

**Struktur- und Funktionsanalyse
der Galaktitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* und
der Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase SoxS aus *Paracoccus
pantotrophus***

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Diplom-Biologin
Yvonne Carius

Homburg, Kiel

Februar 2009

Tag des Kolloquiums:

15. Mai 2009

Dekan:

Prof. Dr. Stefan Diebels

Berichterstatter:

Prof. Dr. Axel J. Scheidig

Prof. Dr. Manfred Schmitt

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Strukturbiologie an der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes sowie in der Abteilung Strukturbiologie/Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Yvonne Carius

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Publikation:

Carius, Y., Rother, D., Friedrich, C.G, Scheidig, A. J. (2009) The structure of the periplasmic thiol–disulfide oxidoreductase SoxS from *Paracoccus pantotrophus* indicates a triple Trx/Grx/DsbC functionality in chemotrophic sulfur oxidation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **65(Pt 3)**, 229-240.

Konferenz-Beiträge:

Carius Y., Kohring G.-W., Giffhorn F., Scheidig A. J. (2006) Crystal structure of Galactitol-Dehydrogenase. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Kristallographie, Freiburg 2006

Carius, Y., Rother, D., Friedrich, C.G, Scheidig, A. J. (2009) The structure of the periplasmic thiol–disulfide oxidoreductase SoxS from *Paracoccus pantotrophus* indicates a triple Trx/Grx/DsbC functionality in chemotrophic sulfur oxidation. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Kristallographie, Hannover 2009

Publikation in Vorbereitung:

Carius, Y., Christian, H., Faust, A., Kornberger, P., Kohring, G.-W., Giffhorn, F., Scheidig, A.J. Crystal structures of the galactitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* in complex with its cofactor and bound substrates.

Koordinaten und Strukturdaten wurden in der PDB-Proteindatenbank unter folgenden Einträgen hinterlegt:

3d4t: Crystal structure of the periplasmic thioredoxin SoxS from *Paracoccus pantotrophus* (oxidized form)

3dml: Crystal structure of the periplasmic thioredoxin SoxS from *Paracoccus pantotrophus* (reduced form)

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Struktur-Funktionsanalyse zweier bakterieller Redox-Enzyme.

Die Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH) aus *Rhodobacter sphaeroides* ist in der Lage, enantioselektiv sowohl ein breites Spektrum an Polyolen zu oxidieren als auch umgekehrt Ketone zu reduzieren. Die Struktur von GatDH konnte, in Komplex mit dem Kofaktor, geklärt werden. Um bessere Einsicht in die Substratbindung zu bekommen, wurden weitere Strukturen mit im aktiven Zentrum gebundenen Substraten gelöst. Der vorgeschlagene Reaktionsweg der GatDH entspricht der für die meisten SDR-Enzyme postulierten Katalyse. GatDH bildet im Kristall und in Lösung stabile Tetramere, was durch Lichtstreuungs-Experimente verifiziert werden konnte.

Die periplasmatische Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase SoxS ist für den Schwefel-oxidierenden (Sox) Phänotyp des chemotrophen Bakteriums *Paracoccus pantotrophus* wichtig. Die Struktur von SoxS konnte in der oxidierten als auch in der reduzierten Form aufgeklärt werden. SoxS zeigt eine hohe strukturelle Homologie zu typischen cytoplasmatischen bakteriellen Thioredoxinen. Dagegen besitzt SoxS im aktiven Zentrum ein Sequenzmotiv, welches nicht in anderen Thioredoxinen vorkommt, aber eng verwandt mit den Sequenzen einiger Glutaredoxinen und DsbC-/DsbG-Mitgliedern ist. SoxS kombiniert in Struktur, Substratspezifität und Reaktionsweise Eigenschaften von Thioredoxinen, Glutaredoxinen und von Mitgliedern der Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen der Dsb-Familie.

Abstract

Aim of this work was the structural and functional characterization of two bacterial redox-enzymes.

The galactitol-dehydrogenase (GatDH) of the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* is able to oxidize a wide spectrum of polyols as well as the reduction of ketones. The structure of GatDH in presence of its cofactor could be determined. To gain deeper insight in the specificity of substrate binding further structures with bound substrates were solved. The proposed reaction pathway of GatDH corresponds to the catalysis postulated for most SDR enzymes. GatDH forms in the crystal as well as in solution stable tetramers as verified by light scattering experiments.

The periplasmic thiol-disulfide oxidoreductase SoxS is beneficial for the sulphur oxidizing (Sox) phenotype of the chemotrophic bacterium *Paracoccus pantotrophus*. The structure of SoxS was solved in its oxidized and reduced form, respectively. SoxS reveals a high structural homology to typical cytoplasmic bacterial thioredoxins. By contrast, SoxS contains the active site motif Pro-Gly-Cys-Leu-Tyr-Cys, not present in other thioredoxins. Interestingly, the sequence of this motif is closely related to the sequence of some glutaredoxins and to the sequences of some members of the thiol-disulfide oxidoreductases DsbC and DsbG. SoxS combines features of thioredoxins, glutaredoxins and the thiol-disulfide oxidoreductases of the Dsb-family in structure, target specificity and reaction.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat p-Toluidinsalz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CCD	<i>charge coupled device</i>
d	Distanz
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
Dsb	Disulfid-Oxidoreduktasen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GatDH	Galaktitol-Dehydrogenase, Galaktit-Dehydrogenase
Grx	Glutaredoxin
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	<i>Lysogenic broth</i> , (Luria-Bertani-Medium)
MAD	<i>multiple wavelength dispersion</i>
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy</i> <i>(time of flight)</i>
MDR	<i>medium-chain dehydrogenase/reductase</i>
MES	2-(N-Morpholino-)ethansulfonsäure
min	Minute
MIR	multipler isomorpher Ersatz (<i>multiple isomorphous replacement</i>)
MPEG	Polyethylenglykol-Monomethylether
MR	molekularer Ersatz (<i>molecular replacement</i>)
MSE	Selenomethionin

NAD ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Ni-NTA	<i>Nickel-Nitrilotriacetic acid</i>
NTCB	2-Nitro-5-thiobenzoessäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Lichtwellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rmsd	<i>root mean square deviation</i> (Standardabweichung)
rms-Distanz	<i>root mean square-Distanz</i> (mittlere Distanz)
RT	Raumtemperatur
SAD	<i>single wavelength dispersion</i>
SDR	<i>short-chain dehydrogenase/reductase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SeMet	Selenomethionin
SIR	einfacher isomorpher Ersatz (<i>single isomorphous replacement</i>)
SOC	<i>Super-optimal broth (SOB) with catabolite respression</i>
Sox	Sulfat-oxidierendes System
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Trx	Thioredoxin
U	Einheit (<i>unit</i>)
UV	ultraviolett
VIS	sichtbarer Spektralbereich

Abkürzungen für die Aminosäuren

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

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Galaktitol-Dehydrogenase	1
1.1.1	Biokatalysatoren und ihre industrielle Nutzung	1
1.1.2	<i>Short-chain</i> Dehydrogenasen/Reduktasen	1
1.1.3	Anwendungen der Galaktitol-Dehydrogenase	4
1.1.4	Zielsetzungen dieser Arbeit.....	7
1.2	SoxS.....	9
1.2.1	Mikrobielle Schwefeloxidation.....	9
1.2.2	Sox-System von <i>Paracoccus pantotrophus</i>	9
1.2.3	Thioredoxine	11
1.2.4	Zielsetzungen dieser Arbeit.....	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Organismen.....	16
2.2	Plasmide	16
2.3	Chemikalien.....	17
2.4	Enzyme und kommerziell erhältliche Reaktionsansätze	20
2.5	Säulenmaterialien	20
2.6	Nährmedien	21
2.7	Puffer und Lösungen.....	22
2.7.1	Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen	22
2.7.2	Lösungen für Alkalische Lyse	22
2.7.3	Lösungen für Agarosegele	23
2.7.4	Lösungen für SDS-Gele	23
2.7.5	Lösungen für Westernblot.....	25
2.7.6	Lösung für die Bestimmung der Proteinkonzentration	25
2.7.7	Puffer für die Aufreinigung von GatDH	26
2.7.8	Puffer für die Aufreinigung von GatDH Δ C3	27
2.7.9	Puffer für die Aufreinigung von SoxS	28
2.8	Kristallisationslösungen.....	29
2.9	Geräte und Zubehör	29

2.13.10	DNA-Sequenzierung	38
2.13.11	Kassettenklonierung	38
2.14	Proteinchemische Methoden	41
2.14.1	SDS-PAGE	41
2.14.2	Coomassie-Färbung	41
2.14.3	Westernblot und Immundetektion	42
2.14.4	Proteinexpression	43
2.14.5	Proteinaufreinigung	44
2.14.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	47
2.14.7	Aktivitätsassay für GatDH	47
2.15	Biophysikalische und Röntgenographische Methoden	48
2.15.1	MALLS (<i>Multiple Angle Laser Light Scattering</i>)-Messungen	48
2.15.2	Kristallisation	49
2.15.3	Theorie der Röntgendiffraktion	52
2.15.4	Datensammlung	56
2.15.5	Datenprozessierung	58
2.15.6	Verbesserung des Strukturmodells	59
2.15.7	Qualität einer Kristallstruktur	60
2.15.8	Darstellung des Strukturmodells zur Interpretation	62

3	Ergebnisse	63
3.1	Galaktitol-Dehydrogenase	63
3.1.1	Klonierung des Expressionskonstruktes pET24a_His_GatDH	63
3.1.2	Expression von (His) ₆ -GatDH.....	64
3.1.3	Aufreinigung von (His) ₆ -GatDH.....	65
3.1.4	MALDI-Analyse der aufgereinigten GatDH.....	68
3.1.5	Aktivitätsbestimmung der aufgereinigten GatDH.....	69
3.1.6	MALLS (<i>Multiple Angle Laser Light Scattering</i>)-Messungen.....	70
3.1.7	Kristallisation von GatDH mit dem Kofaktor NAD ⁺	73
3.1.8	Montieren von GatDH-Kristallen und Testmessungen	74
3.1.9	Optimierung der Kristallisationsbedingungen durch Additiv-Screens.....	75
3.1.10	Aufnahme eines hochauflösenden Datensatz von GatDH in Komplex mit NAD ⁺	75
3.1.11	Strukturlösung der GatDH in Komplex mit NAD ⁺	75
3.1.12	Analyse der GatDH-Struktur in Komplex mit NAD ⁺	78
3.1.13	Strukturen der GatDH mit gebundenen Substraten	80
3.1.14	Lokalisierung von Bindungsstellen zweiwertiger Metall-Ionen	86
3.1.15	Datenstatistik der verschiedenen GatDH-Strukturen mit gebundenen Substraten.....	88
3.1.16	Expression von GatDH mit verkürztem C-Terminus.....	89
3.1.17	Aufreinigung von GatDHΔC3	89
3.1.18	Rückfaltung-Experimente der GatDHΔC3	94
3.2	SoxS.....	95
3.2.1	Expression von SoxS	95
3.2.2	Aufreinigung von SoxS (nativ).....	95
3.2.3	Expression einer Selenomethionin-Variante von SoxS.....	98
3.2.4	Aufreinigung des Selenomethionin-Derivates von SoxS	99
3.2.5	Kristallisation von SoxS.....	100
3.2.6	Montieren von SoxS-Kristallen und Testmessungen (Heimquelle).....	101
3.2.7	Kristallisation des Selenomethionin-Derivates von SoxS	101
3.2.8	SDS-PAGE und MALDI-Messung.....	102
3.2.9	Aufnahme von Datensätzen von SoxS- und SeMet-SoxS-Kristallen.....	105
3.2.10	Aufnahme eines MAD-Datensatzes von SeMet-SoxS-Kristallen	105
3.2.11	Prozessierung des MAD-Datensatzes	106
3.2.12	Verfeinerung der Struktur von SeMet-SoxS	107
3.2.13	Struktur von SoxS	107
3.2.14	Statistiken der Datensätze von SeMet-SoxS und SoxS	108

4	Diskussion	111
4.1	Galaktitol-Dehydrogenase	111
4.1.1	Allgemeine Struktur des Holoenzym.....	111
4.1.2	Vergleich mit homologen Strukturen	114
4.1.3	Aufbau des Tetramers in der Kristallpackung	116
4.1.4	Untersuchung der Mg ²⁺ -Abhängigkeit der GatDH	118
4.1.5	Kofaktor-Bindestelle	121
4.1.6	Aktives Zentrum mit gebundenen Substraten	122
4.1.7	Inhibitor-Studien	129
4.2	SoxS.....	131
4.2.1	Lösung des kristallographischen Phasenproblems mit der MAD-Methode	131
4.2.2	Allgemeine Struktur von SoxS.....	132
4.2.3	Vergleich mit homologen Strukturen	136
4.2.4	Aktives Zentrum und Redox-Zustand von SoxS.....	138
4.2.5	Substrat-Bindung	141
5	Zusammenfassung	145
5.1	Galaktitol-Dehydrogenase	145
5.2	SoxS.....	147
6	Conclusion.....	149
6.1	Galactitol-Dehydrogenase	149
6.2	SoxS.....	151
7	Literaturverzeichnis	153
	Anhang-Vektorkarten	164

1 Einleitung

1.1 Galaktitol-Dehydrogenase

1.1.1 Biokatalysatoren und ihre industrielle Nutzung

In den letzten Jahrzehnten ist die Nachfrage nach biotechnologisch hergestellten Produkten für die Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie, als Pharmazeutika und Feinchemikalien stetig gestiegen. Die biologische Aktivität ist oft streng an eines der möglichen Enantiomere gekoppelt. Beispiele sind das Medikament Contergan[®], dessen Wirkstoff Thalidomid als (*R*)-Enantiomer beruhigende Wirkung hat, das (*S*)-Enantiomer dagegen teratogen wirkt und zu Fehlbildungen bei Ungeborenen führt (Blaschke *et al.*, 1979) sowie Carvon, dessen (*R*)-Enantiomer nach Minze, das (*S*)-Enantiomer dagegen nach Kümmel riecht (Streitwieser *et al.*, 1994). Bei der Herstellung durch chemische Katalysatoren fallen oft Racemate an, die aufwändig in ihre Enantiomere getrennt werden müssen oder das Arbeiten mit Schutzgruppen erfordern (Toone *et al.*, 1989).

Enzyme dagegen können als chirale Katalysatoren nur ein Enantiomer ihrer Substrate umsetzen. Eine biotechnologisch interessante Enzymklasse, welche in der Lage ist, optisch reine Produkte herzustellen, sind die Dehydrogenasen. In einem Racemat-Gemisch hydroxylierter Komponenten kann nur ein Enantiomer oxidiert werden. In der umgekehrten Reaktion können prochirale Ketone zu optisch reinen sekundären Alkoholen reduziert werden. In beiden Reaktionen werden Kofaktoren benötigt, welche durch Regenerationsreaktionen wieder zur Verfügung gestellt werden (Hummel *et al.*, 1997).

1.1.2 Short-chain Dehydrogenasen/Reduktasen

Kurzkettige Dehydrogenasen (*Short-chain dehydrogenases/reductases*, SDR, Persson *et al.* 1995) bilden eine große Familie mit über 3000 Mitgliedern in der UniProtKB/Swiss-Prot-Datenbank (ExPASy, Stand 2008) und über 30 Kristallstrukturen in der Proteindatenbank PDB (Berman *et al.*, 2000). SDR-Enzyme kommen in allen Prokaryonten, Eukaryonten und einigen Viren vor, mit wichtigen Funktionen in Metabolismus-Prozessen. Sie sind sehr divergent bezüglich ihrer katalytischen Reaktion und ihrer Substratspezifität. Trotz einer geringen Sequenzidentität von 15-30 % ist allen strukturell ein α/β -Motiv gemeinsam. Diese Rossmann-Faltung, auch Dinukleotid-Bindungsmotiv genannt, besteht aus einem 6-strängigen β -Faltblatt, das auf beiden Seiten von 2-3 α -Helices umgeben ist, wie die schematische Darstellung (Abb. 1) zeigt (Rossmann *et al.*, 1974; Ghosh *et al.*, 1995). In den SDR-Enzymen

kann dieses zentrale Motiv um einen siebten β -Faltblatt-Strang (β G) und einer α -Helix (α G) erweitert sein. Enzyme dieser Familie besitzen nur wenige gemeinsame, aber hoch konservierte Sequenzmotive und können durch deren Variationen weiter in fünf Unterfamilien eingeteilt werden (*extended*, *classical*, *intermediate*, *divergent* und *complex* (Oppermann *et al.*, 2003; Kallberg *et al.*, 2002)).

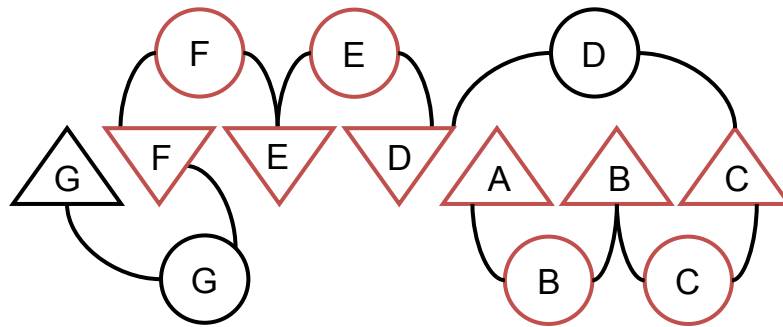


Abb. 1: Schematische Darstellung der Rossmann-Faltung (rote Umrandung) in SDR-Enzymen. Die Faltblatt-Stränge sind als Dreiecke, die Helices als Kreise dargestellt. Ein 6-strängiges β -Faltblatt ist auf beiden Seiten von zwei α -Helices umgeben. Die beiden α/β -Motive werden durch eine Helix verbunden. In den SDR-Enzymen ist das Rossmann-Motiv oft um einen siebten β -Faltblattstrang und eine α -Helix erweitert.

Die meisten SDR-Enzyme sind Dimere oder Tetramere, zusammengehalten durch starke Wechselwirkungen der beiden großen, konservierten Helices α E und α F (Jörnvall *et al.*, 1995).

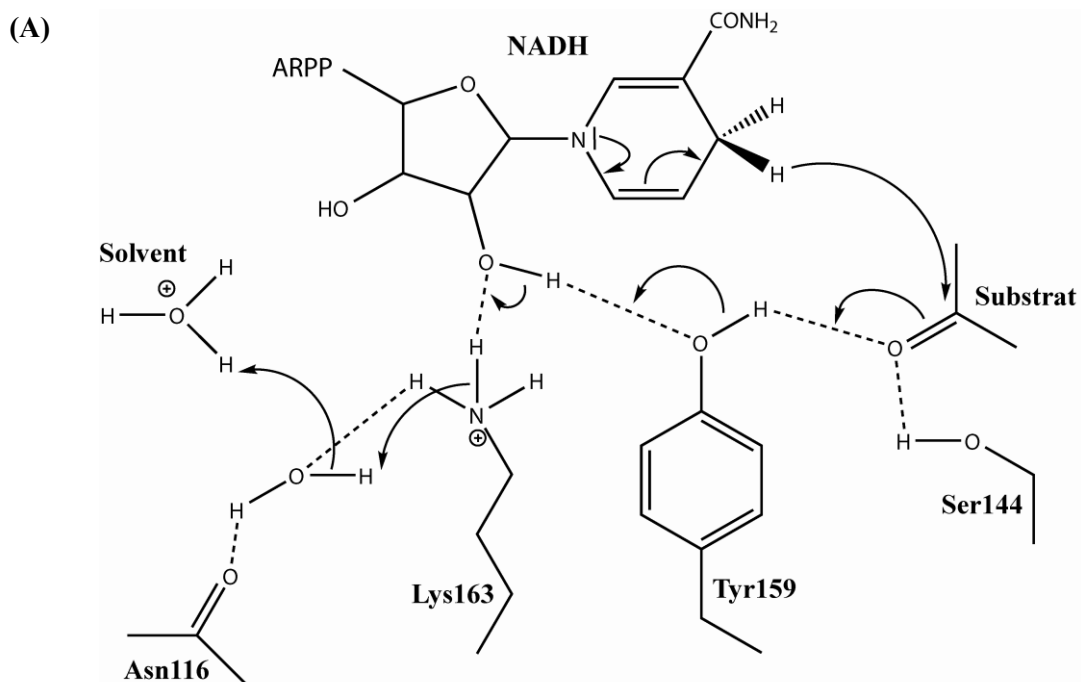
Mitglieder der SDR-Familie umspannen verschiedene EC-Klassen, die Mehrheit davon sind NAD(P)(H)-abhängige Oxidoreduktasen. Sie besitzen ein breites Substrat-Spektrum, welches Alkohole, Steroide und aromatische Substanzen umfasst. Kurzkettige Dehydrogenasen sind hauptsächlich in Dehydrogenase/Reduktase-Reaktionen involviert, fungieren als Lyasen, Epimerasen und Dehydratasen, aber schließen auch RNA-bindende Proteine, Kinasen und Transkriptionsfaktoren ein. Erweiterte SDR-Gruppen bestehen aus Enzymen mit Oxidoreduktase-, Lyase/(Dehydratase)-, Epimerase- und Isomerase-Aktivität (Filling *et al.*, 2002). Die SDR-Familie ist von den funktionell verwandten Familien der *medium-chain dehydrogenases/reductases* (MDR) und den Aldo-Keto-Reduktasen (AKR) strikt getrennt.

Konservierte Motive, welche an der Bindung des Kofaktors beteiligt sind, sind das N-terminal gelegene Nukleotid-Bindemotiv TGXXXGXG, das NNAG-Motiv sowie das PG-Motiv. Die Spezifität für NAD(H) oder NADP(H) wird durch ein Aspartat oder Arginin am Ende des zweiten β -Faltblatt-Stranges reguliert. In 70 % der Fälle befindet sich im Loop zwischen dem

zweiten Faltblattstrang und der zweiten Helix ein konservierter Aspartat-Rest bei NAD-bindenden SDR-Enzymen, bei NADP-bindenden dagegen ein konservierter Arginin-Rest (Duax *et al.*, 2003).

In der SDR-Familie sind nur acht Aminosäure-Reste fast komplett konserviert, von denen die Hälfte Glycine sind. Weniger konservierte Reste sind hydrophobe Aminosäuren wie Isoleucin, Leucin, Valin und Alanin, wodurch die SDR-Enzyme einen hydrophoben Kern aufweisen.

Weitere konservierte Seitenketten sind ein Serin, Tyrosin und Lysin im aktiven Zentrum. Diese bilden zusammen mit einem Asparagin die sogenannte katalytische Tetrade, schematisch in Abb. 2 dargestellt. Tyrosin ist dabei der einzige Rest, der am höchsten in der Familie konserviert ist. Lys159 (Nummerierung entspricht der GatDH) bildet H-Brückenbindungen zu der Ribose des Kofaktors und erniedrigt den pK_a -Wert der OH-Gruppe des Tyrosins. Dieses wirkt als katalytische Base, während Serin das Substrat über H-Brückenbindungen stabilisiert. Es bildet sich ein Protonen-Relay-System, in dem die OH-Gruppe des Tyrosins, die 2'OH-Gruppe der Ribose des Kofaktors, die NH_3^+ -Gruppe des Lysins und ein konserviertes Wassermolekül, das über die Carbonyl-Gruppe des Asparagins im Proteinrückgrat koordiniert wird, involviert sind. Der Protonentransfer kann auf andere konservierte Wassermoleküle, die einen Cluster innerhalb des Proteins bilden, mit Übergang zu der Hydrathülle, erweitert werden (Filling *et al.*, 2002).



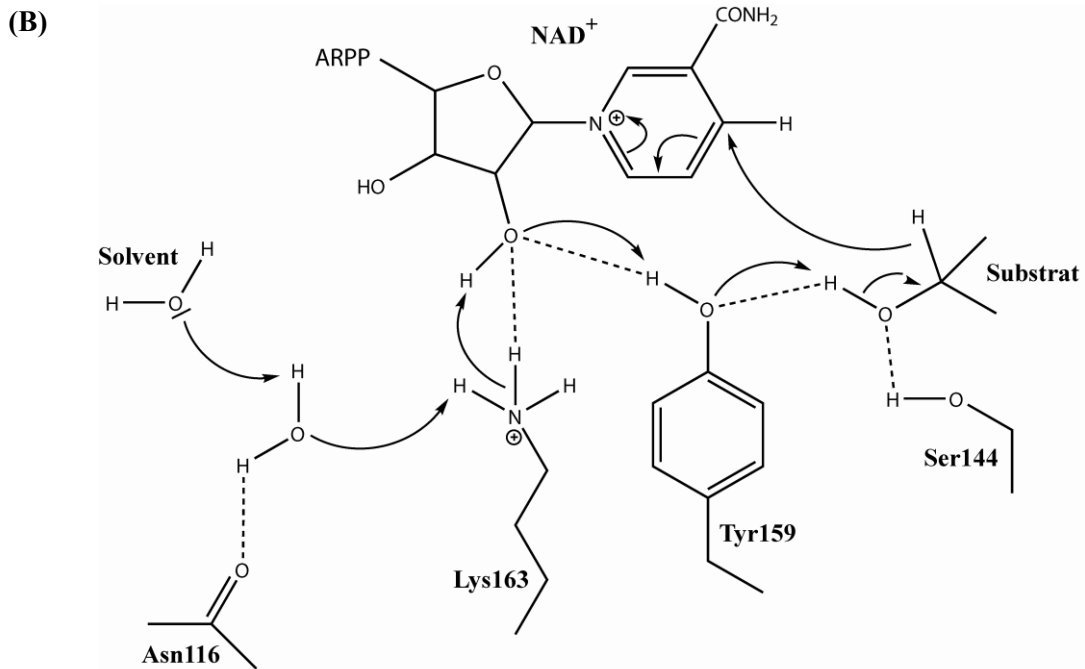


Abb. 2: Postulierter katalytischer Reaktionsmechanismus der Dehydrogenasen für die Oxidationsreaktion (A) sowie die Reduktionsreaktion (B). Die Aminosäure-Reste sind entsprechend der GatDH-Sequenz nummeriert, der Rest des Kofaktors mit ARPP abgekürzt.

- (A) Die Katalyse wird im reduktiven Mechanismus durch einen Protonentransfer von der Hydroxyl-Gruppe des Tyrosins zu der Carbonyl-Gruppe des Substrates initiiert, auf den danach ein Hydrid-Transfer vom NADH zum Substrat folgt.
- (B) In der Oxidationsreaktion wird das Tyrosin zwischenzeitlich deprotoniert, wonach der Hydroxyl-Gruppe des Substrats ein Proton entzogen wird, gefolgt von einem Hydrid-Transfer auf das NAD^+ .

1.1.3 Anwendungen der Galaktitol-Dehydrogenase

Die in dieser Arbeit untersuchte Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH, EC 1.1.1.16) wurde aus dem Purpurbakterium-Stamm *Rhodobacter sphaeroides* D in einem Chemostat-Experiment unter selektivem Druck isoliert und charakterisiert. Im Gegensatz zum Wildtyp-Stamm Si4 ist der selektierte Stamm in der Lage, Galaktitol zu L-Tagatose umzusetzen, obwohl das Gen in beiden Stämmen identisch ist (Schneider *et al.*, 1995).

GatDH ist zu keiner der drei in diesem Stamm ebenfalls exprimierten Polyol-Dehydrogenasen Mannitol-Dehydrogenase, Sorbitol-Dehydrogenase und Ribitol-Dehydrogenase identisch. Es handelt sich also nicht um eine Seitenaktivität dieser Enzyme. Vermutlich führt die Insertion eines repetitiven Motivs mit einer möglichen Ribosomenbindestelle vor dem 5'-Anfang des GatDH-Gens zu einer verstärkten Transkription und/oder Translation und damit zum Anschalten des vorher stillen Genes (Dissertation, Christian Zimmer, 2006).

GatDH ist aus 254 Aminosäuren aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von 26.384 Da. Frühere Untersuchungen (Saccharose-Gradienten-Zentrifugation sowie lineare Gradienten-Elektrophorese) legen die Vermutung nahe, dass die GatDH als Tetramer vorliegt (Schneider *et al.*, 1995).

Aufgrund von charakteristischen Sequenzmotiven kann GatDH in die Unterfamilie der klassischen Dehydrogenasen eingeordnet werden (Kallberg *et al.*, 2002).

GatDH ist in der Lage, verschiedene Polyole, Alkohole, Zuckeralkohole, diverse Diole und sekundäre Alkohole als Substrate zu nutzen und diese zu oxidieren. Dabei wird ausschließlich nur eines der möglichen Enantiomere umgesetzt und das Produkt kann von dem unbelassenen Substrat-Enantiomer getrennt werden. In der umgekehrten Reaktion kann GatDH verschiedene Zucker und Carbonyl-Komponenten reduzieren (Abb. 3, A). Die Reaktion ist streng stereoselektiv, wobei ausschließlich das (*S*)-Enantiomer hergestellt wird. Der K_m -Wert fällt dabei mit zunehmender Länge der Kohlenstoff-Kette (Beispiele siehe Tabellen 1 und 2, aus Kohring *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 1995). Das pH-Optimum der Oxidationsreaktion liegt bei 10,5, das der Reduktionsreaktion bei unter 4 (Gregor Jäkel, Diplomarbeit, 1994).

Tab. 1: Substrate der GatDH in Oxidations- und Reduktionsreaktionen sowie die ermittelten K_m -Werte (Kohring *et al.*, 2003)

Oxidation		Reduktion	
Substrat	K_m [mM]	Substrat	K_m [mM]
(<i>R,S</i>)-1,2-Propandiol	196.0	Hydroxyaceton	202.0
(<i>R,S</i>)-1,2-Butandiol	49.0	1-Hydroxy-2-butanon	26.0
(<i>R,S</i>)-1,2-Hexandiol	1.4	2,3-Hexandion	1.4
(<i>R,S</i>)-1,2,6-Hexantriol	0.5	3,4-Hexandion	4.2

Tab. 2: Relative GatDH-Aktivität mit verschiedenen Substraten, bezogen auf Galaktitol in der Oxidationsreaktion und L-Tagatose in der Reduktionsreaktion (aus Schneider *et al.*, 1995)

Oxidation		Reduktion	
<i>Substrat</i>	<i>Rel. Aktivität [%]</i>	<i>Substrat</i>	<i>Rel. Aktivität [%]</i>
Galaktitol	100	L-Tagatose	100
Xylitol	410	D-Tagatose	4
D-Threitol	428	D-Ribulose	696
<i>meso</i> -Erythritol	4	D-Xylulose	42
1,2-Propandiol	71	L-Erythrulose	1183
1,2-Butandiol	95	Acetoin	304
1,2-Pentandiol	269	Dihydroxyaceton	281
1,2-Hexandiol	323		
(<i>R,S</i>)-1,2,6-Hexantriol	49		

Von Interesse für die Biotechnologie ist außerdem die spezifische Umsetzung von Galaktitol zu dem seltenen Zucker L-Tagatose durch GatDH (Abb. 3, B). Dieser Zucker gehört zu den nicht-metabolisierbaren Süßungsmitteln und kann als Zuckerersatzstoff, z.B. in diabetischen Nahrungsmitteln eingesetzt werden. Für die Chemotherapie kann er außerdem als Vorstufe für die Synthese des Glucosidase-Inhibitors 1-Desoxygalactonojirimycin eingesetzt werden. L-Tagatose kann sowohl chemisch als auch enzymatisch durch andere Enzyme wie z.B. die D-Tagatose-3-Epimerase hergestellt werden, allerdings mit geringeren Ausbeuten (Huwig *et al.*, 1997, Pyun *et al.*, 2004).

Durch das breite Substratspektrum auf der einen Seite und durch die Selektivität in der Reaktion auf der anderen Seite, ist GatDH von großem Interesse für die Biotechnologie. Sie kann zur Herstellung optisch reiner Bausteine („*building-blocks*“) genutzt werden, die zu bioaktiven Komponenten weiter verarbeitet werden können.

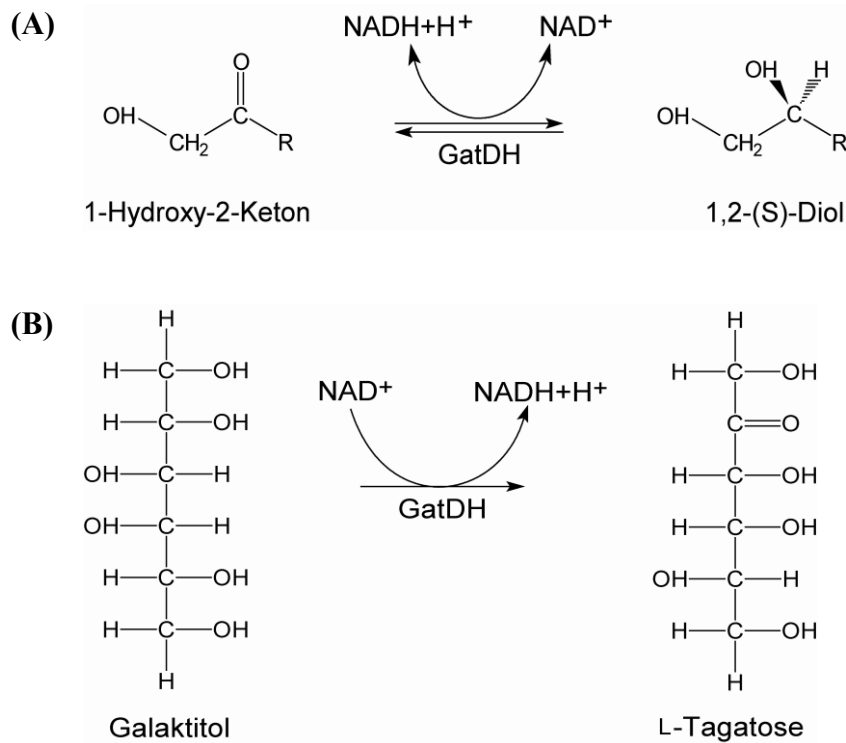


Abb. 3: Reaktionsschemen von GatDH aus *R. sphaeorides*.

- (A) Allgemeines Schema der Oxidations- und Reduktionsreaktionen; GatDH kann Ketone zu Diolen unter Bildung des (S)-Enantiomers reduzieren sowie umgekehrt sekundäre Alkohole zu Ketonen oxidieren unter Reduktion von NAD^+ zu NADH .
- (B) Substratspezifische Oxidation des Zuckeralkohols Galaktitol zu dem seltenen Zucker L-Tagatose.

1.1.4 Zielsetzungen dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Struktur von GatDH aus *R. sphaeorides* mit der Methode der Röntgenstrukturanalyse aufzuklären. Zur Röntgenkristallographie werden größere Mengen (mindestens 10 mg) sehr reinen Proteins benötigt. Dazu sollte GatDH in *E. coli* überexprimiert und mittels verschiedener Chromatographie-Methoden aufgereinigt werden. Zur Erleichterung der Aufreinigung wurde ein $(\text{His})_6$ -Affinitätsmarker an den N-Terminus gesetzt. Da Affinitätsmarker durch ihre Flexibilität die Kristallisation eines Proteins beeinträchtigen können und die für die Kristallisation nötigen Packungsinteraktionen der einzelnen Moleküle stören können, sollte eine Protease-Schnittstelle zum Entfernen eingebaut werden. Die cDNA, kodierend für GatDH aus dem *R. sphaeroides*-Stamm 2.4.1 wurde von der AG Giffhorn (Angewandte Mikrobiologie, Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt.

Eine erste Struktur des Enzyms, mit gebundenem Kofaktor NAD^+ , sollte Einblicke in die Gesamtstruktur des Proteins geben. Zusätzlich sollten weitere Strukturen mit verschiedenen, im aktiven Zentrum gebundenen Substraten und Inhibitoren ein besseres Verständnis der katalytischen Reaktion dieser kurzkettigen Dehydrogenase ermöglichen. Gezielte Modifikationen zur Erweiterung der Substratspezifität und die Steigerung der biokatalytischen Aktivität sollten basierend auf den Strukturinformationen ermöglicht werden.

Die Aktivität der GatDH scheint von der Anwesenheit von Mg^{2+} oder anderen zweiwertigen Metallionen abhängig zu sein (Schneider *et al.*, 1995). Eine Abhängigkeit von bivalenten Metall-Ionen ist bei Mitgliedern der MDR-Familie, den Zn^{2+} -abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen weit verbreitet, bei den SDR-Enzymen dagegen selten beschrieben. Ein Beispiel ist die *R*-Alkohol-Dehydrogenase (RADH), bei der eine Abhängigkeit von Mg^{2+} bereits gezeigt werden konnte (Niefind *et al.*, 2003). Bei der GatDH sollte diese Abhängigkeit durch Lokalisierung von Bindestellen zweiwertiger Metall-Ionen in der Molekülstruktur näher untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte der Oligomer-Zustand in Abhängigkeit von zweiwertigen Metall-Ionen und des Kofaktors durch Lichtstreuungs-Experimente analysiert werden.

1.2 SoxS

1.2.1 Mikrobielle Schwefeloxidation

Die Oxidation von anorganischen Schwefelverbindungen zu Sulfat stellt die Hälfte des globalen Schwefel-Zyklus dar. Biologische Schwefeloxidation wird hauptsächlich von Prokaryonten durchgeführt. Eukaryonten sind zur Schwefeloxidation nur durch Endosymbionten fähig. Es konnten verschiedene biochemische Stoffwechselwege für aerobe, chemotrophe *Archaea*, acidophile und neutrophile freilebende sowie symbiontische Bakterien und anaerobe phototrophe Bakterien nachgewiesen werden. Neutrophile, chemotrophe und phototrophe Bakterien nutzen dabei das Sox-System (Schwefel-oxidierendes Enzym-System) (Friedrich, 1998; Dahl *et al.*, 2008).

1.2.2 Sox-System von *Paracoccus pantotrophus*

Das gram-negative, neutrophile, fakultativ aerobe, fakultativ chemolithotrophe *Alphaproteobakterium Paracoccus pantotrophus* (ursprünglich *Paracoccus denitrificans* GB17) ist in der Lage, reduzierte anorganische Schwefelverbindungen sowie molekularen Wasserstoff als Energiequellen zu nutzen. Außerdem ist es fähig, heterotroph eine große Bandbreite von Kohlenstoffquellen zu verwerten (Ludwig *et al.*, 1993; Rainey *et al.*, 1999).

Das Sox-System ist in *P. pantotrophus* im periplasmatischen Raum lokalisiert und wird von einer Genregion, bestehend aus einem Cluster von 15 Genen, kodiert (Abb. 4).

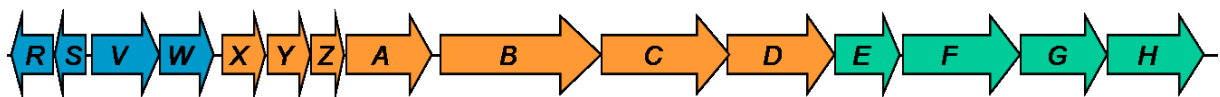


Abb. 4: Sox-Gencluster von *Paracoccus pantotrophus*. Die orange markierten Genabschnitte kodieren für die sieben essentiellen Proteine des Zyklus und können Cytochrom *c in vitro* reduzieren.

Die sieben periplasmatischen Proteine bilden drei Heterodimere (Sox(CD)₂, SoxYZ, SoxXA) und ein monomeres Protein (SoxB) und stellen die Hauptkomponenten des Sox-Zyklus dar. Sie katalysieren zusammen die H₂S-, Schwefel-, Thiosulfat- und Sulfid-abhängige Reduktion von Cytochrom *c in vitro* (Rother *et al.*, 2001).

Das heterodimere SoxYZ ist dabei das zentrale Protein des Zyklus und dient als Transporter für das anorganische Schwefelsubstrat. Das anorganische Schwefelsubstrat wird hierzu kovalent an das freie Thiol des Aminosäurerestes Cys110 der SoxY-Untereinheit durch das

heterodimere molybdänhaltige Häm-Enzym SoxXA gebunden, wodurch ein Persulfid-Thiosulfonat gebildet wird. Bei diesem Reaktionsschritt werden dem Substrat zwei Elektronen entzogen und auf den Akzeptor übertragen. *In vitro* dient Cytochrom *c* als Akzeptor, *in vivo* werden die gewonnenen Elektronen in die Atmungskette geschleust (Friedrich *et al.*, 2001). Das endständige Sulfon wird im nächsten Schritt als Sulfat durch das monomere Dimangan-Protein SoxB, einer Sulfat-Thiohydrolase, abgespalten. Es verbleibt ein Persulfid am SoxY-Cys110-Rest, dessen Sulfan-Schwefel anschließend durch das heterotetramere Sox(CD)₂, einer Sulfan-Dehydrogenase, zu einem Thiosulfonat oxidiert wird. Bei dieser Reaktion werden zusätzlich weitere sechs Elektronen frei. Der Sulfonrest wird schließlich als Sulfat von SoxB abgespalten, wodurch SoxYZ für einen erneuten Reaktionszyklus wieder regeneriert ist (Abb. 5).

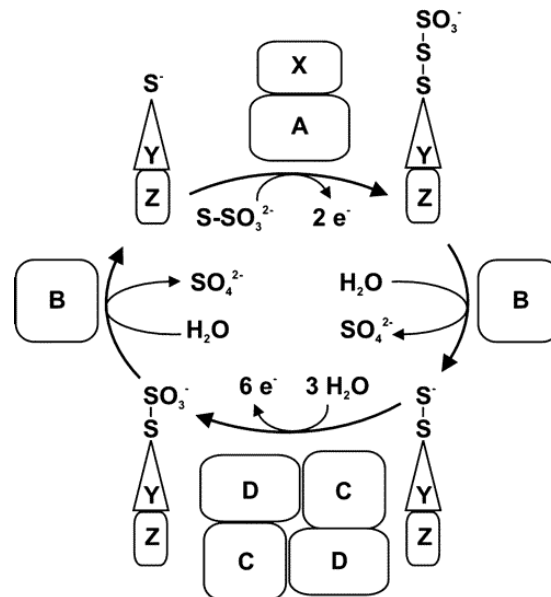


Abb. 5: Reaktionsschema des Sox-Zyklus von *P. pantotrophus* *in vitro*. Das Substrat, hier ein Thiosulfat, wird durch SoxXA auf das freie Cystein der SoxY-Untereinheit des SoxYZ-Komplexes übertragen. SoxB spaltet im nächsten Schritt das endständige Sulfon als Sulfat ab. Durch Sox(CD)₂ wird das neu gebildete Persulfid zu Thiosulfonat oxidiert. SoxB spaltet erneut das Sulfon in Form eines Sulfats ab, wodurch SoxYZ für einen erneuten Reaktionszyklus regeneriert wird. Es werden insgesamt acht Elektronen gewonnen, die auf den Akzeptor Cytochrom *c* übertragen werden (Quentmeier *et al.*, 2007).

Die Substratbindestelle von SoxY liegt am C-Terminus im konservierten Motiv Gly-Gly-Cys-Gly-Gly-COOH. Der C-Terminus ist an der Oberfläche exponiert, wie die Kristallstruktur zeigt (Sauvé *et al.*, 1997). Damit ist SoxYZ im Zyklus für die Partner-Proteine Sox(CD)₂, SoxXA und SoxB zugänglich.

SoxYZ kann vermutlich unspezifische Modifikationen eingehen, wie die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken, gemischten Disulfiden und Thioether-Bindungen. Es wurde nachgewiesen, dass SoxYZ mit einem anderen SoxYZ-Molekül über eine Disulfidbrücke ein Heterotetramer bilden kann (Quentmeier *et al.*, 2007). Dies wurde auch für SoxY in *Chlorobium limicola* beschrieben (Stout *et al.*, 2007). Durch diesen Zustand ist das Sox-System *in vivo* inaktiv und benötigt eine Reaktivierung von SoxYZ.

Die Gene *soxS* und *soxW* des Clusters kodieren für die periplasmatischen Thioredoxin-ähnlichen Proteine SoxS und SoxW. SoxS hat nach der Einschleusung ins Periplasma und Abspaltung der Signalsequenz ein Molekulargewicht von 11.077 Da (99 Aminosäuren), SoxW ein Molekulargewicht von 18.719 Da (166 Aminosäuren). Beide Proteine werden durch SoxV, einen Thiol-Disulfid-Transporter, reduziert. SoxV ist in die Cytoplasmamembran integriert und ein Paralog zu der CcdA-Superfamilie, die an der Reduktion von Apocytochrom *c* beteiligt ist. SoxV dagegen ist nicht an der Synthese von Cytochrom *c* beteiligt, aber essentiell für das chemotrophe Wachstum mit Thiosulfat, was durch Interposon-Mutagenese bewiesen werden konnte (Bardischewsky *et al.*, 2006).

Der homogenote Mutant GBΩS, bei dem das *soxS*-Gen durch ein Kanamycin-Resistenz-Interposon unterbrochen ist, ist nicht in der Lage, chemoautotroph mit Thiosulfat zu wachsen und auch bei einer mixotrophen Kultivierung zeigen die Zellen nur 20 % der Thiosulfat-Oxidation im Vergleich zu dem Wildtyp. Der Expressionslevel der anderen Sox-Proteine unterscheidet sich dabei nicht von dem des Wildtyps. Durch Komplementation mit dem *soxS*-Gen kann die Aktivität der Thiosulfat-Oxidation wieder hergestellt werden. Eine Reaktivierung des Zyklus kann aber auch durch Zugabe von Reduktionsmitteln in das Kultur-Medium von GBΩV und GBΩS erreicht werden, was für die Wichtigkeit von SoxS und SoxV bei Reduktionsreaktionen *in vivo* spricht (Rother *et al.*, 2005; Orawski *et al.*, 2007).

Eine GBΩW-Mutante dagegen zeigt kein vermindertes Wachstum unter chemoautotrophen Kultivierungsbedingungen. Dies zeigt, dass SoxS essentiell für das chemotrophe Wachstum von *P. pantotrophus* ist, während SoxW nicht benötigt wird (Orawski *et al.*, 2007). Mutationsstudien zeigen, dass SoxS an der Reaktivierung des inaktiven Sox(YZ)₂-Tetramers beteiligt ist (Rother *et al.*, 2008).

SoxS ist nicht verwandt mit den anderen bekannten Thioredoxinen von *P. pantotrophus*, hat aber eine hohe Homologie zu Proteinen, die ausschließlich in Schwefel-oxidierenden und phototrophen *Alphaproteobakterien* vorkommen.

1.2.3 Thioredoxine

Thioredoxine sind kleine, ubiquitäre Proteine, die sehr hitzestabil sind. Die große Familie der Thioredoxine kann in fünf Unterfamilien unterteilt werden: Thioredoxine (Trx), die der Familie den Namen gaben, Glutaredoxine (Grx), Disulfid-Oxidoreduktasen (Dsb), Alkylhydroxy-Peroxidasen und Glutathion-S-Transferasen (Pan & Bardwell, 2006; Kadokura *et al.*, 2003). Strukturell gemeinsam ist ihnen die sogenannte Thioredoxin-Faltung (Abb. 6), die sich aus vier β -Faltblattsträngen, umgeben von drei α -Helices, zusammensetzt und zuerst bei Thioredoxin-1 (Trx-1) aus *E. coli* beschrieben wurde (Katti *et al.*, 1990). Sie kann in ein N-terminales $\beta\alpha\beta$ -Motiv und ein C-terminales $\beta\beta\alpha$ -Motiv unterteilt werden, die über eine α -Helix miteinander verknüpft sind. Zusätzlich sind in den verschiedenen Unterfamilien noch lange Insertionen oder Extensionen möglich.

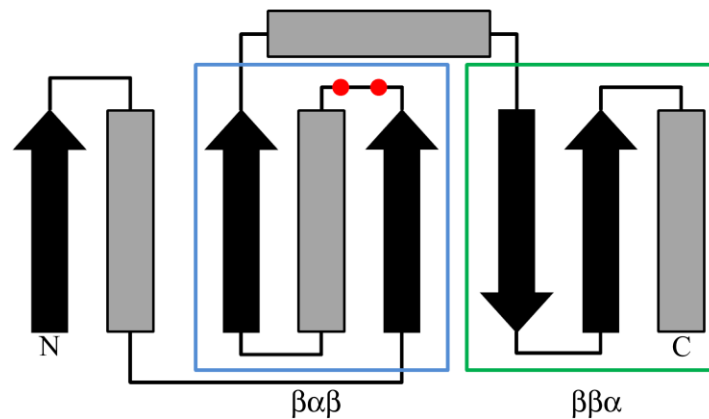


Abb. 6: Schematische Darstellung der Thioredoxin-Faltung. Sie kann in zwei Motive (blau und grün umrandet) unterteilt werden, welche durch eine dritte α -Helix verbunden sind. Das aktive Zentrum mit den beiden Cysteinen (rote Punkte) sitzt dabei am Anfang der ersten α -Helix. Viele Thioredoxine besitzen N-terminal noch zusätzlich ein β -Faltblatt und eine α -Helix.

Thioredoxine sind an einer Vielzahl von Redoxreaktionen beteiligt. Beispiele sind die Bildung oder die reduktive Spaltung von Disulfidbrücken über die reversible Oxidation der zwei Cystein-Seitenreste im aktiven Zentrum des Thioredoxins. Bakterielle Thioredoxine sind weiterhin an der Regulation der Transkription, an der Zellteilung, bei der Energieübertragung und an der Proteinreparatur beteiligt. Sie spielen ebenfalls eine Rolle bei oxidativem Stress von Bakterien und in der Phagen-Assemblierung (Zeller & Klug, 2006).

Alle Thioredoxine weisen ein konserviertes Cys-Xaa-Xaa-Cys-Motiv im aktiven Zentrum auf. Das erste Cystein besitzt einen erniedrigten pK_a -Wert, der die reversible Bildung einer Disulfidbrücke begünstigt. Das Thioredoxin kann als ein Nukleophil wirken und mit dem Thiolat-Ion des ersten Cysteins Disulfidbrücken anderer Proteine angreifen. Es entsteht eine

gemischte Disulfidbrücke zwischen dem Thioredoxin und dem Zielprotein, die wieder gelöst wird, indem das deprotonierte C-terminale Cystein das N-terminale nukleophil angreift. Das Ergebnis ist ein reduziertes Zielprotein und ein oxidiertes Thioredoxin. Oxidierte Thioredoxine werden durch die Thioredoxin-Reduktase in einer NADPH-abhängigen Reaktion regeneriert (Holmgren, 1995).

Glutaredoxine können zwei Arten von Reaktionen katalysieren (Abb. 7). Der Mechanismus der Dithiolreaktion verläuft gleich dem der Thioredoxine. Bei der Monothiol-Reaktion ist dagegen nur das N-terminale Cystein involviert. Es reagiert nur mit dem Glutathion-Rest von glutathionylierten Proteinen, nicht mit den Proteinen selbst.

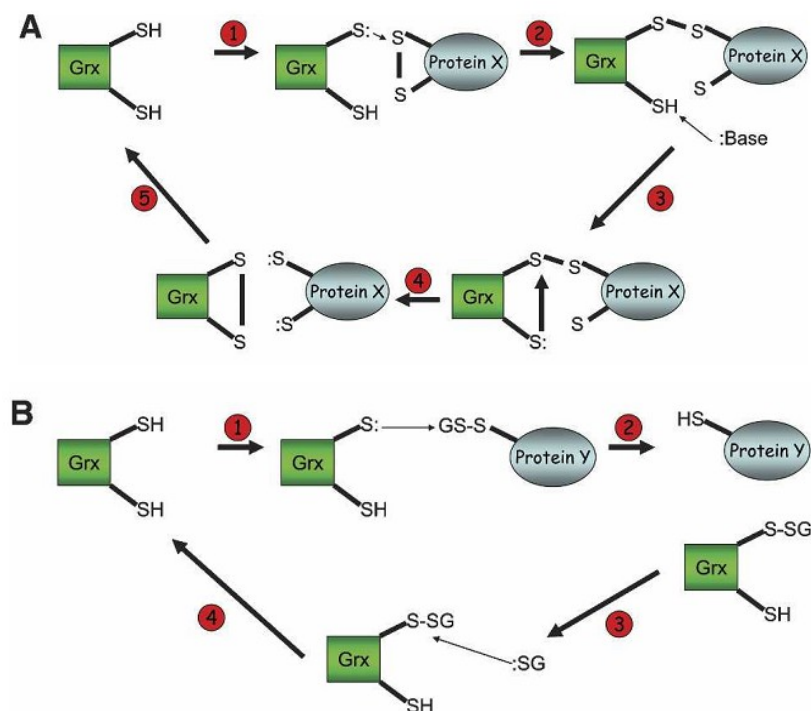


Abb. 7: Schema der Dithiol- (A) und Monothiol- (B) Reaktionen von Glutaredoxinen (entnommen mit Genehmigung aus Pan & Bardwell, 2006)

- (A) Das N-terminale Cystein des Glutaredoxins greift die Disulfidbrücke eines Zielproteins an (1), unter Bildung einer gemischten Disulfidbrücke (2). Das C-terminale Cystein wird deprotoniert und greift die Disulfidbrücke an (3) unter Bildung eines reduzierten Substratproteins und eines oxidierten Glutaredoxins (4). Das oxidierte Glutaredoxin wird wieder reduziert (5). Dieser Mechanismus gleicht dem der Thioredoxine.
- (B) Das reduzierte Monothiol-Glutaredoxin greift ein glutathionyliertes Cystein des Zielproteins an (1), unter Bildung eines glutathionylierten Glutaredoxins und eines nun reduzierten freien Cysteins (2). Das Glutaredoxin wird durch ein reduziertes Glutathion-Molekül wieder regeneriert (3) unter Bildung eines oxidierten Glutathions und eines regenerierten reduzierten Glutaredoxins (4).

Während Thioredoxine vielmehr im reduzierenden Milieu des Cytosols lokalisiert sind und Proteine in ihrem reduzierten Zustand halten, ist das Periplasma eine eher oxidierende Umgebung. Disulfid-Oxidoreduktasen (Dsb) sind Proteine, welche sekretierte Proteine kontrolliert oxidieren, deren Tertiärstruktur dadurch gestärkt wird. DsbA oxidiert Substratproteine im Periplasma und wird durch DsbB wieder regeneriert (Abb. 8, A). Aufgrund der stark oxidativen Wirkung im Periplasma kann es bei Proteinen mit mehr als zwei freien Cysteinen zu Bildung falscher Disulfidbrücken kommen. Die Isomerisierung erfolgt durch DsbC, welches die oxidierten Substratproteine unter Bildung einer gemischten Disulfidbrücke zwischen beiden Proteinen angreift (Abb. 8, B). Diese kann entweder durch einen Angriff der anderen freien Cysteine des Substratproteins erfolgen, wodurch dieses in der richtigen Form oxidiert und das DsbC reduziert wird. Alternativ kann auch das zweite freie Cystein von DsbC die gemischte Disulfidbrücke angreifen unter Bildung eines reduzierten Substratproteins und eines oxidierten DsbC. In diesem Fall kann DsbA wieder angreifen und das Substratprotein erneut unter Bildung der korrekten Disulfidbrücken oxidieren. DsbG ist eine weitere Isomerase mit gleicher Funktionalität wie DsbC.

Die Regeneration von DsbC und DsbG erfolgt durch das membranständige DsbD (Abb. 8, B). Dieses Protein besteht aus drei Untereinheiten, welche je ein Paar Cysteine enthalten: der Thioredoxin-ähnlichen Domäne DsbD α , der Immunoglobulin-ähnlichen Domäne DsbD γ und der DsbD β -Domäne mit acht Transmembransegmenten. In einer Disulfid-Kaskade mit Elektronentransfer durch die Cytoplasmamembran bekommt DsbD seine Reduktionsäquivalente durch ein cytosolisches Thioredoxin, welches an DsbD β bindet. DsbD β reduziert DsbD γ , diese wiederum DsbD α . DsbD α regeneriert die beiden Isomerasen DsbC und DsbG (Goulding *et al.*, 2002).

Beide Dsb-Systeme liegen im gleichen Zellkompartiment, sodass DsbA als starker Oxidant DsbC theoretisch oxidieren und damit inaktivieren kann. Durch eine Dimer-Bildung des DsbC wird dieses davor geschützt (Bader *et al.*, 2001).

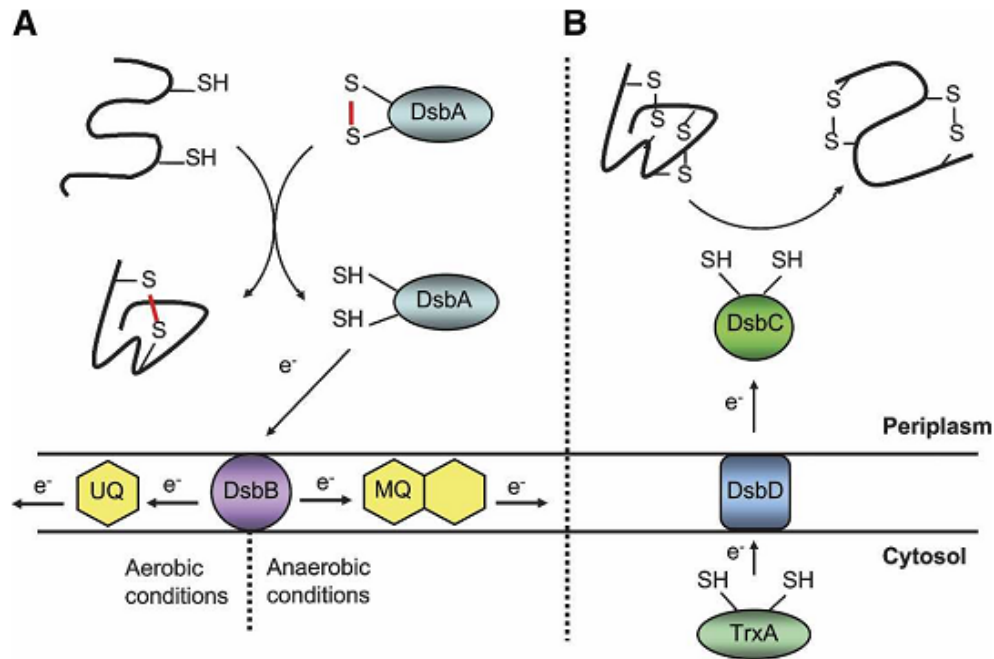


Abb. 8: Mechanismus der Disulfid-Brücken-Bildung und Isomerisierung durch Disulfid-Oxidoreduktasen im Periplasma von Bakterien (entnommen mit Genehmigung aus Pan & Bardwell, 2006).

- (A) DsbA besitzt eine katalytische Disulfidbrücke und oxidiert ein neu in das Periplasma transloziertes Protein unter Bildung eines reduzierten DsbA und eines oxidierten Substrat-Proteins. Die Regeneration des Systems erfolgt durch das Membranprotein DsbB, welches DsbA reoxidiert. DsbB gibt die Elektronen in die Atmungskette ab.
- (B) DsbA kann durch sein hohes Oxidationspotential auch falsche Disulfidbrücken bilden. Deshalb existiert ein anderer Weg zur Korrektur durch das Protein DsbC. DsbC wird durch das Membranprotein DsbD in seiner reduzierten Form gehalten. DsbD wiederum wird durch ein cytosolisches Thioredoxin reduziert.

1.2.4 Zielsetzungen dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Struktur des periplasmatischen Thioredoxins SoxS aus *P. pantrotrophus* mittels Röntgenkristallographie aufzuklären. Zur Röntgenkristallographie werden größere Mengen sehr reinen Proteins benötigt. Deshalb sollte SoxS in *E. coli* überexprimiert, mittels verschiedener Chromatographie-Methoden aufgereinigt und anschließend kristallisiert werden. Die Struktur sollte zur Funktionsanalyse von SoxS dienen und strukturelle Hinweise für die besondere SoxY-spezifische Funktionalität liefern und damit zum besseren Verständnis der Sox-Enzym-Systeme beitragen, auch in Hinblick auf den Reduktionspartner von SoxY.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme, deren Genotypen und Herkunft

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ ⁻	Hanahan (1983)
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i>	Novagen (Darmstadt)
M15[pREP4]	Nal ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ <i>lac</i> ⁻ <i>ara</i> ⁺ <i>gal</i> ⁺ <i>mtf</i> F ⁻ <i>recA</i> ⁺ <i>uvr</i> ⁺ <i>lon</i> ⁺ [pREP4 Kan ^r]	Qiagen (Hilden)

2.2 Plasmide

Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Plasmide, deren Marker und cDNA

Plasmid	Marker/Eigenschaften	Herkunft
pRD170.42	pQE-30-Derivat (Qiagen); Amp ^r ; enthält <i>soxS</i> -cDNA aus <i>P. pantotrophus</i> ; zur Expression von SoxS ohne Signalsequenz, stattdessen mit N-terminalem (His) ₆ -Affinitätssequenz und Enterokinase-Schnittstelle	Dagmar Rother (Technische Mikrobiologie, Universität Dortmund)
pQE-30	Amp ^r ; Vektor zur Expression von Fusionsproteinen mit N-terminaler (His) ₆ -Affinitätssequenz und Enterokinase-Schnittstelle	Qiagen (Hilden)
pET24a(+)_nGatDH	pET24a-Derivat (Novagen, Darmstadt); Kan ^r ; enthält cDNA von GatDH aus <i>R. sphaeroides</i> ; Expression von Wildtyp-GatDH ohne Affinitätsmarker	Petra Kornberger (Angewandte Mikrobiologie, Universität des Saarlandes)
pET24a_His_GatDH	pET24a-Derivat (Novagen, Darmstadt); Kan ^r ; enthält cDNA von GatDH aus <i>R. sphaeroides</i> ; Expression von GatDH mit N-terminaler (His) ₆ -Affinitätssequenz und TEV-Protease-Schnittstelle	diese Arbeit
pET24a_His_GatDH Δ C3	pET24a-Derivat; Kan ^r ; enthält cDNA von GatDH aus <i>R. sphaeroides</i> ; Expression von GatDH mit N-terminaler (His) ₆ -Affinitätssequenz und TEV-Protease-Schnittstelle; Deletion der letzten 3 Aminosäurereste am C-Terminus	Petra Kornberger (Angewandte Mikrobiologie, Universität des Saarlandes)

2.3 Chemikalien

Tab. 5: Chemikalien und ihre Bezugsquelle

<i>Chemikalie</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	Roth (Karlsruhe)
Additiv Screen™ 1-3	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
Agar-Agar	Difco (Heidelberg)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Ameisensäure	Fluka (Steinheim)
Ammoniumdihydrogenphosphat	Fluka (Steinheim)
Ammoniumperoxodisulfat	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Fluka (Steinheim)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Antifoam A Konzentrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bactotrypton	Difco (Heidelberg)
Benzamidin	Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt)
Bradford-Lösung	Bio-Rad (München)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Cacodylsäure	Merck (Darmstadt), Fluka (Steinheim)
Calciumacetat	Fluka (Steinheim)
Calciumchlorid	Fluka (Steinheim)
Coomassie Brilliant Blau R250 und G250	Serva (Heidelberg)
Crystal Screen™, Crystal Screen 2™	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
D(+)-Glucose	Fluka (Steinheim)
Dimethylsulfoxid	Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs)
Dithiothreitol	Gerbu Biotechnik (Gaiberg)
<i>meso</i> -Erythritol	Fluka (Steinheim)

Essigsäure	Baker (Deventer, Holland), Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Sigma-Aldrich (Seelze), Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat	Roth (Karlsruhe), Fluka, Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Difco (Heidelberg)
1,2-Hexandiol	Sigma (Steinheim)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Roth (Karlsruhe), Fluka (Steinheim)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	BioVectra - BTS Biotech (Leon-Rot), Gerbu Biotechnik (Gaiberg)
IZIT? Crystal Indicator	Hampton Research (Laguna Niguel, CA, USA)
Kaliumchlorid	Baker (Deventer, Holland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt), Fluka (Steinheim)
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat	Baker (Deventer, Holland), Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kaliumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
Kobaltchlorid	Fluka (Steinheim)
L-Selenomethionin	Athena Enzyme Systems (Baltimore, USA)
Magnesiumacetat	Fluka (Steinheim)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt), Fluka (Steinheim)
Magnesiumsulfat	Fluka (Steinheim)
Manganchlorid	Fluka (Steinheim)
β -Mercaptoethanol	Applichem (Darmstadt)

2-(<i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Fluka (Steinheim)
Natriumacetat	Fluka (Steinheim)
Natriumazid	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt), Grüssing (Filsum)
Natriumcitrat	Fluka (Steinheim)
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka (Steinheim)
Natriumdodecylsulfat	Roth (Karlsruhe)
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Nicotinamid-adenosin-dinukleotid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PEG/Ion Screen TM	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Polyethylenglykol (400, 3350, 4000, 8000)	Fluka (Steinheim)
Polyethylenglykol-monomethylether 5000	Fluka (Steinheim)
2-Propanol	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure (36%)	Baker (Deventer, Holland)
SelenoMet Medium Base TM	Athena Enzyme Systems (Baltimore, USA)
SelenoMet TM Nutrient Mix	Athena Enzyme Systems (Baltimore, USA)
Tetramethylethyldiamin	Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth (Karlsruhe), Fluka (Steinheim)
Xylitol	Fluka (Steinheim)

2.4 Enzyme und kommerziell erhältliche Reaktionsansätze

Tab. 6: Enzyme und Reaktions-Kits sowie ihre Bezugsquelle

<i>Kit/Enzym/Standard</i>	<i>Firma</i>
QIAquick PCR Purification Kit	Quiagen (Hilden)
Perfectprep [®] Gel Cleanup Kit	Eppendorf (Hamburg)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
DNA-Marker „smart ladder“	Eurogentec (Köln)
DNase I	Roche (Mannheim)
RNase (DNase-frei)	Serva (Heidelberg)
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Platinum [®] Pfx DNA-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
T4 DNA Ligase und Ligationspuffer	Roche (Mannheim)
DNA-Standard "Smart ladder"	Eurogentec (Köln)
LMW-SDS Marker Kit	GE Healthcare (München)
His•Tag [®] Monoclonal Antibody-Kit	(Novagen, Darmstadt)
PageRuler [™] Prestained Protein-Marker	(Novagen, Darmstadt)

2.5 Säulenmaterialien

Affinitäts-Chromatographie:

Die Aufreinigung über Ni-NTA-Matrix wurde entweder im Batch-Verfahren oder mittels selbstgepackter Säulen durchgeführt.

Ni-NTA Agarose	Quiagen (Hilden)
Ni-NTA Superflow	Quiagen (Hilden)
HisTrap [™] HHP	GE Healthcare (München)

Anionenaustauscher-Chromatographie:

HyperD [®] F	PALL/VWR (Darmstadt)
-----------------------	----------------------

Größenausschluss-Chromatographie:

Superdex [™] 200 prep grade 16/60	GE Healthcare (München)
--	-------------------------

2.6 Nährmedien

Die Sterilisation erfolgte bei allen Medien, sofern nicht anders angegeben, durch Autoklavieren bei 121°C für 20 min.

LB-Medium (Lysogenic Broth-Medium):

Pepton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
(Agar	1,5 % (w/v))

Zur Selektion durch Antibiotikaresistenz wurde dem Flüssigmedium das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml, Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 µg/ml) zugegeben.

Zur Herstellung von LB-Platten wurde die Lösung mit 1,5 % (w/v) Agar autoklaviert und nach dem Abkühlen auf ca. 45 °C die entsprechenden Antibiotika (Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml, Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 µg/ml) zugegeben.

SOC-Medium (SOB/Super Optimal Broth + Glucose):

Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Pepton	2 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

Selenomethionin-Expressions-Medium (1 l):

SelenoMet Medium Base TM	21,6 g in 1 l H ₂ O
SelenoMet Nutrient Mix TM	5,1 g in 50 ml H ₂ O
L-Selenomethionin-Lösung	40 µg/ml

Das Basis-Medium wurde autoklaviert, der Nutrient-Mix sowie die Selenomethionin-Lösung wurden kurz vor Gebrauch frisch angesetzt, filtriert (Ø 0,2 µm) und zu dem Basis-Medium gegeben. Zusätzlich wurden noch die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt.

2.7 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Der pH-Wert wurde, wenn nicht angegeben, mit HCl oder NaOH eingestellt.

2.7.1 Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen

PIPES	0,5 M
-------	-------

Die Lösung wurde mit bidestilliertem Wasser angesetzt und der pH mit 5 M KOH auf 6,7 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung filtriert (Ø 0,2 µm) und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Transformationspuffer (nach Inoue, Sambrook und Russell, 2001):

MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
PIPES (0,5 M, pH 6,7)	10 mM

Die Lösung wurde filtriert (Ø 0,2 µm) und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

2.7.2 Lösungen für Alkalische Lyse

GTE-Lösung:

Glucose	50 mM
Tris-HCl	25 mM
EDTA	10 mM
pH 8,0	

NaOH/SDS-Lösung:

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

Kaliumacetat-Lösung:

Essigsäure (98 %)	29,5 ml
-------------------	---------

Der pH wurde durch Zugabe von KOH-Plättchen auf 4,8 eingestellt.

H ₂ O	ad 100 ml
------------------	-----------

2.7.3 Lösungen für Agarosegele*GLB (Gel Loading Buffer):*

Glycerin	50 % (v/v)
SDS	1 % (w/v)
EDTA	125 mM
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
Xylencyanol	0,05 % (w/v)

TAE-Puffer (50x):

Tris-Base	2 M
EDTA	50 mM
Essigsäure	1 M

TBE-Puffer (10x):

Tris-Base	900 mM
EDTA	20 mM
Borsäure	900 mM

2.7.4 Lösungen für SDS-Gele*1xPBS:*

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
pH	7,4

Probenpuffer (4x SDS Gel Loading Buffer):

Tris-HCl	200 mM
SDS	8 % (w/v)
Glycerin	40 % (v/v)
Bromphenolblau	0,04 % (w/v)
pH	6,8

Für reduzierende Bedingungen wurde β -Mercaptoethanol in einer Konzentration von 5 % (v/v) zugegeben.

12 % Trenngel:

<i>Komponenten</i>	<i>5 ml (1 Gel)</i>	<i>10 ml (2 Gele)</i>	<i>15 ml (3 Gele)</i>	<i>20 ml (4 Gele)</i>
H ₂ O	1,65 ml	3,4 ml	5,05 ml	6,8 ml
30 % Acrylamid	2 ml	4 ml	6 ml	8,0 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS	1,3 ml	2,5 ml	3,8 ml	5,0 ml
10 % (w/v) APS	50 μ l	100 μ l	150 μ l	200 μ l
TEMED	2 μ l	4 μ l	6 μ l	8 μ l

16 % Trenngel:

<i>Komponenten</i>	<i>5 ml (1 Gel)</i>	<i>10 ml (2 Gele)</i>	<i>15 ml (3 Gele)</i>	<i>20 ml (4 Gele)</i>
H ₂ O	0,95 ml	2,0 ml	2,95 ml	3,8 ml
30 % Acrylamid	2,7 ml	5,4 ml	8,1 ml	10,8 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS	1,3 ml	2,5 ml	3,8 ml	5,2 ml
10 % (w/v) APS	50 μ l	100 μ l	150 μ l	200 μ l
TEMED	2 μ l	4 μ l	6 μ l	8 μ l

5 % Sammelgel:

<i>Komponenten</i>	<i>1 ml (1 Gel)</i>	<i>2 ml (2 Gele)</i>	<i>3 ml (3 Gele)</i>	<i>4 ml (4 Gele)</i>
H ₂ O	690 μ l	1,4 ml	2,1 ml	2,8 ml
30 % Acrylamid	170 μ l	330 μ l	500 μ l	670 μ l
1 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS	130 μ l	250 μ l	380 μ l	500 ml
10 % (w/v) APS	10 μ l	20 μ l	30 μ l	40 μ l
TEMED	1 μ l	2 μ l	3 μ l	4 μ l

Laufpuffer (10x):

Tris-HCl	250 mM
Glycin	2 M
SDS	1 % (w/v)

Der pH wurde nicht eingestellt. Er sollte ca. 8,3 betragen.

Coomassie-Lösung:

Coomassie Brilliant Blau G250	0,1 % (w/v)
Ethanol	40 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Entfärbelösung:

Essigsäure	10 % (v/v)
------------	------------

2.7.5 Lösungen für Westernblot*Transferpuffer (1 l):*

Glycin	14,42 g
Tris-Base	3,03 g
Methanol	20 % (v/v)

Glycin und Tris-Base wurden in 800 ml Wasser gelöst und danach 200 ml Methanol zugegeben. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt, er sollte 8,3 betragen.

Blocking-Lösung:

BSA in 1x TBS gelöst	3 % (w/v)
----------------------	-----------

2.7.6 Lösung für die Bestimmung der Proteinkonzentration*Bradford Reagenz:*

Coomassie Brilliant Blue G250	100 mg
Ethanol (99 %)	50 ml
Phosphorsäure (85 %)	100 ml

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C gerührt, anschließend zweimal filtriert und Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 200 ml zugegeben.

2.7.7 Puffer für die Aufreinigung von GatDH

PMSF wurde den Puffern immer frisch kurz vor Gebrauch zugegeben.

Lysepuffer:

NaH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	0,5 M
PMSF	0,1 mM
pH	7,4

Waschpuffer A (Ni-NTA-Affinitätschromatographie I):

NaH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	0,5 M
Imidazol	20 mM
PMSF	0,1 mM
pH	7,4

Elutionspuffer A (Ni-NTA-Affinitätschromatographie I):

NaH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	0,5 M
Imidazol	500 mM
PMSF	0,1 mM
pH	7,4

TEV-Protease-Spaltpuffer:

Tris	50 mM
Na ₂ EDTA	10 mM
DTT	1 mM
pH	8,0

Waschpuffer B (Ni-NTA-Affinitätschromatographie II, Batch):

Bis-Tris	20 mM
Imidazol	1 mM
pH	6,5

Elutionspuffer B (Ni-NTA-Affinitätschromatographie II, Batch):

Bis-Tris	20 mM
Imidazol	300 mM
pH	6,5

Dialysepuffer:

Bis-Tris	20 mM
pH	6,5

2.7.8 Puffer für die Aufreinigung von GatDH Δ C3

PMSF wurde den Puffern immer frisch kurz vor Gebrauch zugegeben.

Lysepuffer:

NaH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	0,5 M
PMSF	0,1 mM
Imidazol	20 mM
pH	7,4

Waschpuffer (Ni-NTA-Affinitätschromatographie):

NaH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	0,5 M
Imidazol	20 mM
pH	7,4

Elutionspuffer (Ni-NTA-Affinitätschromatographie):

NaH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	0,5 M
Imidazol	500 mM
pH	7,4

Puffer A (Anionenaustauscher):

Bis-Tris	50 mM
pH	6,5

Puffer B (Anionenaustauscher):

Bis-Tris	50 mM
NaCl	1 M
pH	6,5

2.7.9 Puffer für die Aufreinigung von SoxS

PMSF und β -Mercaptoethanol wurde den Puffern frisch kurz vor Gebrauch zugegeben.

Lysepuffer:

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	0,3 M
pH	8,0
β -Mercaptoethanol	5 mM
PMSF	0,1 mM

Waschpuffer (Ni-NTA-Affinitätssäule):

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	0,3 M
Imidazol	20 mM
pH	8,0
β -Mercaptoethanol	5 mM
PMSF	0,1 mM

Elutionspuffer (Ni-NTA-Affinitätssäule):

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	0,3 M
Imidazol	250 mM
pH	8,0
β -Mercaptoethanol	5 mM
PMSF	0,1 mM

Dialyse-/Gelfiltrationspuffer:

Tris	50 mM
pH	7,5
β -Mercaptoethanol	5 mM

2.8 Kristallisationslösungen

Alle Kristallisationslösungen der Initial-Screens wurden aus vorgefertigten Kits (Hampton-Research, Aliso Viejo, USA) entnommen. Für alle anderen Ansätze wurden jeweils Stammlösungen der einzelnen Komponenten mit einer Konzentration von 0,5 M oder 1 M angesetzt und sterilfiltriert (\varnothing 0,2 μ m). PEG-Stammlösungen wurden mit einer Konzentration von 50 % (w/v) angesetzt und nicht filtriert. Die Kristallisationsansätze wurden kurz vor der Kristallisation zusammenpipettiert.

2.9 Geräte und Zubehör**Tab. 7:** Verwendete Geräte und ihre Hersteller

	<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Analysenwaagen	Ohaus Explorer	Ohaus (Schweiz)
	Sartorius Basic BP6100	Sartorius (Göttingen)
	Sartorius Basic BP61S	Sartorius (Göttingen)
	Sartorius Handy H120	Sartorius (Göttingen)
	Kern 440-47N	Kern (Balingen)
Blockthermostat	TCR100	Roth (Karlsruhe)
	AccuBlock TM	Labnet (Ried, Österreich)
Blot-Apparatur	Mini Trans-Blot [®] Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad (München)
Brutschränke		Binder (Tuttlingen)
Chromatographie-Systeme	ÄKTAbasic FPLC	GE (München)
	ÄKTApurifier FPLC	GE (München)

	FPLC-System	Pharmacia (Freiburg)
Computer	Intel® Pentium® 4-Prozessor, NVIDIA Quadro4 580XGL- Graphikkarte	Dell (Frankfurt/Main)
Gelelektrophorese (DNA)	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad (München)
Gelelektrophorese (Protein)	Mini Protean3	Bio-Rad (München)
Konzentratoren	Vivaspin 20 und 500	Vivascience (Göttingen)
	Amicon Ultra-15	Millipore (Bedford, USA)
	Microcon YM-10	Millipore (Bedford, USA)
Kristallisationsroboter	Mosquito®	TTP LabTech Ltd (Melbourne, UK)
Küvetten	UV-Quarzküvette	Hellma (Jena)
	Einmal-UV-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
MALDI-System	4800 MALDI TOF/TOF Analyzer	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Mikroskope	CX31	Olympus (Hamburg)
	SZX16 mit Digitalkamera DP-20	Olympus (Hamburg)
	Discovery.V20	Zeiss (Jena)
PCR-Gerät	My Cycler™	Bio-Rad (München)
pH-Messgerät		inoLab (Weilheim)
Pipetten	Pipetman	Gilson Int. B.V. (Bad 2µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl Camberg)
Power Supply	PowerPac 300	Bio-Rad (München)
	PowerPac basic	Bio-Rad (München)
Rotator	Intelli-Mixer	neoLab (Heidelberg)
Rührer	RH-KT/C	IKA (Staufen)
	Variomag Mono	Komet Group (Besigheim)

Schüttler (für Gele)	KS 250 basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Schüttelinkubatoren	Minitron	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
	Unitron	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
Sonifikator	Bandelin HD 70	Bandelin (Berlin)
Spektralphotometer	Nanodrop [®] ND-1000	Peqlab (Erlangen)
	UV/VIS- Spektralphotometer SmartSpec [™] Plus	Bio-Rad (München)
	UV/VIS- Spektralphotometer Ultrospec 2100 pro mit Temperatur-Kontroll-Einheit	Amersham Biosciences (Freiburg)
Transilluminator	ColorControl	Desaga Sarstedt Group (Nümbrecht)
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK106	Bandelin (Berlin)
Kristallisationsinkubator	Weinklimaschränke	Liebherr (Ochsenhausen)
Zellaufschlussgerät	EmulsiFlex-C3	Avestin (Mannheim)
Zentrifugen	Zentrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
	Zentrifuge Biofuge PrimoR	Heraeus [®] (Kendro, Langenselbold)
	Zentrifuge Microfuge [®] 18	Beckman Coulter (Krefeld)
	Zentrifuge Minispin plus	Eppendorf (Hamburg)
	Zentrifuge Avanti [™] J-25	Beckman Coulter (Krefeld)

2.10 Röntgenquellen/Synchrotron-Beamlines

Anlage Universität des Saarlandes, Homburg:

Röntgeneratore/ Goniostat	Xcalibur PX Ultra	Oxford Diffraction (Yarnton, UK)
Detektor	Xcalibur Onyx CCD (165 mm)	Oxford Diffraction (Yarnton, UK)
Cryosystem	Cryo-System Cryojet XL	Oxford Instruments (Oxford, UK)

Anlage Christian-Albrechts-Universität zu Kiel:

Röntgeneratore	I μ S Incoatec Mikrofocus	Incoatec (Geesthacht)
Goniostat	mar345dtb desktop beamline	MarResearch (Norderstedt)
Detektor	mar345 Image Plate (345 mm)	MarResearch (Norderstedt)
Cryosystem	700 Series Cryostream Cooler	Oxford Cryosystems (UK)

ESRF (Grenoble, Frankreich):

<i>Beamline</i>	<i>Detektor</i>
ID14-1	ADSC Q210 CCD (ADSC Corp., Poway, USA)
ID14-2	ADSC Q4R CCD (188 mm) (ADSC Corp., Poway, USA)
ID14-3	ADSC Q4R CCD (188 mm) (ADSC Corp., Poway, USA)
ID14-4	ADSC Q315r CCD (ADSC Corp., Poway, USA)
ID23-1	ADSC Q315r CCD (ADSC Corp., Poway, USA)
ID23-2	MarMOSAIC 225 CCD (MarResearch, Norderstedt)
ID29	ADSC Q315r CCD (ADSC Corp., Poway, USA)

EMBL/DESY (Hamburg):

<i>Beamline</i>	<i>Detektor</i>
X11	MarCCD (165 mm) (MarResearch, Norderstedt)
X12 (MAD-Beamline)	MarMOSAIC 225 CCD (MarResearch, Norderstedt)
X13	MarCCD (165 mm) (MarResearch, Norderstedt)

Bessy (Hamburg):

<i>Beamline</i>	<i>Detektor</i>
14.2	MX-225 CCD (Rayonics, Evanston, USA)

2.11 Verbrauchsmaterialien Kristallisation

Kristallisationsplatten	Linbro [®] 24-Well Plate	ICN (Eschwege)
Deckgläser	Ø 22 mm	Roth (Karlsruhe)
Siliconpaste	Baysilone Paste mittelviskos	Bayer (Leverkusen)
Kristallisationsplatten (Mosquito [®])	96-Well Sitting-Drop High-Throughput Crystallography Plate	Axygen (Union City, USA)
Micro-reservoir-stripes (Mosquito [®])	8-well (2 µl und 5 µl)	TTP LabTech Ltd (Melbourne, UK)
Nylonschleifen, montiert auf Magnetcaps	verschiedene Größen/Dicken: 0,05-0,1 µm bis 0,2-0,3 µm	Hampton Research (Aliso Viejo, USA)
Vials/Caps		Hampton Research (Aliso Viejo, USA)
Litholoops	verschiedene Größen	Molecular Dimensions (Stowmarket, Suffolk, UK)

2.12 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Tab. 8: verwendete Computerprogramme und Online-Datenbanken

<i>Programmpaket, Version</i>	<i>Hersteller/Literatur</i>
APBS	Lerner (2004)
ARP/wARP, Versionen 5.0 – 7.0	Morris <i>et al.</i> (2003)
Autorickshaw	The EMBL-HH automated crystal structure determination platform (Panjikar <i>et al.</i> , 2005)
CCP4 Programmpaket, Versionen 4.1 – 6.0.2	Collaborative Computational Project 4 (1994)
ClustalW	Thompson <i>et al.</i> (1994)
CNS Version 1.1	Brünger (1998)
COOT, Version 0.4.1	Crystallographic Object-Oriented Toolkit (Emsley & Cowtan, 2004)
CrysAlis, Version 1.171.21 beta	Oxford Diffraction (Oxford, England)
DALI	Holm & Sander (1996)
DENZO	Otwinowski & Minor (1997)
DM	Cowtan & Main (1998)
DSSP	Kabsch (1983)
EMACS, Version 21.3.1	Free Software Foundation, Inc. (Boston, USA)
EMBOSS	The European Molecular Biology Open Software Suite (2000)
ESPrript Version 2.2	Gouet <i>et al.</i> (1999)

ExPASy	Expert Protein Analysis System; http://expasy.ch/
HIC-UP	Hetero-compound Information Centre – Uppsala (Kleywegt & Jones, 1998)
MOLREP	Vagin & Teplyakov (1997)
MOSFLM	Leslie <i>et al.</i> (1992)
O, Versionen 8.011-9.03	Jones <i>et al.</i> (1991)
PDB	Protein Data Base, http://rcsb.org (Berman <i>et al.</i> , 2000)
PROCHECK, Version 3.5	Laskowski <i>et al.</i> (1993)
PRODRG	The Dundee PRODRG2 Server; http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg/ (Schüttelkopf & van Aalten, 2004)
PISA	Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies (Krissinel & Henrick, 2007)
PyMOL, Versionen 0.90 – 0.97	Delano (2004)
REFMAC5	Murshudov <i>et al.</i> (1997)
SCALEPACK	Otwinowski & Minor (1997)
SFCHECK	Vaguine <i>et al.</i> (1999)
SHELXC, D und E; Version 1997-2008	Sheldrick <i>et al.</i> (2008); Schneider & Sheldrick (2002); Sheldrick <i>et al.</i> (2002);
SUPERPOSE	Maiti <i>et al.</i> (2004)
Swiss-Model	An automated protein homology-modeling server (Schwede <i>et al.</i> , 2003)
XDS Programmpaket (XDS, XSCALE, XDSCONV); Versionen 2005-2008	Kabsch (1993)

2.13 Molekularbiologische Methoden

2.13.1 Kulturbedingungen

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in LB-Flüssigmedium bei 220 rpm (Schüttelradius 25 mm) und 37°C. LB-Agarplatten wurden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.13.2 Optische Dichte

Zur Ermittlung der optischen Dichte einer Bakterienkultur (*E. coli*) wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem UV/Vis-Spektrometer (Amersham, Bio-Rad) gemessen. Als Referenz wurde das entsprechende unbeimpfte Medium eingesetzt.

2.13.3 Herstellung DMSO-kompetenter Zellen

Der jeweilige *E. coli*-Stamm wurde in 40 ml LB-Medium bei 18-20 °C über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 angezogen. Bei Stämmen, welche schon mit einem Plasmid transformiert waren, wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Die Ansätze wurden 10 min auf Eis gestellt, danach die Zellen durch Zentrifugation (4 °C, 2.500g, 10 min) geerntet und der flüssige Überstand gut entfernt (durch Trocknen des umgedrehten Gefäßes auf Papiertüchern). Das Pellet wurde in 13 ml eisgekühltem Transformationspuffer gewaschen (4 °C, 2.500g, 10 min) und anschließend in 8 ml Transformationspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 240 µl DMSO wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert, anschließend in 1,5 ml-Eppendorfgläser aliquotiert (je 100 µl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur ihrer Verwendung wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

2.13.4 Transformation von Plasmid-DNA

Zur Transformation wurden die DMSO-kompetenten Zellen aufgetaut und 10 min auf Eis inkubiert. Pro 100 µl-Aliquot wurde ca. 10-25 ng DNA zugegeben und der Ansatz nochmals 30 min auf Eis inkubiert. Bei Transformation von Ligationsansätzen wurde bis zu 100 µg DNA eingesetzt. Der Hitzeschock erfolgte für 90 s bei 42 °C im Thermoblock, direkt danach wurde der Ansatz 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zur Stabilisierung in 800 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) resuspendiert und 45 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (RT, 5.000g, 10 min), der Überstand entfernt und die Zellen in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Der gesamte Ansatz wurde auf selektiven LB-Platten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.13.5 Plasmidisolierung aus Bakterien

2.13.5.1 Alkalische Lyse

Die alkalische Lyse nach Birnboim und Doly wird zur Gewinnung von Plasmid-DNA in hoher Zahl aus Bakterien eingesetzt (Birnboim & Doly, 1973). Die Bakterienzellen werden dabei durch SDS und NaOH lysiert. SDS denaturiert bakterielle Proteine, NaOH chromosomale DNA und Plasmid-DNA. Bei der Neutralisierung durch Kaliumacetat kommt es zum „Reannealing“ der kovalent geschlossenen Plasmid-DNA. Diese verbleibt zusammen mit der RNA im Überstand, chromosomale DNA und bakterielle Proteine präzipitieren. Die DNA und RNA im Überstand wird mittels Ethanol gefällt. Beim anschließenden Verdau der Plasmid-DNA kann RNase (DNase-frei) zugegeben werden, um die RNA zu entfernen.

Für die alkalische Lyse wurden 1,5 ml Zellsuspension von Übernachtskulturen 20 s bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, das Zellpellet in 100 µl GTE-Lösung resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl NaOH/SDS-Lösung wurde vorsichtig gemischt und der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 150 µl Kaliumacetat-Lösung (pH 4,8) zugegeben, vorsichtig gemischt und der Ansatz nochmals 5 min auf Eis inkubiert. Nach 3 min Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand mit 800 µl Ethanol (95 % (v/v)) versetzt und 2 min bei RT inkubiert. Nach 2 min Abzentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit wurde das Pellet (die gefällte DNA) in 1 ml Ethanol (70 % (v/v)) gewaschen, getrocknet und in 20 µl sterilem bidestilliertem Wasser gelöst. Anschließend erfolgte ein Kontrollverdau der DNA.

2.13.5.2 Plasmidisolierung mittels DNA-Präparationskit

Zur Sequenzierung von Plasmiden sowie deren Transformation in Bakterienstämmen zur Expression oder Plasmidamplifizierung erfolgte die Plasmidpräparation durch den QIAprep Spin Miniprep Kit oder den Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach dem von der Firma angegebenen Protokoll. Das Prinzip besteht aus einer modifizierten alkalischen Lyse mit anschließender Bindung der DNA an eine Silikamembran. Nach verschiedenen Waschschrritten wurde die DNA mit 50-100 µl sterilem bidestillierten Wasser (je nach Herstellerangaben) von der Säule eluiert. Diese Methode erlaubt die Isolierung von Plasmid-DNA ohne Verunreinigungen durch Proteine und RNA im Gegensatz zur alkalischen Lyse.

2.13.6 Konzentrationsmessung der isolierten DNA

Zur Ermittlung der DNA-Konzentration wurde im UV/Vis-Spektrometer (Amersham, Freiburg) die Absorption bei 260 nm gemessen. Als Referenz diente Wasser. Die Konzentration errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{DNA-Gehalt } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \varepsilon_{260 \text{ nm}} \cdot 50 \mu\text{g/ml} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Bestimmung der DNA-Reinheit wurde außerdem der Quotient der Extinktionen gemessen, $\varepsilon(260 \text{ nm})/\varepsilon(280 \text{ nm})$. Bei reiner DNA liegt der Quotient bei 1,8. Werte niedriger als 1,8 weisen auf Verunreinigungen durch Proteine hin, höhere als 1,8 sprechen für einen hohen RNA-Gehalt.

2.13.7 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen vom Typ II sind bakterielle Enzyme, die dsDNA an bestimmten palindromischen Erkennungssequenzen, gewöhnlich aus 4 bis 6 Basen bestehend, schneiden. Dabei entstehen entweder glatte Enden („blunt ends“) oder überhängende Einzelstränge („*sticky ends*“). Letztere eignen sich besser zur Ligation. Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen erlaubt das Schneiden von DNA an bestimmten Sequenzen und ermöglicht dadurch die Klonierung von DNA und die Ermittlung von Größen von DNA-Fragmenten sowie ihrer Lage im Vektor.

Für einen Verdau wurde pro Ansatz ca. 0,5-1 µg DNA mit den Restriktionsenzymen (1 U/µg DNA) in den entsprechenden 10x Puffern 1 h bei 37°C inkubiert. Bei Plasmid-DNA, deren Isolierung mittels alkalischer Lyse erfolgte, wurde zusätzlich 0,25-0,5 µl RNase zum Verdauansatz gegeben. Für Ligationen wurden entsprechend größere Mengen an DNA (5-10 µg) verdaut.

2.13.8 Agarosegele

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Trennung von DNA-Fragmenten aufgrund ihrer Größe. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Moleküls im elektrischen Feld hängt von seiner Form und seiner elektrischen Ladung ab. Die DNA ist normalerweise durch die Phosphatgruppen negativ geladen und wandert in Richtung Anode. In einem Agarosegel wirken die Poren wie ein Molekularsieb, kleinere Moleküle erfahren einen geringeren Widerstand und wandern schneller als größere Moleküle. Die mittlere Größe der Poren wird durch die Agarosekonzentration festgelegt.

Die DNA-Fragmente wurden in 0,8 %igen Gelen bei 8 V/cm in einer horizontalen Gelkammer (Bio-Rad, München) aufgetrennt. Für analytische Gele wurde TBE-Puffer verwendet, für präparative Gele TAE-Puffer. Die Proben wurden zur Markierung der Lauffront mit 1/10 des Volumens an GLB-Probenpuffer versetzt. Als DNA-Längenstandard wurde der „Smart-Ladder“ (Eurogentec, Köln) verwendet. Die Anfärbung der DNA erfolgte im Ethidiumbromidbad (Volumen-Verhältnis Ethidiumbromid zu Wasser 1:2.500). Ethidiumbromid lagert sich zwischen die Doppelstränge der DNA (interkaliert) und fluoresziert nach UV-Bestrahlung (Anregungswellenlänge: 302 nm, Emissionsmaximum: 590 nm).

2.13.9 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die Isolierung der DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem Perfectprep[®] Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg) oder dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Beide sind für DNA-Fragmente der Länge 70 bp bis 10 kb geeignet. Die zu isolierende DNA wird an eine Silikamembran gebunden, gewaschen und mit Wasser wieder eluiert. Diese Methode ermöglicht die Isolierung von DNA aus TBE- oder TAE-Gelen ohne Verunreinigungen durch Agarose, Ethidiumbromid, Proteinen und Salzen. Die Bande der zu isolierenden DNA wurde mit einem sterilem Skalpell aus dem TBE-Gel ausgeschnitten, in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und das Volumen des Gelstückchens über das Gewicht bestimmt (Annahme: 1 mg Gel = 1 µl Volumen). Das Gel wurde im dreifachen Volumen Bindungspuffer im Heizblock bei 50 °C vollständig geschmolzen, danach das einfache Volumen an Isopropanol zugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde vollständig auf die Säule gegeben und bei 9000 rpm 1 min zentrifugiert. Danach wurde einmal mit 750 µl Waschpuffer gewaschen und die Säule getrocknet. Der Säulendurchfluß wurde jeweils verworfen. Die DNA wurde mit 30 µl sterilem bidestilliertem Wasser von der Säule eluiert. Die Zentrifugationsschritte erfolgten alle ebenfalls 1 min bei 9000 rpm.

2.13.10 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde der Vektor in DH5α transformiert, in diesem Bakterienstamm vervielfältigt und mittels DNA-Präparation (Kapitel 2.13.9) isoliert. 2-3 µg DNA in einem Volumen von 20 µl wurde zur Sequenzierung an eine Firma gegeben (MWG, Ebersberg). Es wurden dort sowohl Standardprimer der Firma verwendet oder spezielle mitgeschickte Primer (10 µl, 10 pmol/µl) verwendet. Die Auswertung der Sequenzierdaten erfolgte mit dem Programm *ClustalW* (EMBOSS, 2000; Thompson *et al.*, 1994).

2.13.11 Kassettenklonierung

Zur Expression von GatDH mit einem N-terminalen (His)₆-Affinitätsmarker durch das Plasmid pET24a_His_GatDH wurde in das Ursprungsplasmid pET24a(+)_nGatDH eine Kassette, welche für die Affinitätssequenz und eine TEV-Protease-Erkennungssequenz kodiert, inkloniert. Dazu wurden 2 einzelsträngige DNA-Stücke entwickelt, welche komplementär zueinander sind, mit Ausnahme von einem Überhang aus 2 Basen an ihren 5'-Enden. Dadurch entstehen „sticky ends“, welche direkt zum Klonieren in den mit *NdeI* geöffneten Zielvektor pET24a(+)_nGatDH eingesetzt wurden. Der kodierende Strang kodiert für einen (His)₆-Affinitätsmarker, gefolgt von einer kurzen, aus Aminosäuren mit kleinen

Seitenketten bestehenden und damit flexiblen Sequenz, und der TEV-Protease-Erkennungssequenz ENLYFQ.

kodierender Strang (+):

5'-TATGCAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA ACT AGT GGC AGT GGT TCT GAG AAC CTG TAT TTT CAG CA-3'
 M H H H H H H G T S G S G S E N L Y F Q H

komplementärer Strang (-):

3'- AC GTA GTG GTA GTG GTA GTG CCT TGA TCA CCG TCA CCA AGA CTC TTG GAC ATA AAA GTC GTAT-5'
 (5'-TATG CTG AAA ATA CAG GTT CTC AGA ACC ACT GCC ACT AGT TCC GTG ATG GTG ATG GTG ATG CA-3')

Die unterstrichenen Basen entsprechen einer geschnittenen *NdeI*-Schnittstelle. Beide Oligonukleotide bestehen aus 63 Basen und besitzen einen GC-Gehalt von 46 % mit einem Schmelzpunkt (T_m) von 77,8 °C, welcher nach folgender Formel berechnet wurde:

$$T_m = 69,3 \text{ °C} + 0,41 \times \text{GC-Gehalt [\%]} - 650/\text{Oligonukleotidlänge [bp]}$$

2.13.11.1 Komplexieren der Einzelstränge

Die in bidestilliertem Wasser gelösten Einzelstränge wurden im Verhältnis 1:1 mit einer Konzentration von 100 pmol/ μ l zusammengegeben und unter langsamen Abkühlen zu einem Doppelstrang mit einer Endkonzentration von 50 pmol/ μ l komplexiert. Ein davor gesetzter Denaturierungsschritt sollte eventuelle unspezifische Anlagerungen der Oligonukleotide verhindern. Die Komplexierung wurde in einem PCR-Cycler (MyCycler, Bio-Rad) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dekrement	Zeit
Denaturierung	1	95°C	-	10 min
Annealing	Gradient I	90 °C	-	2 min
	Gradient II	85-65 °C	0,5 °C	2 min
	Gradient III	60 °C	-	2 min
	Gradient IV	50 °C	-	2 min

2.13.11.2 Verdau des Zielvektors

Parallel wurde der Zielvektor pET24a(+)_nGatDH mit *NdeI* verdaut. Für einen Verdau wurde pro Ansatz ca. 6 μ g DNA mit 100 U des Restriktionsenzym (20 U/ μ l) in dem entsprechenden Puffer 2,5 h bei 37°C inkubiert.

2.13.11.3 Dephosphorylierung des linearisierten Vektors

Nach dem Verdau wurde der Vektor mit alkalischer Phosphatase aus Shrimp (SAP) dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden. Zu 1 pmol 5'-DNA-Enden wurde 1 U SAP zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die SAP 15 min bei 65 °C inaktiviert.

Der linearisierte Vektor wurde auf ein 0,8 % iges TAE-Gel aufgetragen und aus dem Gel isoliert. Dies diente erstens zur Überprüfung der Linearisierung und dem Trennen des linearisierten von ungeschnittenem Vektor im Ansatz, um später einen Hintergrund von transformierten Zellen mit dem Originalplasmid zu verhindern. Zweitens wurde der Ansatz dadurch von verwendeten Enzymen und ihren Puffern gereinigt.

2.13.11.4 Ligation

Bei der Ligation katalysieren DNA-Ligasen die Bildung der Phosphodiesterbrücke zwischen freien 5'-Phosphatgruppen und freien benachbarten 3'-Hydroxylgruppen von dsDNA. Die T4-DNA-Ligase benötigt ATP, die DNA-Ligase von *E. coli* NAD⁺ als Kofaktoren.

Zur Ligation wurde 300 ng Vektor-DNA eingesetzt. Die Menge an Insert wurde nach folgender Gleichung berechnet, wobei ein Vektor/Insert-Verhältnis von 3:1, 1:1, 1:3 und 1:5 gewählt wurde:

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Vektor [ng]} \times \text{Insertgröße [bp]}}{\text{Vektorgröße [kb]}} \times \text{Insert/Vektor-Verhältnis}$$

Der Ligationsansatz wurde nach folgendem Schema zusammengestellt:

Vektor-DNA	300 ng
Insert-DNA	X ng
Puffer (10x)	2 µl
Ligase (1 U/µl)	1,5 µl
H ₂ O	bis 20 µl

Die DNA in Wasser wurde erst 15 min bei 45 °C erhitzt, um unspezifische Bindungen zu lösen, danach der Puffer und die Ligase zugegeben und der Ansatz 16-20 h bei 16 °C inkubiert. Zur Transformation in *E. coli* DH5α oder XL-1 wurde 30-120 ng DNA pro 200 µl kompetente Zellen eingesetzt.

2.14 Proteinchemische Methoden

2.14.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE nach Shapiro *et al.* (1967) dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen im elektrischen Feld ist dabei abhängig von der Porengröße des Gels sowie der Ladung, der Form und der Größe der Proteine. Durch Zugabe von SDS („Sodium dodecyl sulfate“) werden die Proteine denaturiert und erhalten eine negative Ladung, sodass sie im elektrischen Feld entsprechend ihrem Molekulargewicht zur Anode wandern. Die Gelmatrix entsteht durch Polymerisation des Acrylamids und des quervernetzenden *N,N*-Bisacrylsäureamids, wobei die Porengröße von der Konzentration des Acrylamids abhängig ist.

Zur Auftrennung der Protein-Gemische wurde je nach Molekulargewicht der Proteine ein 12 oder 16 %iges Tris/Tricin-Gel (0,75 mm Dicke) verwendet (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.7.4). Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min aufgekocht und je nach Taschengröße 10-20 µl aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20-40 mA pro Gel im vertikalen Elektrophoresesystem (Bio-Rad, München). Als Molekulargewichtsmarker wurde der LMW-Marker (GE Healthcare, München) verwendet, welcher folgende Eichproteine enthält:

Phosphorylase b	97,0 kDa
Rinderserumalbumin	66,0 kDa
Ovalbumin	45,0 kDa
Carboanhydrase	30,0 kDa
Trypsin-Inhibitor	20,1 kDa
α-Lactalbumin	14,4 kDa

Danach wurden die Proteine mittels Coomassie-Färbung angefärbt oder auf eine PVDF-Membran überführt und mittels spezifischer Antikörper detektiert.

2.14.2 Coomassie-Färbung

Zur Coomassie-Färbung wurde das Gel erst in ca. 20 ml Färbelösung aufgekocht und 5 min unter leichtem Schütteln gefärbt. Danach wurde die Färbelösung entfernt und das Gel ein- bis zweimal in ca. 20 ml Entfärber erhitzt. Die Proteinbanden bleiben weiter angefärbt, während der Hintergrund entfärbt wird.

2.14.3 Westernblot und Immundetektion

2.14.3.1 Westernblot

Im Westernblot werden die negativ geladenen, in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine positiv geladene Membran transferiert, um sie anschließend immunologisch nachzuweisen (Towbin *et al.*, 1979; Burnette *et al.*, 1981).

Die zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran (Roth, Karlsruhe) geblottet. Dazu wurde das Gel 20 min in eiskaltem Transfer-Puffer äquilibriert, um Salze und Detergenzien zu entfernen. Die PVDF-Membran wurde zuerst mit 100 % Methanol getränkt und anschließend 10 min in Transferpuffer äquilibriert. In der Blotting-Apparatur (Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, München) wurde das Gel auf die Membran zwischen 2 Whatman-Papiere gelegt, um den direkten Kontakt mit den Elektroden zu vermeiden und 2,5 h bei 25 V geblottet. Die negativ geladenen Proteine wandern dabei von dem Gel Richtung Anode auf die PVDF-Membran. Als Molekulargewichtsmarker wurde der PageRuler[™] Prestained Protein-Marker (Novagen, Darmstadt) verwendet.

2.14.3.2 Immundetektion

Zur Immundetektion wurde der His•Tag[®] Monoclonal Antibody-Kit (Novagen, Darmstadt) mit fertigen Lösungen verwendet. Nach dem Blot wurde die Membran zweimal 10 min in je 15 ml 1xTBS gewaschen und zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper 1 h in 15 ml Blockingpuffer (3 % w/v BSA in 1x TBS) inkubiert. Anschließend wurde sie zweimal in 20 ml 1xTBSTT sowie einmal in 15 ml 1xTBS, jeweils 10 min gewaschen. Danach wurde sie 1 h mit dem primären monoklonalen Antikörper gegen den (His)₆-Affinitätsmarker (1:1.000 verdünnt in Blockingpuffer) inkubiert, zweimal 10 min in 20 ml 1xTBSTT und einmal 10 min in 15 ml 1xTBS zur Entfernung ungebundener Antikörper gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären, mit alkalischer Phosphatase konjugierten Ziege-Anti-Mouse-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:5.000 in 8 ml Blockingpuffer). Ungebundener Antikörper wurde durch 5-maliges Waschen für 10 min mit 20 ml 1xTBSTT entfernt.

Der kolorimetrische Nachweis der Proteine erfolgte durch NBT/BCIP. Die konjugierte alkalische Phosphatase dephosphoryliert BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat), welches oxidativ als blauer Indigofarbstoff ausfällt. Das NBT (Nitroblau-Tetrazolium) wirkt dabei als Oxidationsmittel und wird zum purpurfarbenen Diformazan umgesetzt, wodurch es zusätzlich farbverstärkend wirkt. 60 µl NBT-Lösung und 60 µl BCIP-Lösung wurden frisch in 15 ml

AP-Lösung verdünnt und die Membran darin inkubiert. Die Färbereaktion wurde mit deionisiertem Wasser gestoppt.

2.14.4 Proteinexpression

2.14.4.1 Testexpression

Zur Testexpression wurde das entsprechende Expressionsplasmid in verschiedene *E. coli* Expressionsstämme transformiert. Mit jeweils 1-4 Klonen wurden 5 ml LB-Kulturen angeimpft und über Nacht anwachsen gelassen. Mit der am besten gewachsenen Kultur wurde eine 250-500 ml Kultur angeimpft und diese bei 37 °C bis zu einer OD von 0,6 inkubiert, auf kleinere Kolben aufgeteilt (ca. 10-25 ml) und damit unterschiedliche Expressionsparameter getestet. Das Volumen des Mediums sollte dabei nicht mehr als 20 % des Volumens der Gefäße überschreiten. Folgende Expressionsbedingungen wurden in Kombination durchgetestet:

Temperatur: 20 °C, 25°C, 30 °C, 37 °C

IPTG-Konzentration: 0 mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 1 mM

Induktionszeit: 3-5 h und über Nacht (ca. 16 h)

Es wurde jeweils vor der Induktion, nach 1 h, 3 h, 5 h und über Nacht Proben entnommen und die Proteinzusammensetzung mittels SDS-PAGE analysiert. Dazu wurde je 1 ml Kultur abzentrifugiert und das Pellet in 1xPBS-Puffer resuspendiert. Dabei wurde jeweils 500 µl Puffer pro OD₆₀₀-Absorption von 1 zugegeben. 15 µl der resuspendierten Zellen wurden mit 15 µl SDS-Ladepuffer aufgekocht und entsprechend Kapitel 2.14.1 getestet.

2.14.4.2 Großexpression

Zur Expression in großem Maßstab wurde der Expressionsvektor in den Expressionsstamm transformiert oder eine Glycerinkultur frisch ausgestrichen. Eine Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium 6-8 h angezüchtet und mit diesen Zellen eine größere Kultur (100 ml LB) im Verhältnis 1/1000 angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6 l autoklaviertes LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika wurde auf 5 l Schüttelkolben mit Schikanen verteilt. Das Volumen des Nährmediums sollte dabei nicht mehr als 20 % des Volumens des Gefäßes betragen. Die Kultur wurde mit 1/100 der Vorkultur angeimpft. Dazu wurde die entsprechende Menge der Vorkultur abzentrifugiert und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Die Kultur wurde bei 37 °C und 150 rpm (Ø 50 mm, Unitron, Infors) geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,7-1,5 erreicht wurde. Bei zu

großer Schaumbildung wurden 2-5 Tropfen Antifoam A zugegeben. Die Temperatur wurde auf die Expressionstemperatur erniedrigt und die Zellen weitere 30 min inkubiert. Danach wurde die Überexpression mit 0,5-1 mM IPTG induziert, die Zellen nach 3-5 h geerntet und in dem entsprechenden Lysepuffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Proteinaufreinigung bei -80 °C gelagert.

Während der Expression wurde vor der Induktion und in regelmäßigen Abständen nach der Induktion Proben entnommen und diese mittels SDS-PAGE analysiert.

2.14.4.3 Selenomethionin-Expression

Eine Möglichkeit, das kristallographische Phasenproblem zu lösen, ist die MAD-Methode (siehe Kapitel 2.15.3.5). Dabei kann z.B. der anomale Streubeitrag von Selen genutzt werden. Dazu wird bei der Proteinexpression Methionin durch Selenomethionin ersetzt, unter Verwendung spezieller auxotropher *E. coli*-Stämme. In dieser Arbeit wurde dagegen ein modifiziertes Protokoll von Guerrero *et al.*, bei dem keine Spezial-Stämme verwendet wurden, angewendet. Der Stamm, der zur Expression des nativen Proteins verwendet wurde, wurde direkt von LB-Medium auf SeMet-enthaltendes Medium umgestellt (Guerrero *et al.*, 2001).

Die Zellen wurden in 500 ml LB-Medium, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, 16 h angezogen, geerntet und mit sterilem, deionisiertem Wasser gewaschen. Mit diesen Zellen wurde 2 l Selenomethionin-Expressions-Medium, mit L-Selenomethionin (40 µg/ml) und den entsprechenden Antibiotika versetzt, angeimpft. Die OD₆₀₀ sollte dabei zu Beginn 1,0 betragen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 30 °C wurde die Überexpression mit 0,4 mM IPTG induziert. Nach 5 h wurden die Zellen geerntet, in Lysepuffer gewaschen und bis zur Proteinaufreinigung bei -80 °C gelagert. Während der Expression wurde vor der Induktion und in regelmäßigen Abständen nach der Induktion Proben entnommen und diese mittels SDS-PAGE analysiert.

2.14.5 Proteinaufreinigung

2.14.5.1 Zellaufschluss

Die in 50 ml Reaktionsgefäßen eingefrorenen Zellen wurden in kaltem Wasser aufgetaut und in dem entsprechenden eiskalten Lysepuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels eines Zellhomogenisators (Avestin, Mannheim) bei 16.000 Psi. War die Viskosität des Lysats durch chromosomale DNA erhöht, wurde eine kleine Spatelspitze DNase zugegeben.

Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (4 °C, 75.000g, 1-2,5 h) sedimentiert und der Überstand auf eine Ni-NTA-Agarose-Matrix gegeben.

2.14.5.2 Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Affinitätschromatographie ist die reversible Interaktion von Proteinen mit einem Ligand, der an eine Matrix gekoppelt ist. Bei der Ni-NTA-Affinitätschromatographie sind die Liganden zweiwertige Ionen, vor allem Ni^{2+} , welche über den Chelatbildner Nitriolo-Tri-Essigsäure (NTA) immobilisiert sind. Proteine, welche komplexbildende Aminosäuren wie Histidin auf der Oberfläche exponieren, werden an der Matrix gebunden und können durch Imidazol wieder eluiert werden. Außer Ni^{2+} -Ionen können auch andere zweiwertige Ionen eingesetzt werden, z.B. Cu^{2+} , Zn^{2+} und Co^{2+} .

Die Aufreinigung erfolgte an einem ÄKTA-System mit fertig- oder selbstgepackten Säulen (GE Healthcare, München) oder im Eintopf-(*Batch*-)Verfahren. Der Verlauf wurde über die UV-Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Säulen wurden in 20 % Ethanol gelagert und kurz vor Gebrauch mit destilliertem Wasser gewaschen und dann mit 2 Säulenvolumen Waschpuffer äquilibriert. Der Zellüberstand wurde über eine Probenschleife (Superloop mit 150 ml Fassungsvermögen, Amersham, Freiburg) mit einer Flussrate zwischen 1-2 ml/min aufgetragen. Danach wurde mit Waschpuffer solange gewaschen, bis die UV-Absorption wieder die Basislinie erreicht hatte. Der Waschpuffer enthielt 20 mM Imidazol, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Die Elution erfolgte mittels eines Imidazolgradienten, je nach Bindungsstärke des $(\text{His})_6$ -markierten Proteins mit Konzentrationen zwischen 250 und 500 mM. Die gesammelten Fraktionen (1-10 ml) wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

2.14.5.3 Gelfiltration

Die Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie erfolgte an einem ÄKTA-System mit fertig gepackten Superdex 200-Säulen (GE Healthcare, München) mit einem Matrix-Volumen von 124 ml. Der Verlauf wurde über die UV-Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Säulen wurden in 20 % Ethanol gelagert und kurz vor Gebrauch mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 2 Säulenvolumen Laufpuffer äquilibriert. Das aufzureinigende Proteingemisch wurde über eine Probenschleife (5 ml) mit einer Flussrate von 1-1,5 ml/min aufgetragen, die Elution erfolgte mit der gleichen Flussrate. Je höher das Molekulargewicht eines Proteins, desto kürzer ist seine Retentionszeit auf der Säule. Die gesammelten

Fraktionen (1-5 ml Fraktionengröße) wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung getestet.

2.14.5.4 Anionenaustauscher-Chromatographie

Das Prinzip der Ionenaustauscher-Chromatographie beruht auf der Trennung von Proteingemischen aufgrund ihrer unterschiedlichen Oberflächenladungen. Die Ladung eines Proteins bei einem bestimmten pH-Wert hängt von seinem isoelektrischen Punkt (pI) ab. Ist der pH-Wert der Umgebung höher als sein pI, so besitzt das Protein eine negative Gesamtladung und bindet an eine Matrix, die mit positiv geladenen Gruppen besetzt ist (Anionenaustauscher). Liegt der pH-Wert darunter, kann das Protein wegen seiner positiven Ladung an eine negativ geladene Matrix (Kationenaustauscher) binden. Die Proteine können durch die Erhöhung der Ionenstärke, z.B. durch Salze wie NaCl, eluiert werden, wobei die Ionen, Na⁺ bzw. Cl⁻, die Proteine verdrängen. Je höher die Ladung eines Proteins ist, desto höher muss die Ionenstärke sein.

Die Aufreinigung erfolgte an einem ÄKTA-System mit fertig gepackten HyperD[®]F-Säulen (PALL, VWR, Darmstadt) mit 1 ml Matrix. Der Verlauf wurde über die UV-Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Säulen wurden in 20 % Ethanol gelagert und kurz vor Gebrauch direkt mit zwei Säulenvolumen Puffer A (ohne NaCl) äquilibriert. Das aufzureinigende Proteingemisch wurde mittels Probenpumpe mit einer Flussrate von 1-1,5 ml/min aufgetragen und die Säule solange mit Puffer gewaschen, bis die UV-Absorption wieder die Basislinie erreicht hatte. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten (eingestellt mit Puffer B) von 0-1 M NaCl über 45-60 Säulenvolumen.

2.14.5.5 Dialyse

Die Dialyse wurde zum Wechseln des Puffers oder zum Entfernen von Imidazol und Salzen verwendet. Es wurden Dialyseschläuche mit einem Ausschlussvolumen von 3 kDa (für SoxS) und 10-12 kDa (für GatDH) verwendet.

Alternativ wurde mit Hilfe von Konzentratoren das Protein umgepuffert. Hierbei wurden je nach Volumen der Proteinlösung Microcons oder Amicons (Millipore, Bedford, USA) mit einem Ausschlussvolumen von 3 und 12 kDa verwendet.

2.14.5.6 Abspaltung des Affinitäts-Markers mittels TEV-Protease

Die TEV-Protease aus dem *Tobacco-Etch-Virus* (TEV) ist eine sehr spezifische Cystein-Protease mit einem Molekulargewicht von 27 kDa. Sie schneidet an der Erkennungssequenz

E-X-X-Y-Q-G/S nach dem Glutamin. Die TEV-Protease wird durch zweiwertige Ionen gehemmt, weshalb dem Spaltpuffer EDTA zugegeben wurde. Im Verdauansatz wurde die Protease im molaren Verhältnis von 1:25 bis 1:5 (Protease:Fusionsprotein) zugegeben. Das Temperaturoptimum liegt bei 34 °C, der Ansatz wurde aber bei 4 °C oder 20 °C inkubiert, um eine Denaturierung des Fusionsproteins zu vermeiden.

2.14.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.14.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt.

Dazu wurde 1-20 µl Proteinlösung mit 1 ml Bradford-Lösung (Roth, Karlsruhe) versetzt und 5 min inkubiert. An einem UV/Vis-Photometer (Amersham, Freiburg) wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Referenz diente ein Ansatz mit Wasser oder dem entsprechenden Puffer der Proteinlösung. Die Proteinkonzentration wurde mittels einer Standardgerade berechnet, die analog mit dem Referenzprotein BSA (*bovine serum albumine*) erstellt wurde.

2.14.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Spektralphotometer

Die aromatischen Aminosäuren absorbieren Licht im ultravioletten Wellenlängenbereich mit Maxima bei 280 nm (Tryptophan und Tyrosin) sowie 260 nm (Phenylalanin). Der molare Extinktionskoeffizient eines Proteins bei 280 nm ist daher abhängig von seinem Anteil an aromatischen Aminosäuren und kann bestimmt, oder wie in dieser Arbeit, theoretisch berechnet werden (Programm *ProtParam*, ExPASy). Die Konzentration eines Proteins kann somit mittels des theoretischen molaren Extinktionskoeffizienten unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes des Proteins annähernd bestimmt werden (Lambert-Beersches Gesetz). 1,5-2 µl Proteinlösung wurde dazu auf den Proben-Sockel des Spektralphotometers (Nanodrop[®]) pipettiert, welches vorher mit Wasser initialisiert wurde. Als Referenz diente Wasser oder der entsprechende Proteinpuffer.

2.14.7 Aktivitätsassay für GatDH

GatDH ist eine Dehydrogenase, welche sekundäre Alkohole aufoxidieren kann unter Reduktion von NAD⁺ zu NADH. NADH absorbiert, im Gegensatz zu NAD⁺, im Wellenlängenbereich von 300 bis 400 nm. Um die Aktivität der GatDH zu bestimmen, wurde die Extinktionszunahme bei 340 nm, dem Absorptionsmaximum des NADH gemessen.

Es wurde folgender Ansatz in eine Küvette pipettiert:

200 mM Bis-Tris-Puffer, pH 9,0; 1 mM MgCl ₂	500 µl
H ₂ O	280 µl
90 mM NAD ⁺	20 µl
Enzymlösung	100 µl

Der Ansatz wurde bei 30 °C inkubiert und ein Nullabgleich vorgenommen. Dann wurde zum Start der Reaktion das Substrat, 100 µl 1,2-Hexandiol (1 M) zugegeben. Es wurde die Absorptionsänderung bei 340 nm über die Zeit verfolgt.

2.15 Biophysikalische und Röntgenographische Methoden

2.15.1 MALLS (*Multiple Angle Laser Light Scattering*)-Messungen

Lichtstreuung kann zur Charakterisierung von Makromolekülen in Lösung angewandt werden. Bei der MALLS-Technik wird die statische Lichtstreuung, oft als Rayleigh-Streuung bezeichnet, verwendet, bei der die Intensität des gestreuten Lichtes als eine Funktion des Winkels Rückschlüsse auf die Größe und Form von Partikeln zulässt. Die Intensität gibt Informationen über die molare Masse, die Winkel-Abhängigkeit Rückschlüsse auf die Größe von Makromolekülen. Bei Proteinen wird oft zusätzlich zu der 90 °-Messung der Rayleigh-Streuung noch bei anderen Winkeln (z.B. 173 ° und 7 °) gemessen.

$$\frac{K^*c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2c$$

wobei gilt:

K^*	$4\pi^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 n_0^2 / (N_A \lambda_0^4)$
n_0	Refraktionsindex des Lösungsmittels
c	Konzentration [g/ml] der löslichen Moleküle
$R(\theta)$	Anteil der Rayleigh-Streuung der Lösung als Funktion des Streuwinkels und der Konzentration; höher als nur durch das Lösungsmittel gestreute Licht
$P(\theta)$	Winkel-Abhängigkeit des gestreuten Lichtes
dn/dc	Inkrement des Refraktionsindex; für Proteine: 0,185
N_A	Avogadro-Zahl
λ_0	Vakuum-Wellenlänge des Lasers
M_w	Molare Masse (<i>weight-averaged</i>)
A_2	Sekundärer Virial-Koeffizient (Aggregationskoeffizient)

Lichtstreuung kann im Batch-Verfahren oder im Chromatographie-Modus durchgeführt werden. Hier wurde als Chromatographie-Methode die *Asymmetric Field Flow Fractionation* (AFFF)-Technik in einem Feldflusskanal angewandt. Dabei erfolgt die Auftrennung der Probe in einem laminaren Fluss, gegen den senkrecht ein Kraftfeld, der Cross-Flow, angelegt wird. Der Kanal besteht aus zwei Platten, welche durch einen Abstandshalter getrennt sind. Die untere Platte ist permeabel und mit einer Ultrafiltrations-Membran belegt, die die Moleküle zurückhält. Der laminare Fluss in dem Kanal besitzt ein Parabel-Profil. Durch den Cross-Flow werden die schwereren Partikel gegen die Membran gedrückt und von den leichteren getrennt. Die MALLS-Messungen wurden in der Arbeitsgruppe Medizinische Biochemie und Molekularbiologie (Medizinische Fakultät, Universität des Saarlandes) durchgeführt. Zur Vorauftrennung des Proteins wurde ein Feldflusskanal (Eclipse, Wyatt Technology, Dernbach) mit einem Abstandshalter von 490 nm und einer Zellulose-Membran mit einem Ausschlussvolumen von 5 kDa verwendet. Es wurde jeweils 25 μ l oder 50 μ l GatDH mit einer Konzentration von 1 mg/ml injiziert. Der Crossflow F_x wurde dabei zwischen 1,5 und 3 ml/min variiert. Das Molekulargewicht wurde mit einem 3-Winkel-Lichtstreuungsdetektor (miniDAWN, Wyatt Technology, Dernbach), gekoppelt mit einem UV-Detektor (Agilent, Böblingen) sowie einem RI-(Refraktionsindex)-Detektor (Agilent, Böblingen) bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der Software *ASTRA*[®] (Wyatt Technology, Dernbach).

2.15.2 Kristallisation

Für die Röntgenstrukturanalyse werden Einkristalle benötigt. In einem Proteinkristall müssen die einzelnen Proteinmoleküle dreidimensional in regelmäßiger, periodischer Struktur angeordnet sein. Dazu muss das lösliche Protein aus einer metastabilen, übersättigten Lösung in eine stabilere, feste Phase überführt werden, welche energetisch günstiger ist. Bilden sich stabile Nukleationskeime, wachsen diese, bis das System im Gleichgewicht ist. Im günstigsten Falle entstehen Einkristalle, es können aber auch amorphes Präzipitat oder verwachsene Kristalle beobachtet werden (Ducruix & Giegé, 1992).

Proteine sind von einer Hydrathülle umgeben. Durch schrittweises Entziehen von Wasser oder dem Verstärken von anziehenden Kräften zwischen den Molekülen durch so genannte Fällungsmittel kann die Löslichkeit des Proteins gesenkt werden. Bei den Fällungsmitteln kann man zwischen 3 Arten unterscheiden: Salze, hochmolekulare Polymere (z.B. Polyethylenglykole (PEG)) und organische Lösungsmittel (z.B. Ethanol, 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD)).

Die Kristallisation ist neben der Art des Fällungsmittels auch von dessen Konzentration, der Proteinkonzentration, der Temperatur und dem pH-Wert abhängig. Weiterhin können im Proteinmolekül selbst größere flexiblere Bereiche oder Affinitätssequenzen, die zur Aufreinigung genutzt werden, die Kristallisation stören. Hier müssen eventuell verkürzte Varianten des Proteins erzeugt werden oder Affinitätsmarker entfernt werden. Des Weiteren können Substrate, Inhibitoren oder Kofaktoren das Protein stabilisieren und die Kristallisation begünstigen.

Das Finden von Kristallisationsbedingungen ist heute immer noch vom Zufall abhängig. Zuerst werden deshalb sehr viele unterschiedliche Bedingungen getestet (sogenanntes faktorielles Design). Finden sich hier erste Bedingungen, werden diese über gezieltes Screening des pH-Wertes, der Konzentration des Fällungsmittels oder des Proteins optimiert (so genannte Raster- (*Grid*)-Screens).

Die am meisten verwendete Kristallisationsmethode ist die des hängenden Tropfens. Dabei wird die Proteinlösung mit der Fällungsmittel-Lösung auf einem Deckgläschen gemischt und dieses umgedreht auf ein Reservoir mit den Fällungsmitteln gesetzt. Da die Konzentration im Reservoir höher ist als die im Proteintropfen, stellt sich ein Gleichgewicht ein, bis die Konzentration des Fällungsmittels im Tropfen dem des Reservoirs entspricht. Dabei wird dem Tropfen Wasser entzogen und auch die Proteinkonzentration steigt an. Im optimalsten Falle bilden sich Kristalle, es kann aber auch amorphes Präzipitat entstehen oder keine Kristallisation erfolgen.

Die Methode des sitzenden Tropfens entspricht der des hängenden. Der Tropfen sitzt hier auf einer Brücke über der Reservoirlösung. Weitere Methoden sind das Batch-Verfahren und die Dialyse. Bei dem Batch-Verfahren wird das Protein direkt mit dem Fällungsmittel gemischt, ohne dass eine Äquilibration gegen eine Reservoirlösung erfolgt. Bei der Dialyse befindet sich die Proteinlösung in einem Gefäß, welches mit einer Dialyse-Membran verschlossen ist. Dieses schwimmt in einer Reservoirlösung. Durch die Poren der Membran können kleine Moleküle wie Ionen nach beiden Richtungen diffundieren, das Protein aber nicht.

2.15.2.1 Methode des hängenden Tropfens (Hanging drop)

Für Initial-Screens oder zum Optimieren von ersten Kristallisationsbedingungen wurde die Methode des hängenden Tropfens in 24-Well-Platten (Linbro[®]) angewandt. Dazu wurden 500 µl oder 1 ml der jeweiligen Reservoir-Lösung in die Vertiefungen pipettiert. 1 µl Proteinlösung wurde mit 1 µl Reservoirlösung auf einem Deckgläschen (Ø 22 mm) gemischt und dieses auf das entsprechende Reservoir-Well gesetzt. Die Ränder der Vertiefungen

wurden vorher mit Silikonpaste eingefettet, um ein luftdicht abgeschlossenes System zu erhalten. Des Weiteren wurde das Mischungsverhältnis des Reservoirs und der Proteinlösung variiert oder größere Tropfen angesetzt, um die Kristallisationsbedingungen zu optimieren. Die Platten wurden bei 18 °C (in Weinklimaschränken) inkubiert und die Tropfen in regelmäßigen Abständen unter dem Mikroskop kontrolliert.

2.15.2.2 Methode des sitzenden Tropfens (*Sitting drop*) (*Mosquito*[®])

Initial-Screens oder Kokristallisations-Tests mit Substraten bzw. Inhibitoren wurden mit Hilfe eines Kristallisations-Roboters (*Mosquito*[®], TTP Labtech) im *Sitting-Drop*-Verfahren angesetzt. Das Volumen der Reservoirlösung betrug hier 100-200 µl. Es wurde 50-200 nl Proteinlösung eingesetzt und im Verhältnis 1:1 mit Reservoirlösung gemischt. Die Platten wurden bei 18 °C (in Weinklimaschränken) inkubiert und die Tropfen in regelmäßigen Abständen unter dem Mikroskop kontrolliert.

2.15.2.3 Additiv-Screens

Additiv-Screens werden zur Optimierung von schon bekannten und reproduzierbaren Kristallisationsbedingungen eingesetzt. Additive können z.B. Zucker, Alkohole und Detergentien sein. Sie können zusätzlich auch zur Optimierung oder Erhöhung der Packungssymmetrie eines Kristalls eingesetzt werden.

Die Additiv-Screens wurden im *Hanging drop*-Verfahren angesetzt. Bei den flüchtigen Substanzen wurden diese dem Reservoir zugegeben (450 µl Reservoir + 50 µl Additiv) und der Tropfen wie unter 2.23.1 beschrieben, angesetzt. Bei den nicht flüchtigen Additiven wurde 1 µl Protein mit 0,8 µl Reservoir und 0,2 µl Additiv gemischt.

2.15.2.4 Kokristallisation

Bei der Kokristallisation wurde direkt der Proteinlösung und/oder der Reservoirlösung der Kofaktor, das Substrat bzw. der Inhibitor zugegeben und die Tropfen mit der *Sitting drop*-Methode mit dem Kristallisationsroboter angesetzt.

2.15.2.5 Tränken von Kristallen (*Soaking*)

Beim Tränken wurden Kristalle, die ohne Kofaktoren oder Substrate kristallisiert wurden, mit einer Lösung dieser Substanzen inkubiert. Da Proteinkristalle zu 30-80 % aus Lösungsmitteln bestehen und große Kanäle in ihrer Packung aufweisen, können diese Substanzen in den

Kristall diffundieren und im günstigen Fall im aktiven Zentrum binden. Diese Methode spart im Gegensatz zum Kokristallisieren Protein und eventuell teure Substrate und Kofaktoren.

Es wurden in dieser Arbeit Kristalle des Holoenzym (mit dem Kofaktor) hergestellt und diese mit verschiedenen Konzentrationen des Substrates bzw. des Inhibitors unterschiedlich lange inkubiert und danach direkt in flüssigem Stickstoff weggefroren.

2.15.2.6 Montieren von Kristallen unter Cryo-Bedingungen

Zur Datensammlung werden die Kristalle in Nylon-Schleifen oder Litho-Schleifen, die der Größe des Kristalls angepasst sind, montiert. Die Datensammlung erfolgt meist bei tiefen Temperaturen (ca. 100 K). Dies verhindert das vorzeitige Schädigen der Kristalle durch die ionisierende Röntgenstrahlung (Kiefersauer *et al.*, 2000). Um Eisbildung zu verhindern, werden die Kristalle in einer Cryolösung eingefroren, welche glasartig gefriert. Dies wird durch Zusätze wie Glycerin, Zucker, PEG oder organische Lösungsmitteln zu der Reservoirolösung erreicht. Die Kristalle konnten direkt aus dem Tropfen eingefroren werden, wenn die Kristallisation-Lösung selbst glasartig gefror. Ansonsten wurden erst verschiedene Additive der Mutterlauge zugegeben und getestet. Die Kristalle wurden zwischen 2 min und 10 min darin inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.15.3 Theorie der Röntgendiffraktion

Die Theorie der Röntgendiffraktion ist in zahlreichen Lehrbüchern (z.B. Drenth, 1994) erklärt und soll deshalb hier nur kurz angerissen werden.

Die dreidimensionale Struktur von Proteinen ermöglicht ein besseres Verständnis ihrer Funktion. Eine Methode der Strukturaufklärung ist die Röntgenstrukturanalyse. Zur Diffraktion oder Beugung kommt es, wenn Licht auf Materie trifft und von dieser gestreut wird. Dies ermöglicht uns, Abbilder von einem Objekt darzustellen, wie in der Lichtmikroskopie angewandt. Dabei ist die Wellenlänge entscheidend. Sie darf nicht größer sein als das abzubildende Objekt. Um Strukturen von Proteinen sichtbar machen zu können, muss daher Licht eines Wellenlängenbereiches verwendet werden, der in der Größenordnung von Atom-Abständen liegt. Licht, welches in dem benötigten Wellenlängen-Bereich von 0,1 bis 0,15 nm (1-1,5 Å) liegt, sind weiche Röntgenstrahlen. Für diesen Wellenlängen-Bereich existieren noch keine Linsen wie in der Lichtmikroskopie, die die gebeugten Lichtwellen wiedervereinigen. Daher bedarf es mathematischer Programme, um aus dem Beugungsbild ein Abbild der Elektronendichte-Verteilung zu berechnen.

2.15.3.1 Aufbau von Kristallen

Die Beugung von Röntgenstrahlung an einem einzigen Molekül liefert zu wenig messbare Information. Werden dagegen Millionen einzelner Moleküle dreidimensional symmetrisch in Einkristallen angeordnet, kommt es zu einer Verstärkung des Beugungssignals. Ein Einkristall ist aus Einheitszellen aufgebaut, die durch verschiedene Symmetrieeoperationen den Kristall aufbauen. Die Einheitszelle wird durch die Zellparameter a , b , c , welche die Kantenlängen darstellen, sowie den drei Winkeln α , β und γ beschrieben. Sie kann wiederum in verschiedene asymmetrische Einheiten unterteilt werden, die keine kristallographische Symmetrie mehr aufweisen. Ein Kristall kann durch die Symmetrie-Operationen Rotation, Inversion, Spiegelung, Translation und deren Kombinationen aus der asymmetrischen Einheit beschrieben werden (Borchard-Ott, 1997). Insgesamt existieren hierbei 230 Kombinationsmöglichkeiten. Da biologische Makromoleküle chirale Gruppen wie L-Aminosäuren enthalten, fallen die Symmetrie-Operationen Inversion und Spiegelung weg, sodass hier nur noch 65 mögliche Raumgruppen vorkommen.

Die asymmetrische Einheit eines Proteinkristalles kann aus mehreren Proteinmolekülen aufgebaut sein, die sich durch nicht-kristallographische Symmetrie-Operationen (*non-crystallographic symmetries, NCS*) beschreiben lassen.

2.15.3.2 Diffraktion

Diffraktion tritt durch positive und negative Interferenzen von an Objekten gebeugten Lichtwellen auf. Die Diffraktion an einem dreidimensionalen Gitter kann durch das Bragg'sche Gesetz beschrieben werden (Abb. 9):

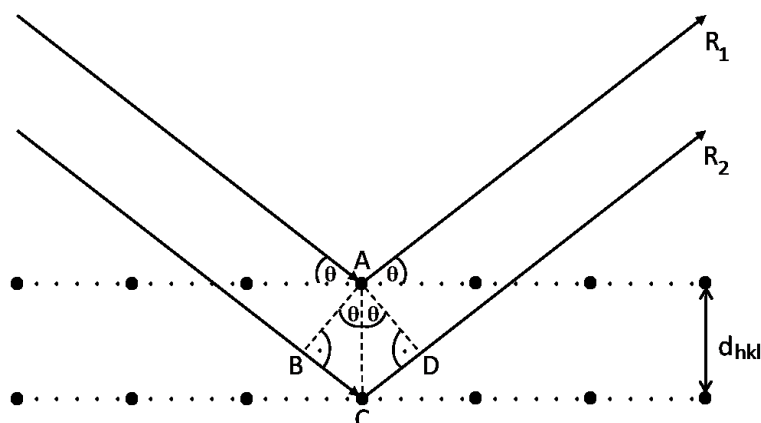


Abb. 9: Schematische Darstellung der Diffraktion an zwei parallelen Gitterebenen.

- d_{hkl} Abstand zwischen den Gitterebenen
- θ Winkel zwischen Strahl und Gitterebene
- λ Wellenlänge der verwendeten Strahlung

Die Röntgenstrahlen R_1 und R_2 mit der Wellenlänge λ treffen im Winkel θ auf benachbarte Gitterebenen. Der Strahl R_2 legt dabei die Strecke \overline{BCD} mehr zurück als R_1 . Damit beide konstruktiv interferieren, müssen sie in Phase sein, das heißt diese zusätzliche Strecke muss ein Vielfaches von λ sein:

$$\overline{BCD} = n \cdot \lambda$$

Da \overline{BC} und \overline{CD} gleich lang sind, gilt folgender Zusammenhang:

$$\overline{BC} = \overline{CD} = d_{hkl} \cdot \sin(\theta)$$

Das Bragg'sche Gesetz ergibt sich aus der Verknüpfung beider Gleichungen:

$$2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin(\theta) = n \cdot \lambda$$

Dies bedeutet, dass für eine Ebenenschar es nur unter bestimmten Winkeln zu konstruktiven Interferenzen kommt. Jedem Reflex kann also eine Ebenenschar und umgekehrt jeder Ebenenschar ein Reflex zugeordnet werden. Dies geschieht durch die sogenannten Miller'schen Indizes h , k und l . Zur Beschreibung der Röntgendiffraktion wird das reale Kristallgitter in ein imaginäres, reziprokes Gitter umgesetzt. Die Koordinaten im reziproken Raum sind die Miller'schen Indizes h , k und l .

2.15.3.3 Fouriertransformation

Jedem Reflex kann ein Strukturfaktor F_{hkl} zugeordnet werden. Da ein gebeugter Röntgenstrahl als elektromagnetische Welle beschrieben werden kann, enthält ein Strukturfaktor sowohl Phase und Amplitude als auch die Koordinaten im reziproken Raum. Röntgenwellen werden an den Elektronenwolken der Atome gebeugt. Bei dem erzeugten Diffraktionsbild handelt es sich mathematisch gesehen daher um eine Fourier-Transformation der Elektronendichte-Verteilung. Durch eine umgekehrte Fouriertransformation (Rück-Fouriertransformation) der Struktur Faktoren unter Einbeziehung des Volumens der Einheitszelle V wird durch folgende Gleichung die Elektronendichte-Verteilung berechnet:

$$\rho_{xyz} = \frac{1}{V} \cdot \sum_{hkl} F_{hkl} \cdot e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \cdot e^{i\alpha(hkl)}$$

↑	↑	↑	↑
Elektronendichte	Amplitude	Basisfunktion	Phase

Die Amplituden sind dabei proportional zum Quadrat der gemessenen Intensität der Röntgenreflexe. Sie lassen sich direkt messen und den Gitterpunkten h , k und l zuordnen. Da

die Detektoren aber nicht in Echtzeit messen können, geht die Phaseninformation der Gleichung verloren und muss indirekt bestimmt werden (siehe Kapitel 2.15.3.5).

2.15.3.4 Patterson-Funktion

Bei der Patterson-Funktion handelt es sich um eine Fourier-Synthese, mit einem Phasenwert $\alpha=0$ für jeden Reflex und mit den Intensitäten $|F_{hkl}^2|$ statt den Amplituden berechnet:

$$P_{uvw} = \frac{1}{V} \cdot \sum_{hkl} |F_{hkl}^2| \cdot e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \cdot e^{i\alpha(hkl)}$$

Dadurch geht die Information über die Koordinaten der Atome verloren. Es werden hierbei nur die Differenzvektoren zwischen Atomen bestimmt, nicht ihre Lage. Dies hat den Vorteil, dass die Patterson-Funktion direkt aus den gemessenen Daten errechnet werden kann. Eine Anwendung ist hierbei die Berechnung einer Differenz-Patterson-Funktion, die die Differenzen der Strukturfaktor-Amplituden (ΔF) zweier Datensätze verwendet. Diese Funktion wird unter anderem bei der Lösung des Phasenproblems mittels MIR oder MAD angewendet werden (siehe Kapitel 2.15.3.5).

2.15.3.5 Lösen des kristallographisches Phasenproblem

Bei der Datensammlung können nur die Intensitäten der Reflexe, nicht aber die Phasen gemessen werden. Die Phasen können daher nur indirekt über folgende Methoden bestimmt werden:

Molekularer Ersatz (MR, molecular replacement)

Bei der Methode des molekularen Ersatzes werden die Phaseninformationen von Kristallstrukturen strukturell ähnlicher Proteine übernommen. Man geht davon aus, dass ab einer Sequenzidentität von 25 % eine vergleichbare Faltung von Proteinen vorliegt. Über die Minimierung von Rotations- und Translations-Funktionen wird das Modell in der Einheitszelle so orientiert, dass es mit der Lage des Proteins unbekannter Struktur zur Deckung kommt (Evans & McCoy, 2008). Diese Methode wird durch die ständig zunehmende Anzahl an Strukturen in der PDB immer häufiger verwendet.

Isomorpher Ersatz (SIR/MIR, single/multiple isomorphous replacement)

Bei dieser Methode wird ein Kristall mit Schweratomen derivatisiert und von diesem sowie einem nativen Kristall Diffraktionsdaten aufgezeichnet. Aus den isomorphen Differenzen zwischen den Strukturfaktoramplituden eines nativen und eines derivatisierten Kristalls lässt

sich über die Differenz-Patterson-Funktion die Lage der Schweratome im Molekül bestimmen. Von diesen Positionen ausgehend kann man erste Phasen berechnen. Allerdings sind aufgrund der Phasenzweideutigkeit für jeden Phasenwinkel zwei Lösungen möglich. Daher werden zur eindeutigen Bestimmung mehrere verschiedene Derivate verwendet. Die Grundvoraussetzung für diese Methode ist, dass die derivatisierten Kristalle isomorph zu den nativen sind (Blundell & Johnson, 1976).

Anomale Dispersion (SAD/MAD, single/multiple anomalous dispersion)

In dieser Methode nutzt man den anomalen Streubetrag bestimmter chemischer Elemente, deren Absorptionskanten nahe der Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung liegen. Die atomaren streuwinkelabhängigen Streufaktoren solcher Atome werden in diesen Fällen um den anomalen Beitrag verändert. Dabei gilt nicht mehr das Friedel'sche Gesetz, das besagt, dass die Strukturfaktoramplituden F_{hkl} und F_{-h-k-l} (Friedelpaare) identisch sind. Aus den anomalen Streubeiträgen ist mit Hilfe einer anomalen Patterson-Funktion die Position der anomal streuenden Atome zu berechnen (Hendrickson & Ogata, 1997). Elemente, deren Absorptionskanten im Bereich der Synchrotronstrahlung von 0,6 bis 2,0 Å liegen, sind viele Metalle wie Kobalt, Zink und Mangan, Halogene wie Brom und Iod sowie Edelgase wie Xenon. Eine elegante Methode, die in dieser Arbeit angewandt wurde, ist der Ersatz von Methionin durch Selenomethionin während der Proteinexpression in *E. coli*, um so die anomale Diffraktion von Selen detektieren zu können. Für eine Phasierung muss im Protein auf 100 Aminosäuren mindestens ein Methionin vorkommen (Smith & Thompson 1998).

2.15.4 Datensammlung

Die Datensammlungen erfolgten an einem Einkreis-Goniometer, wobei der Kristall senkrecht zum Röntgenstrahl stand. Unter kontinuierlicher Drehung des Goniometerkopfes um den Winkel $\Delta\varphi$ wurden Diffraktionsbilder aufgenommen. Der Drehwinkel wurde so gewählt, dass sich möglichst wenige Reflexe räumlich auf dem Detektor überlappten. $\Delta\varphi$ betrug je nach Mosaizität der Kristalle 0,2-1 ° (McRee, 1999). Der Abstand zwischen dem Kristall zu dem Detektor wurde so gewählt, dass zum einen alle gebeugten Reflexe gemessen werden können, zum anderen diese aber nicht zu stark überlappen. Die Belichtungszeiten wurden abhängig von der Intensität der Röntgenquelle gewählt. Am Synchrotron wurde zudem in einigen Fällen die Strahlintensität durch Attenuatoren abgeschwächt, um eine Überbelichtung sowie starke Strahlschäden zu vermeiden. Alle Messungen wurden unter ständiger Kühlung des Kristalls durch Stickstoff bei einer Temperatur von 100 K durchgeführt.

2.15.4.1 Testmessungen

Montierte Kristalle wurden an den Heimquellen (Xcalibur, MarResearch) getestet, welche Röntgenstrahlung mit der Wellenlänge von 1,541 Å (Cu K α -Strahlung) erzeugen. Es wurden verschiedene Parameter getestet, um unterscheiden zu können, ob es sich um einen Protein- oder Salzkristall handelt (Tab. 9).

Tab. 9: Parameter der Testmessungen an den Heimquellen

<i>Parameter</i>	<i>Test auf Protein</i>	<i>Test auf Salz</i>	<i>Test auf Protein (sehr schwach streuende Kristalle)</i>
Belichtung [s]	60	120	1000
Kristall-Detektor [mm]	80	60	130
Oszillation ($\Delta\phi$) [°]	1	5	0,5
Start (ϕ) [°]	0/90	0/90	0/90

2.15.4.2 Aufnahme von Datensätzen

Konnte eine hohe Auflösung schon an den Heimquellen erzielt werden, wurden die Datensätze direkt gemessen. Bei schwächer streuenden Kristallen oder für die MAD-Messungen wurden Datensätze an verschiedenen Synchrotron-Beamlines mit modulierbarer Wellenlänge aufgenommen. Bei den Heimquellen wurden Belichtungszeiten zwischen 1 und 20 min pro Bild eingesetzt, am Synchrotron zwischen 1 s und 1 min. Um bei der Datensammlung mit möglichst wenigen Bildern einen vollständigen Datensatz (Vollständigkeit >95 %) und darüber hinaus eine möglichst hohe Redundanz zu erhalten, wurden die Datensammlungs-Strategien mit der *Strategy*-Option in MOSFLM (Leslie *et al.*, 1992), mit dem Programm BEST (Bourenkov & Popov, 2006) oder mit der entsprechenden Programm-Routine von CrysAlis (Oxford Diffraction) berechnet.

2.15.4.3 Aufnahme eines MAD-Datensatzes

Bei dem MAD- (*multiple wavelength dispersion*-) Experiment wurden im Bereich der Absorptionskante des anomal streuenden Atoms vier Datensätze bei unterschiedlichen Wellenlängen aufgenommen. Die Absorptionskante kann sich in Proteinkristallen im Vergleich zu der theoretischen etwas verschieben. Daher wurde sie mittels eines Röntgen-Fluoreszenz-Scans des Kristalls ermittelt.

Man kann das anomale Streuverhalten mit den anomalen Streufaktoren f' und f'' beschreiben (Hendrickson & Ogata, 1997). Diese lassen sich aus einem Röntgenfluoreszenzspektrum mit Hilfe der Kramers-Kronig-Beziehung herleiten.

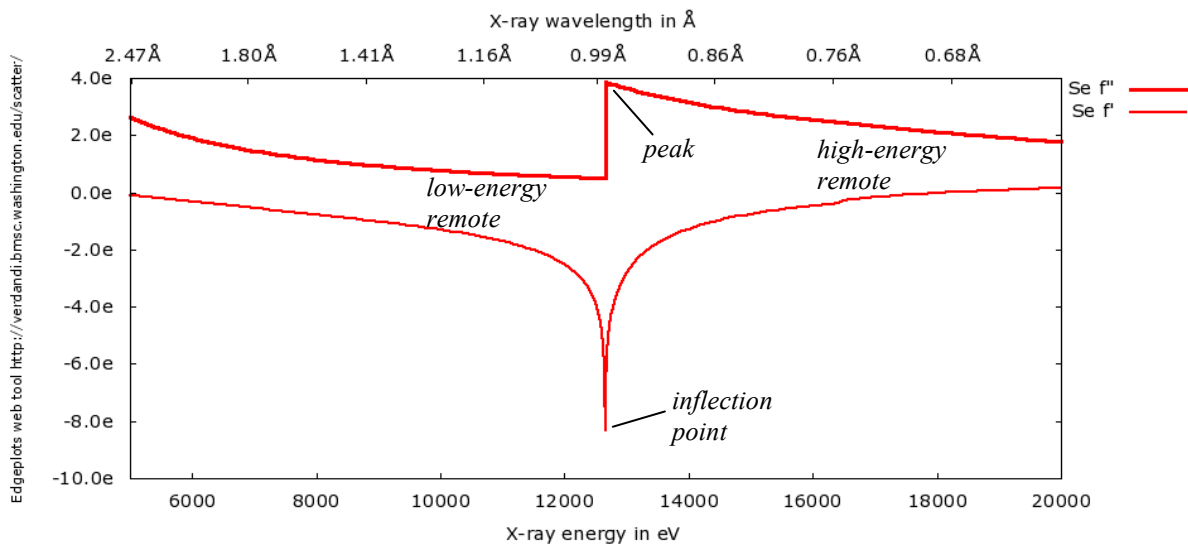


Abb. 10: Auftrag der Streufaktoren f' und f'' gegen die Röntgenstrahlen-Energie bzw. die entsprechende Wellenlänge am Beispiel des Selens (Brennan & Cowan, 1992).

Die Datensätze werden am *peak* der Absorptionskante, an der f'' sein Maximum hat, am *inflection point* der Absorptionskante, an dem f' sein Minimum hat, im *high energy remote* Bereich, an dem f'' immer noch sehr hoch und auch f' sich signifikant von seinem Minimum unterscheidet sowie im *low energy remote* Bereich, an dem f' immer noch sehr hoch ist, aber f'' nun sein Minimum wieder erreicht hat, aufgenommen (vergleiche Abb. 10).

Ein zunehmendes Problem stellt die immer höhere Strahlungsintensität der Beamlines dar, wodurch häufiger das Problem von Strahlenschäden an den Kristallen auftritt. Daher versucht man, eine Struktur schon mit weniger als den vier angegebenen Datensätzen zu lösen. Zunehmend reicht ein Datensatz, bei einer Wellenlänge (SAD- (*single wavelength dispersion*-) Experiment) und mit einer hohen Redundanz gemessen, dazu aus.

2.15.5 Datenprozessierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Programme zur Indizierung der Reflexe, Skalierung und Konvertierung genutzt. Zum einen wurde XDS in Kombination mit XSCALE/XDSCONVERT verwendet und die Dateiformate mit F2mtz/CAD (CCP4-Programmpaket) konvertiert. Als Alternative wurde MOSFLM (Leslie *et al.*, 1992) in Kombination mit SCALA/TRUNCATE (CCP4-Programmpaket) verwendet. An der

Heimquelle in Homburg (Xcalibur PX Ultra, Oxford Diffraction) erfolgte die Indizierung und Intensitätsbestimmung der aufgenommenen Reflexe mit dem Programm CrysAlis (Oxford Diffraction) mit anschließender Konvertierung in das CCP4-Format und Skalierung mit den Programmen SCALA/TRUNCATE.

2.15.5.1 Bestimmung des Matthews-Parameters

Die Anzahl der Moleküle pro asymmetrische Einheit wurde über den Matthews-Parameter bestimmt. Bei dieser Methode wird zugrundegelegt, dass alle Proteine eine vergleichbare Dichte aufweisen. Das Verhältnis zwischen Volumen der Einheitszelle und Molekulargewicht des Proteins sollte zwischen 1,7 und 3,5 Å³/Da liegen (Matthews, 1968). Über die Anzahl der Moleküle in der Einheitszelle kann man dann den Lösungsmittel-Gehalt eines Kristalles berechnen.

2.15.5.2 Lösen des Phasenproblems

Die Berechnung der ersten Phasen erfolgte bei der Methode des molekularen Ersatzes mit dem Programm MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997) aus dem CCP4-Programmpaket. Die Prozessierungsstrategie und Berechnung der ersten Phasen des MAD-Datensatzes ist im Ergebnisteil beschrieben.

2.15.6 Verbesserung des Strukturmodells

Zur visuellen Kontrolle der Struktur wurden die berechneten Koordinaten und die zugehörige Elektronendichte mit den Programmen O oder Coot übereinandergelegt. Dazu wurden zwei Arten von Elektronendichte-Karten aus den experimentell bestimmten (F_{obs}) und den berechneten Strukturfaktoramplituden (F_{calc}) berechnet. Die $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Dichtekarte stellt eine Differenzkarte dar, die Abweichungen des Strukturmodells zu den experimentellen Daten anzeigt. Sie wird visuell zweifarbig dargestellt, einmal die Bereiche, in denen Elektronendichte noch nicht mit zugehörigen Atomen interpretiert wurde und Bereiche, die falsch interpretiert wurden, in Komplementärfarben. Die $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Dichtekarte dagegen entspricht annähernd der realen Dichte im Kristall.

Die fehlerhaften Bereiche wurden per Hand richtig angepasst. Dazu gehörten die richtige Anordnung von Aminosäuren-Seitenketten oder des Verlaufs des Rückgrats und das Ergänzen nicht interpretierter Aminosäure-Reste. Auch lagen Seitenketten oder kurze Abschnitte des Polypeptid-Rückgrates in verschiedenen Konformationen vor und mussten korrigiert werden.

2.15.6.1 Suche nach Liganden und Lösungsmittel-Molekülen

Zusätzlich zu dem Anpassen der Proteinkoordinaten wurden Liganden wie Kofaktor, Substrate und Lösungsmittel-Moleküle sowie im Kristall fest koordinierte Wassermoleküle eingefügt. Bindungsstellen im Kristall für Wasser oder Liganden wurden mittels der Programme ARP/wARP oder COOT gesucht und in die zugehörige Elektronendichte gesetzt. Die Programme benötigen dazu Bibliotheken, in denen die Koordinaten und Geometrie-Parameter der jeweiligen Substanzen enthalten sind. Diese stammten für den Kofaktor NAD von dem Server HIC-UP (**H**etero-compound **I**nformation **C**entre – **U**ppsala; Kleywegt & Jones, 1998). Für die Zucker *meso*-Erythritol und Xylitol wurden die Topologie-Daten mit dem Server PRODRG (Schüttelkopf & van Aalten, 2004) generiert.

2.15.6.2 Verfeinerung des Strukturmodells

Nach jeder manuellen Verbesserung des Strukturmodells erfolgte eine Verfeinerung der Struktur mit dem Programm REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997). Um die Qualität der Struktur und den Verlauf der Verbesserung zu überprüfen, wurde der *R*-Faktor (*residual index*) nach folgender Formel berechnet:

$$R_{cryst} = \frac{\sum ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$$

Eine weitere Kontrolle ist die Berechnung des freien *R*-Faktors, die analog des R_{cryst} erfolgt, aber unter Ausschluss von 5 % der gesamten Reflexe. Diese werden zufällig ausgewählt, markiert und nicht zur Verfeinerung eingesetzt (Brünger, 1992; Tickle *et al.*, 2000).

Ein Abnehmen der *R*-Faktoren zeigt an, dass das Strukturmodell verbessert wurde, während ein Anstieg auf falsche Interpretationen oder Über-Verfeinerung hindeutet. In Protein-Strukturen gelten *R*-Faktoren unter 20 % als sehr gut, unter 25 % als gut. Diese Zyklen aus Anpassung und Modellierung sowie anschließender Verfeinerung wurden so lange durchgeführt, bis die *R*-Faktoren konstant blieben und nicht mehr weiter reduziert werden konnten.

2.15.7 Qualität einer Kristallstruktur

Die Qualität einer Struktur kann durch zusätzliche Kriterien und Faktoren beschrieben werden. Die Validierung der Daten erfolgte durch die Programme SFCHECK und PROCHECK des CCP4-Programmpakets. Sie werden im Ergebnisteil für jeden Datensatz angegeben.

2.15.7.1 Auflösungsbereich

Je höher die Auflösung eines Datensatzes, desto genauer ist die Elektronendichte-Verteilung definiert. Unterhalb von 3 Å kann der Verlauf des Proteinerückgrats erkannt werden, unter 2,5 Å Seitenketten zugeordnet werden. Die verschiedenen Aminosäure-Reste können unterhalb von 2 Å eindeutig erkannt, unter 1,5 Å einzelne Atome unterschieden werden.

2.15.7.2 Unabhängige Reflexe und Vollständigkeit der Daten

Alle Reflexe, die als asymmetrische Einheit des reziproken Gitters die vollständige Beugungsinformation des Kristalls tragen, werden als unabhängig bezeichnet. Die Vollständigkeit eines Datensatzes ist definiert als der Quotient aus der Anzahl der gemessenen zu der theoretisch möglichen Anzahl unabhängiger Reflexe. Ein Datensatz sollte mindestens eine Vollständigkeit von 95 % aufweisen.

2.15.7.3 $I/\sigma(I)$

Der Quotient aus den gemessenen Intensitäten I und deren Standardabweichung $\sigma(I)$ gibt das Verhältnis zwischen Mess- und Rauschsignal an. Das Signal-Rausch-Verhältnis sollte mindestens 3 betragen.

2.15.7.4 B -Faktor

Durch thermische Bewegungen, einer nicht perfekt geordneten Kristall-Packung oder durch das Auftreten von verschiedenen Konformationen von Aminosäure-Resten sind nicht alle symmetrieverwandten Atome exakt gleich positioniert. Der isotope B -Faktor oder Temperaturfaktor gibt diese atomare Bewegung an. Je niedriger er ist, desto fester positioniert ist das Atom.

2.15.7.5 Precision-indicating merging R -factor (R_{pim})

Die Faktoren R_{pim} und R_{rim} geben die Genauigkeit der gemittelten Messwerte an unter Berücksichtigung der Redundanz N eines Datensatzes (Weiss, 2001).

2.15.7.6 Ramachandran-Plot

In einem Ramachandran-Diagramm werden die Dieder-Winkel ϕ (N-C $_{\alpha}$ -Bindung) und ψ (C $_{\alpha}$ -C-Bindung) in der Polypeptidkette gegeneinander aufgetragen. Sie dürfen nur in bestimmten erlaubten Konformationen für α -Helices und β -Faltblätter liegen. Glycin als Aminosäure ohne Seitenrest ist die einzige Ausnahme (Ramachandran & Sasisekharan, 1968). In einer guten

Struktur liegen mindestens 90 % der Aminosäure-Reste in den erlaubten Bereichen. Allerdings kann es aufgrund von ungewöhnlichen Faltungszuständen und Wechselwirkungen der Aminosäuren im Protein zu Abweichungen kommen.

2.15.8 Darstellung des Strukturmodells zur Interpretation

Die Darstellung des fertigen Modells zur Strukturanalyse wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano, 2002) angefertigt. Die zugehörigen Elektronendichte-Karten wurden mit dem Programm FFT (CCP4-Programm-Suite) berechnet. Strukturbasierende Überlagerungen von verschiedenen Strukturen wurden mit dem Programm DALI (Holm & Sander, 1996), Überlagerungen der Protomere eines Kristalls mit dem Programm SUPERPOSE (Maiti *et al.*, 2004) aus dem CCP4-Programmpaket vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Galaktitol-Dehydrogenase

3.1.1 Klonierung des Expressionskonstruktes pET24a_His_GatDH

Für die ersten Kristallisationsansätze wurde GatDH verwendet, die rekombinant in *E. coli* ohne Affinitätsmarker exprimiert wurde und von der AG Giffhorn (Angewandte Mikrobiologie, Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt wurde. Für weitere Kokristallisations- und Tränkeexperimente mit Substraten wurden größere Mengen an GatDH gebraucht. Da die Aufreinigung der Wildtyp-GatDH ohne Affinitätsmarker aufwendig und mit hohen Verlusten verbunden ist, wurde ein Expressionskonstrukt mit einem N-terminalen (His)₆-Affinitäts-Sequenzabschnitt und einer TEV-Protease-Schnittstelle zum Entfernen des Markers hergestellt. Wie in Kapitel 2.13.11 beschrieben, wurde eine Kassette, kodierend für den (His)₆-Affinitäts-Sequenzabschnitt und die TEV-Protease-Erkennungssequenz, in den Vektor pET24a(+)_nGatDH einkloniert. Von drei Klonen wurde die DNA isoliert und ein Testverdau mit der Restriktionsendonuklease *SpeI* durchgeführt. Diese Schnittstelle ist nur in der Kassette vorhanden, nicht aber im Ausgangsplasmid. Der Restriktionsverdau wurde in einem 0,8 %igen TBE-Gel analysiert. Als Negativkontrolle wurde das Ursprungsplasmid aufgetragen (Abb. 11).

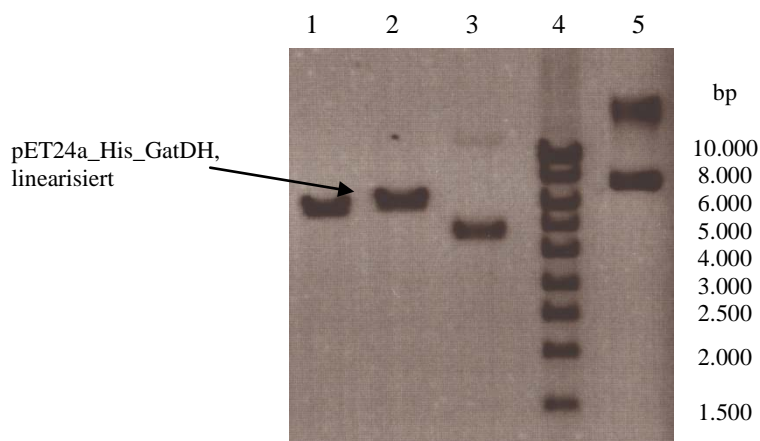


Abb. 11: Testverdau der Kassettenklonierung und Analyse in einem TBE-Agarose-Gel (0,8 %); Von drei Klonen wurden die Plasmide isoliert und mit *SpeI* verdaut. Als Kontrolle wurde das Ursprungsplasmid ohne Kassette aufgetragen.

Spur 1: pET24a_His_GatDH aus Klon 1, linearisiert

Spur 2: pET24a_His_GatDH aus Klon 2, linearisiert

Spur 3: pET24a_His_GatDH aus Klon 3, linearisiert

Spur 4: DNA-Marker

Spur 5: Kontrolle: pET24a(+)_nGatDH

Von den drei isolierten Plasmiden konnten zwei mit *SpeI* linearisiert werden und enthielten damit die Kasette. Eine anschließende Sequenzierung zeigte, dass Klon 2 die Kasette in der richtigen Orientierung enthielt. Eine Vektorkarte befindet sich im Anhang (Abb. 56).

3.1.2 Expression von (His)₆-GatDH

Zur Expression von GatDH mit N-terminalem (His)₆-Affinitäts-Sequenzabschnitt und einer TEV-Protease-Schnittstelle wurde der Expressionsvektor pET24a_His_GatDH, ein pET24a-Derivat (Novagen), in dem Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) transformiert. Testexpressionen zeigten, dass 30 °C und eine IPTG-Konzentration von 0,5 mM die optimalsten Bedingungen waren. Die Expression im großen Maßstab erfolgte, wie in Kapitel 2.14.4.2 beschrieben, in 6 l LB-Medium, versetzt mit dem Antibiotikum Kanamycin (50 µg/ml), bei 30 °C und 150 rpm (Unitron, Infors). Die Überexpression wurde bei einer OD₆₀₀ von 1,5 mit 0,5 mM IPTG induziert und die Zellen nach 5 h geerntet, in Lysepuffer gewaschen und bis zur Proteinaufreinigung bei -80 °C gelagert. Die Expression wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 12).

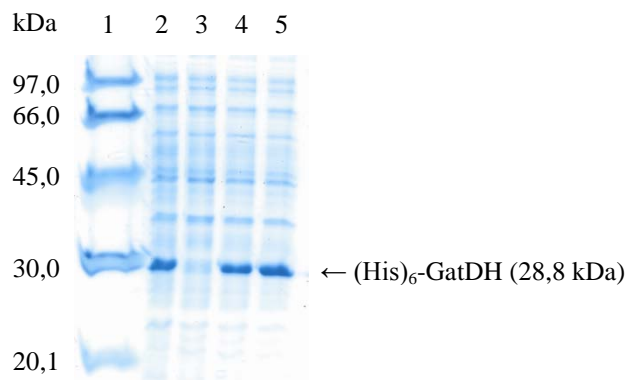


Abb. 12: SDS-PAGE (12 %) unter reduzierenden Bedingungen; Test der Expression von (His)₆-GatDH in *E. coli* BL21(DE3) mit SDS-PAGE.

Spur 1: Marker

Spur 2: Vorkultur bei 37 °C

Spur 3: Expressionskultur vor der Induktion

Spur 4: Expressionskultur 2 h nach der Induktion bei 30 °C

Spur 5: Expressionskultur 4 h nach der Induktion bei 30 °C

Nach 2 h Induktion war schon eine starke Expressionsbande von (His)₆-GatDH zu sehen. Die Expression ohne Induktion in der Vorkultur, die bei 37 °C über Nacht inkubiert wurde, könnte eventuell durch eine basale Expression verursacht worden sein.

3.1.3 Aufreinigung von (His)₆-GatDH

3.1.3.1 Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung wurden das Zellpellet (aus 6 l Kultur) in 120 ml Lysepuffer resuspendiert und bei 16.000 Psi in einem Zellhomogenisator (Avestin Inc.) aufgeschlossen. Während des Aufschlusses wurde eine kleine Spatelspitze DNase zugeben, da das Pellet durch freigesetzte DNA sehr viskos war. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer (120 min, 75.000g, 4 °C) wurde der Überstand auf eine zuvor mit Waschpuffer A äquilibrierte, selbstgepackte Säule mit 7 ml Ni-NTA-Agarose-Matrix (Qiagen) aufgetragen. Die Säule wurde mit Waschpuffer A bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen. Die (His)₆-markierten, affin gebundenen Proteine wurden in dem gleichen Puffer in einem mehrstufigen, linearen Imidazol-Gradienten (20 mM zu 500 mM, eingestellt mit Elutionspuffer A) über ein Volumen von 100 ml eluiert und fraktioniert (Abb. 13). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 14). Auf die Zugabe von MgCl₂ wurde sowohl bei diesem als auch bei den folgenden Schritten verzichtet, da Mg²⁺-Ionen die Affinitäts-Chromatographie stören und die TEV-Protease hemmen können. GatDH blieb auch ohne Zugabe von MgCl₂ weiterhin stabil.

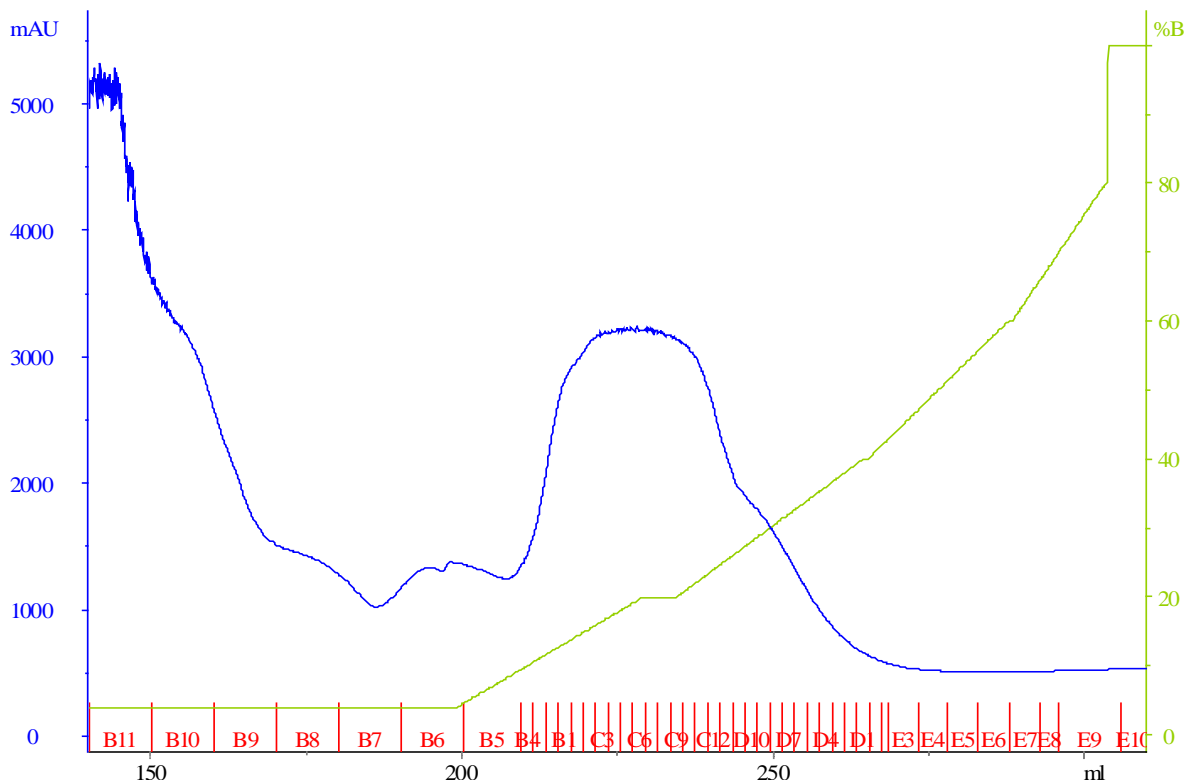


Abb. 13: Chromatogramm des ersten Aufreinigungsschrittes von GatDH, dargestellt sind die Wasch- und Elutionsfraktionen. Das Zelllysate wurde auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen, diese gewaschen, bis die UV-Absorption (blaue Linie) die Basislinie erreicht hatte und (His)₆-markierte GatDH in einem Imidazol-Gradienten (grüne Linie) eluiert.

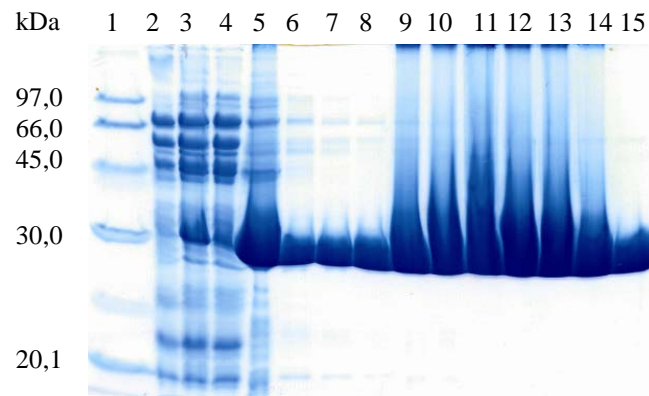


Abb. 14: SDS-PAGE (12 %) unter reduzierenden Bedingungen; Test des ersten Aufreinigungs-Schrittes von $(\text{His})_6$ -GatDH über Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit SDS-PAGE.

Spur 1: Marker

Spur 2: unaufgeschlossene Zellen

Spur 3: Überstand nach dem Zellaufschluß

Spur 4: Säulendurchfluß

Spur 5-7: Waschfraktionen

Spur 8-15: verschiedene Elutionsfraktionen

Wie in Abb. 13 gezeigt, wird $(\text{His})_6$ -markierte GatDH schon im Waschschritt mit 20 mM Imidazol eluiert. Das Protein lag in den Elutionsfraktionen in sehr großer Reinheit vor, sodass kein weiterer Aufreinigungsschritt erforderlich war. Die GatDH-enthaltenden, sauberen Fraktionen (B4-E2) wurden vereinigt und gegen den TEV-Protease-Spaltpuffer dialysiert. Die Gesamtausbeute betrug 500 mg $(\text{His})_6$ -GatDH aus 6 l Zellkultur.

3.1.3.2 Abspaltung des $(\text{His})_6$ -Sequenzabschnitts durch TEV-Protease

Der $(\text{His})_6$ -Sequenzabschnitt wurde mit TEV-Protease abgeschnitten, da er die Kristallisation beeinträchtigte. Dazu mussten erst die Bedingungen für den Protease-Verdau optimiert werden, da dieser nicht sehr effizient war, was auf eine schlechte Zugänglichkeit der Erkennungssequenz für die Protease hindeutet. Es wurden verschiedene Temperaturen (4 °C, 20 °C, 37 °C) getestet, das molare Verhältnis TEV-Protease zu $(\text{His})_6$ -GatDH variiert (1:200, 1:100, 1:50, 1:10), sowie verschiedene Puffer (Erhöhung der DTT- und EDTA-Konzentration, Zugabe von 0,15 M NaCl) getestet. Außerdem wurden verschiedene TEV-Proteasen (TEV-Wildtyp und die Mutante TEV_S216V) getestet. Am effizientesten war der Verdau mit dem Wildtyp im molaren Verhältnis Protease zu Fusionsprotein von 1:10 in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA und 1 mM DTT bei 20 °C. Nach 24 h waren nur 50 % des Fusionsproteins geschnitten. Da der TEV-

Wildtyp sich selbst schneidet und dadurch deaktiviert, wurde nochmals Protease (1:10) zugegeben und weitere 24 h inkubiert. GatDH blieb bei diesen Temperaturen über 48 h stabil.

3.1.3.3 Aufreinigung des Protease-Verdaus mittels Affinitätschromatographie (Batch-Verfahren)

Die abgeschnittene Affinitätssequenz, die ebenfalls mit (His)₆-Affinitätssequenz versehene TEV-Protease und noch nicht geschnittenes Fusionsprotein wurden über eine erneute Ni-NTA-Affinitätschromatographie von der geschnittenen GatDH abgetrennt. Dabei erwies sich das Eintopf-(*Batch*)-Verfahren als effektiver als eine Aufreinigung über eine Säule. Der Protease-Verdau-Ansatz wurde hierfür gegen 20 mM Bis-Tris, pH 6,5 dialysiert, um das EDTA zu entfernen. Dies würde sonst eine Auswaschung des Ni²⁺-Ionen auf der Ni-NTA-Matrix bewirken. Dem dialysierten Proteingemisch (30 ml mit einer Proteinkonzentration von ca. 2 mg/ml) wurde 1 mM Imidazol zugegeben, um eine unspezifische Bindung der geschnittenen GatDH an die Ni-NTA-Matrix, wie in vorhergehenden Tests ohne Imidazol beobachtet, zu unterbinden. Der Ansatz wurde zu 5 ml mit Waschpuffer B äquilibrierte Ni-NTA-Agarose-Matrix (Qiagen, Hilden) gegeben und unter ständigem Mischen (Überkopf-Schüttler) 1,5 h bei 4 °C inkubiert. Die Matrix wurde bei 3.000xg abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Matrix wurde anschließend zweimal mit dem gleichen Puffer (10 ml und 5 ml) gewaschen und die gebundenen Proteine mit 5 ml Elutionspuffer B eluiert. Die einzelnen Überstände wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 15).

Im Überstand war nur eine Bande in Höhe der GatDH zu sehen. In den Waschsritten befand sich neben der GatDH vermutlich auch sich selbstverdaute TEV-Protease oder (His)₆-GatDH, beide mit gleichem Molekulargewicht. In der Elutionsfraktion, aber auch an der aufgekochten Matrix, befanden sich neben geschnittener GatDH noch ungeschnittene (His)₆-GatDH und (His)₆-TEV-Protease. Der GatDH-enhaltende Matrix-Überstand und die vereinigten Waschfraktionen wurden getrennt gegen 20 mM Bis-Tris-Puffer, pH 6,5 dialysiert und eingengt.

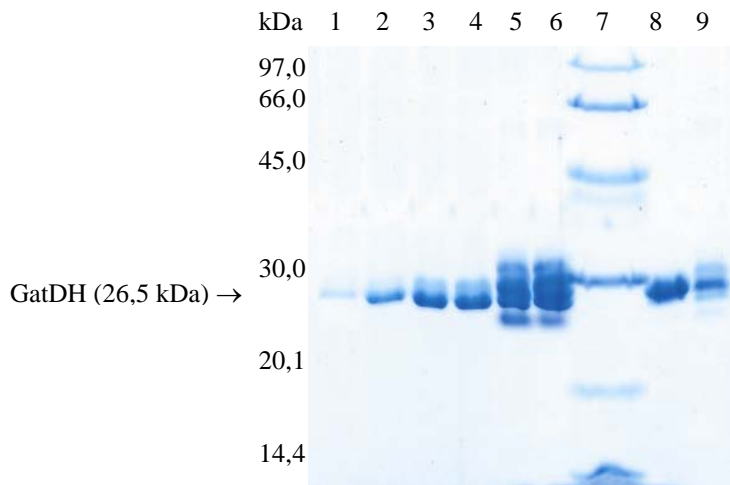


Abb. 15: SDS-PAGE (12 %) unter reduzierenden Bedingungen; Test der Aufreinigung der GatDH mittels Affinitätschromatographie; Hierbei sollte ungeschnittene $(\text{His})_6$ -GatDH von der geschnittenen GatDH ohne N-terminalen $(\text{His})_6$ -Affinitätsmarker getrennt werden.

Spur 1: Verdau-Ansatz von $(\text{His})_6$ -GatDH mit TEV-Protease nach 48 h

Spur 2: Überstand der Ni-Matrix

Spur 3: Waschschrift 1

Spur 4: Waschschrift 2

Spur 5: Elutionsfraktion

Spur 6: aufgekochte Matrix nach der Elution

Spur 7: Marker

Spur 8: Kontrolle: $(\text{His})_6$ -GatDH vor dem Verdau mit TEV-Protease

Spur 9: TEV-Protease

3.1.4 MALDI-Analyse der aufgereinigten GatDH

Das theoretisch berechnete Molekulargewicht der GatDH beträgt ohne den Affinitätsmarkers 26.522 Da. Die MALDI-Messung (Abb. 16) zeigt einen einzelnen Peak bei 26.537 Da, der der Masse der GatDH entspricht. Das Protein ist also zu fast 100 % rein und zeigt keinen proteolytischen Abbau. Der Massenunterschied von +15 Da könnte von einem gebundenen Na^+ -Ion stammen.

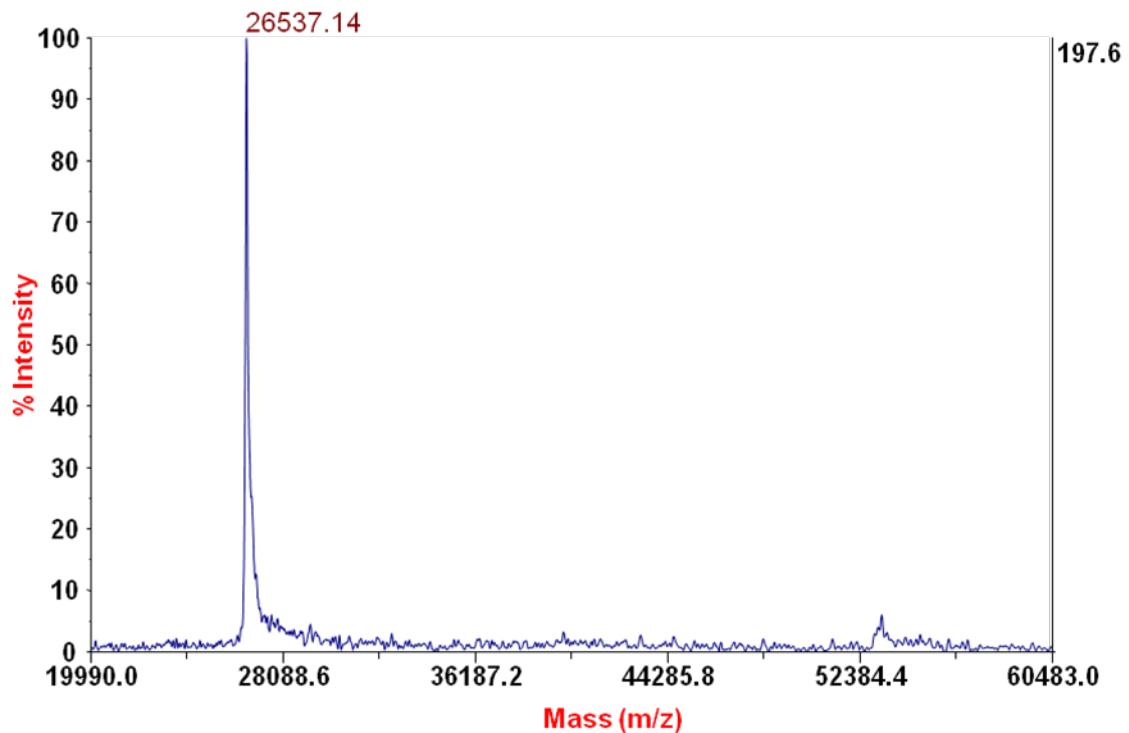


Abb. 16: MALDI-Spektrum der GatDH nach Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie und Entfernen des N-terminalen (His)₆-Affinitätsmarkers.

3.1.5 Aktivitätsbestimmung der aufgereinigten GatDH

Die Aktivität der aufgereinigten GatDH wurde mittels eines Assays bestimmt und mit der der Wildtyp-GatDH verglichen. Um eine zu schnelle Umsetzung des Substrates in der Reaktionsküvette zu vermeiden und damit eine auswertbare Umsetzungskurve zu erhalten, musste die aufgereinigte GatDH mit dem Reaktionspuffer (200 mM Bis-Tris, pH 9,0; 1 mM MgCl₂) auf 0,06 mg/ml verdünnt werden. Der Reaktionsansatz wurde, wie in Kapitel 2.14.7 beschrieben, zusammenpipettiert und bei 30 °C die Absorptionzunahme bei 340 nm über die Zeit gemessen. Um eine höhere Redundanz zu erreichen, wurden je drei Ansätze gemessen (Tab. 10).

Tab. 10: Volumenaktivität und spezifische Aktivität der aufgereinigten GatDH (diese Arbeit) im Vergleich zu anderen aufgereinigten GatDH-Chargen (AG Angewandte Mikrobiologie)

<i>GatDH-Chargen</i>	$\Delta E/min$	Aktivität [U/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg]
GatDH	0,2411	0,5233	9,0
(diese Arbeit)	0,3022	0,6558	11,3
	0,2843	0,6170	10,6
GatDH (aus <i>R. sphaeroides</i> aufgereinigt)			12
GatDH (aus <i>E. coli</i> aufgereinigt)			19

Im Durchschnitt wurde eine Aktivität von 0,6 U/ml gemessen, was einer spezifischen Aktivität von 10,3 U/mg entspricht. Die in dieser Arbeit aufgereinigte GatDH zeigt also eine vergleichbare Aktivität zu der aus dem Ursprungsorganismus isolierten GatDH.

Im Vergleich zu der ohne Affinitätsmarker aufgereinigten GatDH hat die in dieser Arbeit aufgereinigte GatDH nur 55 % der spezifischen Aktivität.

3.1.6 MALLS (*Multiple Angle Laser Light Scattering*)-Messungen

Frühere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die GatDH als Tetramer vorliegt (Diplomarbeit Gregor Jäkel, 1994). Allerdings zeigt das Protein in der analytischen Gelfiltration ein Elutionsprofil, das einem Dimer oder Trimer entspricht (Daten nicht angegeben). Daher wurden zusätzlich MALLS-Messungen mit dem löslichen Protein in der Arbeitsgruppe Medizinische Biochemie und Molekularbiologie (Medizinische Fakultät, Universität des Saarlandes) durchgeführt. Die Tetramer-Bildung der GatDH sollte in Abhängigkeit vom Kofaktor, NAD^+ oder NADH, sowie $MgCl_2$ charakterisiert werden.

3.1.6.1 Probenvorbereitung der GatDH

GatDH mit einer Konzentration von 11 mg/ml (entspricht 417 μM) wurde mit dem ca. 25-fachen molaren Überschuss an EDTA (10 mM Endkonzentration) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wie aus früheren Arbeiten bekannt (Diplomarbeit Gregor Jäkel, 1994), reicht ein 10xfacher Überschuss an EDTA nicht aus, um das Mg^{2+} komplett zu entfernen.

Daher wurde einmal gegen 20 mM Bis-Tris, pH 7,0 mit erneuter Zugabe von 10 mM EDTA dialysiert.

Danach wurde das EDTA durch zweimaliges Dialysieren gegen 20 mM Bis-Tris, pH 7.0 entfernt. Die Konzentration des Proteins wurde auf 1 mg/ml eingestellt und 6 verschiedene Ansätze vorbereitet:

- GatDH, ohne MgCl₂, ohne Kofaktor
- GatDH, ohne MgCl₂, mit 1 mM NAD⁺
- GatDH, ohne MgCl₂, mit 1 mM NADH
- GatDH, mit 1 mM MgCl₂, ohne Kofaktor
- GatDH, mit 1 mM MgCl₂, mit 1 mM NAD⁺
- GatDH, mit 1 mM MgCl₂, mit 1 mM NADH

3.1.6.2 MALLS-Messungen

Die MALLS-Messungen wurden, wie in Kapitel 2.15.1 beschrieben, durchgeführt. Es wurde jeweils 25 µl oder 50 µl GatDH mit einer Konzentration von 1 mg/ml injiziert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden der RI- und der UV-Detektor verwendet. Das Molekulargewicht wurde unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizient ($1.325 \text{ ml g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) von GatDH errechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildungen 17 und 18 dargestellt sowie in den Tabellen 11 und 12 zusammengefasst.

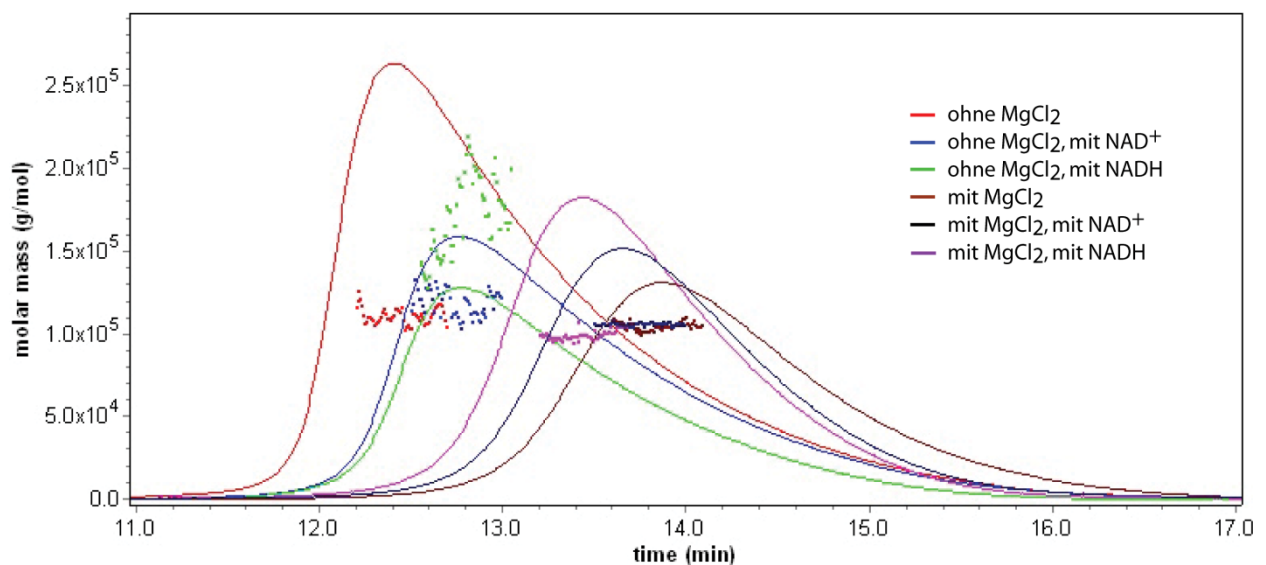


Abb. 17: Bestimmung der Molekulargewichte verschiedener GatDH-Proben mittels MALLS. Als Beispiel wurde das Fluss-Diagramm des UV-Detektors gezeigt.

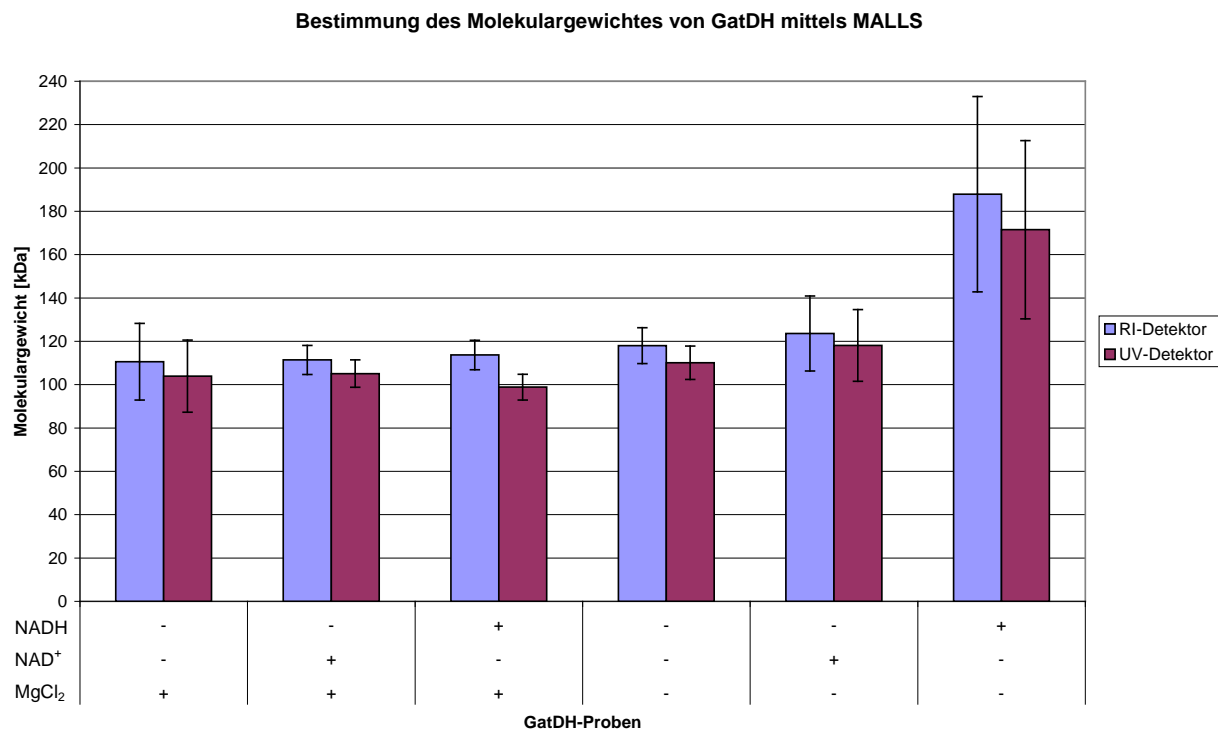


Abb. 18: Bestimmung der Molekulargewichte von GatDH-Proben, in Ab- und Anwesenheit von MgCl₂ und den Kofaktoren NAD⁺/NADH. Die Konzentration wurde sowohl mit einem RI-Detektor als auch mit einem UV-Detektor bestimmt.

Tab. 11: Molekulargewichtsbestimmung der GatDH mit dem RI-Detektor zur Konzentrationsbestimmung

	Probe	MW [kDa]	Fehler [%]	Fehler [kDa]	Injizierte Masse [μg]	kalkulierte Masse Peak [μg]	kalkulierte Masse total [μg]	Polydispersität
mit MgCl ₂	GDH	111	16%	18	38,2	6,8	22,9	1,001
	GDH + NAD ⁺	111	6%	7	38,2	7,9	24,8	1,000
	GDH + NADH	114	6%	7	38,2	9,1	28,1	1,001
ohne MgCl ₂	GDH	118	7%	8	38,2	13,5	45,3	1,002
	GDH + NAD ⁺	124	14%	17	38,2	8,3	29,1	1,004
	GDH + NADH	188	24%	45	38,2	6,4	20,7	1,020

Tab. 12: Molekulargewichtsbestimmung der GatDH mit dem UV-Detektor zur Konzentrationsbestimmung

	Probe	MW [kDa]	Fehler [%]	Fehler [kDa]	Injizierte Masse [μg]	kalkulierte Masse Peak [μg]	kalkulierte Masse total [μg]	Polydispersität
mit MgCl ₂	GDH	104	16%	17	38,2	7,3	24,6	1,001
	GDH + NAD ⁺	105	6%	6	38,2	8,2	25,7	1,000
	GDH + NADH	99	6%	6	38,2	10,1	29,8	1,001
ohne MgCl ₂	GDH	110	7%	8	38,2	14,4	46,7	1,002
	GDH + NAD ⁺	118	14%	17	38,2	8,6	29,6	1,004
	GDH + NADH	172	24%	41	38,2	7,0	22,1	1,020

Die experimentell ermittelten Molekulargewichte der verschiedenen GatDH-Proben liegen fast alle im Bereich des theoretischen Molekulargewichts des Tetramers von 105,6 kDa. Das Laufverhalten im Feldflusskanal unterscheidet sich bei den Proben mit und ohne $MgCl_2$ im Laufpuffer, was auf eine etwas andere Ladungsverteilung hindeuten könnte. Bei GatDH ohne $MgCl_2$ steigt das Molekulargewicht leicht an, bei zusätzlicher Zugabe des Kofaktors NADH scheint das Protein zur Aggregation zu neigen.

3.1.7 Kristallisation von GatDH mit dem Kofaktor NAD^+

Zur Kristallisation wurden verschiedene Chargen der GatDH eingesetzt. Zuerst wurde GatDH verwendet, welche rekombinant in *E. coli* ohne Affinitätsmarker exprimiert und aufgereinigt wurde. Sie wurde von der AG Angewandte Mikrobiologie der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt. Später wurde GatDH verwendet, deren Expressionskonstrukt während dieser Arbeit kloniert, das Protein in *E. coli* produziert und aufgereinigt wurde.

Native GatDH wurde in 20 mM Bis-Tris, pH 6,5 und 1 mM $MgCl_2$ als Kristallisationspuffer und einer Proteinkonzentration von 20 mg/ml kristallisiert. Der Kofaktor NAD^+ wurde in stöchiometrisch gleicher Menge zugegeben. GatDH hat bei einem Molekulargewicht von 26,4 kDa und einer Konzentration von 20 mg/ml eine Molarität von 750 μM . NAD^+ wurde daher in einer Konzentration von 1 mM vor der Kristallisation zugegeben, um durch einen Überschuss ein vollständiges Binden zu gewährleisten.

Für die ersten Kristallisationsversuche wurden *Crystal Screen*TM, *Crystal Screen 2*TM und *PEG/Ion Screen*TM von Hampton-Research getestet. Nach 1-14 Tagen wurden erste Kristalle in 6 verschiedenen Bedingungen beobachtet (Tab. 13).

Tab. 13: Erste Kristallisationsbedingungen von GatDH bei *Crystal Screen*TM und *PEG/Ion Screen*TM (Hampton Research)

Screen, Lösung	Puffer	Salz	Präzipitant	Form der Kristalle
Crystal Screen, 6	0,1 M Tris-HCl, pH 8,5	0,2 M $MgCl_2$	30 % PEG 4000	Verwachsene Plättchen
Crystal Screen, 18	0,1 M NaCacodylat, pH 6,5	0,2 M MgAcetat	20 % PEG 8000	Verwachsene Plättchen
Crystal Screen, 28	0,1 M NaCacodylat, pH 6,5	0,2 M NaAcetat	30 % PEG 8000	Verwachsene Plättchen
Crystal Screen, 46	0,1 M NaCacodylat, pH 6,5	0,2 M CaAcetat	18 % PEG 8000	Plättchen, z.T. kleine Einkristalle
PEG/Ion, 7		0,2 M $CaCl_2$	20 % PEG 3350	Nadeln
PEG/Ion, 28		0,2 M CaAcetat	20 % PEG 3350	Verwachsene Platten

Die Bedingungen ähnelten sich in ihren Bestandteilen. Magnesium-Salze oder verschiedene Acetate sowie Cacodylat als Puffer konnte beobachtet werden. Auch das Molekulargewicht und die Konzentration des PEG waren zum Teil gleich.

Es wurde versucht, diese Bedingungen mit selbst angesetzten Lösungen zu reproduzieren. Dies gelang am besten bei den Bedingungen 6 und 28 (*Crystal Screen*TM):

(1) 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5; 0,2 M MgCl₂; 30 % PEG 4000

(2) 0,1 M NaCacodylat, pH 6,5; 0,2 M NaAcetat; 30 % PEG 8000

Hier kristallisierte das Protein teilweise besser als mit den Originallösungen von Hampton-Research. In der ersten Bedingung bildeten sich zum Teil verwachsene Platten, in der zweiten wuchsen neben verwachsenen Nadeln tetragonale Einkristalle innerhalb von 5 Stunden bis 3 Tagen (Abb. 23, A).

3.1.8 Montieren von GatDH-Kristallen und Testmessungen

Die Kristalle wurden für Testmessungen in Nylon-Schleifen montiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Trotz der hohen Konzentration an PEG 4000 und PEG 8000 in den Kristallisationsansätzen, gefroren diese Bedingungen nicht komplett glasartig. Deshalb wurde jeweils 10 % (v/v) Glycerin bzw. 15 % (w/v) D-Glucose zugegeben. Aus jedem Kristallisationsansatz wurde je ein Kristall in einem der Cryobedingungen inkubiert und eingefroren oder direkt aus dem Tropfen entnommen.

Die Testmessungen wurden, wie in Kapitel 2.15.4.1 beschrieben, durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass Glycerin und Glucose die Diffraktion beeinträchtigen. Kristalle, die direkt aus dem Tropfen entnommen wurden, streuten am besten, trotz leichter Trübung der gefrorenen Mutterlauge. Hier konnte auch beobachtet werden, dass die Diffraktion der Kristalle zunehmend schlechter wird, je länger diese im geöffneten Tropfen verblieben und später eingefroren wurden.

Es wurde mit dem am besten streuenden Kristall (2,6 Å Auflösung) einen Datensatz gesammelt. Die Raumgruppe wurde mit P4₁2₁2 mit den Zellparametern $a=b=109,3$ Å, $c=125,3$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ bestimmt. Eine Berechnung des Matthews-Parameters ergab eine asymmetrische Einheit mit 4 Molekülen und einem Lösungsmittel-Gehalt von 45 %.

3.1.9 Optimierung der Kristallisationsbedingungen durch Additiv-Screens

Um eine höhere Symmetrie mit weniger Molekülen pro asymmetrische Einheit zu erreichen, wurde basierend auf der besten Kristallisationsbedingung Additiv-Screens durchgeführt.

Es wurde eine Bedingung mit 4 % (v/v) n-Propanol gefunden, deren Kristalle die Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit den Zellparametern $a=97,8 \text{ \AA}$, $b=106,6 \text{ \AA}$, $c=109,3 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ sowie 4 Molekülen in der asymmetrischen Einheit aufwiesen.

3.1.10 Aufnahme eines hochauflösenden Datensatz von GatDH in Komplex mit NAD^+

Von einem GatDH-Kristall wurde ein Datensatz am Synchrotron (ESRF, Grenoble) bis zu einer Auflösung von $1,4 \text{ \AA}$ gemessen. Da dieser in den niedrigeren Auflösungsschalen starke Überladung (*Overloads*) der Reflexe zeigte, was mit einem Informationsverlust verbunden ist, wurde ein zweiter Datensatz mit einer geringeren Belichtungszeit und daraus resultierender geringerer Auflösung ($2,0 \text{ \AA}$) gemessen. Um eine noch höhere Auflösung als im ersten Datensatz zu erzielen, wurde ein dritter Datensatz mit verhältnismäßig langer Belichtungszeit bis zu einer Auflösung von $1,25 \text{ \AA}$ gemessen. Alle drei Datensätze wurden einzeln mit XDS prozessiert und in XSCALE vereinigt.

3.1.11 Strukturlösung der GatDH in Komplex mit NAD^+

Die Struktur der GatDH, kokristallisiert mit dem Kofaktor NAD^+ , wurde durch die Methode des molekularen Ersatzes gelöst. Dazu wurde ein Modell aus homologen Strukturen mit dem Server SWISS-MODEL (Schwede *et al.*, 2003) erstellt. Mit den Programmen MOLREP und ARP/wARP wurde ein erstes Strukturmodell der GatDH erstellt. 33 % des Modells, unter Berücksichtigung der vorgegebenen Aminosäure-Sequenz, konnte dadurch modelliert werden. Mit dem Programm O wurden die vier Polypeptid-Ketten aus einzelnen Fragmenten zusammengesetzt und fehlende Aminosäuren ergänzt und anschließend mit dem Programm REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997) verfeinert. Sehr gut definierte Elektronendichte im aktiven Zentrum konnte dem Kofaktor NAD^+ zugeordnet werden. Zwei Mg^{2+} -Bindestellen wurden über die Koordinationssphäre aus sechs Liganden erkannt. Mit zunehmender Verfeinerung der Struktur wurde einigen Aminosäure-Seitenketten und einigen Bereichen des Polypeptid-Rückgrats alternative Konformationen zugeordnet, wodurch sich die *R*-Faktoren nochmals verbesserten. Die Datenstatistiken der endgültigen Struktur sind in Tab. 14 und Abb. 19 zusammengefügt.

Tab. 14: Diffraktions-Datensammlung und Verfeinerungsstatistiken für GatDH, kokristallisiert mit NAD⁺

<i>Datensammlung und Prozessierung</i>	<i>GatDH_NAD⁺</i>	<i>GatDH_NAD⁺</i>	<i>GatDH_NAD⁺</i>
Datensatz	low resolution (2,0 Å)	high resolution (1,4 Å)	ultra high resolution (1,2 Å)
Röntgenquelle	ID14-3	ID14-3	ID14-2
Detektor	ADSC Q4R CCD	ADSC Q4R CCD	ADSC Q4R CCD
Wellenlänge (Å)	0,931	0,931	0,933
Temperatur (K)	100	100	100
Abstand Kristall-Detektor (mm)	150	95	90
Belichtungszeit (s)	3	6	50
Oszillation/Bild (°)	0,4	0,4	0,4
Gesamt-Oszillation (°)	100	100	120
Statistiken der drei zusammengeführten Datensätze (XSCALE)			
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁		
Zelldimensionen			
a / b / c (Å)	97,8/106,6/109,3		
α / β / γ (°)	90/90/90		
Auflösungsgrenze (Å) ^a	1,25 [1,28-1,25]		
Vollständigkeit (%) ^a	98,6 [92,9]		
Anzahl der beobachteten Reflexe (alle/unabhängig)	2.111.884 / 602.430		
durchschnittliche Redundanz	3,5 [1,4]		
<I/σ(I)> ^a	8,4 [2,0]		
R _{sym} (%) ^{a,b}	10,5 [55,9]		
B-factor aus Wilson-Plot (Å ²)	22,0		
Verfeinerungsstatistiken			
Auflösungsgrenze (Å) ^a	1,25 [1,28-1,25]		
Anzahl der unabhängigen Reflexe ^a	297.654 [21.830]		
Vollständigkeit der Daten ^a	99,9 [99,7]		
R _{cryst} (%) ^{a, c}	16,5		
R _{free} (%) ^{a, d}	19,5		
Anzahl der Atome (ohne H)	10.089		
Protein	8.287		
Lösungsmittel	1.802		
Ramachandran-Plot (%)			
favorisiert, erlaubt, ungünstig ^e	98,6; 1,4; 0		
Koordinatenfehler ^f	0,046		

R.m.s.-Abweichung von idealen Werten

Bindungslängen (Å)	0,028
Bindungswinkel (°)	2,339

Durchschnittlicher *B*-Faktor (Å²)

Peptid-Rückgrad	15,8
Seitenketten	25,3
Lösungsmittel	39,0
Propanol	28,3
Mg ²⁺	11,3

B-Faktor (Å²) des NAD⁺

Kette A	13,8
Kette B	16,2
Kette C	15,0
Kette D	17,1

Legende:

^a Werte für die Schale mit der höchsten Auflösung sind in Klammer () gesetzt.

$$R_{sym} = 100 \times \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I_i(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$$

wobei $I_i(hkl)$ die Intensität der *i*ten Messung der Reflexe mit den Miller'schen Indizes *hkl* und $\langle I_i(hkl) \rangle$ die mittlere Intensität aller Messungen von $I(hkl)$ ist, kalkuliert für $I \geq 3\sigma(I)$.

$$R_{cryst} = 100 \times \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$$

mit F_{obs} und F_{calc} als die gemessenen und kalkulierten Strukturfaktor-Amplituden.

^d R_{free} ist entsprechend dem R_{cryst} kalkuliert, aber 5 % der Reflexe sind vom Verfeinerungsprozess ausgenommen (Brünger, 1992; Tickle *et al.*, 2000).

^e kalkuliert mit dem Programm *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993).

^f kalkuliert mit dem Programm *SFCHECK* (Vaguine *et al.*, 1999), basierend auf einem Luzzati-Plot.

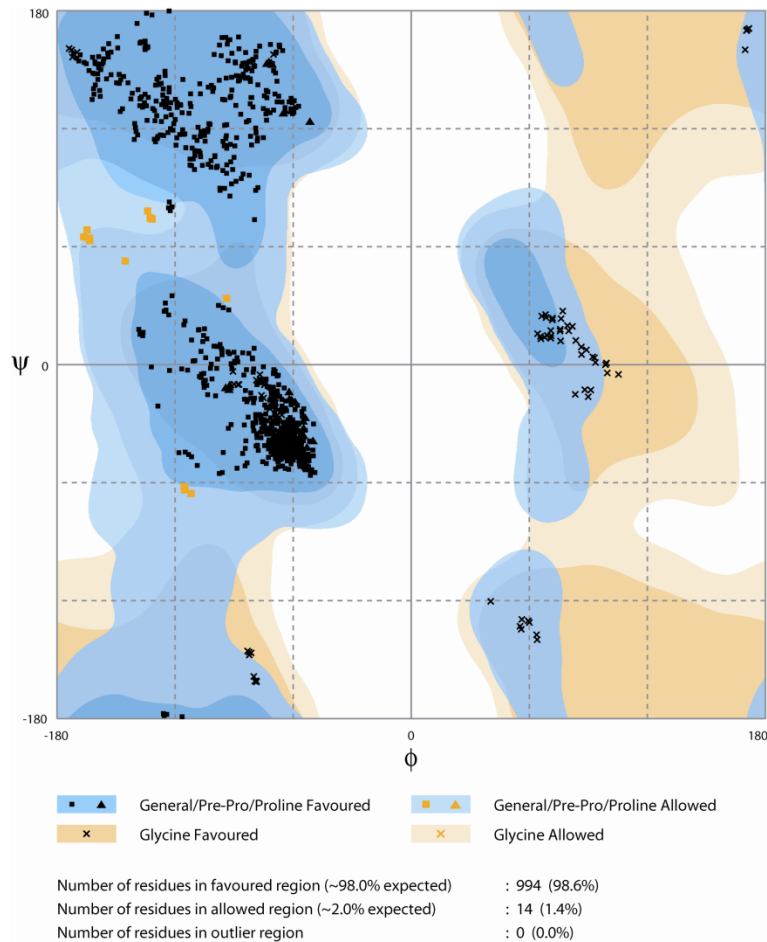


Abb. 19: Ramachandran-Diagramm des endverfeinerten Strukturmodells von GatDH_NAD⁺ (berechnet mit PROCHECK, CCP4).

3.1.12 Analyse der GatDH-Struktur in Komplex mit NAD⁺

GatDH wurde mit dem Kofaktor, aber ohne ein bekanntes Substrat oder Produkt kristallisiert. Eine Analyse der Struktur zeigte aber gut konturierte Elektronendichte im aktiven Zentrum, die nicht durch Wassermoleküle beschrieben werden konnte. Eine OMIT-Karte der Struktur, ohne Wassermoleküle im aktiven Zentrum berechnet, zeigte zwei starke Elektronendichte-Inseln (Abb. 20).

Eine alternative Konformation des Nicotinamid-Rings des Kofaktors konnte ausgeschlossen werden. Es muss sich daher um eine Substanz handeln, die sich entweder in den Aufreinigungspuffern, in den Kristallisationsbedingungen oder im Puffer, in dem das Protein gelagert wurde, befand. Bis-Tris- oder Tris-Moleküle konnten ausgeschlossen werden, da beide zu groß sind, um die Elektronendichte zu beschreiben. Ebenso traf dies auf Cacodylat wegen seines elektronenreichen Arsen-Atoms zu. Übrig blieben n-Propanol und Acetat. Je zwei Acetat- und Propanol-Moleküle wurden getrennt in die Elektronendichte eingesetzt und die Struktur

verfeinert. Die Elektronendichte-Inseln konnten durch beide Substanzen sehr gut beschrieben werden.

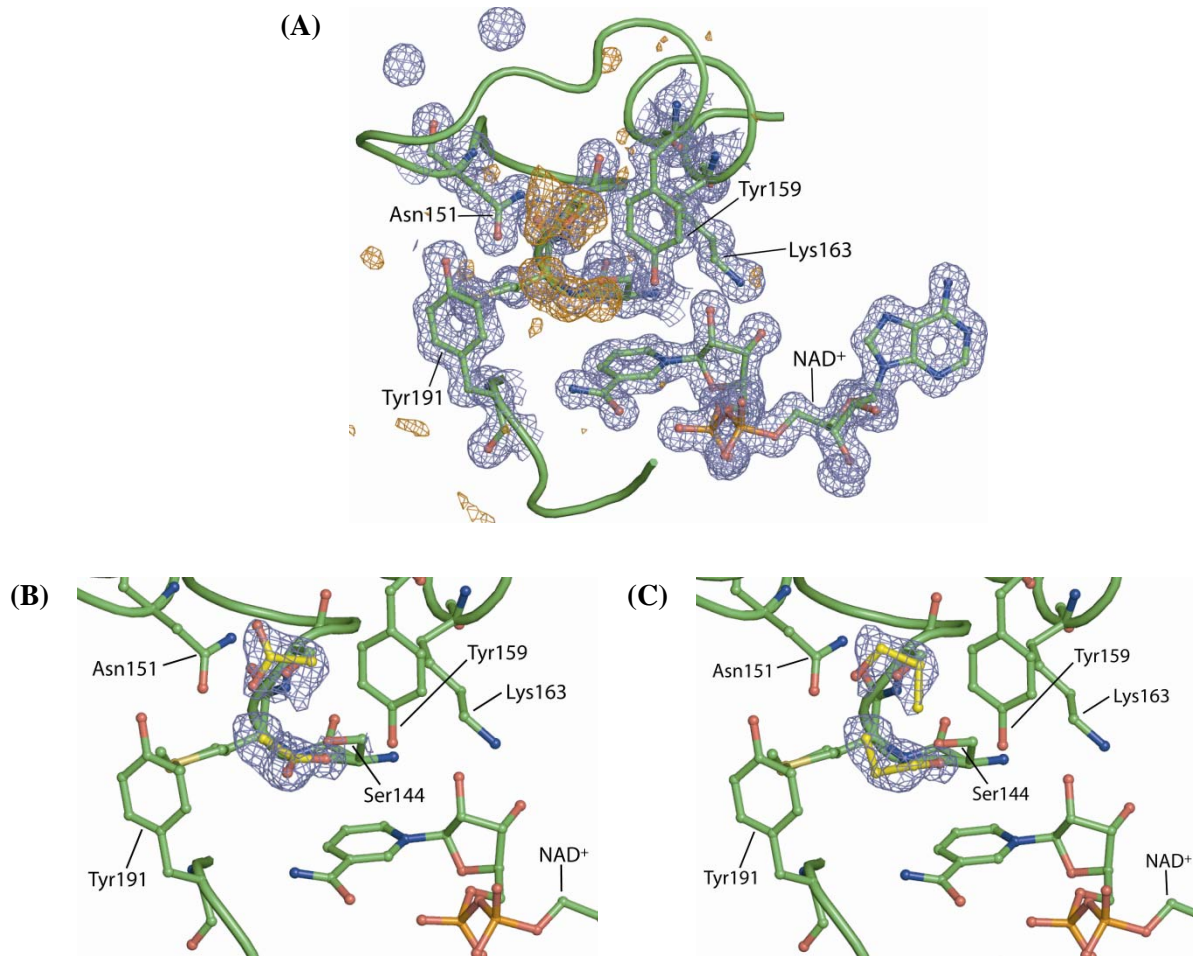


Abb. 20: Aktives Zentrum der GatDH mit Elektronendichte-Karte, konturiert bei $1,5 \sigma$. Die Aminosäure-Reste und der Kofaktor besitzen sehr gut definierte Elektronendichte (in blau).

- (A) Aktives Zentrum mit noch nicht beschriebener Elektronendichte (orange).
- (B) mit zwei im aktiven Zentrum gebundenen Acetat-Molekülen
- (C) mit zwei im aktiven Zentrum gebundenen n-Propanol-Molekülen

Ein n-Propanol-Molekül kann mit seinem O-Atom eine Wasserstoffbrücke zu Ser144 bilden und dadurch das C2-Atom in räumlicher Nähe zu dem Nicotinamidring, an dem der Hydrid-Transfer stattfindet, bringen. n-Propanol wird allerdings nicht von GatDH umgesetzt (Schneider *et al.*, 1995, Kohring *et al.*, 2003). Das zweite n-Propanol-Molekül kann durch H-Brückenbindungen zu Gln154 und Asn151 stabilisiert werden.

Im Falle von Acetat würde ein Molekül mit seinen beiden O-Atomen H-Brückenbindungen zu OG von Ser144 und Ser146, zu OD1 von Asn151 und zu OH von Tyr 159 bilden. In Kette A liegt das Molekül aber so vor, dass es nur mit einem Sauerstoffatom H-Brückenbindungen zu

Ser144 und Tyr 159 eingehen kann. Das zweite Acetat-Molekül liegt in allen Ketten weiter entfernt vom Nicotinamid-Ring und ist durch H-Brückenbindungen zu OE1 von Gln154 und OD1 von Asn151 fixiert.

Jedoch wird in beiden Fällen nach dem Verfeinerungsschritt mit REFMAC5 sowohl für n-Propanol als auch für Acetat Strafelektronendichte angezeigt. Es könnte sich hier also um einen Mischzustand handeln, bei dem in einem Teil der aktiven Zentren sowohl zwei Moleküle Acetat oder n-Propanol binden, in anderen aktiven Zentren je ein Acetat- und ein n-Propanol-Molekül.

Eine weitere GatDH-Struktur, mit einem Kristall gelöst, der ohne n-Propanol, aber mit Acetat kokristallisiert wurde, zeigt nur eine tetraeder-förmige Elektronendichte in der Nähe des Nicotinamid-Rings. Dies deutet auf die Bindung nur eines Acetat-Moleküls in zwei Konformationen hin.

3.1.13 Strukturen der GatDH mit gebundenen Substraten

Um den katalytischen Mechanismus der GatDH besser verstehen zu können, sollten Strukturen der GatDH mit gebundenem Substrat oder Inhibitoren gelöst werden. Dazu sollten GatDH-Kristalle mit Substraten oder Inhibitoren getränkt werden. Hierbei befindet sich die Substanz in der Kristallisations-Mutterlauge und diffundiert in den Kristall. Der Vorteil ist das parallele Testen vieler verschiedener Substanzen. Allerdings kann eine Diffusion der Substanzen in den Kristall durch eine enge Packung der Moleküle erschwert werden oder die Packung des Kristalls durch die Substanzen, z.B. durch Änderung der Dielektrizitätskonstante, zerstört werden. Durch eine Kokristallisation werden beide Probleme vermieden, allerdings müssen eventuell für jede Substanz neue Kristallisationsbedingungen gefunden werden, wozu eine große Menge an Protein benötigt wird.

3.1.13.1 Suchen von neuen Kristallisationsbedingungen

Da in der ersten aufgeklärten Struktur von GatDH Acetat- oder n-Propanol-Moleküle im aktiven Zentrum gebunden sind, würden diese ein Eindiffundieren und Binden der Substrate oder der Inhibitoren ins aktive Zentrum verhindern. Deshalb wurden neue Kristallisations-Bedingungen, in denen keine Substanzen mit Karbonsäure-ähnlichen Gruppen (wie Acetat oder Cacodylat=Arsensäure) vorhanden sind, gesucht. Es wurde daher versucht, in den Kristallisations-Ansätzen das Acetat gegen andere Salze (z.B. $MgCl_2$) auszutauschen. Zusätzlich

wurde das Cacodylat gegen andere Puffer mit unterschiedlichen Pufferbereichen ausgetauscht und verschiedene PEG-Arten mit unterschiedlichen Molekulargewichten (bei 30 % (w/v) eingesetzter Konzentration) getestet.

Tab. 15: Schema zum Screenen des Puffers gegen PEG mit unterschiedlichen Molekulargewichten

Puffer \ PEG (30 % w/v)	PEG 3350	PEG 4000	MPEG 5000	PEG 6000	PEG 8000	PEG 8000
0,1 M MES, pH 6,2	0,2 M MgCl ₂					
0,1 M NaCacodylat, pH 6,5 (Kontrolle)						
0,1 M HEPES, pH 7,0						
0,1 M Tris-HCl, pH 7,5						

Die besten Ergebnisse konnte mit MES als Puffer und MPEG 5000 sowie PEG 8000 erzielt werden. Die Kristalle wuchsen in Form von dicken Stäbchen (Abb. 23, B).

Das Austauschen von MgCl₂ gegen CaCl₂ erbrachte eine Verschlechterung, da die Kristalle sehr faserig wuchsen.

Große Einkristalle konnten schließlich durch das Absenken des pH-Wertes und der Verringerung der PEG-Konzentration erzielt werden. Als beste Bedingungen erwiesen sich dann:

0,1 M MES, pH 5,5-5,9; 0,2 M MgCl₂, 14-15 % MPEG 5000.

Zum Montieren der Kristalle wäre eine Überführung in Cryolösung nicht nötig gewesen, da die Mutterlauge ohne Zusätze bereits glasartig gefror. Testmessungen an der Heimquelle (Xcalibur, Oxford Diffraction) ergaben aber, dass diese Kristalle trotz gleicher Größe der mit Acetat kristallisierten Kristalle schlechter streuten. Deshalb wurden die Kristalle in Lösungen mit steigender PEG-Konzentration überführt. Dies geschah stufenweise, da zu große Konzentrationsunterschiede die Kristalle eventuell instabil werden lassen und sie zerbrechen. Durch den erhöhten PEG-Gehalt können die Kristalle dehydratisiert werden und schrumpfen, wodurch sie mitunter besser streuen (Kiefersauer *et al.*, 2000). Als Maximum wurde 30 % oder 35 % MPEG 5000 in der Cryolösung eingesetzt. Puffer und Salz-Konzentration wurde gegenüber der Mutterlauge nicht verändert.

Von zwei dieser Kristalle, mit den neuen Bedingungen ohne Substanzen mit Carboxylatgruppen kristallisiert, wurde die Struktur gelöst. Die Elektronendichte-Karten zeigten diffuse Elektronendichte im aktiven Zentrum, die vermutlich schlecht positionierte Wassermoleküle zeigt. Lediglich ein Wassermolekül, zu Ser144 und Ser146 über H-Brückenbindungen

koordiniert, ist sehr gut definiert (Abb. 21). Kristalle aus den neuen Bedingungen konnten daher zu Diffusions-Experimenten mit Substraten der GatDH und einem Inhibitor, wie in Kapitel 2.15.2.5 beschrieben, verwendet werden.

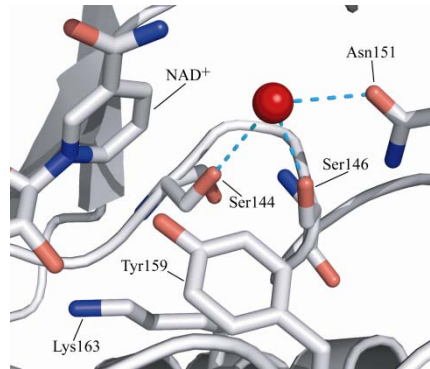
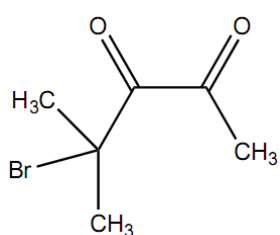


Abb. 21: GatDH-Struktur von einem Kristall, in Bedingungen ohne Acetat und n-Propanol kristallisiert. Außer einem sehr gut definierten Wassermolekül (als rote Kugel dargestellt), das über H-Brückenbindungen (cyan-farbige Striche) zu Ser144, Ser146 und Asn151 koordiniert wird, binden im aktiven Zentrum keine größeren Lösungsmittel-Moleküle. Gleiche Kristalle konnten daher für Tränk-Experimente mit Substraten der GatDH eingesetzt werden.

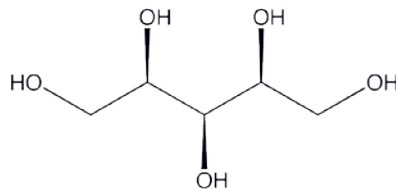
3.1.13.2 Kristall-Diffusions-Experimente (Soaking)

Nachdem Kristalle ohne Substanzen in der Kristallisationsbedingung, die Karbonsäure-ähnliche Gruppen enthalten, etabliert werden konnten, wurden diese mit verschiedenen Substraten und einem für GatDH modellierten und synthetisierten Inhibitor, 2-Brom-2-Methyl-Pentan-3,4-dion (AG Wenzel, Organische Makromolekulare Chemie, Universität des Saarlandes) getränkt. Der Inhibitor hat ein Molekulargewicht von 193,04 g/mol, was einer Konzentration des reinen Inhibitors von 7,25 M entspricht.

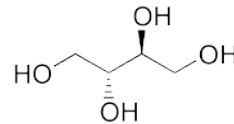
Es wurden 2-Propanol und Xylitol als Substrate gewählt, welche sehr gut von der GatDH umgesetzt werden sowie *meso*-Erythritol, welches eher schlecht umgesetzt wird, aber trotzdem am Enzym binden könnte.



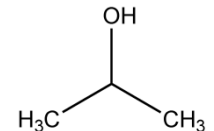
2-Brom-2-Methyl-Pentan-
3,4-dion



Xylitol



meso-Erythritol



2-Propanol

Kristalle der GatDH wurden, wie in Kapitel 3.1.13.1 beschrieben, mit dem Kofaktor NAD⁺ (1 mM) kristallisiert. Die Kristalle wurden in Tränk-Lösung überführt, welche die verschiedenen Substrate oder den Inhibitor sowie frischen Kofaktor (1 mM) enthielten. Die Tränk-Lösung entsprach dabei der Cryo-Lösung, da sie auch gleichzeitig nötig war, um die Diffraktion der Kristalle zu erhöhen. Auch hier wurde die MPEG 5000-Konzentration in 3-5 %-Schritten erhöht und pro Stufe der Kristall zwischen 10-60 min inkubiert. Nach Erreichen der Stufe mit der höchsten MPEG 5000-Konzentration wurde die Kristalle direkt montiert und weggefroren. Es wurden folgende Diffusions-Ansätze durchgeführt:

Tab. 15: Tränk- (*Soaking*-) Experimente mit GatDH-Kristallen

<i>Substrat/Inhibitor</i>	<i>Konzentration in der Tränk/Cryo-Lösung</i>	<i>Zeit (alle Stufen)</i>
Inhibitor	10 mM	1-5 h
2-Propanol	100 mM/10 mM	1-5 h
<i>meso</i> -Erythritol	10 mM	1-5 h
Xylit	100 mM/10 mM	1-5 h

Kristalle, welche mit 100 mM Xylit getränkt wurden, wurden direkt rissig und zerbröselten. Xylitol als Alkohol kann die Dielektrizitätskonstante stark verändern. Dadurch können Packungseffekte im Kristall gestört werden und diesen während des Tränkens auflösen. Daher wurde in späteren Ansätzen die Konzentration auf 10 mM gesenkt.

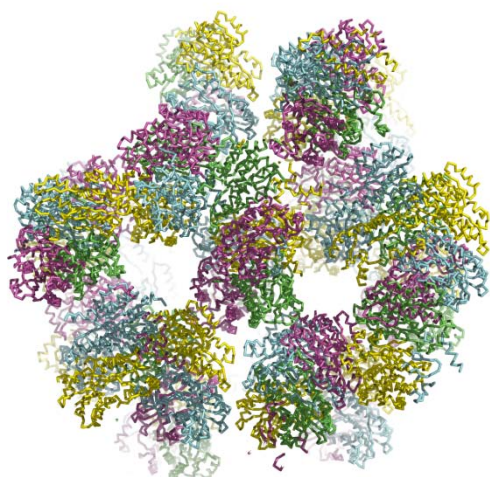
3.1.13.3 Datensätze der getränkten Kristalle

Von den Kristallen wurden Datensätze aufgenommen, wenn sie eine bessere Auflösung als 2,5 Å erreichten. Ab dieser Auflösung ist es möglich, im aktiven Zentrum gebundene Substanzen in der Elektronendichte zu erkennen. Die Raumgruppe und die Zellparameter entsprachen denen der nicht behandelten Kristalle. Mit der Struktur des Holoenzym als Modell wurde mittels molekularem Ersatz die Strukturen gelöst und mit dem Programm REFMAC5 verfeinert. Die Datenstatistiken der endgültigen Strukturen sind in Tab. 17 zusammengefügt.

Lediglich in zwei Strukturen mit hohen Auflösungen, von am Synchrotron vermessenen Kristallen, konnte Elektronendichte den Substraten Xylitol und *meso*-Erythritol zugeordnet werden. Der Besetzungsgrad der Atome der Substrate scheint allerdings nicht bei 100 % zu liegen. Eine Erklärung wäre die Packungsdichte der Kristalle. Die Kristalle besitzen bei der

Raumgruppe $P2_12_12_1$ und Zellparametern von $a=64,9 \text{ \AA}$, $b=115,4 \text{ \AA}$, $c=124,4 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ einen Lösungsmittel-Gehalt von 42 %. Im Kristallgitter sind keine größeren Löcher oder Kanäle zu sehen, sodass das Eindiffundieren der Substrate oder des Inhibitors erschwert oder sehr langsam sein könnte (Abb. 22, B).

(A)



(B)

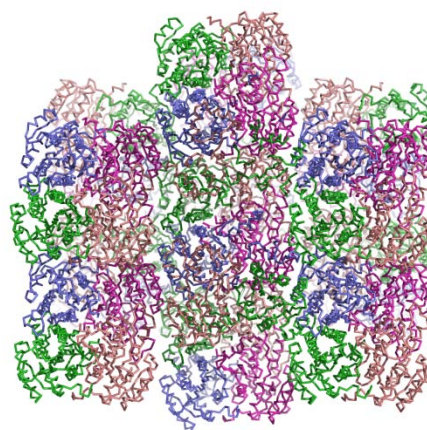


Abb. 22: Vergleich des Packungsaufbau zweier GatDH-Kristallen mit der gleichen Raumgruppe $P2_12_12_1$, aber unterschiedlichen Zellparametern. Die vier Monomere sind unterschiedlich eingefärbt. Es sind die symmetrieverwandten Moleküle innerhalb eines Radius von 30 \AA dargestellt.

(A) $a=97,8 \text{ \AA}$, $b=106,6 \text{ \AA}$, $c=109,3 \text{ \AA}$; $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$; Lösungsmittel-Gehalt von 54 %, Kristallisationsbedingung mit Acetat.

(B) $a=64,9 \text{ \AA}$, $b=115,4 \text{ \AA}$, $c=124,4 \text{ \AA}$; $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$; Lösungsmittel-Gehalt von 42 %, Kristallisationsbedingung ohne Acetat.

3.1.13.4 Kokristallisations-Experimente und Datensätze

Da die Tränk-Experimente von GatDH-Kristallen zum Teil negativ ausfielen und keine interpretierbare Elektronendichte in den Strukturen zu erkennen war, wurde das Enzym zusammen mit dem Substrat oder dem Inhibitor kristallisiert, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit des Kofaktors (NAD^+ oder NADH). Es wurden Substrate gewählt, die gut in der Elektronendichte zu erkennen sind und einen K_m -Wert kleiner als $1,5 \text{ mM}$ aufwiesen, falls dieser bestimmt wurde (siehe Einleitung, Tab. 1). Flüchtige Substanzen wurden dabei auch dem Reservoir zugegeben, die Zucker nur den Kristallisationstropfen. Für den Kristallisationsansatz wurden die Bedingungen aus Kapitel 3.1.13.1 ($0,1 \text{ M MES}$, $\text{pH } 5,5\text{-}6,2$; $0,2 \text{ M MgCl}_2$, $10\text{-}20 \%$

MPEG 5000) verwendet und ein Raster-Screen angesetzt. Die Kristallisationsexperimente sind in Tab. 16 zusammengefasst.

Tab. 16: Kokristallisationsansätze von GatDH mit den Kofaktoren NAD⁺/NADH und verschiedenen Substraten sowie einem Inhibitor

<i>Substrat/Inhibitor</i>	<i>Kofaktor</i>	<i>Konzentration</i>
Inhibitor	1 mM NAD ⁺ /NADH	50 mM
<i>meso</i> -Erythritol	1 mM NAD ⁺ /NADH	5 mM
Xylitol	1 mM NAD ⁺ /NADH	5 mM, 7,5 mM, 20 mM
1,2-Hexandiol	1 mM NAD ⁺ /NADH	5 mM, 20 mM
1,2,6-Hexantriol	10 mM NAD ⁺ /NADH	50 mM (*)
2,3-Hexandion	10 mM NAD ⁺ /NADH	50 mM (*)
2-Heptanol	10 mM NAD ⁺ /NADH	50 mM (*)
1,2-Pentandiol	10 mM NAD ⁺ /NADH	50 mM (*)

(*) Diese Experimente wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Henning Christian (2009) durchgeführt.

Die Kristalle wurden in der bereits etablierten Cryo-Lösung, zusätzlich 1 mM NAD⁺ und den entsprechenden Konzentrationen an Substrat bzw. Inhibitor, eingefroren.

Bei höheren Konzentrationen des Inhibitors fiel das Protein unmittelbar nach dem Vermischen im Tropfen amorph aus, sodass er eher ungeeignet war zum Kokristallisieren. Es wurden trotzdem Datensätze von Kristallen, welche mit dem Inhibitor kokristallisiert wurden, aufgenommen, prozessiert und mittels molekularem Ersatz die Struktur geklärt. Im aktiven Zentrum konnte keine zusätzliche Elektronendichte beobachtet werden, die die Bindung des Inhibitors zeigen konnte. Der ermittelte K_i-Wert des Inhibitors betrug 3 mM, sodass man von einer eher schwachen Bindung ausgehen kann. Außerdem war er sehr schlecht wasserlöslich. Interessanterweise zeigen diese Kristalle (Abb. 23, C) eine andere Raumgruppe (C222₁) und Zellparametern (a=66,4 Å; b=104,9 Å; c=125,1 Å, α=β=γ=90 °). Dies kann auf eventuell veränderte Packungseffekte durch den Inhibitor zurückzuführen sein.

Bei den Kokristallisationsversuchen mit Substrat entstanden nur bei den Ansätzen mit Xylitol, *meso*-Erythritol, 1,2-Hexandiol und 1,2-Pentandiol Einkristalle (mit einer Größe von 0,05-0,1 µm). Allerdings streuten nur die mit 1,2-Pentandiol angesetzten Kristalle besser als 2,0 Å. Alle anderen Kristalle zeigten keine Diffraktion oder eine maximale Diffraktion von ca. 3,0 Å. Von einem Kristall mit 1,2-Pentandiol kokristallisierter GatDH wurden mehrere Datensätze an Heimquelle und Synchrotron im Rahmen einer von mir betreuten Diplomarbeit vermessen. Die

Strukturmodelle konnten mit einer Auflösung von 2,0 Å bis zu einem R_{work} -Faktor von 16,3 % und einem R_{free} -Faktor von 23,0 % (Heimquelle, Kiel) sowie mit einer Auflösung von 1,8 Å bis zu einem R_{work} -Faktor von 19,0 % und einem R_{free} -Faktor von 24,1 % (BESSY, Berlin) endverfeinert werden (Diplomarbeit, Henning Christian, 2009).

3.1.14 Lokalisierung von Bindungsstellen zweiwertiger Metall-Ionen

3.1.14.1 Kokristallisation von GatDH mit CoCl_2

GatDH ist eine Dehydrogenase, für die eine Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen beschrieben wurde (Schneider *et al.*, 1995). Um in der GatDH-Struktur Bindestellen für Mg^{2+} -Ionen zu identifizieren, wurde versucht, diese durch andere zweiwertige, anomal streuende Ionen zu ersetzen. Ein klassischer Ersatz für Mg^{2+} ist Mn^{2+} , da es ebenfalls eine oktaedrische Koordinationssphäre aufweist. Allerdings liegt seine Absorptionskante außerhalb des verwendeten Röntgenstrahlen-Spektrums. Ein anomaler Streuer, dessen Absorptionskante ideal liegt (1,6083 Å), ist Kobalt. Co^{2+} ist ebenfalls ein recht guter Ersatz für Mg^{2+} (Ennifar *et al.*, 2001). Ein weiterer Vorteil ist, dass frühere Untersuchungen zeigten, dass die Aktivität von GatDH durch Zugabe von CoCl_2 um 20 % gesteigert werden kann (Schneider *et al.*, 1995).

Zur Kokristallisation mit CoCl_2 wurden die Kristallisationsbedingungen, wie in Kapitel 3.1.13.1 beschrieben, reproduziert, wobei 0,2 M MgCl_2 durch 0,2 M CoCl_2 ersetzt wurde. GatDH kristallisiert in Anwesenheit von CoCl_2 im Gegensatz zu MgCl_2 als feine Nadeln. Durch Raster-Screen der MPEG 5000-Konzentration gegen die CoCl_2 -Konzentration konnte die Nadeln zu Stäbchen optimiert werden (Abb. 23, D). Als beste Kristallisationsbedingung erwies sich: 0,1 M MES, pH 5,7; 0,1 M CoCl_2 ; 10 % MPEG 5000.

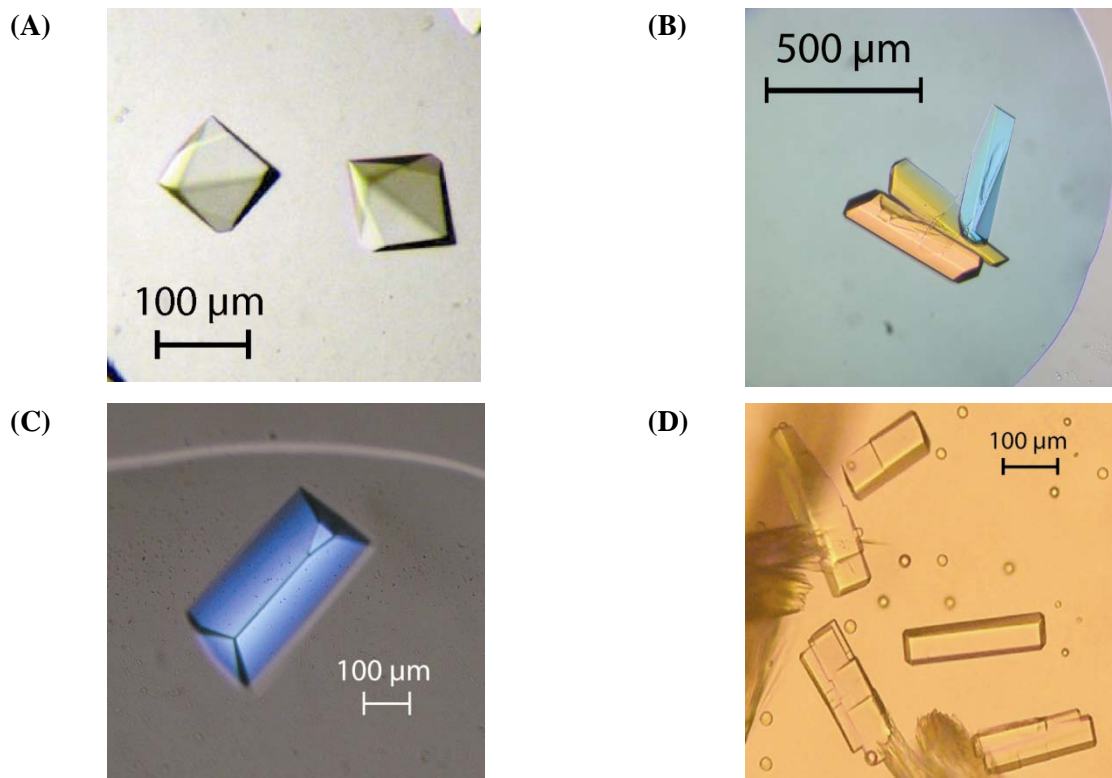


Abb. 23: GatDH-Kristalle, aus verschiedenen Fällungsmitteln mit dem Kofaktor NAD^+ kokristallisiert

- (A) GatDH-Kristalle, in einer Kristallisationsbedingung mit Acetat entstanden
- (B) GatDH-Kristalle, in einer Bedingung ohne Acetat kristallisiert
- (C) GatDH-Kristalle, mit Kofaktor und Inhibitor kokristallisiert
- (D) GatDH-Kristalle, mit CoCl_2 kokristallisiert

3.1.14.2 Aufnahme eines Datensatzes an der Absorptionskante von Kobalt

Von einem GatDH-Kristall, kokristallisiert mit CoCl_2 , wurde an der theoretischen Absorptionskante des Kobalts ein Datensatz gemessen. Ein Röntgen-Fluoreszenz-Scan wurde nicht durchgeführt, da die Cryo-Lösung der Kristalle auch CoCl_2 enthielt. Dadurch könnte keine Aussage getroffen werden, ob in dem Kristall wirklich Co^{2+} -Ionen binden. Die theoretische Absorptionskante von Kobalt liegt bei $1,6083 \text{ \AA}$. Um ein optimales anomales Signal zu erhalten, wurde etwas versetzt ein Datensatz bei $1,602 \text{ \AA}$ gemessen. Der Kristall hatte die Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit den Zellparametern $a=64,7 \text{ \AA}$, $b=115,5 \text{ \AA}$, $c=123 \text{ \AA}$, 2 , $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$.

Die Prozessierung der Daten erfolgte mit XDS unter der Annahme, dass das Friedel'sche Gesetz nicht gilt. Die anomalen Daten wurden mit Combat konvertiert, mit Scala skaliert und anschließend durch das Programm CAD mit den Strukturamplituden des Modells zusammengefügt. Mit dem Programm FFT wurde eine anomale Differenz-Elektronendichte erzeugt. Die Datenstatistik ist in Tab. 17 zusammengefügt.

3.1.15 Datenstatistik der verschiedenen GatDH-Strukturen mit gebundenen Substraten

Tab. 17: Diffraktions-Datensammlung und Verfeinerungsstatistiken der GatDH-Strukturen, mit gebundenen Substraten sowie mit CoCl₂ kokristallisiert.

<i>Datensammlung und Prozessierung</i>	<i>GatDH_Xylitol</i>	<i>GatDH_Erythritol</i>	<i>GatDH_Kobalt</i>
Datensatz			
Röntgenquelle	EMBL/X13	BESSY-MX/BL14.1	EMBL/X12
Detektor	MarCCD165	MX-225 CCD	MarMOSAIC 225
Wellenlänge (Å)	0,8088	0,91841	1,602
Temperatur (K)	100	100	100
Abstand Kristall-Detektor (mm)	187	200	100
Belichtungszeit (s)	Dosis-Modus	15	Dosis-Modus
Oszillation/Bild (°)	0,2	0,5	0,5
Gesamt-Oszillation (°)	115	180	180
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zelldimensionen (Å, °)			
a / b / c	63,9/113,8/122,8	63,8/113,8/123,1	64,7/115,5/123,2
α / β / γ	90/90/90	90/90/90	90/90/90
Auflösungsgrenze (Å) ^a	2,0	1,7	1,96
Verfeinerungsstatistiken			
Auflösungsgrenze (Å) ^a	2,0 [2,05-2,0]	1,7 [1,74-1,7]	1,96 [2,01-1,96]
Anzahl der unabhängigen Reflexe ^a	55.811 [3.448]	92.616 [4.875]	59.200/3.805
Vollständigkeit der Daten ^a	96,4 [81,9]	100 [100]	94,1 [84,1]
R _{cryst} (%) ^{a, b}	22,8 [26,7]	19,5 [28,7]	18,9 [21,7]
R _{free} (%) ^{a, c}	29,6 [37,2]	23,5 [33,7]	25,0 [29,3]
Anzahl der Atome (ohne H)			
Protein	7.629	7.568	7.568
Lösungsmittel	494	111	394
Ramachandran-Plot (%)			
favorisiert, erlaubt, ungünstig ^d	95,3; 3,8; 0,9	97,2; 1,9; 0,9	96,6; 2,7; 0,7
Koordinatenfehler ^e	0,226	0,120	0,187
R.m.s.-Abweichung von idealen Werten			
Bindungslängen (Å)	0,024	0,016	0,022
Bindungswinkel (°)	2,31	1,783	1,963
Durchschnittlicher B-Faktor (Å ²)			
Peptid-Rückgrad	18,9	22,6	16,2
Seitenketten	22,4	27,8	20,2
Lösungsmittel	13,7	22,5	17,5
Substrat bzw. Co ²⁺	38,4	65,0	20,3

B-Faktor (Å²) des NAD⁺

Kette A	55,3	42,5
Kette B	47,0	62,4
Kette C	35,2	57,3
Kette D	47,2	155,1

Legende:

- ^a Werte für die Schale mit der höchsten Auflösung sind in Klammer () gesetzt.
wobei $I_i(hkl)$ die Intensität der *i*ten Messung der Reflexe mit den Miller'schen Indizes *hkl* und $\langle I_i(hkl) \rangle$ die mittlere Intensität aller Messungen von $I(hkl)$ ist, kalkuliert für $I \geq 3\sigma(I)$.
- ^b $R_{\text{cryst}} = 100 \times \frac{\sum |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|}{\sum |F_{\text{obs}}|}$
mit F_{obs} und F_{calc} als die gemessenen und kalkulierten Strukturfaktor-Amplituden.
- ^c R_{free} ist entsprechend dem R_{cryst} kalkuliert, aber 5 % der Reflexe sind vom Verfeinerungsprozess ausgenommen (Brünger, 1992; Tickle *et al.*, 2000).
- ^d kalkuliert mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).
- ^e kalkuliert mit dem Programm SFCHECK (Vaguine *et al.*, 1999), basierend auf einem Luzzati-Plot.

3.1.16 Expression von GatDH mit verkürztem C-Terminus

Um die Funktion des C-Terminus mit den komplexierten Mg²⁺-Ionen und die Rolle bei der Aktivität des Enzyms zu untersuchen, wurden in einem ersten Ansatz die letzten drei Aminosäuren der GatDH mittels Quick-Change-Mutagenese entfernt. Das Plasmid zur Expression von GatDHΔC3, pET24a_His_GatDHΔC3, wurde von Petra Kornberger (AG Angewandte Mikrobiologie, Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt.

GatDHΔC3 wurde entsprechend dem Protokoll für die Wildtyp-GatDH in dem *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) exprimiert.

3.1.17 Aufreinigung von GatDHΔC3

3.1.17.1 Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung wurden das Zellpellet (aus 6 l Kultur) in 80 ml Lysepuffer resuspendiert und bei einem Druck von 16.000 Psi in einem Zellhomogenisator (Avestin Inc.) aufgeschlossen. Während des Aufschlusses wurde eine kleine Spatelspitze DNase zugeben, da das Pellet durch freigesetzte DNA sehr viskos war. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer (150 min, 75.000g, 4 °C) wurde der Überstand auf eine zuvor mit Waschpuffer äquilibrierte HisTrapTMHP-Säule (5 ml) aufgetragen. Die Säule wurde mit Waschpuffer bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen. Die (His)₆-markierten, affin gebundenen Proteine wurden in dem gleichen Puffer in

einem linearen Gradienten (20 mM zu 200 mM Imidazol, über ein Volumen von 50 ml) eluiert und fraktioniert (Abb. 24). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 25) und die GatDH Δ C3-enthaltenden vereinigt.

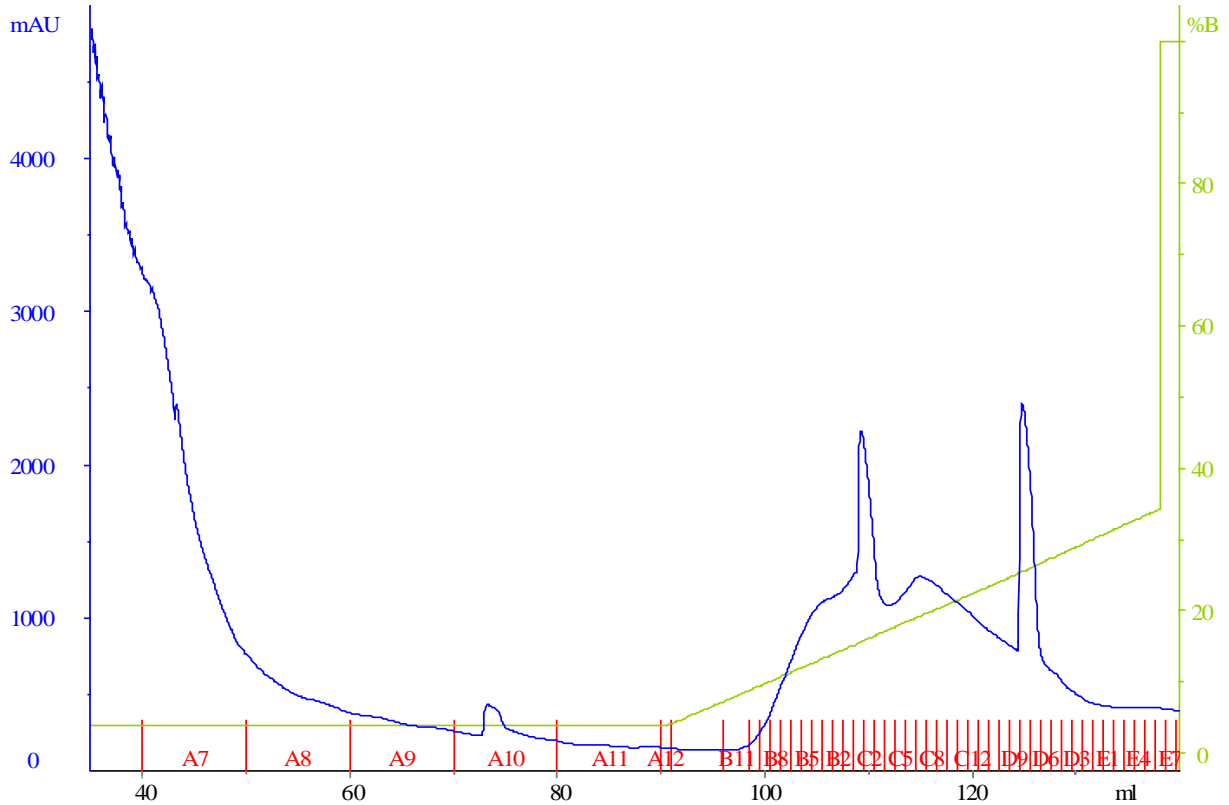


Abb. 24: Chromatogramm des ersten Aufreinigungsschrittes von GatDH Δ C3, gezeigt sind die Wasch- und Elutionsfraktionen. Das Zellysate wurde auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen, diese gewaschen, bis die UV-Absorption (blaue Linie) die Basislinie erreicht hatte und (His) $_6$ -markierte GatDH Δ C3 in einem Imidazol-Gradienten (grüne Linie) eluiert.

Wie Abb. 25 zeigt, banden viele Proteine unspezifisch an die Ni-NTA-Matrix. Mehrere Fraktionen kamen in Frage, die (His) $_6$ -GatDH Δ C3 enthalten konnten. Deshalb wurden die Fraktionen in zwei getrennten Pools (B10-C3 sowie C9-E8) zusammengegeben und diese weiter über Anionenaustauscher aufgereinigt. Dazu wurden beide Pools gegen 20 mM Bis-Tris, pH 6,5 dialysiert.

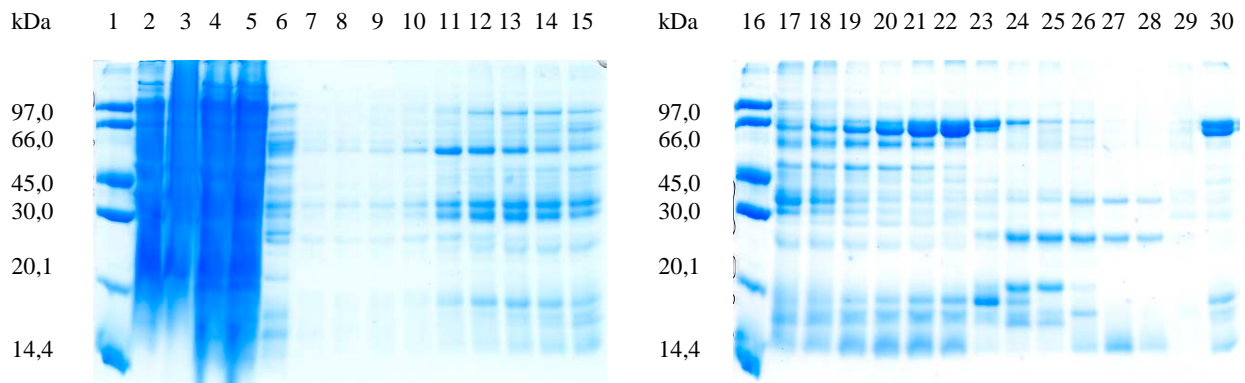


Abb. 25: SDS-PAGE (12 %) unter reduzierenden Bedingungen; Test der Aufreinigung der GatDH Δ C3 mittels Affinitäts-Chromatographie.

Spur 1: Marker

Spur 2: Zellen vor der Induktion

Spur 3: Zellen 3 h nach der Induktion

Spur 4: Überstand nach dem Zellaufschluß

Spur 5: Säulendurchfluß

Spur 6: Waschfraktion

Spur 7-15 und 17-30: verschiedene Elutionsfraktionen

3.1.17.2 Aufreinigung über Anionenaustauscher

Die beiden Pools wurden auf eine zuvor mit Puffer A äquilibrierte HyperD[®]F-Säule (PALL, VWR, Darmstadt) mit der Probenpumpe (ÄKTApurifier) aufgetragen. Die Säule wurde gewaschen, bis die Basislinie erreicht wurde. Die gebundenen Proteine wurden in einem Stufengradienten (0-1 M NaCl, eingestellt mit Puffer B) in 50 mM Bis-Tris, pH 6,5 eluiert (Abb. 26). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft und GatDH Δ C3-enthaltende vereingigt (Abb. 27).

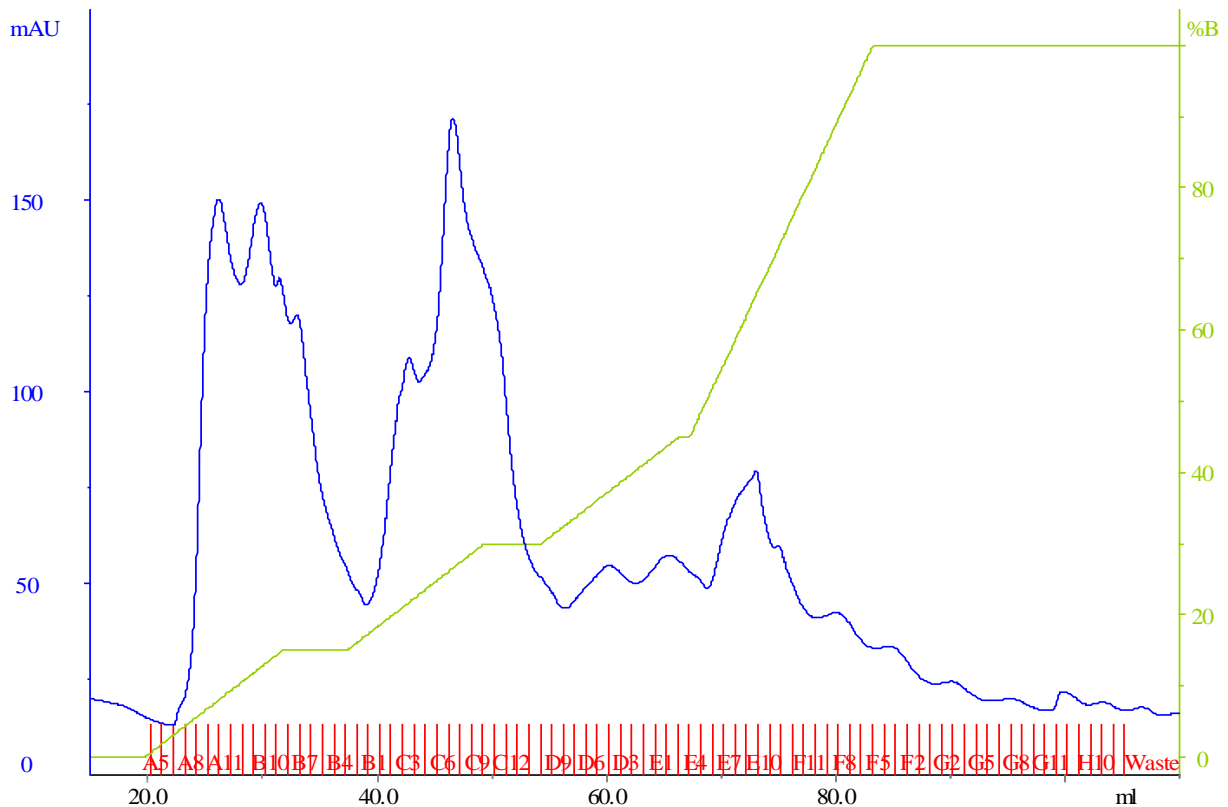


Abb. 26: Chromatogramm des zweiten Aufreinigungsschrittes von GatDH Δ C3, als Beispiel für Pool I der Affinitäts-Chromatographie gezeigt. Über Affinitäts-Chromatographie aufgereinigte GatDH wurde auf eine Anionenaustauscher-Säule aufgetragen, diese gewaschen, bis die UV-Absorption (blaue Linie) die Basislinie erreicht hatte und (His)₆-markierte GatDH Δ C3 in einem NaCl-Gradienten (grüne Linie) eluiert.

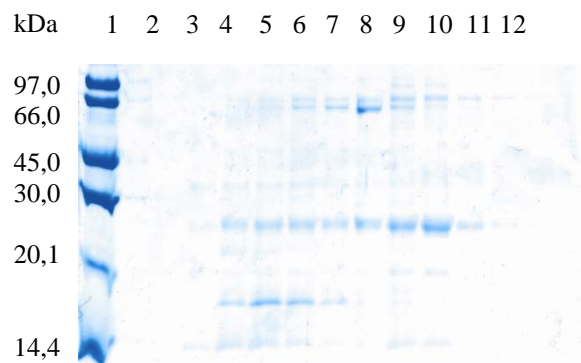


Abb. 27: SDS-PAGE (12 %) unter reduzierenden Bedingungen; Test der Aufreinigung der GatDH Δ C3 mittels Anionenaustauscher-Chromatographie, als Beispiel für Pool I der Affinitäts-Chromatographie gezeigt.

Spur 1: Marker

Spur 2-12: verschiedene Elutionsfraktionen

Das Ergebnis zeigt, dass Pool I kaum weiter aufgetrennt werden konnte (Abb. 27), Pool II etwas besser (keine Abbildung). Hier wäre eine anschließende Gelfiltration möglich. Die Ausbeute betrug insgesamt nur 3 mg aus 6 l Zellen. Außerdem waren die Verunreinigungen zu hoch, um erste Kristallisationsansätze durchzuführen. Zusätzlich hätten das Abschneiden des (His)₆-Affinitätsmarkers und die Gelfiltration zu weiteren Verlusten geführt. Bei der Dialyse zum Entsalzen der Proteinlösung zeigte sich, dass GatDH Δ C3 in Salzkonzentrationen unter 200 mM sehr instabil wird und ausfällt.

3.1.17.3 Nachweis der GatDH Δ C3 mittels MALDI-Messungen und Westernblot

Als Nachweis, ob auch wirklich die verkürzte GatDH aufgereinigt werden konnte, wurden MALDI-Messungen sowie ein Westernblot mit anschließender Immundetektion des (His)₆-Affinitätsmarkers durchgeführt.

Bei den MALDI-Messungen, bei denen das Protein vor dem Auftragen auf den Chip durch Zip-Tip-Säulen entsalzen wurde, konnte kein Proteinpeak nachgewiesen werden. Vermutlich fällt das Protein direkt beim Entsalzen aus. Deshalb wurden die Cysteine mit Iodacetamid alkyliert und das Protein mit Trypsin verdaut. Aufgrund der sehr geringen Sequenzabdeckung nach der massenspektrometrischen Analyse konnte keine klare Aussage getroffen werden, ob es sich um GatDH Δ C3 handelt.

Im Westernblot konnte dagegen eine starke Bande in den Zellen nachgewiesen werden, die dem Molekulargewicht der (His)₆-GatDH Δ C3 entspricht. Im Zellüberstand und in beiden Pools war ebenfalls ein Signal zusehen, allerdings eher schwach (Abb. 28). (His)₆-GatDH Δ C3 scheint also nur zum Teil löslich exprimiert sowie nur bis zu einem gewissen Grade aufzureinigen zu sein.

Im Aktivitätstest zeigte das Protein keine Aktivität. Da GatDH Δ C3 sehr instabil ist und eventuell nicht richtig gefaltet ist, kann keine Aussage getroffen werden, ob der Verlust der Aktivität durch den veränderten C-Terminus verursacht wird.

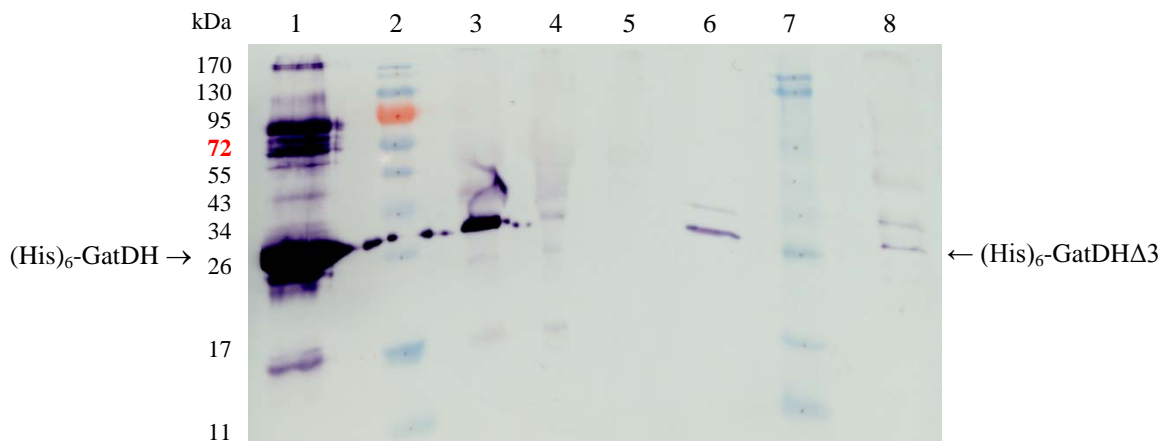


Abb. 28: Westernblot-Analyse der verschiedenen Aufreinigungsschritte von GatDH Δ C3 mittels Antikörpern gegen den (His)₆-Affinitätsmarker.

Spur 1: (His)₆-GatDH als Positivkontrolle

Spur 2: Marker 1

Spur 3: Zellen

Spur 4: Überstand nach dem Zellaufschluss

Spur 5: Durchfluß der Affinitäts-Säule

Spur 6: Pool II der Affinitäts-Chromatographie, über Anionenaustauscher weiter gereinigt

Spur 7: Marker 2

Spur 8: Pool I der Affinitäts-Chromatographie, über Anionenaustauscher weiter gereinigt

3.1.18 Rückfaltung-Experimente der GatDH Δ C3

Parallel zu den Aufreinigungs-Experimenten der GatDH Δ C3 wurde versucht, die Expression löslichen Proteins zu verbessern, was aber nicht gelang. Deshalb wurde versucht, das unlösliche Protein einerseits durch Additive in Lösung zu bringen, falls es nur aggregiert in der Zelle vorliegt, trotzdem aber schon richtig gefaltet ist. Andererseits wurde über verschiedene Protokolle versucht, das Protein aus Einschlusskörper rückzufalten (Diplomarbeit, Henning Christian, 2009).

Für die Etablierung eines Rückfaltungsprotokolls wurde aktive Wildtyp-GatDH denaturiert und anschließend wieder nach den gleichen Protokollen rückgefaltet. Anhand des Aktivitäts-Assays wurde verfolgt, ob die Rückfaltung erfolgreich war. Die rückgefaltete GatDH war löslich, zeigte aber keine Aktivität mehr, was auf eine Fehlfaltung schließen lässt. Daher ist davon auszugehen, dass auch die verkürzte GatDH nicht richtig gefaltet wird.

3.2 SoxS

3.2.1 Expression von SoxS

Zur Produktion von SoxS wurde der Expressionsvektor pRD170.42, ein pQE-30-Derivat (Qiagen, Hilden), in dem Expressionsstamm *Escherichia coli* M15[pREP4] (Qiagen, Hilden) zur Verfügung gestellt (Dagmar Rother, Technische Mikrobiologie, Universität Dortmund). SoxS wird über diesen Vektor mit einem N-terminalem (His)₆-Affinitäts-Sequenzabschnitt und einer Enterokinase-Schnittstelle zum Abspalten des Markers exprimiert.

Die Expression erfolgte, wie in Kapitel 2.14.4.2 beschrieben, in 6 l LB-Medium, versetzt mit den Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (30 µg/ml), bei 30 °C und 130 rpm (Unitron, Infors). Die Überexpression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,7 mit 0,4 mM IPTG induziert und die Zellen nach 4 h geerntet, in Lysepuffer gewaschen und bis zur Proteinaufreinigung bei -80 °C gelagert.

Als Kontrolle wurde eine kleine Kultur (50 ml) mit dem *E. coli* Stamm M15[pREP4], transformiert mit dem Grundplasmid pQE-30, genauso behandelt und induziert. Die Expression wurde mittels SDS-PAGE getestet (siehe Abb. 31).

3.2.2 Aufreinigung von SoxS (nativ)

Zur Aufreinigung wurde die Hälfte des Zellpellets (aus 3 l Kultur) in 80 ml Lysepuffer resuspendiert und bei 16.000 Psi in einem Zellhomogenisator (Avestin Inc.) aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer (120 min, 75.000g, 4 °C) wurde der Überstand auf eine zuvor mit Waschlösung äquilibrierte, selbstgepackte Säule mit 7 ml Ni-NTA-Superflow-Matrix (Qiagen) aufgetragen. Die Säule wurde mit Waschlösung bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen. Die (His)₆-markierten, affin gebundenen Proteine wurden in zwei linearen Imidazol-Gradienten (mit dem Elutionspuffer eingestellt), von 20 mM zu 100 mM Imidazol über ein Volumen von 30 ml, gefolgt von 100 mM zu 250 mM Imidazol über ein Volumen von 30 ml, eluiert und fraktioniert (siehe Abb. 29). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft und SoxS-enthaltende vereinigt (siehe Abb. 31).

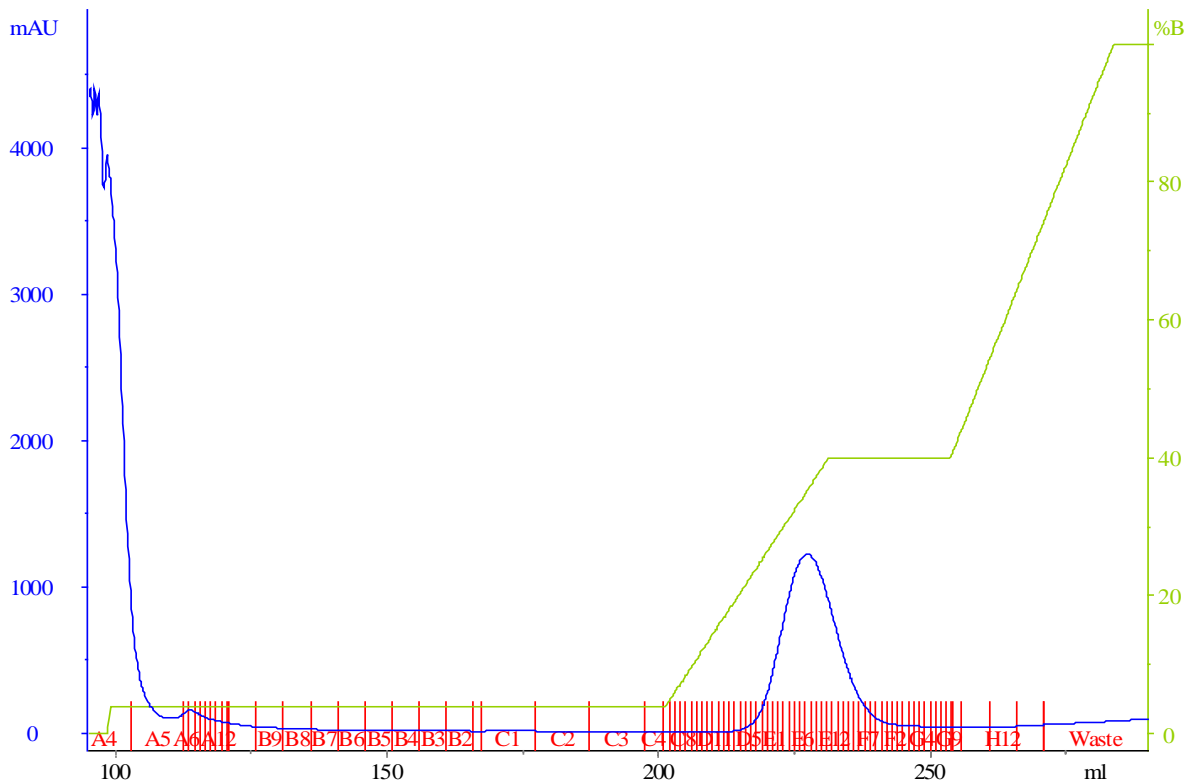


Abb. 29: Chromatogramm des ersten Aufreinigungsschrittes von SoxS. Das Zelllysate wurde auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen, diese gewaschen, bis die UV-Absorption (blaue Linie) die Basislinie erreicht hatte und (His)₆-markiertes SoxS in einem Imidazol-Gradienten (grüne Linie) eluiert.

Wie in Abb. 31 gezeigt, ist eine starke Bande in Höhe des erwarteten Molekulargewichtes von (His)₆-SoxS (13 kDa) bei der induzierten Kultur zu sehen, aber nicht bei der uninduzierten Kultur und der induzierten Kontrollkultur (der Expressionsstamm mit dem Grundvektor). Im Zellüberstand befand sich eine große Menge SoxS, allerdings auch im Zellpellet, was auch auf einen nicht ausreichenden Zellaufschluss oder auf partiell unlösliches Protein schließen lässt. Nach der Affinitätschromatographie lag SoxS schon in sehr hoher Reinheit vor, mit geringen Mengen an verunreinigenden Proteinen mit Molekulargewichten von 30 kDa, 60 kDa und 90 kDa.

Daher wurde als weiteren Aufreinigungsschritt noch eine Gelfiltration durchgeführt. Dazu wurden die vereinigten Fraktionen über Nacht gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 5 mM β -Mercaptoethanol dialysiert, anschließend aufkonzentriert und auf eine mit dem Gelfiltrationspuffer äquilibrierte Superdex 200 Gelfiltration-Säule (16/600, GE Healthcare) mit einer Flussrate von 0,8 ml/min aufgetragen (siehe Abb. 30).

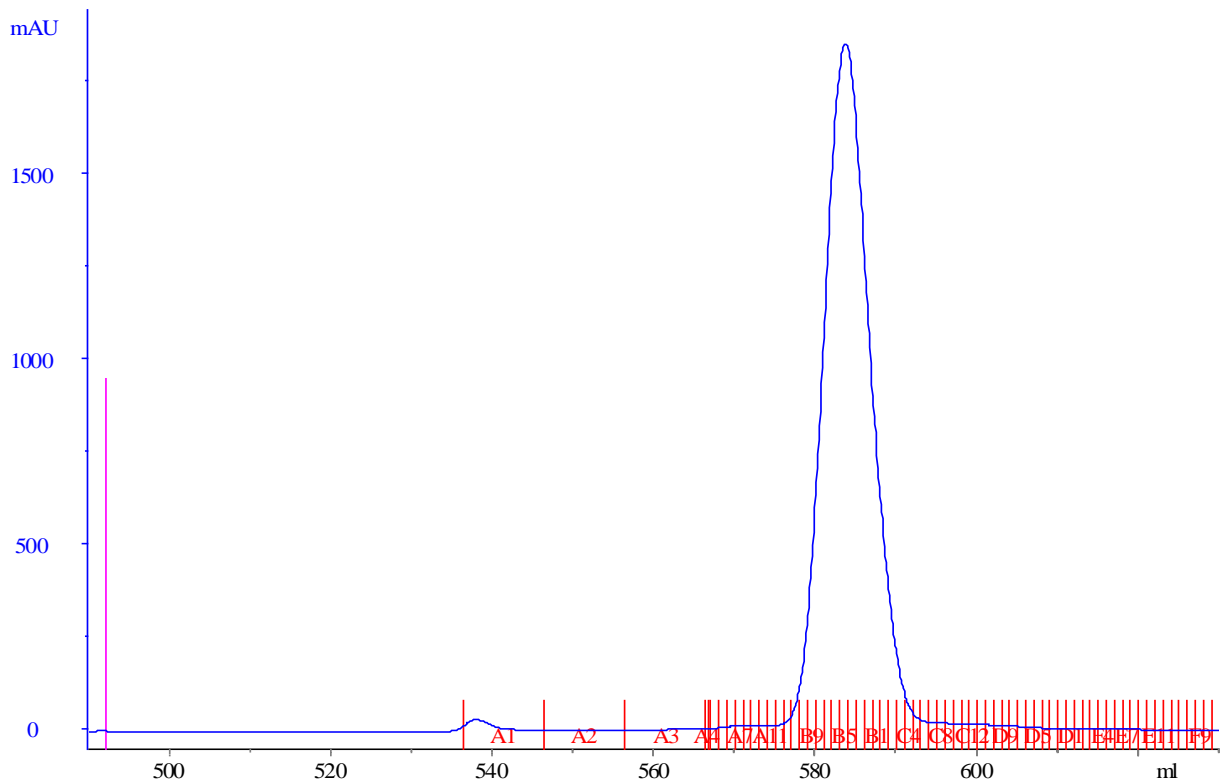


Abb. 30: Chromatogramm der Gelfiltration zur Aufreinigung von SoxS. Die Aufreinigung wurde durch die UV-Absorption (blaue Linie) bei 280 nm verfolgt.

Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. Wie in Abb. 31 zu sehen, konnten die Proteine mit höheren Molekulargewichten abgetrennt werden. Fraktionen, welche reines SoxS enthielten, wurden vereinigt und bis zu einer Konzentration von 23 mg/ml aufkonzentriert. Die Gesamtausbeute betrug 28 mg SoxS aus 3 l Zellkultur.

Der (His)₆-Affinitätsmarker wurde nicht entfernt, da die ersten Kristallisationsversuche (siehe Kapitel 3.2.5) zeigten, dass er die Kristallisation nicht beeinträchtigte.

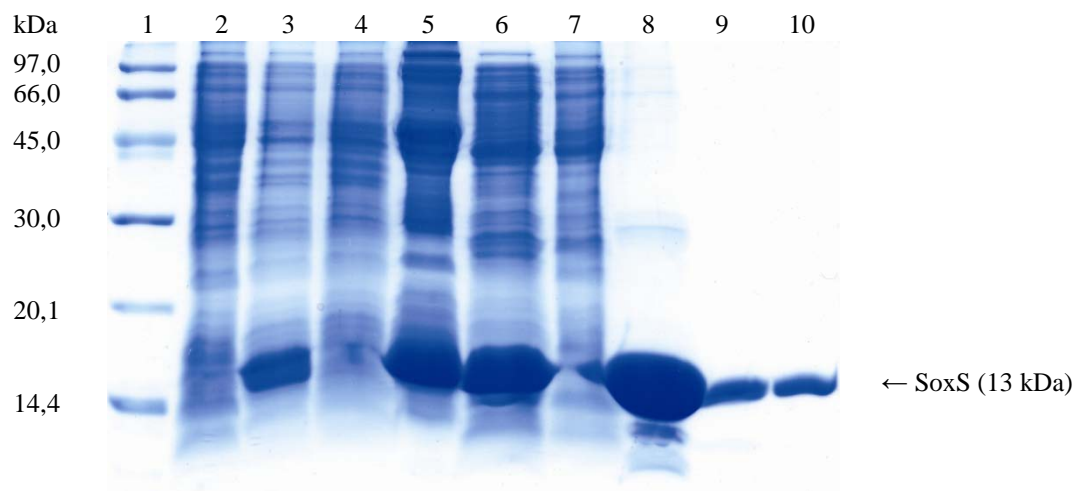


Abb. 31: SDS-PAGE (16 %) unter reduzierenden Bedingungen; Zusammenfassung der Expression, Aufreinigungs- und Kristallisationsschritte von SoxS aus *P. pantotrophus*.

Spur 1: Marker

Spur 2: Expressionskultur vor der Induktion

Spur 3: Expressionskultur 4 h nach Induktion

Spur 4: Kontrolle: M15[pREP4], mit pQE-30 transformiert, nach 2 h Induktion

Spur 5: Zellpellet nach Aufschluss

Spur 6: Zellüberstand von Spur 5

Spur 7: Durchfluss der Ni-NTA-Säule

Spur 8: Pool nach der Ni-NTA-Säule; vor der Gelfiltration

Spur 9: Pool nach der Gelfiltration; zur Kristallisation eingesetzt

Spur 10: aufgelöste Kristalle

3.2.3 Expression einer Selenomethionin-Variante von SoxS

Die Selenomethionin-substituierte Form von SoxS wurde in dem gleichen *E. coli*-Stamm (M15[pREP4]) exprimiert wie die native Form, nach einem modifizierten Protokoll von Guerrero *et al.* (Guerrero *et al.*, 2001). Wie in Kapitel 2.14.3 beschrieben, wurden die Zellen in 500 ml LB-Medium, versetzt mit den Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (30 µg/ml), 16 h angezogen, geerntet und mit sterilem, deionisiertem Wasser gewaschen. Mit diesen Zellen wurden 2 l Selenomethionin-Expressions-Medium mit L-Selenomethionin (40 µg/ml), Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (30 µg/ml) versetzt, angeimpft. Die OD₆₀₀ sollte dabei zu Beginn 1,0 sein, hier betrug sie 0,7. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 30 °C wurde die Überexpression mit 0,4 mM IPTG induziert. Nach 5 h wurden die Zellen geerntet, in Lysepuffer gewaschen und bis zur Proteinaufreinigung bei -80 °C gelagert. Die Expression wurde mittels SDS-PAGE getestet (siehe Abb. 32).

3.2.4 Aufreinigung des Selenomethionin-Derivates von SoxS

Die Aufreinigung von SeMet-SoxS erfolgte nach dem gleichen Schema wie die des SoxS (siehe Kapitel 3.2.2). SeMet-SoxS verhielt sich bei der Aufreinigung wie SoxS und zeigte ein gleiches Laufverhalten in der Chromatographie, weswegen auf Abbildungen der Chromatogramme verzichtet wird. Die Expressions- und Aufreinigungsschritte sind in Abb. 32 zusammengefasst.

Das komplette Zellpellet aus 2 l Kultur wurde in 20 ml Lysepuffer resuspendiert und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie und anschließend über Gelfiltration aufgereinigt. Die SoxS-haltigen Fraktionen der Gelfiltration wurden zusammengeführt und bis zu einer Konzentration von 25 mg/ml aufkonzentriert. Die Gesamtausbeute betrug 36 mg Protein aus 2 l Kultur.



Abb. 32: SDS-PAGE (16 %) unter reduzierenden Bedingungen; Zusammenfassung der Expression, Aufreinigungs- und Kristallisationsschritte des Selenomethionin-Derivats von SoxS.

Spur 1: Marker

Spur 2: Expressionskultur vor der Induktion

Spur 3: Expressionskultur 5 h nach Induktion

Spur 4: Zellpellet nach Aufschluss

Spur 5: Zellüberstand von Spur 4

Spur 6: Durchfluss der Ni-NTA-Säule

Spur 7: Elutionsfraktion der Ni-NTA-Säule

Spur 8: Elutionsfraktion der Ni-NTA-Säule

Spur 9: Pool nach der Ni-NTA-Säule; vor der Gelfiltration

Spur 10: Fraktion der Gelfiltration

Spur 11: Pool nach der Gelfiltration; zur Kristallisation eingesetzt

Spur 12: Mutterlauge der SoxS-Kristalle

Spur 13: aufgelöste Kristalle

Spur 14: Marker

3.2.5 Kristallisation von SoxS

SoxS wurde ohne vorheriges Abschneiden des N-terminalen (His)₆-Affinitäts-Markers und der Enterokinase-Schnittstelle kristallisiert. Als Kristallisationspuffer wurde der Puffer des letzten Aufreinigungsschritts, der Gelfiltration-Laufpuffer verwendet und die Proteinkonzentration auf 20 mg/ml eingestellt.

Die ersten Kristallisationsversuche wurden mit dem *Crystal Screen*TM von Hampton-Research durchgeführt. Nach 1-2 Tagen wurden erste Kristalle in 5 verschiedenen Bedingungen beobachtet, welche alle reproduziert werden konnten (Tab. 18).

Tab. 18: Erste Kristallisationsbedingungen von SoxS bei *Crystal Screen*TM (Hampton Research)

<i>Screen-Lösung</i>	<i>Puffer</i>	<i>Salz/Präzipitant</i>	<i>Präzipitant</i>
3		0,4 M NH ₄ H ₂ PO ₄	
11	0,1 M NaCitrat, pH 5,6	1 M NH ₄ H ₂ PO ₄	
20	0,1 M NaAc, pH 4,6	0,2 M NH ₄ SO ₄	25 % PEG 4000
35	0,1 M HEPES, pH 7,5	0,8 M NaH ₂ PO ₄	
		0,8 M KH ₂ PO ₄	
37	0,1 M NaAc, pH 4,6		8 % PEG 4000

Die Kristalle waren alle nadel- oder spindelförmig, z. T. stark verwachsen. Als Negativkontrolle wurden alle Ansätze zusätzlich nur mit dem Kristallisationspuffer angesetzt. Hier blieben die Kristallisationstropfen klar, so dass Salzkristalle ausgeschlossen werden konnten.

Die Kristallisationsbedingungen wurden verglichen und verschiedene Kombinationen aus ihnen gebildet. Der pH-Wert der Puffer (Citrat und HEPES) wurde gegen die Phosphat-Konzentration variiert sowie die PEG 4000-Konzentration gegen die Ammoniumsulfat-Konzentration getestet. Dadurch konnte ermittelt werden, dass mit sinkendem pH-Wert die Kristalle größer werden, wobei Citrat der bessere Puffer als HEPES war. Außerdem bildeten sich durch den Ersatz von Ammoniumphosphat durch Kalium- und Natriumphosphat Kristalle, welche weniger faserig waren. PEG 4000 war eher von Nachteil und verursachte häufiger viele kleine Kristalle oder nur Phasentrennung und Präzipitat.

Es konnten zwei Bedingungen ermittelt werden, bei denen Einkristalle wuchsen (Abb. 33, A):

- (1) 0,1 M NaCitrat, pH 5,2; 0,4 M NaH₂PO₄, 0,4 M KH₂PO₄
- (2) 0,1 M NaAcetat, pH 4,6; 0,3 M Ammoniumsulfat.

Da die Kristalle immer noch z.T. verwachsen und klein ($< 0,05$ mm) waren, wurde die Tropfengröße und das Verhältnis von Proteinlösung zu Reservoir variiert (1:3; 1,5:2,5; 2:2; 2,5:1,5; 3:1), was aber keine Optimierung der Kristalle erbrachte.

3.2.6 Montieren von SoxS-Kristallen und Testmessungen (Heimquelle)

Die Kristalle wurden zur Datensammlung in Nylon-Schleifen montiert und eingefroren. Als Cryo-Bedingungen wurden beiden Hauptbedingungen jeweils PEG 400 oder Glycerin zugegeben und auf glasartiges Gefrieren getestet. Als optimal erwies sich Bedingung 1 (0,1 M Citrat, pH 5,2; 0,4 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) mit 25 % Glycerin oder 30 % PEG 400. Es wurden jeweils zwei vergleichbar große Einkristalle (0,05 x 0,05 x 0,2 mm) aus dem Kristallisationsansatz entnommen und in den beiden Cryo-Lösungen inkubiert. Ein Kristall wurde nach 2 min, der andere nach 10 min in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Kristalle wurden anschließend an der Heimquelle (Xcalibur, Oxford Diffraction) wie in Kapitel 2.15.4.1 beschrieben, getestet.

Es konnte beobachtet werden, dass eine längere Inkubation in der Cryolösung die Diffraktion des Kristalles minderte. Der Kristall, welcher in Mutterlauge plus Glycerin eingefroren wurde, zeigte die beste Diffraktion. PEG 400 als Cryo-Zusatz verursacht eine leichte Phasentrennung, welche eventuell die Diffraktion etwas beeinträchtigen könnte.

3.2.7 Kristallisation des Selenomethionin-Derivates von SoxS

Das SeMet-Derivat konnte im gleichen Puffer wie SoxS, mit einer Konzentration von 20 mg/ml, kristallisiert werden. Auch hier wurde der $(\text{His})_6$ -Affinitäts-Markern nicht entfernt. Das Protein kristallisierte unter den gleichen Bedingungen wie das native Protein, allerdings waren die Kristalle im Vergleich zu den Kristallen aus nativem SoxS stärker verwachsen. Ein Grid-Screen (pH-Wert gegen Phosphat-Konzentration) ergab, dass eine Erhöhung des pH-Wertes auf 5,4 zur Bildung der besten Einkristalle führte (Abb. 33, B). Die Kristalle wurden in den gleichen Cryo-Puffern wie SoxS-nativ kurz inkubiert und eingefroren und an der Heimquelle wie unter Kapitel 2.15.4.1 beschrieben, getestet. Die Kristalle mit Glycerin als Cryo-Zusatz streuten hier ebenfalls besser als mit PEG 400.

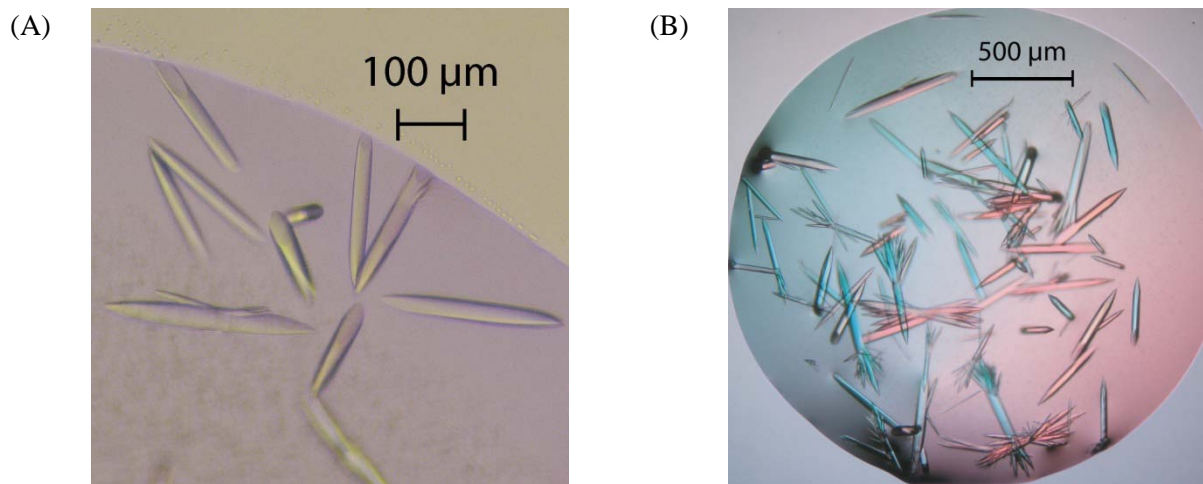


Abb. 33: SoxS-Kristalle nach der Optimierung
(A) natives SoxS (B) SeMet-Derivat

3.2.8 SDS-PAGE und MALDI-Messung

Um sicherzugehen, dass die Kristalle aus dem aufgereinigten SoxS bestehen und keine Verunreinigungen kristallisiert wurden oder das Protein proteolytisch abgebaut wurde, wurden Kristalle beider Proteine (SoxS nativ und das SeMet-Derivat) mehrmals in Reservoirolösung gewaschen und mittels einer Mischung aus 0,1 % (v/v) Methanol und 0,1 % (v/v) Ameisensäure, in Wasser verdünnt, aufgelöst. Das aufgereinigte Protein, die Mutterlauge, die Waschflüssigkeit sowie die aufgelösten Proteinkristalle wurden mittels SDS-PAGE (Abb. 34) und MALDI-TOF (Abb. 35) analysiert.

Das SDS-Gel zeigt, dass die aufgelösten Kristalle beide SoxS-Varianten waren und das Protein nicht proteolytisch abgebaut wurde. Die fehlenden Proteinbanden in der Mutterlauge zeigen, dass im Tropfen das Protein fast vollständig auskristallisiert ist. Erst im Waschschrift 2 löste sich etwas Protein, eventuell Präzipitat, welches am Kristall anhaftete.

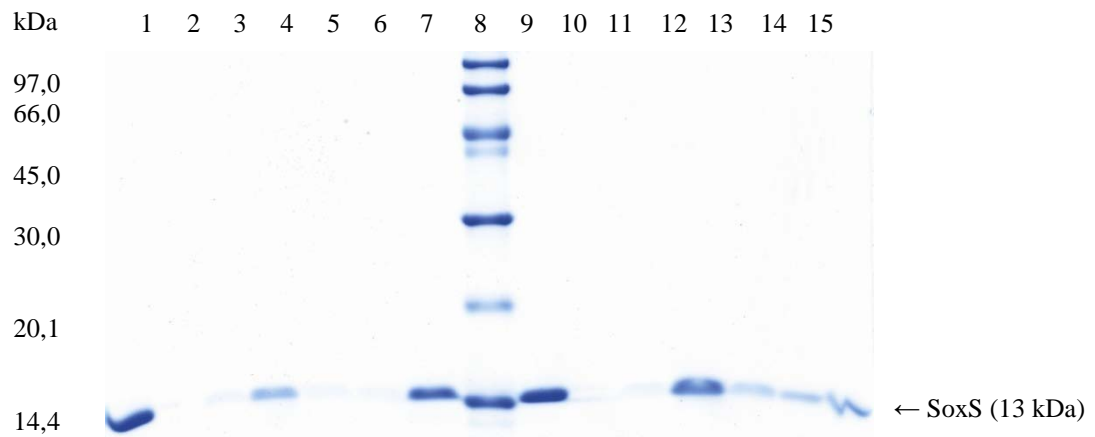


Abb. 34: SDS-PAGE (16 %) unter reduzierenden Bedingungen; SoxS-Kristalle (nativ und SeMet-Derivat) wurden dreimal mit Reservoirlösung und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und in Methanol/Ameisensäure aufgelöst und mit dem löslichen Protein verglichen.

Spuren 1-7: SoxS (nativ)

Spuren 9-15: SoxS (SeMet-Derivat)

Spur 1 und 9: lösliches Protein; nach Aufreinigung und Konzentration

Spur 2 und 10: Mutterlauge der SoxS-Kristalle

Spur 3 und 11: Waschschrift 1 (Reservoirlösung)

Spur 4 und 12: Waschschrift 2 der Kristalle (Reservoirlösung)

Spur 5 und 13: Waschschrift 3 der Kristalle (Reservoirlösung)

Spur 6 und 14: Waschschrift 4 (Wasser)

Spur 7 und 15: aufgelöster Kristall

Spur 8: Marker

Die theoretisch berechneten Molekulargewichte sind für SoxS ohne Signalsequenz, aber mit N-terminalem (His)₆-Sequenzabschnitt und Enterokinase-Schnittstelle, 13.064,76 Da (mit N-terminalem Start-Methionin) und 12.933,57 Da (N-terminales Methionin abgespalten). Bei Ersatz aller Methionine durch Selenomethionin erhöhen sich die Massen auf 13.299,20 Da bzw. 13.121,11 Da.

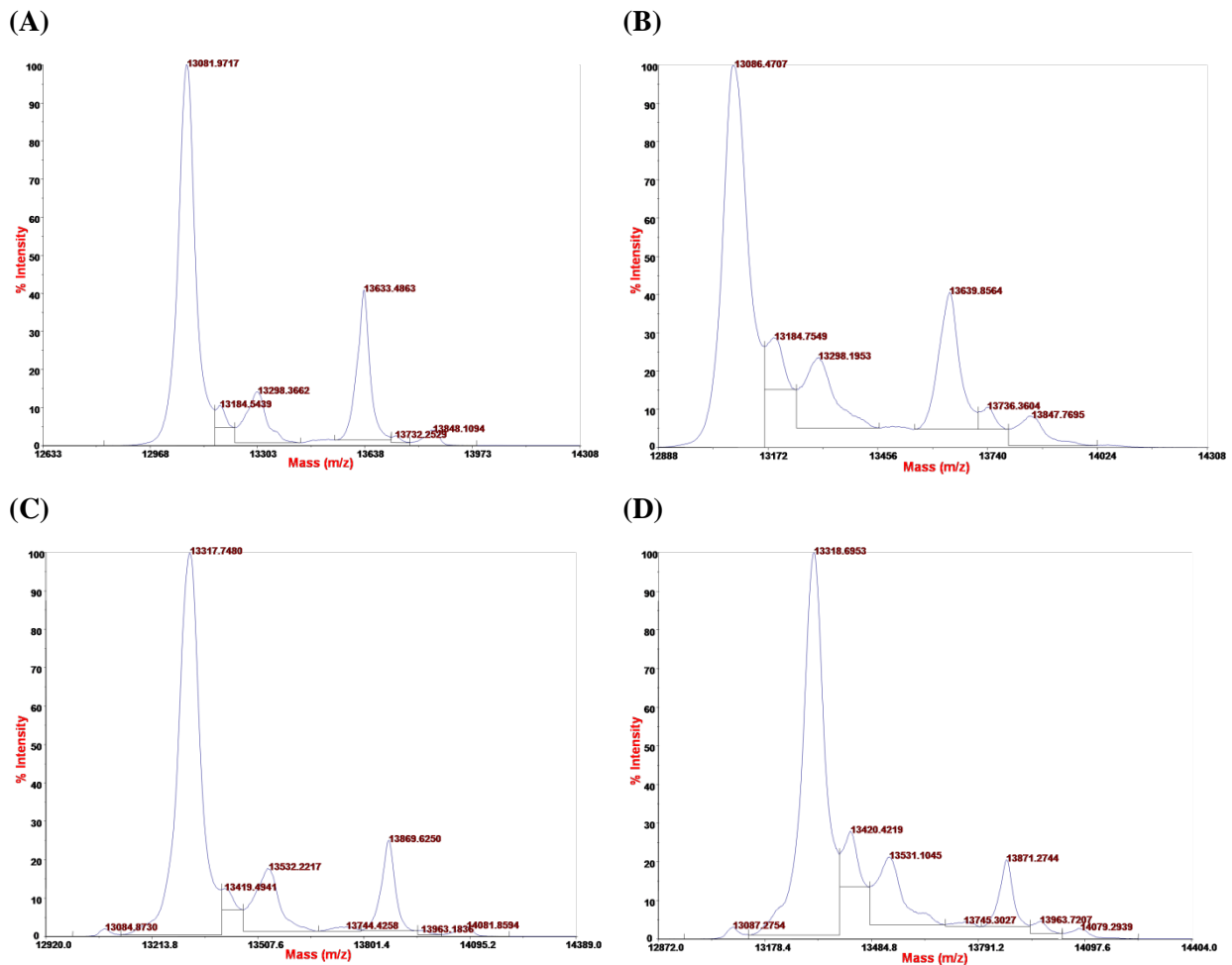


Abb. 35: MALDI-Spektren von SoxS (**A** und **B**) und der Selenomethionin-substituierten Variante (**C** und **D**). Es wurde jeweils das aufgereinigte Protein (**A** und **C**) sowie gewaschene und aufgelöste Kristalle (**B** und **D**) gemessen.

Die mittels MALDI-TOF ermittelten Molekulargewichte der aufgereinigten Proteine als auch der aufgelösten Kristalle stimmen mit den theoretischen Molekulargewichten überein, die für SoxS mit N-terminalem Start-Methionin berechnet wurden. Daher konnte ein proteolytischer Abbau des Proteins während der Kristallisation ausgeschlossen werden. Die Abweichung beträgt zwischen +17 Da und +22 Da, vermutlich durch ein gebundenes Natrium-Molekül. Zusätzlich wurde ein zweiter Peak in allen Messungen beobachtet, welcher um 553 Da größer ist und keinen bekannten MALDI-Artefakten, wie z.B. gebundene Matrix, zugeordnet werden konnte.

3.2.9 Aufnahme von Datensätzen von SoxS- und SeMet-SoxS-Kristallen

Von den am besten streuenden Kristallen von SoxS und SeMet-SoxS wurden Datensätze an der Heimquelle (Xcalibur, Oxford Diffraction) aufgenommen. Die Datensätze wurde mit der Software CrysAlis (Oxford Diffraction) prozessiert. Die erste Auswertung ergab die Raumgruppe P3, die merohedrische Verzwilligung (*Twining*) aufweisen kann. Bei der Verzwilligung handelt es sich um eine Anomalie im Kristallgitter, in der ein Kristall aus verschiedenen Domänen besteht, die sich in ihrer Orientierung unterscheiden. Der Kristall kann dabei äußerlich intakt sein und ein perfekt aussehender Einkristall sein. Eine Untergruppe ist die merohedrische Verzwilligung, in der die einzelnen Domänen sich in allen drei Dimensionen perfekt überlappen (Yeates, 1997). Ein Test auf *Twining* mit dem Programm SFCHECK (CCP4, 1994) zeigte merohedrische Verzwilligung mit den *Twin*-Operatoren -h, -k, l und *Twining*-Faktoren von 30-40 %. Da bei erhöhtem *Twining*-Faktor eine Phasierung schwierig wird, wurden neue Kristallisationsansätze mit SeMet-SoxS mit den Additiv-Screens 1-3 (Hampton-Research), basierend auf der besten Kristallisationsbedingung, angesetzt. Additive können eine Veränderung in der Packung des Kristalls bewirken, was sich auf die Raumgruppe bzw. das Kristallwachstum auswirken kann.

Aus unterschiedlichen Additiv-Bedingungen wurden mehrere SeMet-SoxS-Kristalle montiert und an der Heimquelle getestet. Die langen Spindeln wurden in Stücke geteilt und nur die Mittelstücke montiert, da die „verzwirbelten“ Endstücke eventuell den höchsten Grad an *Twining* aufweisen. Von verschiedenen Kristallen wurden Datensätze aufgenommen und mit CrysAlis prozessiert. Die Analyse durch SFCHECK ergab eine Reduktion der *Twining*-Faktoren auf 4 bis 12 %.

Alle Kristalle von SoxS und SeMet-SoxS besaßen die Raumgruppe P3₁21 mit den Zellparametern $a=b=80,9 \text{ \AA}$, $c=33,2 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$. Unter der Annahme, dass sich ein Molekül in der asymmetrischen Einheit befindet, betrug der Matthews-Parameter $2,4 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ bei einem Lösungsmittel-Gehalt von 49,0 % (Matthews, 1968).

3.2.10 Aufnahme eines MAD-Datensatzes von SeMet-SoxS-Kristallen

An der Beamline X12 (EMBL/DESY, Hamburg) wurde von dem SeMet-SoxS-Kristall mit dem niedrigsten Verzwilligungs-Faktor ein MAD-Datensatz bei vier unterschiedlichen Wellenlängen aufgenommen. Um die genaue Absorptionskante der eingebauten Selen-Atome zu ermitteln, wurde zuerst ein Fluoreszenz-Scan durchgeführt (Abb. 36).

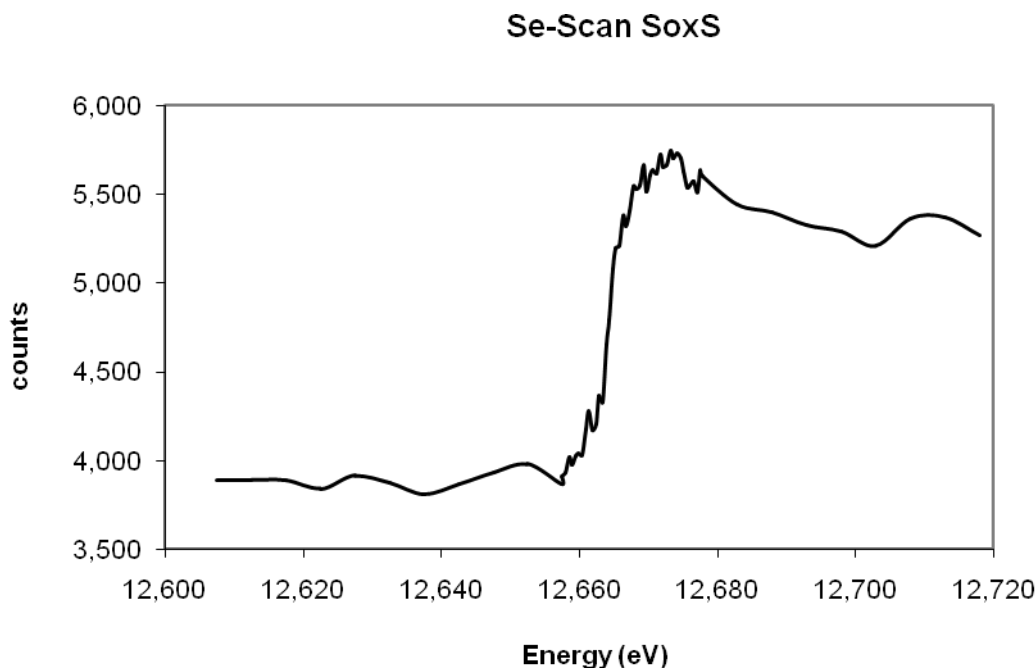


Abb. 36: Röntgen-Fluoreszenz-Scan nahe der Absorptionskante von Selen von einem SeMet-SoxS-Kristall; Die Absorptionskante des eingebauten Selens lag bei 12.664 eV, dies entspricht einer Wellenlänge von 0.979 Å.

Für einen möglichst vollständigen MAD-Datensatz wurde zunächst je ein Datensatz im *peak*-Bereich (0,97833Å) sowie im *inflection point* (0,97838Å) der Absorptionskante und anschließend je ein Datensatz im *high energy remote*-Bereich (0,95369Å) sowie im *low energy remote*-Bereich (1,0332 Å) aufgenommen.

3.2.11 Prozessierung des MAD-Datensatzes

Die Struktur von SeMet-SoxS wurde mit Hilfe des 3-Wellenlängen-MAD-Protokolls des Programms *Auto-Rickshaw* (Panjekar *et al.*, 2005) mit den ersten drei Datensätzen (*peak*, *inflection point*, *high energy remote*) gelöst. Die Diffraktionsbilder wurden mit dem Programm DENZO prozessiert, die Reflexdaten mit SCALEPACK vereinigt und skaliert und anschließend mit dem Programmpaket CCP4 konvertiert (CCP4, 1994). Die anomalen F_A -Werte wurden mit dem Programm SHELXC berechnet (Sheldrick *et al.*, 2001).

Basierend auf den ersten Analysen der Daten, wurde die maximale Auflösung für die Substruktur-Bestimmung und initialen Phasenberechnung auf 2,4 Å gesetzt. Alle 5 Selen-Atome, deren Anzahl vorgegeben wurde, konnten mit dem Programm SHELXD gefunden werden

(Schneider und Sheldrick, 2002). Die korrekte Händigkeit der Substruktur wurde mit den Programmen ABS (Hao, 2004) und SHELXE (Sheldrick, 2002) bestimmt.

Der Besetzungsgrad aller Substruktur-Atome wurde verfeinert und die ersten Phasen wurden mit dem Programm MLPHARE (CCP4, 1994) berechnet. Die Phasen der Strukturamplituden wurden durch Dichtemodifizierung (*density modification*) und Phasenerweiterung (*phase extension*) mit dem Programm DM bis zu einer Auflösung von 2,4 Å verbessert (Cowtan, 1994). Mit dem Programm ARP/wARP konnten anschließend 79,31 % des Modells, unter Berücksichtigung der vorgegebenen Aminosäure-Sequenz, vormodelliert werden (Morris *et al.*, 2004).

3.2.12 Verfeinerung der Struktur von SeMet-SoxS

Die Struktur von SoxS wurde gegen den *low-energy-remote*-Datensatz mit hoher Auflösung verfeinert. 92 Aminosäuren von insgesamt 116 konnten durch das Programm *Auto-Rickshaw* der Elektronendichte zugeordnet werden. Mit dem Programm COOT wurden fehlende Aminosäuren am N- und C-Terminus sowie ein *cis*-Prolin in der Mitte der Aminosäurenkette eingefügt und mit REFMAC5 die Struktur verfeinert. Die Polypeptidkette ist sehr gut definiert, mit Ausnahme der N-terminalen (His)₆-Affinitätssequenz und der Enterokinase-Schnittstelle sowie der drei letzten Aminosäuren am C-Terminus. Mit dem Programm ARP/wARP wurden Wassermoleküle gesucht und eingesetzt. Mit zunehmender Verfeinerung der Struktur wurde einigen Aminosäure-Seitenketten alternative Konformationen zugeordnet, wodurch sich die *R*-Faktoren nochmals verbesserten. Abschließend wurde Elektronendichte in der Nähe des aktiven Zentrums als β -Mercaptoethanol interpretiert und dieses eingesetzt.

Die Datenstatistiken der endgültigen Struktur sind in Tab. 19 und Abb. 37 zusammengefügt.

3.2.13 Struktur von SoxS

Die Struktur des nativen SoxS wurde durch die Methode des molekularen Ersatzes gelöst. Als Modell diente die Struktur des Selenomethionin-Derivates. Auch hier ist die Polypeptidkette sehr gut definiert, mit Ausnahme der N-terminalen (His)₆-Affinitätssequenz, der Enterokinase-Schnittstelle und der ersten Aminosäure von SoxS nach der Schnittstelle sowie der drei letzten Aminosäuren am C-Terminus.

Die Datenstatistiken der endgültigen Struktur sind in Tab. 19 und Abb. 37 zusammengefügt.

3.2.14 Statistiken der Datensätze von SeMet-SoxS und SoxS

Tab. 19: Diffraktions-Datensammlung und Verfeinerungsstatistiken für SeMet-SoxS (PDB-Eintrag 3dml) und SoxS (PDB-Eintrag 3d4t).

<i>Datensammlung und Prozessierung</i>	<i>SeMet-SoxS</i>				<i>SoxS</i>
Datensatz	peak	inflection point	high-energy remote	low-energy remote	nativ
Röntgenquelle	X12/EMBL				Xcalibur PX Ultra
Detektor	MARMosaic-CCD detector [225 mm]				Onyx CCD [165 mm]
Wellenlänge (Å)	0,97833	0,97838	0,95369	1,0332	1,54
Temperatur (K)	100	100	100	100	100
Abstand Kristall-Detektor (mm)	250	250	250	180	80
Belichtungszeit (s)	30	30	30	50	120
Oszillation/Bild (°)	1	1	1	0,5	1
Gesamt-Oszillation (°)	180	180	180	126,5	180
Raumgruppe	P3 ₁ 21	P3 ₁ 21	P3 ₁ 21	P3 ₁ 21	P3 ₁ 21
Zelldimensionen (Å, °)					
a / b / c	80,9/80,9/33,2	80,9/80,9/33,2	80,9/80,9/33,2	80,9/80,9/33,2	81,0/81,0/33,1
α / β / γ	90/90/120	90/90/120	90/90/120	90/90/120	90/90/120
Auflösungsgrenze (Å) ^a	2,4	2,40	2,4	1,9	2,05
	(2,46-2,4)	(2,46-2,4)	(2,46-2,4)	(1,94-1,9)	(2,16-2,05)
Vollständigkeit (%) ^a	99,9 (100)	99,9 (100)	99,9 (100)	99,7 (98,3)	99,5 (100,0)
Anzahl der observierten Reflexe (alle/unabhängig)	51623 / 5050	53837 / 5050	54214 / 5050	64193 / 10007	268214 / 7981
durchschnittliche Redundanz	10,2 (9,4)	10,6 (9,8)	10,7 (9,9)	6,4 (5,2)	33,6 (19,7)
<I/σ(I)> ^a	19,4 (8,9)	19,4 (8,5)	19,1 (8,3)	30,9 (6,4)	36,0 (6,2)
R _{r.i.m.} ^{a,b}	10,7 (28,9)	10,8 (30,8)	10,9 (33,0)	9,0 (49,6)	2,2 (11,5)
R _{p.i.m.} ^{a,c}	3,3 (9,4)	3,3 (9,7)	3,3 (10,4)	3,4 (21,5)	12,6 (51,8)
B-factor aus Wilson-Plot (Å ²)	30,9	31,9	31,1	18,4	17,3
FOM (DM-FOM)	0,665 (0,871)	0,665 (0,871)	0,665 (0,871)		

Verfeinerungsstatistiken		
Auflösungsgrenze (Å) ^a	1,9 (1,95-1,9)	2,05 (2,1-2,05)
Anzahl der unabhängigen Reflexe ^a	9530 (684)	7621 (547)
Vollständigkeit der Daten ^a	99,7 (97,3)	100 (100)
R _{cryst} (%) ^{a, d}	15,4 (19,9)	17,4 (22,7)
R _{free} (%) ^{a, e}	20,1 (23,4)	21,6 (33,4)
Anzahl der Atome (ohne H)	961	904
Protein	799	789
Lösungsmittel	162	115
Ramachandran-Plot (%) favorisiert, erlaubt, ungünstig ^f	96,0; 4,0; 0	94,7; 5,3; 0
Koordinatenfehler ^g	0,124	0,155
R.m.s.-Abweichung von idealen Werten		
Bindungslängen (Å)	0,012	0,013
Bindungswinkel (°)	1,512	1,608
Durchschnittlicher B-Faktor (Å ²)		
Peptid-Rückgrad	16,7	14,0
Seitenketten	19,2	15,3
Lösungsmittel	43,6	29,6

Legende:

^a Werte für die Schale mit der höchsten Auflösung sind in Klammer () gesetzt.

$$^b R_{r.i.m.} = 100 \times \sum_{hkl} [N/(N-1)]^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$$

$$^c R_{p.i.m.} = 100 \times \sum_{hkl} [1/(N-1)]^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$$

wobei $I_i(hkl)$ die Intensität der *i*ten Messung der Reflexe mit den Miller'schen Indizes *hkl* und $\langle I_i(hkl) \rangle$ die mittlere Intensität aller Messungen von $I(hkl)$ ist, kalkuliert für $I \geq 3\sigma(I)$. Beide R-Faktoren sind in Abhängigkeit der Redundanz *N* berechnet.

$$^d R_{cryst} = 100 \times \sum | |F_{obs}| - |F_{calc}| | / \sum |F_{obs}|$$

mit F_{obs} und F_{calc} als die gemessenen und kalkulierten Strukturfaktor-Amplituden.

^e R_{free} ist entsprechend dem R_{cryst} kalkuliert, aber 5 % der Reflexe sind vom Verfeinerungsprozess ausgenommen (Brünger, 1992; Tickle *et al.*, 2000).

^f kalkuliert mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

^g kalkuliert mit dem Programm SFCHECK (Vaguine *et al.*, 1999), basierend auf einem Luzzati-Plot.

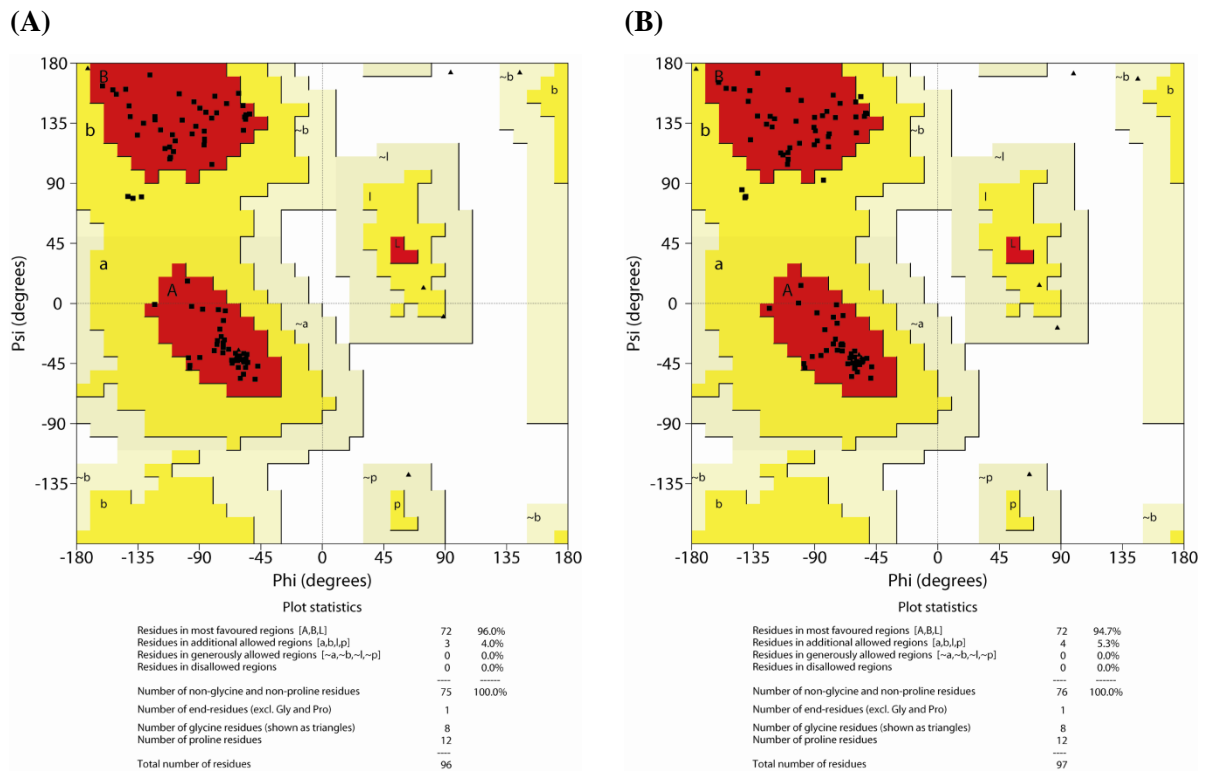


Abb. 37: Ramachandran-Diagramme der endverfeinerten Strukturmodelle, berechnet mit PROCHECK von **(A)** SeMet-SoxS und **(B)** SoxS.

4 Diskussion

4.1 Galaktitol-Dehydrogenase

Die zu der Familie der *Short-chain*-Dehydrogenasen (SDR) gehörende Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH) wurde heterolog in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) exprimiert, mit einer N-terminalen (His)₆-Affinitätssequenz, gefolgt von einer TEV-Protease-Schnittstelle. Das Protein wurde über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt und zur Röntgenstrukturanalyse kristallisiert. Der Affinitätsmarker beeinträchtigte die Kristallisation des Proteins und wurde daher zuvor entfernt. Erste Kristallisationsbedingungen wurden mittels Zufalls-Screening gefunden und im Raster-Screen-Verfahren optimiert. Das aufgereinigte Protein sowie die Kristalle wurden mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF analysiert. Es wurde kein proteolytischer Verdau in den aufgelösten Kristallen festgestellt.

Bei der Röntgenstrukturanalyse kann nur die Intensität der Reflexe experimentell bestimmt werden, nicht aber deren Phasen. Dieses sogenannte kristallographische Phasenproblem kann durch verschiedene Methoden indirekt gelöst werden (siehe Kapitel 2.15.3.5). Die hier angewandte Methode ist die des molekularen Ersatzes, bei dem Phasen, berechnet aus den Koordinaten eines strukturell homologen Modells, verwendet werden. Dazu wird ein Homologiemodell mit Proteinstrukturen erstellt, die eine ausreichend hohe Sequenzidentität (>25 %) aufweisen. Zumeist wird das Protein mit der höchsten Sequenzidentität als Modell verwendet. Das Modell kann aber auch aus Domänen unterschiedlicher Proteine, die eine möglichst hohe Homologie in den entsprechenden Bereichen aufweisen, zusammengesetzt werden.

4.1.1 Allgemeine Struktur des Holoenzym

Die Struktur der GatDH, kokristallisiert mit dem Kofaktor NAD⁺ wurde mit einer Auflösung von 1,25 Å aufgeklärt. Das kristallographische Phasenproblem konnte durch die Methode des molekularen Ersatzes gelöst werden. Als Modell diente die Kristallstruktur der Gluconat-5-Dehydrogenase (TM0441) aus *Thermotoga maritima* (PDB-Eintrag 1vl8). Die gesamte Polypeptidkette und alle Seitenketten sind in der Elektronendichte-Karte sehr gut definiert, ebenso konnte sehr gut erkennbare Elektronendichte im aktiven Zentrum dem Kofaktor NAD⁺ zugeordnet werden (siehe Abb. 20 A, Ergebnisse).

Die Kristallstruktur der GatDH zeigt ein aus sieben Strängen bestehendes β -Faltblatt, welches auf jeder Seite von drei α -Helices umgeben ist. Der Kofaktor bindet in einer tiefen Tasche

oberhalb des β -Faltblattes (Abb. 38). Dies entspricht der für Mitglieder der SDR-Familie typischen Rossmann-Faltung, welche sich aus 2 $\beta\alpha\beta$ -Motiven ($\beta A-\alpha B-\beta B-\alpha C-\beta C$ sowie $\beta D-\alpha E-\beta E-\alpha F-\beta F$) zusammensetzt (Rossmann *et al.*, 1974; Ghosh *et al.*, 1995).

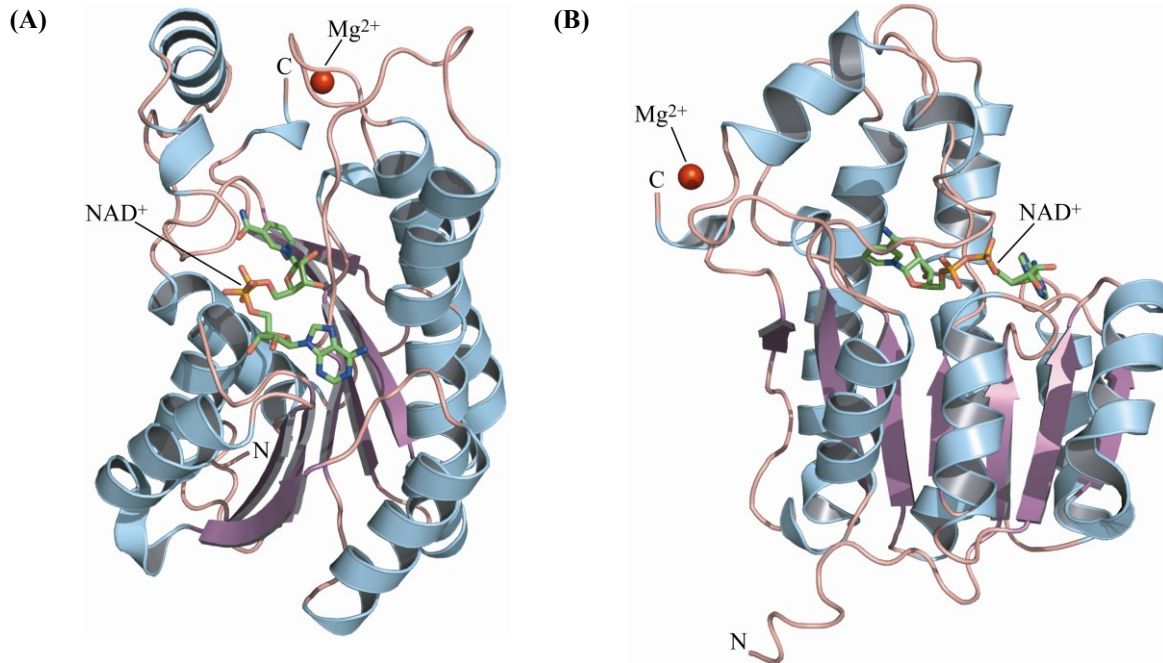


Abb. 38: Kristall-Struktur der GatDH aus *Rhodobacter sphaeroides* bei 1,25 Å Auflösung in Aufsicht (A) und Seitenansicht (B). GatDH besteht aus einem sieben-strängigen β -Faltblatt (lila), welches von sieben α -Helices (cyan) umgeben ist. Der Kofaktor NAD^+ , in Stäbchen-Darstellung, bindet in einer Tasche oberhalb der Faltblattstränge. Am C-Terminus der GatDH bindet ein Mg^{2+} -Ion (als rote Kugel dargestellt). Der Kern der Struktur zeigt die für viele NAD(P)(H) -bindenden Proteinen charakteristische Rossmann-Faltung.

Die Sekundärstrukturelemente wurden nach der Nomenklatur der $3\alpha/20\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (Ghosh *et al.*, 1991) benannt (Abb. 39, A und B). Bei GatDH liegt zwischen den beiden $\beta\alpha\beta$ -Motiven noch die α -Helix αD . Zusätzlich ist das zentrale Rossmann-Faltungsmotiv C-terminal noch um ein siebtes β -Faltblatt (βG) sowie eine Helix (αG) erweitert, welche durch eine linksgängige *Cross-Over*-Verbindung mit einem Helix-Turn-Helix-Motiv mit zwei kleinen Helices ($\alpha FG1$ und $\alpha FG2$) von dem Rossmann-Motiv getrennt sind. Strukturell kann GatDH daher nach der SCOP-Datenbank (*Structural Classification of Protein Database*, Murzin *et al.*, 1995) in die Klasse der Tyrosin-abhängigen Oxidoreduktasen eingeordnet werden.

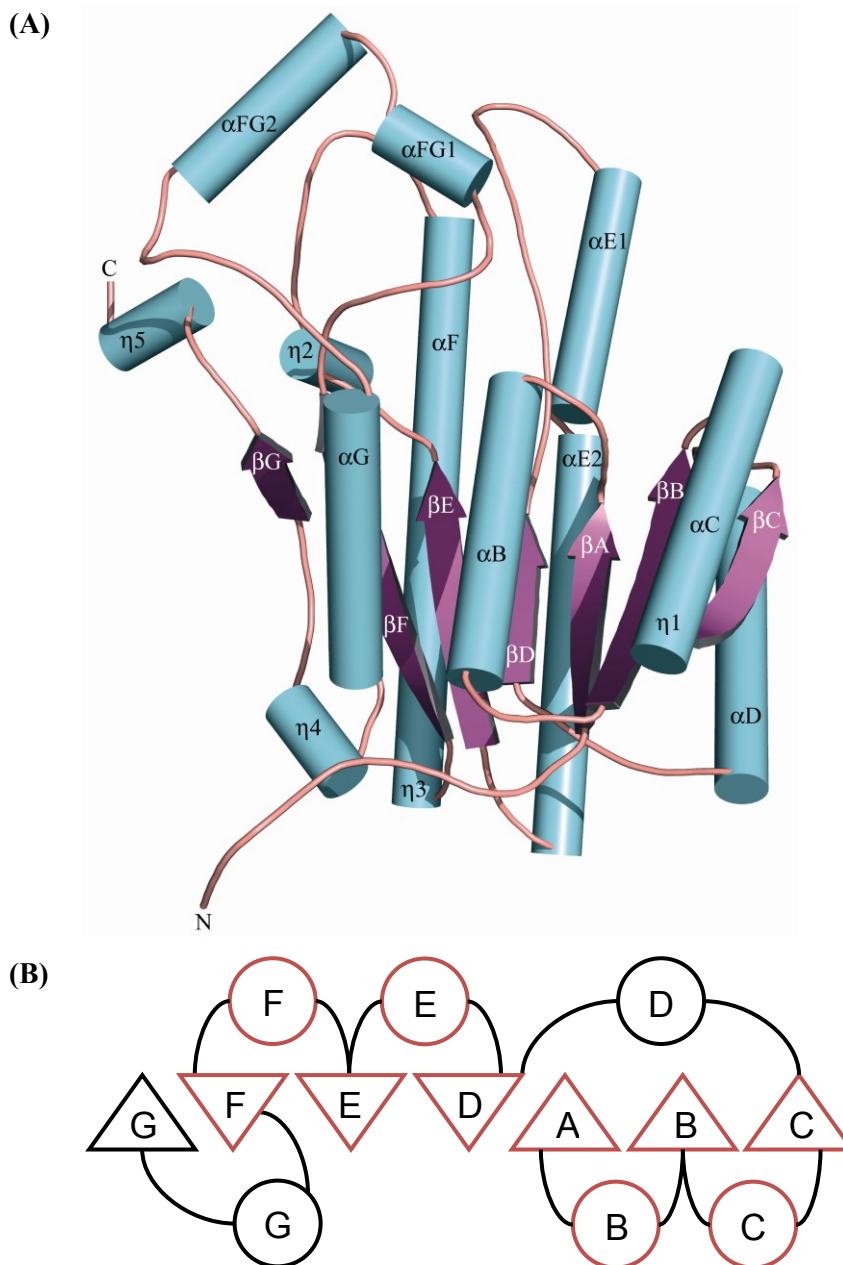


Abb. 39: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur-Elemente und ihre Benennung nach der Nomenklatur der $3\alpha/20\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (Ghosh *et al.*, 1991).

- (A) Dreidimensionale Cartoon-Darstellung. Die Helices sind als Zylinder, die Faltblätter als Pfeile dargestellt.
- (B) Schematische Darstellung der Sekundärstruktur-Elemente, die im Kern eine Rossmann-Faltung (rote Umrandung) enthalten. Die Helices sind als Kreise, die Faltblätter als Dreiecke dargestellt.

4.1.2 Vergleich mit homologen Strukturen

Ein strukturbasiertes Alignment gegen die PDB-Datenbank mit dem Programm DALI (Holm & Sander, 1996) ergab, dass die höchste strukturelle Homologie zu der 2-(R)-Hydroxypropyl-COM-Dehydrogenase von *Xanthobacter autotrophicus*, der Gluconat-5-Dehydrogenase von *Thermotoga maritima*, die das Modell für die Strukturlösung lieferte und der 3-Oxoacyl-Reduktase von *Bacillus anthracis* vorhanden ist (Tab. 20).

Tab. 20: Zusammenstellung einiger Proteine mit der höchsten strukturellen Homologie zu GatDH

<i>Protein</i>	<i>PDB-Eintrag</i>	<i>Z-Score</i>	<i>r.m.s.d</i>	<i>LALI</i>	<i>% IDE</i>
2-(R)-Hydroxypropyl-COM-Dehydrogenase	2cfc	37,8	1,2	243	39
Gluconat-5-Dehydrogenase	1vl8	37,4	1,4	248	36
3-Oxoacyl-Reduktase	2uvd	37,3	1,2	242	33
Levodion-Reduktase	1iy8	36,9	1,4	245	31
R-Alkohol-Dehydrogenase	1nxq	34,5	1,6	241	37
Xylitol-Dehydrogenase	1zem	35,4	1,3	241	31

Legende: Z-Score: (Z-Score > 2: Homologie vorhanden)

r.m.s.d: Standard-Abweichung der vergleichbaren C_α-Atome

LALI: Anzahl der C_α-Atome, die verglichen werden konnten

% IDE: Sequenzidentität

Bei nicht homologen Proteinen findet man Sequenzidentitäten in der Größenordnung von 15 bis 25 %. Allerdings können auch entfernt Homologe Sequenzabdeckungen in diesem Bereich aufweisen. Hier zeigen oft nur einzelne Domänen eine höhere Sequenzidentität. Bei Identitäten über 25 % geht man davon aus, dass die Tertiärstruktur der Proteine gleich ist. Alle in Tabelle 20 aufgeführten Proteine zeigen einen deutlich höheren Prozentsatz an Sequenzidentität und sind daher alles Homologe der GatDH. Ein strukturbasiertes Sequenzalignment zwischen GatDH und dem Modell, der Gluconat-5-Dehydrogenase ist in Abb. 40 dargestellt.

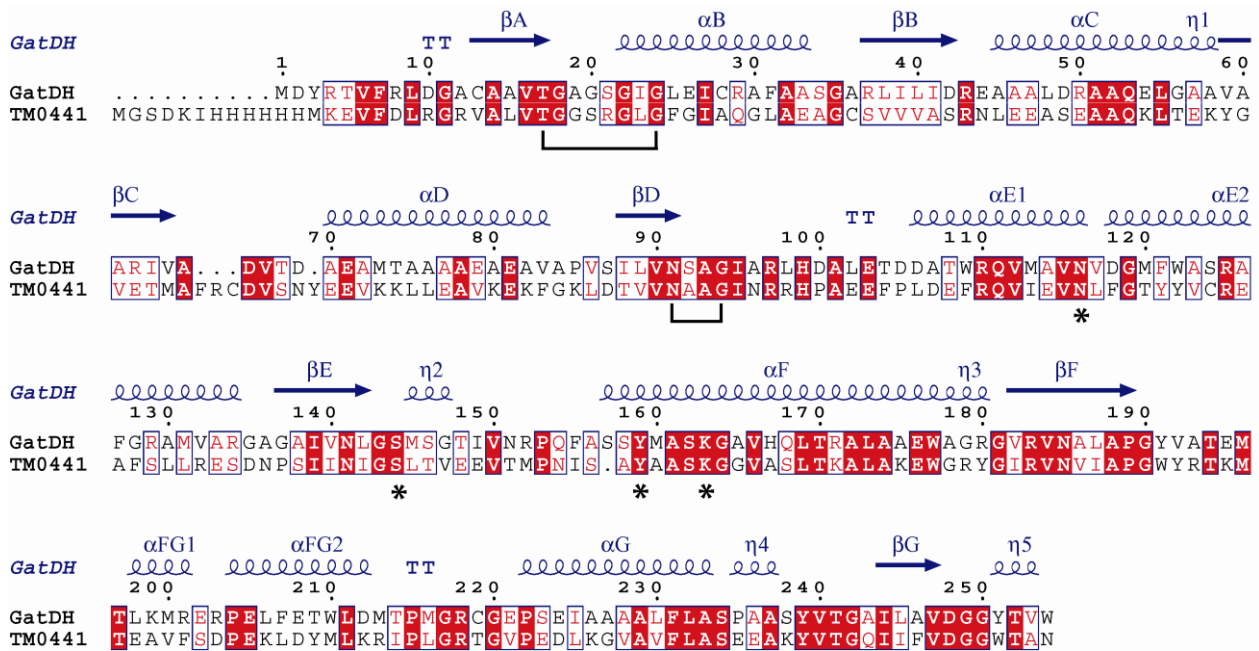


Abb. 40: Vergleich der Sequenzen der Proteine GatDH und der als Suchmodell verwendeten Gluconat-5-Dehydrogenase (TM0441). Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt, die Sekundärstrukturelemente mit dem Programm *DSSP* (Kabsch & Sander, 1983) ermittelt. Das Bild wurde mit dem Programm *ESPrnt* (Gouet *et al.*, 1999) erstellt. Die Klammern kennzeichnen die beiden Hauptmotive zur Bindung des Kofaktors. Mit Sternchen (*) sind die Seitenreste gekennzeichnet, die die katalytische Tetrade bilden.

Neben der strukturellen Einordnung kann die GatDH aufgrund verschiedener Sequenzmotive zu den klassischen SDR-Enzymen gezählt werden (Kallberg *et al.*, 2002). In Tab. 21 sind die wichtigsten Motive und ihre Funktion aufgeführt.

Tab. 21: Konservierte Sequenzmotive der SDR-Enzyme (nach Oppermann *et al.*, 2003) und ihr Vorkommen in der GatDH

Konserviertes Motiv	Sequenz (GatDH)	Position (GatDH)	Funktion
TGXXXGXG	TGAGSGIG	17-24	Kofaktor-Bindung, Erhaltung des zentralen β -Faltblattes
D	D	65	Stabilisierung der Tasche, in der der Adeninring liegt; schwache Bindung des Coenzym
NNAG	NSAG	91-94	Stabilisierung des zentralen β -Faltblattes

N	N	116	Katalytische Tetrade
S-Y-K	S-Y-K	144, 159, 163	Aktives Zentrum, katalytische Tetrade
PG	PG	189-190	Reaktionsrichtung
T	T	194	H-Brücke zu Carboxamid des Nicotinamid-Ringes

4.1.3 Aufbau des Tetramers in der Kristallpackung

GatDH kristallisiert als Tetramer, einem Dimer aus zwei Dimeren (siehe Abb. 41). Die Monomere A1 und A2 bzw. B1 und B2 interagieren jeweils mit den beiden großen Helices αE und αF über hydrophobe Wechselwirkungen, H-Brückenbindungen sowie einigen Salzbrücken. Die Berührungsoberfläche, errechnet mit PISA (Krissinel & Henrick, 2007), besitzt eine durchschnittliche Ausdehnung von 1.581 \AA^2 pro Monomer. Die Monomere A1 mit B1 sowie A2 mit B2 sind ihrerseits über hydrophobe Interaktionen und H-Brücken der Helices und Faltblattstränge αF , αG , βF und $\eta 5$ sowie über den Bereich am N-Terminus und αB miteinander verbunden und bilden dadurch das Tetramer. Die Berührungsoberfläche beträgt hier 1.786 \AA^2 pro Monomer.

Bei den meisten SDR-Enzymen wird eine Abhängigkeit der Aktivität von dem tetrameren oder dimeren Zustand beschrieben. Beispiele sind die Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus megaterium* (GlcDH), welche in der tetrameren Form aktiv und als Monomer inaktiv ist (Mauer & Pfeleiderer, 1985, 1987). Für dieses Enzym wurde ein kooperativer Effekt zweier Aminosäuren, welche an der Dimer-Interaktion beteiligt sind, beschrieben (Baik *et al.*, 2005). Die Dimerbildung findet in den SDR-Enzymen vor allem über die beiden großen Helices αE und αF statt (Jörnfall *et al.*, 1995). Ein anderes SDR-Mitglied, die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17β -HSDcl) aus dem pflanzenpathogenen Pilz *Cochliobolus lunatus* ist nur als Dimer aktiv. Die kritischen Seitenketten der Katalyse sind hier in den Helices αE und αF lokalisiert und scheinen nur in einem stabilen Dimer-Komplex für eine Katalyse richtig positioniert zu sein (Kristan *et al.*, 2005).

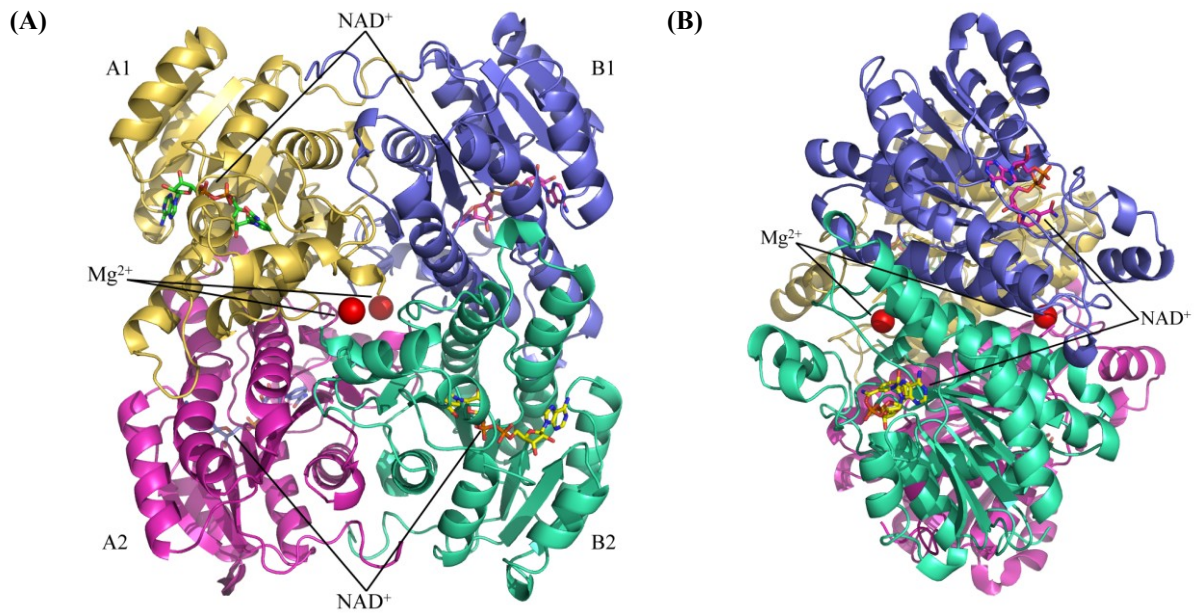


Abb. 41: Aufbau des Tetramers der GatDH, in Cartoon-Darstellung. Die einzelnen Monomere sind unterschiedlich eingefärbt, die Kofaktoren in Stäbchen dargestellt. Die beiden Mg^{2+} -Moleküle, welche Monomer A1 mit B2 sowie B1 mit A2 komplexieren, sind als rote Kugeln dargestellt.

- (A) Die einzelnen Monomere der GatDH sind über starke Wechselwirkungen miteinander verbunden sowie zusätzlich über Kreuz durch die Mg^{2+} -Ionen komplexiert.
- (B) 90°-Ansicht zu Bild A. Die Mg^{2+} -Moleküle liegen auf einer nicht-kristallographischen Symmetrie-Achse. Der katalytische Tyrosinrest im aktiven Zentrum liegt 16,43 Å entfernt.

Bei der GatDH sind zusätzlich die sich gegenüberliegenden Monomere (A1 zu B2 sowie B1 zu A2) an ihren C-Termini jeweils über ein Mg^{2+} -Ion komplexiert (Abb. 41 und 42). Das Mg^{2+} ist von einer oktaedrischen Koordinationssphäre umgeben, die aus vier Wassermolekülen und der Carboxylgruppe der letzten Aminosäure von beiden Monomeren besteht. Außerdem wechselwirken die letzten vier Aminosäuren sowie die Schleife vor αF über H-Brücken-Bindungen und Salzbrücken miteinander, mit einer Berührungsoberfläche von 452 Å² pro Monomer.

Die Bindungslängen des Mg^{2+} -Ions zu den sechs Liganden variieren zwischen 2,00 und 2,13 Å. Dies entspricht den Literaturwerten von 2,0-2,15 Å, der für Mg^{2+} -Ionen mit Sauerstoff-Liganden in Proteinen angegeben ist (Harding, 2001).

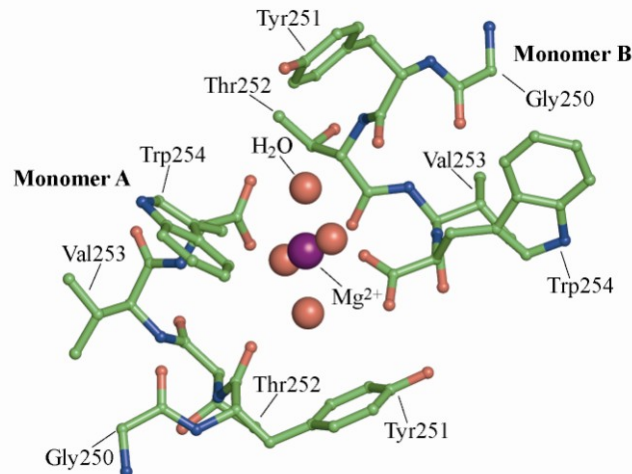


Abb. 42: Mg^{2+} -Bindestelle am C-Terminus der GatDH. Es sind die letzten fünf Aminosäure-Seitenreste zweier Monomere dargestellt, wobei C-Atome grün, Sauerstoff-Atome rot, Stickstoff-Atome blau und das Mg^{2+} -Ion violett eingefärbt sind. Zwei GatDH-Monomere sind über ein Mg^{2+} -Ion komplexiert. Mg^{2+} besitzt eine oktaedrische Koordinationssphäre, die aus vier Wassermolekülen und jeweils einem Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe an jedem C-Terminus gebildet wird.

4.1.4 Untersuchung der Mg^{2+} -Abhängigkeit der GatDH

In der Publikation von Schneider *et al.* (1995) wird die Aktivität der GatDH als strikt abhängig von zweiwertigen Metall-Ionen beschrieben. Durch Dialyse gegen Phosphat-Puffer wurde ein Verlust der Aktivität um 56 % festgestellt, welche durch Zugabe von MgCl_2 , CoCl_2 , MnCl_2 und MgCl_2 zu 100-120 % wiederhergestellt werden konnte. Die Zugabe von 1 mM EDTA bewirkte eine Abnahme der Aktivität um 68 %, die durch Zugabe von 2 mM MgCl_2 wieder regeneriert wurde (Schneider *et al.*, 1995).

Ein SDR-Enzym, bei dem eine strikte Abhängigkeit der Aktivität von Mg^{2+} -Ionen beschrieben wurde, ist die RADH aus *Lactobacillus brevis* (Niefind *et al.*, 2000). Hier wurden in der Struktur ebenfalls zwei Bindestellen von Mg^{2+} -Ionen am C-Terminus gefunden, vergleichbar zur GatDH. Durch intensives Dialysieren des Proteins gegen den 10^6 -fachen molaren Überschuss an EDTA konnte eine komplette Inaktivierung erreicht werden (Niefind *et al.*, 2003). GatDH wurde entsprechend behandelt und gegen einen Puffer (20 mM Bis-Tris, pH 6,5), der das 10^6 -fache molare Verhältnis an EDTA enthielt, dialysiert. Anschließend wurde ein Aktivitätsassay durchgeführt. Es konnte kein Verlust der Aktivität beobachtet werden. Deshalb wurde GatDH an eine Anionenaustauscher-Säule gebunden und mit 1 l

Puffer mit 10 mM EDTA gewaschen. Danach sollte das Protein eluiert werden und ein Aktivitätstest durchgeführt werden. Es zeigte sich aber, dass die GatDH vollständig auf der Säule ausgefallen war (Diplomarbeit, Henning Christian, 2009).

4.1.4.1 Substitution der Mg^{2+} -Ionen durch Co^{2+} -Ionen

Um die Mg^{2+} -Abhängigkeit der GatDH auch strukturell zu untersuchen, wurde $MgCl_2$ in den Kristallisationsbedingungen durch $CoCl_2$ ersetzt werden. Dazu wurde das Protein gegen Puffer mit EDTA dialysiert, um das Mg^{2+} zu entfernen und in Anwesenheit von $CoCl_2$ kristallisiert (siehe Kapitel 3.1.14, Ergebnisse).

Mg^{2+} und Co^{2+} besitzen beide eine oktaedrische Koordinationssphäre und können daher gegeneinander ausgetauscht werden. Die Absorptionskante von Kobalt liegt, im Gegensatz zu der des Mg^{2+} , im bei der Röntgenkristallographie verwendeten Wellenlängenbereich. Es wurde ein Datensatz an der Absorptionskante (1,608 Å) des Kobalts aufgenommen und eine anomale Differenz-Elektronendichte berechnet. Am C-Terminus befindet sich ein starkes Signal, das sich mit den Koordinaten der Mg^{2+} -Bindestelle in der ersten Struktur deckt (siehe Kapitel 4.1.2). Es konnte also in dem Protein, welches zur Kokristallisation mit Co^{2+} eingesetzt wurde, das Mg^{2+} durch Co^{2+} ersetzt werden. Ein weiteres starkes Signal, das auf eine zweite Bindestelle für Mg^{2+} , z.B. im aktiven Zentrum, hindeuten würde, konnte nicht identifiziert werden.

4.1.4.2 Multiple Angle Laser Light Scattering-(MALLS)-Messungen

MALLS-Messungen (Kapitel 3.1.6, Ergebnisse) zeigen, dass GatDH unabhängig von der Anwesenheit von Mg^{2+} oder den Kofaktoren NAD^+ und $NADH$, als Tetramer vorliegt. Das abweichende Laufverhalten der GatDH als Dimer oder Trimer in der analytischen Gelfiltration kann auf die relativ flache Form des Komplexes zurückgeführt werden. Standard-Proteine für die Kalibrierung von GPC-Säulen sind dagegen überwiegend globuläre, runde Proteine. Die Methode ist demnach für die Bestimmung des Oligomerisierungszustandes nur als erster Anhaltspunkt geeignet.

Die tetramere Form der GatDH scheint daher auch ohne Mg^{2+} -Ionen stabil zu sein. Dies konnte auch bei der RADH gezeigt werden, welche durch Entfernen der Mg^{2+} -Ionen inaktiviert wird, aber weiterhin als stabiles Tetramer vorliegt (Niefind *et al.*, 2003). Damit konnte nicht endgültig bewiesen werden, dass die Aktivität der GatDH von zweiwertigen Ionen abhängig ist. Der Einfluss der Mg^{2+} -Bindestelle am C-Terminus sollte durch die

Expression, Aufreinigung und Kristallisation einer C-terminal verkürzten Mutante näher untersucht werden.

4.1.4.3 Expression und Aufreinigung von GatDH Δ C3

Die Expression einer C-terminal verkürzten Mutante der GatDH erwies sich als sehr schwierig, da das Protein hauptsächlich in Einschlusskörperchen vorlag. Der geringe Teil des löslichen Proteins wurde aufgereinigt, allerdings war die Ausbeute für eine Kristallisation nicht ausreichend. Das Protein blieb nur in Hochsalz-Bedingungen (über 200 mM NaCl) stabil.

Rückfaltungs-Versuche des Proteins aus den Einschlusskörperchen waren nicht erfolgreich (Diplomarbeit, Henning Christian, 2009). Wildtyp-GatDH, welche in einem Kontrollexperiment analog denaturiert und rückgefaltet wurde, zeigte ebenfalls keine Aktivität mehr. Somit kann nur die Aussage getroffen werden, dass das Rückfaltungsprotokoll keine aktive GatDH liefert. Damit kann keine Aussage bezüglich eines Aktivitätsverlustes der verkürzten GatDH wegen der fehlenden Aminosäuren getroffen werden.

Die letzten vier Aminosäuren bilden eine π -Helix (η 5) und sind in der Dimer-Bildung involviert, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben. Der C-Terminus der GatDH scheint daher für die Stabilität des Proteins und seine Tertiärstruktur sehr wichtig zu sein. GatDH mit C-terminalem (His)₆-Affinitätsmarker zeigt keine Aktivität (Dissertation, Christian Zimmer, 2006). Eine Mutante, welche um die Aminosäure Alanin verlängert wurde (GatDH_A255), konnte löslich in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt werden (Diplomarbeit, Henning Christian, 2009). Die Aktivität dieser Mutante ist vergleichbar gegenüber der des Wildtyps.

Diese Daten (Kapitel 4.1.4.1-4.1.4.3) würden eher für die Stabilisierung des Tetramers über hydrophobe Interaktionen und H-Brücken der Aminosäure-Seitenketten als für die Komplexierung durch Mg²⁺ sprechen. Die starken Wechselwirkungen der großen Interaktionsflächen zwischen allen Monomeren und die MALLS-Messungen (siehe Kapitel 3.1.6, Ergebnisse) zeigen ebenfalls, dass der tetramere Komplex auch ohne die Mg²⁺-Ionen stabil sein kann. Allerdings kann eine genaue Aussage diesbezüglich nur durch eine noch ausstehende Strukturanalyse der GatDH-Mutanten geklärt werden.

4.1.5 Kofaktor-Bindestelle

Die Bindestelle von NAD(P)(H) liegt bei den klassischen SDR-Enzymen in dem hoch konservierten Motiv GXXXGXG. Bei der GatDH sind dies die Aminosäurereste 18-24 (GAGSGIG) zwischen dem ersten β -Faltblattstrang (β A) und der ersten α -Helix (α B).

Die Spezifität für NAD(H) oder NADP(H) wird durch ein Aspartat oder Arginin am Ende des zweiten β -Faltblattes reguliert (Duax *et al.*, 2003). Bei NAD(H)-bindenden SDR-Enzymen befindet sich in 70 % der Fälle in der Schleife zwischen dem zweiten Faltblattstrang und der zweiten Helix ein konservierter Aspartat-Rest, bei NADP(H)-bindenden dagegen findet man einen konservierten Arginin-Rest, der in der Sequenz eine Aminosäure weiter liegt. In GatDH ist das seltenere Motiv D42/R43 vorhanden, sodass aufgrund der Sequenz nicht auf die Kofaktor-Präferenz geschlossen werden kann. Andere SDR-Enzyme, die diese Sequenz ebenfalls besitzen, binden NAD (Duax *et al.*, 2003). Auch würde der negativ geladene Aspartat-Rest die Bindung der Phosphat-Gruppe beim NADP behindern, wohingegen die Seitengruppe des Arginin kompatibel mit der OH-Gruppe der Ribose ist und π -Wechselwirkungen mit dem Adenin-Ring eingeht.

In der Struktur der GatDH konnte sehr gut definierte Elektronendichte eindeutig dem Kofaktor NAD(H) zugeordnet werden. Dies deckt sich mit früheren Untersuchungen bezüglich der Kofaktor-Abhängigkeit (Schneider *et al.*, 1995). Eine Unterscheidung, ob NAD^+ oder die reduzierte Form NADH vorliegt, kann anhand der niedrigen Elektronendichte der Wasserstoffatome nicht getroffen werden. Beide Formen unterscheiden sich nur anhand einer leichten Abweichung von der Planarität des Nicotinamid-Ringes in der reduzierten Form. Diese Abweichung ist ebenfalls, aufgrund der dafür zu geringen Auflösung der Daten, in der Elektronendichte nicht zu erkennen. Da NADH aber sehr schnell durch den Luftsauerstoff zu NAD^+ oxidiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass in der Kristallstruktur die oxidierte Form vorliegt.

Der Kofaktor ist über 22 H-Brückenbindungen mit den Aminosäure-Seitenketten der GatDH oder mit fest in der Struktur positionierten Wassermolekülen gebunden (Abb. 43). Sein Nicotinamid-Ring begrenzt auf einer Seite das aktive Zentrum in einer Tasche, in welcher die Substrate binden. Zusätzlich wird der aromatische Adenin-Ring über π -Wechselwirkungen mit dem Arginin-Rest 43, welcher in zwei Konformationen vorliegt, koordiniert. Eines der Wassermoleküle (in Abb. 43 als WAT1 bezeichnet), mit denen der Kofaktor eine H-Brückenbindung eingeht, ist in Dinukleotid-bindenden Enzymen konserviert. Es wird dabei immer über weitere H-Brückenbindungen koordiniert, einmal zu dem letzten konservierten

Glycinrest sowie dem ersten oder zweiten konservierten Glycinrest im GXXXGXG-Motiv (Bottoms *et al.*, 2002). In GatDH ist es der letzte und der erste konservierte Glycinrest sowie Ser92.

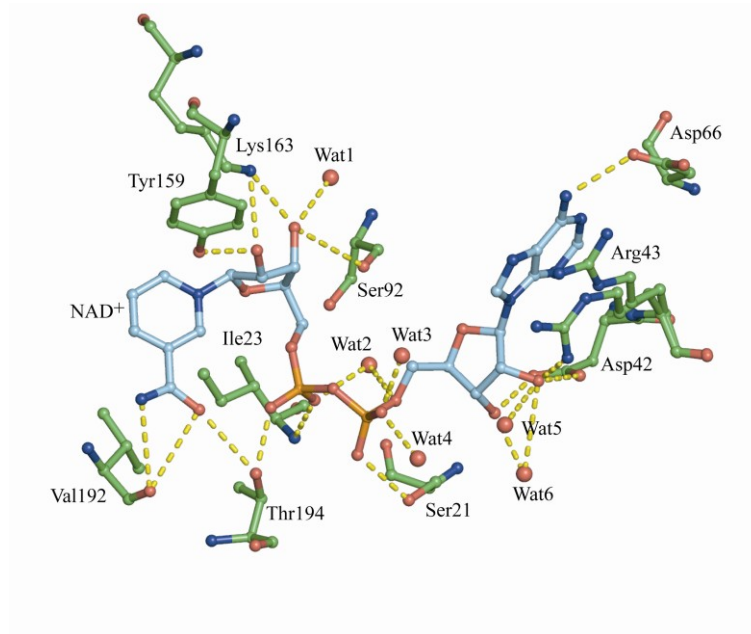


Abb. 43: Bindung des Kofaktor NAD^+ über Wasserstoffbrücken-Bindungen. NAD^+ , in cyan eingefärbt, ist über 22 H-Brücken-Bindungen mit Aminosäure-Seitenketten der GatDH oder mit fest positionierten Wassermolekülen gebunden. Zusätzlich kann der Adenin-Ring noch in π -Wechselwirkung mit Arg43, das in zwei Konformationen vorliegt, treten.

4.1.6 Aktives Zentrum mit gebundenen Substraten

Das aktive Zentrum liegt bei der GatDH, wie bei vielen SDR-Enzymen mit Rossmann-Faltung, am Ende einer langen Spalte, die ein neutrales bis positives Oberflächenpotential besitzt (siehe Abb. 44). Es ist gegen seine Umgebung durch die Helices αFG1 und αFG2 abgeschirmt. Diese liegen in einem flexiblen Bereich (AS195-205), der sogenannten Substratbinde-Schleife.

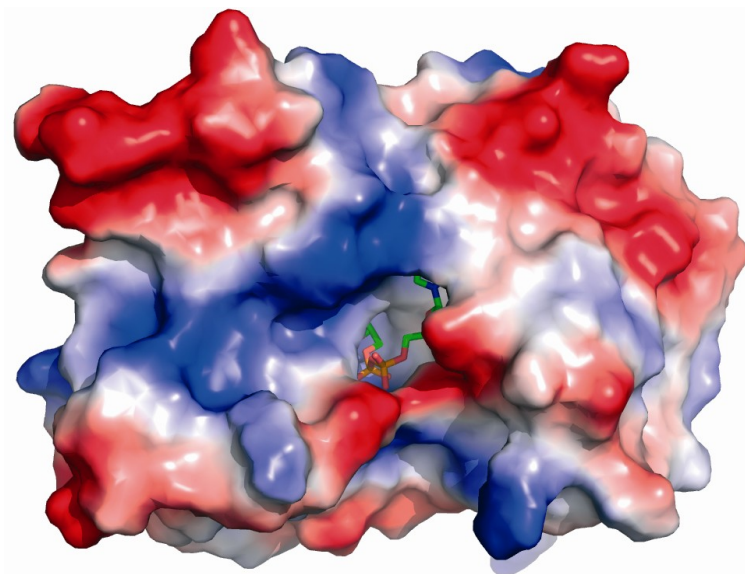


Abb. 44: Oberflächenpotential der GatDH. Der in einer tiefen Spalte gebundene Kofaktor NAD^+ ist als Stick-Darstellung gezeigt. Die molekulare Oberfläche wurde entsprechend dem elektrostatischen Potential, berechnet mit dem Programm *APBS* (Baker *et al.*, 2001), eingefärbt. Ein negatives Potential ist rot, ein positives Potential blau dargestellt.

In der Nähe des Nicotinamid-Ringes des NAD^+ , der Stelle der Hydrid-Übertragung, befand sich Elektronendichte, die nicht durch Wassermoleküle interpretiert werden konnte. Sie konnte sehr gut durch zwei Acetat- oder n-Propanol-Moleküle beschrieben werden, die sich im Kristallisationsansatz befanden. Die Moleküle sind sehr gut über H-Brückenbindungen mit Aminosäureresten im aktiven Zentrum fixiert, worauf in Kapitel 3.2.12 (Ergebnisse) schon eingegangen wurde. Ein ähnliches Merkmal wurde bei der Struktur der AFR aus *Sinorhizobium morelense* beobachtet, in deren aktiven Zentrum ebenfalls ein Acetat-Molekül band (Dambe *et al.*, 2006).

Ein noch besseres Verständnis des katalytischen Mechanismus der GatDH ist durch Strukturen zu erlangen, die von der GatDH umsetzbare Substrate im aktiven Zentrum binden. Um dies zu erreichen, wurden Kristalle, die ohne Acetat kristallisiert wurden, mit verschiedenen Substraten getränkt bzw. das Protein mit den Substraten kokristallisiert (siehe Kapitel 3.1.13, Ergebnisse). Es wurden verschiedene Datensätze aufgenommen und die Strukturen durch molekularen Ersatz mit der ersten GatDH-Struktur gelöst.

4.1.6.1 Tränkexperimente mit verschiedenen Substraten

Nur in zwei Datensätze mit hinreichend hoher Auflösung war Elektronendichte im aktiven Zentrum zu finden, die den jeweiligen Substraten *meso*-Erythritol bzw. Xylitol zugeordnet werden konnte. Der Besetzungsgrad des Kofaktors scheint in beiden Strukturen nicht vollständig zu sein. Dies erklärt auch die 4- bis 6-fach höheren B-Faktoren im Vergleich zu der ersten Struktur ohne Substrat (Tab. 14 und 17). Auch gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Ketten. Es sind jeweils zwei der Ketten besser definiert als die anderen beiden.

Die Struktur des mit Xylitol getränkten Kristalls besitzt zusätzlich noch ungeordnete Bereiche in der Substratbindeschleife (Glu195-205). Wie in Kapitel 3.1.13.2 (Ergebnisteil) beschrieben, musste die Konzentration an Xylitol beim Tränken gesenkt werden, da die Kristalle rissig wurden, was auf eine starke Veränderung der Dielektrizitätskonstante und damit auf Zerstörung der Packungseffekte hindeutet. Xylitol ist durch GatDH nach 52,5 h zu 75 % zu Xylulose umgesetzt (Diplomarbeit, Jäkel, 1994). Die Kristalle wurden bis zu 5 h in der Tränklösung belassen. Es könnte beim Einfrieren des Kristalles für die Datenmessung also ein Gemisch aus Substrat und Produkt vorliegen. Eine Unterscheidung, um welche Substanz es sich handelt, konnte wegen der schlechten Elektronendichte nicht getroffen werden. Daher wurde von dem Substrat Xylitol ausgegangen und in den Ketten B und D je ein Molekül ins aktive Zentrum gesetzt (Abb. 45, A). In den Ketten A und C ist dagegen fraglich, ob ein Substrat-Molekül gebunden hat.

Bei der Struktur des mit *meso*-Erythritol getränkten Kristalls sind die Bereiche der Substrat-Bindeschleife geordneter. Allerdings wird dieser Zucker kaum umgesetzt (siehe Tab. 2, Einleitung). Bei den Tränk-Experimenten bindet er vermutlich, wird aber nicht von der GatDH oxidiert. Nach Verfeinern der Struktur mit dem Kofaktor NAD⁺ wurde *meso*-Erythritol in noch nicht interpretierte Elektronendichte ins aktive Zentrum gelegt (siehe Kapitel 3.1.13.3, Ergebnisse). Der Kofaktor scheint in den Ketten B und C des Tetramers in zwei Konformationen vorzuliegen, die aber nicht modelliert werden konnten.

In Kette C und D scheint ein Molekül *meso*-Erythritol zu binden, in Kette A und B auch zwei Moleküle pro aktives Zentrum (Abb. 45, B). Dabei ist das zweite Molekül jeweils schlechter definiert.

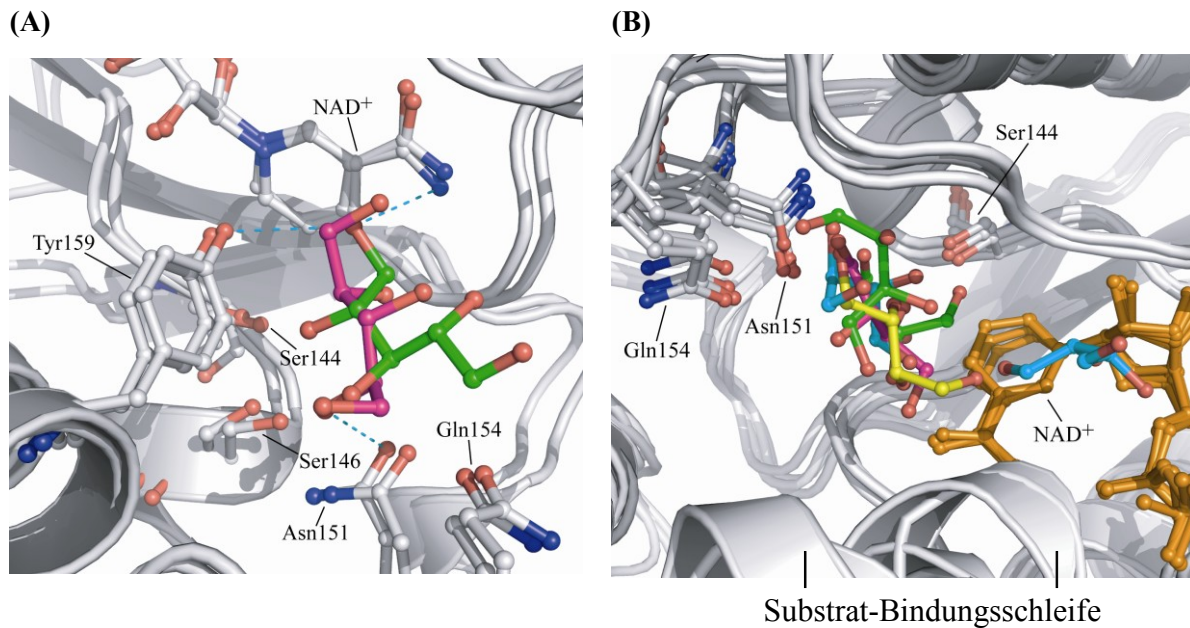


Abb. 45: Aktives Zentrum von GatDH-Strukturen mit gebundenem Substrat; Die einzelnen Ketten wurden mit dem Programm SUPERPOSE (CCP4, 1994) übereinandergelegt. Die wichtigsten Aminosäure-Reste sind in weiß als Stäbchen dargestellt.

- (A) mit gebundenem Xylitol in Kette B (in grün, mit eingezeichneten H-Brücken) und D (in magenta)
- (B) mit zwei gebundenem *meso*-Erythritol-Molekülen in den Ketten A (in grün) und B (in cyan) sowie je ein Molekül in den Ketten C (in magenta) und D (in gelb)

Wie in Kapitel 3.1.13.3 (Ergebnisteil) beschrieben, zeigen die Strukturen der getränkten Kristalle eine hohe Packungsdichte (Abb. 22). Es sind keine größeren Kanäle vorhanden, durch die die Substrate ins Innere des Kristalles diffundieren könnten. Auch ist der Zugang zum aktiven Zentrum der einzelnen Moleküle durch die Helices α FG1 und α FG2 verdeckt. In beiden Strukturen wird über Ser144 und Ser146 ein Wassermolekül koordiniert, wie auch schon in der Struktur ohne Substrat beobachtet wurde (Abb. 21, Ergebnisse). Erst eine Verdrängung dieses Wassermoleküls würde eine Bindung der Substrate an das an der katalytischen Tetrade beteiligte Ser144 ermöglichen. Dadurch käme das C2-Atom, an dem der Hydrid-Transfer erfolgt, in räumliche Nähe zu dem Nicotinamid-Ring. Um diese Probleme zu vermeiden, wurde daher als nächster Ansatz GatDH mit verschiedenen Substraten kokristallisiert.

4.1.6.2 Kokristallisationsexperimente mit verschiedenen Substraten

Um einen besseren Zugang der Substrate zum aktiven Zentrum und deren Bindung zu ermöglichen, wurden Kokristallisationsexperimente durchgeführt, wie in Kapitel 3.1.13.4 (Ergebnisteil) beschrieben. Der Vorteil ist, dass das Substrat dem löslichen Protein zugegeben wird und dadurch besser im aktiven Zentrum binden kann. Nachteile sind der Verbrauch größerer Mengen Protein sowie eventuell die Notwendigkeit, die Kristallisationsbedingungen zu optimieren bzw. anzupassen.

Im Rahmen einer von mir betreuten Diplomarbeit wurde eine Struktur von GatDH mit gebundenem 1,2-(*S*)-Pentandiol im aktiven Zentrum gelöst (Diplomarbeit Henning Christan, 2008). Das Substrat ist in allen vier Ketten gut definiert. Ein Übereinanderlegen aller Protomere zeigt, dass 1,2-Pentandiol im aktiven Zentrum in allen Ketten ähnlich ausgerichtet ist. Es handelt sich wahrscheinlich fast ausschließlich um das Substrat, da die Elektronendichte eine tetragonale Struktur der Substituenten am C2-Atom zeigt. Bei einer Oxidation der Hydroxylgruppe würden diese sich planar anordnen (Abb. 46).

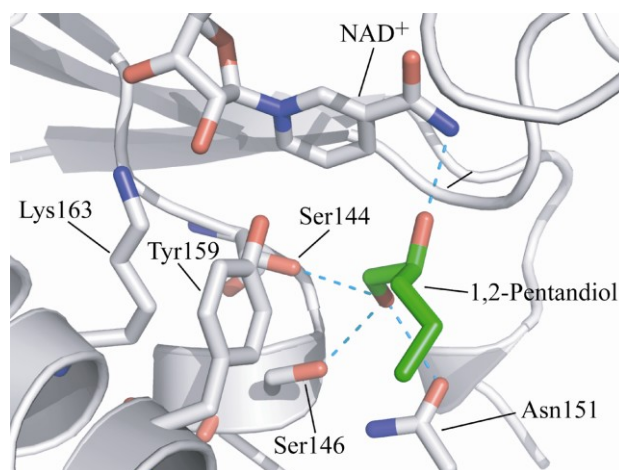


Abb. 46: Aktives Zentrum der GatDH mit gebundenem 1,2-(*S*)-Pentandiol (grün eingefärbt) und den wichtigsten Aminosäure-Seitenketten in Stäbchendarstellung. Das Substrat ist über H-Brückenbindungen (cyan-farbige Striche) sehr gut stabilisiert.

Das Substrat 1,2-(*S*)-Pentandiol wird über drei H-Brückenbindungen von dem O-Atom der 1'-Hydroxylgruppe zu den beiden OG-Atomen der Serin-Reste 144 und 146 ($d=3,4$ und $3,1$ Å) sowie zu der Seitenkette von Asn151 ($d=2,9$ Å) stabilisiert. Zusätzlich wird das Substrat noch mit seiner 2'-Hydroxylgruppe an das N-Atom des Nicotinamids gebunden. Dies erklärt die enantioselektive Umsetzung von 1,2-Diolen in der (*S*)-Konfiguration. In der (*R*)-Konfiguration wäre eine Stabilisierung des Substrates nicht möglich.

Der Abstand von C2 des 1,2-Pentandiols zu dem Nicotinamid-Ring, auf den der Hydridtransfer bei der Oxidation erfolgen sollte, beträgt mehr als 3,7 Å. Dagegen liegt das C1-Atom räumlich näher. Dies konnte auch in den anderen Strukturen mit Xylitol und *meso*-Erythritol beobachtet werden. Eine Erklärung wäre, dass in den Kristallstrukturen kein Intermediat-Zustand, der sich beim Hydrid-Transfer einstellt, dargestellt wird, sondern der Anfangszustand mit Substrat oder der Endzustand mit umgesetztem Produkt. Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass GatDH Substrate nicht nur an der 2'-Position reduzieren bzw. oxidieren kann, sondern zusätzlich noch an der 1'-Position (Dissertation Thomas Jung, 2008).

Die übereinandergelegten Strukturen mit den verschiedenen Substraten in Abb. 47 zeigen, dass 1,2-(*S*)-Pentandiol an der gleichen Stelle bindet wie Acetat und n-Propanol und alle drei Bindungspartner durch Ser144 und teilweise Ser146 stabilisiert werden. Die Substrate Xylitol und *meso*-Erythritol dagegen binden entfernter zum Nicotinamid-Ring. Die Substrate müssen erst ein gut positioniertes Wassermolekül verdrängen, um mit den Serin-Resten wechselwirken zu können.

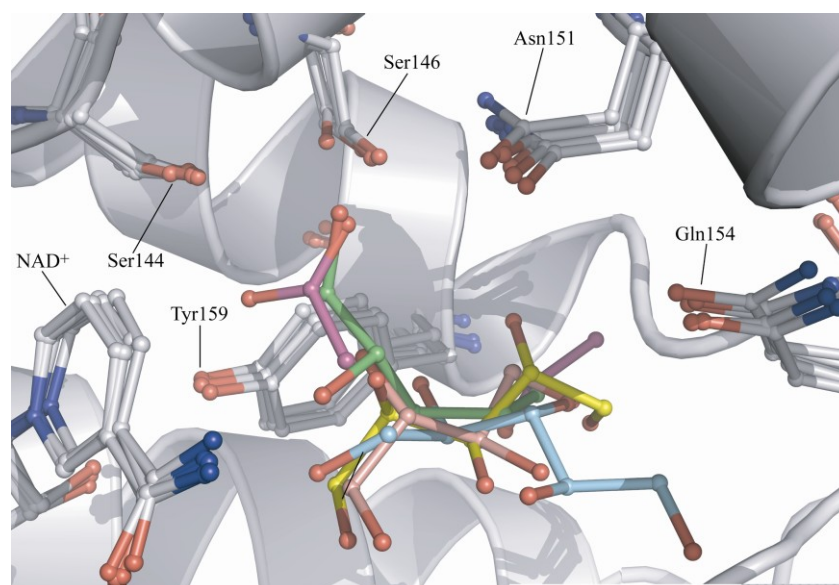


Abb. 47: Übereinandergelegte Strukturen mit verschiedenen Substraten. Die wichtigsten in der Katalyse involvierten Aminosäure-Seitenketten sind in weiß dargestellt. Der Übersichtlichkeit wegen sind nicht alle Substrate-Konformationen in jeder der vier Ketten gezeigt. Die Substrate sind wie folgt gefärbt:

- 2 Xylitol-Moleküle: gelb und cyan
- *meso*-Erythritol: rosa
- 1,2-Pentandiol: grün
- 2 Acetat-Moleküle: magenta

Bis auf Abweichungen im Bereich der Substratbinde-Schleife ist die GatDH ein starres Molekül. Auch im aktiven Zentrum ändern sich kaum die Positionen der Aminosäure-Reste und des NAD^+ . Die Substrate liegen in einem großen Hohlraum, der leicht das Eindiffundieren von Substrat und das Ausdiffundieren von Produkt ermöglicht. Die Substrat-Bindeschleife kann sich dabei dem anpassen. Diese Eigenschaften sind zusammen eine Erklärung für das große Substrat-Spektrum der GatDH.

Als Fazit kann gesagt werden, dass die GatDH vermutlich verschiedenste Substrate, aromatische als auch aliphatische, umsetzen kann (siehe auch Dissertation Thomas Jung, 2008). Die Substratbindungs-Schleife (AS 195-205) passt sich dabei teilweise der jeweiligen Größe des Substrates an. Die Umsatzrate der Substrate steigt mit Länge seiner Kohlenstoffkette, wie bei sekundären Alkoholen beobachtet (Schneider *et al.*, 1995). Dies könnte durch die bessere Bindung im aktiven Zentrum wie in einer Klammer erklärt werden. Kleinere Substrate können eher entweichen oder sich gegenseitig behindern. Durch die Flexibilität der an der Oberfläche der GatDH liegenden Schleife wird gleichzeitig auch das Entlassen des Produktes gewährleistet. Eine Optimierung der GatDH für biotechnologische Anwendungen in Hinblick auf ihr Substrat-Spektrum wäre durch gezielte Mutationen der Aminosäure-Reste in diesem Bereich denkbar.

4.1.6.3 Katalyse-Mechanismus der GatDH

Aufgrund der verschiedenen Strukturen der GatDH kann der für die SDR-Enzyme postulierte Mechanismus auch auf GatDH übertragen werden. An der katalytischen Reaktion beteiligt ist die sogenannte Tetrade, bestehend aus Asn-Ser-Tyr-Lys. Das Tyrosin ist der einzige Aminosäure-Rest, welcher in der SDR-Familie vollständig konserviert ist. Der zweite wichtige Aminosäure-Rest ist ein Lysin, vier Reste hinter dem Tyrosin. Er bildet H-Brückenbindungen zu der Ribose des NAD^+ aus und erniedrigt den pK_a -Wert der OH-Gruppe am Tyrosin, welches somit als katalytische Base wirkt. Dadurch wird ein Protonentransfer vom Tyr-OH zu dem Ribose-OH begünstigt. In diesem Protonen-Relay-System wird das Proton an Lys-NH_3^+ und anschließend an ein Wasser, welches über das Sauerstoff-Atom in der Hauptkette des Asparagins koordiniert ist, weitergegeben. Serin in der Tetrade stabilisiert dabei das Substrat.

In der GatDH bilden die Aminosäure-Seitenketten Ser144, Tyr159 und Lys163 sowie Asn116 die Tetrade. Asn116 liegt in der Helix αE . Durch H-Brückenbindungen der Seitenkette zu anderen Resten entsteht ein Knick in der Helix, die daher in zwei Hälften unterteilt wird (αE1

und $\alpha E2$). Das Protein-Rückgrat wird so in eine Position gebracht, in der es ein Wassermolekül binden kann, welches zudem mit dem Lysin- NH_3^+ der Tetrade koordiniert ist (Oppermann *et al.*, 2003).

4.1.7 Inhibitor-Studien

Zur Optimierung der GatDH für ihre Anwendung im Biotechnologie-Bereich ist die genaue Kenntnis des Reaktionsmechanismus und der an der Reaktion beteiligten Aminosäure-Reste nötig. Eine Kristallstruktur stellt den Mittelwert aller Moleküle dar. Substrate können umgesetzt werden und im Kristall ein Gemisch aus Edukt und Produkt vorliegen. Der Vorteil eines Inhibitors für die Röntgenstrukturanalyse liegt hier in der fehlenden Umsetzung und dadurch einer eventuell erhöhten Stabilität des Komplexes mit dem Protein. Parallel zu Diffusions- und Kokristallisations-Experimenten mit Substraten sollte daher die Struktur der GatDH im Komplex mit gebundenen Inhibitoren aufgeklärt werden.

4.1.7.1 *Tränk/Kokristallisations-Experimente mit einem für die GatDH entworfenen Inhibitor*

In der AG Wenz (Universität des Saarlandes) wurde ein Inhibitor (2-Brom-2-methyl-pentan-3,4-dion) für GatDH entworfen und synthetisiert. Dieser wurde, analog den Experimenten mit den GatDH-Substraten, für Tränkeexperimente als auch zur Kokristallisation eingesetzt (siehe Kapitel 3.1.13, Ergebnisse). Von unterschiedlichen Kristallen wurden Datensätze aufgenommen und die Struktur durch molekularen Ersatz mit der Struktur mit gebundenem Acetat, aufgeklärt. In keiner der Strukturen konnte Elektronendichte im aktiven Zentrum dem Inhibitor zugeordnet werden. Allerdings zeigten weitere Messungen, dass der K_i -Wert dieses Inhibitors im millimolaren Bereich lag und deshalb vermutlich schlecht bindet. Außerdem kann keine Aussage getroffen werden, ob es sich um einen kompetitiven Inhibitor handelt.

4.1.7.2 *Modellierung von potentiellen Inhibitoren*

In der Arbeitsgruppe Apostilakis (München) wurde die Struktur des Holoenzym als Modell herangezogen, um Inhibitoren zu modellieren, welche von ihrer Größe ins aktive Zentrum passen könnten. Dazu wurde die ZINC-Datenbank (Irwin & Shoichet, 2005) nach möglich bindenden Molekülen durchsucht.

10 Substanzen wurden in die engere Auswahl genommen. Vier davon versprachen gute Interaktionen und sollten mit der GatDH kokristallisiert werden. Allerdings war nur eine dieser Substanzen käuflich zu erwerben. K_i -Wert-Messungen der Gruppe Wenz (Universität des Saarlandes) zeigten, dass es sich hierbei aber um einen eher schwach bindenden Inhibitor handelte. Ein Grund für die Abweichung von „*in silico*“- zu „*in vitro*“-Analysen könnte sein, dass die Aminosäuren-Seitenketten in der Substratbindetasche als nicht flexibel in der Simulation behandelt wurden.

4.2 SoxS

Die Oxidoreduktase SoxS aus *Paracoccus pantotrophus* wurde heterolog in dem *E. coli* Stamm M15[pREP4] exprimiert, ohne die N-terminale periplasmatische Signalsequenz, aber mit einem N-terminalen (His)₆-Affinitätsmarker, gefolgt von einer Enterokinase-Schnittstelle. Das Protein wurde über Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit anschließender Gelfiltration aufgereinigt. Der Affinitätsmarker beeinträchtigte die Kristallisation des Proteins nicht und musste daher für diese nicht entfernt werden. Erste Kristallisationsbedingungen wurden mittels Zufalls-Screening gefunden und im Raster-Screen-Verfahren optimiert. Das aufgereinigte Protein sowie die Kristalle wurden mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF analysiert. Es wurde kein proteolytischer Verdau in den aufgelösten Kristallen festgestellt.

Erste Diffraktionsmessungen zeigten einen hohen Verzwilligungs-Faktor der Kristalle zwischen 30 und 40 %, welcher die Prozessierung der Daten und die Strukturlösung erschwerte. Bei der Verzwilligung (*Twinning*) handelt es sich um eine Anomalie im Kristallgitter, in der ein Kristall aus verschiedenen Domänen besteht, die sich in ihrer Orientierung unterscheiden. Der Kristall kann dabei äußerlich intakt sein und ein perfekt aussehender Einkristall sein. Eine Untergruppe ist die merohedrische Verzwilligung, in der die einzelnen Domänen sich in allen drei Dimensionen perfekt überlappen (Yeates *et al.*, 1997). SoxS zeigt merohedrische Verzwilligung mit den Twin-Operatoren -h, -k, l. Mittels Additiv-Screens konnte eine Verbesserung der Packung bzw. die Reduktion des Twinning-Faktors der Kristalle auf unter 12 % erzielt werden.

4.2.1 Lösung des kristallographischen Phasenproblems mit der MAD-Methode

Bei der Röntgenstrukturanalyse kann nur die Intensität der Reflexe direkt gemessen werden, nicht aber deren Phasen. Dieses kristallographische Phasenproblem kann durch verschiedene Methoden indirekt gelöst werden (siehe Kapitel 2.15.3.5). Da für SoxS keine homologe Proteinstruktur mit einer hinreichend hohen Sequenzidentität zur Bildung eines Modells für den molekularen Ersatz vorhanden war, wurde die MAD-Methode mit Selen als anomalen Streuer gewählt. Der Vorteil bei der Inkorporation von Selen während der Proteinexpression (Austausch von Methionin gegen Selenomethionin) ist die vollständige Besetzung der Selenpositionen, anders als bei Schweratom-Diffusions-Experimenten mit Kristallen. Für ein ausreichend hohes anomales Signal sollte das Protein auf 100 Aminosäuren mindestens ein Methionin aufweisen. SoxS besitzt fünf Methionine bei einer Sequenzlänge von 116 Aminosäuren und eignet sich somit sehr gut für diese Methode. Ein SoxS-Derivat wurde mit

durch Selenomethionin substituiertem Methionin exprimiert und entsprechend dem Protokoll für das native SoxS aufgereinigt und kristallisiert. Die Diffraktionseigenschaften verschiedener Kristalle wurden an der Heimquelle getestet. Die Kristalle zeigten ebenfalls einen hohen Twinning-Faktor, wie die Kristalle von nichtsubstituiertem SoxS. Die Kristalle des nativen wie auch des SeMet-substituierten SoxS zeigten keine Unterschiede in Diffraktions-Qualität und Mosaizität, besaßen die gleichen Zellparametern und konnten somit als isomorph betrachtet werden. Mit einem Kristall, welcher einen geringen Verzwillingungs-Faktor von ca. 4 % besaß, wurde am Synchrotron (DESY/EMBL, Hamburg) ein MAD-Datensatz bei vier verschiedenen Wellenlängen aufgenommen und mit den in der automatisierten Strukturlösungs-Pipeline *Auto-Rickshaw* (Panjikar *et al.*, 2005) verknüpften Programm-Routinen die Phasenwerte berechnet.

Die Struktur von SoxS mit Selenomethionin konnte bis zu einer Auflösung von 1,9 Å aufgeklärt und bis zu einem R_{work} -Faktor von 15,4 % und einem R_{free} -Faktor von 20,1 % verfeinert werden. Diese Struktur wurde als Modell verwendet, um durch molekularen Ersatz die Struktur des nativen SoxS zu lösen. Die Struktur von SoxS wurde bei einer Auflösung von 2,1 Å aufgeklärt und konnte bis zu einem R_{work} -Faktor von 17,4 % und einem R_{free} -Faktor von 21,6 % verfeinert werden.

4.2.2 Allgemeine Struktur von SoxS

Bei beiden Strukturen sind die Polypeptidkette und alle Seitenketten in der Elektronendichte-Karte sehr gut definiert, mit Ausnahme des N-terminalen (His)₆-Affinitätsmarker, der Enterokinase-Schnittstelle sowie den letzten 3 Aminosäuren von SoxS. Dieser Bereich ist in vielen Kristallstrukturen zu flexibel, um in der Elektronendichte sichtbar zu sein. In der Elektronendichte des nativen SoxS ist außerdem noch die erste Aminosäure von SoxS nach der Enterokinase-Schnittstelle nicht erkennbar. Die Nummerierung mit 1 beginnt nach der Signalsequenz zur Sekretion ins Periplasma bzw. in dem kristallisierten Konstrukt nach der Enterokinase-Schnittstelle (siehe Abb. 51).

Die Struktur von SoxS aus *P. pantotrophus* besteht aus 4 β -Faltblattsträngen, umgeben von 2 α -Helices (Abb. 48). Dies entspricht dem Kern der typischen Thioredoxin-Faltung, die allen Thioredoxinen aus Prokaryonten und Eukaryonten gemeinsam ist. Diese besteht aus einem N-terminalen $\beta\alpha\beta$ -Motiv sowie einem C-terminalen $\beta\beta\alpha$ -Motiv, welche durch eine α -Helix miteinander verbunden sind (Pan & Bardwell, 2006). SoxS weist diese beiden zentralen Motive ebenfalls auf, allerdings fehlt die verbindende Helix. Diese ist durch einen sehr

großen, mäanderförmigen Loop ersetzt. Das aktive Zentrum von SoxS befindet sich am N-Terminus der ersten α -Helix des N-terminalen $\beta\alpha\beta$ -Motivs.

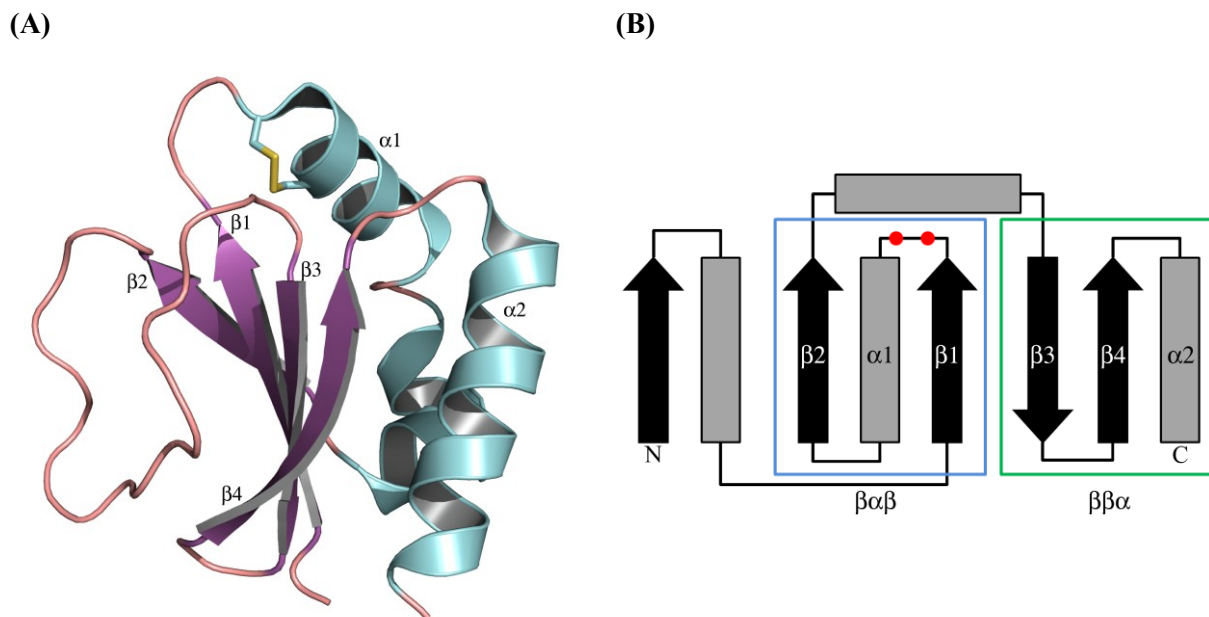
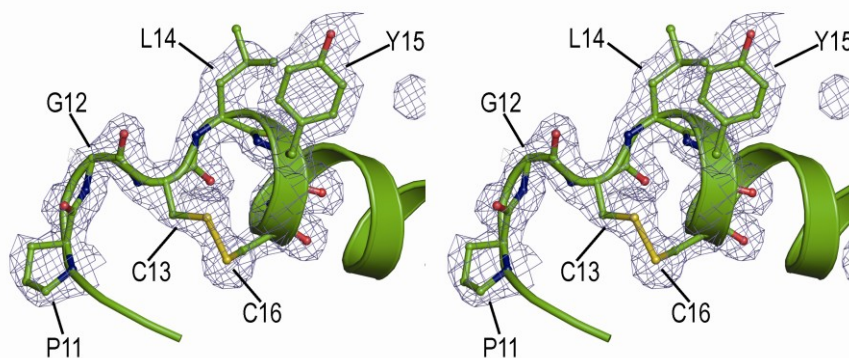


Abb. 48: Allgemeine Struktur von SoxS aus *P. pantotrophus* (A) und schematische Darstellung der Thioredoxin-Faltung (B). SoxS besitzt die beiden Motive $\beta\alpha\beta$ ($\beta 1$, $\alpha 1$, $\beta 2$) und $\beta\beta\alpha$ ($\beta 3$, $\beta 4$, $\alpha 2$). Die zusätzlichen Sekundärstrukturelement am N-Terminus und die verbindende Helix fehlen dagegen. Das aktive Zentrum mit den beiden Cysteinen (im oxidierten Zustand als Stäbchen dargestellt) liegt vor der ersten α -Helix $\alpha 1$ (im Schema als rote Punkte dargestellt).

Vergleicht man beide SoxS-Strukturen (die des nativen Proteins und des SeMet-Derivats), so überlagern beide sehr gut, mit einer RMS-Distanz in den Positionen der C_{α} -Atome von nur 0,2 Å. Auch wurden keine Änderungen in der Konformation der Hauptkette oder Rotamere in den Seitenketten beobachtet. Der signifikanteste Unterschied in der Elektronendichte-Karte wurde für die beiden Cysteine im aktiven Zentrum festgestellt. Die Cysteine im Kristall des nativen SoxS liegen im oxidierten Zustand vor und bilden eine intramolekulare Disulfid-Brücke aus, wo hingegen die Cysteine des SeMet-Derivats überwiegend in der reduzierten Thiol-Form vorliegen (Abb. 49). Eine Erklärung hierzu wäre, dass kurz vor der Kristallisation des Proteins erneut frisches β -Mercaptoethanol zugegeben wurde, um eine Oxidation des Selens in den SeMet-Seitenresten durch den Luftsauerstoff zu vermeiden. Auch wuchsen diese Kristalle schneller und wurden früher in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, so dass noch keine genügende Oxidation des Schwefels in den Cysteinen stattfinden konnte.

(A)



(B)

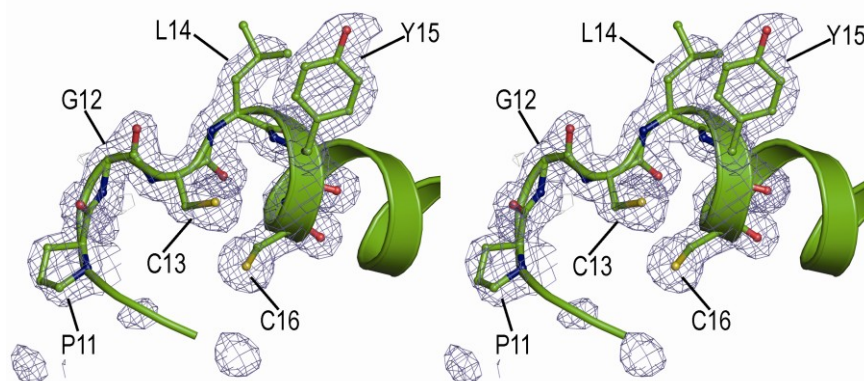


Abb. 49: Stereo-Darstellung des aktiven Zentrums von SoxS mit Elektronendichte-Karte (konturiert bei $1,5 \sigma$).

(A) oxidierte Form von SoxS

(B) reduzierte Form von SeMet-SoxS

Allerdings konnte an den Kristallen des SeMet-SoxS Strahlschäden beobachtet werden. Durch die sehr hohe Intensität der Röntgen-Strahlung an Synchrotron-Strahlquellen der dritten Generation (z.B. ESRF, Grenoble) mit hoher Energie wird dieses Problem bei kristallinen Makromolekülen zunehmend bedeutender und ist häufig eine Ursache für erfolglose Strukturaufklärungsversuche unter Verwendung des anomalen Signals. Einige der Effekte sind zum Beispiel das reduktive Abspalten der Carboxylatgruppe in den Seitenketten von Glutamat und Aspartat sowie das Spalten von Disulfidbrücken. Letztere können sich dabei um bis zu $0,7 \text{ \AA}$ verlängern (Weik *et al.*, 2000, 2002).

In der Struktur des am DESY (Hamburg) gemessenen SeMet-SoxS-Kristalls konnten ebenfalls diese Strahlschäden beobachtet werden. Um den Verlauf und das Ausmaß der Spaltung der Disulfidbrücke zu analysieren, wurden die Datensätze einzeln für die Berechnung von Elektronendichtekarten verwendet und das Modell verfeinert. Dabei zeigt sich, dass der Abstand zwischen den Schwefelatomen in beiden Cysteinen im aktiven

Zentrum, entsprechend der Reihenfolge der gemessenen Datensätze, immer größer wird. Der Abstand verlängert sich dabei insgesamt um 0,7 Å, was dem in der Literatur beschriebenen Wert entspricht (Weik *et al.*, 2002).

peak-Datensatz: 2,6 Å

inflection point-Datensatz: 3,0 Å

high energy remote-Datensatz: 3,1 Å

low energy remote-Datensatz: 3,3 Å

Der an der Heimquelle gemessene SoxS-Kristall weist dagegen keinen Strahlschaden auf. Die Bindungslänge der Disulfidbrücke beträgt 2,1 Å und entspricht damit fast dem Literaturwert von 2,04 Å (Weik *et al.*, 2002). Als Vergleich wurde ein Datensatz eines SeMet-Kristalles prozessiert, welcher nur an der Heimquelle vermessen wurde. Für diesen Kristall betrug die Bindungslänge zwischen den beiden Cysteinen 3,0 Å. Bei einer vollständigen Reduktion müsste der Abstand der beiden Cysteine mehr als 3,1 Å sein. Man kann also davon ausgehen, dass SeMet-SoxS schon teilweise reduziert im Kristall vorliegt, durch den Strahlschaden am Synchrotron aber komplett reduziert wurde. Eine Differenz-Elektronendichte-Karte zwischen beiden Kristallen mit $F_{\text{obs}}(\text{reduziert}) - F_{\text{obs}}(\text{oxidiert})$ zeigt dies deutlich (Abb. 50).

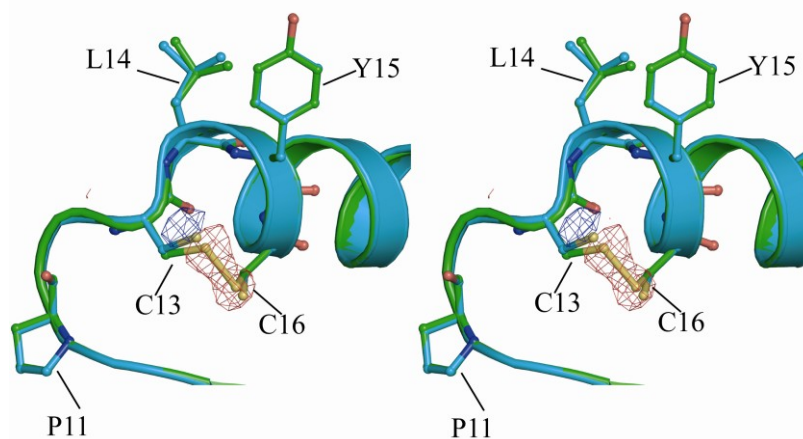


Abb. 50: Differenz-Elektronendichte-Karte von SeMet-SoxS (in cyan) und SoxS (in grün) mit $F_{\text{obs}}(\text{reduziert}) - F_{\text{obs}}(\text{oxidiert})$ und $\alpha_{\text{calc}}(\text{oxidiert})$ berechnet, konturiert bei $5,0 \sigma$ (blau) und $-5,0 \sigma$ (rot). Der gewichtete *R*-Faktor zwischen beiden Datensätzen, berechnet mit dem Programm *SCALEIT* des *CCP4*-Programmpakets (CCP4, 1994), beträgt 11,2 %.

4.2.3 Vergleich mit homologen Strukturen

Die Aminosäuresequenz von SoxS wurde mit allen bekannten Mitgliedern der Thioredoxin- und Glutaredoxinfamilie (329 und 173 Sequenzen), die in der UniProtKB/Swiss-Prot Datenbank (ExPASy, Stand 2008) erfasst sind, verglichen. Es konnte keine eindeutige Verwandtschaft zu diesen Mitgliedern festgestellt werden, außer zu SoxS-Proteinen anderer Organismen. Die nächsten weitläufig verwandten Thioredoxine stammen dagegen aus den Unterfamilien der Disulfid-Oxidoreduktasen DsbC und DsbG, insbesondere hinsichtlich der Sequenz des aktiven Zentrums. Darauf wird später in Kapitel 4.2.4 näher eingegangen.

Ein strukturbasiertes Alignment mit strukturell verwandten Proteinen aus der PDB-Datenbank (Berman *et al.*, 2000) mit dem DALI-Server (Holm & Sander, 1997) identifizierte Thioredoxin-1 (Trx-1) von *E. coli* (Katti *et al.*, 1990) und Thioredoxin-2 (Trx-2) von dem Cyanobakterium *Anabaena spec.* (Saarinen *et al.*, 1995) als die Proteine mit der höchsten strukturellen Homologie (Abb. 51, Tab. 22). Beide Thioredoxine sind cytoplasmatische Proteine, im Gegensatz zu SoxS, welches ins Periplasma sekretiert wird.

Tab. 22: Thioredoxine mit der höchsten strukturellen Homologie zu SoxS

<i>Protein</i>	<i>PDB-Eintrag</i>	<i>Z-Score</i>	<i>r.m.s.d</i>	<i>LALI</i>	<i>% IDE</i>
Thioredoxin-1 (<i>E. coli</i>)	2trx	9,2	1,9	84	14
Thioredoxin-2 (<i>Anabaena spec.</i>)	1thx	9,2	2,2	85	19

Legende:

Z-Score	Z-Score > 2: Homologie vorhanden
r.m.s.d	Standard-Abweichung der vergleichbaren C _α -Atome
LALI	Anzahl der C _α -Atome, die verglichen werden konnten
% IDE	Sequenzidentität

Trotz der geringen Sequenzidentität lassen sich alle drei Strukturen sehr gut übereinanderlegen, wie ein strukturbasiertes Sequenz-Alignment zeigt (Abb. 51). Aufgrund der geringen Sequenzidentität musste das mit dem Programm ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführte Sequenz-Alignment allerdings manuell dem mit dem Programm DaliLite (Holm & Sander, 1996) durchgeführten Alignment der Sekundärstrukturelemente angepasst werden. Die Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Programm DSSP (Kabsch, 1983) ermittelt. Die Konservierung der Faltung ist in einigen verwandten Proteinen häufig besser als die der Sequenz. Dies kann durch eine strukturelle Evolution erklärt werden, bei der Veränderungen in der Aminosäure-Sequenz, die nicht zu einer Veränderung der Faltung

führen und damit die Funktion des Proteins weiterhin gewährleistet ist, toleriert werden können. Als Beispiel kann humanes Hämoglobin und Myoglobin mit einer Sequenzidentität von 27 % genannt werden.

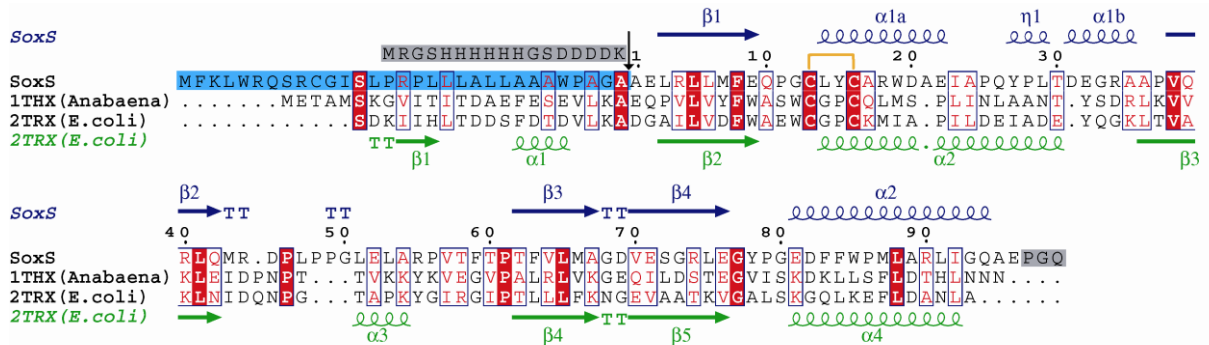


Abb. 51: Sequenzalignment zwischen den Proteinen SoxS aus *P. pantotrophus*, Thioredoxin-2 aus *Anabaena spec.* (PDB-Eintrag 1thx) und Thioredoxin-1 aus *E. coli* (PDB-Eintrag 2trx). Die Signalsequenz von SoxS ist cyan unterlegt. Sie ist in der Kristallstruktur durch den Affinitätsmarker und die Enterokinase-Schnittstelle ersetzt, aber nicht in der Elektronendichte zu erkennen (in grau dargestellt). Der Pfeil (\downarrow) bezeichnet gleichzeitig die Schnittstelle der Enterokinase und der Signalsequenz. Die letzten 3 Aminosäuren, die ebenfalls nicht in der Elektronendichte zu sehen sind, sind grau unterlegt. Die eckige Klammer in Orange kennzeichnet die beiden Cysteine im aktiven Zentrum. Das Bild wurde mit dem Programm *ESPrInt* erstellt.

Die größten Unterschiede zwischen SoxS und den homologen Strukturen liegen am N-Terminus und im Linkerbereich zwischen den beiden zentralen Struktur-Motiven (siehe Abb. 48). SoxS fehlt der erste β -Faltblattstrang und die erste α -Helix, welche nicht zu dem Kernmotiv $\beta\alpha\beta/\beta\beta\alpha$ gehören. Das erste Sekundärstrukturelement von SoxS ist der β -Faltblattstrang $\beta 1$, welcher $\beta 2$ in Trx-1 und Trx-2 entspricht.

Anstelle der verbindenden Helix ($\alpha 3$ in Trx-1 und Trx-2) besitzt SoxS eine große Schleife zwischen den Faltblattsträngen $\beta 2$ und $\beta 3$, welche teilweise in den Raum reicht, der bei Trx-1 und Trx-2 von der Helix $\alpha 1$ besetzt ist. Diese Schleife ist sehr gut durch eine Prolin-reiche Sequenz (Pro-Leu-Pro-Pro, AS 46-49), die ihr eine große Stabilität verleiht sowie durch Packungsinteraktionen mit dem N-Terminus von SoxS strukturiert.

Die Helix $\alpha 1$ von SoxS, an deren Beginn das aktive Zentrum liegt, weist einen Knick auf, wodurch das aktive Zentrum der Umgebung zugänglicher wird. Die Helix $\alpha 1$ ist im Bereich der Aminosäurereste 23-30 unterbrochen, verursacht durch einen konservierten Prolin-Rest (Pro25). Dadurch bildet sich eine π -helikale Windung, welcher die Helix in zwei Teile, $\alpha 1a$

und $\alpha 1b$ unterteilt. Durch die entstandene vergrößerte Oberfläche entlang der Helix ist diese besser zugänglich. Im Gegensatz zu anderen Thioredoxinen liegt in SoxS dieses spezielle Merkmal weiter in Richtung des C-terminalen Teils der Helix, wodurch diese noch mehr aufgeweitet ist. Ein ähnliches Merkmal ist auch bei DsbD γ aus *E. coli* beschrieben (Kim *et al.*, 2003).

4.2.4 Aktives Zentrum und Redox-Zustand von SoxS

Allen Thioredoxinen gemeinsam ist das konservierte Motiv Cys-Xaa-Xaa-Cys im aktiven Zentrum, welches am N-Terminus der ersten Helix im $\beta\alpha\beta$ -Motiv liegt. Die Thiole dieses Motivs können reversibel eine Disulfid-Brücke bilden und sind deshalb an Thiol-Disulfid-bedingten Redox-Reaktionen beteiligt. SoxS weist ein aktives Zentrum auf, welches vor der Helix $\alpha 1$ liegt und kann deshalb, auch aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit in die Familie Thioredoxin_1, zu der Trx-1 aus *E. coli* gehört, eingestuft werden.

Die Aminosäuresequenz im aktiven Zentrum von SoxS ist Gly-¹³Cys-Leu-Tyr-¹⁶Cys-Ala. Sie ist bei keinem Vertreter der Thioredoxin- oder Glutaredoxin-Familie vorhanden. In den meisten Thioredoxinen und Glutaredoxinen befindet sich an der ersten Xaa-Position ein Prolin und an der zweiten Stelle eine aromatische Aminosäure. In SoxS dagegen befindet sich an der ersten Position ein Leucin, gefolgt von einem Tyrosin. Die dem Motiv vorangehende Aminosäure ist auch konserviert und in Thioredoxinen überwiegend ein Tryptophan. In SoxS dagegen ist es ein Glycin, welches eher in der Sequenz des aktiven Zentrums von Glutaredoxinen vorkommt. Damit ist SoxS, die Sequenz des aktiven Zentrums betrachtend, eher verwandt mit Glutaredoxinen (Pro-Gly-Cys-Pro-Tyr-Cys) und Mitgliedern der DsbC- und DsbG-Familie (Pro-Xaa-Cys-Xaa-Tyr-Cys).

Wie in Kapitel 4.2.2 schon beschrieben, liegen die Cysteine im Kristall des nativen SoxS im oxidierten Zustand vor und bilden eine intramolekulare Disulfid-Brücke aus, wo hingegen die Cysteine des SeMet-Derivats in der Thiol-Form vorliegen (Abb. 49). Um eine Disulfid-Brücke zu bilden, bewegen sich die beiden Schwefelatome von Cys13 und Cys16 aufeinander zu, wobei sie in dem Winkel $\chi 1$ um 16° bzw. 10° aufeinander zu rotieren. Zusätzlich wird die Hauptkette vor dem aktiven Zentrum von Pro11 und Gly12 leicht angepasst. Durch das Pro11 geschieht dies aber nur geringfügig, so dass der Loop Gln-Pro-Gly-Cys-Leu sehr starr ist. Zusätzlich wird diese Schleife durch H-Brückenbindungen zwischen Gln10-O und Cys13-N ($d=3,23 \text{ \AA}$), Gly12-O und Leu14-N ($d=3,14 \text{ \AA}$) sowie zwischen Cys13-O und Cys16-N

($d=3,18 \text{ \AA}$) stabilisiert. Auch die Seitengruppen von Leu14 und Tyr15, die dicht gepackt zueinander sind, tragen zu der Stabilität des Loops mit dem aktiven Zentrum bei.

Im reduzierten Zustand ist das Schwefelatom von Cys13 für Moleküle aus dem Lösungsmittel frei zugänglich und kann H-Brücken-Bindungen zu Thr60-O ($d=3,39 \text{ \AA}$), Thr60-OG1 ($d=3,26 \text{ \AA}$), Cys16-N ($d=3,17 \text{ \AA}$) und Cys16-SG ($d=3,36 \text{ \AA}$) eingehen. Die Konformation von Thr60 und damit seine Interaktion mit Cys13 wird außerdem durch eine H-Brücken-Bindung zwischen Thr60-OG1 und Gln10-NE2 ($d=2,89 \text{ \AA}$) stabilisiert. Im oxidierten Zustand werden die stabilisierenden H-Brücken-Bindungen zu Thr60 um $0,2 \text{ \AA}$ verlängert, was aber mit dem mittleren Koordinatenfehler von $0,2 \text{ \AA}$ zwischen den Strukturen relativiert werden muss.

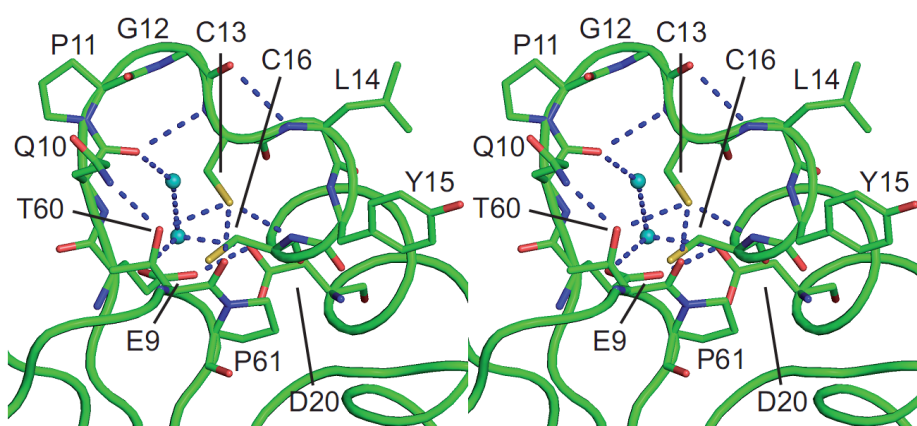


Abb. 52: Netzwerk von H-Brückenbindungen im aktiven Zentrum der reduzierten Form von SoxS in Stereo-Darstellung. Die H-Brückenbindungen (blaue gestrichelte Linien) sind direkt oder über Wasser (als cyan-farbige Kugeln dargestellt) vermittelt.

Zusätzlich trägt das benachbarte Pro61, welches in *cis*-Konformation vorliegt und in allen Thioredoxinen konserviert ist, zu der Stabilität bei. Es schirmt zudem das Cys16 von der Umgebung ab.

In der näheren Umgebung von Cys16-SG gibt es keine polaren Atome außer dem Schwefelatom des Cys13. Daher ist eine Deprotonierung der Sulfhydrylgruppe ohne gleichzeitige Disulfidbrückenbildung des Cys16 mit Cys13 eher unwahrscheinlich.

Ein negatives Ladungspotential wird unterhalb des Cys16 durch Glu9 gebildet, dessen Seitenkette zwei H-Brückenbindungen ausbildet, mit OE2 zu einem Wassermolekül und mit OE1 zu Asp20-OD2. Die negative Ladung beider Carboxyl-Seitenketten wird partiell reduziert über eine H-Brücken-Interaktion von Asp20-OD1 zu Arg40-NE ($d=3,28 \text{ \AA}$) und Arg40-NH2 ($d=2,78 \text{ \AA}$).

Zusätzlich zu diesem Netzwerk aus H-Brücken-Bindungen wird die Konformation der Schleife mit dem aktiven Zentrum durch H-Brücken-Bindungen und einer dichten Packung

zwischen den Seitenketten des voranlaufenden β -Faltblattsstrangs $\beta 1$ und der folgenden α -Helix $\alpha 1$ sowie dem β -Faltblattstrang $\beta 3$ stabilisiert.

Diese Beobachtungen und die nur geringfügigen konformellen Änderung zwischen oxidiertes und reduzierter Form sprechen dafür, dass in SoxS der oxidierte Zustand der bevorzugte ist. Bei SoxS würde dies auf ein hohes Reduktionspotential gegenüber seinem Substrat deuten. Um dies zu belegen, ist noch die quantitative Bestimmung der pK_a -Werte der Cysteine von SoxS und seines Redoxpotentials geplant (Fragestellung der AG Technische Mikrobiologie, Universität Dortmund).

Die großen Unterschiede der Thioredoxine bezüglich ihrer katalysierten Reaktionen in einer Vielfalt von biochemischen Vorgängen werden durch kleine Abweichungen in ihrer Faltung und durch die Aminosäure-Sequenz ihres aktiven Zentrums bestimmt. Die lokale Konzentration an Substratproteinen mit Thiol-Resten oder Disulfidbrücken bestimmt zusammen mit dem Redoxpotential der Thioredoxine, ob eine Reaktion oxidativ oder reduktiv abläuft (Zapun *et al.*, 1993; Aslund *et al.*, 1997; Huber-Wunderlich & Glockshuber, 1998). Der erste Cystein-Rest des aktiven Zentrums in Thioredoxinen hat einen verringerten pK_a -Wert. Er wird vermutlich durch die Art der Aminosäurereste zwischen den beiden Cysteinen im CXXC-Motiv beeinflusst (Dyson *et al.*, 1997; Mossner *et al.*, 1998).

Verschiedene strukturelle Eigenschaften, die zur Stabilisierung des favorisierten Oxidationszustandes eines Thioredoxins beitragen, werden in der Literatur diskutiert. Eine ist die Stabilisierung des reduzierten Zustands, mit einem Thiolat-Anion des ersten Cysteins, durch die Dipol-Ladung der nachfolgenden α -Helix (Kallis & Holmgren, 1980, Gleason *et al.*, 1990; Foloppe & Nilsson, 2004). Dies wird weiterhin durch die Art der die Cysteine des aktiven Zentrums flankierenden Aminosäuren unterstützt, die die Ausbildung eines charakteristischen Netzwerks aus H-Brückenbindungen ermöglichen (Foloppe & Nilsson, 2004). Ein weiterer Einfluss kommt von der Schleife mit dem aktiven Zentrum, die durch H-Brückenbindungen stabilisiert ist. Die Bildung einer Disulfid-Brücke wird durch die mehr oder weniger dichte Packung zwischen dem vorangehenden β -Faltblattstrang und der folgenden α -Helix favorisiert (Goulding *et al.*, 2004; Guddat *et al.*, 1998).

4.2.5 Substrat-Bindung

Thioredoxine sind eher unspezifisch bezüglich ihrer Substrat-Proteine, führen aber eine spezifische Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase-Reaktion durch. Ausnahmen sind Mitglieder der Dsb-Untergruppe, die an der Reifung von Cytochrom *c* im Periplasma beteiligt sind. Sie besitzen die klassische Thioredoxin-Faltung, haben aber Insertionen oder Extensionen, was eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von Substrat-Proteinen spielt. Dies konnte in DsbE (CcmG) und TlpA von *Bradyrhizobium japonicum* und ResA von *Bacillus subtilis* beobachtet werden (Edeling *et al.*, 2002; Capitani *et al.*, 2001; Colbert *et al.*, 2006).

SoxS dagegen besitzt keine Insertionen oder Extensionen, trotzdem kann, basierend auf strukturellen Merkmalen von anderen Thioredoxin-ähnlichen Proteinen, eine potentielle Substrat-Bindestelle auf der Oberfläche des SoxS beschrieben werden. Als Grundlage dienen die Strukturen von Glutaredoxin mit gebundenem Glutathion (Bushweller *et al.*, 1994) sowie die des humanen Thioredoxin in Komplex mit Peptiden des zellulären Transkriptionsfaktor NFκB, für dessen Aktivierung es verantwortlich ist (Qin *et al.*, 1995; Qin *et al.*, 1996).

Eine Darstellung der Oberflächen und ihrer Ladung von SoxS zeigt, dass die Seitenketten Gln10, Pro11, Gly12, Cys13, Tyr15, Phe59, Thr60, Pro61, Gly77, Tyr78, Pro79, Phe83 und Met87 eine flache Furche auf beiden Seiten des aktiven Zentrums bilden (Abb. 53). Das hoch konservierte *cis*-Pro61 wird häufig als wichtiger Faktor bei der Substratbindung diskutiert. Seine *cis*-Konformation exponiert in der Hauptkette das Sauerstoff-Atom der voranstehenden Aminosäure auf der Oberfläche, welches damit als potentieller Interaktionspartner von Substrat-Proteinen oder Peptiden besser zugänglicher wird (Qin *et al.*, 1995).

In direkter Nachbarschaft zu diesem Prolin und dem Cys13 bilden die beiden Seitenketten von Tyr15 (im CXXC-Motiv) und Phe59 eine hydrophobe Klammer. Diese könnte als Selektivitäts-Filter für Peptide mit kleinen Seitenketten, wie Glycin, dienen. Ein ähnliches Merkmal wurde bei dem humanen Glutaredoxin-2 beschrieben. Wie Abb. 54 zeigt, ist hier das Glutathion zwischen dem Tyrosin des aktiven Zentrums und einem Threonin, anstelle des Phe59 von SoxS, gebunden (PDB-Eintrag 2fls). Ein potentieller Interaktionspartner könnte daher der C-Terminus von SoxY mit dem Motiv -Gly-Gly-Cys-Gly-Gly-COOH sein, welches in seiner Struktur dem Glutathion sehr ähnlich ist.

Das zu Tyr15 benachbarte Leu14 in SoxS scheint dagegen keine Rolle bei der Substratbindung zu spielen, sondern eher durch die dichte Packung dessen Orientierung zu stabilisieren.

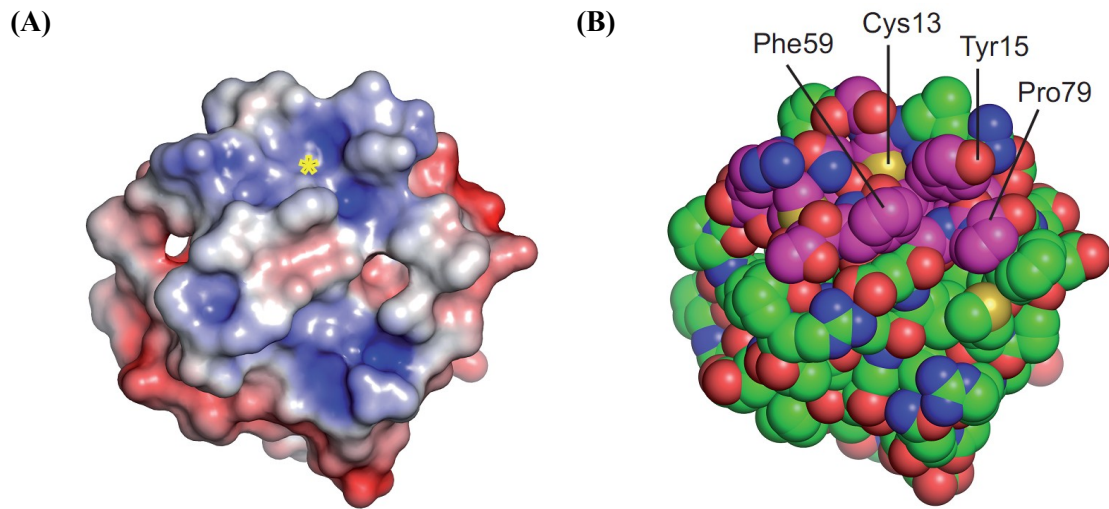


Abb. 53: Oberflächen-Darstellung von SoxS

- (A) Oberflächenladung. Das gelbe Sternchen zeigt die Position des redox-aktiven Cys13 an. Die molekulare Oberfläche wurde entsprechend dem elektrostatischen Potential, berechnet mit dem Programm *APBS* (Baker *et al.*, 2001), eingefärbt. Ein negatives Potential ist rot, ein positives Potential blau dargestellt. Das gelbe Sternchen kennzeichnet die Lage des redox-aktiven Cys13 im aktiven Zentrum
- (B) Kalottenmodell der Oberfläche von SoxS mit der Substrat-Bindungstasche. Die Kohlenstoff-Atome sind grün, Stickstoff-Atome blau, Sauerstoff-Atome rot und Schwefel-Atome gelb dargestellt. Für das Substrat-Bindungsepitop sind die Kohlenstoff-Atome magenta eingezeichnet und die wichtigsten Aminosäuren beschriftet.

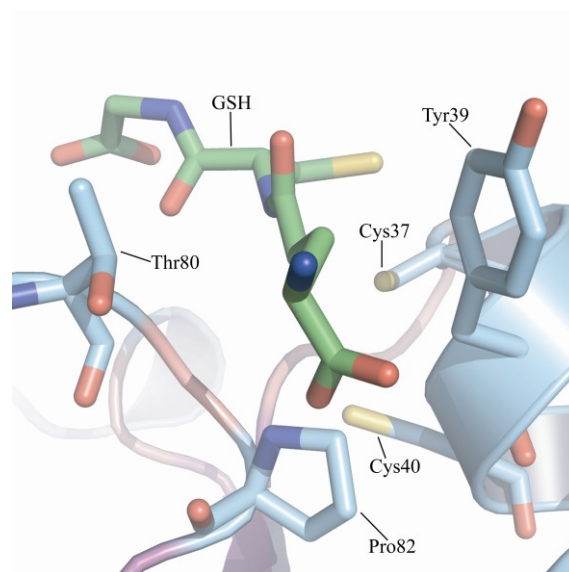


Abb. 54: Struktur des humanen Glutaredoxins mit gebundenem Glutathion (GSH) (PDB-Eintrag 2fls). Das Substrat liegt in einer Klammer zwischen Tyr39 und Thr80.

Wie Sequenzvergleiche zeigen, ist SoxS mit Mitgliedern der periplasmatischen DsbC- und DsbG-Familie, vor allem bezüglich der Pro-Xaa-Cys-Xaa-Tyr-Cys-Sequenz im aktiven Zentrum, am engsten verwandt.

Deren physiologische Funktion ist vorwiegend die Reduktion von Disulfid-Brücken, wie auch bei den Glutaredoxinen die Deglutathionierung. DsbC und DsbG sind für das Aufbrechen von Disulfidbrücken oder die Isomerisierung von falsch gefalteten Disulfidbrücken verantwortlich. Dieser Reaktionstyp kann auch auf das periplasmatische SoxS übertragen werden, dessen Substrat vermutlich der C-Terminus von SoxY des SoxYZ-Komplexes ist.

Das aktive Zentrum von SoxY ist der Cystein-Rest (Cys110) am C-Terminus (Quentmeier & Friedrich, 2001). Er liegt in dem konservierten Motiv Gly-Gly-¹¹⁰Cys-Gly-Gly-COOH. SoxYZ gehört zu den essentiellen Proteinen im Sox-Zyklus. Das dimere Hämenzym SoxXA überträgt das Substrat, eine Schwefelverbindung, auf das freie Thiol von SoxY. Das kovalent verknüpfte Substrat wird durch den Sox-Zyklus geschleust, indem SoxYZ als Carrier fungiert. SoxYZ wird am Ende des Zyklus regeneriert und kann neues Substrat für einen neuen Zyklus-Durchlauf binden.

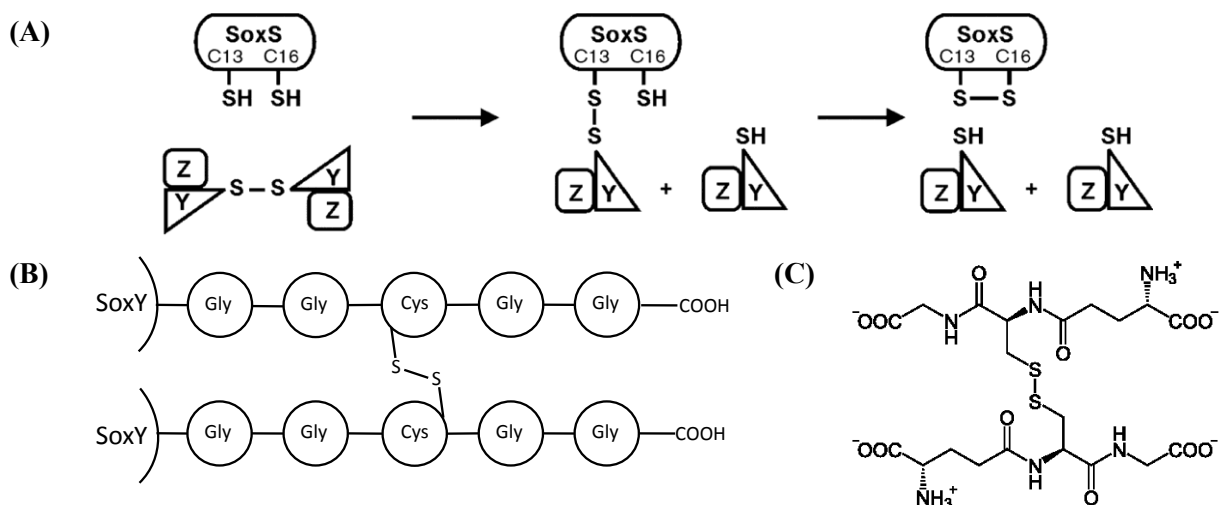


Abb. 55: Modell des postulierten Reaktionsmechanismus von SoxS.

- (A) SoxS reduziert vermutlich die intermolekulare Disulfidbrücke in dem inaktiven Sox(YZ)₂-Heterotetramer unter Bildung zweier aktiver SoxYZ-Heterodimere (entnommen aus Rother *et al.*, 2008).
- (B) Modell der quervernetzten C-Termini zweier SoxY-Moleküle
- (C) Modell eines oxidierten Glutathion (GSSG)

Es wurde festgestellt, dass das Thiol von Cys110 unspezifisch eine Disulfidbrücke mit einem zweiten SoxY-Molekül unter Bildung eines über Cys110 verknüpften Heterotetramers

eingehen kann, wodurch das SoxYZ-Protein inaktiviert wird (Quentmeier *et al.*, 2008; Rother *et al.*, 2008). SoxS reduziert vermutlich diese intermolekulare Disulfidbrücke und aktiviert damit SoxYZ wieder (Abb. 55, A). Das kreuzvernetzte Motiv hat Ähnlichkeit mit einem oxidierten Glutathion (GSSG) (Abb. 55, B und C).

Allerdings kann der Reaktionsmechanismus von Glutaredoxinen nicht direkt auf den von SoxS übertragen werden, da diese nicht mit dem Substrat-Protein, sondern nur mit dem GSH-Rest interagieren (Foloppe & Nilsson, 2004). Auch werden sie im Cytoplasma durch reduziertes Glutathion in ihrem reduzierten Zustand gehalten und sind strukturell nur sehr entfernt mit Thioredoxinen verwandt. Allerdings konnte für einige Glutaredoxine gezeigt werden, dass sie auch intramolekulare Disulfidbrücken mit einem vergleichbaren Mechanismus wie Thioredoxine reduzieren können (Berndt *et al.*, 2008). Die Mehrzahl der Glutaredoxine reduzieren oxidierte Cysteinyl-Gruppen über ein Cystein-Glutathion-Intermediat. In dieser Deglutathionylierungs-Reaktion wird nur das N-terminale Cystein in dem aktiven Zentrum genutzt. Würde man diesen Reaktionsmechanismus auf den des SoxS-SoxYZ-Systems übertragen, würde SoxS aus einem (SoxYZ)₂-Tetramer ein aktiviertes SoxYZ-Heterodimer erzeugen und das zweite SoxYZ würde kovalent mit SoxS verbunden bleiben. Dieses zweite SoxYZ-Heterodimer würde dann durch einen nukleophilen Angriff von Cys16 auf das C-terminale Cys110 abgespalten werden, wie bei klassischen Thioredoxinen beschrieben.

Weitere Analysen und Mutationsstudien sind notwendig, um gebundene Substrate von SoxS zu verifizieren und damit den genauen Reaktions-Mechanismus von SoxS aufzuklären zu können. Ein Ansatz hierfür ist das Mutieren des C-terminalen Cysteins zu Alanin. Bei einer Reduktion von Disulfid-Brücken greift zuerst das N-terminale Cystein an und bildet mit einem Cystein des Substrat-Proteins eine gemischte Disulfidbrücke. Ist das C-terminale Cystein dagegen ausgeschaltet, so bleibt das Substrat kovalent an dem N-terminalen Cystein gebunden. Es wurde bereits ein Peptid hergestellt, welches der Aminosäure-Sequenz des konservierten C-Terminus von SoxY entspricht. Könnte dieses Peptid mit SoxS (Wildtyp) und der Mutante SoxS_C16A kokristallisiert werden und die Röntgenkristall-Struktur aufgeklärt werden, wäre dies ein guter Hinweis dafür, das SoxS spezifisch inaktive SoxYZ-Heterotetramere wieder zu aktiven Heterodimeren reduzieren kann.

Diese biochemischen Beweise zusammenfassend muss man SoxS eher als Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase beschreiben, die Eigenschaften von Mitgliedern verschiedener Thioredoxin-Unterfamilien vereint.

5 Zusammenfassung

5.1 Galaktitol-Dehydrogenase

Die Nachfrage nach optisch reinen Substanzen als Ausgangsverbindungen für die Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie, als Pharmazeutika und Feinchemikalien steigt stetig an. Dehydrogenasen sind in diesem Zusammenhang von großem Interesse, da sie ein großes Substratspektrum abdecken und als chirale Katalysatoren nur ein Enantiomer herstellen können (Hummel *et al.*, 1997).

Die in die Familie der *Short-chain*-Dehydrogenasen/Reduktasen gehörende Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH) aus dem Purpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides* ist in der Lage, ein breites Spektrum an Substraten verschiedener Polyole, Zuckeralkohole, Diole und sekundärer Alkohole in Oxidationsreaktion als auch verschiedenste Karbonyl-Komponenten in der Reduktionsreaktion enantioselektiv umzusetzen (Kohring *et al.*, 2003).

Eine besonders wichtige Reaktion ist die Oxidation von Galaktitol zu dem seltenen Zucker L-Tagatose, der als Zuckerersatzstoff, z.B. in diabetischen Nahrungsmitteln Verwendung findet (Schneider *et al.*, 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte GatDH rekombinant in *E. coli* BL21(DE3) produziert, über Affinitätschromatographie aufgereinigt und in Gegenwart seines Kofaktors NAD⁺ kristallisiert werden. Eine erste Struktur von GatDH konnte mit einer Auflösung von 1,25 Å durch molekularen Ersatz gelöst werden. Als Modell wurde die Gluconat-5-Dehydrogenase aus *Thermotoga maritima* verwendet.

GatDH zeigt die in der Familie der SDR-Enzyme weit verbreitete Rossmann-Faltung mit einem alternierenden α/β -Motiv (Ghosh *et al.*, 1995). Ein β -Faltblatt, aus sieben Strängen bestehend, ist auf jeder Seite von drei α -Helices umgeben. Der Kofaktor bindet in einer tiefen Tasche an dem konservierten Nukleotid-Bindemotiv GXXXGXXG.

Durch Lichtstreuungs-Experimente (*Multiple Angle Light Scattering*, MALLS) konnten frühere Aussagen verifiziert werden, dass die GatDH als Tetramer vorliegt. Dies konnte auch mit der Kristallstruktur belegt werden, in der über große Interaktionsflächen die Protomere zusammengehalten werden und ein Tetramer aus zwei Dimeren bilden. Zusätzlich konnten zwei Mg²⁺-Bindestellen lokalisiert werden. Sie befinden sich auf einer zweizähligen Drehachse zwischen den C-Termini der Protomere. In früheren Untersuchungen wurde beschrieben, dass die Aktivität der GatDH von zweiwertigen Metall-Ionen abhängig ist (Schneider *et al.*, 1995). Durch Kristallisation und weitere biochemische Charakterisierung einer um drei Aminosäuren am C-Terminus verkürzten Variante von GatDH sollte dieser

Zusammenhang untersucht werden. Diese Variante erwies sich als instabil, was auf einen großen Einfluss des C-Terminus auf die Tertiärstruktur des Proteins hindeutet. In wieweit dies auf fehlende Packungseffekte der letzten Aminosäuren am C-Terminus zurückzuführen ist, ist noch unklar. Die Mg^{2+} -Koordination scheint hierbei weniger eine Rolle zu spielen, da in den MALLS-Experimenten die GatDH sowohl mit als auch ohne Mg^{2+} -Ionen als Tetramer vorliegt. Weitere Varianten für den C-terminalen Bereich sind in Arbeit und müssen noch charakterisiert werden.

Um weitere Bindungsstellen für zweiwertige Metall-Ionen in der GatDH zu finden, wurde das anomale Streuverhalten von Kobalt genutzt und Mg^{2+} in den Kristallisationsansätzen durch Co^{2+} ersetzt. Außer der bereits beschriebenen Bindestelle am C-Terminus konnten aber keine weiteren Stellen lokalisiert werden.

Um die Substratbindung und -spezifität der GatDH besser verstehen zu können, wurden Kristalle der GatDH mit Substraten getränkt oder das Protein mit diesen kokristallisiert. Drei verschiedene Strukturen, mit den gebundenen Substraten Xylitol, *meso*-Erythritol und 1,2-Pentandiol im aktiven Zentrum, konnten ebenfalls gelöst werden. Die Übereinanderlagerung aller Strukturen zeigt, dass die GatDH ein sehr starres Protein ist, mit Ausnahme der Substrat-Bindungsschleife. Sie liegt an der Oberfläche des Moleküls und kann sich dem Substrat anpassen. Die Positionen der Aminosäure-Seitenketten im aktiven Zentrum dagegen ändern sich kaum. Dies könnte eine Erklärung für das breite Substratspektrum der GatDH sein.

Der vorgeschlagene Reaktionsweg für die GatDH entspricht der für die meisten SDR-Enzyme postulierten Katalyse, bei der in einem Protonen-Relay-System Protonen übertragen werden. Involviert sind dabei der Ribose-Ring des Kofaktors und die vier konservierten Aminosäuren Asn116, Ser144, Tyr159 und Lys163, die die sogenannte katalytische Tetrade bilden (Filling *et al.*, 2002).

Diese Einblicke in die Struktur der GatDH und dem Reaktionsmechanismus sollten gezielte Modifikationen des Proteins zur Erweiterung der Substratspezifität und die Steigerung der biokatalytischen Aktivität ermöglichen.

5.2 SoxS

Das gram-negative Bakterium *Paracoccus pantotrophus* ist in der Lage, unter aeroben und chemolithotrophen Bedingungen reduzierte Schwefelverbindungen als Elektronenquelle zur Energiegewinnung zu nutzen. Dies wird durch das im Periplasma lokalisierte Schwefel-oxidierende Enzym-System (Sox-System) bedingt, welches von einer Genregion, bestehend aus einem Cluster von 15 Genen, kodiert wird. Die zentralen Komponenten des Zyklus stellen die sieben essentiellen Proteine SoxYZ, SoxXA, Sox(CD)₂ und SoxB dar. Darüber hinaus kodieren weitere Gene für diverse Thioredoxine und Transkriptionsfaktoren, die die Aktivität der zentralen Komponenten beeinflussen bzw. regulieren können (Friedrich *et al.*, 2001). Für den Zyklus wichtig scheint das periplasmatische Thioredoxin SoxS zu sein (Rother *et al.*, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte SoxS rekombinant in *E. coli* M15[pREP4] produziert, über verschiedene Chromatographie-Systeme aufgereinigt und anschließend kristallisiert werden. Die Struktur wurde durch die MAD-Methode (*multiple anomalous dispersion*) mit Hilfe des anomalen Signals von Selen gelöst. Dazu wurde ein Derivat von SoxS, in dem Methionin durch Selenomethionin ersetzt wurde, exprimiert, aufgereinigt und kristallisiert.

SoxS zeigt das Kernmotiv der Thioredoxin-Faltung, bei der vier β -Faltblatt-Stränge von zwei α -Helices umgeben sind. Während SoxS den oxidierten Zustand mit einer Disulfidbrücke im aktiven Zentrum zeigt, konnte das Selenomethionin-Derivat in einem überwiegend reduzierten Zustand kristallisiert werden.

Die Aminosäure-Sequenz Pro-Gly-Cys-Leu-Tyr-Cys mit den beiden Cysteinen im aktiven Zentrum von SoxS ist bei keinem Vertreter der Thioredoxin- oder Glutaredoxin-Familie vorhanden und kann daher nicht direkt verglichen werden. Sie ist dagegen eng verwandt mit dem Sequenz-Motiv in einigen Glutaredoxinen (Pro-Gly-Cys-Pro-Tyr-Cys) und Mitgliedern der DsbC-Familie (Pro-Xaa-Cys-Xaa-Tyr-Cys).

Glutaredoxine können zwei Arten von Reaktionen katalysieren. Die Dithiol-Reaktion verläuft dabei gleich der bei Thioredoxinen. Bei der Monothiol-Reaktion dagegen reagieren sie spezifisch nur mit dem Glutathion-Rest von glutathionylierten Proteinen, nicht mit dem Ziel-Protein selbst (Foloppe & Nilsson, 2004). Die Disulfid-Oxidoreduktasen DsbC und DsbG sind an der Isomerisierung falsch gebildeter Disulfidbrücken von Proteinen im Periplasma beteiligt (Goulding *et al.*, 2002).

Thioredoxine sind eher Substrat-unspezifisch. SoxS dagegen scheint vermutlich Substrat-spezifisch für SoxY zu sein, das als Heterodimer-Komplex mit SoxZ eines der essentiellen

Proteine des Sox-Zyklus ist. SoxY besitzt ein freies Cystein, an welches das Schwefel-Substrat während des Durchlaufens des Zyklus gebunden bleibt. Es konnte aber gezeigt werden, dass SoxYZ auch als inaktives Heterotetramer Sox(YZ)₂ vorliegen kann, indem zwei SoxY-Moleküle miteinander eine intermolekulare Disulfidbrücke bilden (Rother *et al.*, 2008). SoxS kann spezifisch diese Disulfidbrücke spalten und damit SoxYZ reaktivieren. Das aktive Zentrum von SoxY mit dem freien Cystein liegt sehr exponiert an dessen C-Terminus (Gly-Gly-Cys-Gly-Gly-COOH) und hat in seinem inaktiven Zustand eine große Ähnlichkeit mit oxidiertem Glutathion (GSSG).

SoxS kann damit als periplasmatische Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase bezeichnet werden, welche strukturell gesehen eine hohe Homologie zu cytoplasmatischen bakteriellen Thioredoxinen hat, von seiner Funktion her aber ein Chimär aus Thioredoxin, Glutaredoxin und Disulfid-Oxidoreduktase der DsbC/DsbG-Familie darstellt.

Weitere Analysen und Mutationsstudien sind jedoch notwendig, um gebundene Substrate von SoxS zu verifizieren sowie den genauen Reaktionsmechanismus von SoxS aufzuklären.

6 Conclusion

6.1 Galactitol-Dehydrogenase

The demand for optical pure compounds as building blocks for the food and cosmetics industries as well as for pharmaceuticals and fine chemicals is constantly increasing. In this regard, dehydrogenases covering a wide substrate spectrum and producing only one enantiomer as chiral catalysts are of great interest (Hummel *et al.*, 1997).

The galactitol-dehydrogenase (GatDH) from the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* is able to enantioselectively oxidize a wide substrate spectrum including polyols, sugar alcohols, diols and secondary alcohols on the one hand and to reduce different carbonyl-compounds on the other hand (Kohring *et al.*, 2003). One important reaction is the oxidation of galactitol to the rare sugar L-tagatose, which is utilized as a sugar-substitute e.g. in diabetic diets (Schneider *et al.*, 1995).

In this work, GatDH was recombinantly produced in the *E. coli* strain BL21(DE3), purified via affinity chromatography and crystallized with its cofactor NAD⁺. A first structure of GatDH was solved via molecular replacement to 1.25 Å resolution. As a model, the gluconat-5-dehydrogenase from *Thermotoga maritima* was used.

GatDH displays the Rossmann fold with an alternating α/β -motif widely common in the family of SDR-enzymes (Ghosh *et al.*, 1995). One β -sheet consisting of seven strands is surrounded by three α -helices on every side. The cofactor binds in a deep cleft at the conserved nucleotide-binding motif GXXXGXXG.

With multiple angle light scattering (MALLS) it could be verified that GatDH forms a stable tetramer as former experiments have already indicated. Furthermore, based on the crystal structure it could be shown that the tetramer consists of a dimer of dimers with two extensive interaction interfaces.

Former investigations described the dependency of the catalyzed reaction of GatDH on the presence of divalent metal ions (Schneider *et al.*, 1995). Within the crystal structure two Mg²⁺-binding sites could be identified, which are located on a two-fold axis within the tetramer. The individual sites are formed by two opposing C-termini of two protomers.

In a first step, the influence of the Mg²⁺-binding on the stability, activity and tetramer formation was analyzed by the production of a C-terminal truncated variant of GatDH. However, this variant turned out to be instable indicating a high influence of the C-terminus on the tertiary structure of the protein.

Currently, it is not clear how far the last amino acids at the C-terminus are involved in packing effects. The Mg^{2+} -coordination seems to be irrelevant, since GatDH is a tetramer with and without Mg^{2+} -ions as proven by the light scattering experiments. Further GatDH-variants with differently mutated C-terminus are in work and need to be characterized.

To locate further binding sites for metal ions within GatDH, Mg^{2+} was substituted for Co^{2+} in the crystallisation setups and the anomalous X-ray diffraction signal of cobalt was analyzed. No further binding sites could be identified except those described for Mg^{2+} at the C-termini.

For a better understanding of the reaction mechanism of GatDH, the crystals were soaked with or the protein was cocrystallized in the presence of substrates.

Three different structures with bound substrates xylitol, *meso*-erythritol und 1,2-pentandiol in the active site could be solved. An alignment of all structures shows, that GatDH is a very rigid protein, except for the substrate binding loop. This structural feature is located at the surface of the molecule and adjusts to the substrate. In contrast, the positions of the amino acid residues within the active site do not significantly change. The proposed reaction pathway of GatDH corresponds to the catalysis postulated for the most SDR enzymes, in which protons are transferred in a proton-relay system. The ribose ring of the cofactor and the four conserved amino acids Asn116, Ser144, Tyr159 and Lys163 build the so-called catalytic tetrad (Filling *et al.*, 2002). The extended and flexible substrate binding pocket could be an explanation for the wide substrate spectrum and the rigidity of the catalytic tetrad for the enantioselectivity of GatDH.

These insights into the structure of GatDH and its reaction mechanism should allow directed protein modification for optimisation of the substrate specificity and the enhancement of the biological activity.

6.2 SoxS

The gram-negative bacterium *Paracoccus pantotrophus* is able to grow with reduced sulphur-compounds under aerobic and chemolithotrophic conditions, using them as energy sources. This phenotype is determined through the sulphur-oxidizing enzyme system (Sox), located in the periplasmic space and encoded through a cluster of 15 genes. The central components of the cycle are the seven essential proteins SoxYZ, SoxXA, Sox(CD)₂ and SoxB. Additionally, other genes code for different thioredoxins and transcription factors regulating the activity of the central proteins (Friedrich *et al.*, 2001). One periplasmic thioredoxin, SoxS is beneficial for the sulphur-oxidizing phenotype and essential under aerobic conditions (Rother *et al.*, 2008).

In this work, SoxS was recombinantly produced in the *E. coli* strain M15[pREP4], purified via different chromatography systems and crystallized. The structure was solved via the multiple anomalous dispersion (MAD) method. Using the anomalous signal of selenium, a derivative of SoxS in which methionine was substituted for selenomethionine was expressed, purified and crystallized.

SoxS displays the core motif of the thioredoxin fold consisting of four β -strands surrounded by two α -helices. While SoxS shows the oxidized form with a disulfide bridge in the active site, the selenomethionine derivative was crystallized in its mostly reduced form.

By contrast, SoxS contains the active site sequence Pro-Gly-Cys-Leu-Tyr-Cys not present in other thioredoxins. Interestingly, this motif is closely related to the sequence of some glutaredoxins (Pro-Gly-Cys-Pro-Tyr-Cys) and to the sequences of some members of the thiol-disulfide oxidoreductases DsbC and DsbG (Pro-Xaa-Cys-Xaa-Tyr-Cys).

Glutaredoxins catalyze two kinds of reactions. The dithiol-reaction is similar to the one in thioredoxins. In the monothiol-reaction, the glutaredoxins only interact with the GSH moiety and not the target-protein (Foloppe & Nilsson, 2004). The disulfide oxidoreductases DsbC und DsbG are involved in the isomerisation of mismatched disulfide bridges (Goulding *et al.*, 2002).

In general, thioredoxins are substrate-unspecific. In contrast, SoxS seems to be substrate-specific for SoxY of the heterodimeric complex SoxYZ, which is an essential complex of the Sox cycle. SoxY exhibits one accessible cysteine-residue carrying the sulphur substrate during the cycle. However, SoxYZ can also build an intermolecular disulfide bridge between two SoxY proteins resulting in a catalytically inactive Sox(YZ)₂ heterotetramer. SoxS is proposed to specifically reduce this interprotein disulfide bridge between the two SoxY

proteins within the tetramer, thus reactivating SoxYZ (Rother *et al.*, 2008). The active site of SoxY with the free cysteine is exposed on its C-terminus (Gly-Gly-Cys-Gly-Gly-COOH) and the disulfide cross-linked C-terminal peptides share structural similarities with oxidized glutathione (GSSG).

Therefore, SoxS is characterized as periplasmic thiol-disulfide oxidoreductase with structural homology to cytoplasmic bacterial thioredoxins, but functionally resembles a chimera formed out of thioredoxins, glutaredoxins and disulfide oxidoreductases of the DsbC/DsbG-family with specificity towards an interprotein disulfide bond sharing similarities with oxidized glutathione. Further analyses and mutational studies are necessary to verify bound substrates of SoxS and to resolve the detailed reaction mechanism.

7 Literaturverzeichnis

- Aslund, F., Berndt, K. D. & Holmgren, A. (1997) Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J Biol Chem*, **272**(49), 30780-6.
- Bader, M. W., Hiniker, A., Regeimbal, J., Goldstone, D., Haebel, P. W., Riemer, J., Metcalf, P. & Bardwell, J. C. (2001) Turning a disulfide isomerase into an oxidase: DsbC mutants that imitate DsbA. *Embo J*, **20**(7), 1555-62.
- Baik, S. H., Michel, F., Aghajari, N., Haser, R. & Harayama, S. (2005) Cooperative effect of two surface amino acid mutations (Q252L and E170K) in glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IWG3 on stabilization of its oligomeric state. *Appl Environ Microbiol*, **71**(6), 3285-93.
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(18), 10037-41.
- Bardischewsky, F., Fischer, J., Holler, B. & Friedrich, C. G. (2006) SoxV transfers electrons to the periplasm of *Paracoccus pantotrophus* - an essential reaction for chemotrophic sulfur oxidation. *Microbiology*, **152**(Pt 2), 465-72.
- Bardischewsky, F., Quentmeier, A., Rother, D., Hellwig, P., Kostka, S. & Friedrich, C. G. (2005) Sulfur dehydrogenase of *Paracoccus pantotrophus*: the heme-2 domain of the molybdoprotein cytochrome *c* complex is dispensable for catalytic activity. *Biochemistry*, **44**(18), 7024-34.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, **28**(1), 235-42.
- Berndt, C., Lillig, C. H. & Holmgren, A. (2008) Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim Biophys Acta*, **1783**(4), 641-50.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**(6), 1513-23.
- Blaschke, G., Kraft, H. P., Fickentscher, K. & Kohler, F. (1979) [Chromatographic separation of racemic thalidomide and teratogenic activity of its enantiomers (author's transl)]. *Arzneimittelforschung*, **29**(10), 1640-2.
- Blundell, T. L. & Johnson, L. N. (1976) X-ray crystallography.
- Borchard-Ott W. (1997) Kristallographie - Eine Einführung für Naturwissenschaftler. 5th Edition. Edition Springer, Berlin; Heidelberg.

- Bottoms, C. A., Smith, P. E. & Tanner, J. J. (2002) A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domains. *Protein Sci*, **11**(9), 2125-37.
- Bourenkov, G. P. & Popov, A. N. (2006) A quantitative approach to data-collection strategies. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **62**(Pt 1), 58-64.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Brennan, S. & Cowan, P.L. (1992) A suite of programs for calculating x-ray absorption, reflection and diffraction performance for a variety of materials at arbitrary wavelengths. *Rev. Sci. Instrum.*, **63**, 850.
- Brünger, A. T. (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, **355**(6359), 472-5.
- Burnette, W. N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, **112**(2), 195-203.
- Bushweller, J. H., Billeter, M., Holmgren, A. & Wuthrich, K. (1994) The nuclear magnetic resonance solution structure of the mixed disulfide between *Escherichia coli* glutaredoxin(C14S) and glutathione. *J Mol Biol*, **235**(5), 1585-97.
- Capitani, G., Rossmann, R., Sargent, D. F., Grutter, M. G., Richmond, T. J. & Hennecke, H. (2001) Structure of the soluble domain of a membrane-anchored thioredoxin-like protein from *Bradyrhizobium japonicum* reveals unusual properties. *J Mol Biol*, **311**(5), 1037-48.
- Christian, H. (2009) Biophysikalische Charakterisierung der Galactitol-Dehydrogenase von *Rhodobacter sphaeroides*. *Diplomarbeit*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Colbert, C. L., Wu, Q., Erbel, P. J., Gardner, K. H. & Deisenhofer, J. (2006) Mechanism of substrate specificity in *Bacillus subtilis* ResA, a thioredoxin-like protein involved in cytochrome c maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(12), 4410-5.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **50**(Pt 5), 760-3.
- Cowtan, K. & Main, P. (1998) Miscellaneous algorithms for density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54**(Pt 4), 487-93.
- Dahl, C., Schulte, A., Stockdreher, Y., Hong, C., Grimm, F., Sander, J., Kim, R., Kim, S. H. & Shin, D. H. (2008) Structural and molecular genetic insight into a widespread sulfur oxidation pathway. *J Mol Biol*, **384**(5), 1287-300.

- Dambe, T. R., Kuhn, A. M., Brossette, T., Giffhorn, F. & Scheidig, A. J. (2006) Crystal structure of NADP(H)-dependent 1,5-anhydro-D-fructose reductase from *Sinorhizobium morelense* at 2.2 Å resolution: construction of a NADH-accepting mutant and its application in rare sugar synthesis. *Biochemistry*, **45**(33), 10030-42.
- Delano, W. L. (2004). The pymol molecular graphics system. www.pymol.org.
- Diederichs, K. & Karplus, P. A. (1997) Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat Struct Biol*, **4**(4), 269-75.
- Drenth J. (1994) Principles in Protein Crystallography. 1st Edition. Edition Springer-Verlag, Inc., New York, USA.
- Duax, W. L., Pletnev, V., Addlagatta, A., Bruenn, J. & Weeks, C. M. (2003) Rational proteomics I. Fingerprint identification and cofactor specificity in the short-chain oxidoreductase (SCOR) enzyme family. *Proteins*, **53**(4), 931-43.
- Ducruix, A. & Giege, R. (1992) Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. *A Practical Approach*.
- Dyson, H. J., Jeng, M. F., Tennant, L. L., Slaby, I., Lindell, M., Cui, D. S., Kuprin, S. & Holmgren, A. (1997) Effects of buried charged groups on cysteine thiol ionization and reactivity in *Escherichia coli* thioredoxin: structural and functional characterization of mutants of Asp 26 and Lys 57. *Biochemistry*, **36**(9), 2622-36.
- Edeling, M. A., Guddat, L. W., Fabianek, R. A., Thony-Meyer, L. & Martin, J. L. (2002) Structure of CcmG/DsbE at 1.14 Å resolution: high-fidelity reducing activity in an indiscriminately oxidizing environment. *Structure*, **10**(7), 973-9.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**(Pt 12 Pt 1), 2126-32.
- Ennifar, E., Walter, P. & Dumas, P. (2001) An efficient method for solving RNA structures: MAD phasing by replacing magnesium with zinc. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 330-332.
- Evans, P. & McCoy, A. (2008) An introduction to molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **64**(Pt 1), 1-10.
- Filling, C., Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jornvall, H. & Oppermann, U. (2002) Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem*, **277**(28), 25677-84.
- Foloppe, N. & Nilsson, L. (2004) The glutaredoxin -C-P-Y-C- motif: influence of peripheral residues. *Structure*, **12**(2), 289-300.

- Friedrich, C. G. (1998) Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. *Adv Microb Physiol*, **39**, 235-89.
- Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A. & Fischer, J. (2001) Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl Environ Microbiol*, **67**(7), 2873-82.
- Ghosh, D., Pletnev, V. Z., Zhu, D. W., Wawrzak, Z., Duax, W. L., Pangborn, W., Labrie, F. & Lin, S. X. (1995) Structure of human estrogenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase at 2.20 Å resolution. *Structure*, **3**(5), 503-13.
- Ghosh, D., Weeks, C. M., Grochulski, P., Duax, W. L., Eрман, M., Rimsay, R. L. & Orr, J. C. (1991) Three-dimensional structure of holo 3 alpha,20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a member of a short-chain dehydrogenase family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(22), 10064-8.
- Gleason, F. K., Lim, C. J., Gerami-Nejad, M. & Fuchs, J. A. (1990) Characterization of *Escherichia coli* thioredoxins with altered active site residues. *Biochemistry*, **29**(15), 3701-9.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I. & Metz, F. (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*, **15**(4), 305-8.
- Goulding, C. W., Apostol, M. I., Gleiter, S., Parseghian, A., Bardwell, J., Gennaro, M. & Eisenberg, D. (2004) Gram-positive DsbE proteins function differently from Gram-negative DsbE homologs. A structure to function analysis of DsbE from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, **279**(5), 3516-24.
- Goulding, C. W., Sawaya, M. R., Parseghian, A., Lim, V., Eisenberg, D. & Missiakas, D. (2002) Thiol-disulfide exchange in an immunoglobulin-like fold: structure of the N-terminal domain of DsbD. *Biochemistry*, **41**(22), 6920-7.
- Guddat, L. W., Bardwell, J. C. & Martin, J. L. (1998) Crystal structures of reduced and oxidized DsbA: investigation of domain motion and thiolate stabilization. *Structure*, **6**(6), 757-67.
- Guerrero, S. A., Hecht, H. J., Hofmann, B., Biebl, H. & Singh, M. (2001) Production of selenomethionine-labelled proteins using simplified culture conditions and generally applicable host/vector systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, **56**(5-6), 718-23.
- Hao, Q. (2004) ABS: a program to determine absolute configuration and evaluate anomalous scatterer substructure. *J Appl Cryst*, **37**(3), 498-499.
- Harding, M. M. (2001) Geometry of metal-ligand interactions in proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**(Pt 3), 401-11.
- Hendrickson, W.A. & Ogata C.M. (1997) Phase determination from multiwavelength anomalous diffraction measurements. *Methods in Enzymology*, 276. Academic Press, pp. 494-523.

- Holm, L. & Sander, C. (1996) Mapping the protein universe. *Science*, **273**(5275), 595-603.
- Holm, L. & Sander, C. (1997) Dali/FSSP classification of three-dimensional protein folds. *Nucleic Acids Res*, **25**(1), 231-4.
- Holmgren, A. (1995) Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure*, **3**(3), 239-43.
- Huber-Wunderlich, M. & Glockshuber, R. (1998) A single dipeptide sequence modulates the redox properties of a whole enzyme family. *Fold Des*, **3**(3), 161-71.
- Hummel, W. (1997) New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **58**, 145-84.
- Huwig, A., Emmel, S., Jäkel, G. & Giffhorn, F. (1997) Enzymatic synthesis of L-tagatose from galactitol with galactitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D. *Carbohydr Res*, **305**(3-4), 337-339.
- Irwin, J. J. & Shoichet, B. K. (2005) ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model*, **45**(1), 177-82.
- Jäkel, G. (1994) Isolierung und Charakterisierung einer durch Enzymevolution entstandenen Galaktit-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* D. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, **47** (Pt 2), 110-9.
- Jörnvall, 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.
- Jung, T.F. (2008) Substratspezifität und Stereoselektivität der Galaktitoldehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* D. *Dissertation*, Universität des Saarlandes.
- Kabsch, W. (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Cryst*, **26**, 795-800.
- Kadokura, H., Katzen, F. & Beckwith, J. (2003) Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem*, **72**, 111-135.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H. & Persson, B. (2002) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Eur J Biochem*, **269**(18), 4409-17.
- Kallis, G. B. & Holmgren, A. (1980) Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **255**(21), 10261-5.

- Katti, S. K., LeMaster, D. M. & Eklund, H. (1990) Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J Mol Biol*, **212**(1), 167-84.
- Kiefersauer, R., Than, M. E., Dobbek, H., Gremer, L., Melero, M., Strobl, S., Dias, J. M., Soulimane, T. & Huber, R. (2000) A novel free-mounting system for protein crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes. *J Appl Cryst*, **33**(Part 5), 1223-1230.
- Kim, J. H., Kim, S. J., Jeong, D. G., Son, J. H. & Ryu, S. E. (2003) Crystal structure of DsbDgamma reveals the mechanism of redox potential shift and substrate specificity(1). *FEBS Lett*, **543**(1-3), 164-9.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1998) Databases in protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54**(Pt 6 Pt 1), 1119-31.
- Kohring, G. W., Wiehr, P., Jeworski, M. & Giffhorn, F. (2003) Stereoselective oxidation of aliphatic diols and reduction of hydroxy-ketones with galactitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D. *Commun Agric Appl Biol Sci*, **68**(2 Pt A), 309-12.
- Krissinel, E. (2007) On the relationship between sequence and structure similarities in proteomics. *Bioinformatics*, **23**(6), 717-23.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* **372**, 774-797.
- Kristan, K., Deluca, D., Adamski, J., Stojan, J. & Rizner, T. L. (2005) Dimerization and enzymatic activity of fungal 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase from the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *BMC Biochem*, **6**, 28.
- 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.
- Leslie, A. G. W. (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data *Jnt CCP4/ESF-EAMCB Newsl Protein Crystallogr*, **26**.
- Lerner, M.G. & Carlson H.A. (2006) APBS plugin for PyMOL. University of Michigan, Ann Arbor.
- Ludwig, W., Mittenhuber, G. & Friedrich, C. G. (1993) Transfer of *Thiosphaera pantotropha* to *Paracoccus denitrificans*. *Int J Syst Bacteriol*, **43**(2), 363-7.
- Maiti, R., Van Domselaar, G. H., Zhang, H. & Wishart, D. S. (2004) SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic Acids Res*, **32**(Web Server issue), W590-4.
- Matthews, B. M. (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, **33**, 491-495.

- McPherson, A. (2002) Introduction to Macromolecular Crystallography. 1st Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- McRee, D.E. (1999) Practical Protein Crystallography. 2nd Edition. Edition Academic Press, San Diego USA.
- Morris, R. J., Perrakis, A. & Lamzin, V. S. (2003) ARP/wARP and automatic interpretation of protein electron density maps. *Methods Enzymol*, **374**, 229-44.
- Mossner, E., Huber-Wunderlich, M. & Glockshuber, R. (1998) Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci*, **7**(5), 1233-1244.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **53**(Pt 3), 240-55.
- Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T. & Chothia, C. (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol*, **247**(4), 536-40.
- Niefind, K., Muller, J., Riebel, B., Hummel, W. & Schomburg, D. (2003) The crystal structure of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* suggests the structural basis of its metal dependency. *J Mol Biol*, **327**(2), 317-28.
- Niefind, K., Riebel, B., Muller, J., Hummel, W. & Schomburg, D. (2000) Crystallization and preliminary characterization of crystals of R-alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56**(Pt 12), 1696-8.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B. & Jornvall, H. (2003) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact*, **143-144**, 247-53.
- Orawski, G., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., Rother, D. & Friedrich, C. G. (2007) The periplasmic thioredoxin SoxS plays a key role in activation in vivo of chemotrophic sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus*. *Microbiology*, **153**(Pt 4), 1081-6.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*, 307-326.
- Pan, J. L. & Bardwell, J. C. (2006) The origami of thioredoxin-like folds. *Protein Sci*, **15**(10), 2217-2227.
- Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V. S., Weiss, M. S. & Tucker, P. A. (2005) Auto-Rickshaw: an automated crystal structure determination platform as an efficient tool for the validation of an X-ray diffraction experiment. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **61**(Pt 4), 449-57.

- Persson, B., Krook, M. & Jornvall, H. (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases. *Adv Exp Med Biol*, **372**, 383-95.
- Pyun, S.-J., Lee, K.-Y., Oh, C.-Y. & Ham W.H. (2004) Synthesis of (+)-1-Deoxygalactonojirimycin. *Heterocycles*, **62**(1), 333-341.
- Qin, J., Clore, G. M., Kennedy, W. M., Huth, J. R. & Gronenborn, A. M. (1995) Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NF kappa B. *Structure*, **3**(3), 289-297.
- Qin, J., Clore, G. M., Kennedy, W. P., Kuszewski, J. & Gronenborn, A. M. (1996) The solution structure of human thioredoxin complexed with its target from Ref-1 reveals peptide chain reversal. *Structure*, **4**(5), 613-620.
- Quentmeier, A. & Friedrich, C. G. (2001) The cysteine residue of the SoxY protein as the active site of protein-bound sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *FEBS Lett*, **503**(2-3), 168-172.
- Quentmeier, A., Janning, P., Hellwig, P. & Friedrich, C. G. (2007) Activation of the heterodimeric central complex SoxYZ of chemotrophic sulfur oxidation is linked to a conformational change and SoxY-Y interprotein disulfide formation. *Biochemistry*, **46**(38), 10990-8.
- Quentmeier, A., Li, L. & Friedrich, C. G. (2008) Identification of two inactive forms of the central sulfur cycle protein SoxYZ of *Paracoccus pantotrophus*. *FEBS Lett*, **582**(25-26), 3701-4.
- Rainey, F. A., Kelly, D. P., Stackebrandt, E., Burghardt, J., Hiraishi, A., Katayama, Y. & Wood, A. P. (1999) A re-evaluation of the taxonomy of *Paracoccus denitrificans* and a proposal for the combination *Paracoccus pantotrophus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*, **49**(Pt 2), 645-51.
- Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Advances In Protein Chemistry*, **23**, 283-437.
- Rossmann, M. G., Moras, D. & Olsen, K. W. (1974) Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, **250**(463), 194-9.
- Rother, D., Henrich, H. J., Quentmeier, A., Bardischewsky, F. & Friedrich, C. G. (2001) Novel genes of the sox gene cluster, mutagenesis of the flavoprotein SoxF, and evidence for a general sulfur-oxidizing system in *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J Bacteriol*, **183**(15), 4499-508.
- Rother, D., Orawski, G., Bardischewsky, F. & Friedrich, C. G. (2005) SoxRS-mediated regulation of chemotrophic sulfur oxidation in *Paracoccus pantotrophus*. *Microbiology*, **151**(Pt 5), 1707-16.

- Rother, D., Ringk, J. & Friedrich, C. G. (2008) Sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus*: the sulfur-binding protein SoxYZ is the target of the periplasmic thiol-disulfide oxidoreductase SoxS. *Microbiology*, **154**(Pt 7), 1980-8.
- Saarinen, M., Gleason, F. K. & Eklund, H. (1995) Crystal structure of thioredoxin-2 from *Anabaena*. *Structure*, **3**(10), 1097-108.
- Sauve, V., Bruno, S., Berks, B. C. & Hemmings, A. M. (2007) The SoxYZ complex carries sulfur cycle intermediates on a peptide swinging arm. *J Biol Chem*, **282**(32), 23194-204.
- Schneider, K. H., Jakel, G., Hoffmann, R. & Giffhorn, F. (1995) Enzyme evolution in *Rhodobacter sphaeroides*: selection of a mutant expressing a new galactitol dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiology*, **141** (Pt 8), 1865-73.
- Schneider, T. R. & Sheldrick, G. M. (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**(Pt 10 Pt 2), 1772-9.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. & Peitsch, M. C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, **31**(13), 3381-5.
- Schüttelkopf, A. W. & van Aalten, D. M. (2004) PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**(Pt 8), 1355-63.
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. & Maizel, J. V., Jr. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, **28**(5), 815-20.
- Sheldrick, G. M., Hauptman, H. A., Weeks, C.M., Miller, R. & Uson, I. (2001). International Tables for Macromolecular Crystallography. M. G. R. E. Arnold. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. **F**: 333-345.
- Sheldrick, G. M. (2002) Macromolecular phasing with SHELXE. *Z Kristallogr*, **217**, 644-650.
- Sheldrick, G. M. (2008) A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A*, **64**(Pt 1), 112-22.
- Smith, J. L. & Thompson, A. (1998) Reactivity of selenomethionine--dents in the magic bullet? *Structure*, **6**(7), 815-9.
- Stout, J., De Smet, L., Panjikar, S., Weiss, M. S., Savvides, S. N. & Van Beeumen, J. (2006) Crystallization, preliminary crystallographic analysis and phasing of the thiosulfate-binding protein SoxY from *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, **62**(Pt 11), 1093-6.
- Streitwieser A., Heathcock C.H., & Kosower E.M. (1994). *Organische Chemie*. 2nd. Edition VCH, Weinheim, Deutschland.

- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res*, **22**(22), 4673-4680.
- Tickle, I. J., Laskowski, R. A. & Moss, D. S. (2000) Rfree and the rfree ratio. II. Calculation of the expected values and variances of cross-validation statistics in macromolecular least-squares refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56** (Pt 4), 442-450.
- Toone, E. J., Simon, E. S., Bednarski, M. D. & Whitesides, G. M. (1989) Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Tetrahedron*, **45**(17), 5365-5422.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(9), 4350-4.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997) MOLREP: An automated program for molecular replacement. *J Appl Cryst*, **30**, 1022-1025.
- Vaguine, A. A., Richelle, J. & Wodak, S. J. (1999) SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55**(Pt 1), 191-205.
- Weik, M., Berges, J., Raves, M. L., Gros, P., McSweeney, S., Silman, I., Sussman, J. L., Houee-Levin, C. & Ravelli, R. B. (2002) Evidence for the formation of disulfide radicals in protein crystals upon X-ray irradiation. *J Synchrotron Radiat*, **9**(Pt 6), 342-6.
- Weik, M., Ravelli, R. B., Kryger, G., McSweeney, S., Raves, M. L., Harel, M., Gros, P., Silman, I., Kroon, J. & Sussman, J. L. (2000) Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(2), 623-8.
- Weiss, M. (2001) Global indicators of X-ray data quality. *J Appl Cryst*, **34**(2), 130-135.
- Yeates, T. O. (1997) Detecting and overcoming crystal twinning. *Methods Enzymol*, **276**, 344-58.
- Zapun, A., Bardwell, J. C. & Creighton, T. E. (1993) The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation in vivo. *Biochemistry*, **32**(19), 5083-5092.
- Zeller, T. & Klug, G. (2006) Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften*, **93**(6), 259-266.
- Zhu, D. W., Lee, X., Breton, R., Ghosh, D., Pangborn, W., Daux, W. L. & Lin, S. X. (1993) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the complex of human placental 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase with NADP+. *J Mol Biol*, **234**(1), 242-4.

Zimmer, C. (2006) Identifizierung von zwei biotechnologisch interessanten Enzymen und ihrer Gene zur stereo- und regioselektiven Modifikation. *Dissertation*, Universität des Saarlandes.

Anhang-Vektorkarten:

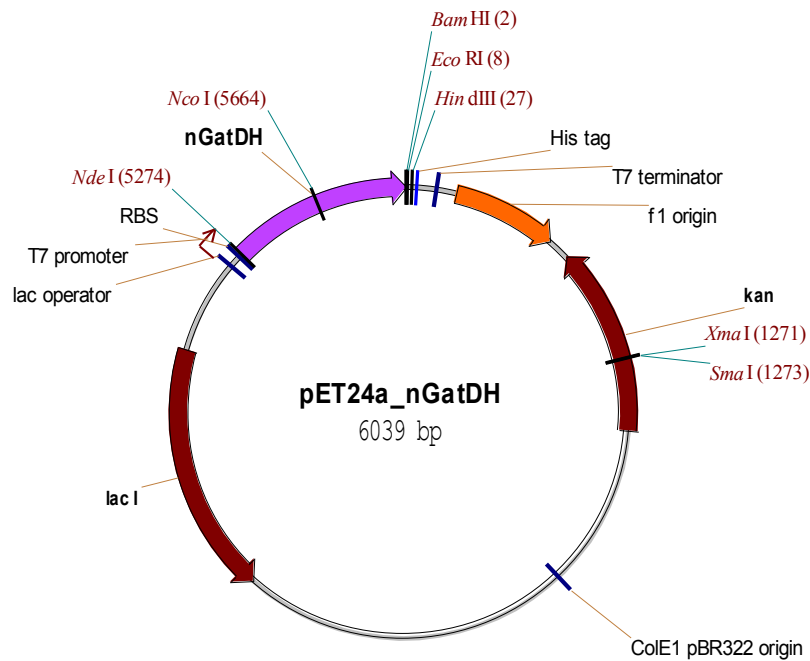


Abb. 55: Vektorkarte des Ursprungsplasmides pET24a_nGatDH (Petra Kornberger, Angewandte Mikrobiologie, Universität des Saarlandes)

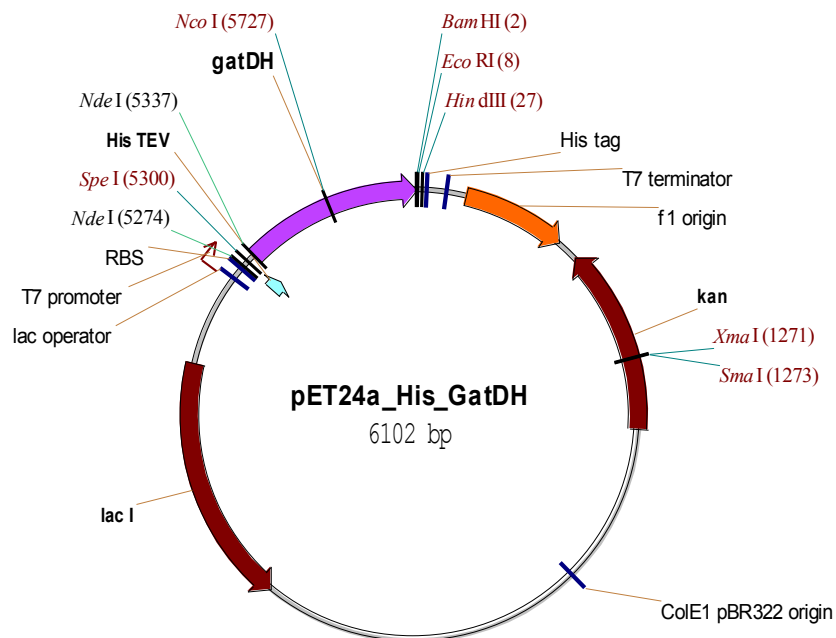


Abb. 56: Vektorkarte des in dieser Arbeit hergestellten Expressionsplasmides pET24_His_GatDH. Vor die Sequenz von GatDH (lila) wurde über die *NdeI*-Schnittstelle eine Kasette, kodierend für eine (His)₆-Affinitätssequenz und eine TEV-Protease-Schnittstelle (cyan), eingesetzt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Axel J. Scheidig für die Betreuung dieser Arbeit und der geduldigen Unterrichtung in der Proteinchemie und Proteinkristallographie.

Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Cornelius G. Friedrich möchte ich für seine finanzielle Unterstützung und seine Hilfe bei Fragen zur Schwefeloxidation in Bakterien danken. Außerdem danke ich seinen Mitarbeitern Dr. Armin Quentmeier, Dr. Dagmar Rother und Dr. Frank Bardischewsky für die Hilfestellungen und Überlassungen der Plasmide.

Bei Herrn Prof. Dr. Friedrich Giffhorn, Dr. Gert-Wieland Kohring und Petra Kornberger möchte ich mich für die Bereitstellung der GatDH zur Kristallisation, die Überlassung der Plasmide sowie ihrer Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Gerhard Wenz und Dr. Joannis Apostolakis möchte ich für die Überlassungen der Inhibitoren sowie der *in silico* Inhibitor-Bindungsanalysen danken.

Bei Dr. Tresfore Dambe und Dr. Björn Klink möchte ich mich für ihre geduldige Einführung und Hilfestellungen in die Kristallisation sowie Datenmessungen bedanken. Dr. Annette Faust danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Geduld in Fragen zur Datenprozessierung, Anregungen bei Verfeinerungen und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Joachim Bräutigam danke ich für die MALDI-Messungen sowie Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann und Dr. Markus Greiner für die Möglichkeit, MALLS-Messungen durchführen zu können.

Für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei meinen Kollegen in Homburg, Frau Ulrike Denne, Birgit Herrmann, Dr. Ardina Grüber, Mario Schu, Ana Obada, Dr. Marion Lang, Ulrich Zander, Birgit Kreutzer, Stefan Werner, Dr. Stefan Szedlacsek und Dr. Peter Haebel sowie den Kollegen in Kiel, Prof. Dr. Ulf-Peter Hanssen, PD Dr. Christoph Plieth, PD Dr. Rainer Schindler, Dr. Indra Schröder, Monika Backhaus, Sonja Hollmer, Sonja Vollbehr, Livia Saleh, Renato Weisse, Matthias Haffke und Stefan Düsterhoff bedanken. Ein besonderer Dank gilt hier auch meinem ehemaligen Diplomanden Henning Christian für seinen Beitrag zu dem GatDH-Projekt.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Marie-Luise und Herbert Carius, die mich jederzeit unterstützt haben und immer für mich da waren.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Yvonne Carius
Geburtstag	06.06.1978
Geburtsort	Saarbrücken
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung:

1984-1988	Grundschule in Blieskastel-Breitfurt
1988-1997	Von der Leyen-Gymnasium Blieskastel
1997	Allgemeine Hochschulreife

Studium/Beruflicher Werdegang:

10/1997-10/1999	Grundstudium der Biologie an der Universität des Saarlandes
10/1999	Vordiplom
10/1999-01/2003	Hauptstudium der Biologie an der Universität des Saarlandes mit Abschluss Diplom
11/2001-01/2003	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Angewandte Molekularbiologie Thema: Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Toxin-Immunität in K28-Killerhefen
05/2003-04/2007	Promotion in der Arbeitsgruppe Strukturbiologie an der Uniklinik des Saarlandes
05/2007-01/09	Fortsetzung der Promotion in der Arbeitsgruppe Strukturbiologie/Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie (ZBM) der Christian-Albrechts-Universität Kiel
02/2009-	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI), Braunschweig