekannter Struktur, was die Wahrscheinlichkeit eines gemeinsamen Reaktionsmechanismus innerhalb

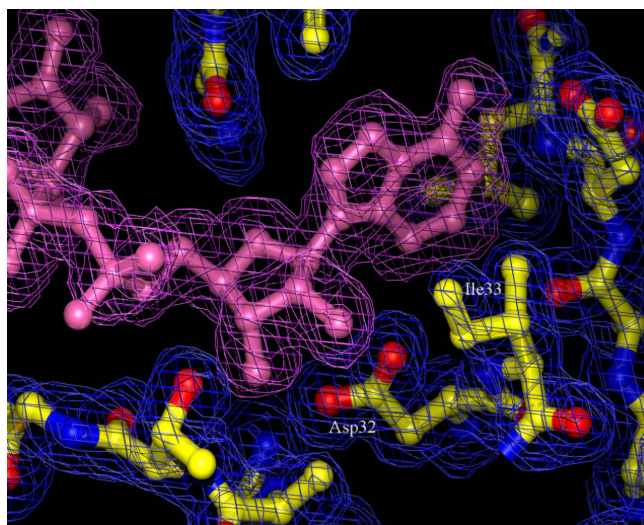


Abbildung 33: Ansicht der Aminosäurereste Asp³² und Ile³³ sowie des Adenosinanteils des gebundenen Kofaktors mit der zugehörigen $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichte. Asp³² ist bei SDR, die NAD(H) gegenüber NADP(H) bevorzugen, hoch konserviert. Eine potentielle Phosphatgruppe am 2'-Sauerstoffatom eines gebundenen NADP(H)-Moleküls würde ungünstige Kontakte verursachen.

dieser Proteinfamilie unterstreicht. Der binäre Komplex der 3 α -HSDH mit dem Kofaktor NAD⁺ (Abb. 33), der an der carboxyterminalen Seite der β -Stränge bindet, ist gleichermaßen gut mit dem Kofaktor in anderen binären oder ternären Komplexen

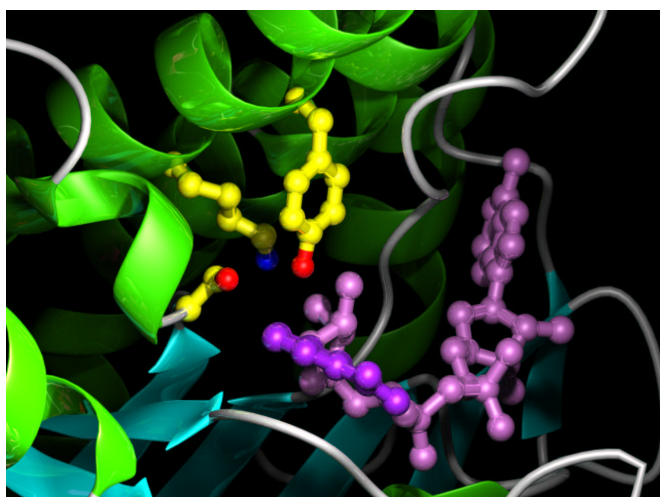


Abbildung 34: Ansicht der katalytischen Triade der 3 α -HSDH mit gebundenem Nukleotidkofaktor. Die katalytischen Reste Tyr¹⁵⁵ und Lys¹⁵⁹ entspringen Helix α F, während sich das katalytische Ser¹¹⁴ in einer kurzen Schleifenregion zwischen Strang β E und Helix α EF1 befindet. Zu erkennen ist auch die räumlich nahe Anordnung der katalytischen Reste zum Nikotinamidringsystem des Kofaktors. Die Ebene des dunkler eingefärbten Nikotinamidrings steht parallel zur Blickrichtung.

von SDR zu überlagern (Abb. 35). Dementsprechend sind, wie in anderen Komplexstrukturen mit SDR auch, beide Riboseringe des Nukleotidkofaktors als 2'-*endo*-Konformer vorhanden. Der Nikotinamidring liegt in einer *syn*- und die Adeninbase in einer *anti*-Konformation zum jeweils zugehörigen Riboserest vor. Die Orientierung des Nikotinamidrings zur katalytischen Triade ist, wie zu erwarten, e-

benfalls sehr ähnlich zu der in anderen SDR•NAD(P)(H)-Komplexen. Aufgrund der vorliegenden Strukturinformation kann postuliert werden, dass die 3 α -HSDH ein NAD(H)-abhängiges Enzym ist und kaum NADP(H) als Kofaktor akzeptieren wird. Die Carboxylgruppe von Asp³², ein hochkonservierter Rest in der Gruppe NAD(H) bevorzugender Enzyme (Nakanishi, Matsuura et al. 1997), bildet sowohl zur 2' als auch 3' Hydroxylgruppe des Adenosylrestes Wasserstoffbrücken (Abb. 33). Demnach würde eine potentielle Phosphatgruppe an der 2'-Position des Adenosylrestes ungünstige Kontakte in dieser Region verursachen. Darüber hinaus stände die beobachtete Konformation von Ile³³ aus sterischen Gründen in Konkurrenz zu einer möglichen Anwesenheit einer Phosphatgruppe. Die aus der Strukturinformation abgeleitete Bevorzugung der 3 α -HSDH von NAD(H) gegenüber NADP(H) ist darüber hinaus auch ein Hinweis auf den katabolen Charakter des Enzyms.

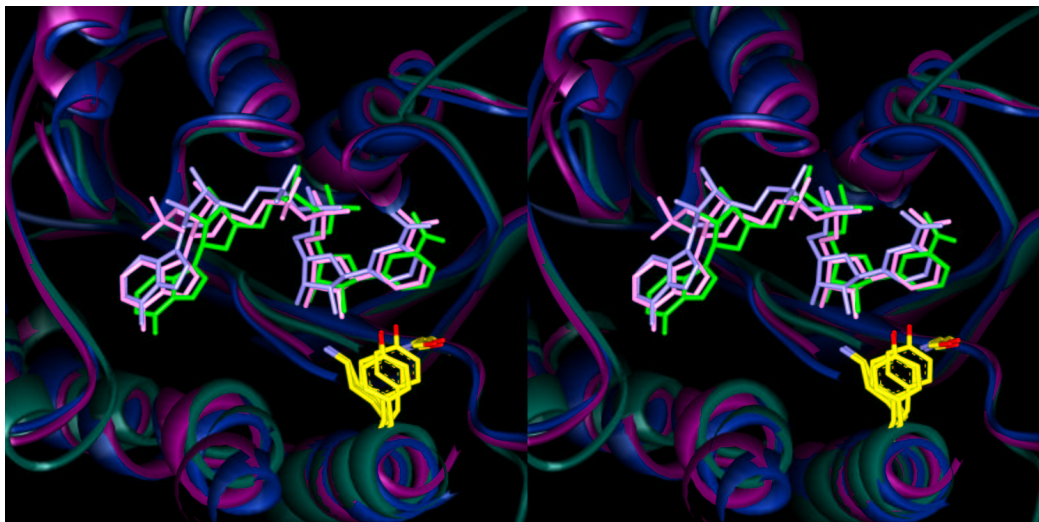


Abbildung 35: Stereodarstellung der Überlagerung dreier Strukturen der SDR-Familie mit gebundenem Nucleotidkofaktor. Der 3 α -HSDH (grün) ist die Struktur der 7 α -HSDH aus *E. coli* im Komplex mit NADH (blau) und die Struktur der Tropinonreduktase II im Komplex mit NADP⁺ (violett) überlagert. Neben den Sekundärstrukturelementen sind die Reste der katalytischen Triade und die Nucleotidkofaktoren dargestellt.

2.3.4 Substratbindeschleife

In den Strukturen einiger Mitglieder der SDR-Familie ist die sogenannte Substratbindeschleife (bestehend aus den Aminosäureresten 188 bis 213 in der Nomenklatur der 3 α -HSDH) ohne die Anwesenheit eines gebundenen Kofaktors oder Substrates nahezu völlig ungeordnet. Nach der Bindung des Dinukleotidkofaktors können die Randbereiche der Schleife stabilisiert werden und erst nach der Bindung des Hydroxyl- bzw. Carbonylsubstrates nimmt die Substratbindeschleife eine definierte, in der Regel überwiegend helikale, Konformation an. Die Substratspezifität der verschiedenen Mitglieder der SDR-Familie wird offenbar in einem hohen Maß von dieser Schleife bestimmt (Abb. 36). In vielen Fällen wird die Flexibilität und Anpassungsfähigkeit der Substratbindeschleife für das breite Spektrum möglicher Substrate, das üblicherweise bei Enzymen der SDR-Familie beobachtet wird, verantwortlich gemacht. Wie mit diesem Vorwissen zu erwarten war, ist in der Struktur der Apo-3 α -HSDH keine oder nur schlecht definierte Elektronendichte für den Hauptteil der Substratbindeschleife feststellbar. Eine Ausnahme bilden die fünf Aminosäurereste 209 bis 213, die in der Elektronendichte erkennbar definiert sind. In der Kristallstruktur der mit NAD⁺ komplexierten 3 α -HSDH werden darüber hinaus in zumindest

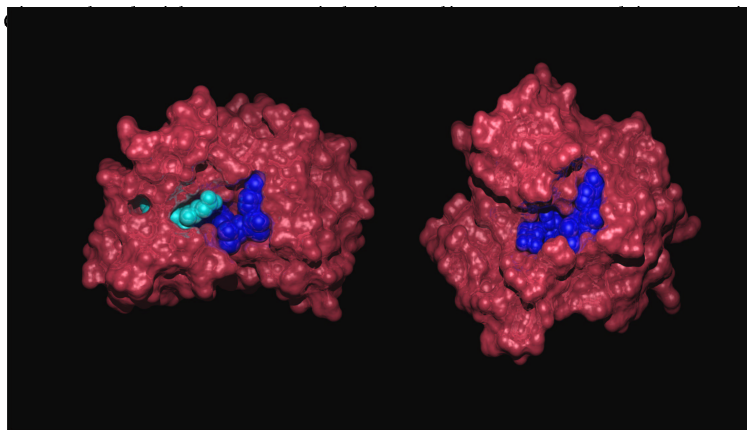


Abbildung 36: Die Rolle der Substratbindeschleife. Links die Oberflächendarstellung eines Monomers der Komplexstruktur (PDB-Zugriffscod 1FMC) der 7 α -HSDH aus *E. coli* mit NADH (dunkelblau) und dem Steroidsubstrat 7-Oxo-Glykochenodesoxycholsäure (hellblau), rechts ein Monomer des binären Komplexes der 3 α -HSDH mit NAD⁺. Gut zu erkennen ist, wie die Substratbindeschleife im ternären Komplex das Steroidsubstrat umschließt und vom Lösemittel abschirmt. Ein großer Teil der Substratspezifität des Enzyms kann offensichtlich der Substratbindeschleife zugeschrieben werden. Die Substratbindeschleife des binären Komplexes ist dagegen frei zugänglich, da sich die Substratbindeschleife in einem flexiblen Zustand befindet. Sie ist aus diesem Grunde kristallographisch nicht sichtbar.

Abbildung 36 zeigt die Elektronendichte für den Hauptteil der Substratbindeschleife in der Apo-Form sehr subtil ist und nicht zwingend der Bindung des Kofaktors zugeschrieben werden kann.

Um einen Einblick in die Mechanismen der Substraterkennung und damit auch in die Art und Weise, wie die Substratspezifität der 3 α -HSDH erreicht wird, zu erlangen, wurden ausgedehnte Versuche unternommen, Kristalle eines ternären Komplexes zu erhalten. Dazu wurden zum einen frisch gezogene Kristalle des 3 α -HSDH•NAD⁺-Komplexes mit verschiedenen Steroidsubstraten „gesoakt“, zum anderen wurden auch ausgedehnte „Screenings“ zur Kokristallisation in Anwesenheit dieser Verbindungen unternommen. Diese Bemühungen führten jedoch nicht zum gewünschten Erfolg der Kristallisation eines ternären Komplexes. Eine genaue Betrachtung der hier beschriebenen Kristallstruktur der 3 α -HSDH zeigt deutlich, dass eine vollständig geordnete Substratbindeschleife nach dem Muster anderer SDR-Strukturen nicht mit der vorhandenen Kristallpackung verträglich ist. Erfolgreiche Soakingexperimente sind somit kaum zu erwarten, eine erfolgreiche Kokristallisation des ternären Komplexes müsste zu einer neuen Kristallpackung führen. Eine solche konnte jedoch bislang nicht beobachtet werden.

2.4 Diskussion und Ausblick

Die bemerkenswerteste Eigenschaft der hier vorgestellten Struktur der 3 α -HSDH ist sicherlich die ausgedehnte Insertion zwischen Strang β E und Helix α F innerhalb des Rossmann-Faltungsmotivs, die eine Oligomerisierung über die zur Q-Achse gehörende Kontaktfläche verhindert. Eben dieses Oligomerisierungsmuster war bislang das für dimere Mitglieder der SDR-Familie einzig bekannte. Da keine Reste dieser Insertion

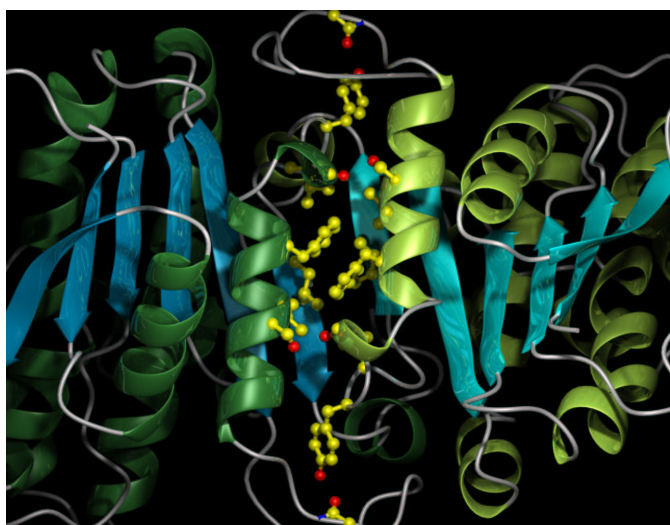


Abbildung 37: Ansicht des Dimerisierungskontaktes der 3 α -HSDH. α -Helices sind grün, β -Stränge sind blau eingefärbt, die linke Untereinheit ist dunkler dargestellt als die rechte. Im Bereich des Kontaktes befinden sich Helix α G und Strang β G beider Untereinheiten. Dargestellt sind die Reste Phe²²⁸, die eine planare aromatische Stapelung ausbilden; Tyr²³⁶, deren Hydroxylgruppen Wasserstoffbrücken zum Proteinrückgrad formen (Carbonylfunktion von Arg²¹⁵, sichtbar jeweils am oberen und unteren Bildrand) und Ser²²⁴, die Wasserstoffbrücken zu den Carbonylfunktionen von Ala²³³ ausbilden.

in direktem Kontakt mit dem aktiven Zentrum oder der mutmaßlichen Substratbindestelle des Enzyms stehen, wirft sich zwangsläufig die Frage auf, welche Funktion dieser zusätzlichen Proteinregion zugeschrieben werden kann. Die Spekulation liegt nahe, dass das höchstwahrscheinlich infolge der Insertion vorliegende und bislang innerhalb der SDR-Familie neuartige Oligomerisierungsmuster mit einem kooperativen Effekt zwischen den Untereinheiten in Zusammenhang steht. Bislang sind als Beleg für einen derartigen kooperativen Effekt zwischen Untereinheiten von Mitgliedern der SDR-Familie lediglich für zwei kurzkettige *cis*-Retinol/3 α -Hydroxysterol-Dehydrogenase-Isoenzyme kinetische Daten verfügbar, die in beiden Fällen in Abhängigkeit vom Substrat eine sigmoidale Michaelis-Menten-Kinetik aufweisen (Chai, Zhai et al. 1997; Su, Chai et al. 1998). Es muss hier jedoch angemerkt werden, dass die für diese Isoenzyme gesammelten kinetischen Daten nicht auf der Grundlage gereinigter Enzyme, sondern auf der von Gesamtzellextrakten beruhen, so dass diese Ergebnisse mit einer gewissen Vorsicht gehandhabt werden sollten. Eine mögliche Kooperativität zwischen Untereinheiten eines SDR-Enzyms im Hinblick auf die Kristallstruktur wurde für die homotetramere 3 α ,20 β -HSDH aus *Streptomyces*

tion in direktem Kontakt mit dem aktiven Zentrum oder der mutmaßlichen Substratbindestelle des Enzyms stehen, wirft sich zwangsläufig die Frage auf, welche Funktion dieser zusätzlichen Proteinregion zugeschrieben werden kann. Die Spekulation liegt nahe, dass das höchstwahrscheinlich infolge der Insertion vorliegende und bislang innerhalb der SDR-Familie neuartige Oligomerisierungsmuster mit

hydrogenans (Ghosh, Wawrzak et al. 1994; Ghosh, Erman et al. 1994) diskutiert. Bei diesem Mitglied der SDR-Familie sind in der Umgebung der Substratbindetasche Aminosäurereste aus den drei jeweils anderen Untereinheiten auszumachen. Als Vermittler für einen möglichen kooperativen Effekt wurde hier Helix α F vorgeschlagen, die sowohl das katalytische Lysin und Tyrosin beherbergt als auch zur Ausbildung der Substratbindetasche der über die Q-Achse verwandten Untereinheit beiträgt. Demgegenüber existieren in der 3 α -HSDH keine durch eine Q-Achse symmetrieverwandten Untereinheiten. Kein Rest einer Untereinheit liegt dem aktiven Zentrum der jeweils anderen Untereinheit nahe genug, um an der Ausbildung der Substratbindetasche beteiligt zu sein, wenn man postuliert, dass die Substratbindestelle der 3 α -HSDH räumlich in Analogie zu anderen Enzymen der SDR-Familie steht. Ein möglicher kooperativer Effekt der 3 α -HSDH könnte über die Substratbindeschleife vermittelt werden, deren carboxyterminale Reste 209 bis 213 in der vorliegenden Struktur Kontakte im carboxyterminalen Bereich von Helix α F und Helix α G ausbilden. Eine Übertragung von Information über gebundenes Substrat von einer zur anderen Untereinheit mittels Konformationsänderungen wäre somit zwanglos möglich. Es darf hier allerdings nicht verschwiegen werden, dass die in der vorliegenden Struktur beobachtete Konformation der Reste 209 bis 213 höchstwahrscheinlich durch die Eigenheiten der Kristallpackung bestimmt wird und nicht oder nur sehr bedingt die Gegebenheiten in Lösung widerspiegelt.

Umfassende und sorgfältig erhobene kinetische Daten müssen erarbeitet werden, um die bestehende Möglichkeit eines kooperativen Effektes zwischen den beiden Untereinheiten der 3 α -HSDH näher zu beleuchten. Darüber hinaus wäre eine mutierte Form des 3 α -HSDH-Enzyms, in dem die Insertion zwischen Strang β E und Helix α F deletiert ist, ein wertvolles Mittel, um den Einfluss dieser Insertion auf die Ausbildung der Quartärstruktur, die Substraterkennung und einen möglichen kooperativen Effekt schlüssig zu belegen. Kristalle einer derartigen Mutante böten aufgrund der anzunehmenden neuen Kristallform des weiteren eine erneute Chance, die Kristallstruktur eines ternären Komplexes aufzuklären.

3. Zusammenfassung

Diese Arbeit stellt zwei neue Kristallstrukturen Nuklotidkofaktor-bindender Proteine vor. Die S-Adenosylmethionin:tRNA-Ribosyltransferase/Isomerase (QueA) überträgt in einer ungewöhnlichen Enzymreaktion den Ribosylrest aus S-Adenosylmethionin auf ein prämodifiziertes, die Base preQ₁ enthaltendes tRNA-Substrat, und bildet dort die modifizierte Base Queuin, kurz Q-Base genannt. Wie in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte, ist eine intakte Q-Biosynthese essentiell für die Virulenz des Ruhrerregers *Shigella*. Da Eukaryonten kein QueA-Enzym besitzen, erscheint dieses als ideales Target für ein rationales Wirkstoffdesign. Hier wird die grundlegende Voraussetzung dafür – ein räumliches Modell des Enzyms – vorgestellt. Die Kristallstruktur des QueA-Enzyms wurde mit der Methode der anomalen Dispersion bei multiplen Wellenlängen (MAD) gelöst. Das Strukturmodell präsentiert sich als langgestrecktes Protein, das aus zwei voneinander deutlich abgesetzten Domänen aufgebaut ist. Die kleinere der beiden Domänen zeigt ein sechssträngiges β -Fass-Faltungsmotiv, wie es beispielsweise aus der humanen Rhinovirus 3C-Protease und aus trypsinartigen pankreatischen Serinproteasen bekannt ist. Dieses Faltungsmotiv ist um einen kurzen siebten β -Strang ergänzt. Die zweite, größere Domäne zeigt ein vollständig neuartiges Faltungsmuster, das im wesentlichen aus zwei zentralen Faltblättern besteht, die auf beiden Seiten von insgesamt sechs Helices umgeben sind. Aufgrund der dipolartigen elektrostatischen Potentialverteilung um das Molekül, einer Anhäufung basischer Reste auf der kleinen Domäne und einer Anhäufung konservierter Reste auf der großen Domäne lässt sich die ungefähre Lage der RNA-Bindestelle und des aktiven Zentrums des Enzyms vorhersagen. Die beobachteten Schwierigkeiten bei der Kristallisation und Strukturlösung des QueA-Enzyms sind möglicherweise eine Folge strukturelle Flexibilität, die sich auch in den extremen B-Faktoren der gemessenen kristallographischen Datensätze widerspiegeln könnte. Unter diesem Gesichtspunkt fällt auch der ausgeprägt hohe Anteil von Schleifenregionen am Strukturmodell auf

Die 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase aus *Comamonas testosteroni* (3 α -HSDH) ist ein Mitglied der Familie kurzkettiger Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR) und vermittelt die Oxidation einer Hydroxylgruppe bzw. Reduktion einer Carbonylfunktion an Position 3 des Steroidgrundgerüsts bei unterschiedlichsten C₁₉₋₂₇-Steroiden. Darüber hinaus werden auch verschiedene xenobiotische Substanzen

als Substrat akzeptiert. Die Kristallstruktur des Enzyms wurde mit der Methode des molekularen Ersatzes gelöst und zeigt ein Homodimer pro asymmetrischer Einheit, dessen Untereinheiten jeweils ein typisches Rossmann-Faltungsmotiv aufweisen. Dies entspricht auch der Situation unter physiologischen Bedingungen. Die Dimerisierung findet über eine Kontaktfläche statt, die im wesentlichen durch Helix αG und Strang βG jeder Untereinheit gebildet wird. Bislang wurde diese Art des intermolekularen Kontaktes ausschließlich bei homotetrameren Mitgliedern der SDR-Familie festgestellt. Die Ausbildung eines Tetramers ist in der vorliegenden Struktur jedoch durch die Anwesenheit einer vorwiegend α -helikalen Subdomäne blockiert, die allen anderen bekannten Mitgliedern der SDR-Familie fehlt.

Die Struktur eines binären Enzymkomplexes mit NAD^+ konnte ebenfalls gelöst werden. Das aktive Zentrum zusammen mit dem Nukleotidkofaktor lässt sich dabei gut mit dem anderer Komplexstrukturen aus der SDR-Familie überlagern.

4 Abkürzungsverzeichnis

3α,20β-HSDH	3 α ,20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase aus <i>Streptomyces hydrogenans</i>
3α-HSDH	3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase aus <i>Comamonas testosteroni</i>
7α-HSDH	7 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase aus <i>Escherichia coli</i>
A	Adenin
ADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Drosophila</i>
ATP	Adenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
FOM	Phasengütefaktor(en), engl. <i>figure of merit</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethylsulfonsäure)
IPTG	Isopropyl-1-Thio- β -D-Galactosid
MAD	Methode der anomalen Dispersion bei multiplen Wellenlängen, engl. <i>multiple wavelength anomalous dispersion</i>
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NAD⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid im oxidierten Zustand
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid im reduzierten Zustand
NADP⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat im oxidierten Zustand
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat im reduzierten Zustand
NCS	Nichtkristallographische Symmetrie
OD₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
oQ	Epoxy-Queuin
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol (ein nachfolgender Zahlenwert bezeichnet das mittlere Molekulargewicht)
PEGMME	Polyethylenglykol-Monomethylether (ein nachfolgender Zahlenwert bezeichnet das mittlere Molekulargewicht)
PhP	Phasierungskraft, engl. <i>phasing power</i>
PreQ₁	7-Aminomethyl-7-Deazaguanin
Q	7-(4,5-cis-Dihydroxy-1-Zyklopenten-3-yl)-Aminomethyl)-7-Deazaguanin (Queuin)

RNA	Ribonukleinsäure
SAM	S-Adenosylmethionin
SDR	Kurzkettige Dehydrogenase(n)/Reduktase(n), engl. <i>short chain dehydrogenase(s)/reductase(s)</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
w/v	Gewicht pro Volumen
v/v	Volumen pro Volumen

5 Bildnachweis

Abb. 1 ist der Internetseite <http://www.pbrc.hawaii.edu/kunkel/gallery/bacteria> entnommen

Abb. 2 ist dem Werk von P. J. Sansonetti *Molecular and Cellular Biology of Shigella flexneri Invasiveness: From Cell Assay Systems to Shigellosis*, erschienen 1992 im Springer-Verlag, Berlin, entnommen.

Abb. 25 ist dem Buch von C. Branden und J. Tooze *Introduction to Protein Structure*, erschienen bei Garland Publishing, Inc., New York entnommen

6 Literatur

- Aberg, A., Yaremchuk, A., Tukalo, M., Rasmussen, B. & Cusack, S. (1997). Crystal structure analysis of the activation of histidine by *Thermus thermophilus* histidyl-tRNA synthetase *Biochemistry* **36**(11): 3084-94.
- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H. & Kurland, C. G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**(6707): 133-40.
- Antosiewicz, J., Briggs, J. M. & McCammon, J. A. (1996). Orientational steering in enzyme-substrate association: ionic strength dependence of hydrodynamic torque effects. *Eur Biophys J* **24**(3): 137-41.
- Antosiewicz, J. & McCammon, J. A. (1995). Electrostatic and hydrodynamic orientational steering effects in enzyme- substrate association. *Biophys J* **69**(1): 57-65.
- Auerbach, G., Herrmann, A., Gutlich, M., Fischer, M., Jacob, U., Bacher, A., and Huber, R. (1997). The 1.25 Å crystal structure of sepiapterin reductase reveals its binding mode to pterins and brain neurotransmitters. *EMBO J* **16**: 7219-7230.
- Baranowski, W., Dirheimer, G., Jakowicki, J. A. & Keith, G. (1994). Deficiency of queuine, a highly modified purine base, in transfer RNAs from primary and metastatic ovarian malignant tumors in women. *Cancer Res* **54**(16): 4468-71.
- Benach, J., Atrian, S., González-Duarte, R., and Ladenstein, R. (1999). The catalytic reaction and inhibition mechanism of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: observation of an enzyme-bound NAD-ketone adduct at 1.4 Å resolution by X-ray crystallography of alcohol dehydrogenase allozymes ADH, ADH and ADHUF, and distantly related forms. *J Mol Biol* **289**(2): 335-355.
- Berglund, H., Rak, A., Serganov, A., Garber, M. & Hard, T. (1997). Solution structure of the ribosomal RNA binding protein S15 from *Thermus thermophilus*. *Nat Struct Biol* **4**(1): 20-3.
- Birktoft, J. J. & Blow, D. M. (1972). Structure of crystalline -chymotrypsin. V. The atomic structure of tosyl- -chymotrypsin at 2 Å resolution. *J Mol Biol* **68**(2): 187-240.
- Brandis, H. & Pulverer, G. (1988). Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag.
- Briercheck, D. M., Wood, T. C., Allison, T. J., Richardson, J. P. & Rule, G. S. (1998). The NMR structure of the RNA binding domain of *E. coli* rho factor suggests possible RNA-protein interactions. *Nat Struct Biol* **5**(5): 393-9.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D* **54**(Pt 5): 905-921.
- Carlson, B. A., Kwon, S. Y., Chamorro, M., Oroszlan, S. Hatfield, D. L. & Lee, B. J. (1999). Transfer RNA modification status influences retroviral ribosomal frameshifting. *Virology* **255**(1): 2-8.
- CCP4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* **50**: 760-763.
- Chai, X., Zhai, Y. & Napoli, J. L. (1997). cDNA cloning and characterization of a cis-retinol/3alpha-hydroxysterol short-chain dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**(52): 33125-33131.

- Choi, H. K., Tong, L., Minor, W., Dumas, P., Boege, U. Rossmann, M. G. & Wengler, G.. (1991). Structure of Sindbis virus core protein reveals a chymotrypsin-like serine proteinase and the organization of the virion. *Nature* **354**(6348): 37-43.
- Clerk, P. & Sansonetti, P. J. (1987). Entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells: evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization and myosin accumulation. *Infect. Immun.* **55**: 2681-2688.
- Cudd, A. & Fridovich, I. (1982). Electrostatic interactions in the reaction mechanism of bovine erythrocyte superoxide dismutase. *J Biol Chem* **257**(19): 11443-7.
- Cudney, R., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y., & McPherson, A (1994). *Acta Crystallogr. D* **50**: 414-423.
- De La Fortelle, E. & Bricogne, G. (1997). Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement in the MIR and MAD methods. *Methods Enzymol.* **276**: 472-494.
- Desideri, A., Falconi, M., Polticelli, F., Bolognesi, M., Djinovic, K. & Rotilio, G. (1992). Evolutionary conservativeness of electric field in the Cu,Zn superoxide dismutase active site. Evidence for co-ordinated mutation of charged amino acid residues. *J Mol Biol* **223**(1): 337-42.
- Desogus, G., Todone, F., Brick, P. & Onesti, S. (2000). Active site of lysyl-tRNA synthetase: structural studies of the adenylation reaction. *Biochemistry* **39**(29): 8418-25.
- Durand, J. M., Okada, N., Tobe, T., Watarai, M., Fukuda, I. Suzuki, T., Nakata, N., Komatsu, K., Yoshikawa, M. & Sasakawa, C. (1994). *vacC*, a virulence-associated chromosomal locus of *Shigella flexneri*, is homologous to *tgt*, a gene encoding tRNA-guanine transglycosylase (Tgt) of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **176**(15): 4627-34.
- Emmerich, B., Zubrod, E., Weber, H. Maubach, P. A. Kersten, H. & Kersten, W. (1985). Relationship of queuine-lacking transfer RNA to the grade of malignancy in human leukemias and lymphomas. *Cancer Res* **45**(9): 4308-14.
- Fava, A. (1985). *Organic Sulfur Chemistry: Theoretical and Experimental Advances*. Bernardi, F. Csizmadia & I. G. Mangini, A. (Hrsg.). Amsterdam, Elsevier.
- Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M. Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K. A., Dodson, R. Hickey, E. K., Gwinn, M. Dougherty, B., Tomb, J. F. Fleischmann, R. D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A. R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M., Gocayne, J., Venter, J. C. et al. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**(6660): 580-6.
- Frey, B., McCloskey, J., Kersten, W. & Kersten, H. (1988). New function of vitamin B12: co-bamide-dependent reduction of epoxyqueuosine to queuosine in tRNAs of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **170**(5): 2078-82.
- Fujinaga, M., Delbaere, L. T., Brayer, G. D. & James, M. N. (1985). Refined structure of alpha-lytic protease at 1.7 Å resolution. Analysis of hydrogen bonding and solvent structure. *J Mol Biol* **184**(3): 479-502.
- Getzoff, E. D., Tainer, J. A., Weiner, P. K. Kollman, P. A. Richardson, J. S. & Richardson, D. C.. (1983). Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* **306**(5940): 287-90.
- Ghosh, D., Erman, M Wawrzak, Z. Duax, W. L. & Pangborn, W.. (1994). Mechanism of inhibition of 3 alpha, 20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase by a licorice-derived steroidal inhibitor. *Structure* **2**(10): 973-980.
- Ghosh, D., Wawrzak, Z., Weeks, C. M. Duax, W. L. & Erman, M. (1994). The refined three-dimensional structure of 3 alpha,20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and possible roles of the residues conserved in short-chain dehydrogenases. *Structure* **2**(7): 629-640.

- Guss, J. M., Merritt, E. A., Phizackerley, R. P., Hedman, B., Murata, M., Hodgson, K. O. & Freeman, H. C. (1988). Phase determination by multiple-wavelength x-ray diffraction: crystal structure of a basic "blue" copper protein from cucumbers. *Science* **241**(4867): 806-11.
- Hatfield, D., Feng, Y. X., Lee, B. J., Rein, A., Levin, J. G. & Oroszlan, S. (1989). Chromatographic analysis of the aminoacyl-tRNAs which are required for translation of codons at and around the ribosomal frameshift sites of HIV, HTLV-1, and BLV. *Virology* **173**(2): 736-42.
- Hendrickson, W. A., Horton, J. R. & LeMaster, D. M. (1990). Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J.* **9**(5): 1665-1672.
- Hendrickson, W. A., Smith, J. L., Phizackerley, R. P. & Merritt, E. A. (1988). Crystallographic structure analysis of lamprey hemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation. *Proteins* **4**(2): 77-88.
- Holm, L. & Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* **233**(1): 123-138.
- Huang, B. S., Wu, R. T. & Chien, K. Y. (1992). Relationship of the queuine content of transfer ribonucleic acids to histopathological grading and survival in human lung cancer. *Cancer Res* **52**(17): 4696-700.
- Jacks, T., Madhani, H. D., Masiarz, F. R., Varmus & H. E. (1988). Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell* **55**(3): 447-58.
- Jones, T. A. & Kjeldgaard, M. (1997). Electron-density map interpretation. *Methods Enzymol.* **277**: 173-208.
- Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**(18): 6003-13.
- Kadurugamuwa, J. L., Rhode, M., Wehland J. & Timmis, K.N. (1991). Intercellular spread of *Shigella flexneri* through a monolayer mediated by membranous protrusions and associated with reorganisation of the cytoskeletal protein vinculin. *Infect. Immun.* **59**: 3463-3471.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. & Tabata, S. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). *DNA Res* **3**(3): 185-209.
- Katz, S. L. (1986). The burden of disease resulting from diarrhea. *In* New vaccine development: establishing priorities, National Academy Press, Washington, D.C.
- Kersten, H. & Kesten, W. (1990). *Chromatography and Modification of Nucleosides Part B*, Gehrke, Ch. W. & Kuo, K. C. T. (Hrsg.), Elsevier.
- Khan, W. A., Seas, C., Dhar, U., Salam, M. A. & Bennis, M. L. (1997). Treatment of Shigellosis: V. Comparison of azithromycin and ciprofloxacin. A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* **126**(9): 697-703.
- Kinzie, S. D., Them, B. & Iwata-Reuyl, D. (2000). Mechanistic studies of the tRNA-modifying enzyme QueA: a chemical imperative for the use of AdoMet as a "ribosyl" donor. *Org Lett* **2**(9): 1307-10.
- Klapper, I., Hagstrom, R., Fine, R., Sharp, K. & Honig, B. (1986). Focusing of electric fields in the active site of Cu-Zn superoxide dismutase: effects of ionic strength and amino-acid modification. *Proteins* **1**(1): 47-59.

- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1994). *Halloween ... masks and bones. From First Map to Final Model*. S. Bailey, Hubbard, R. & Waller, D. Daresbury Laboratory, Warrington, UK., SERC: 59-66.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1998). Databases in protein crystallography. *Acta Cryst* **D54**: 1119-1131.
- Krook, M., Ghosh, D., Duax, W. & Jornvall, H. (1993). Three-dimensional model of NAD(+)-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase and relationships to the NADP(+)-dependent enzyme (carbonyl reductase). *FEBS Lett* **322**(2): 139-42.
- LaBrec, E. H., Schneider, H., Magnani, T.J. & Formal, S. B. (1964). Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. *J. Bacteriol* **88**: 1503-1518.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**: 283-291.
- Leong, L. E., Walker, P. A. & Porter, A. G. (1993). Human rhinovirus-14 protease 3C (3Cpro) binds specifically to the 5'-noncoding region of the viral RNA. Evidence that 3Cpro has different domains for the RNA binding and proteolytic activities. *J. Biol. Chem.* **268**(34): 25735-9.
- Marks, T. & Farkas, W. R. (1997). Effects of a diet deficient in tyrosine and queuine on germfree mice. *Biochem Biophys Res Commun* **230**(2): 233-7.
- Maser, E., Möbus, E. & Xiong, G. (2000). Functional expression, purification, and characterization of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**(2): 622-628.
- Matthews, D. A., Smith, W. W., Ferre, R. A., Condon, B., Budahazi, G., Sisson, W., Villafranca, J. E., Janson, C. A., McElroy, H. E., Gribskov, C. L., et al., (1994). Structure of human rhinovirus 3C protease reveals a trypsin-like polypeptide fold, RNA-binding site, and means for cleaving precursor polyprotein. *Cell* **77**(5): 761-71.
- May, A. C. & Johnson, M. S. (1994). Protein structure comparisons using a combination of a genetic algorithm, dynamic programming and least-squares minimization. *Protein Eng* **7**(4): 475-85.
- May, A. C. & Johnson, M. S. (1995). Improved genetic algorithm-based protein structure comparisons: pairwise and multiple superpositions. *Protein Eng* **8**(9): 873-82.
- McGuffin, L. J., Bryson, K. & Jones, D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**(4): 404-5.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Möbus, E., Jahn, M., Schmid, R., Jahn, D. & Maser, E. (1997). Testosterone-regulated expression of enzymes involved in steroid and aromatic hydrocarbon catabolism in *Comamonas testosteroni*. *J. Bacteriol.* **179**(18): 5951-5955.
- Möbus, E. & Maser, E. (1998). Molecular cloning, overexpression, and characterization of steroid-inducible 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. A novel member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J. Biol. Chem.* **273**(47): 30888-30896.
- Mounier, J., Vasselon, T., Hellio, R., Lesourd, M. & Sansonetti, P.J. (1992). *Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 cells through their basolateral pole. *Infect. Immun.* **60**: 237-248.
- Mueller, S. O. & Slany, R. K. (1995). Structural analysis of the interaction of the tRNA modifying enzymes Tgt and QueA with a substrate tRNA. *FEBS Lett* **361**(2-3): 259-64.

- Murthy, H. M., Hendrickson, W. A., Orme-Johnson, W. H., Merritt, E. A. & Phizackerley, R. P. (1988). Crystal structure of *Clostridium aci-di-urici* ferredoxin at 5 Å - resolution based on measurements of anomalous X-ray scattering at multiple wavelengths. *J Biol Chem* **263**(34): 18430-6.
- Nakajima, K., Yamashita, A., Akama, H., Nakatsu, T., Kato, H., Hashimoto, T., Oda, J. & Yamada, Y. (1998). Crystal structures of two tropinone reductases: different reaction stereospecificities in the same protein fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**(9): 4876-4881.
- Nakanishi, M., Matsuura, K., Kaibe, H., Tanaka, N., Nonaka, T., Mitsui, Y. & Hara, A. (1997). Switch of coenzyme specificity of mouse lung carbonyl reductase by substitution of threonine 38 with aspartic acid. *J. Biol. Chem.* **272**(4): 2218-2222.
- Navaza, J. (1994). *Acta Crystallogr. A* **50**: 157-163.
- Okada, N. & Nishimura, S. (1979). Isolation and characterization of a guanine insertion enzyme, a specific tRNA transglycosylase, from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **254**(8): 3061-6.
- Okada, N., Shindo-Okada, N., Sato, S., Itoh, Y. H., Oda, K. & Nishimura, S. (1978). Detection of unique tRNA species in tumor tissues by *Escherichia coli* guanine insertion enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(9): 4247-51.
- Oppermann, U. C., Belai, I. & Maser, E. (1996). Antibiotic resistance and enhanced insecticide catabolism as consequences of steroid induction in the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **58**(2): 217-223.
- Oppermann, U. C. & Maser, E. (1996). Characterization of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *Eur. J. Biochem.* **241**(3): 744-749.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**: 307-326.
- Owenby, R. K., Stulberg, M. P. & Jacobson, K. B. (1979). Alteration of the Q family of transfer RNAs in adult *Drosophila melanogaster* as a function of age, nutrition, and genotype. *Mech Ageing Dev* **11**(2): 91-103.
- Powell, H. R. (1999). *Acta Crystallogr. D* **55**: 1690-1695.
- Radic, Z., Kirchoff, P. D., Quinn, D. M., McCammon, J. A. & Taylor, P. (1997). Electrostatic influence on the kinetics of ligand binding to acetylcholinesterase. Distinctions between active center ligands and fasciculin. *J Biol Chem* **272**(37): 23265-77.
- Reuter, K. & Ficner, R. (1995). Sequence analysis and overexpression of the *Zymomonas mobilis* tgt gene encoding tRNA-guanine transglycosylase: purification and biochemical characterization of the enzyme. *J Bacteriol* **177**(18): 5284-8.
- Reuter, K., Slany, R., Ullrich, F. & Kersten, H. (1991). Structure and organization of *Escherichia coli* genes involved in biosynthesis of the deazaguanine derivative queuine, a nutrient factor for eukaryotes. *J Bacteriol* **173**(7): 2256-64.
- Robert-Koch-Institut (2000). Wichtige Infektionskrankheiten in Deutschland. Jahresbericht 1999, Teil 3: Importierte Infektionskrankheiten. *Epid. Bull.* **29**.
- Roll-Mecak, A., Cao, C., Dever, T. E. & Burley, S. K. (2000). X-Ray structures of the universal translation initiation factor IF2/eIF5B: conformational changes on GDP and GTP binding. *Cell* **103**(5): 781-92.
- Romier, C. (1997). *Structure determination by MIRAS and biochemical study of the catalytic mechanism of tRNA-guanine transglycosylase (TGT), a tRNA-modifying enzyme.* Dissertation.
- Romier, C., Reuter, K., Suck, D. & Ficner, R. (1996). Crystal structure of tRNA-guanine transglycosylase: RNA modification by base exchange. *Embo J* **15**(11): 2850-7.
- Rossmann, M. G. (1990). The molecular replacement method. *Acta Crystallogr A* **46**(Pt 2): 73-82.

- Rossmann, M. G. & Blow, D. M. (1962). *Acta Crystallogr. D* **15**: 24-31.
- Rossmann, M. G., Liljas, A., Bränden, C.-I. & Banaszak, L.J. (1975). *Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases*. The Enzymes. P. D. Boyer. New York, Academic Press: 61-102.
- Sansonetti, P. J. (1992). *Molecular and Cellular Biology of Shigella flexneri Invasiveness: From Cell Assay Systems to Shigellosis*. Berlin, Springer-Verlag.
- Sansonetti, P. J., Kopecko, D. J. & Formal, S.B. (1982). Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **35**: 852-860.
- Sansonetti, P. J., Ryter, A., Clerc, P., Maurelli, A.T. & Mounier, J. (1986). Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect. Immun.* **51**: 461-469.
- Shirakihara, Y., Leslie, A. G., Abrahams, J. P., Walker, J. E., Ueda, T., Sekimoto, Y., Kambara, M., Saika, K., Kagawa, Y., Yoshida, M. (1997). The crystal structure of the nucleotide-free alpha 3 beta 3 subcomplex of F1-ATPase from the thermophilic Bacillus PS3 is a symmetric trimer. *Structure* **5**(6): 825-36.
- Slany, R. K., Bosl, M., Crain, P. F. & Kersten, H. (1993). A new function of S-adenosylmethionine: the ribosyl moiety of AdoMet is the precursor of the cyclopentenediol moiety of the tRNA wobble base queuine. *Biochemistry* **32**(30): 7811-7.
- Slany, R. K. & Kersten, H. (1994). Genes, enzymes and coenzymes of queuosine biosynthesis in procaryotes. *Biochimie* **76**(12): 1178-82.
- Smith, D. B. & Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**(1): 31-40.
- Somers, W. S., Stahl, M. L. & 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**(12): 1601-1612.
- Su, J., Chai, X., Kahn, B. & Napoli, J. L. (1998). cDNA cloning, tissue distribution, and substrate characteristics of a cis-Retinol/3alpha-hydroxysterol short-chain dehydrogenase isozyme. *J. Biol. Chem.* **273**(28): 17910-17916.
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. & Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253**(5022): 872-9.
- Talalay, P., Dobson, M. M. & Tapley, D.F. (1952). *Nature* **170**: 620-621.
- Tan, R. C., Truong, T. N., McCammon, J. A. & Sussman, J. L. (1993). Acetylcholinesterase: electrostatic steering increases the rate of ligand binding. *Biochemistry* **32**(2): 401-3.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Nakanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A. & 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**(1): 33-45.
- Terwilliger, T. C. & Berendzen, J. (1999). Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr. D* **55**(Pt 4): 849-861.
- Varughese, K. I., Skinner, M. M., Whiteley, J. M., Matthews, D. A. & Xuong, N. H. (1992). Crystal structure of rat liver dihydropteridine reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**(13): 6080-6084.
- Walker, P. A., Leong, L. E. & Porter, A. G. (1995). Sequence and structural determinants of the interaction between the 5'- noncoding region of picornavirus RNA and rhinovirus protease 3C. *J Biol Chem* **270**(24): 14510-6.
- Walsh, C. (1979). *Enzymatic Reaction Mechanisms*. New York, W. H. Freeman & Co.

- Willems, A., deVos, P. & deLey, J. (1992). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications*. A. Balows, Trueper, H. G. & Dworkin, M. (Hrsg.). Springer-Verlag, Berlin: 2583-2590.
- Winberg, J. O., Brendskag, M. K., Sylte, I., Lindstad, R. I. & McKinley-McKee, J. S. (1999). The catalytic triad in *Drosophila* alcohol dehydrogenase: pH, temperature and molecular modelling studies. *J. Mol. Biol.* **294**(2): 601-616.

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit ist in folgenden Zeitschriftenbeiträgen veröffentlicht worden:

- Grimm, C., Klebe, G., Ficner, R. & Reuter, K. (2000). Screening orthologs as an important variable in crystallization: preliminary X-ray diffraction studies of the tRNA-modifying enzyme S-adenosyl-methionine:tRNA ribosyl transferase/isomerase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**(Pt 4): 484-8.
- Grimm, C., Maser, E., Möbus, E., Klebe, G., Reuter, K. & Ficner, R. (2000). The crystal structure of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni* shows a novel oligomerization pattern within the short chain dehydrogenase/reductase family. *J Biol Chem* **275**(52): 41333-9.
- Maser, E., Xiong, G., Grimm, C., Ficner, R. & Reuter, K. (2001). 3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*: biological significance, three-dimensional structure and gene regulation. *Chem Biol Interact* **130-132**(1-3): 707-22.

Die Koordinaten der 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/Carbonylreduktase aus *Comamonas testosteroni* sind in der Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) unter den Zugriffs-codes 1 FJH (Apoprotein) und 1FK8 (binärer Komplex) hinterlegt.

Danksagung

Ich danke meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe für die interessante Themenstellung, bei deren Bearbeitung ich immer größte Freiheit genoss.

Herrn Dr. Klaus Reuter und Dr. Ralf Ficner möchte ich dafür danken, dass sie mir während der gesamten Arbeit mit Rat und Tat unermüdlich und freundschaftlich zur Seite standen.

Herrn Dr. Milton T. Stubbs danke ich für viele anregende Diskussionen und Unterstützung bei kristallographischen Problemen.

Herrn Prof. Dr. Edmund Maser danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit bei der Strukturaufklärung der 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

Herrn Dr. Thorsten Selmer vom MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg bin ich für die Durchführung der Massenspektroskopie am nativen und derivativen QueA-Protein zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Satoshi Tabata vom Kazusa DNA Research Institute in Japan, Frau Dr. Siv Andersson vom Institut für Molekularbiologie der Universität Uppsala, Herrn Dr. Stefan Zimmermann vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Marburg, Herrn Dr. Jochen Decker vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Regensburg, Herrn Dr. Robert Huber und Prof. Dr. Karl O. Stetter vom Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg und Herrn Prof. Dr. Mohamed Marahiel vom Institut für Biochemie der Universität Marburg danke ich für das großzügige Geschenk von (in der Reihenfolge der Namensnennung) Cosmid cs0165, DNA von λ -Phage F1339, chromosomaler DNA aus *H. pylori* and *H. influenzae*, chromosomaler DNA aus *A. aeolicus* und chromosomaler DNA aus *B. subtilis*.

Ich danke dem Personal der Synchrotronmessstationen ID13, ID14-4 und ID29 des ESRF in Grenoble, der Stationen BW7A und BW6 des DESY in Hamburg und 5.2 R des ELETTRA in Triest für die gute Betreuung der Messungen. Mein besonderer Dank geht hier an den technischen Bereitschaftsdienst des ESRF, dessen hoher Einsatzbereitschaft ich das geglückte Quecksilber-MAD-Experiment verdanke.

Schließlich danke ich den Arbeitskreisen Prof. Klebe, Prof. Lührmann und Dr. Ficner für das angenehme Arbeitsumfeld.