

**Kristallstruktur und Momentaufnahmen
entlang des Reaktionsmechanismus der
 α -L-Arabinofuranosidase**

Inaugural – Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Klaus Hövel
aus Bochum

Köln 2004

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie – abgesehen von unten (Abschnitt A.4) angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg betreut worden.

(Klaus Hövel)

Berichtersteller:	Prof. Dr. Dietmar Schomburg Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt
Einreichung des Gesuchs:	4. Mai 2004
Tag der mündlichen Prüfung:	30. Juni 2004

Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg für das interessante und herausfordernde Thema, das mir stets entgegengebrachte Vertrauen, die eingeräumten Freiheiten bei der strategischen Ausrichtung der Arbeit und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut,

Frau Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt für die Übernahme des Coreferats,

Herrn Dr. Karsten Niefind für die geduldige und mühevollen Einführung in die theoretischen Hintergründe der Proteinkristallographie, die zahlreichen Erklärungen und Hilfen im Umgang mit diversen Programmen, die Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse und die Betreuung der Röntgenanlagen am Institut,

Herrn Prof. Dr. Yuval Shoham und Frau Dalia Shallom für die ausgezeichnete Kooperation, die hervorragende Qualität der mir zur Verfügung gestellten Proteinproben, die Einführung in die Welt der Glykosidasen, die ständige Diskussionsbereitschaft, den sanften Druck („time is money“) und die Hilfe bei der Interpretation, Einordnung und Publikation der Ergebnisse,

Herrn Dr. Jan Abendroth für die Beteiligung an meiner Ausbildung zum Proteinkristallographen, die ständigen Hilfen im Umgang mit Computern und Programmen und die Anregungen und Motivationshilfen im Laufe der Arbeit,

Herrn Dr. Lejon Martens für die Einführung in die Massenspektrometrie, die Kooperation bei der massenspektrometrischen Charakterisierung der derivatisierten Proteinkristalle, der netten Arbeitsatmosphäre in unserem internationalen Büro und bleibende Erinnerungen aus dem Mothers in Chicago.

Herrn Dr. Helge Schlieben für seine Authentizität, die wissenschaftlichen und politischen Diskussionen, die Reiseführung auf dem Weg nach Grenoble und die Unterkunft bei seiner Schwiegermutter während der Tagung in Jena,

Frau Annette Faust, Herrn Sascha Marek und Herrn Christian Brück für die Begleitung und Hilfestellungen bei den Synchrotronmessungen in Hamburg und Grenoble,

Herrn Dr. Daniel Schlieper für die interessanten Diskussionen zu diversen kristallographischen Fragestellungen und den vorgelebten Idealismus eines naturwissenschaftlichen Forschers,

Frau Dr. Barbara Beuth und Herrn Dr. Jörg Müller für Diskussionen und Hilfestellungen zu Beginn und im Laufe der Arbeit,

den Betreuern der EMBL Außenstation am DESY, vor allem Herrn Dr. Ehmke Pohl für seinen engagierten Support, die Hilfestellungen und Tipps während der Messungen, seine freundliche Art und die unkomplizierte Bereitstellung von Synchrotronmesszeit,

Frau Dr. Shivani Chatterjee für die Hilfestellungen bei allen molekularbiologischen Fragen und die wertvollen Hinweise zur Pflege von Hasen,

Frau Sabine Lohmer für ein gut funktionierendes Labor,

Herrn Michael Zimmermann und Herrn Dr. Peter Krämer für die geduldige und freundliche Hilfe bei Problemen mit Computern und Daten,

der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung meiner Arbeit und

meiner Familie, die mich während meiner gesamten Ausbildungszeit unterstützt hat.

Vielen Dank!

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
3-Buchstaben und 1-Buchstabencode der Aminosäuren	IX
Sonstige Abkürzungen	X
1 EINLEITUNG	- 1 -
1.1 Glykosidasen	- 1 -
1.1.1 Allgemeine Einleitung	- 1 -
1.1.2 Mikrobielle Hemicellulasen	- 2 -
1.1.3 Unterteilung der Glykosid Hydrolasen in Familien und Clane	- 3 -
1.1.3.1 α -L-Arabinofuranosidasen	- 3 -
1.1.4 Historie der Glykosid Hydrolasen	- 3 -
1.1.5 Die Reaktionsmechanismen der Glykosid Hydrolasen	- 4 -
1.1.6 Homologe Strukturen	- 6 -
1.2 Die α-L-Arabinofuranosidase aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> T-6	- 7 -
1.2.1 Kinetische Analysen der katalytischen Mutanten der AbfA	- 7 -
1.2.1.1 Identifikation der katalytischen Säure/Base: Glu175	- 7 -
1.2.1.2 Identifizierung des katalytischen Nukleophils: Glu294	- 10 -
1.2.1.3 Substratspezifität der AbfA	- 11 -
1.2.2 Biotechnologische Bedeutung	- 12 -
1.3 Proteinkristallographie: Aktuelle Entwicklungen im Bereich der MAD-Phasierung	- 13 -
1.3.1 Theoretischer Hintergrund der anomalen Streuung	- 13 -
1.3.2 Instrumentelle Rahmenbedingungen	- 14 -
1.3.3 Strategien der Datensammlung	- 15 -
1.3.4 Bestimmen der geeigneten Messwellenlängen	- 15 -
1.4 Zielsetzung der Arbeit	- 17 -
2 MATERIAL UND METHODEN	- 18 -
2.1 Materialien, Geräte und EDV-Systeme	- 18 -
2.2 Proteinanalytik	- 20 -
2.2.1 Proteinkonzentration	- 20 -
2.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	- 20 -
2.2.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)	- 20 -
2.2.4 Gelfiltration	- 21 -
2.2.5 Massenspektrometrie	- 21 -
2.2.5.1 MALDI-TOF MS	- 21 -
2.2.5.2 ESI MS	- 21 -

2.3	Proteinkristallisation	- 22 -
2.3.1	Kristallisation.....	- 22 -
2.3.2	Impfkristallisation	- 22 -
2.3.3	Herstellung von Schwermetallatomderivaten	- 22 -
2.4	Röntgendiffraktometrie	- 23 -
2.4.1	Kristallmontage.....	- 23 -
2.4.2	Diffractionsexperimente.....	- 24 -
2.4.2.1	Se-Met AbfA, <i>R3</i>	- 24 -
2.4.2.2	MIR Phasierung, <i>R3</i>	- 25 -
2.4.2.3	4-Nitrophenyl-Ara (E175A), <i>R3</i>	- 25 -
2.4.2.4	native AbfA, Ara- α (1,3)-Xyl (E175A) und kovalentes Intermediat (E175A), <i>R3</i>	- 26 -
2.4.2.5	native AbfA, <i>P2₁</i>	- 26 -
2.4.2.6	E294A, <i>P2₁</i>	- 27 -
2.5	Datenreduktion	- 28 -
2.6	Strukturlösungen: MAD und MIR	- 28 -
2.6.1	Detektion der Selen-Substruktur	- 28 -
2.6.2	Detektion isomorpher Schwermetallatomderivate.....	- 29 -
2.6.3	Dichtemodifikation, Modellbau und Verfeinerung.....	- 29 -
2.6.3.1	MAD-Phasierung	- 29 -
2.6.3.2	MIR-Phasierung.....	- 30 -
2.6.4	Strukturlösung und Verfeinerung der <i>R3</i> Strukturen	- 30 -
2.6.5	Strukturlösung der <i>P2₁</i> Strukturen – Molekularer Ersatz.....	- 30 -
2.6.6	Analyse der Strukturmodelle	- 31 -
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	- 32 -
3.1	Proteinanalytik	- 32 -
3.1.1	SDS-Gelelektrophorese und native Gelelektrophorese	- 32 -
3.1.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	- 33 -
3.1.3	Gelfiltration.....	- 35 -
3.1.4	Massenspektrometrie	- 35 -
3.1.4.1	Native AbfA und katalytische Mutanten (E175A, E294A)	- 35 -
3.1.4.2	Seleno-Methionin Derivat	- 36 -
3.2	Kristallisation	- 37 -
3.2.1	Kristallform der Raumgruppe <i>P2₁</i>	- 37 -
3.2.2	Kristallform der Raumgruppe <i>R3</i>	- 38 -
3.2.3	Kristallisation von Se-Met-AbfA und der katalytischen Mutanten (E175A/E294A)	- 39 -
3.3	Diffractionsmessungen und Rechnungen mit nativen Datensätzen	- 39 -
3.3.1	Native Datensätze und Bestimmung der Raumgruppen	- 39 -
3.3.2	Kristallpackung	- 40 -
3.3.3	Rechnungen zur Selbstrotationsfunktionen.....	- 41 -
3.3.3.1	Rhomboedrische Kristallform	- 41 -
3.3.3.2	Primitiv monokline Kristallform	- 42 -

3.4	Strukturlösungen R3	- 44 -
3.4.1	Strukturlösung I: Multiple anomale Dispersion (MAD).....	44 -
3.4.1.1	MAD-Experimente: Raumgruppe $P2_1$	44 -
3.4.1.2	MAD-Experiment: Raumgruppe $R3$	46 -
3.4.1.3	Phasierungsrechnungen: Bestimmung der Se-Substruktur	47 -
3.4.1.4	Automatischer Modellbau mit ARP/wARP.....	49 -
3.4.2	Strukturlösung II: Multipler isomorpher Ersatz (MIR)	52 -
3.4.2.1	Screening-Methoden zur Derivatidentifizierung	52 -
3.4.2.2	MIR-Experiment: Raumgruppe $R3$	56 -
3.4.2.3	Bestimmung der Schwermetallpositionen, Phasierung und Modellbau	58 -
3.5	Strukturlösung $P2_1$	- 59 -
3.5.1	Molekularer Ersatz: MOLREP und manuell.....	59 -
3.6	Darstellung und Röntgendiffraktionsmessungen der katalytischen Mutanten: Michaelis-Menten Komplexe und kovalentes Glykosyl-Enzym Reaktionsintermediat	- 60 -
3.6.1	E175A	60 -
3.6.1.1	Michaelis-Menten Komplex I: 4-Nitrophenyl-Ara	60 -
3.6.1.2	Michaelis-Menten Komplex II: Ara- $\alpha(1,3)$ -Xyl.....	61 -
3.6.1.3	Das kovalente Arabinofuranose-Enzym Intermediat.....	61 -
3.6.1.4	Einfluß der Reaktion auf die Kristalleigenschaften.....	61 -
3.6.2	E294A: Die katalytische Mutante mit der besonderen Kristallisationseigenschaft.....	62 -
3.7	Verfeinerung und Qualität der Strukturen	- 64 -
3.7.1	$R3$ Strukturen.....	65 -
3.7.1.1	MAD Struktur	65 -
3.7.1.2	Das native Enzym.....	66 -
3.7.1.3	E175A-Komplexe.....	68 -
3.7.2	$P2_1$ Strukturen	72 -
3.7.2.1	Die katalytische Mutante E294A.....	72 -
3.7.2.2	Die native AbfA in der primitiv monoklinen Kristallform.....	74 -
3.8	Tertiärstruktur	- 75 -
3.8.1	Das katalytische (β/α) ₈ -Barrel.....	75 -
3.8.2	Die β -Sandwich Domäne mit Jelly Roll Topologie.....	77 -
3.9	Quartärstruktur: Die erste Struktur einer hexameren Glykosidase	- 80 -
3.9.1	Oligomerkontakte	82 -
3.9.1.1	Das Interface des Dimers	82 -
3.9.1.2	Das Interface des Hexamers	83 -
3.10	Homologe Glykosidasen	- 85 -
3.10.1	Clan GH-A und Clan GH-H.....	85 -
3.11	Der strukturelle Einfluß der Mutationen	- 87 -
3.11.1	Säure/Base Mutante E175A.....	87 -
3.11.2	Die katalytische Mutante E294A.....	88 -
3.12	Flexible und rigide Bereiche der Struktur	- 89 -

3.13 Michaelis-Menten Komplexe und Substratbindung	- 91 -
3.13.1 Die Residuen des aktiven Zentrums	- 91 -
3.14 Die Zuckerkonformationen der Michaelis-Menten Komplexe	- 95 -
3.15 Substratspezifität der AbfA: Der erste Komplex einer Clan GH-A Glykosidase mit einem furanosidischen Substrat	- 95 -
3.16 Das erste kovalente Intermediat eines furanosidasen Substrats	- 99 -
3.16.1 Massenspektrometrischer Nachweis des kovalenten Intermediats	- 100 -
3.16.2 Die ² T _T -Konformation des kovalenten Intermediats.....	- 101 -
3.17 Strukturen entlang der Reaktionskoordinaten	- 102 -
3.17.1 Lokalisation und Funktion der katalytischen Residuen	- 102 -
3.17.2 Syn und Anti Protonierungs-Trajektorien	- 104 -
3.17.3 Elektrophile Wanderung des anomeren Kohlenstoffs	- 105 -
3.17.4 Reaktionsmechanismus der AbfA	- 107 -
3.17.5 Das „Schlüssel und Schloß Prinzip“ der AbfA	- 108 -
4 ZUSAMMENFASSUNG	- 110 -
ANHANG	- 112 -
A.1 Kurzzusammenfassung	- 112 -
A.2 Abstract	- 113 -
A.3 Lebenslauf	- 114 -
A.4 Vorabveröffentlichungen	- 115 -
A.5 Posterbeiträge	- 115 -
A.6 Literaturverzeichnis	- 116 -
A.7 Abbildungsverzeichnis	- 124 -
A.8 Tabellenverzeichnis	- 126 -

Abkürzungsverzeichnis

3-Buchstaben und 1-Buchstabencode der Aminosäuren

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

Sonstige Abkürzungen

Å	Ångström (1 Å = 0.1 nm)
<i>a,b,c</i>	Gitterachsen im realen Raum
<i>α,β,γ</i>	Winkel zwischen den Gitterachsen
AbfA	Arabinofuranosidase
a.i.	absolute Intensität
Ara- α (1,3)-Xyl	Arabinofuranose- α (1,3)-Xylose
au	asymmetrische Einheit der Elementarzelle
B	Temperaturfaktor
bzw.	beziehungsweise
<i>E.coli</i>	Darmbakterium <i>Escherichia Coli</i>
Da	Dalton
DLS	dynamische Lichtstreuung
DTT	Dithiothreitol
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EC	<i>enzyme catalogue</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
ESRF	<i>European Synchrotron Radiaton Facility</i>
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
g	Gramm
h	Stunde
I	Intensität
l	liter
m	Meter
M	molar
MAD	Multiple anomale Dispersion
MALDI	<i>matrix-assisted-laser-desorption/ionization</i>
mg	Milligramm
min	Minute
MIR	Multipler isomorpher Ersatz

ml	Milliliter
Mol	Einheit der Stoffmenge
MR	Molekularer Ersatz
MW	Molekulargewicht
λ	Wellenlänge
NCS	Nicht kristallographische Symmetrie
4-Nitrophenyl-Ara	4-Nitrophenyl-Arabinofuranose
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
R_{cryst}	kristallographischer R-Wert
R_{free}	freier R-Wert
R_{sym}	linearer R-Wert
R_{work}	R-Wert des Arbeitsdatensatzes
RMS	Standardabweichung (<i>root mean square</i>)
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Se-Met	Seleno-Methionin
TOF	<i>Time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
V_M	Matthews-Koeffizient
v/v	Volumenprozent

1 Einleitung

1.1 Glykosidasen

1.1.1 Allgemeine Einleitung

Der größte Teil der durch photosynthetische CO₂ Fixierung produzierten Biomasse wird in Zellwänden in Form von polymeren Kohlenwasserstoffen, hauptsächlich als Cellulose oder Hemicellulose, gespeichert. Der Abbau dieser polymeren Kohlenwasserstoffe stellt den Schlüsselschritt des Kohlenstoffzyklus dar, in dem die pflanzliche Biomasse zu löslichen Zuckern abgebaut wird. Dies wird durch Mikroorganismen vermittelt, die spezifische Glykosid Hydrolasen wie Cellulasen und Hemicellulasen produzieren. Die α -L-Arabinofuranosidasen (Abbildung 1-1) (EC 3.2.1.55) sind Hemicellulasen, die arabinofuranosidische Seitenketten in Hemicellulosen wie Arabinoxylan, Arabinogalaktan oder L-Arabinan hydrolysieren. Die α -L-arabinofuranosidischen Seitenketten inhibieren die Aktivität der Endoxylanasen und β -Xylosidasen und verhindern somit den kompletten Abbau des Polymers in die Xylose Einheiten.

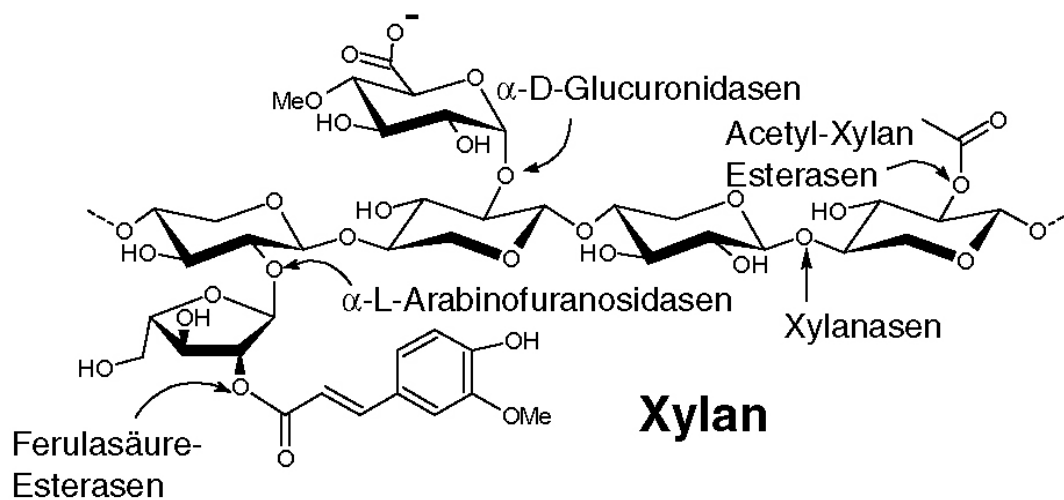


Abbildung 1-1 Die strukturellen Komponenten des Xylans. Darüber hinaus sind die Hemicellulasen gezeigt, die für den Abbau des Xylans verantwortlich sind.

Die glykosidische Bindung zwischen zwei Zuckern ist eine der stabilsten Bindungen in der Natur und die enzymatische Hydrolyse, die von Glykosid Hydrolasen (Glykosidasen) katalysiert wird, sorgt für eine bis zu 10^{17} -fache Beschleunigung (k_{cat}/k_{uncat}) der Reaktion

(Wolfenden et al., 1998). Die Schlüsselemente dieser bemerkenswerten Katalyse sind die „fein justierten“ Positionen der katalytischen Reste, die Verzerrung des Zuckerrings zur Stabilisierung des Oxocarbeniumion-artigen Übergangszustands und die Verschiebung des Wasserstoffs am anomeren Kohlenstoffatom des Substrats für den direkten nukleophilen Angriff (Zechel and Withers, 1999). Viele Glykosidasen sind darüber hinaus modulare Proteine und besitzen neben ihren katalytischen Domänen weitere funktionelle Domänen, hauptsächlich Kohlenhydrat-bindende Domänen (Carbohydrate binding modules: CBMs) (Bourne and Henrissat, 2001).

1.1.2 Mikrobielle Hemicellulasen

Hemicellulasen sind Schlüsselemente beim Abbau der pflanzlichen Biomasse und im Kohlenstofffluß der Natur. Die Substrate dieser Enzyme sind eine heterogene Gruppe an verzweigten und linearen Polysacchariden, welche über Wasserstoffbrückenbindungen an den Mikrofibrillen der Cellulose in der pflanzlichen Zellwand gebunden sind, um diese zu einem robusten Netzwerk zu verbinden. Darüber hinaus sind Hemicellulosen ebenfalls kovalent gebunden an Lignin.

Der Abbau der Cellulose und Hemicellulose wird von Mikroorganismen durchgeführt, die sowohl in der freien Natur als auch als Teil des Verdauungstrakts höherer Tiere zu finden sind. Aufgrund der verschiedenen Strukturen und Organisationen der Polysaccharide werden für den kompletten Abbau der Hemicellulose viele unterschiedliche Enzyme benötigt. In vielen Bereichen ist dieser Prozess aufgrund der unlöslichen und rigiden Struktur der pflanzlichen Zellwand und der begrenzten Verfügbarkeit der cellolytischen und hemicellolytischen Mikroorganismen sehr langsam. Da ein großer Teil der Polymere entweder unlöslich oder mit der unlöslichen Cellulose assoziiert ist, sind viele Hemicellulasen modulare Proteine und besitzen neben ihrer katalytischen Domäne andere funktionale Module. Die wichtigsten Module sind Kohlenhydrat-bindende Module (Carbohydrate-binding-modules, CBM's), die das Binden der Enzyme an die unlöslichen Polysaccharide vermitteln. Die katalytische Domäne der Hemicellulasen sind entweder Glykosid Hydrolasen (GH), die die glykosidische Bindung hydrolysieren oder Kohlenhydrat Esterasen, die durch einen Ester gebundene Seitenketten hydrolysieren, bei denen es sich um Acetat oder Ferulasäure handelt (Abbildung 1-1).

1.1.3 Unterteilung der Glykosid Hydrolasen in Familien und Clane

In den letzten Jahren gab es einen erheblichen Zuwachs an Informationen über Glykosidasen sowohl im Bereich der Sequenzen als auch im Bezug auf die Veröffentlichung neuer Strukturen. Derzeit sind mehr als 8500 Sequenzen von Glykosidasen bekannt und die sequenzbasierte Klassifizierung ihrer katalytischen Domänen in Glykosid Hydrolase (GH) Familien und Clane ist auf dem stets aktuellen Server für Kohlenwasserstoff-aktive Enzyme (Carbohydrate-Active Enzymes CAZy, <http://www.afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>) verfügbar. Basierend auf ihren Sequenzen werden die Glykosidasen derzeit in 76 verschiedene Familien unterteilt (Zechel and Withers, 1999). Kristallstrukturen eines Vertreters von wenigstens 30 dieser Familien sind bekannt, und die Strukturen zeigen trotz der Tatsache, daß all diese Enzyme die gleiche Reaktion - die Hydrolyse eines Acetals - katalysieren, eine große strukturelle Vielfalt. Einige Familien besitzen ähnliche generelle Faltungen und werden daher in Clanen zusammengefaßt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind 5 Clane beschrieben worden (Henrissat and Davies, 1997): GH-A (Glykosid Hydrolase-A), GH-B, GH-C, GH-D und GH-E. Der größte dieser Clane ist der Clan GH-A, der häufig auch als 4/7 Superfamilie bezeichnet wird, da sich die katalytischen Residuen (Säure/Base und Nukleophil) an den C-terminalen Enden der β -Stränge 4 und 7 befinden. Die GH-51 Arabinofuranosidasen wurden basierend auf Sequenzanalysen zusammen mit 16 weiteren Familien der Glykosid Hydrolasen dem Clan GH-A zugeordnet (Henrissat et al., 1995; Zverlov et al., 1998). Innerhalb dieses Clans sind Strukturen der Familien 1, 2, 5, 10, 17, 26, 42 und 53 beschrieben worden, und die katalytische Domäne aller Strukturen zeigt die gleiche $(\beta/\alpha)_8$ -Topologie und eine ähnliche Architektur des aktiven Zentrums. Überhaupt stellen die Glykosid Hydrolasen die größte Gruppe der TIM-barrel Strukturen dar. Die E.C. Nummern sind meistens 3.2.1.x, wobei x die Substratspezifität definiert.

1.1.3.1 α -L-Arabinofuranosidasen

Derzeit sind 130 Sequenzen von verschiedenen α -L-Arabinofuranosidasen bekannt, und gemäß der sequenzbasierten Klassifizierung sind die verschiedenen bakteriellen, fungiziden and pflanzlichen α -L-Arabinofuranosidasen Mitglieder der GH-Familien 3, 43, 51, 54 und 62.

1.1.4 Historie der Glykosid Hydrolasen

Bei der ersten Kristallstruktur eines Enzyms handelt es sich um den wohl bekanntesten und am meisten untersuchten Vertreter der Glykosid Hydrolasen, dem Hühnereiweiß-Lysozym. Obwohl bereits 1965 (Blake, 1965) die Kristallstruktur vorgestellt wurde und zahlreiche kristallographische Untersuchungen den Reaktionsmechanismus des Enzyms untersuchten und zu dem Schluß kamen, daß die Reaktion einem einschrittigen Mechanismus (Philipps Mechanismus) folgt, dauerte es bis zum Jahr 2001, bis diese Vermutung revidiert und der Mechanismus aufgeklärt werden konnte (Vocadlo et al., 2001). Mit Hilfe der Kristallstruktur

und der massenspektrometrischen Identifikation des kovalenten Reaktionsintermediats konnte der Koshland Mechanismus abgesichert werden. Bereits vor der Publikation dieser Ergebnisse gab es Untersuchungen mit anderen β -*retaining* Glykosidasen, die wichtige Hinweise auf einen gemeinsamen Reaktionsmechanismus dieser Enzyme lieferten (Koshland, 1953). Erst mit der Veröffentlichung des kovalenten Reaktionsintermediats des Hühnereiweiß-Lysozyms konnte ein genereller Reaktionsmechanismus für alle β -Glykosidasen formuliert werden. Allerdings konnten bis zu dieser Arbeit nur Kristallstrukturen kovalenter Intermediate mit pyranosidischen Substraten vorgestellt werden, die Struktur eines kovalent gebundenen furanosidischen Substrats war vor dieser Arbeit nicht publiziert.

1.1.5 Die Reaktionsmechanismen der Glykosid Hydrolasen

Die enzymatische Hydrolyse der glykosidischen Bindung führt entweder zu einer Umkehrung oder zur Beibehaltung der Konfiguration am anomeren Kohlenstoff (*inverting/retaining*) und bei etwa 2/3 aller charakterisierten GH-Familien bleibt die anomere Konfiguration erhalten. In den GH-Familien der α -L-Arabinofuranosidasen sind beide Reaktionsmechanismen zu finden: Enzyme der Familien 51 und 54 hydrolysieren unter Erhalt der anomeren Konfiguration, wo hingegen die Glykosidasen der Familie 43 die Konfiguration umkehren (Pitson et al., 1996). Die Stereochemie des Reaktionsmechanismus der Familie 62 ist noch nicht charakterisiert worden.

Die meisten *retaining* Glykosidasen spalten die glykosidische Bindung unter Verwendung von 2 Carboxylsäuren, die als Nukleophil und als Säure/Base fungieren. Die Hydrolyse vollzieht sich über einen 2-Schritt Mechanismus mit einem kovalenten Zucker-Enzym Reaktionsintermediat (Abbildung 1-2) (Davies et al., 1998; Sinnott, 1990). Im ersten Schritt der Reaktion fungiert eine der Carboxylgruppen als Säure und protoniert zeitgleich zur Spaltung der Bindung den Sauerstoff des abgehenden Aglykons. Gleichzeitig erfolgt der Angriff des katalytischen Nukleophils auf den anomeren Kohlenstoff, was zur Ausbildung des kovalenten Reaktionsintermediats führt (E-S*, Abbildung 1-2). Im zweiten Schritt der Katalyse wird das Wassermolekül von der katalytischen Säure/Base deprotoniert, welches am anomeren Kohlenstoff angreift, um die Hydrolyse des kovalenten Zucker-Enzym-Komplexes zu ermöglichen. Im hydrolysierten Produkt (P₂) bleibt somit die Konfiguration des anomeren Kohlenstoffs erhalten (Abbildung 1-2).

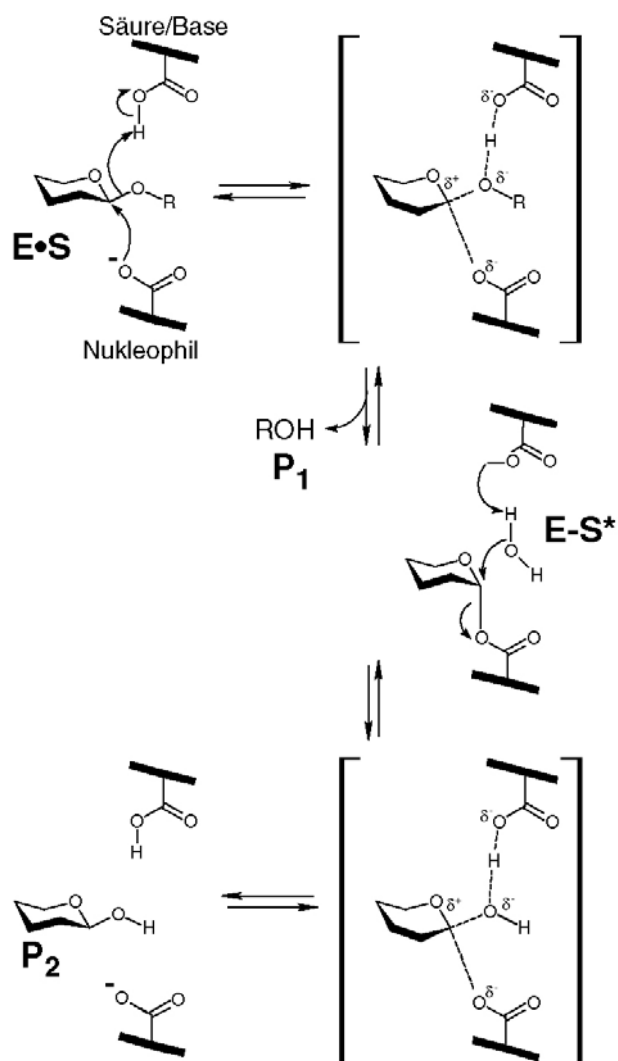


Abbildung 1-2 Der Reaktionsmechanismus der *retaining* Glykosidasen (Koshland Mechanismus).

Die *inverting* Glykosidasen spalten die glykosidische Bindung in einem 1-Schritt Mechanismus (Phillips Mechanismus). Die beiden Carboxylgruppen fungieren als Säure und Base und sind in einer geeigneten Entfernung zueinander positioniert, damit das Substrat und ein Wassermolekül zwischen ihnen gebunden werden kann (Abbildung 1-3). In *inverting* Glykosidasen sind die beiden Carboxylgruppen im Durchschnitt 10.5 Å voneinander entfernt, im Gegensatz dazu beträgt der Abstand in *retaining* Glykosidasen durchschnittlich 5.5 Å, was mit dem 2-Schritt Mechanismus konsistent ist (Abbildung 1-2).

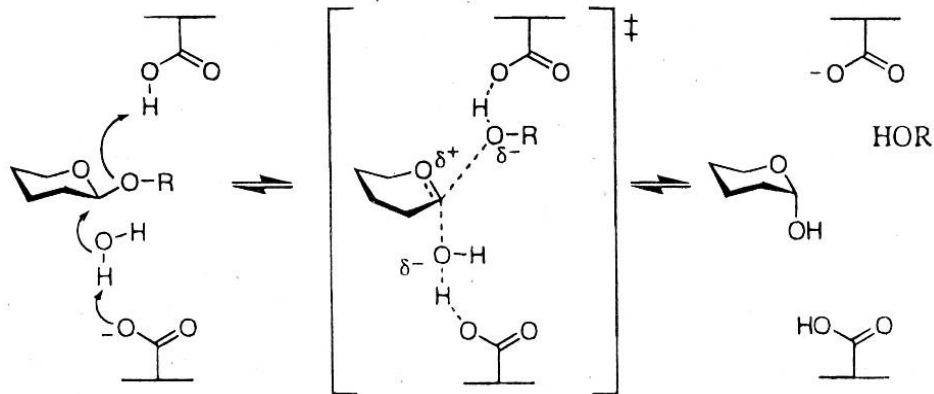


Abbildung 1-3 Der Phillips Mechanismus der *invertिंग* Glykosidasen, der zu einer Umkehrung der Konfiguration am anomeren Kohlenstoff führt. Die Abbildung wurde Vocadlo et al. (2001) entnommen (Vocadlo et al., 2001).

1.1.6 Homologe Strukturen

Vor der Strukturlösung der AbfA war keine Struktur einer Arabinofuranosidase der GH-Familie 51 bekannt. Darüber hinaus gab es zu Beginn der Arbeit keine Struktur aus anderen GH-Familien, in denen Arabinofuranosidasen zu finden sind (GH 3, 43, 51, 54 und 62). Auch andere homologe Strukturen mit hinreichender Sequenzidentität waren nicht bekannt. Aufgrund der sequenzbasierten Klassifizierung der Glykosid Hydrolase Familie 51 als Mitglied des GH-A Clans wurde für die katalytische Domäne eine $(\beta/\alpha)_8$ -Faltung angenommen. Aufgrund der Sequenzlänge wurde eine zweite, nicht katalytische Domäne erwartet. Die Abweichungen vom $(\beta/\alpha)_8$ -Grundmotiv und die generelle Faltung der zweiten Domänen waren nicht vorhersehbar, daher waren Rechnungen zum Molekularen Ersatz wenig vielversprechend und wurden nicht durchgeführt. Die α -L-Arabinofuranosidasen der GH-Familie 51 besitzen untereinander eine Sequenzidentität von bis zu 50%, aber im Vergleich zu Glykosidasen anderer GH-Familien liegt die höchste Sequenzidentität bei unter 10%.

Kurz vor der Strukturpublikation der AbfA wurde die Struktur einer α -L-Arabinanase der GH-43 vorgestellt (Nurizzo et al., 2002). Die Struktur dieses Enzyms zeigt ein neues Faltungsmuster mit einem *five bladed β -Propeller*. Die Arabinofuranosidasen der GH-Familie 43 gehören im Gegensatz zu den Arabinofuranosidasen der Familie 51 nicht zum Clan GH-A. Ferner gehören sie zu den *invertिंग* Glykosidasen (Pitson et al., 1996).

1.2 Die α -L-Arabinofuranosidase aus *Geobacillus stearothermophilus* T-6

Die α -L-Arabinofuranosidase aus *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (AbfA) stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Das Enzym besteht aus 502 Aminosäuren und gehört zur Glykosid Hydrolase Familie 51 (GH-51). Die Expression und Reinigung der nativen AbfA, des Seleno-Methionin Derivats und der katalytischen Mutanten (Glu175 und Glu294), die im Laufe der Arbeit kristallisiert und röntgenkristallographisch charakterisiert wurden, wurde vom Kooperationspartner in Israel durchgeführt:

Das *abfa* T-6 Gen wurde in den Vektor pET9D (Novagen) kloniert und in *Escherichia Coli* BL21 Zellen (DE3) (Novagen) exprimiert. Die Reinigung der AbfA wurde mit Hilfe von Hitzebehandlung bei 333 K und anschließender Gelpermeationschromatographie durchgeführt und resultierte in Grammquantitäten an gereinigtem (> 99%) Protein (Gilead and Shoham, 1995; Shallom et al., 2002a).

Das Seleno-Methionin Derivat der AbfA wurde in Methionin auxotrophen *E.coli* B834 Zellen (DE3)(Novagen) exprimiert (Mechaly et al., 2000) und anschließend auf die gleiche Weise gereinigt wie das native Protein (Hövel et al., 2003).

Die beiden Mutationen (E175A, E294A) wurden mit Hilfe des QuickChange Kits (Stratagene, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Die Reinigung erfolgte wie bei den anderen Proteinproben (Shallom et al., 2002a; Shallom et al., 2002b).

1.2.1 Kinetische Analysen der katalytischen Mutanten der AbfA

Parallel zur Strukturlösung der AbfA wurden vom Kooperationspartner in Israel die beiden katalytischen Aminosäuren durch kinetische Analysen der jeweiligen Mutanten identifiziert (Shallom et al., 2002a; Shallom et al., 2002b). Diese Arbeiten sollen an dieser Stelle beschrieben werden, um auf der einen Seite den Reaktionsmechanismus der *retaining* Glykosidasen tiefergehend vorzustellen. Auf der anderen Seite läßt sich aus diesen Experimenten die methodische Vorgehensweise der kristallographischen Arbeiten, insbesondere für die Darstellung der Zucker-Enzym Komplexe, ableiten.

1.2.1.1 Identifikation der katalytischen Säure/Base: Glu175

Die Identifizierung der katalytischen Säure/Base in Glykosidasen basiert hauptsächlich auf der Substitution der fraglichen Carboxylgruppe durch eine nicht ionisierbare Aminosäure und anschließender Charakterisierung des mutagenisierten Enzyms. Dies umfasst die kinetische Analyse der Mutante gegenüber Substraten mit unterschiedlichen Abgangsgruppen (A), der Wiederherstellung der katalytischen Aktivität mit Hilfe von externen Nukleophilen wie Azid-Ionen (B) und dem Vergleich der pH-Abhängigkeit des Wildtyps und der Mutante (C). Für alle Experimente wurden Aryl β -D-Xylopyranoside als Substrate verwendet, da α -L-

Arabinofuranoside mit unterschiedlichen Abgangsgruppen nicht verfügbar sind. Die enzymatische Aktivität der AbfA gegenüber β -D-Xylopyranosiden (Abschnitt 1.2.1.3) erlaubte die kinetische Charakterisierung des Wildtyps und der E175A Mutante.

(A) Der Ersatz der Carboxylgruppe durch eine nicht ionisierbare Aminosäure beeinflusst die Geschwindigkeit beider Reaktionsschritte. Der Effekt auf den Glykosilierungsschritt der Reaktion hängt allerdings wesentlich von der Aktivität der Abgangsgruppe ab. Die Hydrolyse von Substraten mit schlechten Abgangsgruppen, für die die Protonierung durch die katalytische Säure erforderlich ist, wird durch die Mutation stärker beeinträchtigt als die Hydrolyse von Substraten mit guter Abgangsgruppe, die der Säurekatalyse nicht bedürfen. Im Gegensatz dazu ist der Einfluß der Mutation auf die Geschwindigkeit der Deglykosilierung für alle Substrate vergleichbar, da unabhängig von der Abgangsgruppe des Substrats immer das gleiche Zucker-Enzym Intermediat hydrolysiert wird. Im Fall der E175A Mutante der AbfA konnte gezeigt werden, daß der Glykosilierungsschritt der Reaktion für Substrate mit schlechter Abgangsgruppe signifikant verlangsamt war (kleinere k_{cat}/K_m -Werte). Darüber hinaus erniedrigte sich der K_m -Wert mit steigender Aktivität der Abgangsgruppe, da mehr Zucker-Enzym Intermediat akkumulierte. Dieses kinetische Verhalten der E175A Mutante kann nur dadurch erklärt werden, daß es sich bei Glu175 tatsächlich um die katalytische Säure/Base handelt (Shallom et al., 2002a).

(B) In *retaining* Glykosidasen führt der Ersatz der katalytischen Säure/Base durch eine kleinere Aminosäure wie Alanin zu einer Höhle innerhalb des aktiven Zentrums, in die exogene Nukleophile wie Azid-Ionen penetrieren können. Das Azid-Ion, das im Gegensatz zum Wasser der Katalyse der Base nicht bedarf, kann das im Glykosilierungsschritt der Reaktion gebildete Zucker-Enzym Intermediat nukleophil attackieren, was zur Ausbildung eines Zucker-Azid Produkts führt (Abbildung 1-4). In Fällen, in denen der 2. Schritt der Reaktion (Deglykosilierung) geschwindigkeitsbestimmend ist, führt die Anwesenheit von Natriumazid (NaN_3) zu einer Beschleunigung der Reaktion. Für die E175A Mutante der AbfA konnte gezeigt werden, daß in Anwesenheit von 1M Natriumazid der k_{cat} -Wert der Reaktion um das 35-fache erhöht wurde. Als Folge der Beschleunigung des zweiten Schritts der Reaktion wurde der K_m -Wert erhöht, da weniger Zucker-Enzym Intermediate akkumulierte. Insgesamt bleibt der k_{cat}/K_m -Wert der Reaktion konstant, da die Anwesenheit des Azid-Ions keinen Einfluß auf den Glykosilierungsschritt hat. Azid hatte erwartungsgemäß keinen beschleunigenden Effekt auf die katalytische Aktivität des Wildtyps.

Darüber hinaus wurde das Produkt der Reaktion der E175A Mutante in Anwesenheit von Azid durch $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ Spektroskopie, Massenspektrometrie und FTIR analysiert. Die Ergebnisse zeigten für das im Laufe der Reaktion gebildete Produkt (Zucker-Azid) die gleiche Konfiguration am anomeren Kohlenstoff wie für das eingesetzte Substrat (Abbildung 1-4). Dies ist mit dem postulierten Reaktionsmechanismus konsistent und bestätigt die Annahme, daß es sich bei Glu175 um die katalytische Säure/Base handelt (Shallom et al., 2002a).

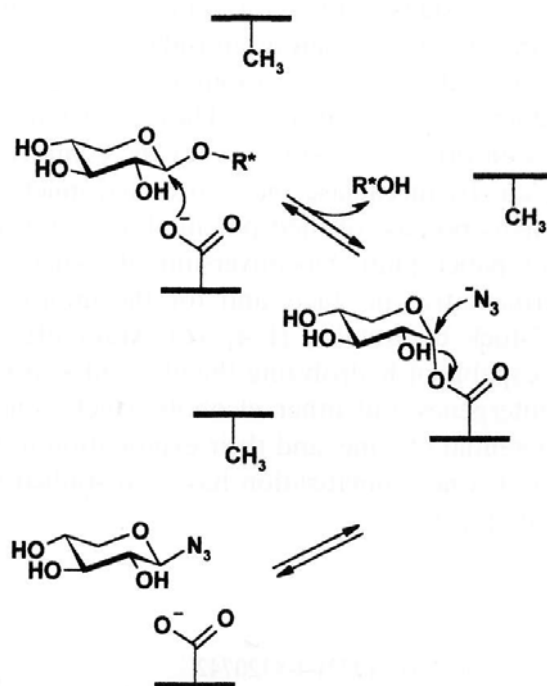


Abbildung 1-4 Schematische Darstellung der Wiederherstellung der Aktivität der Säure/Base Mutante unter Verwendung eines Substrats mit guter Abgangsgruppe. Die Abbildung wurde D. Shallom et al.(2002) entnommen (Shallom et al., 2002a).

(C) Die pH Abhängigkeit des Wildtyps der AbfA ist mit einer typischen Glockenkurve vergleichbar, was die Ionisierbarkeit der beiden katalytischen Carboxylgruppen widerspiegelt. Im Vergleich dazu ist die Abnahme der katalytischen Aktivität der E175A Mutante der AbfA bei hohen pH-Werten reduziert, da die protonierte Carboxylgruppe (die katalytische Säure) fehlt. Darüber hinaus ist das pH Optimum der E175A Mutante um eine pH Einheit höher als beim Wildtyp. In *retaining* Glykosidasen sind die katalytischen Residuen etwa 5 Å voneinander entfernt, was die Ladungen wechselseitig beeinflusst. Daher beeinflusst die Abwesenheit der katalytischen Säure/Base die Ionisierbarkeit des katalytischen Nucleophils, reduziert seine Azidität (pK_a) und verschiebt das pH Optimum der E175A Mutante zu höherem pH-Wert. Die gezeigte pH-Abhängigkeit der E175A Mutante ist mit ihrer Rolle als katalytische Säure/Base konsistent (Shallom et al., 2002a).

Alle Teilergebnisse bestätigten die Hypothese, daß es sich bei Glu175 um die katalytische Säure/Base handelt. Darüber hinaus ergab sich ein mit dem postulierten Reaktionsmechanismus im Einklang stehendes Bild.

1.2.1.2 Identifizierung des katalytischen Nucleophils: Glu294

Aufgrund von Sequenzhomologien wurde Glu294 als das katalytische Nucleophil identifiziert. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde Glu294 durch Ala substituiert und das kinetische Profil der Mutante mit Substraten, die unterschiedlich aktive Abgangsgruppen besitzen, bestimmt. Der resultierende k_{cat} -Wert der E294A Mutante mit 4-Nitrophenyl-Ara als Substrat liegt bei $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, was 6×10^{-8} der katalytischen Aktivität des Wildtyps entspricht.

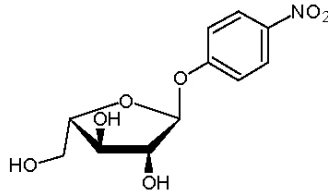


Abbildung 1-5 Schematische Darstellung von 4-Nitrophenyl-Ara. Entsprechend erhöhen im Substrat 2,5-Dinitrophenyl-Ara die beiden Nitrogruppen die Aktivität der Abgangsgruppe.

Für die meisten Substrate war die katalytische Aktivität zu gering, um den K_m -Wert zu bestimmen. Für 2,5-Dinitrophenyl-Ara, welches das reaktivste Substrat ist, konnte ein K_m -Wert von 8 mM bestimmt werden, der K_m -Wert des Wildtyps hingegen liegt bei 0.65 mM. Der k_{cat}/K_m -Wert der E294A Mutante für 2,5-Dinitrophenyl-Ara wurde mit $2.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ bestimmt, was etwa 7 Größenordnungen unter dem des Wildtyps liegt. Das kinetische Profil der Mutante war demnach konsistent mit der Hypothese, daß es sich bei Glu294 um das katalytische Nucleophil handelt, da nur für das Substrat mit der reaktivsten Abgangsgruppe – 2,5-Dinitrophenyl-Ara - in Abwesenheit des katalytischen Nucleophils ein K_m -Wert bestimmt werden konnte. Im Gegensatz zu den anderen Substraten ist die Abgangsgruppe durch die beiden Nitrogruppen stärker aktiviert, so daß die Reaktion, wenn auch mit deutlich verminderter Geschwindigkeit, in Abwesenheit des Nucleophils stattfindet. Diese Ergebnisse reichten jedoch nicht aus, um Glu294 eindeutig als das katalytische Nucleophil zu identifizieren, da bei Glykosidasen auch Fälle berichtet wurden, in denen die Mutation von Residuen, die nicht direkt an der Katalyse beteiligt sind, zu einer starken Verminderung oder zum Verlust der katalytischen Aktivität führten (Sierks et al., 1990; Totsuka et al., 1994). Für die eindeutige Identifizierung wurden Versuche mit Natriumazid (NaN_3) durchgeführt, das in der E294A Mutante den durch die Mutation frei gewordenen Platz einnehmen kann, um den anomeren Kohlenstoff des Zuckersubstrats nucleophil anzugreifen (Abbildung 1-6). In Gegenwart von 1 M Natriumazid konnte die katalytische Aktivität der E294A Mutante um das 44-fache gesteigert werden, was die Hypothese, daß es sich bei Glu294 um das katalytische Nucleophil handelt, stützt.

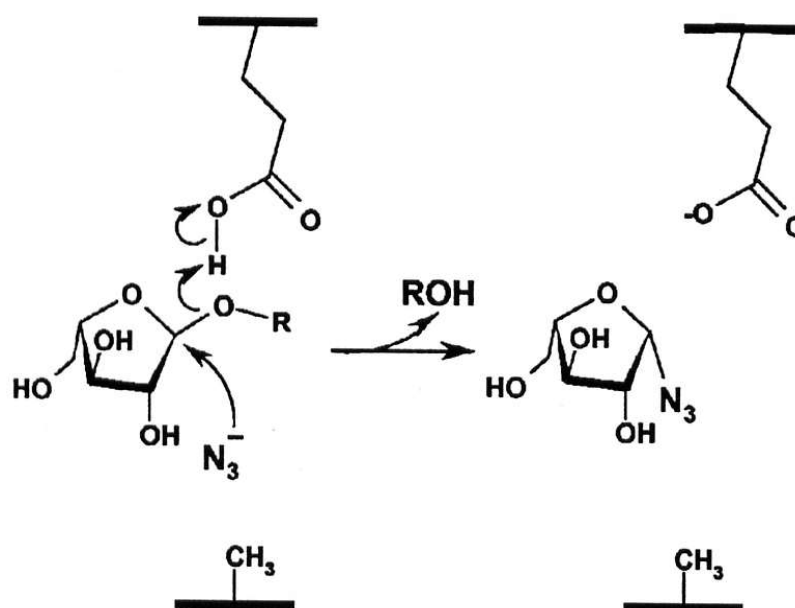


Abbildung 1-6 Schematische Darstellung der Wiederherstellung der katalytischen Aktivität der E294A Mutante der AbfA. In Gegenwart von Natriumazid, was statt der katalytischen Carboxylgruppe den Kohlenstoff des Zuckers nukleophil angreift, entsteht ein Produkt mit umgekehrter anomerer Konfiguration. Die Abbildung wurde D. Shallom et al. (2002) entnommen (Shallom et al., 2002b).

Darüber hinaus wurde die anomere Konfiguration des Produkts analysiert, da Natriumazid ebenfalls die Aktivität von Säure/Base Mutanten wiederherstellen kann (siehe Abschnitt 1.2.1.1). Das isolierte Produkt wurde mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ Spektroskopie, Massenspektrometrie und FTIR als β -L-Arabinofuranose - Azid - also mit der umgekehrten Konfiguration am anomeren Kohlenstoff - charakterisiert, was Glu294 der AbfA und homologe Residuen der GH Familie 51 eindeutig als das katalytische Nukleophil identifiziert.

1.2.1.3 Substratspezifität der AbfA

Die Arabinofuranosidasen GH-Familien 3, 43, 51, 54 und 62 besitzen eine breite Substratspezifität und hydrolysieren sowohl einzelne arabinofuranosidische Reste an O-5, O-2 und/oder O-3 als auch an O2 und O3 doppelsubstituierte Xylane, Xylooligomere und α -1,5 verknüpfte Arabinane (Saha, 2000).

Obwohl die α -L-Arabinofuranosidase aus *Geobacillus stearothermophilus* T-6 zur Glykosid Hydrolase Familie 51 gehört, die spezifisch arabinofuranosidische Substrate hydrolysieren, kann die AbfA xylopyranosidische Substrate umsetzen (Shallom et al., 2002a). D-Xylopyranose und L-Arabinofuranose zeigen strukturelle Gemeinsamkeiten, denn die Xylopyranosen besitzen nicht das C6 und 6-OH der Glukose. Derartige bifunktionelle Enzyme - α -L-Arabinofuranosidase/ β -D-Xylosidase - sind bereits für die Familien GH-3 und GH-43 beschrieben worden (Lee et al., 2003; Sakka et al., 1993; Utt et al., 1991).

1.2.2 Biotechnologische Bedeutung

Hemicellulasen rücken aufgrund der potentiellen industriellen Anwendung in den Prozessen der Biobleichung des Zellstoffs und der Umwandlung der Lignocellulose zu verdaubaren Produkten immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. Ein neuer biotechnologischer Aspekt ist die Verwendung der Glykosid Hydrolasen in der enzymatischen Synthese von Oligosacchariden (Palcic, 1999). Besonders durch molekularbiologisch veränderte *retaining* Glykosidasen, in denen das katalytische Nukleophil substituiert wurde - sogenannten Glykosid Synthetasen - , konnten hohe Ausbeuten verschiedener Oligosaccharide erzielt werden. Unter Verwendung aktivierter Zuckerdonatoren mit der umgekehrten Konfiguration des anomeren Kohlenstoffatoms im Vergleich zum natürlichen Substrat synthetisieren die mutagenisierten Enzyme effizient Oligosaccharide ohne das Produkt anschließend zu hydrolisieren. Seitdem dies erstmals von Withers erfolgreich demonstriert wurde (Mackenzie et al., 1998), wurde diese Technik für eine ganze Reihe von Glykosid Hydrolasen angewendet (Fort et al., 2000; Malet and Planas, 1998; Trincone et al., 2000). Die α -L-Arabinofuranosidasen besitzen besondere Merkmale, die sie für die Verwendung als Glykosid Synthetasen besonders interessant machen. Die α -L-Arabinofuranosidasen gehören zu den wenigen Glykosid Hydrolasen, die in der Lage sind, furanosidische Substrate zu hydrolisieren. Einige der α -L-Arabinofuranosidasen hydrolisieren darüber hinaus ebenfalls Aryl β -D-Xylopyranoside, so daß die entsprechenden Mutanten bei der Verwendung als Glykosid Synthetasen in der Lage wären, sowohl arabinofuranosidische als auch xylopyranosidische Substrate zu akzeptieren (Saha, 2000; Shallom et al., 2002a). Derartige Glykosid Synthetasen für furanosidische Substrate sind bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vorgestellt worden

1.3 Proteinkristallographie: Aktuelle Entwicklungen im Bereich der MAD-Phasierung

Die theoretischen Grundlagen der Proteinkristallographie sind bereits in zahlreichen Standardwerken (Blundell and Johnson, 1976; Ducruix, 1999; Shnueli, 1996) erschöpfend dargestellt worden. An dieser Stelle möchte ich einen Überblick über aktuelle Entwicklungen der MAD-Phasierungsmethode geben, da die MAD-Phasierung die wesentliche Hürde zur Strukturlösung der AbfA und somit Grundlage aller resultierenden Ergebnisse war. Bei den MAD-Phasierungsexperimenten, die mit der primitiv monoklinen Kristallform durchgeführt wurden, spielten Überlegungen über die Strategie der Datensammlung, die Auswahl der Synchrotronquelle und Grenzen bzw. Möglichkeiten der Methode eine zentrale Rolle.

1.3.1 Theoretischer Hintergrund der anomalen Streuung

Die Größe der Röntgenbeugung nimmt mit zunehmendem Beugungswinkel ab, die Größe der anomalen Streuung ist jedoch unabhängig vom Beugungswinkel.

$$f = f_o + f' + if''$$

Die gesamte Streuung f besteht aus f_o , der normalen oder Thomson-Streuung und f' und f'' , den dispersiven und anomalen Anteilen der anomalen Streuung. Der Streubeitrag der anomalen Streuung ist abhängig von der Energie der Messwellenlänge und somit an der Absorptionskante des anomal streuenden Atoms am größten. Die Absorption eines Röntgenphotons sorgt für einen Elektronenübergang, der die Amplitude und Phase der gebeugten Röntgenstrahlen beeinflusst und dies führt zur anomalen Streuung. Die spezifische Energie für einen solchen Elektronenübergang wird als Absorptionskante bezeichnet und kann mit Hilfe eines Röntgenabsorptionsspektrums identifiziert werden. Für die typischerweise im Proteinkristall enthaltenen Atome C, N, O, und S ist die Größe der anomalen Streuung normalerweise klein und kann vernachlässigt werden. In den letzten Jahren wurde jedoch an einigen Beispielen gezeigt, daß auch das anomale Signal des Schwefels für die Bestimmung der kristallographischen Phaseninformation genutzt werden kann (Dauter et al., 1999).

Die Synchrotrone, die für die Proteinkristallographie nutzbar sind, verfügen über eine modulierbare Wellenlänge in einem Energiebereich zwischen 25 und 6 keV (0.5 - 2.0 Å). In diesem Bereich liegen zahlreiche Absorptionskanten von Atomen, die ein für die Phasierung nutzbares Signal liefern. Diese Atome sind oft natürlicherweise im Proteinkristallen enthalten (beispielsweise Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo) oder können eingebracht werden (Se, Br, Kr, Hg, Pt, Lanthanide). Die Auswahl des geeigneten anomal streuenden Atoms ist von der jeweiligen Situation abhängig. So ist z. B. für die Phasierung eines Metalloproteins keine Derivatisierung des Kristalls notwendig. Es ist generell sinnvoller, eine kleine Anzahl von anomal streuenden Atomen mit einem vergleichsweise starken anomalen Signal zu haben,

als eine große Anzahl von schwach anomal streuenden Atomen. Daher ist der Einsatz von schwereren Atome wie den Lanthaniden zu favorisieren. Durch die elegante Möglichkeit des molekularbiologischen Einbaus von Selen als Seleno-Methionin wird die Se-Met MAD-Phasierungsmethode am häufigsten durchgeführt. Dieser Ansatz ist fast universal anwendbar, da Methionin in einer Häufigkeit von durchschnittlich 2 % in Proteinen vorkommt. Die meisten Kristalle der Se-Met Derivate sind strukturell isomorph zum nativen Protein. Darüber hinaus können sowohl Bakterien als auch eukaryontischen Zellen in Se-Met haltigen Medien wachsen.

1.3.2 Instrumentelle Rahmenbedingungen

In den letzten zwei Jahrzehnten hat sich die MAD- (*multiple anomalous dispersion*) neben der MIR-Phasierung (*multiple isomorphous displacement*) zur Methode der Wahl entwickelt, das kristallographische Phasenproblem im Bereich der Proteinkristallographie zu lösen (Hendrickson and Ogata, 1997). Obwohl die Methode auf einem kleinen anomalen Signal beruht, weist sie gegenüber der MIR-Methode eine Reihe von Vorteilen auf: Alle für die Phasierung notwendigen Daten können mit Hilfe eines Kristalls gewonnen werden, die Qualität der Anfangsphasen ist in der Regel höher als bei der MIR-Methode, und mit Hilfe von Methionin auxotrophen Zellen können Derivate mit hohen Besetzungsgraden des anomal streuenden Selens generiert werden. Die zeitintensive und auf Versuch und Irrtum basierende Suche nach isomorphen Schwermetallatomderivaten kann auf diese Weise signifikant verkürzt werden.

Die Mehrzahl der Probleme, die das Wachstum der MAD-Methode limitierten, sind in der Vergangenheit gelöst worden: Es steht ausreichend Meßzeit zur Verfügung, die instrumentellen und messtechnischen Rahmenbedingungen sind an vielen Synchrotronen optimiert worden, so daß die strengen experimentellen Anforderungen erfüllt werden können, d.h., die Meßplätze gewährleisten eine reproduzierbare Modulierung der Wellenlänge und deren Stabilität (Evans and Pettifer, 1996).

Zu dem enormen Wachstum der MAD-Methode hat darüber hinaus beigetragen, daß das Einfrieren der Proteinkristalle und die Messung bei Tieftemperaturen im Stickstoffstrom (100 K) mittlerweile zur Routine gehört (Garman and Schneider, 1997). Die Tieftemperaturmessungen sind für die MAD-Methode von großer Bedeutung, da die Stabilität der Proteinkristalle gegenüber der Synchrotronstrahlung durch die Begrenzung von Strahlenschäden deutlich erhöht werden kann, um einen kompletten MAD Datensatz von einem einzelnen Kristall zu gewinnen. Ferner sind die Auslesezeiten der neueren Detektoren (ADSC Quantum 210) auf unter 1 Sekunde verkürzt worden, so daß ein komplettes MAD Experiment, daß vor einigen Jahren noch mehre Tage andauerte, in Abhängigkeit von der Kristallsymmetrie und dem Diffraktionsvermögen innerhalb von wenigen Stunden durchgeführt werden kann.

1.3.3 Strategien der Datensammlung

Der Beitrag des anomalen Signals ist klein, normalerweise 2-5 % des Gesamtbeitrags, daher ist es für den Erfolg der meisten MAD-Experimente von entscheidender Bedeutung, die optimale Strategie der Datensammlung zu wählen, um eine möglichst hohe Datenqualität zu erhalten. Neben den Möglichkeiten, Friedel-Paare auf dem selben Diffraktionsbild zu sammeln oder die *inverse beam* Methode anzuwenden, ist es für die Datenqualität und somit für das Gelingen des Experiments außerordentlich wichtig, eine möglichst hohe Redundanz der Daten erreichen. Je häufiger ein Meßwert experimentell bestimmt wird, desto näher liegt der Mittelwert der Einzelmessungen am realen Wert. Bei der *inverse beam* Methode werden die Friedel Paare auf verschiedenen Diffraktionsbildern gemessen: Von einem definierten Winkelbereich werden Daten gemessen, anschließend wird der Kristall um 180° um die Spindelachse des Goniometers gedreht, um die entsprechenden Friedel Partner zu messen. Dies gewährleistet die Genauigkeit der gemessenen anomalen Differenzen, da sie in einem geringen zeitlichen Abstand gemessenen werden. Darüber hinaus erhöht diese Vorgehensweise die Redundanz der Daten. Daneben gibt es natürlich zahlreiche erfolgreiche Beispiele klassischer MAD-Phasierungsexperimente, in denen von beliebig orientierten Kristallen drei Datensätze nacheinander gemessen wurden. Aber gerade bei Experimenten, in denen man, wie bei den primitiv monoklinen Kristallen der AbfA mit 144 Selenpositionen, an die Grenzen der MAD-Methode stößt, entscheidet die richtige Strategie über Erfolg oder Mißerfolg des Experiments.

1.3.4 Bestimmen der geeigneten Messwellenlängen

Die Wellenlängen des MAD-Experiments müssen sorgfältig bestimmt werden, um den kleinen Anteil des anomal streuenden Atoms am Gesamtstreubeitrag zu maximieren. Die anomalen Streubeiträge (f'') müssen möglichst groß sein und darüber hinaus müssen die dispersiven Differenzen (f') maximiert werden. Die anomalen Beiträge führen zu den Bijvoet Differenzen, so daß die Friedel-Paare nicht mehr dieselben Strukturfaktoramplituden haben ($F_{hkl} \neq F_{-h-k-l}$). Die dispersiven Differenzen oder isomorphen Differenzen (f') führen zu Intensitätsunterschieden bei verschiedenen Wellenlängen. Typischerweise werden daher Datensätze bei drei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen, obwohl theoretisch zwei Messwellenlängen ausreichen würden, um die Phasen eindeutig zu bestimmen. Aktuelle methodische Arbeiten im Bereich der MAD-Phasierung beschäftigen sich mit der Frage, wieviele Messwellenlängen notwendig sind. Dabei wurde gezeigt, daß die Qualität der Anfangsphasen bei der Messung von nur 2 Wellenlängen vergleichbar ist mit der, die aus drei oder vier Wellenlängen berechnet wurden (Gonzalez et al., 1999). Dies konnte vor allem durch eine geeignete Wahl der Wellenlängen erreicht werden, die die dispersiven Differenzen maximierten. Insgesamt erscheint es aus heutiger Sicht sinnvoller zu sein, 2 bis 3 Wellenlängen mit hoher Redundanz zu messen und nicht Daten für 4 oder mehr Wellenlängen mit niedrigerer Redundanz zu bestimmen.

Die Messwellenlängen müssen mit Hilfe eines Röntgenabsorptionsspektrums experimentell bestimmt werden und können nicht theoretisch berechnet werden, da die chemische Umgebung der anomalen Streuer die Gestalt und Position (keV) der Absorptionskante beeinflussen kann. Dies kann in theoretischen Berechnungen nicht berücksichtigt werden (Cromer and Libermann, 1970). Mit Se als anomal streuendem Atom kann die Messung des Absorptionsspektrums durch zwei wesentliche Faktoren beeinflusst werden. Der erste Aspekt ist die im Proteinkristall stattfindende Oxidation des Selens, der zweite die Anisotropie der K-Absorptionskante des Selenomethionins (Hendrickson et al., 1989). Der Einfluß der Anisotropie kann zur Abschwächung der ansonsten gut definierten K-Absorptionskante führen. Die Oxidation des Selens kann ebenso zu schlechten Absorptionsspektren führen, dies kann jedoch durch die Zugabe von DTT während der Reinigung und Kristallisation verhindert werden (Doublet, 1997).

Bei großen Se-Substrukturen zeichnet sich zudem ein Trend ab, statt eines kompletten MAD Datensatzes, der aus drei Wellenlängen besteht, nur Daten der *Peak*-Wellenlänge mit hoher Redundanz zu vermessen. Dies resultiert aus der Beobachtung, daß der überwiegende Anteil der bisher bestimmten Se-Substrukturen mit Programmen gelöst wurde, die direkte Methoden verwenden (Snb, SHELXD). Bei diesen Programmen wird nur mit einer Wellenlänge gerechnet, dabei wird in der Regel die *Peak*-Wellenlänge verwendet, da die anomalen Differenzen (f'') bei dieser Wellenlänge am größten sind.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Aufgabenstellung der Arbeit war die röntgenkristallographische Untersuchung der α -L-Arabinofuranosidase. Da zu Beginn der Arbeit keine Struktur mit hinreichender Homologie bekannt war, mußte die Struktur *de novo* gelöst werden. Neben der Strukturlösung ließen sich weitere Ziele schwer definieren, da im Verlauf einer Strukturlösung viele geschwindigkeitsbestimmende Hindernisse entstehen können. Besonders der zeitliche Rahmen der beiden kritischsten Arbeitsschritte, der Kristallisation und Phasierung, waren im Vorfeld schwierig einzuordnen.

Daher war es das primäre Ziel, die Struktur der α -L-Arabinofuranosidase zu bestimmen, um Informationen über die Faltung des Proteins und die Architektur des aktiven Zentrums zu gewinnen. Diese Informationen erschienen besonders interessant, da kein Vertreter dieser GH-Familie strukturell charakterisiert war und diese Informationen für die gesamte Enzymfamilie (GH51) und für Arabinofuranosidasen anderer GH-Familien als repräsentativ einzuschätzen waren.

Zu Beginn der Arbeit wurde vom Kooperationspartner aus Israel (Dalia Shallom und Yuval Shoham) eine ausreichende Menge des gereinigten nativen Proteins zur Verfügung gestellt. Der Kooperationspartner stellte bereits im Angangsstadium des Projekts die Expression und Reinigung des Seleno-Methionin Derivats der α -L-Arabinofuranosidase für nachfolgende Se-Met MAD-Phasierungsexperimente in Aussicht.

Nach der erfolgreichen Strukturlösung eröffnete sich mit der Bestimmung der Strukturen entlang des Reaktionsmechanismus der AbfA ein weiteres Forschungsfeld. Dies war besonders aufschlußreich, um den postulierten Reaktionsmechanismus mit Hilfe von Atomkoordinaten absichern und beschreiben zu können. Darüber hinaus konnte die Substratspezifität der AbfA eingehend untersucht werden und ein Vergleich zu Glykosiden, die pyranosidische Substrate hydrolisieren, durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien, Geräte und EDV-Systeme

Die wichtigsten Geräte, Materialien und EDV-Systeme sind in Tabelle 2-1, Tabelle 2-2 und Tabelle 2-3 zusammengefasst.

Tabelle 2-1 Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Cryostream Cooler	Oxford Cryosystems, Oxford, England
<u>Drehanoden (Cu):</u>	
FR 591	Nonius, Delft, Niederlande
Rotaflex RU-200	Rigaku, Düsseldorf
<u>Dynamische Lichtstreuung:</u>	
DynaPro-801	Protein Solutions, Charlottesville, USA
<u>EDV-Systeme:</u>	
Indigo2 mit Irix 6.5	Silicon Graphics, München
Octane mit Irix 6.5	Silicon Graphics, München
O2 mit irix 6.5	Silicon Graphics, München
PC mit RedHat Linux 6.2	SL Datentechnik, Köln
<u>Flächenzähler:</u>	
DIP-2030	MAC Science, Yokohama, Japan
MAR 345	MAR Research, Hamburg
FPLC	Pharmacia, Uppsala, Schweden
<u>Massenspektrometrie:</u>	
MALDI-MS Biflex III (TOF)	Bruker, Bremen
ESI-MS LCQ (T)	Finnigan MAT, Bremen
<u>Monocromatoren:</u>	
MAC-XOS Doppelspiegel	MAC Science, Yokohama, Japan
CMF12-38Cu6 Doublemirror	Osmic, Northwood, USA
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Phast Elektrophoresesystem	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Pipettierautomat Multiprobe 104	Packard, Meriden, USA
Spektralphotometer Ultrospec 2000	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Spiegelreflexionskamera EOS 500N	Canon, Tokyo, Japan
<u>Waagen:</u>	
Analysenwaage FA-210-4	Faust, Köln
Laborwaage SBA 52	Scaltec, Heiligenstadt

Tabelle 2-2 Sonstige Materialien.

Bezeichnung	Hersteller
Bradford Proteinassay	BioRad, München
capillary Wachs	Hampton Research, Laguna Niguel, USA
Celluloseacetatfilter 0.2 µm	Sartorius, Göttingen
Celluloseacetatfilter 0.02 µm	Whatman, Maidstone, England
Centricon-30	Millipore, Eschborn
Cryoloops/Cryowerkzeuge	Hampton Research, Laguna Niguel, USA
Goniometerköpfe	Stoe, Darmstadt, Hampton Research, USA
Linbro-Schalen	Hampton Research, Laguna Niguel, USA
Makroröhrchen (0.1-1mm)	Hilgenfeld, Malsfeld
Superdex 200 HR10/30	Pharmacia, Uppsala, Schweden

Tabelle 2-3 Computerprogramme

Programm/Programmpaket	Referenz
<u>Kristallographie:</u>	
CCP4/CCP4i -suite	CCP4 (1194)
CNS-suite	Brunger <i>et al.</i> (1998)
HKL-suite	Otwinowski & Minor (1997)
Shake & Bake	Weeks & Miller (1999)
SOLVE/RESOLVE	Terwilliger & Bredendzen (1999)
<u>Graphikprogramme:</u>	
O	Jones <i>et al.</i> (1991)
BRAGI	Schomburg & Reichelt
Pymol	DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA
<u>Analyse von Röntgenstrukturen:</u>	
CCP4/CCP4i -suite	CCP4 (1194)
DSSP	Kabsch & Sander (1983)
TOPS	Westhead <i>et al.</i> (1999)
<u>Darstellung von Strukturen und Elektronendichten</u>	
BOBSCRIPT	Esnouf (1997)
MOLSCRIPT	Kraulis (1991)
RASTER3D	Merrit & Cacon (1997)
Pymol	DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA

2.2 Proteinanalytik

2.2.1 Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Verfahren nach Bradford mit dem Kit von BioRad (München) angewendet. Das Protein bildet mit dem Reagenz Coomassie Brilliant Blue einen gefärbten Komplex, der bei einer Wellenlänge von 595 nm absorbiert. Die Komplexbildung verläuft linear mit steigender Proteinkonzentration. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wird eine mit Rinderserumalbumin bestimmte Eichkurve verwendet.

2.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Phast System von Pharmacia eingesetzt. Bei der SDS-PAGE werden vorgefertigte Gradientengele (PHAST-Gradientengel) eingesetzt, die aus Sammelgelzone und Trenngelzone mit 8-25 % Acrylamid bestehen. Proteinlösungen verschiedener Konzentration (0.1 bis 1.0 mg ml^{-1}) wurden mit dem Auftragspuffer (8 ml Verdünnungspuffer, 1 g SDS, 4mg Bromphenolblau, 2 ml β -Mercaptoethanol in einem definierten Verhältnis gemischt und 5 min bei 95°C inkubiert, zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Trennung (Pharmacia Separation Technique File No. 110) wurden die Proteine durch eine sensitive Silberfärbung sichtbar gemacht (Pharmacia Development Technique File No. 210). Der LMW-Marker (Low Molecular Weight) der Firma Pharmacia wurde als Standard verwendet (Abbildung 3-1, A).

Bei der nativen PAGE wurden $1 \mu\text{l}$ einer nativen Proteinprobe mit einer Konzentration zwischen 0.1 und 1.0 mg ml^{-1} auf ein PHAST Gradientengel aufgetragen. Die Trennung erfolgte nach dem Pharmacia Separation Technique File No. 120. Ein Standard wurde nicht aufgetragen, da jedes Protein im Gegensatz zur SDS-PAGE ein von Größe und Ladung abhängiges individuelles Laufverhalten zeigt (Abbildung 3-1, B; Abbildung 3-10).

2.2.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung bestimmt den hydrodynamischen Radius des Proteins, woraus über das Molekulargewicht des Proteins das Oligomerisierungsverhalten bzw. die Homogenität auf der Ebene der Aggregation abgeleitet werden kann. Für die Messung wurde das Gerät DynaPro-801 (Protein Solutions) verwendet. Für die Messungen bei 20°C wurden Proteinkonzentrationen zwischen $1 - 15 \text{ mg ml}^{-1}$ eingesetzt, um eine konzentrationsabhängige Oligomerisierung auszuschließen. Die Proteinproben wurden vor jeder Messung durch einen $0.02 \mu\text{m}$ Filter (Fa. Whatman) filtriert. Für die einzelnen Proben wurden mindestens 20 Einzelmessungen aufgenommen. Die Auswertung erfolgte unter der Annahme einer monomodalen oder bimodalen Verteilung mit dem Modell eines globulären

Proteins für die Berechnung der Molmasse aus dem hydrodynamischen Radius mit der Software des Geräts.

2.2.4 Gelfiltration

Die gereinigte Proteinlösung wurde bei einer Flußrate von 0.4 ml/min auf die äquilibrierte Säule (Superdex 200 HR, Fa. Amersham Pharmacia) aufgetragen und mit einem Elutionspuffer bestehend aus 50 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl und 1mM NaN₃ (pH=7.5) bei einer Temperatur von 4°C chromatographiert. Zur Abschätzung des Oligomerisierungsverhaltens der AbfA wurde ein Eichlauf mit dem LMW-Marker (Low Molecular Weight) der Firma Pharmacia durchgeführt, der ein Gemisch an Proteinen mit bekannten Molekulargewichten enthält.

2.2.5 Massenspektrometrie

2.2.5.1 MALDI-TOF MS

Zur Entsalzung der Proteinproben wurden 100 µl der Enzymlösung mit einer Konzentration zwischen 1–10 mg ml⁻¹ gegen 0.1 % TFA dialysiert. 5 µl dieser Lösung wurden anschließend mit 15 µl 0.1% TFA und 30 µl einer gesättigten Sinapinsäurelösung (Acetonitril-Wasser 1:2 0.1 % TFA) gemischt. Auf den Spots des MALDI Probenhalters wurden vorher 0.5 µl einer in Ethanol gesättigten Sinapinsäurelösung als Dünnschicht präpariert. Nach dem Trocknen der Dünnschicht wurden 0.5 µl der Proteinprobe auf die einzelnen Spots aufgebracht und unter Luftzug getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die Probe mit Rinderserumalbumin als Standard vermessen. Ziel dieser Vorgehensweise ist es, die Proteinprobe mit einem Überschuss an Matrixsubstanz (Sinapinsäure) zu kokristallisieren. Mit Laserlicht einer Wellenlänge in dem Bereich des Absorptionsmaximums der Matrixsubstanz wird anschließend die kokristallisierte Probe mit Laserlicht unter Hochvakuum bestrahlt (MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) (Karas and Hillenkamp, 1988). Dadurch wird die Proteinprobe zusammen mit der Matrix in die Gasphase gerissen und anschließend in Abhängigkeit von Masse und Ladung (m/z) in einem Flugzeitanalysator (TOF: *Time of flight*) analysiert.

2.2.5.2 ESI MS

Zur ESI (Electro Spray Ionization) wurde die Enzymlösung gegen ein Methanol-Wasser-Gemisch 1:1 mit 0.1 % Essigsäure dialysiert. Es wurden ca. 100 µl mit einer Proteinkonzentration von 10 pmol/µl benötigt.

2.3 Proteinkristallisation

2.3.1 Kristallisation

Für die Kristallisation wurden die aufgereinigten Proteinproben durch einen 0.02 µm Filter filtriert, um eventuell vorhandene Verunreinigungen abzutrennen. Dabei wurden dieselben Filter (Fa. Whatman) verwendet wie bei der Probenvorbereitung für die Experimente der dynamischen Lichtstreuung (Abschnitt 3.1.2), um die Homogenität der eingesetzten Probe sicherzustellen. Die Kristallisationsexperimente wurden mit Linbro-Platten (Hampton Research) und Polystyrol- und Polypropylen-Brücken bzw. Deckgläschen aus Glas durchgeführt. Zur Kristallisation wurde die Dampfdiffusionsmethode mit sitzendem und hängenden Tropfen eingesetzt. Der Kristallisationstropfen wurde aus Proteinlösung, Reservoirlösung und gegebenenfalls Additiven gemischt. Das Volumen der Kristallisationstropfen zu Beginn des Experiments variierte zwischen 4 und 20 µl. Die Ergebnisse wurden regelmäßig unter dem Stereomikroskop beobachtet und dokumentiert. Bei der Definition der Kristallisationsbedingung handelt es sich grundsätzlich um die Definition der Zusammensetzung des Reservoirs, die Komponenten des Puffers der Proteinlösung werden vernachlässigt. Zur Kristallisation wurde die Strategie der unvollständigen faktoriellen Suche nach Jancarik & Kim (Jancarik, 1991) verfolgt. Die zuerst gefundenen Kristallisationsbedingungen wurden durch die systematische Variation der verschiedenen Parameter optimiert. Die Reservoirs wurden überwiegend von Hand pipettiert und gemischt.

2.3.2 Impfkristallisation

Für die Impfkristallisation (*Mikroseeding*) bei der monoklinen Kristallform wurden die Proteinkristalle im Tropfen mit einer Nadel zerstört und die Kristallsplitter in eine Stabilisierungslösung überführt, die der Zusammensetzung des Reservoir entspricht. Dabei wurde 1 µl der Kristallsplittersuspension in 200 µl der Stabilisierungslösung überführt. Anschließend konnte die Anzahl der Kristallsplitter durch die weitere Verdünnung der Stabilisierungslösung gesteuert werden. Für die Kristallisationsansätze wurde die Fällungsmittelkonzentration so erniedrigt, daß keine spontane Kristallisation stattfand. Nach einer Voräquibrierungszeit, die je nach Tropfengröße bis zu eine Woche betrug, wurden die Kristallisationsansätze mit 0.5 µl der entsprechend verdünnten Impflösung versetzt.

2.3.3 Herstellung von Schwermetallatomderivaten

Für die Herstellung der Schwermetallatomderivate wurden die zu derivatisierenden Kristalle auf eine neue Brücke überführt. Besonders für die mechanisch sehr instabilen monoklinen

Kristalle erwies es sich im Hinblick auf die Mosaizität der Kristalle als vorteilhaft, diese mit Hilfe einer Pipette aus dem Kristallisationstropfen auf die neue Brücke zu überführen und nicht mit Hilfe einer Nylonschleife. Da die Kristalle der AbfA dazu neigten, am Boden der Kristallisationsbrücke zu haften, mußte vorher mit einer Nadel in der Nähe der Kristalle in die Brücke gestochen werden, um diese zu lösen. Zur Derivatisierung wurden die Kristalle, die sich in 9 µl der Stabilisierungslösung befanden, mit 1 µl der Schwermetalllösung versetzt und für einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Das Reservoir wurde dazu mit einem Klebestreifen luftdicht verschlossen. Für eine reproduzierbare Herstellung der Schwermetallatomderivate und Stabilität der Kristalle war es wichtig, die Schwermetalllösungen in der Stabilisierungslösung herzustellen bzw. zu verdünnen und nicht mit Wasser. Alternativ war es möglich, bei der Herstellung der Schwermetalllösungen statt der Stabilisierungslösung die Cryolösung zu verwenden, um die Kristalle direkt nach der Derivatisierung röntgenkristallographisch untersuchen zu können.

2.4 Röntgendiffraktometrie

2.4.1 Kristallmontage

Für die Tieftemperaturmessungen mußte den Kristallisationslösungen beider Kristallformen 10 % Glycerin hinzugefügt werden. Die Konzentration des Glycerins mußte schrittweise erhöht werden, da besonders die primitiv monoklinen Kristalle gegenüber dieser Veränderung der Lösungsumgebung besonders sensitiv waren. Bei den monoklinen Kristallen wurde in einem ersten Schritt das Reservoir mit 1 ml des Cryopuffers gefüllt, der Ansatz luftdicht verschlossen und über einen Zeitraum von mindestens 12 Stunden stehen gelassen. Anschließend wurde die Hälfte des Tropfenvolumens entfernt und durch eine um 2.5 % Glycerin angereicherte Kristallisationslösung ersetzt, so daß sich eine Konzentration von 1.25 % Glycerin im Tropfen ergab. In gleicher Weise wurde nachfolgend jeweils mit einem Abstand von einer Stunde die Hälfte des Kristallisationstropfens durch eine entsprechende Cryolösung ersetzt, die mit 5 %, 7.5 % 10% und 12.% Glycerin angereichert war. Eine zehnpromtente Konzentration an Glycerin war für Tieftemperaturmessungen ausreichend, höhere Konzentration an Glycerin (12.5 %) führten gerade bei größeren Kristallen zu deutlichen Rissen und einem fast vollständigen Verlust des Diffraktionsvermögens.

Bei den rhomboedrischen Kristallen konnte das gesamte Cryoprotokoll innerhalb von 30 Minuten durchgeführt werden. Ein direktes Überführen der Kristalle aus der Kristallisationslösung in den Cryopuffer war allerdings nicht möglich, so daß die Glycerinkonzentration wie oben beschrieben Schritt für Schritt erhöht wurde.

Für die Messung wurden die Kristalle mit einer Nylonschleife (Fa. Hampton Research) aus der Cryolösung entfernt und möglichst schnell in einem Stickstoffstrom auf 100 K gekühlt. Anschließend wurde der Kristall so justiert, daß er zu jedem Zeitpunkt der Messung in der Strahlebene lag.

2.4.2 Diffraktionsexperimente

Die Kristalle der AbfA wurden mit den am Institut zur Verfügung stehenden Drehanoden mit Cu-K α -Strahlung und unter Verwendung von Synchrotronstrahlung am EMBL in Hamburg und Grenoble (Frankreich) vermessen. Die Datensätze der in dieser Arbeit vorgestellten Strukturen wurden alle bei 100 K gemessen: Sowohl die Röntgenquellen am Institut, als auch die Meßplätze am EMBL waren mit Cryostream Cooler 600 Cryoanlagen von Oxford Cryosystems, Oxford, UK, ausgestattet.

2.4.2.1 Se-Met AbfA, R3

Der Datensatz des Se-Met-Derivats, der zu einer der beiden Strukturlösungen führte, wurde am Meßplatz der EMBL-Outstation am DORIS-Speicherring des DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron) in Hamburg an der *Beamline* BW7A gemessen. An diesem Meßplatz ist die Wellenlänge modulierbar, und es steht ein MAR CCD-Detektor mit 165 mm Durchmesser zur Verfügung. Zu Beginn des Experiments wurde zur Bestimmung der drei Wellenlängen ein Röntgenfluoreszenzspektrum des Se-Met-Kristalls aufgenommen. Die Meßwellenlängen wurden per visueller Inspektion des Spektrums festgelegt, das Programm CHOOCH (Evans and Pettifer, 2001) wurde auf Anraten der EMBL-Mitarbeiter zur Auswertung nicht herangezogen. Die drei Datensätze wurden in der Reihenfolge *Peak*, *Inflection point* und *Remote*-Wellenlänge von einem Kristall nacheinander gemessen. Die *Peak*-Wellenlänge wurde für eine mögliche SAD-Phasierung mit einer höheren Redundanz vermessen als die anderen beiden Wellenlängen. Strahlenschäden waren trotz der intensiven Synchrotronstrahlung im Laufe der Messung, die insgesamt etwa 48 Stunden dauerte, nicht feststellbar.

Tabelle 2-4 Messparameter der MAD Datensätze

Datensatz	peak	inflection	remote
höchste Auflösung [Å]	1.68	1.68	1.68
Wellenlänge [Å]	0.9793	0.9797	0.9645
Kristall-Detektor [mm]	120	120	120
Rotation pro Bild [°]	0.3	0.3	0.3
Bilder	490	364	295
Gesamtrotation [°]	147	109.2	88.5
Detektor	ccd-165mm	ccd-165mm	ccd-165mm

Die Se-Met MAD-Phasierungsexperimente der primitiv monoklinen Kristallform ($P2_1$) wurden mit vergleichbarer Strategie durchgeführt. Eines dieser Experimente wurde ebenfalls an der BW7A am EMBL in Hamburg, das andere am *European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)* in Grenoble am Meßplatz ID 29 mit einem CCD-Detektor ADSC Quantum 210

durchgeführt. Die Parameter dieser Messungen sind aufgrund der negativen Ergebnisse dieser Phasierungsexperimente in dieser Arbeit nicht angeführt.

2.4.2.2 MIR Phasierung, R3

Die Datensätze der MIR-Phasierung wurde mit $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung an einer hauseigenen Drehanode (Rigaku RU200) gemessen. Die Drehanode wurde bei einer Hochspannung von 45 kV und einem Stromfluss von 100 mA betrieben. Die gebeugten Röntgenstrahlen wurden mit einem MAR 345 Flächenzähler gemessen. Für die MIR Phasierung wurden die nativen Kristalle der AbfA der rhomboedrischen Kristallform mit Platin und Quecksilber derivatisiert (siehe Abschnitt 3.4.2).

Tabelle 2-5 Messparameter der MIR Phasierung

Datensatz	Pt	Hg
höchste Auflösung [Å]	2.05	2.1
Wellenlänge [Å]	1.54178	1.54178
Kristall-Detektor [mm]	180	175
Rotation pro Bild [°]	1	1
Bilder	82	76
Gesamtrotation [°]	82	76
Bildspeicherplatte [mm]	345mm	345mm

2.4.2.3 4-Nitrophenyl-Ara (E175A), R3

Der Datensatz der 4-Nitrophenyl-Ara Struktur wurde an der *multipol wiggler beamline* BW7B (DESY c/o EMBL Hamburg), die mit einem MAR 345-Flächenzähler ausgestattet war, gemessen. Im Gegensatz zur BW7A besitzt die BW7B eine feste Wellenlänge, die etwa doppelt so intensiv ist wie die der BW7A. Durch die hohe Intensität der zur Verfügung stehenden Synchrotronstrahlung eignet sich dieser Meßplatz, um Proteinkristalle bis zu ihrem Auflösungsmaximum zu vermessen. Der hochaufgelöste 1.20 Å Datensatz der 4-Nitrophenyl-Ara Struktur wurde zur Vermeidung von gesättigten Reflexen in den niedrig aufgelösten Bereichen in drei Runden unterschiedlicher Auflösung gemessen.

Tabelle 2-6 Messparameter des 4-Nitrophenyl-Ara Datensatzes

Datensatz	hoch	mittel	niedrig
höchste Auflösung [Å]	1.2	1.6	3.75
Wellenlänge [Å]	0.8463	0.8463	0.8463
Kristall-Detektor [mm]	190	220	650
Rotation pro Bild [°]	0.5	0.5	2
Bilder	106	117	37
Gesamtrotation [°]	53	58.5	74
Bildspeicherplatte [mm]	345mm	345mm	300mm
Pixelgröße [µm]	150	150	150

2.4.2.4 native AbfA, Ara- α (1,3)-Xyl (E175A) und kovalentes Reaktionsintermediat (E175A), R3

Die drei Datensätze der rhomboedrischen Kristallform wurden mit CuK α -Strahlung einer hauseigenen Drehanode (Rigaku RU-200 B der Firma Rigaku, Düsseldorf) gemessen. Die Drehanode wurde mit einer Hochspannung von 45 kV und einem Stromfluß von 100 mA betrieben. Die Röntgenstrahlung wird an diesem Meßplatz mit einem CMF12-38Cu6 Monochromator der Firma Osmic, Northwood, USA, monochromatisiert. Die gebeugten Röntgenstrahlen wurden mit einem MAR 345 Flächenzähler gemessen.

Tabelle 2-7 Messparameter der mit CuK α -Strahlung gemessenen R3 Datensätze.

Datensatz	nativ	Ara- α (1,3)-Xyl	Intermediat
höchste Auflösung [Å]	1.75	1.8	2.1
Wellenlänge [Å]	1.54178	1.54178	1.54178
Kristall-Detektor [mm]	130	140	160
Rotation pro Bild [°]	1	1	1
Bilder	116	85	82
Gesamtrotation [°]	116	85	82
Bildspeicherplatte [mm]	345	345	345

2.4.2.5 native AbfA, P2,

Der native Datensatz der primitiv monoklinen Kristallform mit einem Auflösungsmaximum von 2.6 Å wurde an der Beamline X11 am EMBL in Hamburg mit einem MAR CCD Detektor gemessen. Aus Zeitgründen konnte dieser Datensatz nicht vollständig gemessen werden.

Tabelle 2-8 Messparameter für den nativen Datensatz der $P2_1$ Raumgruppe

Datensatz	native AbfA
höchste Auflösung [Å]	2.6
Wellenlänge [Å]	0.9080
Kristall-Detektor [mm]	220
Rotation pro Bild [°]	0.5
Bilder	245
Gesamtrotation [°]	122.5
Detektor	ccd-165mm

2.4.2.6 E294A, $P2_1$

Der Datensatz der E294A Mutante wurde am EMBL in Hamburg an der *multipol wiggler beamline* BW7B auf einer MAR345 Bildspeicherplatte gemessen. Aufgrund der hohen Mosaizität wurde der Kristall zur Vermeidung von sich überlappenden Reflexen bei jeder Aufnahme um 0.3° gedreht.

Tabelle 2-9 Messparameter des Datensatzes der E294A Mutante

Datensatz	E294A
höchste Auflösung [Å]	2.35
Wellenlänge [Å]	0.8431
Kristall-Detektor [mm]	450
Rotation pro Bild [°]	0.3
Bilder	393
Gesamtrotation [°]	117.9
Bildspeicherplatte [mm]	345

2.5 Datenreduktion

Die Röntgendiffraktionsbilder aller gemessenen Datensätze wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK aus dem HKL-Programmpaket (Otwinowski and Minor, 1997) indiziert, integriert und skaliert. Bei der Reduktion der MAD-Daten wurde für die weiteren Rechnungen mit SOLVE (Terwilliger and Berendzen, 1999) mit den Optionen *anomalous* und *no merge original index* skaliert, um den in SOLVE implementierten lokalen Skalierungsalgorithmus, der symmetrieverwandte Reflexe zusammenfaßt, zu nutzen. Für die weiterführenden Rechnungen zur Positionsbestimmung mit SnB und SHELXD wurde lediglich mit der Option *anomalous* oder *scale anomalous* skaliert.

Die Strukturfaktoramplituden wurden bei allen Datensätzen mit TRUNCATE (CCP4, 1994) aus den gemessenen Intensitäten berechnet. Zur Berechnung des freien R-Werts wurden 5 % der gemessenen Reflexe mit UNIQUEIFY (CCP4, 1994) randomisiert ausgewählt. Für beide Kristallformen wurde die Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit (Packungsdichte) bzw. die Packungsdichte im Kristall mit MATTHEWS_COEFF (CCP4, 1994) abgeschätzt. Die Selbstrotationsfunktionen wurden mit GLRF (Tong and Rossman, 1997), native Pattersonfunktionen mit FFT (CCP4, 1994) berechnet.

2.6 Strukturlösungen: MAD und MIR

2.6.1 Detektion der Selen-Substruktur

Die Selensubstruktur der Se-Met-AbfA wurde unabhängig voneinander mit SOLVE (Terwilliger and Berendzen, 1999), Snb (Weeks et al., 1994) und SHELXD gelöst.

Innerhalb der automatischen Routinen von SOLVE, das im Gegensatz zu Snb und SHELXD auf Differenz-Patterson-Methoden basiert, werden nach der lokalen Skalierung der symmetrieverwandten Reflexe die drei Datensätze gegeneinander skaliert und die anomalen (f'') und dispersiven (f') Streubeiträge verfeinert. Für eine erfolgreiche Suche und Verfeinerung der Selenpositionen konnte das Auflösungsmaximum zwischen 1.7 und 3.0 Å variiert werden. Weiterhin wurden alle Selenpositionen nur unter Verwendung der Peak-Wellenlänge eindeutig bestimmt. Ein Schlüssel zum Erfolg des simulierten SAD-Experiments war sicherlich die hohe Redundanz, mit der die Peak-Wellenlänge gemessen wurde.

Mit den auf direkten Methoden basierenden Programmen Snb und SHELXD konnte die Selensubstruktur ebenfalls gelöst werden. Aufgrund der größeren Erfahrung im Umgang mit dem Programm, dem hohen Ausmaß an Automatisierung und dem daraus resultierenden zeitlichen Vorteil wurden nachfolgende Arbeitsschritte und Berechnungen mit SOLVE durchgeführt. Ein weitergehender, methodischer Vergleich der einzelnen Phasierungsmethoden und Programme am Beispiel der AbfA war nicht Zielsetzung dieser Arbeit.

2.6.2 Detektion isomorpher Schwermetallatomderivate

Die Daten potentieller Schwermetallatomderivate wurden mit DENZO und SCALEIT (CCP4, 1994) jeweils gegen die nativen Daten skaliert. Als erstes Kriterium fungierte der in DENZO bei der Skalierung von wenigen Röntgenbildern des potentiellen Derivats gegen den nativen Datensatz berechnete χ^2 -Wert. Ein zu kleiner χ^2 -Wert (< 2) bei geringen Intensitätsunterschieden zwischen den nativen Daten und dem potentiellen Derivat ist ein Hinweis auf unzureichende Derivatisierung, wohingegen ein zu großer χ^2 -Wert (> 50) ein Hinweis auf ein nicht isomorphes Derivat ist. Als weiteres Kriterium wurden die mit SCALEIT berechneten R_{iso} -Werte bzw. der *gradient*, der ein Maß für die gemessenen Intensitätsunterschiede ist, herangezogen. Für die Berechnung dieser Werte sollte der Datensatz des möglichen Schwermetallatomderivats eine Vollständigkeit von mindestens 30 % aufweisen.

Anschließend wurden mit CNS (Brunger et al., 1998) isomorphe Differenzpattersonfunktionen berechnet, um die Eignung der potentiellen Derivate zu beurteilen. Die Schwermetallatomsubstrukturen des Quecksilber- und Platinderivats wurden anschließend mit den automatischen Suchroutinen in SOLVE (Terwilliger and Berendzen, 1999) gelöst.

2.6.3 Dichtemodifikation, Modellbau und Verfeinerung

2.6.3.1 MAD-Phasierung

Im Rahmen der Strukturlösung der AbfA wurden die Rechnungen zur Dichtemodifikation und die Phasenerweiterung auf 1.68 Å mit dem Programm RESOLVE durchgeführt. In den neueren Versionen von RESOLVE (ab Version 2.03) wird die nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) anhand der Schwermetallatomsubstruktur bestimmt und für die folgenden Mittelungsrechnungen verwendet. Im Falle der Strukturlösung der AbfA konnten die NCS-Matrizen innerhalb des Dimers aus den Selenpositionen unter Verwendung der Standardparameter bestimmt werden. Die Qualität der NCS gemittelten und phasenerweiterten Elektronendichtefunktion war hoch, so daß die automatische ModellbauRoutine in RESOLVE große Teile des AbfA Strukturmodells bauen konnte. Ein vollständigeres Modell konnte mit dem Programm ARP/wARP (Perrakis et al., 1999) in die auf 1.68 Å Auflösung phasenerweiterte Dichte gebaut werden. Dabei wurde in einem ersten Schritt mit dem *warpNtrace*-Modus ein Hybridmodell generiert, in das mit dem *sidechain-docking*-Modus anschließend die Sequenz der AbfA in das Modell gelegt wurde. Wurden Dichtemodifikation, NCS-Mittelung und Phasenerweiterung mit den entsprechenden CCP4-Programmen (CCP4, 1994) durchgeführt, konnte im Anschluß ein vergleichbar vollständiges Modell mit ARP/WARP generiert werden. Im Anschluß wurde das Strukturmodell in mehreren Zyklen von manuellen Modellbauarbeiten in O (Jones et al., 1991) und Verfeinerungsrechnungen mit REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) vervollständigt und

verfeinert. Die Wassersuche wurde mit der ARP/wARP Routine durchgeführt, die in der REFMAC5 Version von CCP4i implementiert ist. Nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) *restraints* oder *constraints* wurden bei der Verfeinerung der Se-Met.Abfa nicht berücksichtigt.

2.6.3.2 MIR-Phasierung

Die Strukturlösung mittels des multiplen isomorphen Ersatzes (MIR) wurde mit der gleichen Abfolge an Programmen (SOLVE/RESOLVE, jeweils Standardparameter) durchgeführt wie bei der MAD-Phasierung. Das mit den Strukturfaktoramplituden und Phasen der MIR-Phasierung generierte Strukturmodell aus RESOLVE war allerdings signifikant weniger vollständig als das korrespondierende Modell der MAD-Phasierung. Dies entsprach den Erwartungen, da die aus MAD-Phasierungen resultierenden Anfangsphasen in der Regel besser sind. Darüber hinaus wurden im Falle der MAD-Phasierung experimentelle Phasen bis 1.68 Å Auflösung bestimmt. Für weitere Strukturlösungen der Abfa wurde daher die MAD Struktur als Startmodell verwendet. Das aus der MIR-Phasierung resultierende Strukturmodell wurde nicht weiter vervollständigt.

2.6.4 Strukturlösung und Verfeinerung der R3 Strukturen

Die verfeinerte MAD Struktur (Abschnitt 3.7.1) diente als Startmodell für die Verfeinerung aller Abfa Strukturen der rhomboedrischen Kristallform: der nativen Abfa, der beiden Michaelis-Menten Komplexe und des kovalenten Reaktionsintermediats. Die drei Substrate wurden per Hand modelliert und einer Energieminimierung unterzogen. Für die Verfeinerung mit REFMAC5 wurden für die drei Substrate Konfigurationsdateien erstellt. Die Besetzungsfaktoren aller Substrate wurden für die Verfeinerungsrechnungen auf 1.0 gesetzt. Die nicht-kristallographische Symmetrie des Dimers wurde bei allen Verfeinerungen nicht berücksichtigt. Bei der Verfeinerung der 4-Nitrophenyl-Ara Struktur, für die Daten bis in einen atomaren Auflösungsbereich gesammelt werden konnten, wurden anisotrope Temperaturfaktoren berücksichtigt, die Gewichtung der gemessenen Röntgenterme im Vergleich zu den stereochemischen Zwängen erhöht und die Beiträge von Wasserstoffatomen berücksichtigt. Bei allen anderen Strukturen wurde besonderer Wert auf die stereochemische Qualität der Modelle gelegt, daher wurden die gemessenen Röntgenterme im Vergleich zu den stereochemischen Zwängen weniger stark gewichtet.

2.6.5 Strukturlösung der P2₁ Strukturen – Molekularer Ersatz

Bei der Strukturlösung der Abfa der Raumgruppe P2₁ wurde ein Dimer der nativen Abfa der Raumgruppe R3 verwendet, da Rechnungen mit einem Monomer nicht zu weiterführenden Ergebnissen führten. Mit dem Programm MOLRPEP konnten nur fünf plausible Lösungen gefunden werden, was mit den Symmetrieüberlegungen der primitiv monoklinen

Raumgruppe nicht konsistent war. Mit der Kenntnis der internen 222-Symmetrie des ersten Hexamers konnte das 6. Dimer zur Komplettierung des zweiten Hexamers manuell in O (Jones et al., 1991) erzeugt werden. Nachfolgende Verfeinerungsrechnungen wurden mit REFMAC5 durchgeführt. Im Gegensatz zu den Verfeinerungsrechnungen der Strukturen der rhomboedrischen Kristallform wurde bei der Strukturverfeinerung die nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) innerhalb der zwei Hexamere bzw. der zwölf Monomere durch *restraints* berücksichtigt. Der Wassereinbau wurde ebenfalls mit der in REFMAC5 implementierten ARP/wARP Routine durchgeführt. Analog zu der in Abschnitt 2.6.4 beschriebenen Vorgehensweise diente die endverfeinerte Struktur der E294A Mutante als Startmodell für die Verfeinerung der nativen AbfA in der primitiv monoklinen Kristallform.

2.6.6 Analyse der Strukturmodelle

Während der Verfeinerung wurden die Qualität der Modelle mit PROCHECK (Laskowski et al., 1985) und den Routinen in REFMAC (Murshudov et al., 1997) auf ihre stereochemische Plausibilität geprüft. Darüber hinaus wurden mit SFCHECK (CCP4, 1994) Dichte-Korrelationskoeffizienten für alle Haupt- und Seitenkettenatome berechnet. Lieferten die einzelnen Programme Hinweise auf stereochemische Mängel oder geringe Korrelationskoeffizienten der Elektronendichte für einzelne Residuen oder Teilbereiche der Struktur, wurde das Modell in O überprüft und gegebenenfalls manuell angepaßt. Ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung des Verfeinerungsprozesses war die Beobachtung der R-Werte. Fiel der R_{free} in vergleichbarem Maße wie der R_{work} , war dies ein Hinweis auf eine signifikante Verbesserung des Strukturmodells. Der R_{free} basiert auf dem Prinzip der Kreuzvalidierung, d. h. aus einem Teil der Daten, der bei der Verfeinerung unberücksichtigt bleibt, wird der freie R_{free} berechnet.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Proteinanalytik

3.1.1 SDS-Gelelektrophorese und native Gelelektrophorese

Die vom Kooperationspartner expremierte und gereinigte Proteinprobe wurde mit SDS-Gelelektrophorese und nativer Gelelektrophorese analysiert. Abbildung 3-1 A zeigt das silbergefärbte SDS-Gel der nativen AbfA. Auf der mittleren und rechten Spur sind zwei verschiedene Konzentrationen der AbfA Lösung (0.1 bzw. 1.0 mg ml⁻¹) aufgetragen, die wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben mit dem Auftragspuffer verdünnt wurden. Das SDS-Gel der AbfA zeigt jeweils nur eine einzige Bande und liefert folglich keine Hinweise auf eine Kontamination mit Fremdproteinen. Das Protein war demnach elektrophoretisch rein. Die linke Spur zeigt die Marker-Proteine, deren Größen links neben dem Gel angegeben sind. Ferner bestätigt das SDS-Gel das aus der Sequenz berechnete Molekulargewicht der monomeren AbfA von etwa 57 kDa.

Das native Gel (Abbildung 3-1 B) zeigt für eine AbfA Konzentration von 0.1 mg ml⁻¹ (linke und mittlere Spur) nur eine einzige Bande. Bei einer AbfA Konzentration von 1.0 mg ml⁻¹ (rechte Spur) erscheint deutlich eine zweite Bande, die durch das Vorliegen einer Isoform der AbfA erklärt werden könnte. Die möglicherweise vorhandene Isoform der AbfA beeinflusst aber weder das mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) untersuchte Aggregationsverhalten noch besitzt sie ein anderes Retentionsvolumen in der Gelfiltration.

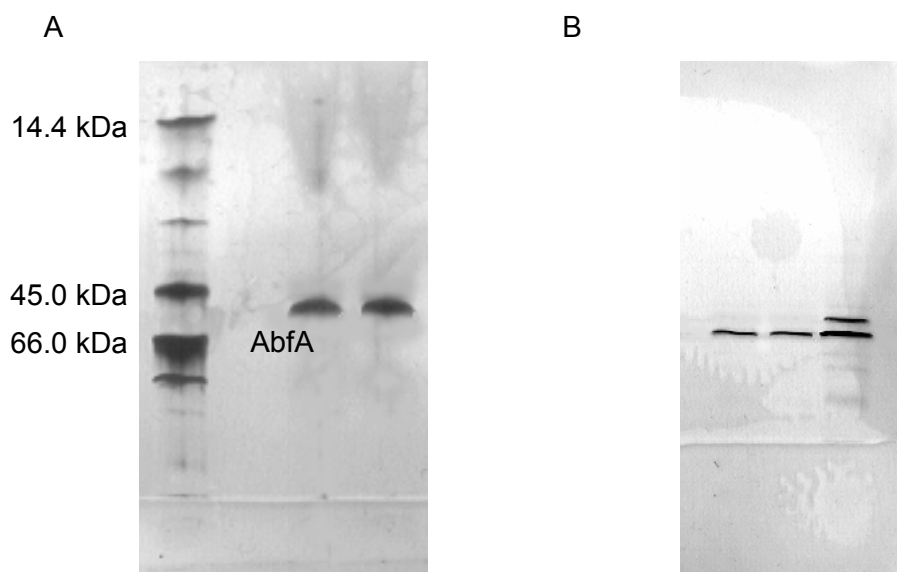


Abbildung 3-1 (A) SDS Gelelektrophorese (B) Native Gelelektrophorese

Darüber hinaus erscheint die zweite Bande erst bei einer Proteinkonzentration von 1 mg ml^{-1} , was auch durch eine Überladung des Gels erklärt werden könnte. Die erfolgreiche Kristallisation der AbfA wird durch das mögliche Vorhandensein einer Isoform nicht inhibiert (Abschnitt 3.2).

3.1.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Mit der dynamischen Lichtstreuung wurde der hydrodynamische Radius gemessen und daraus das Aggregationsverhalten und das Molvolumen der AbfA untersucht. Die *Baseline* und der SOS-Fehler sind zwei berechnete Größen, um die Qualität der Messung abzuschätzen. Die *Baseline* leitet sich von der Vollständigkeit der Autokorrelationsfunktion ab. Der SOS-Fehler (*sum of squares*) gibt die Summe der mittleren quadratischen Fehler zwischen den gemessenen und den an die Autokorrelationsfunktion angepaßten Daten an. Für eine monomodale Verteilung sollte der Wert der *Baseline* unter 1.005, der SOS-Fehler unter 5 und die Polydispersität unter 30 % sein. Die Werte der nativen AbfA und der Se-Met-AbfA sind in Tabelle 3-1 zusammengefaßt. Auch in der dynamischen Lichtstreuung erwies sich die aufgereinigte native AbfA und die Se-Met-AbfA als homogen auf der Ebene der Aggregation. Die Polydispersität liegt mit 7.3 und 8.9 % deutlich unter dem Schwellenwert von 30 %, der allgemein für die Kristallisierbarkeit von Proteinproben angenommen wird (Ferre-D'Amare, 1997). Das nach dem Modell für globuläre Proteine aus dem hydrodynamischen Radius berechnete Molekulargewicht entspricht unter Beachtung des Fehlers der dynamischen Lichtstreuung von bis zu 15 % einem Tetramer, welches ein theoretisches Molekulargewicht von 228 kDa ($4 \times 57 \text{ kDa}$) besitzt. Bis zur Strukturlösung wurde trotz der Ergebnisse der Gelfiltration (Abschnitt 3.1.3) eine tetramere AbfA angenommen, da auch vorhergehende Untersuchungen des Kooperationspartners zu diesen Ergebnissen kamen (Gilead and Shoham, 1995). Darüber hinaus zeigten die AbfA Proben, die alle bei 4°C gelagert wurden, über den gesamten Zeitraum der Arbeit eine ungewöhnlich hohe Stabilität bzw. Haltbarkeit. Proteinproben, die im Jahre 1999 vom Kooperationspartner expremiert und aufgereinigt wurden, zeigten in der dynamischen Lichtstreuung bis zum Jahre 2003 ein unverändert homogenes Aggregationsverhalten und konnten erfolgreich zur Kristallisation eingesetzt werden.

Tabelle 3-1 Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung von nativer und Se-Met-AbfA

	native AbfA	Se-Met-AbfA
hydrodynamischer Radius [nm]	5.5	5.6
Polydispersität [%]	7.3	8.9
resultierendes Molekulargewicht [kDa]	183	189
Qualitätskriterien der Messungen		
<i>Baseline</i>	0.432	0.455
<i>SOS-Error</i>	0.999	0.999

Die Proteinproben der katalytischen Mutanten wurden vor den Kristallisationsexperimenten ebenfalls mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung untersucht. Die Proben der katalytischen Mutanten der AbfA weisen jeweils eine homogene Enzymfraktion mit monomodaler Verteilung auf, was durch die Qualitätskriterien der Messungen belegt wird (Tabelle 3-2). Die Polydispersität der beiden Proteinproben ist etwa doppelt so hoch wie die der nativen AbfA und der Se-Met-AbfA, liegt aber noch unter dem Schwellenwert von 30 % (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2 Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung der katalytischen Mutanten

	E294A	E175A
hydrodynamischer Radius [nm]	6.0	6.1
Polydispersität [%]	20.0	27.9
resultierendes Molekulargewicht [kDa]	220	236
Qualitätskriterien der Messungen		
<i>Baseline</i>	1.001	1.002
<i>SOS-Error</i>	1.048	2.020

Dies hatte jedoch keinen Einfluß auf die Kristallisierbarkeit der Proteinlösungen und das Diffraktionsvermögen der gewonnenen Kristalle, denn für die E175A Mutante konnten Röntgendaten bis zu atomaren Auflösungsbereichen gemessen werden (Tabelle 3-20).

3.1.3 Gelfiltration

Die Gelpermeationschromatographie wurde nicht zur Reinigung der AbfA Proben sondern zu analytischen Zwecken durchgeführt, um das Oligomerisierungsverhalten der AbfA in Lösung zu studieren. Die Auswertung erfolgte durch lineare Regression des Eichlaufs, wobei anschließend mit Hilfe des Retentionsvolumens der nativen AbfA von 11.01 ml ein Molekulargewicht von 368 kDa berechnet wurde (Tabelle 3-3). Die analytische Gelfiltration lieferte somit Hinweise auf eine hexamere AbfA in Lösung, da das theoretische Molekulargewicht des Hexamers bei 342 kDa (4 x 57 kDa) liegt.

Tabelle 3-3 Retentionsvolumina der Gelpermeationschromatographie

Protein [kDa]	Retentionsvolumen [ml]
Dextranblau (2000 kDa)	8.06
Ferritin (440 kDa)	10.31
Katalase (240 kDa)	12.25
BSA (66 kDa)	13.67
Ovalbumin (43 kDa)	14.99
Ribonuklease (12.3 kDa)	17.63
native AbfA	11.01

Andererseits deuteten die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung eher auf ein Tetramer hin (Abschnitt 3.1.2.) Im Vergleich der beiden Methoden zur Bestimmung des Oligomerisierungsverhaltens von Proteinen wurde die Aussagekraft der Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung höher eingeschätzt, da die Gelpermeationschromatographie stark von der geometrischen Form des Moleküls abhängt.

3.1.4 Massenspektrometrie

3.1.4.1 Native AbfA und katalytische Mutanten (E175A, E294A)

Mittels ESI-Massenspektrometrie wurden die Molmassen der nativen AbfA und der katalytischen Mutanten E175A und E294A ermittelt. Dies diente zum einen der Überprüfung der Aminosäuresequenz und zum anderen der Kontrolle der erfolgreichen Substitution der katalytischen Glutaminsäuren durch Alanin in den beiden Mutanten. Das aus der Sequenz berechnete Molekulargewicht beträgt 57218 Da (502 Aminosäuren), wobei die erste N-terminale Aminosäure Met in *E.coli* abgespalten wird. Daraus resultiert ein theoretisches Molekulargewicht von 57087 Da. Berücksichtigt man die Fehlergrenzen der ESI

Massenspektrometrie von 0.1 % in diesem Massenbereich, entspricht das gemessene Molekulargewicht der nativen AbfA dem erwarteten. Die gemessenen Differenzen zwischen der nativen AbfA und den katalytischen Mutanten von jeweils 58 Da, in denen jeweils eine Glutaminsäure durch Alanin ersetzt wurde, entspricht ebenfalls den Erwartungen (theoretische Differenz 58,04 Da). Vom Kooperationspartner in Israel wurden im Rahmen der massenspektrometrischen Darstellung des kovalenten Reaktionsintermediats ebenfalls ESI Messungen durchgeführt. Das für die E175A Mutante gemessene Molekulargewicht von 57021 Da (Abbildung 3-33) bestätigt die eigenen Ergebnisse.

Tabelle 3-4 Ergebnisse der ESI Massenspektrometrie

	native AbfA	E175A	E294A
Molekulargewicht [Da]	57077	57019	57019

3.1.4.2 Seleno-Methionin Derivat

Der vollständige Einbau von Selenomethionin wurde ebenfalls mit Hilfe der ESI Massenspektrometrie kontrolliert. Bei 12 Selenpositionen pro AbfA Molekül und einer Differenz von 47 Da zwischen Seleno-Methionin und Methionin pro Position ergibt sich eine theoretische Differenz von 611 Da. Die tatsächlich gemessene Differenz zwischen der nativen AbfA und dem Seleno-Methionin Derivat beträgt 608 Da (Tabelle 3-5), was im Rahmen des experimentellen Fehlers und der Tatsache, daß die Besetzung der einzelnen Positionen unter Umständen nicht vollständig ist, den Erwartungen entspricht.

Tabelle 3-5 Differenz der Molmassen zwischen nativer AbfA und Seleno-Methionin Derivat

	native AbfA	Se-Met AbfA
Molekulargewicht [Da]	57077	57685

3.2 Kristallisation

3.2.1 Kristallform der Raumgruppe $P2_1$

Zu Beginn der Arbeit konnte AbfA in der primitiv monoklinen Raumgruppe $P2_1$ kristallisiert werden. Erste Hinweise auf das Kristallisationsverhalten von AbfA lieferte der PEG/Ion-Screen der Firma Hampton Research. Die Kristallisationslösung bestand aus 20% (w/v) PEG 3350 und 0.2 M NH_4F , wobei erste kleine Kristalle nach 7 Tagen beobachtet werden konnten. Zur Optimierung dieser Kristallisationsbedingung wurden der Kristallisationslösung 0.1 M Tris/HCl hinzugefügt, um den pH-Wert variieren zu können. In einem Bereich von pH=6.0-7.0, 18-27% (w/v) PEG 3350 und 0.1-0.5M NH_4F konnten die monoklinen Kristalle gewonnen werden. Die optimierte Fällungsmittellösung bestand aus 18% (w/v) PEG 3350, 0.2 M NH_4F and 0.1 M Tris/HCl pH=7.0 (12°C). Das Enzym konnte unter diesen Bedingungen zuverlässig kristallisiert werden, allerdings wuchsen in nur wenigen Kristallisationsansätzen regelmäßig gewachsene Kristalle mit definierten Kanten und Oberflächen. Mit zunehmender Größe der Kristalle nahm auch der Anteil an Kristallen mit ausgeprägten Baufehlern zu. *Mikroseeding* erwies sich als Technik der Wahl, um reproduzierbar Einkristalle geeigneter Größe und Qualität zu erlangen. Die Qualität der Kristalle konnte durch mehrere *Mikroseeding*-Zyklen erhöht werden. Zur Gewinnung von Kristallen geeigneter Größe und Qualität betrug das Anfangsvolumen des Kristallisationstropfens 20 μl (10 μl Proteinlösung + 10 μl der optimierten Kristallisationslösung). Diese Kristallisationsansätze wurden bei 12 °C für einen Zeitraum von 7 Tagen voräquiliert, bevor Kristallsplittersuspensionen (0.5 μl Impflösung) verschiedener Verdünnung (1:400 - 1:12000) in die Kristallisationstropfen hinzupipettiert wurden. Bei 12°C benötigten die Kristalle einen Zeitraum von bis zu vier Wochen, um ihre maximale Größe von 0.4 x 0.25 x 0.15 mm zu erreichen (Abbildung 3-2, rechts). *Makroseeding* führte stets zu hunderten von sehr kleinen Kristallen, die für Röntgendiffraktionsmessungen keine ausreichende Größe aufwiesen.

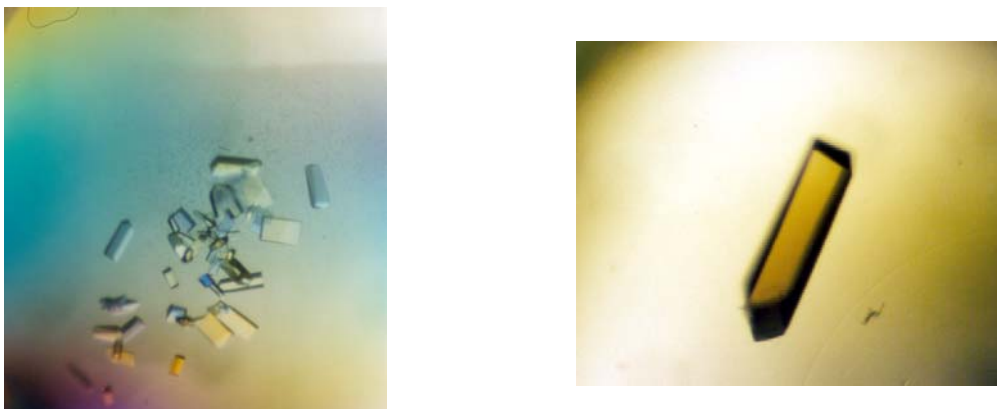


Abbildung 3-2 Primitiv monokline Kristalle der Raumgruppe $P2_1$ unter polarisiertem Licht. Vor (links) und nach (rechts) der Optimierung der Kristallisationsbedingung durch *Mikroseeding*.

Weiterhin konnten Kristalle unter Verwendung verschiedener Kombinationen aus Polymeren (PEG 2000, PEG 2000 MME, PEG 4000, PEG 6000, PEG 10000), 2-Methyl-2,4-Pentandiol (MPD) und Salzen ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 , LiSO_4 , NaCl , NaOAc , NaCitrat) gewonnen werden. Das Enzym kristallisierte unter allen Bedingungen ebenfalls in der primitiv monoklinen Kristallform, wobei die Qualität der Kristalle hinsichtlich des Diffraktionsvermögens und der ausgeprägten Baufehler nicht erkennbar verbessert werden konnte.

3.2.2 Kristallform der Raumgruppe $R3$

Etwa 2 Jahre nach der Kristallisation in der primitiv monoklinen Kristallform konnte AbfA in der höher symmetrischen Raumgruppe $R3$ kristallisiert werden. Bei identischer Zusammensetzung der Kristallisationslösung konnten durch Variation des pH-Wertes der Kristallisationslösung um eine pH-Einheit (von $\text{pH}=7.0$ auf $\text{pH}=8.0$) rhomboedrische Kristalle gewonnen werden. Die ersten Kristalle unter diesen Bedingungen konnten jedoch erst nach *cross-seeding* mit Kristallsplittern der primitiv monoklinen Kristallform (3.2.1) beobachtet werden. Nachfolgend konnten unter den genannten Bedingungen die höher symmetrischen Kristalle ohne *cross-seeding* gewonnen werden. Retrospektiv ist es daher fraglich, ob in der Tat die $P2_1$ Kristallsplitter zur Kristallisation führten oder ob nicht allein der Pipettiervorgang oder das Öffnen des Ansatzes die Kristallisation initiierte.

Im Laufe der Optimierung der Kristallisationsbedingung erwies sich der Zusatz von Isopropanol von 2.5 bis 15 % (v/v) als vorteilhaft für das Diffraktionsvermögen der Kristalle. Darüber hinaus konnte das Kristallwachstum durch den Zusatz von Isopropanol signifikant beschleunigt werden. In einem pH-Bereich von 8.0-8.75 gelang die Kristallisation in der rhomboedrischen Raumgruppe. Das optimierte Fällungsmittel bestand aus 18% (w/v) PEG 3350, 0.2 M NH_4F , 5% (v/v) Isopropanol und 0.1 M Tris/HCl $\text{pH}=8.0$ (RT). Kristalle geeigneter Qualität konnten reproduzierbar ohne Impfkristallisationstechniken gewonnen werden und erreichten ihre maximale Größe von 0.3 x 0.2 x 0.2 mm innerhalb einer Woche. Im Vergleich zu den primitiv monoklinen Kristallen (Abbildung 3-2) zeigten die $R3$ Kristalle wenig erkennbare Baufehler und einen stärker ausgeprägten Farbeffekt unter dem Polarisationsfilter (Abbildung 3-3).

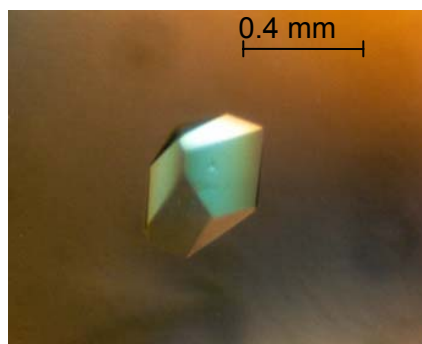


Abbildung 3-3 Optimierte rhomboedrische Kristalle der Raumgruppe $R3$ unter polarisiertem Licht.

3.2.3 Kristallisation von Se-Met-AbfA und der katalytischen Mutanten (E175A/E294A)

Das Seleno-Methionin Derivat der AbfA (Se-Met-AbfA) und die E175A Mutante konnten unter den gleichen Bedingungen kristallisiert werden wie das native Protein und zeigten hinsichtlich Kristallwachstum, Qualität und Größe der Kristalle keine signifikanten Unterschiede. Dies gilt sowohl für die primitiv monokline als auch für die rhomboedrische Kristallform.

Die E294A Mutante konnte nicht in der höher symmetrischen Raumgruppe kristallisiert werden. Im pH-Bereich von 8.0-8.75, in dem normalerweise die *R3* Kristalle für das native Protein, das Seleno-Methionin Derivat und die E175A Mutante beobachtet werden konnten, kristallisierte die E294A Mutante überraschend in der primitiv monoklinen Kristallform. Versuche, unter diesen Bedingungen durch *Mikroseeding* mit *R3* Kristallsplittern die höher symmetrischen Kristalle zu gewinnen, blieben erfolglos.

3.3 Diffraktionsmessungen und Rechnungen mit nativen Datensätzen

3.3.1 Native Datensätze und Bestimmung der Raumgruppen

In der Tabelle 3-6 sind die Statistiken der nativen Röntgendatensätze aufgeführt. Ein erster nativer Datensatz eines *P2₁* Kristalls wurde am Synchrotron in Hamburg bis zu einer Auflösung von 2.6 Å vermessen. Der Datensatz ist aus Zeitgründen nicht vollständig (Vollständigkeit 84.6 %). Ein deutlich besseres Diffraktionsvermögen zeigten die *R3* Kristalle bereits an einer Kupferdrehanode, an der sie die Röntgenstrahlen bis zu einem Auflösungsmaximum von 1.8 Å beugten. Die Indizierung und Skalierung der Daten mit DENZO und SCALEPACK (Otwinowski and Minor, 1997) führte zu der Raumgruppe *P2₁* mit den Gitterparametern $a=100.8$ Å, $b=178.1$ Å, $c=196.2$ Å und $\beta=96.1^\circ$ und der Raumgruppe *R3* mit folgenden kristallographischen Gitterkonstanten: $a=b=179.3$ Å und $c=100.4$ Å. Unter Berücksichtigung der systematischen Auslöschungen konnte für die primitiv monokline Kristallform die Raumgruppe *P2* ausgeschlossen werden. Für die Differenzierung zwischen *R3* und *R32* wurden die R_{merge} -Werte nach der Skalierung verglichen. Als Auflösungsgrenze für die Skalierung wird üblicherweise ein Signal/Rauschverhältnis von $I/\sigma(I) > 2$ gewählt, beide Kristalle sind daher nicht ganz bis zu ihrem Auflösungsmaximum vermessen worden. Die Qualität beider Datensätze ist mit R_{merge} -Werten von 5.4 % und 4.7 % über alle Auflösungsschalen hoch.

Tabelle 3-6 Ausgewählte kristallographische Parameter der nativen Datensätze

		X11, EMBL outstation Hamburg	Rigaku rotating anode X-ray generator
Wellenlänge (Å)		0.9080	1.54178
Gitterkonstanten (Å)	<i>a</i>	100.8	179.3
	<i>b</i>	178.1	179.3
	<i>c</i>	196.2	100.4
	β	96.1°	
Raumgruppe		<i>P2</i> ₁	<i>R3</i>
Anzahl Monomere in der asym. Einheit		12	2
V_m (Å ³ Da ⁻¹)		2.56	2.7
Oszillationswinkel pro Aufnahme (°)		0.5	1
Anzahl der Bilder		245	116
Temperatur der Datensammlung (K)		100	100
Auflösung (Å)		2.6	1.8
Anzahl der gemessenen Reflexe		483244	429358
Anzahl der zurückgewiesenen Reflexe		9171	6821
Anzahl der unabhängigen Reflexe		166649	119711
Vollständigkeit (%)		84.6	99.7
R_{merge} (%) #		5.4	4.7
R_{merge} (%) (höchste Auflösungsschale)		31.6 (2.65 - 2.60 Å)	29.2 (1.84 - 1.80 Å)
$I/(\sigma)$		19.7	26.5
$I/(\sigma)$ (höchste Auflösungsschale)		3.4 (2.65 - 2.60 Å)	3.9 (1.84 - 1.80 Å)

3.3.2 Kristallpackung

Die Anzahl der Proteinmonomere pro asymmetrischer Einheit läßt sich unter Verwendung der Kristallparameter aus der Indizierung, des Molekulargewichts des Proteins (57 kDa) und mit der Annahme einer für Proteinkristalle typischen Proteindichte von 1.22 mg ml⁻¹ (Andersson and Hovmoller, 2000) berechnen. Die in Tabelle 3-7 aufgeführten Packungsdichten von 2.56 und 2.7 Å³ Da⁻¹ (V_M -Wert) (Matthews, 1968) für 12 bzw. 2 Moleküle pro asymmetrischer Einheit liegen in dem für Proteinkristalle üblichen Bereich. Für die *R3* Kristalle war es aufgrund des V_M -Werts, der vorhandenen Symmetrie und der experimentellen Ergebnisse der Gelpermeationschromatographie und der dynamischen Lichtstreuung eindeutig, daß AbfA als Hexamer im Kristall vorliegt.

Tabelle 3-7 Packungsdichte

	Monomere	V_M -Wert [Å ³ Da ⁻¹]	Lösungsmittelanteil (%)
<i>P2</i> ₁	8	3.85	68
<i>P2</i> ₁	10	3.1	60
<i>P2</i> ₁	12	2.56	52
<i>R3</i>	2	2.7	56

Die vorliegenden Informationen waren für die primitiv monokline Kristallform jedoch nicht ausreichend, um zu diesem Zeitpunkt zwischen zwei/drei Tetrameren oder zwei Hexameren

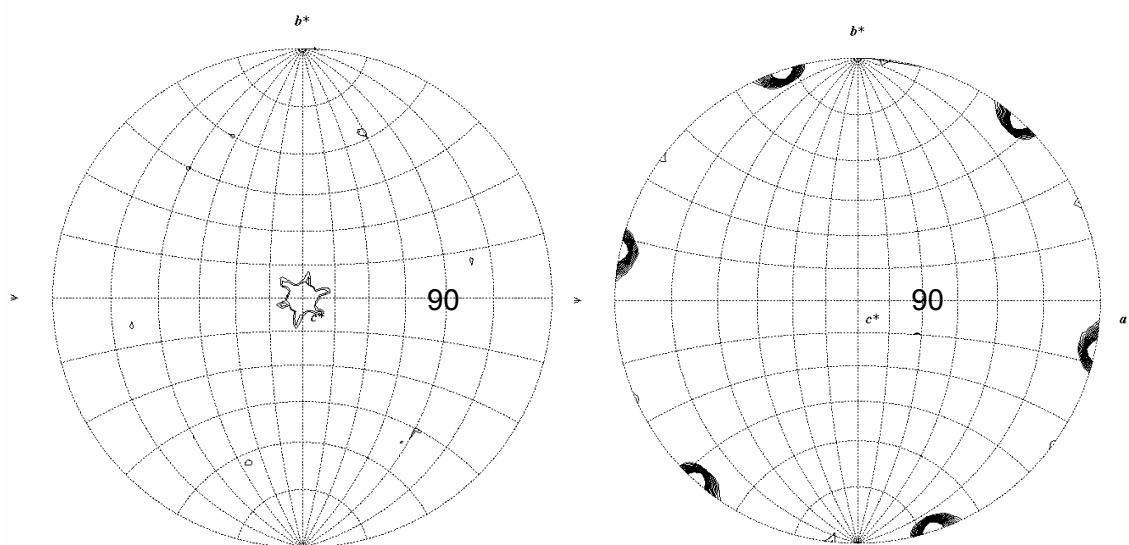
in der asymmetrischen Einheit der $P2_1$ Kristalle zu unterscheiden. Das Vorliegen von 4, 5 oder 6 Dimeren war aufgrund der Ergebnisse der Gelpermeationschromatographie und der dynamischen Lichtstreuung wenig wahrscheinlich. Erst nach der Strukturlösung konnte auch für diese Kristallform die hexamere Quartärstruktur der AbfA bestätigt werden.

3.3.3 Rechnungen zur Selbstrotationsfunktionen

3.3.3.1 Rhomboedrische Kristallform

Nichtkristallographische Symmetrien (NCS) im Kristall lassen sich mit Hilfe von Selbstrotationsfunktionen identifizieren. Die Selbstrotationsfunktionen für Rotationswinkel von $\kappa=120^\circ$ und $\kappa=180^\circ$ unter Verwendung von Daten im Auflösungsbereich von 15-3.5 Å wurden mit dem Programm GLRF (Tong and Rossman, 1997) berechnet und sind in Abbildung 3-4 dargestellt.

Abbildung 3-4 Selbstrotationsfunktionen der $R3$ Kristalle bei $\kappa = 120^\circ$ (links), $\kappa = 180^\circ$ (rechts). Die Konturierung beginnt bei 3σ und ist in 0.5σ Schritte unterteilt.



Die Peaks der Selbstrotationsfunktion sind mit einer hexameren AbfA im Kristall konsistent. Der intensivste Peak bei $\kappa=120^\circ$ ($I/\sigma(I) = 28.6$) entspricht der dreizähligen kristallographischen Drehachse. Drei Peaks bei $\kappa=180^\circ$ weisen eine Intensität von etwa 60% im Vergleich zum intensivsten Peak auf und entsprechen den drei zweizähligen nicht-kristallographischen Symmetrieachsen (Tabelle 3-8). Die drei übrigen Peaks bei $\kappa=180^\circ$ sind symmetrieverwandt.

Tabelle 3-8 Polarwinkel der intensivsten Peaks der Selbstrotationsfunktion

φ	ψ	κ	$I/\sigma(I)$	Ursprung
90	90	120	28.6	kristallographisch
0	42	180	17.3	NCS
180	18	180	17.2	NCS
180	78	180	16.9	NCS

Die hexamere Quartärstruktur besitzt eine D_3 -Punktsymmetrie, und man kann sich das Molekül als Trimer von Dimeren vorstellen. Das Hexamer besetzt eine spezielle Lage im Kristall, da die dreizählige kristallographische Achse und die Molekülachse des Hexamers zusammenfallen (Abschnitt 3.9).

3.3.3.2 Primitiv monokline Kristallform

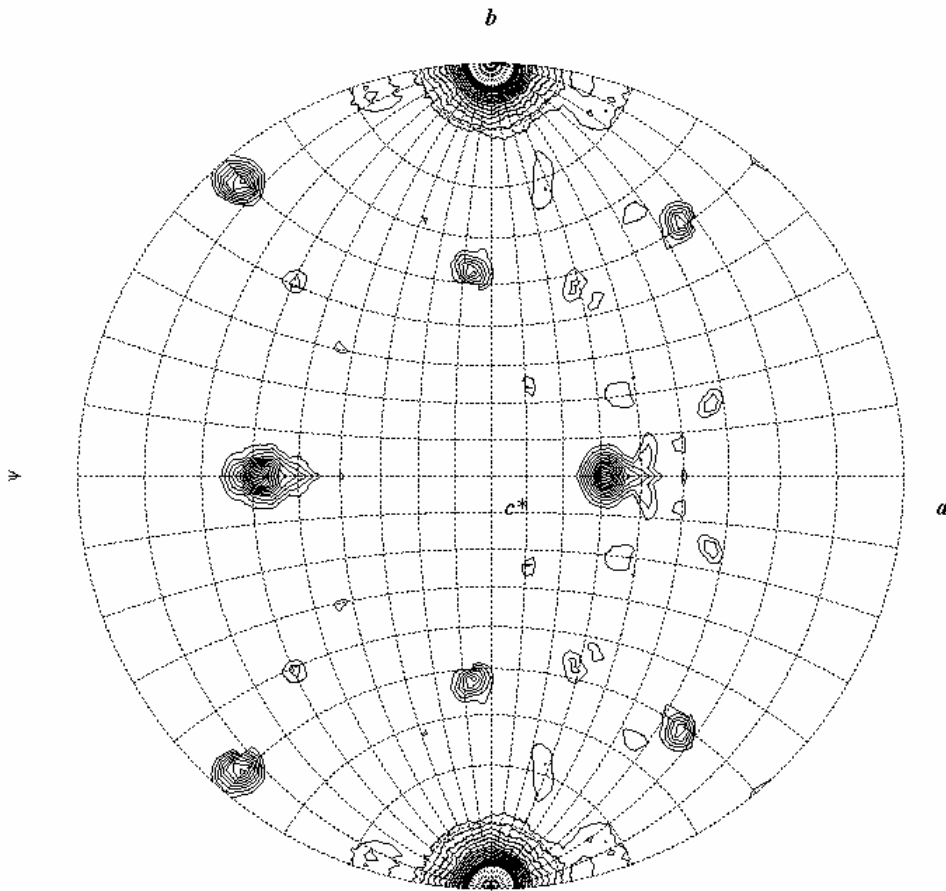
Die Selbstrotationsfunktion mit den nativen Daten der primitiv monoklinen Kristallform war nicht eindeutig interpretierbar. Abbildung 3-5 zeigt die Selbstrotationsfunktion im Auflösungsbereich von 10-4 Å für den Rotationswinkel $\kappa=180^\circ$. In Verbindung mit den Ergebnissen der Gelfiltration und der dynamischen Lichtstreuung, die zu diesem Zeitpunkt eher auf eine tetramere Quartärstruktur hindeuteten, wurde vermutet, daß sich zwei (V_M -Wert: $3.85 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, 68% Lösungsmittelgehalt) oder drei Tetramere mit jeweils drei senkrecht zueinander angeordneten NCS-Achsen (internes 2-2-2 System) in der asymmetrischen Einheit befinden, wobei bei dieser Anordnung eine nicht-kristallographische parallel zur zweizähligen kristallographischen Schraubenachse verlaufen müßte. Diese Hypothese war konsistent mit den 3 intensivsten Peaks der Selbstrotationsfunktion (Tabelle 3-9). Eine berechnete native Pattersonfunktion bestätigte diese Hypothese jedoch nicht (Daten nicht gezeigt) und die verbleibenden Peaks bei $\kappa=180^\circ$ (Abbildung 3-5) konnten nicht plausibel interpretiert werden.

Die hexamere Quartärstruktur konnte erst nach der Strukturlösung identifiziert werden, da die berechnete Selbstrotationsfunktion keine Hinweise auf die vorhandene dreizählige NCS-Achse lieferte (Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9 Polarwinkel der intensivsten Peaks der Selbstrotationsfunktion

φ	ψ	κ	$I/\sigma(I)$	Ursprung
0	0	180	15.6	kristallographisch
148	88	180	3.7	NCS
56	92	180	3.6	NCS
		120	-	NCS

Abbildung 3-5 Selbstrotationsfunktion der $P2_1$ Kristalle bei $\kappa = 180^\circ$. Die Konturierung beginnt bei 1σ und ist in 0.1σ Schritte unterteilt.



3.4 Strukturlösungen R3

3.4.1 Strukturlösung I: Multiple anomale Dispersion (MAD)

Die kristallographische Phaseninformation sollte mit Hilfe der MAD-Methode (Multiple anomale Dispersion) gewonnen werden. Dazu wurde, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, das Seleno-Methionin Derivat der AbfA kristallisiert und anschließend bei 3 verschiedenen Wellenlängen, klassischerweise *peak*, *inflection* und *remote*, vermessen. Das inkorporierte Selen zeigt in Abhängigkeit von der Wellenlänge anomale Streubeiträge, über die eine Lösung der Se-Substruktur möglich ist.

Der Vergleich der beiden Kristallformen unter besonderer Berücksichtigung der Eignung für die anschließende Se-Met-MAD-Phasierung (Hendrickson and Ogata, 1997) zeigte deutliche Unterschiede zwischen den beiden Kristallformen. Bei der $P2_1$ Kristallform mit 12 AbfA Molekülen in der asymmetrischen Einheit bestand die zu bestimmende Se-Substruktur aus 144 Positionen (12 Methionine pro Monomer in der Sequenz). Die Bestimmung einer Se-Substruktur dieser Größenordnung entspricht trotz der enormen Fortschritte auf den Gebieten der Synchrotrontechnologie und der Verarbeitung und Interpretation von Röntgendiffraktionsdaten nicht dem Stand der Technik. Darüber hinaus waren die Kristalle aufgrund der großen asymmetrischen Einheit (684 kDa), der niedrigeren Raumgruppensymmetrie und einem moderaten Diffraktionsvermögen für die Se-Met-MAD Phasierungsmethode weniger gut geeignet. Bei den $R3$ Kristallen mit 2 Molekülen in der asymmetrischen Einheit waren im Laufe des Se-Met-MAD Phasierungsprozesses 24 Selenpositionen zu bestimmen. Die höhere Symmetrie, die kleinere asymmetrische Einheit (104 kDa) und das gute Diffraktionsvermögen lieferten zudem gute Voraussetzungen für ein erfolgreiches Phasierungsexperiment. Zu Beginn der Arbeit waren jedoch nur die Kristallisationsbedingungen für die primitiv monokline Kristallform bekannt, so daß die ersten MAD-Phasierungsexperimente mit dem Derivat dieser Kristallform durchgeführt wurden.

3.4.1.1 MAD-Experimente: Raumgruppe $P2_1$

Die Statistiken über die Se-Met-MAD Daten, die am Synchrotron in Hamburg mit den primitiv monoklinen Kristallen gemessen wurden, sind in Tabelle 3-10 aufgeführt. Das erste MAD Experiment (Se-Met-MAD I) mit einem kleineren Kristall (0.2 x 0.15 x 0.1 mm) lieferte Daten mit unbefriedigender Datenqualität und Auflösung. Darüber hinaus war es aufgrund technischer Probleme nicht möglich, die *Remote*-Wellenlänge zu messen. Die resultierenden R_{merge} -Werte von 12.9 % und 10.7 % für alle Auflösungsschalen sind Beleg für den relativ hohen experimentellen Fehler. Dieser Fehler steht im Gegensatz zu den hohen Anforderungen, die bei der MAD Phasierungsmethode an die Datenqualität gestellt werden, denn der anomale Anteil am Gesamtstreubeitrag liegt normalerweise zwischen 2-5% (Walsh et al., 1999). Das zweite Phasierungsexperiment (Se-Met-MAD II, Tabelle 3-10) wurde mit einem optimierten $P2_1$ Kristall (0.3 x 0.2 x 0.2 mm) durchgeführt. Die meisten großen

Schwermetall-Substrukturen wurden mit Programmen gelöst, die direkte Methoden verwenden (SnB, SHELXD). Dabei wird in der Regel nur mit den Daten der *Peak*-Wellenlänge gerechnet, die daher, zur Verbesserung der Datenqualität, mit einer höheren Redundanz gemessen wurde (954252 gemessene Reflexe).

Tabelle 3-10 Datenstatistiken der $P2_1$ Se-Met-MAD Experimente (A)

BW7A, EMBL Hamburg c/o DESY	Se-Met-MAD I			Se-Met-MAD II		
	peak	inflection	remote	peak	inflection	remote
Wellenlänge (Å)	0.9784	0.979	-	0.9787	0.9791	0.9536
Temperatur der Datensammlung (K)	100	100	-	100	100	100
Auflösung (Å)	33.0-4.0	33.0-3.5	-	25.0-3.0	25.0-3.0	25.0-3.0
Anzahl der gemessenen Reflexe	212289	285030	-	954252	557109	783944
Anzahl der unabhängigen Reflexe	60004	86509	-	153431	152972	154002
Vollständigkeit (%)	99.7	98.9	-	99.9	99.4	99.8
R_{merge} (%) #	12.9	10.7	-	8.4	9.1	8.2
R_{merge} (%) höchste Auflösungsschale	26.3	28.4	-	33.7	34.4	32.9
$I/(\sigma)I$	8.7	10.9	-	12.5	10.5	13.2
$I/(\sigma)I$ höchste Auflösungsschale	5.3	2.6	-	4.4	2.6	3.9

$$\# R_{merge} = \sum (|I - \langle I \rangle|) / \sum I.$$

Der Vergleich der beiden Datensätze zeigt die erhöhte Datenqualität mit kleineren R_{merge} -Werten, höhere $I/(\sigma)I$ -Werte und Auflösung (3.0 Å) der mit den größeren Kristallen gemessenen MAD Daten. Eine weitere Optimierung dieser Kristallisationsbedingung zur Verbesserung des Diffraktionsvermögens war nicht möglich.

Um den hohen Anforderungen an die Datenqualität trotz des moderaten Diffraktionsverhaltens gerecht zu werden, wurde ein weiteres Experiment am Synchrotron in Grenoble durchgeführt. Die dort zur Verfügung stehende Röntgenstrahlung weist eine wesentlich höhere Intensität auf als am Synchrotron in Hamburg. Dies führte bei vergleichbarer Kristallqualität zu qualitativ höherwertigen Röntgendaten (Tabelle 3-11). Dabei wurden zwei unterschiedliche Messtrategien verfolgt: Mit einem Kristall wurde ein klassisches MAD Experiment bis zu einer Auflösung von 2.9 Å durchgeführt. Ein weiterer Kristall, der zu Beginn der Messung bis zu einem Auflösungsmaximum von 2.5 Å streute, wurde nur an der Absorptionskante (*Peak*) des anomal streuenden Selens (SAD) vermessen. Aufgrund von signifikanten Strahlungsschäden mußte das Experiment nach etwa 1000 Aufnahmen (Oszillationswinkel von 0.5°/Aufnahme) abgebrochen werden, und die Daten wurden unter Berücksichtigung von Redundanz, Auflösung und Qualität bis zu einem Auflösungsmaximum von 2.8 Å skaliert.

Tabelle 3-11 Datenstatistiken der $P2_1$ Se-Met-MAD/SAD Experimente (B)

ID 29, EMBL Grenoble	Se-Met-MAD			Se-Met-SAD
	peak	inflection	remote	peak
Wellenlänge (Å)	0.97918	0.979338	0.915002	0.97918
Temperatur der Datensammlung (K)	100	100	100	100
Auflösung (Å)	35.0-2.9	35.0-2.9	35.0-2.9	35.0-2.8
Anzahl der gemessenen Reflexe	718322	693966	699828	1535731
Anzahl der unabhängigen Reflexe	187840	186650	186846	227775
Vollständigkeit (%)	99.8	99.8	99.9	99.0
R_{merge} (%) #	6.3	6.3	7.5	8.0
R_{merge} (%) höchste Auflösungsschale	25.7	31.0	39.3	31.2
$I/\sigma I$	14.1	14.8	20.5	15.6
$I/\sigma I$ höchste Auflösungsschale	5.9	4.7	4.5	6.7

$$\# R_{merge} = \sum (|I - \langle I \rangle|) / \sum I.$$

3.4.1.2 MAD-Experiment: Raumgruppe R3

Mit den optimierten rhomboedrischen Kristallen wurde ein weiteres MAD Experiment mit der gleichen Strategie der Datensammlung wie bei den primitiv monoklinen Kristallen durchgeführt (Tabelle 3-12). Ein klassischer MAD Datensatz wurde aufgenommen, wobei jedoch die *Peak*-Wellenlänge, im Hinblick auf spätere Phasierungsrechnungen, mit einer höheren Redundanz gemessen wurde. Der Kristall zeigte ein sehr gutes Diffraktionsvermögen, und Daten bis zu einer Auflösung von 1.68 Å wurden gemessen. Ziel der Datensammlung war es nicht, die maximale Auflösungsgrenze zu erreichen, was die $I/\sigma(I)$ -Werte für die höchste Auflösungsschale zeigen. Eine gute Datenqualität stand im Vordergrund, was die niedrigen R_{merge} -Werte von 5.5 %, 4.5 % und 4.4 % über alle Auflösungsschalen belegen.

Tabelle 3-12 Datenstatistiken der R3 Se-Met-MAD Experimente

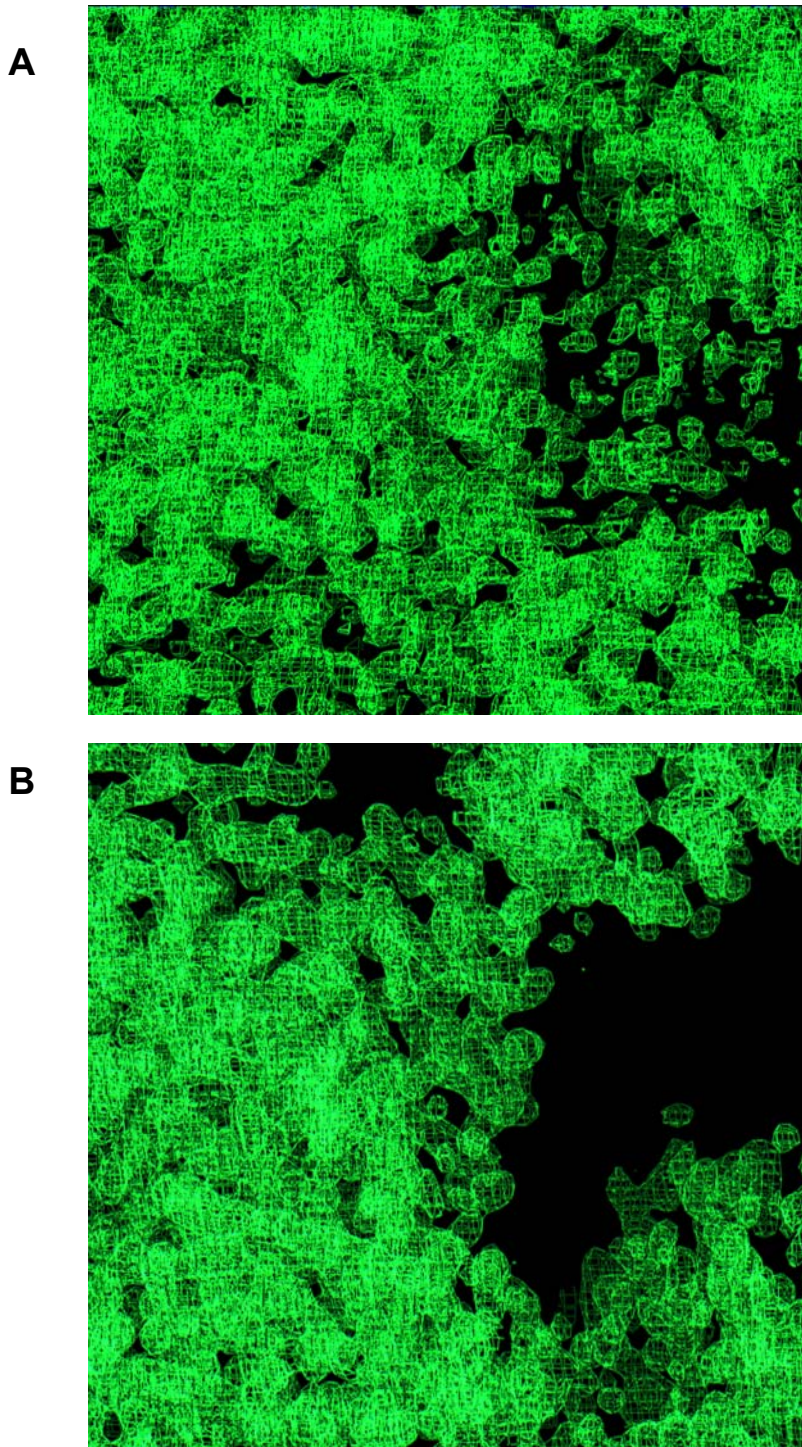
BW7A, EMBL Hamburg c/o DESY	Se-Met-MAD		
	peak	inflection	remote
Wellenlänge (Å)	0.9793	0.9797	0.9645
Temperatur der Datensammlung (K)	100	100	100
Auflösung (Å)	20.0-1.68	20.0-1.68	20.0-1.68
Anzahl der gemessenen Reflexe	634996	461846	384746
Anzahl der unabhängigen Reflexe	135163	131337	132006
Vollständigkeit (%)	100.0	97.1	97.6
R_{merge} (%) #	5.5	4.5	4.4
R_{merge} (%) höchste Auflösungsschale	27.0	35.7	31.1
$I/\sigma I$	20.4	18.5	18.0
$I/\sigma I$ höchste Auflösungsschale	5.9	3.4	3.5

$$\# R_{merge} = \sum (|I - \langle I \rangle|) / \sum I.$$

3.4.1.3 Phasierungsrechnungen: Bestimmung der Se-Substruktur

Für die Bestimmung und Verfeinerung der 144 bzw. 24 Positionen der Se-Substruktur wurden die Programme SOLVE (Terwilliger and Berendzen, 1999), SnB (Weeks et al., 1994) und SHELXD (Schneider and Sheldrick, 2002) verwendet. Für die große Se-Substruktur der $P2_1$ Kristallform (144 Positionen) gelang es trotz intensiver Bemühungen nicht, eine signifikante Lösung zu finden, die zur Berechnung interpretierbarer Elektronendichten führte. Die Se-Substruktur der $R3$ Kristallform (24 Positionen) konnte schon während des Experiments am Synchrotron als SAD-Fall gelöst werden. Dazu wurde mit den Daten der *Peak*-Wellenlänge gerechnet, wobei die obere Auflösungsgrenze auf 2.5 Å erniedrigt wurde. Das Programm SHELXD, welches direkte Methoden verwendet, berechnete in kürzester Zeit (45 sec.) eine signifikante Lösung für die Se-Substruktur. SnB, das wie SHELXD auf direkten Methoden basiert, fand ebenfalls eine signifikante Lösung für die Schwermetall-Substruktur ($R_{\min}=0.315$, $R_{\text{cryst.}}=0.18$). Die Qualität der Anfangsphasen einer MAD Phasierung ist in der Regel höher als die einer SAD Phasierung, daher wurden nachfolgend die *Inflection*- und *Remote*-Wellenlänge zur Verbesserung der resultierenden Elektronendichtefunktion gemessen. Unabhängig von der SAD-Phasierung mittels SHELXD/SnB konnte die Substruktur ebenfalls mit dem Programm SOLVE, welches auf Patterson Suchroutinen basiert, gelöst werden. Die Lösung der Substruktur in SOLVE gelang sowohl als SAD-Fall mit den Daten der *Peak*-Wellenlänge als auch mit allen drei Wellenlängen als klassischer MAD-Fall (Tabelle 3-13). Für die Rechnungen mit SOLVE wurde die obere Auflösungsgrenze auf 2.5 Å erniedrigt. Insgesamt belegen diese Rechnungen die gute Qualität der gemessenen MAD-Daten, denn die Se-Substruktur konnte von allen Programmen unabhängig voneinander bestimmt werden. Aktuell zeichnet sich in der Proteinkristallographie ein Trend ab, daß direkte Methoden unter Verwendung hoch redundanter *Peak*-Daten die größte Erfolgswahrscheinlichkeit liefern, um komplexe Schwermetall-Substrukturen zu lösen. Im Fall der AbfA führten beide Phasierungsansätze (SAD/MAD) zum Erfolg und für nachfolgende Rechnungen wurde mit den in SOLVE bestimmten und verfeinerten Positionen gerechnet.

Abbildung 3-6 Verbesserung der Elektronendichte durch Dichtemodifikation. (A) Dichte mit ersten Phasen aus SOLVE. (B) Dichte nach der Dichtemodifikation mit RESOLVE.



Die Qualität der Anfangsphasen und die der Elektronendichtefunktion nach der Dichtemodifikation war nach der MAD-Phasierung signifikant höher als nach der SAD-Phasierung (Tabelle 3-13).

Tabelle 3-13 FOM-Werte der MAD-Phasierung und Dichtemodifikation (SOLVE/RESOLVE)

	Auflösung	SOLVE	RESOLVE
FOM (MAD)	20.0-2.5	0.57	0.81
FOM (SAD)	20.0-2.5	0.39	0.69

Daher wurde nachfolgend mit den durch die MAD-Phasierung bestimmten und verfeinerten Se-Positionen gerechnet. In der resultierenden Elektronendichte, die mit den ersten MAD-Phasen aus SOLVE berechnet wurde (Abbildung 3-6 (A)), kann man eindeutig zwischen Bereichen hoher (Protein) und niedriger (Lösungsmittel) Elektronendichte unterscheiden. Diese visuelle Inspektion der Dichte ist ein wichtiges Kriterium dafür, daß die gefundenen Positionen und die daraus berechneten Anfangsphasen sinnvoll sind. Im Zuge der nachfolgenden Dichtemodifikation mit dem Programm RESOLVE (Terwilliger, 2001) wurden die Phasen bis zum experimentelle Auflösungsmaximum von 1.68 Å erweitert. Anhand der gefundenen Se-Positionen konnte RESOLVE die NCS-Operatoren innerhalb des Dimers bestimmen und eine nicht-kristallographische Mittelung durchführen. Diese führte zu einer interpretierbaren Elektronendichte mit hoher Konnektivität, in der die Ausdehnung der Monomere und des Dimers innerhalb der asymmetrischen Einheit eindeutig zu erkennen war (Abbildung 3-6 (B)). Der Betrag der Phasenextension zur Verbesserung der Dichte ist sicherlich höher einzuschätzen als der der Mittelung mit lediglich zwei Monomeren in der asymmetrischen Einheit.

3.4.1.4 Automatischer Modellbau mit ARP/wARP

Im Rahmen der Proteinkristallographie ist die Anwendung automatischer Modellbauroutinen nur bei ausreichender Auflösung und guter Qualität der Elektronendichtefunktion möglich. Im Fall der MAD-Strukturlösung der AbfA zeigten die Se-Met-Kristalle gute Beugungseigenschaften, das anomale Signal wurde zuverlässig gemessen, und die aus den resultierenden Se-Positionen berechneten Anfangsphasen waren überdurchschnittlich gut. Durch die hohe Qualität der bis 1.68 Å phasenerweiterten und nicht-kristallographisch gemittelten Elektronendichte war ein automatischer Modellbau mit ARP/wARP (Perrakis et al., 1999) möglich. Tabelle 3-14 zeigt eine Übersicht über den iterativen Prozess des automatischen Modellbaus für das in der asymmetrischen Einheit enthaltene AbfA-Dimer. Bereits nach dem ersten Zyklus wies das Hybridmodell eine Konnektivität von 0.88 auf und setzte sich aus nur 37 Kettenfragmenten zusammen. Der Prozess konvergierte nach einigen Zyklen und am Ende der automatischen Modellierungsroutine *warpNtrace* bestand das Hybridmodell, bezogen auf das AbfA-Dimer, aus 931 von 1002 möglichen Residuen, 17 Kettenfragmenten und wies eine hohe Konnektivität auf (0.96).

Tabelle 3-14 Fortschritt des AbfA Hybridmodells. Nach jedem Zyklus, der aus 10 Verfeinerungsschritten besteht, wird jeweils ein Modell generiert, dessen iterative Vervollständigung dargestellt ist.

Zyklus	Ketten	Residuen	Konnektivität
1	37	769	0.88
2	25	862	0.93
3	23	896	0.94
4	22	913	0.95
5	21	919	0.95
6	19	932	0.96
7	21	929	0.95
8	19	928	0.95
9	17	931	0.96

Die Lage der Monomere war aufgrund vorheriger Modellbauarbeiten mit RESOLVE (s.u.) bekannt, weshalb eine Zuordnung der Ketten zu den einzelnen Monomeren möglich war. Für das *side chain docking* wurden das Monomer A aus 7 und das Monomer B aus 10 Kettenfragmenten generiert. Das Proteinmodell des Monomers A konnte mit 481 der 501 Residuen (96 %) modelliert werden, und für 68.6 % der Residuen wurde ein sinnvolles Rotamer in der Bibliothek gefunden. Im finalen AbfA Proteinmodell fehlten im Monomer A dem zur Folge lediglich 20 Residuen, die manuell in die Dichte eingebaut werden mußten. Für das Monomer B konnten 90 % der Residuen eingebaut werden, und für 63.8 % wurde ein sinnvolles Rotamer gefunden (Abbildung 3-7).

Die Qualität der Elektronendichte und Vollständigkeit des Proteinmodells war unabhängig von den verwendeten Programmen für die Phasenerweiterung und Dichtemodifikation. Wurden diese Arbeitsschritte mit dem Programm DM durchgeführt und anschließend die automatischen Modellierungsroutinen des Programms ARP/wARP angewendet, resultierte ein nahezu identisches Modell mit 17 Kettenfragmenten, 917 eingebauten Residuen und einer Konnektivität von ebenfalls 0.96. Dieser Vergleich dokumentiert, daß die Dichtemodifikation (NCS-Mittelung) und Phasenextension der neuen RESOLVE Version (2.03) im Fall der AbfA gleichwertige Ergebnisse lieferte. Der automatische Modellbau, der in dieser RESOLVE Version implementiert ist, lieferte ebenfalls ein gutes, aber signifikant unvollständigeres Modell mit 676 vollständig eingebauten Residuen als das Programm ARP/wARP.

Abbildung 3-7 Darstellung der Ergebnisse des side chain dockings. Für 68.6 % aller Seitenketten des Monomers A konnte ein sinnvolles Rotamer in der Bibliothek gefunden werden. Diese Residuen sind mit einem * in der Zeile SC correct beschriftet. Die Buchstaben L, H, B, C, E, I, M kennzeichnen die 7 der 17 Kettenfragmente des Hybridmodells, aus denen das Monomer A generiert wurde.

```
Number: 01...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: ATKKATMIIEKDFKIAEIDKRIYGSFIEHLGRAVYGGIYEPGHPQADENG
Chain: ---LLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLL---HHHHHHHHHHHHHHHHH
SC correct: **** * * **** * * * * * * * * * * * * *

Number: 51...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: FRQDVIELVKELQVPIIRYPGGNFVSGYNWEDGVPKEQRPRLDLAWKS
Chain: HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB
SC correct: * **** * * * * * * * * * * * * * * *

Number: 101...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: VETNEIGLNEFMDWAKMVGAEVNMAVNLGTRGIDAARNLVEYCNHPSGSY
Chain: BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB
SC correct: ***** ***** ** ***** ***** ***** ** *****

Number: 151...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: YSDLRIAHGYKEPHKIKTWCIGNEMDGPWQIGHKTAVEYGRICEAAKVM
Chain: BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB
SC correct: ***** ** * **** * * * * * * * * * * * * *

Number: 201...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: KWVDPTELIVCGSSNRNMPFAEWEATVLDHTYDHVDYISLHQYGNRD
Chain: BBBBBBBBBBBBBB---CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
SC correct: **** ***** * * ***** * * * * * * * *

Number: 251...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: NDTANYLALSLEMDDFIRSVVAIADYVKAKKRSKKTIHLSFDEWNVWYHS
Chain: CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
SC correct: ***** * * * ***** * * * * * ***** * *****

Number: 301...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: NEADKLIWPWTVAPPLEDIYNFEDALLVGCMLITLKHADRVKIACLAQ
Chain: CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC--
SC correct: * * * **** ***** ***** ***** ***** * * * * *

Number: 351...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: LVNVIAPIMTEKNGPAWKQTIYYPFMHASVYGRGVALHPVISSPKYDSKD
Chain: -EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE
SC correct: ***** ** * * ***** ***** * * * * * * * *

Number: 401...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: FTDVPYLESIAVYNEEKEEVTIFAVNRDMEDALLECDVRSFEDYRVIEH
Chain: EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE-III III
SC correct: * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Number: 451...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: IVLEHDNVKQTNSAQSSPVVPHRNGDAQLSDRKVSATLPKLSWNVIRLGK
Chain: IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII---MMMMMMMMMMMMMM-
SC correct: ***** ***** * * * * * * * * * * * * * *

Number: 501...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: R
Chain: -
SC correct:
```

3.4.2 Strukturlösung II: Multipler isomorpher Ersatz (MIR)

3.4.2.1 Screening-Methoden zur Derivatidentifizierung

Parallel zur MAD-Phasierungsmethode wurde die Phaseninformation durch die Methode des multiplen isomorphen Ersatzes (MIR) gewonnen. Um den auf *trial and error* basierenden Prozess der Identifizierung geeigneter Derivate zu beschleunigen, wurden Methoden der nativen Gelelektrophorese und Massenspektrometrie als Screening-Methoden angewendet.

3.4.2.1.1 MALDI-TOF MS: Eine Präparationstechnik für Proteinkristalle

Die auf MALDI-TOF MS basierende *Screening*-Methode potentieller Schwermetallatom-Derivate ist im Gegensatz zu der zeitaufwendigen röntgenkristallographischen Untersuchung schnell, so daß zahlreiche Derivatisierungsbedingungen innerhalb eines Tages untersucht werden können. Mit Hilfe dieser Methoden kann man nur kovalent gebundene Schwermetallatome identifizieren, typischerweise Pt, Hg, Au, die als „weiche Liganden“ klassifiziert werden. Die kovalent gebundene Schwermetallverbindung führt zu einer Veränderung des experimentell bestimmten Molekulargewichts im Vergleich zum nativen Protein.

Es wurde gemeinsam mit Lejon Martens eine spezielle Präparationstechnik der Kristalle auf den Probenhalter entwickelt (Abbildung 3-8), um native und derivatisierte Proteinkristalle direkt mit Hilfe von MALDI-TOF MS vermessen zu können. Das direkte Präparieren und Vermessen von Proteinkristallen bietet gegenüber der üblichen Verwendung von Proteinlösungen folgende Vorteile:

1. In Lösung können Bindungsstellen für Schwermetalle vorliegen, die im Kristall durch Kristallkontakte nicht zugänglich sind. Die Ergebnisse aus Experimenten, die auf derivatisierten Proteinlösungen basieren, sind daher nicht eindeutig.
2. Derivatisierte Proteinkristalle können vor der Messung für eine bestimmte Zeit in eine Stabilisierungslösung eingebracht werden (*back soak*). Durch diesen Zwischenschritt können nicht gebundene Schwermetallatome entfernt werden, die die Auflösung der erhaltenen Spektren reduzieren. Von derivatisierten Proteinkristallen wurden auf diesem Wege Spektren erhalten, die eine gute Intensität und ein vergleichbares Signal/Rauschverhältnis aufwiesen wie die Spektren nativer Proteinlösungen (Abbildung 3-9).

Abbildung 3-8 Montage des Proteinkristalls auf den MALDI Probenhalter. Der Kristall wird mit einem Nylonloop aus der Stabilisierungslösung entnommen und auf den vorbereiteten Probenhalter aufgebracht. Anschließend werden 0.8 µl einer Matrixlösung (gesättigte CCA-Lösung [1/1 0.1% TFA / Acetonitril (v/v)]) auf den Kristall aufgebracht. Nach einiger Zeit entstehen drei verschiedene Zonen der Cokristallisation von Analyt und Matrix. In der äußersten Zone wird eine gute Cokristallisation für die anschließende MALDI-TOF MS Messung erhalten.

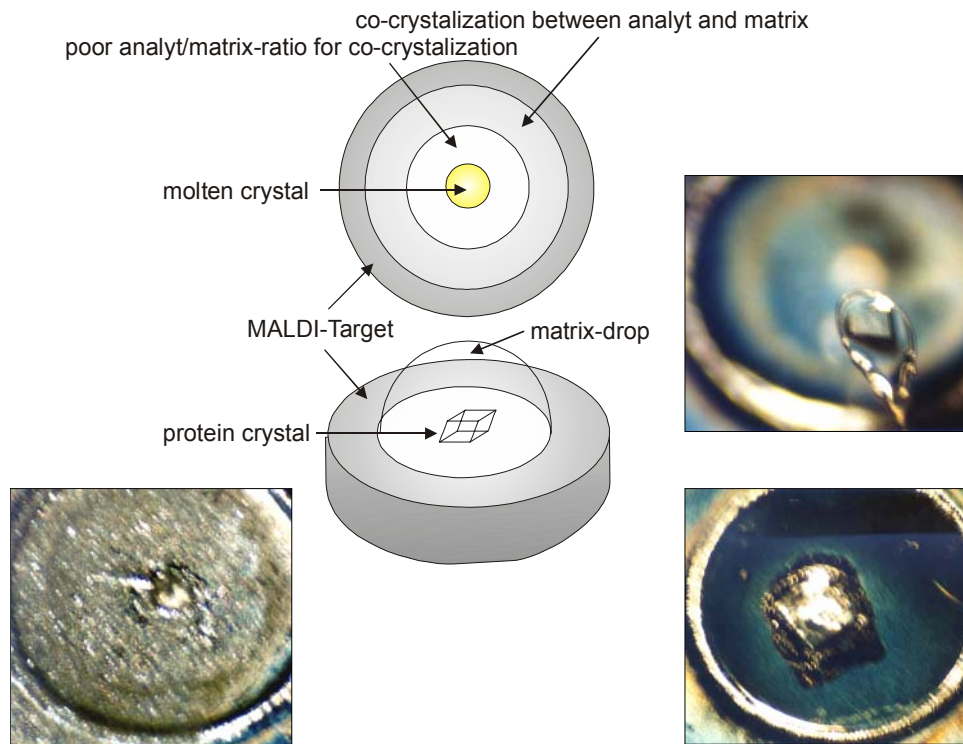
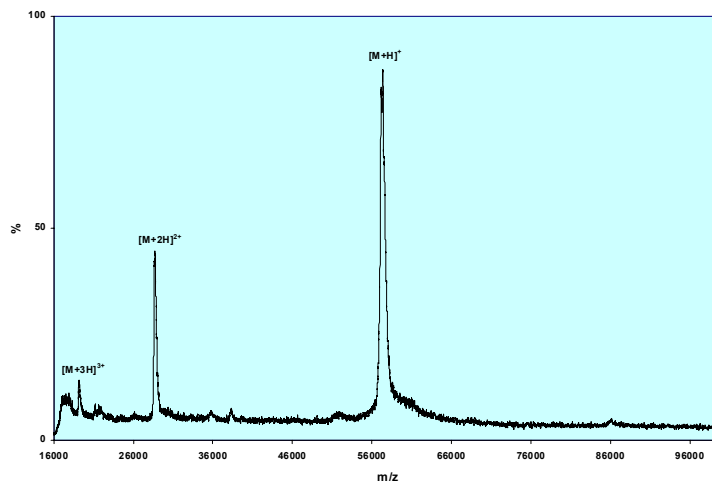


Abbildung 3-9 Spektren mit guter Auflösung und Intensität wurden von direkt vermessenen Proteinkristallen erhalten. Die Veränderungen des Molekulargewichts nach Versetzen mit der Schwermetall-Lösung wird mit dem Molekulargewicht des nativen Proteins verglichen (Tabelle 3-15). Eine signifikante Änderung des Molekulargewichts weist auf eine potentielle Derivatisierung hin.



Für nachfolgende röntgenkristallographische Studien lieferten die in Tabelle 3-15 aufgeführten Ergebnisse Hinweise auf eine mögliche Derivatisierung von AbfA mit verschiedenen Platin, Quecksilber und Goldverbindungen. Für diese Verbindungen konnte ein signifikanter Shift im Vergleich zum Molekulargewicht der nativen AbfA gemessen werden. Die Größe des Shifts nimmt mit steigender Konzentration der Schwermetallverbindung zu (z. B. 0,1 und 10 mM K_2PtCl_4 ; 0,1, 1 und 10 mM $HgCl_2$) und ist auch von der Reaktivität der Abgangsgruppe abhängig ($Cl > NO_2 > CN$). Wurde für eine bestimmte Derivatisierungsbedingung ein Shift gemessen, konnte dieser bei allen getesteten Verbindungen für beide Kristallformen beobachtet werden. Die vermutlich unterschiedliche Kristallpackung hatte scheinbar keinen Einfluß auf die möglichen Bindungsstellen.

Tabelle 3-15 Die Veränderung des Molekulargewichts im Vergleich zum nativen Protein ist abhängig von der Art der Schwermetallverbindung und deren Konzentration. Die Dauer der Derivatisierung betrug jeweils 12 Stunden.

Konzentration [mM]	Verbindung	Shift im Molekulargewicht [Da]
0,1	K_2PtCl_4	-
1	K_2PtCl_4	415
10	K_2PtCl_4	765
0,1	$HgCl_2$	-
1	$HgCl_2$	667
10	$HgCl_2$	784
5	K_2PtCl_6	793
10	$MeHgCl$	565
10	$MePbOAc$	-
10	AuI_3	-
10	$Phen_2Hg$	-
10	AuI_3	-
10	K_2AuCl_4	603
10	$Gd_2(SO_4)_2$	-
10	$KAu(CN)_2$	235
1	$KAu(CN)_2$	-
10	$UO_2(NO_3)_2$	-
10	Na_2WO_4	-
0,1	$KAuCl_4$	197
5	K_2OsCl_6	313
1	K_2IrCl_6	-
5	$K_2Pt(NO)_2$	1060
5	$K_2Pt(CN)_4$	186

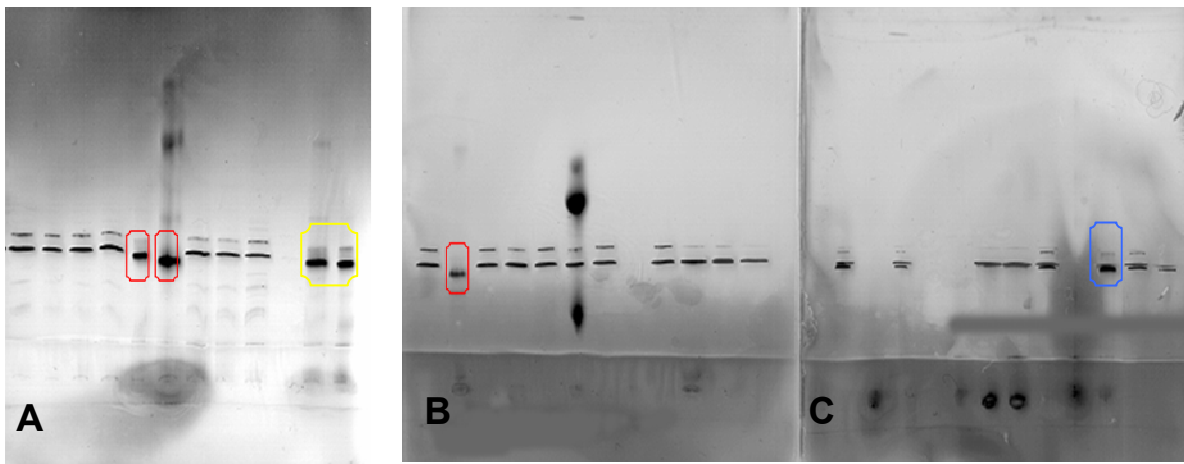
Am Beispiel der MIR Strukturlösung der AbfA konnte belegt werden, daß die entwickelte *Screening*-Methode in der Lage ist, wertvolle Hinweise auf mögliche Derivatisierungsbedingungen zu liefern. Aufgrund fehlender Kenntnis über die Stöchiometrie der Schwermetallbindung sind keine Aussagen über die Anzahl der gebundenen Atome möglich. Ebenfalls liefert diese Methode keine Information darüber, ob es sich um ein spezifisches Derivat handelt, das sich für ein Phasierungsexperiment eignet. Ein unspezifisches Derivat

mit vielen schlecht besetzten Positionen führt ebenfalls zu einer signifikanten Veränderung des Molekulargewichts.

3.4.2.1.2 Native Gelelektrophorese

Für den Fall, daß die Derivatisierung der AbfA zu einer Veränderung der Ladung des Proteins führt, läßt sich dies durch ein verändertes Laufverhalten in der nativen Gelelektrophorese nachweisen. Dazu wurden die nativen Proteinlösungen mit verschiedenen Schwermetall-Lösungen versetzt und für eine bestimmte Zeit inkubiert. Die Derivatisierung wurde bei pH=7.0 und pH=8.0 durchgeführt, da die beiden Kristallformen bei diesen pH-Bedingungen kristallisiert wurden, und auch die Kristalle bei dem jeweiligen pH-Wert derivatisiert wurden.

Abbildung 3-10 Native Gelelektrophorese der nativen und derivatisierten AbfA Lösungen. Die rot und gelb gekennzeichneten Banden, die ein verändertes Laufverhalten zeigen, sind auf eine mögliche Derivatisierung mit Schwermetallreagenzien zurückzuführen.



Gel A: Die linken vier Banden zeigen das Laufverhalten der nativen AbfA, die mit unterschiedlichen Konzentrationen (0.1 bis 1.0 mg ml⁻¹) aufgetragen wurde. Die beiden rot gekennzeichneten Banden sind auf eine mögliche Derivatisierung mit 1 mM (links) und 10 mM (rechts) HgCl₂ zurückzuführen. Die Proteinlösung wurde vor dem Auftragen auf das Gel jeweils eine Stunde mit HgCl₂ bei pH=8.0 derivatisiert.

Die beiden gelb gekennzeichneten Banden zeigen den Vergleich der beiden pH-Bedingungen. Es wurde jeweils für eine Stunde mit 1 mM HgCl₂ bei pH=7.0 (links) und pH=8.0 (rechts) inkubiert. Das Versetzen mit HgCl₂ führte bei beiden pH-Werten zu einer Änderung des Laufverhaltens, und eine mögliche Derivatisierung findet unter beiden Bedingungen unabhängig vom pH-Wert statt. Diesen Ergebnissen zur Folge sollten sich beide Kristallformen mit HgCl₂ derivatisieren lassen. Die übrigen Banden, bei denen die Proteinlösung mit anderen Schwermetall-Lösungen versetzt wurde, zeigen kein verändertes Laufverhalten und liefern keinen Hinweis auf eine mögliche Derivatisierung.

Gel B und C: Der Shift der rot gekennzeichneten Bande ist auf eine 12-stündige Derivatisierung mit 1mM HgCl₂ (pH=7.0) zurückzuführen (s. Gel A). Die blau markierte Bande zeigt keine signifikante Veränderung des Laufverhaltens. In diesem Fall wurde die Proteinlösung 12 Stunden mit 1 mM K₂PtCl₄ inkubiert. Diese reaktive Platinverbindung führte in den MALDI-TOF MS Experimenten bereits nach einer Stunde zu einem Shift im gemessenen Molekulargewicht (Tabelle 3-15), und spätere Phasierungsexperimente belegten, dass es sich um ein Derivat handelte. Die Derivatisierung mit K₂PtCl₄ brachte demnach keine zusätzliche Ladung ein. Viele der übrigen Banden weisen nach dem Versetzen mit einer Schwermetall-Lösung ein unverändertes Laufverhalten auf. Entweder fand keine Derivatisierung statt oder eine mögliche Derivatisierung war nicht mit einer Ladungsveränderung des Proteins verbunden. Bei der Behandlung mit verschiedenen Schwermetallreagenzien präzipitierte AbfA und drang daher nicht in das native Gel ein (Gel C). Dies korrelierte in allen Fällen mit einem vollständigen Verlust des Diffraktionsvermögens der entsprechend behandelten Kristalle. Diese Derivatisierungsbedingungen waren daher wenig vielversprechend.

3.4.2.2 *MIR-Experiment: Raumgruppe R3*

Mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese konnten vielversprechende Hinweise auf mögliche Derivatisierungsbedingungen mit HgCl₂ gewonnen werden. Die Ergebnisse der Massenspektrometrie (Tabelle 3-15) deuteten ebenfalls auf HgCl₂ als mögliches Derivatisierungsreagenz hin. Darüber hinaus lieferten die MALDI-TOF MS Ergebnisse zahlreiche Shifts für verschiedene Platinverbindungen. K₂PtCl₄ ist aufgrund der Abgangsgruppe die reaktivste Platinverbindung und wurde daher, neben HgCl₂, in erster Instanz für die röntgenkristallographische Untersuchung derivatisierter Kristalle verwendet. Im Rahmen der Proteinkristallographie gibt es für HgCl₂ und K₂PtCl₄ die meisten Berichte über erfolgreiche MIR-Phasierungsexperimente, daher sprach auch die Statistik für diese Vorgehensweise. Wie bereits diskutiert (Abschnitt 3.4.1) unterschieden sich die beiden Kristallformen für die Eignung im Rahmen der MAD-Phasierung. Die gleiche Argumentation hinsichtlich des Diffraktionsvermögens der Kristalle, der Größe der asymmetrischen Einheit und der Anzahl der Schwermetallpositionen ist auch für den MIR-Phasierungsprozess gültig. Daher wurden die hier dargestellten Derivatisierungen und Röntgendiffraktionsexperimente mit den rhomboedrischen Kristallen durchgeführt. Wurden die primitiv monoklinen Kristalle unter den gleichen Bedingungen derivatisiert, die zu einer erfolgreichen Derivatisierung der rhomboedrischen Kristalle führte (s.u.), gelang mit den gemessenen Röntgendaten keine Strukturlösung. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese und Massenspektrometrie lassen allerdings vermuten, daß die *P2₁*-Kristalle unter den gleichen Bedingungen derivatisiert werden. Die schlechte Qualität der Röntgendaten war vermutlich der Grund, daß die Schwermetallpositionen nicht bestimmt und die Struktur nicht gelöst werden konnte.

Tabelle 3-16 Iterative Vorgehensweise bei der Darstellung geeigneter Derivate. Die gemessenen Derivatdaten wurden mit dem Programm SCALEIT gegen die nativen Daten skaliert. Der in SCALEIT berechnete *Gradient* ist ein Maß für die experimentell gemessenen Intensitätsunterschiede. Der Gradient steigt bei beiden Schwermetallverbindungen mit zunehmender Soakdauer und Schwermetallkonzentration.

	K ₂ PtCl ₄			HgCl ₂		
	3 std.	8 std.	13 std.	72 std.	48 std.	120 std.
D.-Zeit [std.]	3 std.	8 std.	13 std.	72 std.	48 std.	120 std.
Konzentration [mM]	10mM	10mM	10mM	1mM	10mM	10mM
Auflösung [Å]	10-2.3	20-2.0	20-2.05	15-2.1	10-2.6	20-2.1
Vollständigkeit [%]	88.7	90.7	96.9	98.3	78.8	94.9
I/σ(I)	7.6	9.1	15.1	8.6	3.8	5.8
R _{sym} [%]	9.7	10.8	6.5	12.0	13.0	13.5
gradient (<i>scaleit</i>)	2.9	5.9	11.2	3.3	4.9	17.6

Ausgehend von den Ergebnissen der Massenspektrometrie und der nativen Gelelektrophorese wurde anfänglich versucht mit relativ kurzen Inkubationszeiten von wenigen Stunden geeignete Schwermetallderivate zu bekommen. Dies führte zu Intensitätsunterschieden, die größer waren als der zu erwartende experimentelle Fehler, aber für die Substrukturlösung erwiesen sich diese Daten als nicht ausreichend. Es zeigte sich, daß wesentlich längere Derivatisierungszeiten und höhere Schwermetallkonzentrationen notwendig waren, um signifikante Intensitätsunterschiede zu den nativen Daten messen zu können (Tabelle 3-16), denn mit zunehmender Soakdauer und Schwermetallkonzentration nimmt der Besetzungsgrad der einzelnen Positionen zu. In Tabelle 3-17 sind für das Quecksilber- und Platinderivat MIR-Daten aufgeführt, die zur Strukturlösung führten (10 mM HgCl₂, 120 std.; 10 mM K₂PtCl₄, 13 std.). Das Diffraktionsvermögen der derivatisierten Kristalle ist schlechter als das der nativen. Für die MIR-Phasierungsmethode ist die Auflösung zufriedenstellend, da die Schwermetallpositionen aufgrund der atomaren Streufaktoren typischerweise in einem Auflösungsbereich von 3-3.5 Å bestimmt werden.

Tabelle 3-17 Quecksilber (10 mM, 120 std.) und Platin (10mM, 13 std.)-Derivatdatensätze für die MIR-Phasierung.

Rigaku RU-200	MIR	
	Hg	Pt
Wellenlänge (Å)	1.54178	154.178
Temperatur der Datensammlung (K)	100	100
Auflösung (Å)	20.0-2.1	20.0-2.05
Anzahl der unabhängigen Reflexe	65700	72203
Vollständigkeit (%)	94.9	97.3
R_{merge} (%) #	13.5	6.5
R_{merge} (%) höchste Auflösungsschale	29.5	31.8
$I/(\sigma)I$	5.9	15.0
$I/(\sigma)I$ höchste Auflösungsschale	3.1	2.9

$$\# R_{merge} = \sum (I - \langle I \rangle) / \sum I.$$

3.4.2.3 Bestimmung der Schwermetallpositionen, Phasierung und Modellbau

Für die Positionsbestimmung wurde das Auflösungsmaximum auf 3.0 Å erniedrigt. Das Programm SOLVE, das auch für die MAD-Phasierung verwendet wurde, konnte mit Hilfe der MIR-Phasierungsmethode die Platin- und Quecksilberpositionen bestimmen. Die berechneten Anfangsphasen führten zu einer interpretierbaren Elektronendichtefunktion. Für die Positionsbestimmung wurde das Auflösungsmaximum auf 3.0 Å erniedrigt. Die *figure of merit* Werte der MIR-Phasierung aus SOLVE bzw. RESOLVE sind in Tabelle 3-18 aufgeführt.

Tabelle 3-18 FOM-Werte der MIR Phasierung und Dichtemodifikation (SOLVE/RESOLVE)

	Auflösung	SOLVE	RESOLVE
FOM (MIR)	20.0-3.0	0.41	0.66

Die berechneten MIR-Phasen mit einem FOM-Wert von 0.66 nach der Dichtemodifikation waren deutlich schlechter als die der Se-Met-MAD-Phasierung mit einem FOM-Wert von 0.81 bei einer Auflösung von 2.5 Å (Tabelle 3-13). Das in RESOLVE erstellte Modell der MIR-Phasierung bestand aus 143 von 1002 vollständig eingebauten Residuen. Darüber hinaus wurden 454 Residuen ohne Seitenkette eingebaut. In diesem unvollständigen Modell waren viele Sekundärstrukturelemente, insbesondere α -Helices, zu erkennen. Allerdings konnte RESOLVE nach der MAD-Phasierung ein wesentlich vollständigeres Modell mit 676 vollständig eingebauten Residuen (weitere 81 Residuen ohne Seitenkette) generieren (Abschnitt 3.4.1.4). Für das weitere Vorgehen bei der Strukturlösung der AbfA wurden daher die MIR-Daten nicht weiter berücksichtigt und mit den MAD-Phasen gerechnet. Eine Kombination der MIR und MAD-Daten führte in SOLVE nicht zu einer Verbesserung der berechneten Anfangsphasen.

3.5 Strukturlösung $P2_1$

3.5.1 Molekularer Ersatz: MOLREP und manuell

Bei der Strukturlösung der AbfA der Raumgruppe $P2_1$ wurde ein Dimer der bei 1.75 Å verfeinerten nativen AbfA der Raumgruppe $R3$ verwendet. Rechnungen mit einem Monomer als Suchmodell führten mit dem Programm MOLREP nicht zu vielversprechenden Ergebnissen. Die mit einem Sternchen gekennzeichneten fünf Lösungen führten jeweils zu einer plausiblen Erniedrigung des R-Wertes und zu einer Erhöhung des Korrelationskoeffizienten (Tabelle 3-6). Für die sechste Lösung waren diese Änderungen nur marginal. Bei nachfolgenden Verfeinerungsrechnungen mit fünf oder sechs Dimeren lag der freie R-Wert in einem Bereich von 35 – 40 %. Die visuelle Inspektion der Kristallpackung in 'O' (Jones et al., 1991) ergab für das sechste Dimer weder eine sinnvolle Packung noch lag dieses Dimer in einem Bereich hoher Elektronendichte. Das Vorliegen von fünf Dimeren war mit den Symmetrieüberlegungen der primitiv monoklinen Raumgruppe nicht konsistent. Allerdings konnte in den fünf Lösungen bzw. Dimeren eine hexamere AbfA - aus 3 Dimeren mit einer internen 222-Symmetrie - identifiziert werden. Dieses Hexamer war identisch mit dem der rhomboedrischen Kristallform. Mit der Kenntnis der internen 222-Symmetrie konnte zur Komplettierung des 2. Hexamers ein 6. Dimer erzeugt werden. Dies war mit den Symmetrieüberlegungen konsistent, und nachfolgende Verfeinerungsrechnungen mit 2 Hexameren lieferten plausible R-Werte (s. Abschnitt 3.7.2) Im primitiv monoklinen Kristall beinhaltet die asymmetrischen Einheit zwei ganze AbfA Hexamere. Die Orientierung der beiden Hexamere zueinander unterscheidet sich allerdings von der in der rhomboedrischen Kristallform beobachteten Anordnung. Dies wird jedoch erst bei der Diskussion der Quartärstruktur genauer beschrieben.

Tabelle 3-19 Ergebnisse der Kreuzrotations- und Translationsfunktionen aus MOLREP

Dimer	alpha	beta	gamma	Xfrac	Yfrac	Zfrac	R-fac	Corr
1*	331.5°	61.5°	25.3°	0.728	0.000	0.102	0.562	0.208
2*	29.4°	62.7°	299.5°	0.987	0.627	0.069	0.529	0.302
3*	303.9°	64.5°	66.6°	0.645	0.494	0.359	0.496	0.390
4*	27.8°	62.2°	179.2°	0.070	0.763	0.843	0.461	0.473
5*	56.0°	65.8°	258.7°	0.925	0.146	0.665	0.426	0.553
6	29.2°	61.6°	58.3°	0.781	0.743	0.562	0.424	0.557

3.6 Darstellung und Röntgendiffraktionsmessungen der katalytischen Mutanten: Michaelis-Menten Komplexe und kovalentes Glykosyl-Enzym Reaktionsintermediat

3.6.1 E175A

3.6.1.1 Michaelis-Menten Komplex I: 4-Nitrophenyl-Ara

Durch Sequenzvergleiche der Glykosid Hydrolase Familie 51 (GH-51) und biochemische Charakterisierung der AbfA wurde vor der Strukturlösung gezeigt (Shallom et al., 2002a; Shallom et al., 2002b), daß es sich bei der Aminosäure E175 um die katalytische Glutaminsäure handelt, die während der Katalyse als Säure/Base fungiert. Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung wurde demonstriert, daß die E175A Mutation zu einer partiellen Inaktivierung des Enzyms führt. Für die Darstellung des Michaelis-Menten Komplexes wurde die kristallisierte E175A Mutante (Abschnitt 3.2.3) mit dem synthetischen Substrat, 4-Nitrophenyl-Ara, *gesoaked*. Dazu wurde der Kristall vor der Messung für 15 min. in den Cryopuffer eingebracht, der mit 20 mM 4-Nitrophenyl-Ara angereichert wurde. Die eintretende Gelbfärbung des Kristalls, verursacht durch das freigesetzte 4-Nitrophenolat, belegt die katalytische Aktivität der AbfA im Kristall. Eine Cokristallisation erschien nicht sinnvoll, da das Substrat vollständig umgesetzt werden würde.

Tabelle 3-20 Die gemessenen Substrat-Enzym Komplexe der E175A Mutante. Ausgewählte kristallographische Parameter der Michaelis-Menten Komplexe und des kovalenten Reaktionsintermediats. Die Gitterparameter verändern sich durch das *Soaken* mit den verschiedenen Substraten im Vergleich zum nativen Kristall nicht signifikant.

	Native AbfA	4-Nitrophenyl-Ara	Kovalentes Intermediat	Ara- α (1,3)-Xyl
	Wildtyp	E175A	E175A	E175A
Wellenlänge (Å)	1.54178	0.84590	1.54178	1.54178
Raumgruppe	<i>R3</i>	<i>R3</i>	<i>R3</i>	<i>R3</i>
a,b (Å)	178.322	179.311	179.430	178.871
c (Å)	100.410	100.397	100.231	100.404
Unabhängige Reflexe	119 711	370 260	75 814	107 887
Auflösung (Å)	20.0-1.75	50.0-1.20	20.0-2.0	20.0-1.80
Vollständigkeit (%)	99.7	99.1	93.3	96.9
$\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$ (äußerste Schale)	26.5 (2.8)	16.3 (1.7)	13.4 (1.7)	16.9 (1.9)
R_{sym} (%) (äußerste Schale)	4.7 (39.5)	4.9 (38.3)	6.2 (37.5)	5.5 (41.0)

Der Michaelis-Menten Komplex mit 4-Nitrophenyl-Ara wurde am Synchrotron in Hamburg an der BW7B, dem Messplatz mit der intensivsten Röntgenstrahlung, gemessen. Insgesamt

wurden drei Datensätze dieses Kristalls (hoch, normal und niedrig aufgelöst) gemessen und mit SCALEPACK über den gesamten Auflösungsbereich von 50-1.20 Å gemeinsam skaliert (Tabelle 3-20).

3.6.1.2 Michaelis-Menten Komplex II: Ara- α (1,3)-Xyl

Für die Darstellung des Michaelis-Menten Komplexes mit dem natürlichen Substrat wurden die Kristalle der E175A Mutante mindestens 12 Stunden in dem substratangereicherten Cryopuffer (20 mM Ara- α (1,3)-Xyl) *gesoaked*. Kürzere Verweildauern im substrathaltigen Cryopuffer führten wegen niedriger Besetzung im aktiven Zentrum zu diffusen Elektronendichten für das gebundene Zuckersubstrat. Dies erklärt sich durch den Vergleich der beiden Substrate, denn 4-Nitrophenyl-Ara ist kleiner und kann leichter durch die Lösungsmittelkanäle des AbfA Kristalls zum aktiven Zentrum diffundieren als das natürliche Substrat.

Ausgewählte kristallographische Parameter des an einer CuK α -Drehanode (Rigaku RU200, MAR345 Flächenzähler) gemessenen Kristalls sind in Tabelle 3-20 aufgeführt. Der Kristall streute bis zu einem Auflösungsmaximum von 1.8 Å.

3.6.1.3 Das kovalente Arabinofuranose-Enzym Intermediat

Das synthetische Substrat 2,5-Dinitrophenyl-Ara besitzt eine reaktivere Abgangsgruppe als 4-Nitrophenyl-Ara, die der Säurekatalyse für den ersten Schritt der Reaktion nicht bedarf. Versetzt man die E175A Mutante mit diesem artifiziellen Substrat, findet der erste Schritt der Reaktion, die Glykosylierung des Proteins, statt. Die Deglykosylierung des Proteins ist dann der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion. Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung der Abf wurde gezeigt (Shallom et al., 2002a), daß dies zur Akkumulation des kovalenten Glykosyl-Enzym Intermediats führt. Da über die Stabilität des Intermediats keine genaueren Erkenntnisse vorlagen, wurde für die Darstellung des kovalenten Reaktionsintermediats der E175A Kristall lediglich für 2 sec. in den Cryopuffer eingetaucht, der mit 20 mM 2,5-Dinitrophenyl-Ara angereichert war. Anschließend wurde der Kristall direkt im Stickstoffstrom eingefroren und bis zu einer Auflösung von 2.0 Å gemessen.

3.6.1.4 Einfluß der Reaktion auf die Kristalleigenschaften

Die Studie von Übergangszuständen einer im Kristall stattfindenden Reaktion ist aufgrund der Auswirkungen der Reaktion auf die Kristalleigenschaften schwierig. Die Reaktion führt zu einer Erhöhung der Mosaizität und zunehmenden Fehlordnung im Kristall. Die Einsatzmöglichkeiten der Laue Kristallographie, die gegenüber diesen Kristalleigenschaften sensitiv ist, sind daher für die meisten biologischen Systeme begrenzt (Hajdu et al., 2000).

Im Fall der AbfA konnte diese Änderung der Kristalleigenschaften ebenfalls beobachtet werden. Die Michaelis Menten Komplexe zeigten eine höhere Mosaizität als das nicht-komplexierte Enzym (Tabelle 3-21). Die Mosaizitäten der beiden Michaelis Menten Komplexe mit 0.292° und 0.777° unterscheiden sich vor allem sehr deutlich, weil die Mosaizität von Synchrotron Daten in der Regel kleiner ist als die von Daten, die mit einer $\text{CuK}\alpha$ -Drehanode als Röntgenquelle gemessen wurden. Darüber hinaus variiert die Mosaizität von Kristall zu Kristall, die Auswirkung der Komplexbildung sollte jedoch vergleichbar sein. Der Einfluß der Größe des zugefügten Substrats sollte eine untergeordnete Rolle spielen. Der Datensatz des Übergangszustands zeigt die höchste Mosaizität von 1.154° , da die Reaktion durch die Glykosilierung des Enzyms weiter fortgeschritten ist. Dies korreliert mit der niedrigsten Auflösung aller Komplex- Datensätze für diese katalytische Mutante. Trotz der veränderten Kristalleigenschaften waren Auflösung und Qualität aller Datensätze gut, was auf das insgesamt sehr gute Beugungsvermögen der rhomboedrischen Kristallform zurückzuführen ist.

Tabelle 3-21 Mosaizität der E175A Komplex-Kristalle im Vergleich

Datensatz	Mosaizität [°]	Auflösung [Å]	Röntgenquelle
4-Nitrophenyl-Ara	0.292	1.2	Synchrotron
Ara- α (1,3)-Xyl	0.777	1.8	$\text{CuK}\alpha$ -Drehanode
2,5-Dinitrophenyl-Ara	1.154	2.0	$\text{CuK}\alpha$ -Drehanode
Se-Met-MAD (peak)	0.230	1.68	Synchrotron

3.6.2 E294A: Die katalytische Mutante mit der besonderen Kristallisationseigenschaft

Wie in Abschnitt 3.2.3 bereits beschrieben, konnte unter den Kristallisationsbedingungen, bei denen für das native Enzym, das Seleno-Methionin Derivat und die E175A Mutante die R3 Kristallform beobachtet wurde, die E294A Mutante überraschend nur in der primitiv monoklinen Kristallform kristallisiert werden. Aufgrund der Tatsache, daß die Mutation dieser katalytischen Aminosäure zu einer fast vollständigen Inaktivierung von AbfA führt (Shallom et al., 2002b), wurde die E294A Mutante mit 20 mM des synthetischen Substrats 4-Nitrophenyl-Ara kokristallisiert. Beleg für die sehr geringe enzymatische Aktivität dieser Mutante ist die Tatsache, daß nach einem Zeitraum von mehreren Wochen keine signifikante Gelbfärbung des Kristallisationstropfens durch das Produkt der Reaktion, 4-Nitrophenolat, zu beobachten war. Bei der nativen AbfA ist bereits nach wenigen Sekunden eine tief gelbe Färbung des Tropfens zu erkennen.

Tabelle 3-22 Ausgewählte kristallographische Parameter des Datensatzes der E294A Mutante cokrystallisiert mit dem synthetischen Substrat 4-Nitrophenyl-Ara. Der Datensatz wurde am EMBL in Hamburg an der BW7B gemessen. Aufgrund der begrenzten Messzeit ist der Datensatz nicht vollständig (83.6 %).

E294A mit 4-Nitrophenyl-Ara	
Wellenlänge (Å)	0.8431
Raumgruppe	$P2_1$
a (Å)	101.48
b (Å)	179.02
c (Å)	198.39
β (°)	97.37
Unabhängige Reflexe	242700
Auflösung (Å)	15.0-2.35
	Vollständigkeit (%)
15.0 - 2.35 Å	83.6
15.0 - 5.0 Å	76.0
5.0 - 2.43 Å	~ 90
2.43 - 2.35 Å	63.0
$\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$ (äußerste Schale)	13.1 (1.6)
R_{sym} (%) (äußerste Schale)	5.7 (35.6)

Aufgrund des moderaten Diffraktionsvermögens dieser Kristallform wurde der Kristall der E294A Mutante am Synchrotron in Hamburg (BW7A) gemessen. Aufgrund der hohen Intensität der an diesem Messplatz zur Verfügung stehenden Röntgenstrahlung konnten die am höchsten aufgelösten Daten der primitiv monoklinen Kristallform bis zu einem Auflösungsmaximum von 2.35 Å gemessen werden. Der R-Wert von 5.7 % über den gesamten Auflösungsbereich belegt die gute Qualität der gemessenen Daten. Der Datensatz konnte aufgrund der begrenzten Messzeit nicht vollständig gemessen werden. Darüber hinaus war der Primärstrahlfänger zu nah am Kristall positioniert, daher wurden nur 76 % aller Reflexe im Auflösungsbereich zwischen 15.0 - 5.0 Å gemessen. Aufgrund von Strahlungsschäden besitzt die höchste Auflösungsschale von 2.43 bis 2.35 Å lediglich eine Vollständigkeit von 63.0 %. Der übrige Auflösungsbereich von 5.0 - 2.5 Å weist eine Vollständigkeit von etwa 90% auf.

3.7 Verfeinerung und Qualität der Strukturen

Eine Übersicht über die Strukturen, deren Verfeinerung in Kapitel 3.7 dokumentiert ist.

3.7.1: Raumgruppe R3

3.7.1.1: MAD Struktur, 1.68 Å

3.7.1.2: AbfA (nativ), 1.75 Å

3.7.1.3: Michaelis-Menten Komplex I (E175A): 4-Nitrophenyl-Ara, 1.2 Å

Michaelis-Menten Komplex II (E175A): Ara- α (1,3)-Xyl, 1.8 Å

Reaktionsintermediat (E175A): 2,5 Dinitrophenyl-Ara, 2.0 Å

3.7.2: *Raumgruppe P2₁*

3.7.2.1: E294A, 2.35 Å

3.7.2.2: AbfA (nativ), 2.6 Å

Die Angabe in Å gibt die obere Auflösungsgrenze der Datensammlung an.

3.7.1 R3 Strukturen

3.7.1.1 MAD Struktur

In dem mit ARP/wARP generierten Strukturmodell fehlten im Monomer A 20 Residuen (Abschnitt 3.4.1.4). Bereits mit diesem unvollständigen Strukturmodell wurden nach der ersten Verfeinerung mit REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) R-Werte von 26.4 % (R_{work}) und 30.1 % (R_{free}) erzielt. Die Vervollständigung und Verfeinerung des Strukturmodells bestand aus mehreren Zyklen der manuellen Anpassung des Strukturmodells an die Elektronendichte in 'O' und Verfeinerungsrechnungen mit dem Programm REFMAC5.

Tabelle 3-23 Inhalt und Qualität des verfeinerten Modells aus der MAD-Phasierung. Die Parameter wurden mit REFMAC5 (RMS-Werte) oder SFCHECK (DPI, Luzatti-Plot) berechnet. Für die Berechnung des freien R-Wertes (R_{free}) wurden mit dem CCP4-Programm UNIQUEIFY 5% der Daten randomisiert ausgewählt.

Enzym	Se-Met AbfA
Raumgruppe	R3
Inhalt des Modells	
Residuen	994
Substrat	---
Wasser	1026
Glycerol	---
Verfeinerung	
Auflösungsbereich [Å]	35.0 - 1.68
R_{work} (%)	17.2
R_{free} (%)	20.1
RMS-Abweichungen	
DPI [Å]	0.100
Bindungslängen [Å]	0.020
Bindungswinkel [°]	1.554
chirale Volumen [Å ³]	0.184
Luzatti plot [Å]	0.178
B-Faktoren	
alle Proteinatome [Å ²]	24.0
Atome der Proteinhauptkette [Å ²]	22.5
Atome der Proteinseitenkette [Å ²]	25.6
Substrat [Å ²]	---
Wasser [Å ²]	40.1
Glycerol [Å ²]	---

Bis auf die ersten 4 Residuen, für die keine ausreichende Qualität der Elektronendichte vorhanden war, konnten alle fehlenden Aminosäuren in 'O' eingebaut werden. Nach lokalen

Fehlern im Strukturmodell wurde mit dem Programm SFCHECK (Elektronendichte-Korrelationskoeffizienten für alle Haupt- und Seitenkettenatome jeder einzelnen Aminosäure) gesucht, und bis auf wenige Seitenketten an der Oberfläche des Proteins waren alle Aminosäure gut in der Dichte definiert. Der Einbau von insgesamt 1026 Wassern wurde mit der ARP/wARP Routine durchgeführt, die in der REFMAC5 Version von CCP4i implementiert ist. Anschließend wurden die eingebauten Wasser mit einem auffällig hohen B-Faktor (> 60) überprüft und gegebenenfalls aus dem Strukturmodell entfernt. Nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) *restraints* oder *constraints* wurden bei der Verfeinerung nicht berücksichtigt. Die bis zu einem R_{work} von 17.2 % verfeinerte Struktur aus der MAD-Phasierung diente als Startmodell für die Verfeinerung der nativen AbfA und der E175A Strukturen.

Im Ramachandran-Plot liegen 87.3 % aller Residuen in den am meisten favorisierten Bereichen (*most favoured*) und 11.7 % in den zusätzlich erlaubten (*additionally allowed*). Die übrigen neun Residuen des AbfA Dimers – 0.6 % liegen in den großzügig erlaubten Bereichen (*generously allowed*) und 0.5 % in den verbotenen Bereichen (*disallowed region*) des Plots – sind alle gut in der Elektronendichte definiert.

3.7.1.2 Das native Enzym

Die bis zu einem R-Wert von 17.2 % verfeinerte MAD Struktur (Abschnitt 3.7.1) diente als Startmodell für die Verfeinerung der nativen AbfA. Der gesamte Verfeinerungsprozess bestand aus einer Kombination der manuellen Anpassung der Struktur an die Elektronendichte in 'O' und den Verfeinerungsroutinen aus REFMAC5. Bei der Wassersuche mit ARP/wARP wurden 1146 Wassermoleküle in die Struktur eingebaut.

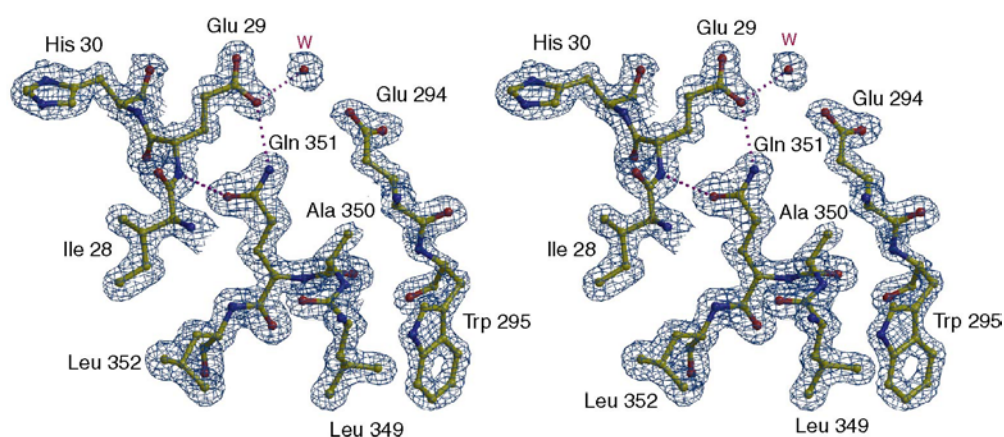


Abbildung 3-11 Repräsentativer Ausschnitt der $2DF_0$ - mF_c gewichteten nativen AbfA Elektronendichte bei 1.75 Å. Die gezeigte Elektronendichte ist bei 2.0σ konturiert. Die Abbildung wurde mit BOBSCRIPT (Esnouf, 1997) und RASTER3D (Merritt and Bacon, 1997) erstellt. Die katalytische Glutaminsäure E294 hat eine gut definierte Elektronendichte. Gln351, das in die nicht-Prolin cis-Peptidbindung involviert ist, und Glu29 sind an der Substratbindung beteiligt (s. Strukturdiskussion).

Die nicht-kristallographische Symmetrie wurde während der Verfeinerung nicht berücksichtigt. In den aktiven Zentren der AbfA waren gut definierte Dichten für Glycerol - Bestandteil des Cryo-Puffers - vorhanden. Das Glycerol imitiert durch seine Hydroxyl-Gruppen das natürliche Zuckersubstrat, daher wird es fest gebunden, und die B-Faktoren von durchschnittlich 29.3 \AA^2 sind mit denen der gesamten Proteinstruktur (24.9 \AA^2) vergleichbar. Die Verfeinerung konvergierte bei R-Werten von 17.1 % (R_{work}) und 20.4 % (R_{free}) (Tabelle 3-24). In allen AbfA Strukturen sind zwischen den Residuen Tyr70 – Pro71, Gly72 – Gly73 und Ala350 – Gln351 drei cis-Peptidbindungen enthalten. Alle drei Bereiche sind eindeutig in der Elektronendichte definiert, und Abbildung 3-11 zeigt den Bereich um die nicht-Prolin cis-Peptidbindung zwischen Ala350 und Gln351.

Tabelle 3-24 Verfeinerung der nativen Struktur. Der DPI und der Luzatti-Plot wurden mit SFCHECK berechnet. Ferner wurden mit SFCHECK Dichte-Korrelationskoeffizienten für alle Haupt- und Seitenketten berechnet. Bis auf einige Aminosäureseitenketten an der Proteinoberfläche waren alle Residuen gut in der Elektronendichte definiert.

Enzym	AbfA (nativ)
Raumgruppe	<i>R3</i>
Inhalt des Modells	
Residuen	994
Substrat	---
Wasser	1146
Glycerol	2
Verfeinerung	
Auflösungsbereich [\AA]	20.0 - 1.75
R_{work} (%)	17.1
R_{free} (%)	20.4
RMS-Abweichungen	
DPI [\AA]	0.120
Bindungslängen [\AA]	0.014
Bindungswinkel [$^\circ$]	1.490
chirale Volumen [\AA^3]	0.096
Luzatti plot [\AA]	0.183
B-Faktoren	
alle Proteinatome [\AA^2]	24.9
Atome der Proteinhauptkette [\AA^2]	23.5
Atome der Proteinseitenkette [\AA^2]	26.3
Substrat [\AA^2]	---
Wasser [\AA^2]	37.8
Glycerol [\AA^2]	29.3

Die stereochemische Qualität der nativen Struktur wurde mit PROCHECK überprüft. Abbildung 3-12 zeigt den Ramachandran-Plot (Verteilung der Hauptkettentorsionswinkel ϕ und ψ) der Kette B: 86.7 % aller Residuen liegen in den am meisten favorisierten Bereichen (A, B, L; *most favoured*) und 11.7 % in den zusätzlich erlaubten Bereichen (a, b, I, p;

additionally allowed). Tyr299 und Ile356 (0.5 %) sind beide in den großzügig erlaubten Bereichen ($\sim a$, $\sim b$, $\sim l$, $\sim p$; *generously allowed*), Asn354 und Ala 224 in den verbotenen Bereichen (*disallowed region*) des Plots. Alle 4 Residuen lagen bereits in der verfeinerten MAD Struktur an dieser Position des Ramachandran-Plots. Diese Residuen sind eindeutig in der Elektronendichte des nativen Enzyms definiert, und aufgrund der hohen Qualität der vorliegenden Dichte war eine Veränderung der Torsionswinkel weder sinnvoll noch möglich.

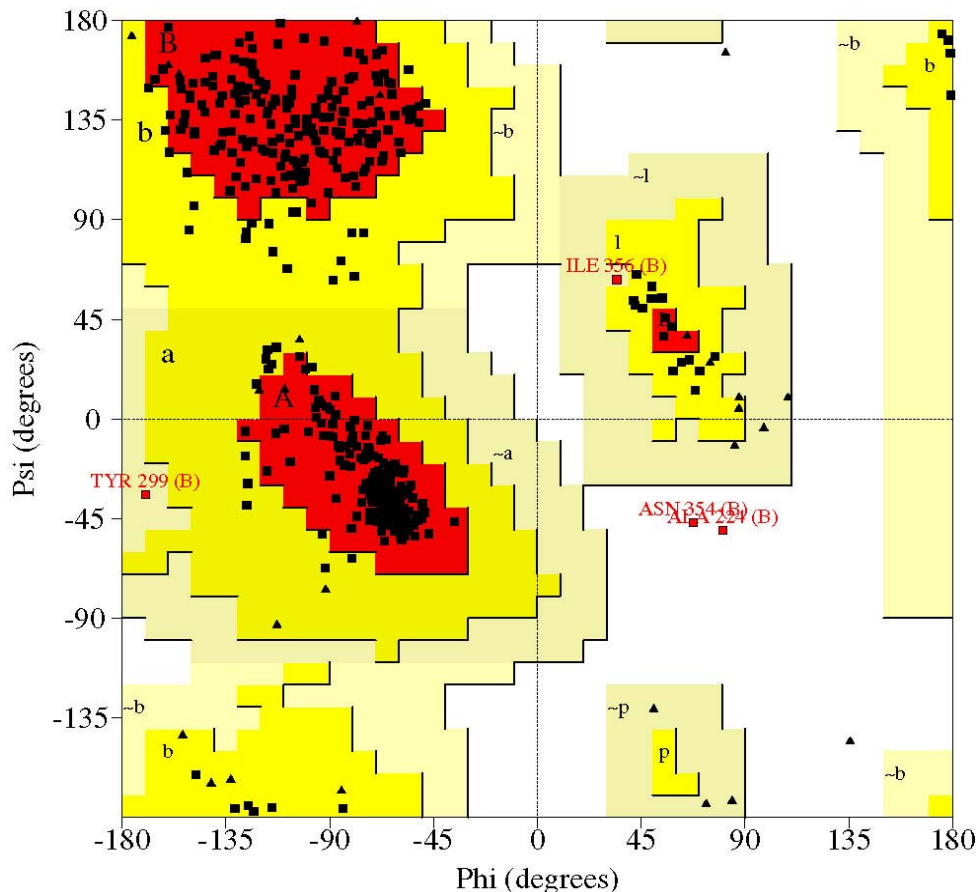


Abbildung 3-12 Ramachandran-Plot der nativen AbfA (Kette B). Die vier Residuen (Ala224, Tyr299, Asn 354, Ile356), die in den großzügig erlaubten (hellgelb, $\sim a$, $\sim b$, $\sim l$, $\sim p$; *generously allowed*) und in den verbotenen Bereichen (weiß, *disallowed region*) liegen, sind in beiden Ketten des AbfA Dimers in diesen Bereichen des Plots zu finden. Zur besseren Übersicht sind nur die Residuen der Kette B dargestellt. In allen gezeigten Ramachandran-Plots sind Glycine als Dreiecke dargestellt.

3.7.1.3 E175A-Komplexe

Die Vorgehensweise bei der Verfeinerung der E175A Strukturen war identisch mit der bei der nativen AbfA. Die MAD-Struktur wurde als Startmodell verwendet und anschließend mit 'O' und REFMAC5 verfeinert. Für die gebundenen Substrate, 4-Nitrophenyl-Ara, Ara- $\alpha(1,3)$ -Xyl und das kovalente Reaktionsintermediat wurden bereits nach dem ersten Verfeinerungsschritt gut definierte Elektronendichten im aktiven Zentrum erhalten, in die die Substrate eindeutig eingepasst werden konnten. Die B-Faktoren der einzelnen Substrate, die

nicht signifikant höher sind als für die der Gesamtstruktur, sind ein Hinweis auf den hohen Besetzungsgrad der gebundenen Substrate. Die Besetzungsfaktoren aller Substrate wurden für die Verfeinerungsrechnungen auf 1.0 gesetzt. In Abhängigkeit von der Auflösung konnten 1588 (4-Nitrophenyl-Ara), 930 (Ara- α (1,3)-Xyl) und 767 (kovalentes Intermediat) Wasser in die Strukturen eingebaut werden. Die nicht-kristallographische Symmetrie des Dimers wurde bei allen Verfeinerungen nicht berücksichtigt. Bei der Verfeinerung der 4-Nitrophenyl-Ara Struktur, für die Daten bis in einen atomaren Auflösungsbereich gesammelt werden konnten, wurden anisotrope Temperaturfaktoren berücksichtigt, was zu einer signifikanten Erniedrigung der R-Werte von etwa 1.5 % führte. Bei allen Strukturen wurde besonderer Wert auf die stereochemische Qualität der Modelle gelegt, daher wurden die gemessenen Röntgenterme im Vergleich zu den stereochemischen Zwängen weniger stark gewichtet. Bei einer stärkeren Gewichtung der experimentellen Daten erniedrigten sich die R-Werte zwar um etwa 1 %, aber die Stereochemie verschlechterte sich deutlich.

Tabelle 3-25 Verfeinerung der E175A-Komplexe. Ausgewählte Parameter der Verfeinerung und der Qualität der Modelle. Die RMS-Abweichungen wurden mit REFMAC5 berechnet, der DPI und Luzatti-Plot mit SFCHECK und die B-Faktoren mit BAVARAGE.

Enzym	E175A	E175A	E175A
Raumgruppe	R3	R3	R3
Substrat	4-Nitrophenyl- Ara	Ara- α (1,3)-Xyl	2,5 Dinitro- Ara
Inhalt des Modells			
Residuen	994	994	994
Substrat	2	2	2
Wasser	1588	930	767
Glycerol	---	---	---
Verfeinerung			
Auflösungsbereich [Å]	20.0 - 1.20	20.0 - 1.80	20.0 - 2.0
R _{work} (%)	16.0	17.4	16.9
R _{free} (%)	17.9	21.3	21.5
RMS-Abweichungen			
DPI [Å]	0.045	0.135	0.203
Bindungslängen [Å]	0.014	0.013	0.018
Bindungswinkel [°]	1.563	1.474	1.667
chirale Volumen [Å ³]	0.104	0.091	0.104
Luzatti plot [Å]	0.154	0.219	0.232
B-Faktoren			
alle Proteinatome [Å ²]	17.3	30.1	42.1
Atome der Proteinhauptkette [Å ²]	15.9	28.9	40.9
Atome der Proteinseitenkette [Å ²]	18.7	31.3	43.4
Substrat [Å ²]	33.3	43.2	43.7
Wasser [Å ²]	22.3	39.2	48.2

Multiple Konformationen wurden nicht berücksichtigt, da sich diese in den Elektronendichten nicht abzeichneten. Abbildung 3-13 zeigt die Ramachandran-Plots des 4-Nitrophenyl-Ara

Komplexes und des Reaktionsintermediats. Ala224, Tyr299, Asn354 und Ile356 liegen, wie in der MAD Struktur und der nativen AbfA, in den auffälligen Bereichen der Plots. Auch die Elektronendichte der hoch aufgelösten Struktur (4-Nitrophenyl-Ara) lieferte keine Hinweise auf lokale Fehler in diesen Bereichen des Modells.

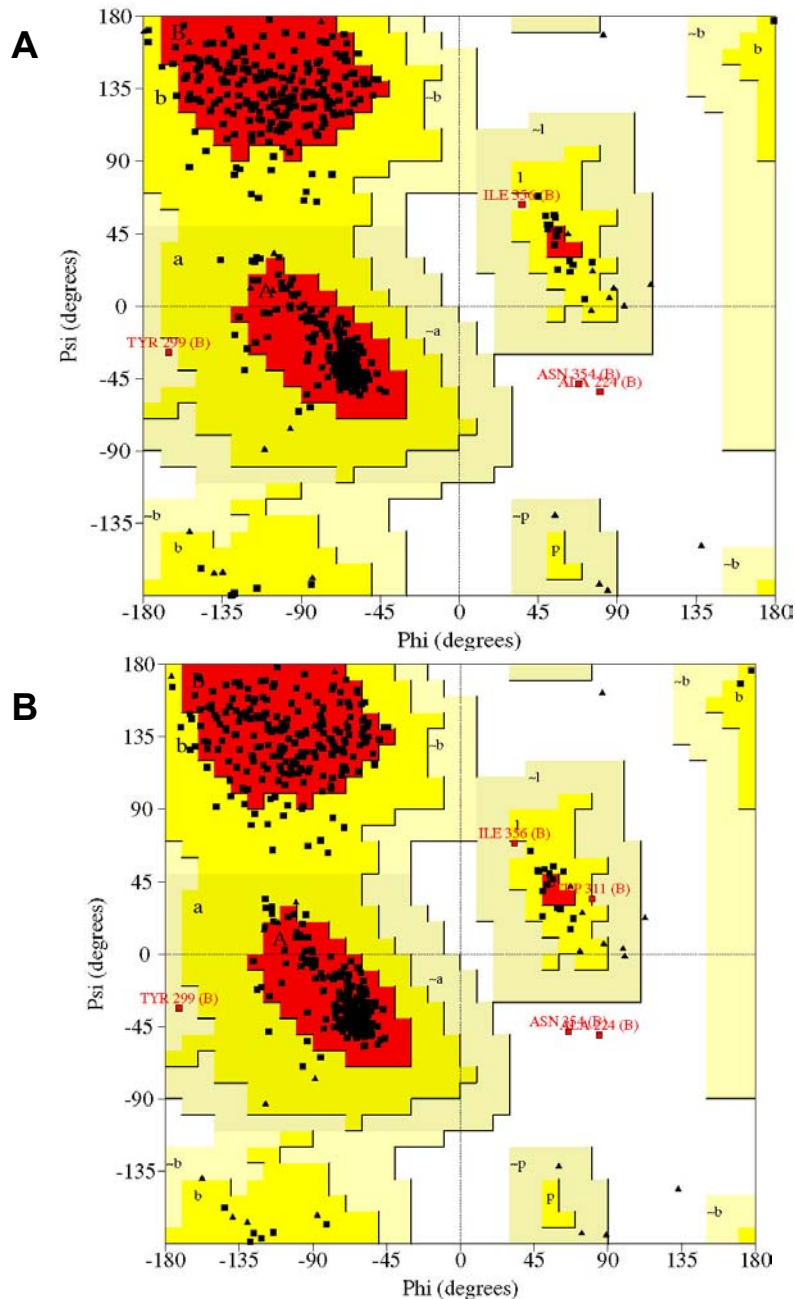


Abbildung 3-13 Ramachandran-Plots des 4-Nitrophenyl-Ara Komplexes (A) mit der höchsten Auflösung (1.2 Å) und des kovalenten Reaktionsintermediats (B) mit der niedrigsten Auflösung (2.0 Å) der R3 Kristallform. Zur Verbesserung der Darstellung sind jeweils nur die Residuen der Kette B dargestellt. In A liegen 88.3 % in den am meisten favorisierten Bereichen, 10.6 % in den zusätzlich erlaubten Bereichen und jeweils 0.5 % in den großzügig erlaubten und verbotenen Bereichen des Plots. In B sind es 86.5 % und 12.4 % für die am meisten favorisierten und zusätzlich erlaubten Bereiche. 0.7 % und 0.5 % der Residuen liegen in den großzügig erlaubten und verbotenen Bereichen.

Für den Komplex Ara- α (1,3)-Xyl ist der Ramachandran-Plot nicht gezeigt, aber auch dort liegen diese vier Residuen in den genannten Bereichen. Die Verfeinerung der 3 Komplexe konvergierte bei R_{work} -Werten von 16.0 (4-Nitrophenyl-Ara), 17.4 (Ara- α (1,3)-Xyl) und 16.9 % (kovalentes Reaktionsintermediat) (Tabelle 3-25).

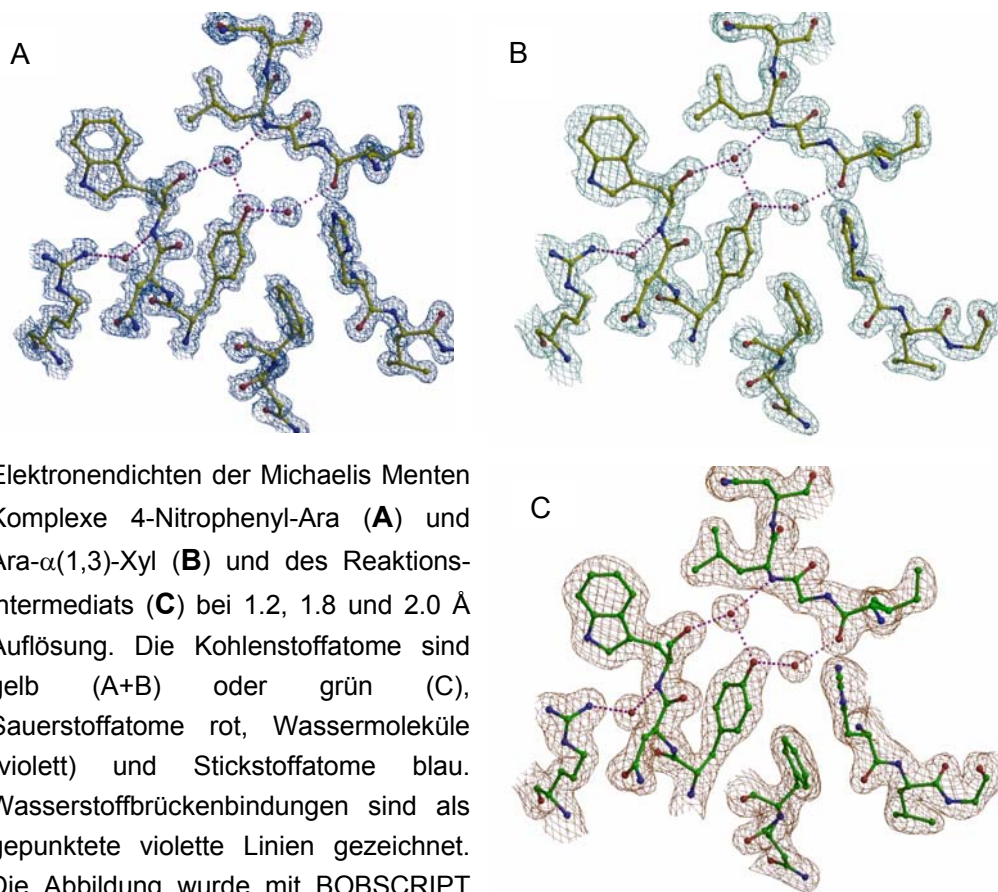


Abbildung 3-14 Repräsentativer Ausschnitt aus den $2DF_o-mF_c$ - Elektronendichten der verschiedenen E175 Komplexe bei 1.2, 1.8 und 2.0 Å Auflösung. Die Dichten sind jeweils bei 2.5σ konturiert.

Abbildung 3-14 zeigt, daß die Qualität der Elektronendichte mit zunehmender Auflösung steigt. In dem atomaren Auflösungsbereich von 1.2 Å sind deutliche Löcher in den aromatischen Ringsystemen (Trp und Tyr) zu erkennen. Die Zahlenwerte für den DPI und den Luzatti-Plot (Tabelle 3-25) für die drei Strukturen belegen, daß die Unsicherheit der Atomkoordinaten mit zunehmender Auflösung sinkt und die Validität der Strukturen steigt.

3.7.2 $P2_1$ Strukturen

3.7.2.1 Die katalytische Mutante E294A

Für die Verfeinerung der Struktur der katalytischen Mutante wurden die beiden Hexamere als Startmodell verwendet, die aus den endverfeinerten nativen Dimeren der Raumgruppe $R3$ mit MOLREP und anschließender Ergänzung erzeugt wurden (Abschnitt 3.5.1). Die Verfeinerung wurde mit der gleichen Strategie wie bei den anderen Strukturen durch Modifikationen des Modells in 'O' und Verfeinerungsroutinen aus REFMAC5 durchgeführt. Zu Beginn wurde mit dem Startmodell aus dem molekularen Ersatz eine Starre-Körper Verfeinerung durchgeführt, die jedoch zu keiner signifikanten Erniedrigung der R-Werte ($R_{\text{work}}=48.6\%$ und $R_{\text{free}}=48.5\%$) führte.

Tabelle 3-26 Ausgewählte Parameter der Verfeinerung der nativen $P2_1$ Struktur und der katalytischen Mutante E294A

Enzym Raumgruppe	AbfA (nativ) $P2_1$	E294A $P2_1$
Inhalt des Modells		
Residuen	5964	5964
Substrat	---	---
Wasser	227	393
Glycerol	---	---
Verfeinerung		
Auflösungsbereich [Å]	20 - 3.0	15.0 - 2.35
R_{work} (%)	22.8	24.0
R_{free} (%)	29.0	27.5
RMS-Abweichungen		
DPI [Å]	0.5130	1.353
Bindungslängen [Å]	0.046	0.021
Bindungswinkel [°]	3.232	1.850
chirale Volumen [Å ³]	0.203	0.129
Luzatti plot [Å]	0.401	0.397
B-Faktoren		
alle Proteinatome [Å ²]	42.7	61.0
Atome der Proteinhauptkette [Å ²]	42.1	60.2
Atome der Proteinseitenkette [Å ²]	42.3	61.8
Substrat [Å ²]	---	---
Wasser [Å ²]	25.3	52.4
Glycerol [Å ²]	---	---

Bei der Verfeinerung wurden die nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) *restraints* innerhalb der zwei Hexamere bzw. der zwölf Monomere berücksichtigt. Dies führte im Gegensatz zu der Verfeinerung der rhomboedrischen Strukturen mit nur einem Dimer in der asymmetrischen Einheit zu einer signifikanten Erniedrigung von R_{work} und R_{free} (jeweils $\sim 2\%$). Nach dem Einbau von 393 Wassern konvergierten die R-Werte bei $R_{\text{work}}=24.0\%$ und $R_{\text{free}}=27.5\%$ (Tabelle 3-26). Die B-Faktoren sind mit durchschnittlich 61.0 \AA^2 für alle Proteinatome relativ hoch. Der mit den experimentellen Daten in TRUNCATE berechnete B-Faktor liegt mit 77.4 \AA^2 auch in dieser Größenordnung und belegt die hohe Fehlordnung und das moderate Diffraktionsvermögen des Kristalls. Darüber hinaus wurden alle Daten bis zur experimentellen Auflösungsgrenze von 2.35 \AA (Tabelle 3-22) in den Verfeinerungsrechnungen berücksichtigt. Beide Aspekte erklären die hohen B-Faktoren der endgültigen Struktur. Die E294A Mutante wurde mit dem synthetischen Substrat, wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben, kokristallisiert. In der resultierenden Elektronendichte waren die Residuen des Proteins gut definiert, aber in allen 12 aktiven Zentren der Protomere konnte keine interpretierbare Elektronendichte für das gebundene Substrat 4-Nitrophenyl-Ara beobachtet werden. Für das Cryoprotektant Glycerol war ebenfalls keine Dichte vorhanden. Im Ramachandran-Plot liegen jeweils 0.7% (insgesamt 6 Residuen) in den großzügig erlaubten und verbotenen Bereichen. Ala224, Tyr299, Asn 354 und Ile3561 liegen in allen Strukturen der AbfA in diesen Bereichen des Plots. Arg441 und Asp444 sind an der Oberfläche des Proteins positioniert und bestmöglich an die vorhandene Elektronendichte angepaßt.

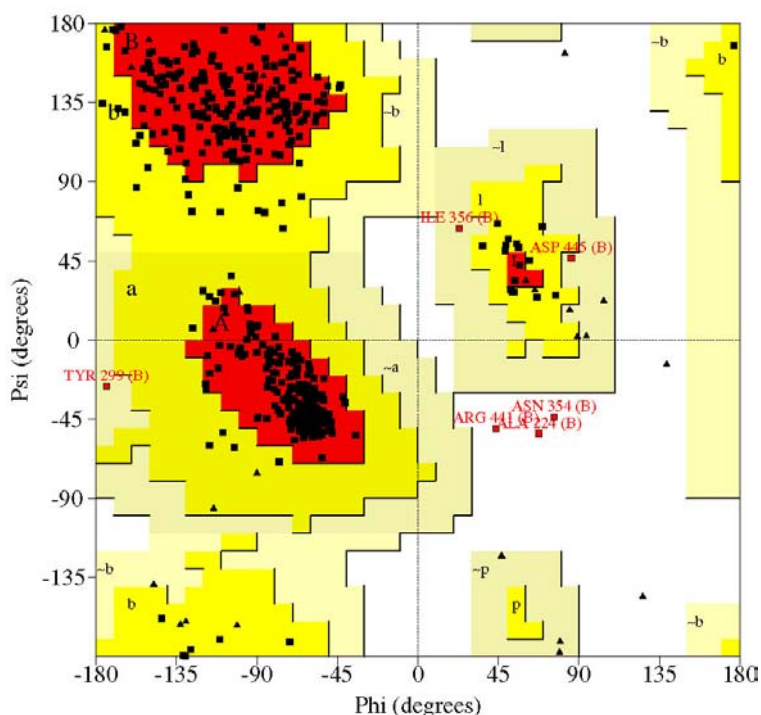


Abbildung 3-15 Ramachandran-Plot eines Monomers (B) der E294A Mutante. In den am meisten favorisierten Bereichen A, B, L (rot) liegen 87.1% (386) und den darüber hinaus erlaubten Bereichen (a, b, l, p, gelb) 11.5% (51) der Residuen. Jeweils 0.7% liegen in den großzügig erlaubten ($\sim a$, $\sim b$, $\sim l$, $\sim p$, hellgelb) und verbotenen Bereichen (weiß) des Plots.

3.7.2.2 Die native AbfA in der primitiv monoklinen Kristallform

Für die Verfeinerung der nativen AbfA in der $P2_1$ Raumgruppe wurde die endverfeinerte Struktur der E294A Mutante (Abschnitt 3.7.2.1) als Startmodell verwendet. Im Zuge der Verfeinerung wurde die katalytische Glutaminsäure, Glu294, in die gut definierte Dichte eingepaßt, mit ARP/wARP gebundene Wassermoleküle in das Strukturmodell integriert und leichte Modifikationen im Modell durchgeführt. NCS *restraints* wurden während des gesamten Verfeinerungsprozesses berücksichtigt, und am Ende lagen die R-Werte bei $R_{\text{work}}=22.8\%$ und $R_{\text{free}}=29.0\%$ (Tabelle 3-26). Das endgültige Modell besteht aus 2 ganzen Hexameren und beinhaltet 227 gebundene Wasser. Diese Struktur wurde lediglich bei der Untersuchung des Einflusses der Mutation an Position 294 berücksichtigt. Beim Vergleich der Kristallpackung und der Quartärstruktur wurde die höher aufgelöste Struktur der katalytischen Mutante verwendet. Die R-Werte beider $P2_1$ Strukturen sind verhältnismäßig niedrig, da die identische Struktur in der rhomboedrischen Kristallform in einer anderen Orientierung bereits bei höherer Auflösung bestimmt wurde.

3.8 Tertiärstruktur

Die AbfA kristallisiert in der rhomboedrischen Kristallform mit einem Dimer des Hexamers in der asymmetrischen Einheit. In der primitiv monoklinen Kristallform sind zwei Hexamere in der asymmetrischen Einheit enthalten. Das AbfA Monomer (Abbildung 3-16) besteht aus 2 Domänen, einem $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel (Residuen 20 – 383) und einer β -Sandwich Domäne mit Jelly roll Topologie (Residuen 1 -19 und 384 – 501). Die Abbildung zeigt das Enzym aus zwei verschiedenen Perspektiven (90° Rotation entlang der horizontal eingezeichneten x-Achse). Der linke Teil der Abbildung zeigt eine Aufsicht auf das $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel, der rechte Teil hebt die Anordnung der zwei Domänen hervor.

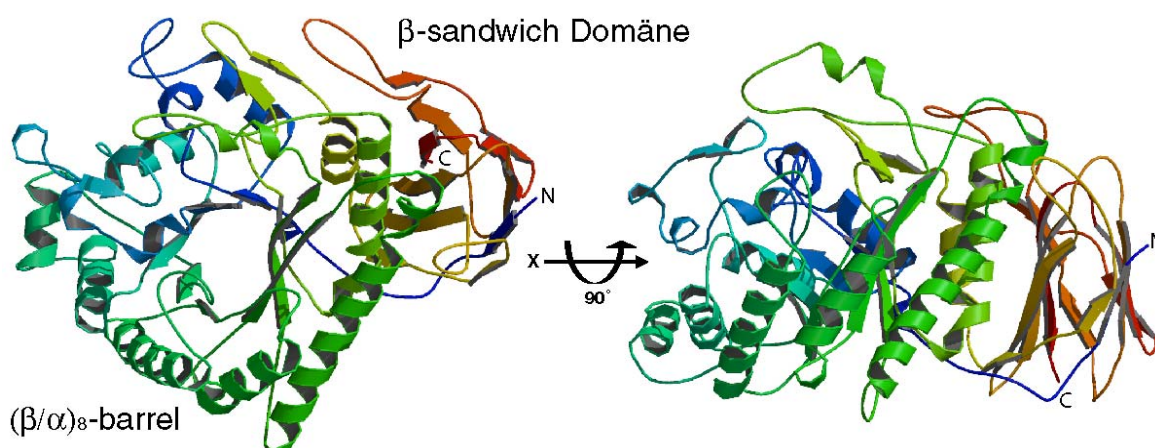


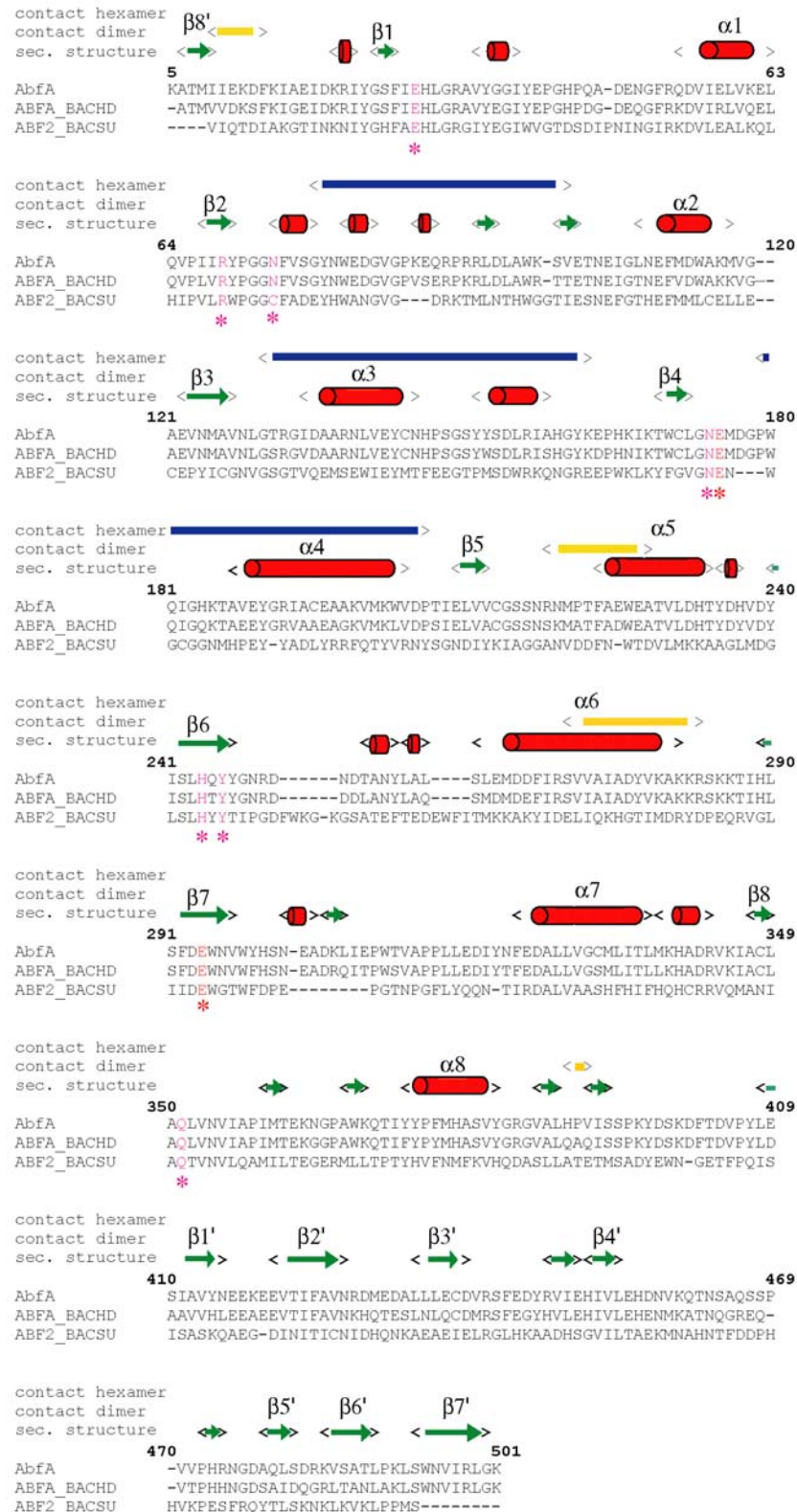
Abbildung 3-16 Die Faltung des AbfA Monomers als Banddiagramm. Das Enzym ist aus zwei verschiedenen Blickwinkeln zu sehen, die durch eine horizontale Rotation um 90° entlang der x-Achse zueinander in Beziehung stehen. Die Sekundärstrukturelemente sind mit gleitenden Übergängen von blau (N-Terminus) über grün und gelb nach rot (C-Terminus) eingefärbt. Bis auf das N-terminale Faltblatt (blau) ist die β -Sandwich Domäne in Rot- und Gelbtönen eingefärbt. Das $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel ist in Grün- und Blautönen gezeichnet.

3.8.1 Das katalytische $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel

Das $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel (Residuen 20-383) besitzt einen elliptischen Querschnitt (Abbildung 3-16), wobei die Hauptachse von den β -Strängen 1 bis 5 gebildet wird. Diese verzerrte Architektur des Barrels ist bereits bei anderen $(\beta/\alpha)_8$ -Glykosidasen beobachtet worden (Jenkins et al., 1995). Darüber hinaus gibt es zahlreiche Abweichungen vom $(\beta/\alpha)_8$ -Grundmotiv. Eine zusätzliche Subdomäne, bestehend aus drei α -Helices und einem anti-parallelen β -Faltblatt (Residuen 74 bis 103), befindet sich zwischen β -Strang 2 und α -Helix 2.

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 3-17 Sequenz und Sekundärstrukturelemente der AbfA. Die α -Helices sind durch rote Zylinder, die Faltblätter durch grüne Pfeile symbolisiert. Die das $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel Grundmotiv bildenden Sekundärstrukturelemente sind mit $\alpha 1 - \alpha 8$ und $\beta 1 - \beta 8$ gekennzeichnet. Die acht β -Stränge des Jelly Roll Motivs sind mit $\beta 1' - \beta 8'$ annotiert. Die Kontaktflächen innerhalb der Dimere sind durch gelbe, die innerhalb des Hexamers durch blaue Balken dargestellt.



Zwei weitere α -Helices befinden sich zwischen α -Helix 3 und β -Strang 4 (Residuen 151 bis 158) bzw. β -Strang 7 und α -Helix 7 (Residuen 302 bis 307). Außerdem befindet sich ein antiparalleles Faltblatt (Residuen 359 bis 369) zwischen β -Strang 8 und α -Helix 8.

Glykosid Hydrolasen mit einer ähnlichen globalen Faltung können daraufhin in Clans gruppiert werden (Davies and Henrissat, 1995). Basierend auf Sequenzvergleichen wurden die α -L-Arabinofuranosidasen der Familie 51 als Teil des aus 16 Glykosid Hydrolase Familien bestehenden Clans GH-A klassifiziert (Zverlov et al., 1998). Innerhalb dieses Clans sind Strukturen für Enzyme der Familien 1, 2, 5, 10, 17, 26, 42 und 53 beschrieben worden, und die katalytische Domäne aller Strukturen weist die gleiche globale $(\beta/\alpha)_8$ -Topologie und Architektur des aktiven Zentrums auf. Sowohl die $(\beta/\alpha)_8$ -Faltung der AbfA als auch die Lokalisation der katalytischen Residuen (Abbildung 3-18) ist konsistent mit der Klassifizierung der Glykosid Hydrolase Familie 51 als Mitglied des GH-A Clans.

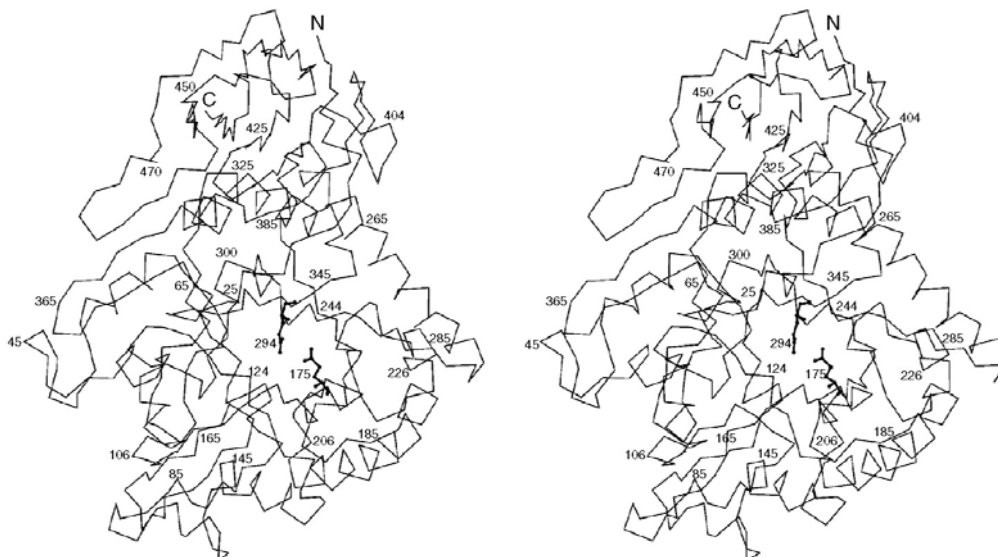


Abbildung 3-18 C-alpha trace der AbfA als Stereodiagramm. Die katalytischen Residuen E175 und E294 sind als *ball-and-stick* Modelle dargestellt. Die Position der Aminosäuren ist etwa alle 20 Residuen angegeben.

3.8.2 Die β -Sandwich Domäne mit Jelly Roll Topologie

Die zweite Domäne besteht aus 12 β -Strängen mit einer ungewöhnlichen *Jelly Roll* Topologie. Die acht β -Stränge des Jelly Rolls sind in der Form eines Sandwiches gepackt, wobei viele hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem oberen und unteren Faltblatt vorhanden sind. Der achte β -Strang wird von den N-terminalen Residuen 6 bis 9 gebildet, wohingegen der verbleibende Teil der Domäne aus den C-terminalen Residuen 384 bis 501 besteht. In Gegensatz zum perfekten Grundmotiv des *Jelly Rolls* zeigt der achte β -Strang eine entgegengesetzte Richtung und ist wahrscheinlich im Laufe der Evolution in die

Domäne eingebettet worden (Abbildung 3-19). Diese Domäne zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu der C Domäne einiger α -Amylasen und zu Cellulose bindenden Domänen (Fujimoto et al., 1998; Kamitori et al., 1999; Tormo et al., 1996) (Abbildung 3-20). Von daher ist es denkbar, daß diese Domäne ehemals als Kohlenhydrat bindende Domäne fungierte, die ihre Funktion im Laufe der Evolution verloren hat. In diesem Zusammenhang ist es sinnvoll zu erwähnen, daß AbfA gegenüber Xylan keine Bindung zeigte (Shallom und Shoham, unveröffentlichte Daten).

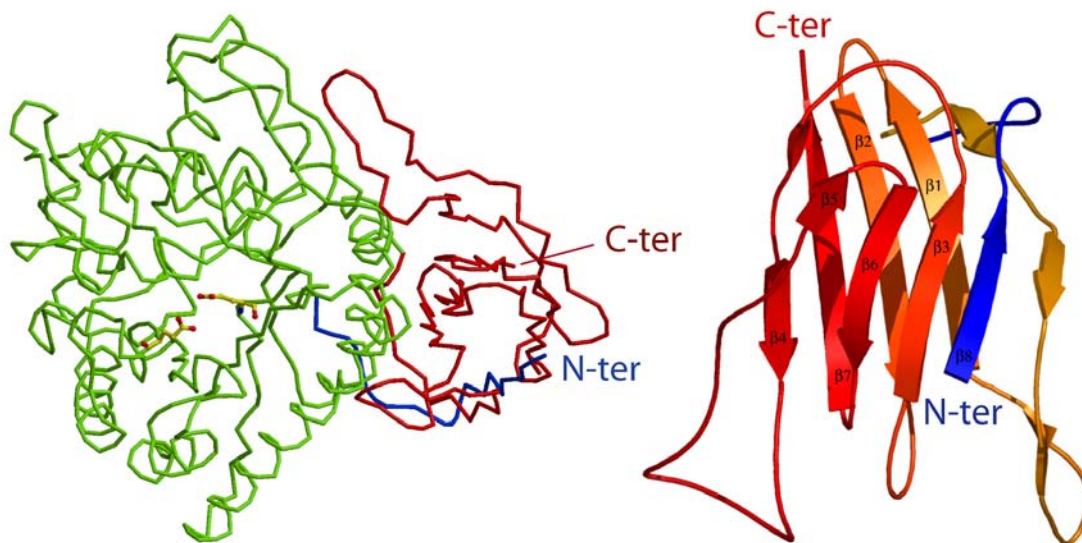
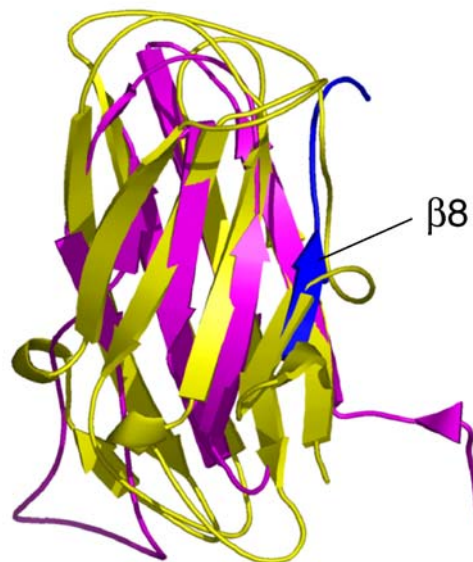


Abbildung 3-19 Die beiden Domänen der AbfA (links). Die katalytische Domäne ist grün eingefärbt, die Kohlenstoffe der beiden katalytischen Glutaminsäuren gelb, die Sauerstoffe rot. Der N-terminale Teil der β -Sandwich Domäne ist blau, der C-terminale Teil dunkelrot gekennzeichnet. Im rechten Teil der Abbildung ist die Einbettung des N-terminalen β -Strangs (Residuen 6 bis 9, blau) in das *Jelly Roll* Motiv dargestellt. Die acht β -Stränge sind annotiert, der achte Strang (blau) besitzt im Vergleich zum perfekten *Jelly Roll* Motiv eine entgegengesetzte Richtung.

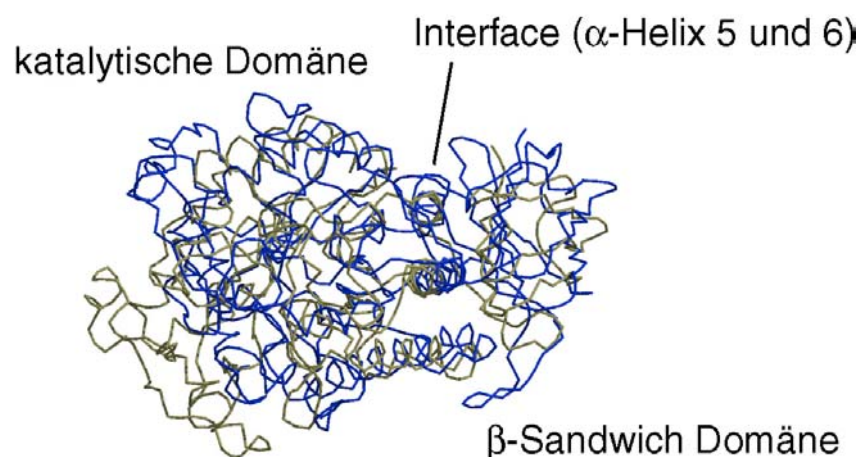
Die strukturelle Ähnlichkeit zu α -Amylasen bezieht sich auch auf die Interaktionen zwischen der *Jelly Roll* Domäne und dem $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel. Zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen befinden sich zwischen dem unteren Faltblatt des *Jelly Roll*s und Residuen um die sechste und siebte Helix des $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel. Eine ähnliche Architektur des Interface zwischen der *Jelly Roll* Domäne und dem $(\beta/\alpha)_8$ -Barrel konnte bereits für die α -Amylase II aus *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 beobachtet werden (Abbildung 3-21). In diesen Arbeiten wurde vorgeschlagen, daß die *Jelly Roll* Domäne eine stabilisierende Wirkung auf die katalytische Domäne ausübt (Kamitori et al., 1999).

Abbildung 3-20 Strukturvergleich zwischen den β -Sandwich Domänen der AbfA und der Cellulose bindenden Domäne 1nbc.pdb (Tormo et al., 1996). AbfA: Der achte β -Strang (entgegengesetzte Richtung im Vergleich zum perfekten *Jelly Roll*) ist blau, der Rest violett eingefärbt. 1nbc.pdb ist gelb koloriert.



β -Sandwich Domäne

Abbildung 3-21 Vergleich der Interfacearchitektur. In der AbfA (blau) und der α -Amylase II (grau) Kamitori, 1999 #354] bilden jeweils die α -Helices fünf und sechs die Grenzfläche zwischen der katalytischen und β -Sandwich Domäne.



3.9 Quartärstruktur: Die erste Struktur einer hexameren Glykosidase

Die AbfA liegt in beiden Kristallformen als Hexamer mit D_3 -Punktsymmetrie vor, das am besten als ein Trimer von Dimeren beschrieben werden kann. Abbildung 3-22 zeigt die hexamere AbfA entlang der dreizähligen Achse in der rhomboedrischen Kristallform. Das Molekül besetzt im Kristall eine spezielle Lage, da die Molekülachse innerhalb des Hexamers mit der kristallographischen Achse zusammenfällt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde für nur sehr wenige Glykosidasen vermutet, daß sie eine hexamere Struktur aufweisen (Iriyama et al., 2000), und die Struktur der AbfA stellt die erste beschriebene Kristallstruktur einer hexameren Glykosidase dar. Die β -Sandwich Domänen grenzen die hexamere Struktur nach außen hin ab. Diese Architektur steht im Einklang mit der Vermutung, daß die Domäne vormals als Kohlenhydrat bindende Domäne fungierte (Abschnitt 3.8.2).

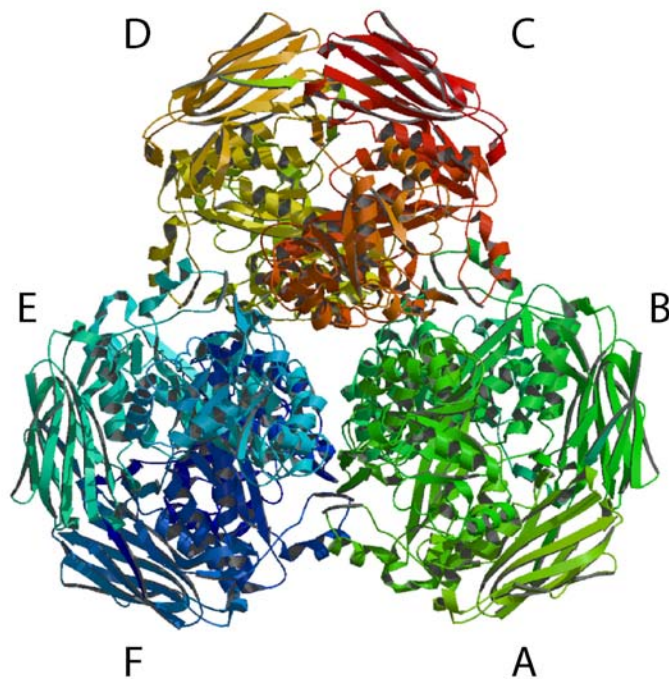


Abbildung 3-22 Die hexamere AbfA in der rhomboedrischen Kristallform. Die Monomere A, B, C, D, E, F sind eingefärbt. A/B, C/D und E/F bilden jeweils eine dimeren Struktur mit einer zweizähligen NCS-Symmetrie.

Bis zur Lösung der Struktur war für die primitiv monokline Kristallform unklar, ob zwei/drei Tetramere oder 2 Hexamere vorliegen. Die experimentellen Ergebnisse der analytischen Gelpermeationschromatographie ergaben kein eindeutiges Ergebnis, denn das ermittelte Molekulargewicht lag zwischen einer tetrameren und hexameren AbfA. Die dynamische Lichtstreuung lieferte Hinweise auf eine Tetramer, und in der Selbstrotationsfunktion fehlte die dreizählige nicht-kristallographische Achse, die für ein Hexamer zu erwarten gewesen

wäre. Mit der Strukturlösung ließ sich die Frage der Quartärstruktur eindeutig klären, denn in der asymmetrischen Einheit der primitiv monoklinen Kristallform sind zwei vollständige Hexamere enthalten. Die einzelnen AbfA Hexamere sind in beiden Kristallformen identisch, aber die Anordnung der Hexamere zueinander ist verschieden. In der rhomboedrischen Kristallform sind die Hexamere entlang der dreizähligen kristallographischen Achse hintereinander angeordnet, und die Molekülachsen der Hexamere (Abbildung 3-22) sind parallel.

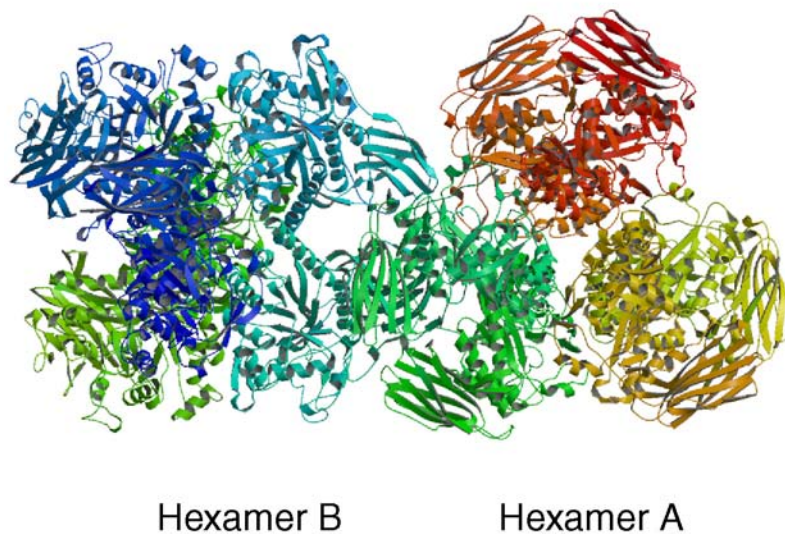


Abbildung 3-23 Die Kristallpackung in der primitiv monoklinen Kristallform. Das Hexamer A ist in der gleichen Orientierung gezeigt wie in Abbildung 3-22. Die Molekülachse des Hexamers B liegt – anders als in der rhomboedrischen Kristallform – nicht parallel zu der von A.

In der primitiv monoklinen Kristallform sind die Molekülachsen der Hexamere nicht parallel zueinander, was zu einer unterschiedlichen Kristallpackung im Vergleich zur rhomboedrischen Kristallform führt. Die unterschiedlichen pH-Werte der Kristallisationsbedingungen beeinflussen wahrscheinlich die Ladungsverteilung an der Oberfläche des Enzyms und sorgen für andere Kristallkontakte und so zu einer anderen Packung im Kristall. Diese Argumentation klärt allerdings nicht die Fragestellung, weshalb die katalytische Mutante E294A unter den Kristallisationsbedingungen der höher symmetrischen Kristallform für die native AbfA, das Seleno-Methionin Derivat und die E175A Mutante auch in der primitiv monoklinen Kristallform kristallisiert, da die Position 294 nicht in den Kontaktbereichen zwischen den Hexameren liegt. Allerdings liegt die katalytische Glutaminsäure E294 im nativen Enzym deprotoniert vor, und in der E294A Mutante fehlt die negative Ladung, so daß die veränderte Ladung im aktiven Zentrum indirekt die Ladungsverteilung in den Kontaktbereichen beeinflussen könnte.

3.9.1 Oligomerkontakte

3.9.1.1 Das Interface des Dimers

In der Grenzfläche jedes Dimers partizipieren die Residuen 218 bis 228 um den N-terminalen Bereich der α -Helix 5 und die Residuen 270 bis 283 am C-terminale Ende der α -Helix 6 an den Wechselwirkungen zwischen den beiden Monomeren. Neben diesen Residuen des $(\beta/\alpha)_8$ -Barrels sind die Residuen 9 bis 14 am N-Terminus an den Wechselwirkungen beteiligt. Die an den Wechselwirkungen beteiligten Residuen sind in Abbildung 3-17 durch gelbe Balken gekennzeichnet. Eine besonders starke Wechselwirkung besteht zwischen den Phe14 der Ketten A und B, deren Aromaten *stacking interactions* ausbilden (Abbildung 3-24). Die Größe der Kontaktfläche innerhalb des Dimers wurde mit SC berechnet und beträgt 530 \AA^2 . Die Formkomplementarität (*shape complementary, sc*) in permanenten oligomeren Proteinkomplexen liegt zwischen 0.57 und 0.73 \AA (Colman et al., 1993; Lawrence and Colman, 1993), und für die Kontaktfläche des AbfA-Dimer wurde ein Komplementarität von 0.674 \AA berechnet, die in diesem Intervall liegt.

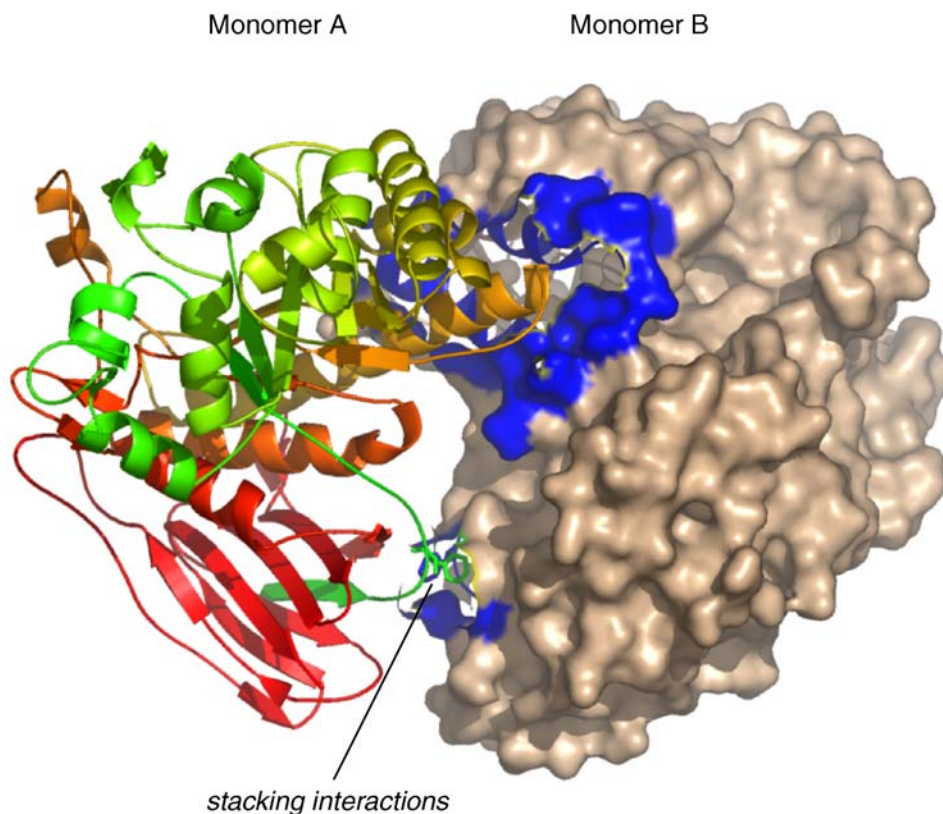


Abbildung 3-24 Kontaktfläche innerhalb eines Dimers. Für das Monomer sind die Sekundärstrukturelemente in Gelb-, Rot- und Grüntönen gezeigt. Für das Monomer B ist die mit Pymol berechnete Oberfläche dargestellt, wobei die an der Wechselwirkung des Dimers beteiligten Residuen in blau eingefärbt wurden.

3.9.1.2 Das Interface des Hexamers

Die an der Wechselwirkung zwischen den Dimeren beteiligten Residuen liegen in den Sequenzabschnitten Gly78 bis Val102 (Subdomäne zwischen β -Strang 2 und α -Helix 2), Gly78 bis Lys162 (α -Helix 3 und eine weitere α -Helix vor β -Strang 4) und Trp180 bis Pro206 (α -Helix 4). Die Wechselwirkungen zwischen den AbfA Dimeren stabilisieren die hexamere Quartärstruktur.

Als Sekundärstrukturelemente befinden sich in diesen genannten Sequenzabschnitten die α -Helices 3 und 4 des $(\beta/\alpha)_8$ -Barrels und Teile der in Abschnitt 3.8.1 beschriebenen Abweichungen vom Grundmotiv des Barrels. Die entsprechenden Abschnitte in der Sequenz sind in Abbildung 3-17 durch blaue Balken gekennzeichnet.

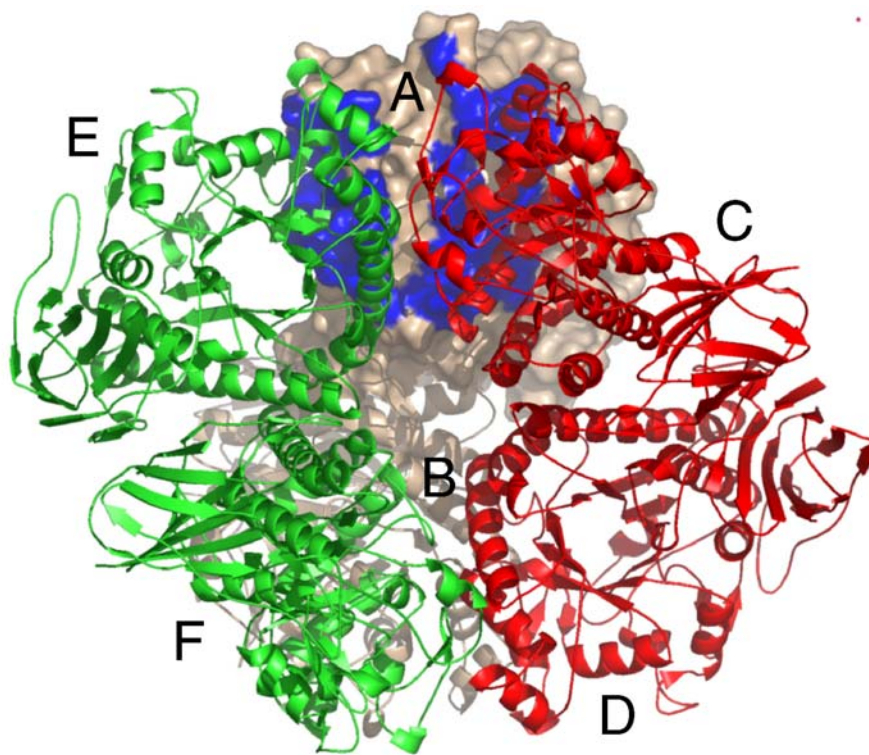


Abbildung 3-25 Kontaktflächen des AbfA Hexamers. Die Residuen des Monomers A, die an den Kontakten zwischen den Dimeren (gelb und grün koloriert) beteiligt sind, sind blau dargestellt. Für das Monomer A ist die mit Pymol berechnete Oberfläche dargestellt. Das Monomer A besitzt Kontaktflächen zu den Monomeren E und C, nicht zu F und D.

In Abbildung 3-25 sind die an der Wechselwirkung zwischen den Dimeren beteiligten Residuen für das Monomer A blau gekennzeichnet. Die Kontaktflächen sind zwischen den Dimeren kleiner als innerhalb des Dimers (530 \AA^2), denn die Größe der Kontaktflächen zwischen den Monomeren A und C beträgt 427 \AA^2 und die zwischen Monomer A und E weist eine Größe von 426 \AA^2 auf. Die Formkomplementarität (Lawrence and Colman, 1993) zwischen den Dimeren mit jeweils 0.708 \AA liegt allerdings etwas höher als innerhalb des

Dimers (0.674 Å). Die mit AREAIMOL berechnete Oberfläche eines AbfA Monomers beträgt 18941 Å². Alle Kontaktflächen eines Monomers, das gemeinsame Kontaktflächen mit drei anderen Monomeren aufweist (z. B. A/B, A/C, A/E), haben in der Summe eine Größe von insgesamt 1383 Å², das sind 7.3 % der gesamten Proteinoberfläche.

Nach Jones und Thornton (Jones and Thornton, 1996) hat die Kontaktfläche innerhalb eines Homodimers eine durchschnittliche Größe von 1685 Å² (Intervall von 368 Å² bis 4746 Å²). Die Kontaktflächen innerhalb des Homohexamers der AbfA sind mit 426, 427 und 530 Å² im Vergleich dazu relativ klein, so daß kooperative Effekte zwischen den Dimeren zur Stabilisierung der hexameren Quartärstruktur sicherlich beitragen.

Aufgrund verschiedener Argumente kann man davon ausgehen, daß das Hexamer ein auch in Lösung vorliegender Oligomerisierungszustand der AbfA ist und kein Artefakt der Kristallisation:

Das gleiche AbfA Hexamer liegt in den Kristallen beider Raumgruppen (*R3* und *P2₁*) vor.

Die Formkomplementarität innerhalb und zwischen den „Dimeren“ des Hexamers ist hoch.

Das mit der Gelpermeationschromatographie ermittelte Molekulargewicht liegt zwischen einer tetrameren und hexameren AbfA, allerdings würde eine tetramere AbfA keine sinnvolle Packung ergeben. Neben der hexameren Quartärstruktur würde noch eine dimere AbfA in Frage kommen, aber der experimentelle Fehler der Methode ist nicht so hoch. Auch ergeben die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung einen hydrodynamischen Radius, der gegen das Vorliegen eines Dimers spricht.

Eine konzentrationsabhängige Oligomerisierung kann ausgeschlossen werden, da der mit der dynamischen Lichtstreuung bestimmte hydrodynamische Radius über einen weiten Konzentrationsbereich konstant bleibt.

3.10 Homologe Glykosidasen

3.10.1 Clan GH-A und Clan GH-H

Die Struktur der AbfA ist konsistent mit der Einteilung der Arabinofuranosidasen der Glykosid Hydrolase Familie 51 in Clan GH-A. Alle Kristallstrukturen von Mitgliedern dieses Clans (Glykosid Hydrolase Familien 1, 2, 5, 10, 17, 26, 42 und 53) zeigen die gleiche globale $(\beta/\alpha)_8$ -Faltung wie die AbfA. Die Abbildung 3-26 zeigt am Beispiel der CelC, einer Endoglukanase der Glykosid Hydrolase Familie 5, die Strukturhomologie der katalytischen Domäne, die sich nur in der Insertion oder Deletion von einzelnen Sekundärstrukturelementen oder Subdomänen unterscheidet, die Sekundärstrukturelemente des $(\beta/\alpha)_8$ -Grundmotivs liegen übereinander.

Bereits hier zeigt sich, daß die AbfA auch eine ähnliche Architektur des aktiven Zentrums besitzt, denn die katalytischen Residuen beider Enzyme liegen aufeinander (linker Teil der Abbildung). Der rechte Teil der Abbildung zeigt, daß die N- und C-terminalen Bereiche der katalytischen Domäne der AbfA und der N- und C-Terminus der CelC-Sequenz beinahe aufeinanderliegen. Die β -Sandwich Domäne der AbfA (Residuen 1 - 19 und 384 - 501), die als Kohlenhydrat bindende Domäne fungieren könnte (Abschnitt 3.8.2), ist daher für die Stabilität der AbfA Struktur wahrscheinlich nicht essentiell.

GH-51 vs. GH-5 (GH-A clan)

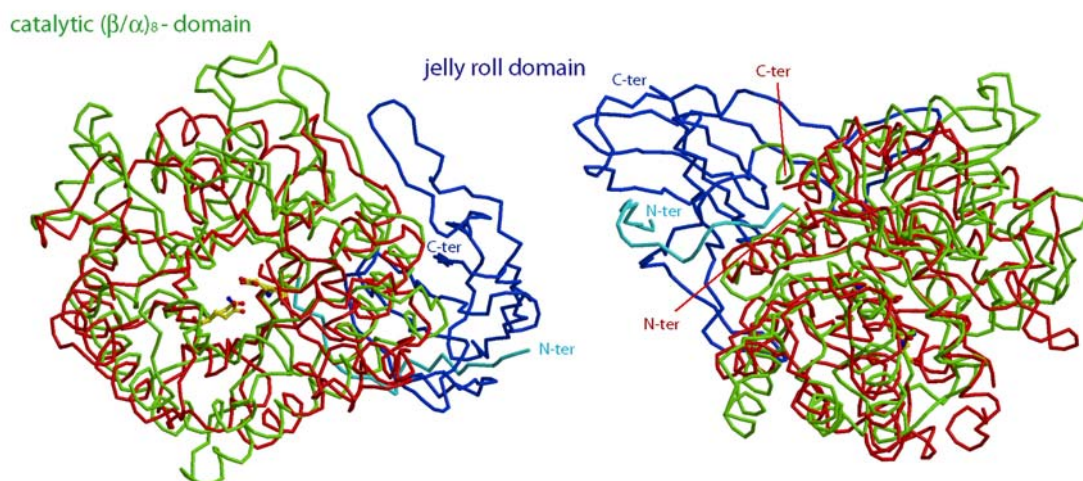


Abbildung 3-26 Strukturvergleich der AbfA mit CelC, einer Endoglukanase der Glykosid Hydrolase Familie 5. Die katalytische Domäne der AbfA ist grün eingefärbt, die β -Sandwich Domäne in hell (N-Terminus) und dunkelblau (C-terminaler Bereich). Die Struktur der CelC ist rot koloriert. Die zwei katalytischen Residuen sind jeweils in der *ball-and-stick* Darstellung dargestellt (Kohlenstoffe gelb, Sauerstoffe rot und Stickstoff blau).

Die β -Sandwich Domäne der AbfA zeigt Strukturhomologien zur C Domäne der α -Amylasen (Fujimoto et al., 1998; Kamitori et al., 1999) der Glykosid Hydrolase Familie 13. Diese Glykosidasen gehören zu Clan GH-H. Abbildung 3-27 zeigt die übereinandergelegten Strukturen der AbfA und der α -Amylase aus *Bacillus subtilis* (pdb-Code 1bag.pdb) (Fujimoto et al., 1998). Die Überlagerung der AbfA mit der α -Amylase II aus *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 (Kamitori et al., 1999) ist bereits in Abbildung 3-21 und die strukturelle Ähnlichkeit zu Kohlenhydrat bindenden Domänen (Tormo et al., 1996) in Abbildung 3-20 gezeigt worden.

GH-51 vs. GH-13 (α -amylases, GH-H clan)

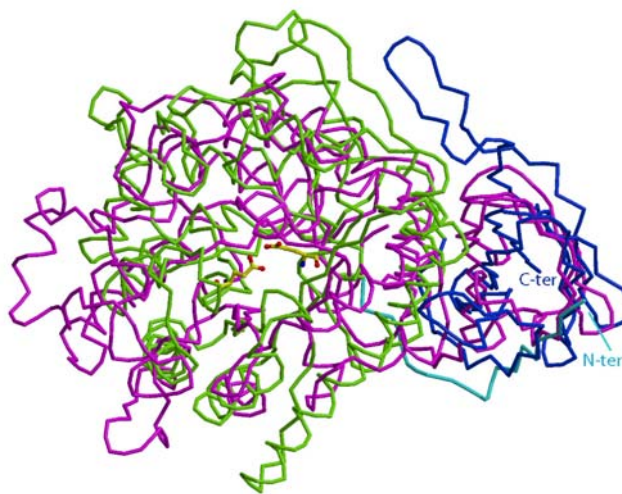


Abbildung 3-27 Strukturvergleich zwischen AbfA und der α -Amylase aus *Bacillus subtilis* (Clan GH-H). Die Kolorierung und Darstellung der katalytischen Glutaminsäuren der AbfA ist wie in Abbildung 3-26. Die α -Amylase ist violett eingefärbt.

Im Vergleich mit Clan GH-A Glykosidasen zeigt die katalytische Domäne der Clan GH-H Mitglieder erwartungsgemäß eine geringere Strukturhomologie zu AbfA. Die Glykosidasen der Familie 13 besitzen neben der katalytischen und β -Sandwich Domäne eine dritte Domäne (linker Teil der Struktur in Abbildung 3-26), die in den Arabinofuranosidasen der Familie 51 nicht vorhanden ist.

3.11 Der strukturelle Einfluß der Mutationen

3.11.1 Säure/Base Mutante E175A

Der strukturelle Einfluß der Mutation der katalytischen Säure/Base an Position E175A wird durch die Superposition der nativen AbfA und der E175A Mutante im Komplex mit Ara- α (1,3)-Xyl deutlich. Die durch die Mutation bedingten Strukturveränderungen sind gering, und vor allem die Atomkoordinaten der Seitenketten der vorangehenden und nachfolgenden Aminosäure bleiben durch die Mutation an Position 175 nahezu unverändert (Abbildung 3-28).

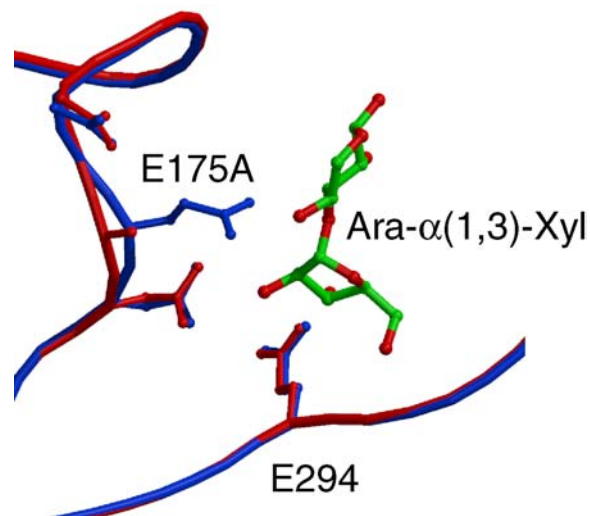
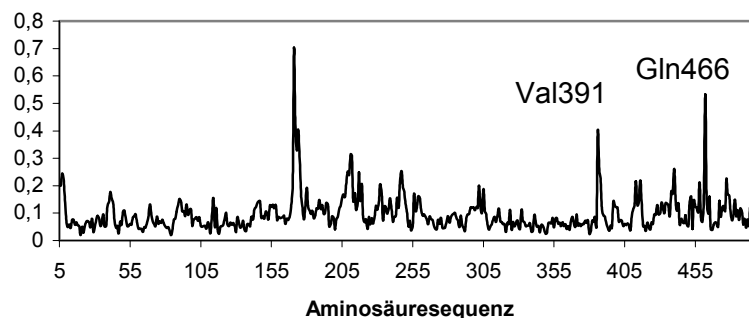


Abbildung 3-28 Einfluß der Mutation an Position 175. Die Struktur der nativen AbfA ist blau, die der E175A Mutante im Komplex mit dem natürlichen Substrat (Kohlenstoffatome grün) ist rot koloriert. Die beiden katalytischen Residuen und die der katalytischen Säure/Base (Glu175) vorangehende und nachfolgende Aminosäure sind jeweils als *ball-and-stick* Modell dargestellt.

Der r.m.s.d. – Plot der Hauptkettenatome zeigt erwartungsgemäß die größte Abweichung zwischen den Hauptkettenatomen der nativen Struktur und Säure/Base Mutante E175A an Position 175.

r.m.s.d. - Plot: AbfA (nativ) - Ara- α (1,3)-Xyl

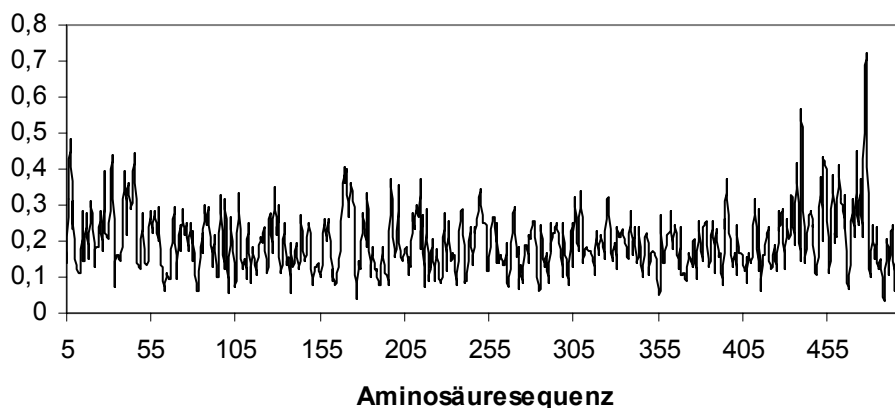


Die lokale Umgebung der katalytischen Säure/Base hat sich nicht wesentlich verändert, und auch ein Einfluß der Mutation auf die Gesamtstruktur ist nicht zu erkennen. Die größeren Abweichungen im C-terminalen Bereich der Sequenz (z.b. Val391 und Gln466) liegen im Bereich der β -Sandwich Domäne und sind nicht in die Substratbindung involviert.

3.11.2 Die katalytische Mutante E294A

Der r.m.s.d. – Plot der Hauptkettenatome der nativen AbfA und katalytischen E294A Mutante zeigt, daß die Mutation an Position 294 zu keiner Strukturveränderung führt, die im Bereich der Mutation größer ist als in der übrigen Struktur. Der r.m.s.d. – Wert für die Hauptkettenatome liegt durch die geringere Auflösung, die mit den Kristallen der Raumgruppe $P2_1$ erzielt wurde, bei durchschnittlich 0.249 Å (Tabelle 3-28). Der flexiblere C-terminale Teil der Struktur zeigt im Vergleich zur restlichen Struktur größere Unterschiede zwischen den beiden Strukturen. Dies liegt an der höheren Flexibilität dieses Bereichs und ist unabhängig von der Mutation E294A im aktiven Zentrum der AbfA (Abschnitt 3.12).

r.m.s.d. - Plot: AbfA (nativ, $P2_1$) - E294A ($P2_1$)



3.12 Flexible und rigide Bereiche der Struktur

Die kristallographischen B-Faktoren als ein Maß für die Flexibilität bzw. Unsicherheit von Atomkoordinaten belegen, daß die C-terminale β -Sandwich Domäne eine höhere Flexibilität besitzt als die katalytische Domäne (Abbildung 3-29). Dies steht im Einklang mit allen berechneten r.m.s.d. – Plots, die für den C-Terminus der Sequenz größere Abweichungen zeigen als für den Rest der Struktur. Die α -Helices 3 und 4 des $(\beta/\alpha)_8$ -Barrels, die an den Kontaktflächen zwischen den Dimeren des Hexamers beteiligt sind (Abbildung 3-17), und die Bereiche der α -Helices 5 und 6, die die Kontaktflächen innerhalb des Dimers bilden (Abbildung 3-17), besitzen die niedrigsten Temperaturfaktoren innerhalb der Struktur (Abbildung 3-29). Die Residuen des aktiven Zentrum besitzen B-Faktoren, die mit denen der übrigen Residuen der katalytischen Domäne vergleichbar sind.

Der Blick auf die Architektur der nach isotropen Temperaturfaktoren angefärbten hexameren AbfA (Abbildung 3-30) erklärt die Tatsache, daß die Residuen der β -Sandwich Domäne die höchsten Temperaturfaktoren besitzen, denn diese Domäne grenzt das Hexamer nach außen hin ab und ist solvensexponiert. Es sei in diesem Zusammenhang noch einmal darauf hingewiesen, daß diese Architektur mit der Hypothese konsistent ist, daß die Domäne früher als Kohlenhydrat bindende Domäne fungierte, die diese Funktion im Laufe der Evolution verlor.

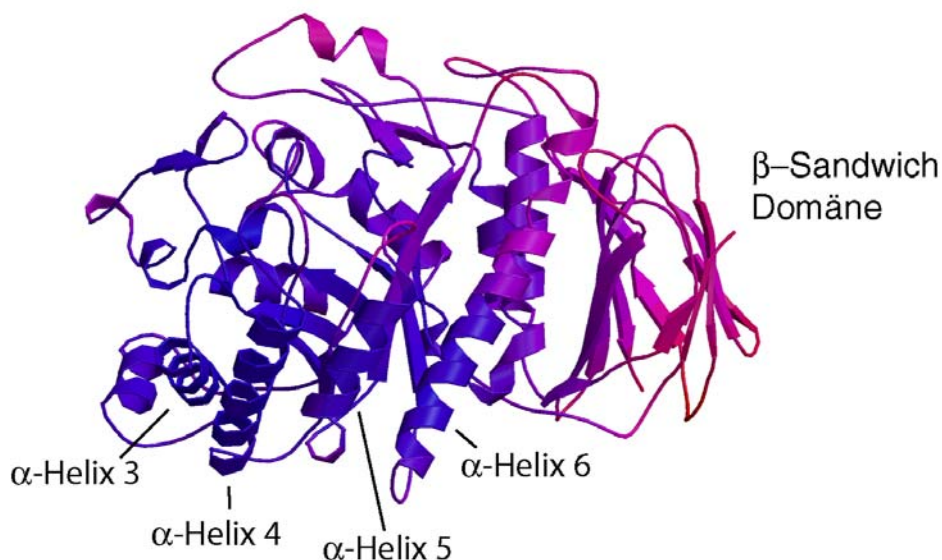


Abbildung 3-29 Anfärbung der Sekundärstrukturelemente der nativen AbfA nach isotropen Temperaturfaktoren. Bereiche mit niedrigen Temperaturfaktoren sind blau, und Bereiche mit hohen Temperaturfaktoren sind rot angefärbt.

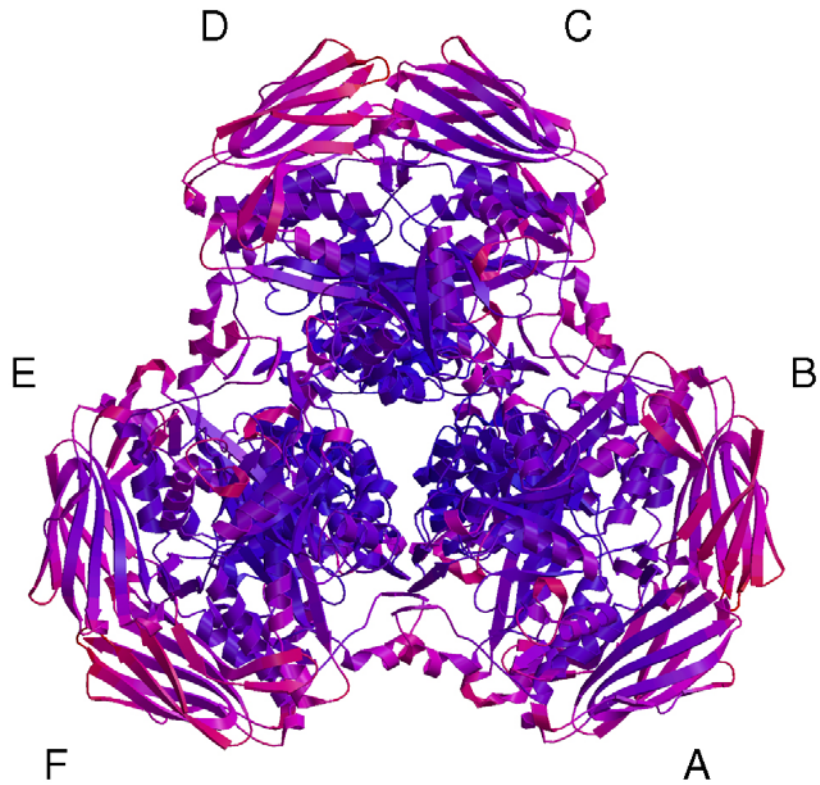


Abbildung 3-30 Anfärbung des kompletten AbfA Hexamers nach isotropen Temperaturfaktoren. Bereiche mit niedrigen Temperaturfaktoren sind blau, und Bereiche mit hohen Temperaturfaktoren sind rot eingefärbt.

3.13 Michaelis-Menten Komplexe und Substratbindung

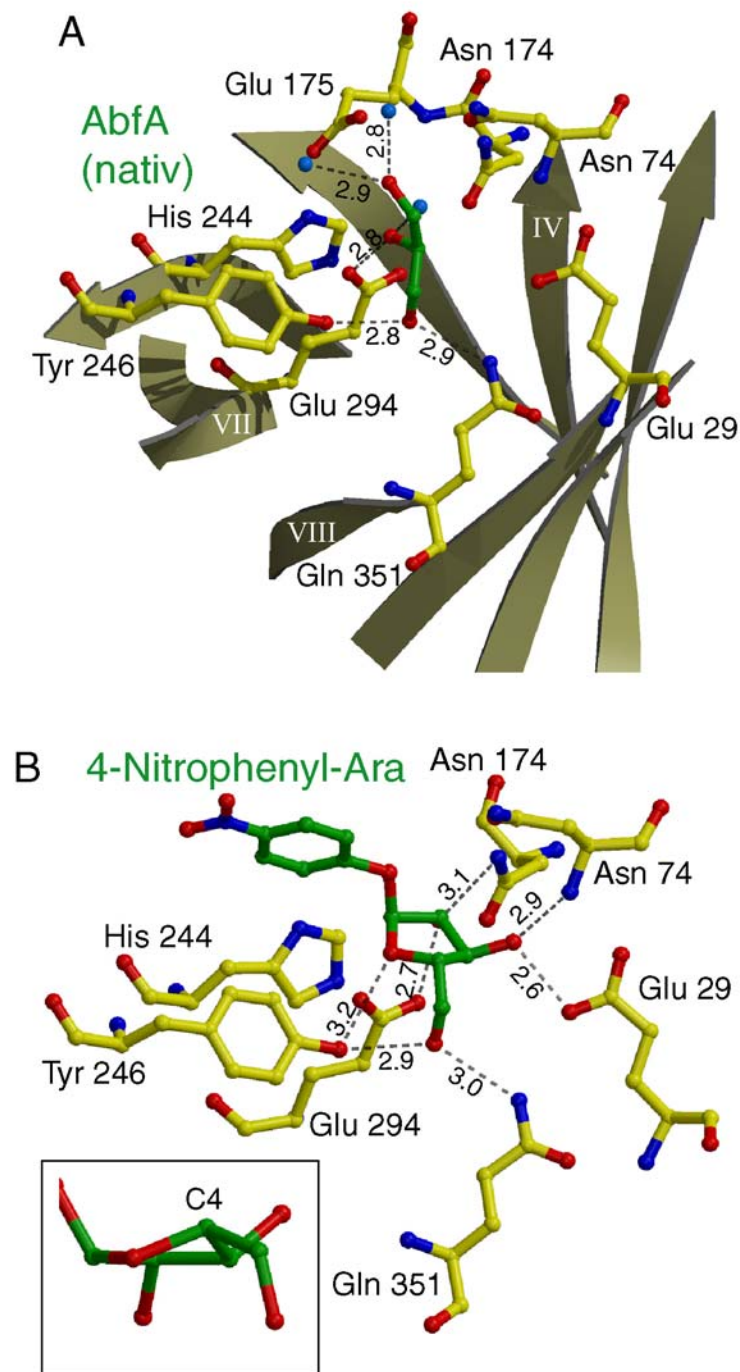
Um Enzym-Substrat Komplexe zu erhalten, wurde eine katalytische Mutante der AbfA verwendet. Die kinetischen Charakteristiken der Säure/Base E175A Mutante der AbfA erlaubten die Darstellung von Komplexen mit verschiedenen Substraten. Diese Enzym-Substrat Komplexe repräsentieren zwei Momentaufnahmen entlang des Reaktionsmechanismus der AbfA. Für Substrate mit einer wenig reaktiven Abgangsgruppe, wie 4-Nitrophenyl-Ara und das natürliche Substrat Ara- α (1,3)-Xyl, das aus Xylan dargestellt wurde, zeigt die E175A Mutante eine um mindestens 10^3 reduzierte Aktivität gegenüber dem Wildtyp (Shallom et al., 2002b). Daher konnten durch *Soaken* der Kristalle der E175A Mutante mit den Substraten 4-Nitrophenyl-Ara und Ara- α (1,3)-Xyl Strukturen der Michaelis-Menten Komplexe mit den ungespaltenen Substraten erhalten werden.

3.13.1 Die Residuen des aktiven Zentrums

Abbildung 3-31 A zeigt das Netzwerk der Wasserstoffbrückenbindungen im aktiven Zentrum des Wildtyps. Interessanterweise ist ein Glycerolmolekül – Bestandteil des Cryopuffers – im aktiven Zentrum gebunden. Die Hydroxylgruppen des Glycerols befinden sich an der gleichen Stelle wie die Hydroxylgruppen der Substrate, deren Bindung im Folgenden diskutiert wird. Die Abbildung 3-31 B und C zeigt das aktive Zentrum der Michaelis-Menten Komplexe der E175A Mutanten mit den intakten Substraten 4-Nitrophenyl-Ara und Ara- α (1,3)-Xyl. In beiden Komplexen wird der Arabinofuranosering in der *Subsite* -1 von einer großen Anzahl an Wasserstoffbrücken gebunden. Alle Hydroxylgruppen des furanosidischen Substrats sind so positioniert, daß zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum Enzym gebildet werden könnten. Im Michaelis-Menten Komplex Ara- α (1,3)-Xyl ist die Xylose in der *Subsite* +1 durch nur eine Wasserstoffbrückenbindung (Asn174) gebunden und ist daher weniger fest gebunden. Das könnte die Tatsache erklären, daß AbfA in der Lage ist, strukturell sehr verschiedene Substrate zu binden und zu hydrolisieren (Shallom et al., 2002b).

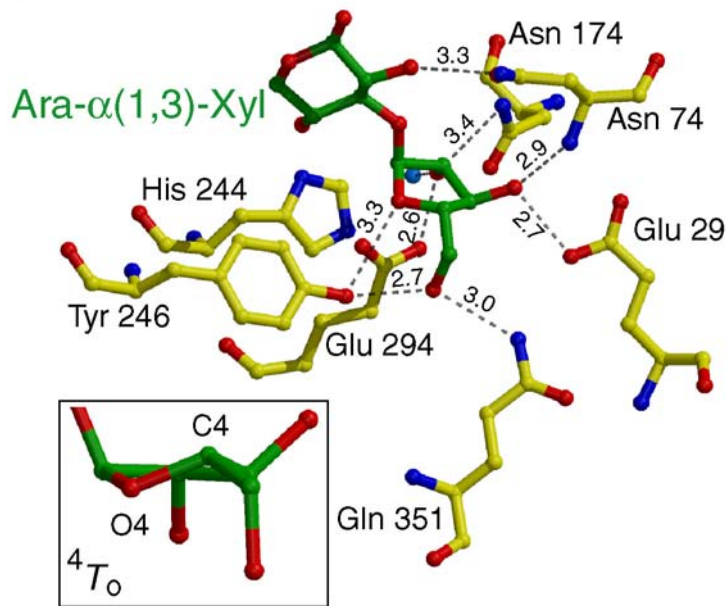
Mit Hilfe der Kristallstrukturen der nativen AbfA und der Michaelis-Menten Komplexe konnten neun wichtige Aminosäuren identifiziert werden, die für die Katalyse und die Wechselwirkungen mit dem Substrat eine entscheidende Rolle spielen: Glu29, Arg69, Asn74, Asn174, Glu175, His244, Tyr246, Glu294 und Gln351 (Abbildung 3-31). Die Lokalisation und Funktion vieler dieser Residuen ist in Clan GH-A konserviert (Sakon et al., 1996). Die katalytische Säure/Base Glu175 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu His244 am Ende des β -Strangs sechs (in Abbildung 3-31 nicht gezeigt). In anderen Clan GH-A Enzymen ist diese Position durch eine homologe Residue besetzt, diese kann sein ein His oder Tyr (Familie 5), Asn (Familien 1, 2 und 17), Asp (Familie 26) und ein Gln (Familie 10). In der AbfA ist Asn 174, das dem Protonen-Donor am Ende des β -Strangs vier vorangeht, in einer geeigneten Distanz für eine Wasserstoffbrückenbindung zur 2-Hydroxylgruppe der Arabinofuranose (3.4 Å) (Abbildung 3-31C).

Abbildung 3-31 Interaktionen der Liganden mit den Residuen des aktiven Zentrums. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gepunktete schwarze Linien dargestellt, ihre Länge in Å ist angegeben. Kohlenstoffatome der Proteinresiduen sind gelb, Kohlenstoffatome der Liganden grün, Sauerstoffatome rot und Stickstoffatome blau koloriert. Ausgewählte Wassermoleküle, die eine direkte Wechselwirkung zu den Liganden ausüben, sind als hellblaue Kugel dargestellt. (A) Die native AbfA mit einem Glycerolmolekül im aktiven Zentrum. (B) Der Michaelis-Menten Komplex der E175 Mutante mit 4-Nitrophenyl-Ara.

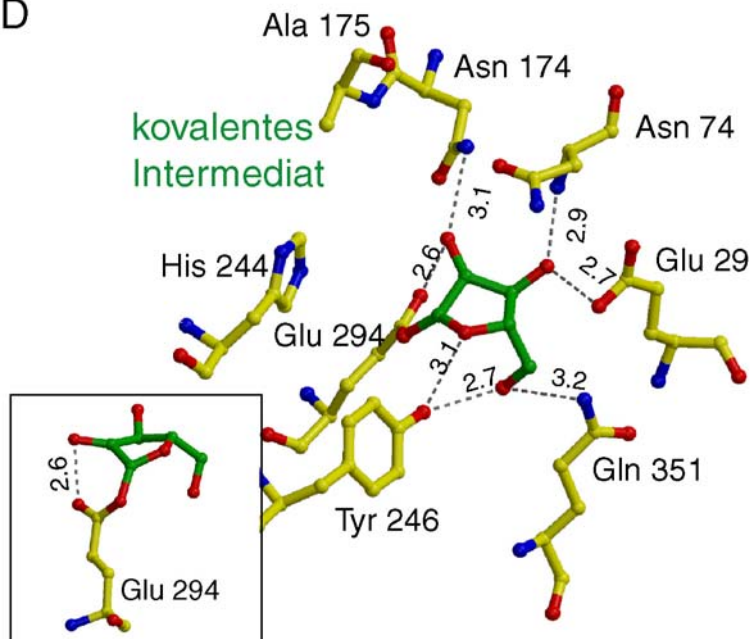


(C) Der Michaelis-Menten Komplex der E175A Mutante mit Ara- α (1,3)-Xyl. Die Einsätze in B und C zeigen die Konformationen des Arabinofuranosers in der -1 *Subsite*. (D) Der kovalente Arabinofuranose - Enzym Komplex, der mit Hilfe der E175A Mutante und dem Substrat 2,5-Dinitrophenyl-Ara dargestellt wurde. Der Einsatz zeigt die starke Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 2-Hydroxylgruppe des Arabinofuranosezuckers und der katalytischen Glutaminsäure E294.

C



D



Dieser Rest ist streng konserviert unter den Clan Mitgliedern und hat sowohl eine wichtige strukturelle als auch funktionelle Bedeutung, die Konformation, Protonierung und Ladung der Residuen im aktiven Zentrum zu erhalten. Zum Beispiel führte die Substitution des homologen Asn durch Asp für eine Glykosidase der Familie 5 zu einem fast vollständigen Verlust der Enzymaktivität (Navas and Beguin, 1992). Darüber hinaus scheint dieser Rest eine wichtige Rolle bei der Katalyse zu spielen, indem er die Bildung des kovalenten Glykosyl-Enzym Intermediats unterstützt (Ryttersgaard et al., 2002). Arg69 der AbfA ist am Grund der Substratbindetasche lokalisiert (am Ende des β -Strangs 2) und ist konserviert in den Familien 1, 2, 5 und 17 (Residue in Abbildung 3-31 nicht gezeigt, aber in Abbildung 3-38 dargestellt). Diese Residue sorgt wahrscheinlich dafür, daß die nukleophile Glutaminsäure Glu294 deprotoniert bleibt, denn der Carbonylsauerstoff O ^{ϵ 2} der Glu294 befindet sich in einer geeigneten Distanz von 3.1 Å zu dem Nⁿ¹-Atom, um eine Wasserstoffbrückenbindung auszubilden.

Ein aromatischer Rest am Ende des β -Strangs acht, oft ein Tryptophan, partizipiert an einer nicht-Prolin cis-Peptidbindung und ist absolut konserviert unter den Clan GH-A Mitgliedern. In den Strukturen der AbfA ist an gleicher Stelle Gln351 lokalisiert, das ebenfalls an einer nicht-Prolin cis-Peptidbindung beteiligt ist (Abbildung 3-11). Die ungewöhnliche Konformation der Hauptkette zwingt die Seitenkette des Gln351 in einer bestimmte Orientierung, um eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe am C5 Kohlenstoff des Furanoserings auszubilden, die bei einer normalen Konformation der Hauptkette nicht möglich wäre (Abbildung 3-31 A-D). Gln351 ist nach der cis-Peptidbindung (Ala350 – Gln351) positioniert, wo hingegen der aromatische Rest in den Clan GH-A Mitgliedern vor dieser lokalisiert ist. Diese einzigartige cis-Peptidbindung ist in mindestens sechs verschiedenen Glykosid Hydrolase Familien mit (β/α)₈-Topologie zu beobachten (1, 2, 5, 17, 18 und 42) und ist ein Hinweis auf eine evolutionäre Verwandtschaft aller Glykosid Hydrolasen, die diese Topologie aufweisen.

Ein besonderes Merkmal des aktiven Zentrums der AbfA ist Glu29 am Ende des β -Strangs eins, die einen direkten Kontakt zum Substrat in der *Subsite* -1 ausübt. Eine starke Wasserstoffbrücke mit einer Länge von 2.6 Å bzw. 2.7 Å ist in den Komplexen mit 4-Nitrophenyl-Ara und Ara- α (1,3)-Xyl zwischen dem Carbonylsauerstoff O ^{ϵ 1} der Glu29 und der 3-Hydroxylgruppe des furanosidischen Substrats vorhanden (Abbildung 3-31 B und C). Ein Ersatz dieser Glutaminsäure in der α -L-Arabinofuranosidase aus *Thermobacillus xylanilyticus* (Glykosid Hydrolase Familie 51) führte zu einer Erniedrigung der katalytischen Aktivität um 3 bis 4 Größenordnungen (Debeche et al., 2002). Die 3-Hydroxylgruppe des furanosidischen Substrats befindet sich außerdem in einer für eine Wasserstoffbrücke geeigneten Entfernung von 2.9 Å zum Amidstickstoff des Asn74 (Abbildung 3-31 B). Direkte Wechselwirkungen mit dem Peptidrückrad sind häufig von besonderer Bedeutung für die Substratbindung, da das Rückrad in der Regel weniger flexibel ist als die Seitenketten. Asn74 am Ende des zweiten β -Strangs befindet sich einer ähnlichen Position wie ein Histidin, das in den Familien 1, 5, 10 und 26 fast überall konserviert ist (Ryttersgaard et al., 2002). Dieses Histidin, das in den Strukturen der AbfA fehlt, ist in den anderen Glykosidasen am Ende des dritten β -Strangs lokalisiert und bildet eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe am C3 Kohlenstoffatom des jeweiligen Zuckersubstrats.

3.14 Die Zuckerkonformationen der Michaelis-Menten Komplexe

Die Arabinofuranoseringe der Michaelis-Menten Komplexe der AbfA sind in nahezu identischen Konformation zu beobachten. Im Komplex mit 4-Nitrophenyl-Ara liegt der Zucker in einer 4E Konformation (*Envelope* mit C4 oberhalb der Ringebene) und im Michaelis-Menten Komplex mit Ara- $\alpha(1,3)$ -Xyl in der 4T_0 Konformation (unsymmetrischer *Twist* mit C4 oberhalb und dem endozyklischen Sauerstoff (O4) unterhalb der Ebene) vor (Abbildung 3-31 B und C). Beide Konformationen positionieren die glykosidische Bindung stärker in einer *quasi-axialen* Orientierung als in der E_3 Konformation (*Envelope* mit C3 unterhalb der Ringebene) der freien α -L-Arabinose. Dies erleichtert den nukleophilen Angriff der Glu294 am anomeren Kohlenstoff und positioniert den glykosidischen Sauerstoff (O1) näher an der katalytischen Säure/Base (Glu175).

Im Ara- $\alpha(1,3)$ -Xyl Komplex ist eine Wasserstoffbrücke mit einer Länge von 3.3 Å zwischen Asn74 und der 3-Hydroxylgruppe der Xylose in der *Subsite* +1 zu beobachten (Abbildung 3-31 C). Diese zusätzliche Wasserstoffbrücke, die im Komplex mit 4-Nitrophenyl-Ara fehlt, ist möglicherweise für die Unterschiede in den Zuckerkonformationen der beiden Substrate verantwortlich. Die beiden Zuckerkonformationen scheinen jedoch keinen unterschiedlichen Einfluß auf die Stabilisierung des Übergangszustands zu haben, da die Energiebarrieren zwischen den einzelnen *Envelope* und *Twist* Konformationen der Furanosen vergleichsweise gering sind (Collins and Ferrier, 1995) (Abschnitt 3.15).

3.15 Substratspezifität der AbfA: Der erste Komplex einer Clan GH-A Glykosidase mit einem furanosidischen Substrat

Die in dieser Arbeit präsentierten Strukturen sind die ersten einer Clan GH-A Glykosidase im Komplex mit einem furanosidischen Substrat. Der Vergleich dieser Strukturen mit anderen Clan GH-A Glykosidasen im Komplex mit pyranosidischen Substraten gestattet Einblicke in die Einzelheiten der Substratspezifität dieser Enzymfamilie. Wie in Abschnitt 3.14 beschrieben, ist keine große Verzerrung der Arabinofuranose in den Michaelis-Menten Komplexen im Vergleich zur freien α -L-Arabinofuranose zu beobachten. Für Pyranose-spezifische *retaining* Glykosidasen ist die Verzerrung der Zuckerkonformation eine der wichtigsten Charakteristiken der Substratbindung und spielt eine entscheidende Rolle bei der Katalyse (Davies, 1998; Ducros et al., 2002; Notenboom et al., 1998a; Sidhu et al., 1999; Tews et al., 1996; Vocadlo et al., 2001). In Furanosen sind die Energiebarrieren zwischen den verschiedenen *Envelope* und *Twist* Konformationen im Vergleich zu den Konformationsänderungen in Pyranosen vergleichsweise gering (Collins and Ferrier, 1995). Daher ist der Beitrag der Verzerrung der Zuckerkonformation in der AbfA und anderen Furanose-spezifischen Glykosidasen zur Erniedrigung der Energie des Übergangszustands der Reaktion wahrscheinlich weniger signifikant.

Wie in Abschnitt 3.10.1 beschrieben, ist die Faltung der AbfA konsistent mit der Klassifizierung zur Clan GH-A. Die katalytische Domäne der AbfA zeigt daher strukturelle Ähnlichkeit zu Cel5A, einer Endoglukanase aus *Bacillus agaradhaerens* (pdb-Code: 1h2j.pdb), die zur Glykosid Hydrolase Familie 5 (Clan GH-A) gehört (Varrot and Davies, 2003). Cel5A hydrolysiert die β -1,4-glykosidische Bindung in Cello-Oligosacchariden unter Beibehaltung der Konformation am anomeren Kohlenstoffatom (*retaining*). Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen AbfA und Cel5A erlaubte die Superposition beider Strukturen, die einen Vergleich zwischen der Bindung glukopyranosidischer und arabinofuranosidischer Substrate im aktiven Zentrum beider Enzymfamilien ermöglichte. Bei der Superposition der Strukturen wurden der Michaelis-Menten Komplex 4-Nitrophenyl-Ara der AbfA und Cel5A im Komplex mit 2,4-Dinitro-2-Desoxy-2-Fluoro- β -D-Cellobiose verwendet.

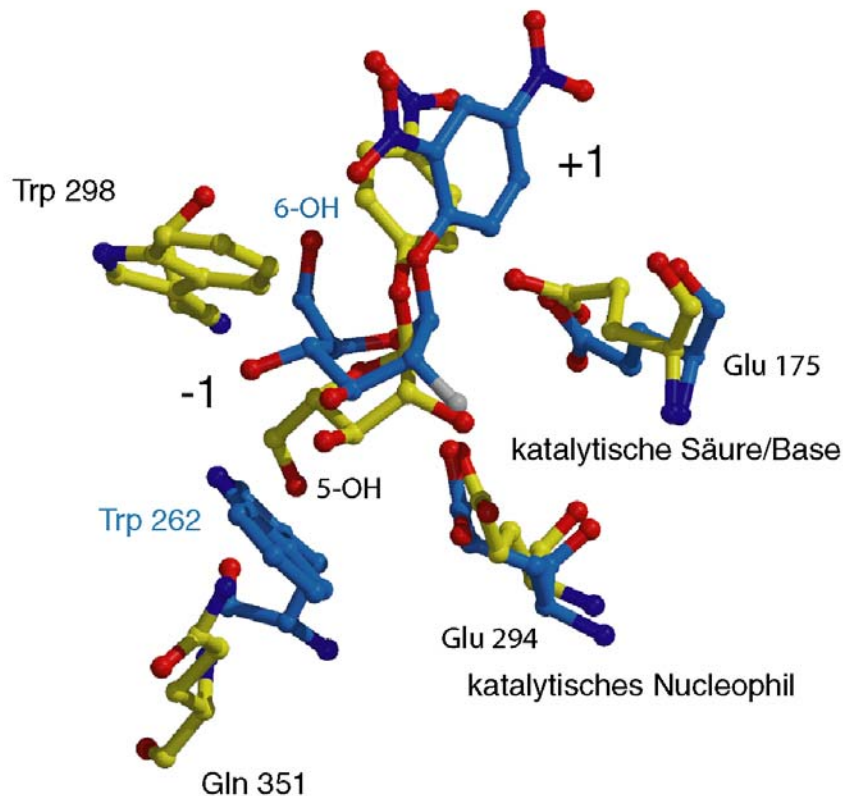


Abbildung 3-32 Substratspezifität der AbfA und Cel5A. Superposition der beiden Strukturen mit den komplexierten Substraten 4-Nitrophenyl-Ara (AbfA) und 2,5-Dinitrophenyl-2-desoxy-2-Fluoro- β -D-Cellobiose (Cel5A). Nur die katalytischen Residuen und die Residuen, die für die Spezifität gegenüber D-glukopyranosidischen und L-arabinofuranosidischen Substraten verantwortlich sind, sind dargestellt. Die Kohlenstoffatome der Cel5A sind hellblau, die der AbfA gelb koloriert. Fluor ist weiß, Stickstoff dunkelblau und Sauerstoff rot gezeichnet.

Der Ring der D-Glukose paßt in das aktive Zentrum der AbfA bis auf den C6 Kohlenstoff und die 6-Hydroxylgruppe, die zu nah am Trp298 positioniert sind (Distanz von 1.3 Å zwischen der 6-Hydroxylgruppe und dem Tryptophan). Diese Residue ist in den meisten Arabinofuranosidasen der Glykosid Hydrolase Familie 51 konserviert bis auf 2 Endoglukanasen der Familie, die glukopyranosidische Substrate hydrolisieren. Aufgrund dieser Information ist es zulässig vorzuschlagen, daß Trp298 für die Diskriminierung gegenüber glukopyranosidischen Substraten in der Glykosid Hydrolase Familie 51 verantwortlich ist. Auf eine ähnliche Weise verhindert der C5 Kohlenstoff und die 5-Hydroxylgruppe der L-Arabinofuranose die Bindung im aktiven Zentrum der Endoglukanasen der Familie 5. Diese Atome des arabinofuranosidischen Substrats sind in unmittelbarer Nähe (1.8 Å, Abbildung 3-32) zum Trp262 der Cel5A, das sich am Ende des achten β -Strangs befindet. Aus sterischen Gründen ist daher die Bindung eines arabinofuranosidischen Substrats im aktiven Zentrum der Endoglukanasen der Familie 5 nicht möglich. In den Strukturen der AbfA ist an einer vergleichbaren Position Gln351 lokalisiert, aber, wie bereits in Abschnitt 3.13.1 beschrieben, orientiert die vorangehende nicht-Prolin cis-Peptidbindung die Seitenkette dieser Residue in einer geeigneten Orientierung zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zur 5-Hydroxylgruppe der Arabinofuranose. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß lediglich zwei Residuen – Trp298 und Gln351 – die Diskriminierung zwischen D-glukopyranosidischen und L-arabinofuranosidischen Substraten modulieren. Darüber hinaus ist es naheliegend zu spekulieren, daß die reziproke Mutagenese dieser Residuen die Substratspezifität beider Enzyme vertauschen müßte. Erste Experimente, die von Dalia Shallom durchgeführt wurden, bestätigen diese Hypothese. Die beiden dreifach-Mutanten der AbfA W298A, A350W, Q351S und W298F, A350W, Q351S zeigten bei Experimenten mit dem Rohextrakt keine Aktivität gegenüber 4-Nitrophenyl-Ara. Viel interessanter ist allerdings die Beobachtung, daß die beiden Mutanten 4-Nitrophenyl-Glukose umsetzen. Die Aktivitätstests wurden zur Inaktivierung der *E.coli* eigenen Enzyme bei 50°C durchgeführt. Dies sind allerdings vorläufige Ergebnisse und eine vollständige Charakterisierung des kinetischen Profils beider Mutanten mit aufgereinigtem Enzym wird von Dalia Shallom noch durchgeführt werden.

Tabelle 3-27 Kinetische Parameter der AbfA. Das kinetische Profil der AbfA für die Hydrolyse der Aryl- α -L-Arabinofuranoside und Aryl- β -D-Xylopyranoside. Die Werte sind (Shallom et al., 2002a; Shallom et al., 2002b) entnommen. AF – Arabinofuranose; Xyl – Xylopyranose

Phenolsubstituent	Zucker	k_{cat} (s ⁻¹)	ratio k_{cat} [AF/Xyl]	K_m (mM)	ratio K_m [AF/Xyl]	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	ratio k_{cat}/K_m [AF/Xyl]
2,5-Dinitro	AF	190	2.6	0.35	1/23	540	60
	Xyl	74		8.0		9.3	
3,4 Dinitro	AF	340	34	0.53	1/8	640	280
	Xyl	10		4.4		2.3	
4-Nitro	AF	87	4.3	0.65	1/23	130	100
	2-Nitro	Xyl		20		15.3	

Obwohl die AbfA zur Arabinofuranose-spezifischen Glykosid Hydrolase Familie 51 gehört, ist sie in der Lage, xylopyranosidische Substrate zu hydrolisieren. D-Xylopyranose und L-Arabinofuranose teilen räumliche Gemeinsamkeiten, da die Xylopyranose keinen C6 Kohlenstoff und keine 6-Hydroxylgruppe besitzt, die eine sterischen Hinderung gegenüber Trp298, wie es bei der Glukose der Fall ist, verursachen könnte. Diese Ähnlichkeit begründet die Existenz bifunktionaler α -L-Arabinofuranosidasen/ β -D-Xylosidasen in den Glykosid Hydrolase Familien 3 und 43 (Lee et al., 2003; Sakka et al., 1993; Utt et al., 1991). AbfA ist in der Lage, Aryl- β -D-xylopyranosidische Substrate mit einer 2 – 30 fach niedrigeren Aktivität (k_{cat}) und 28 – 60 fach herabgesetzten Spezifität (k_{cat}/K_m) im Vergleich zu den korrespondierenden Aryl- α -L-arabinofuranosidischen Substraten zu hydrolisieren (Tabelle 3-27) (Shallom et al., 2002a; Shallom et al., 2002b). Wie bereits erwähnt, binden furanosidische Substrate ohne signifikante Verzerrung der Zuckerkonformation. Scheinbar ist die AbfA in der Lage, xylopyranosidische Substrate zu binden, aber ohne die notwendige Verzerrung des Substrats, die für eine effiziente Katalyse sechsringiger Substrate notwendig ist. Dies erklärt zum Teil die niedrigere Spezifität der AbfA gegenüber xylopyranosidischen Substraten. Gln351 bildet eine Wasserstoffbrücke zur 5-Hydroxylgruppe furanosidischer Substrate (Abbildung 3-32). Für die 4-Hydroxylgruppe xylopyranosidischer Substrate, die eine Wasserstoffbrücke mit einer Länge von 3.1 Å zum Trp262 (N^{ε1}) der Cel5A ausbildet, ist die Distanz zum Gln351 (N^{ε2}) der AbfA mit 4.9 Å für eine Wasserstoffbrücke hingegen zu lang. Diese 4-Hydroxylgruppe bildet daher zu den Residuen im aktiven Zentrum der AbfA keine Wasserstoffbrückenbindung aus, daher werden xylopyranosidische Substrate schwächer gebunden. Dies erklärt zum Teil die niedrigere Aktivität der AbfA gegenüber xylopyranosidischen Substraten.

3.16 Das erste kovalente Intermediat eines furanosidasen Substrats

Für Glykosidasen, die die glykosidische Bindung unter Beibehaltung der Konfiguration am anomeren Kohlenstoff hydrolisieren (*retaining*), liefern Strukturen mit einer kovalenten Bindung zwischen dem katalytischen Nukleophil und dem Zuckersubstrat wertvolle Hinweise auf den Reaktionsmechanismus der Enzyme, in denen die Hydrolyse über ein kovalentes Glykosyl-Enzym Intermediat verläuft. Obwohl der Mechanismus für die meisten *retaining* Glykosidasen akzeptiert war, seit er 1953 von Koshland (Koshland, 1953) zum ersten Mal formuliert wurde, dauerte es bis zum Jahr 2001, um den Mechanismus endgültig zu bestätigen. Die Experimente wurden mit der röntgenkristallographisch wohl am intensivsten untersuchten *retaining* Glykosidase, dem Hühnereiweiß-Lysozym aus der Glykosid Hydrolase Familie 22, durchgeführt (Vocadlo et al., 2001).

Die meisten Strukturen kovalenter Reaktionsintermediate wurden unter Verwendung von 2-Fluoro-2-Desoxy-Zuckerderivaten erhalten. Diese Substrate besaßen darüber hinaus noch eine reaktive Abgangsgruppe und wurden zusammen mit dem Wildtyp oder einer Säure/Base Mutante des Enzyms verwendet (Wicki et al., 2002). Die Verwendung dieser auf dem Reaktionsmechanismus basierenden Inhibitoren führt zu einer Anreicherung des kovalenten Glykosyl-Enzym Intermediats, welches daraufhin mit Hilfe der Massenspektrometrie oder Röntgenkristallographie untersucht werden kann. Ein großer Nachteil dieser Vorgehensweise liegt darin, daß in den erhaltenen Strukturen die starke Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem 2-Hydroxyl des Zuckers und dem katalytischen Nukleophil fehlt. In einigen Glykosidasen wurde gezeigt, daß diese Wasserstoffbrückenbindung einen Betrag von mindestens 10 kcal/mol zur Stabilisierung des Übergangszustands leistet (Namchuk and Withers, 1995; White et al., 1996; Zechel and Withers, 1999). Zum jetzigen Zeitpunkt sind erst zwei Strukturen unsubstituierter Glykosyl-Enzym Intermediate beschrieben worden. Die Strukturen der kovalenten Intermediate der Glykosidase Cex der Glykosid Hydrolase Familie 10 (GH-10) und der GH-13 Glykosidase Cyclodextrin-Glykosyltransferase wurden unter Verwendung ihrer Säure/Base Mutanten und Substraten erhalten, die eine reaktive Abgangsgruppe – Dinitrophenolat oder ein Fluorid-Ion – aufwiesen (Notenboom et al., 1998a; Uitdehaag et al., 1999). In der Struktur der Cex konnte tatsächlich eine ungewöhnlich kurze Wasserstoffbrückenbindung (2.37 Å) zwischen dem 2-Hydroxyl des Zuckers und dem Nukleophil beobachtet werden, die in dem Komplex des gleichen Enzyms mit dem Fluor-substituierten Zucker natürlich nicht vorhanden ist (Notenboom et al., 1998b; White et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine ähnliche Strategie verfolgt. In dem Versuch, das kovalente Glykosyl-Enzym Intermediat der AbfA zu isolieren, wurde das Substrat 2',5'-Dinitrophenyl-Ara gemeinsam mit der Säure/Base Mutante E175A verwendet. Unter diesen Bedingungen ist die Deglykosylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der E175A Mutante (Shallom et al., 2002a), was zu einer Akkumulation des Glykosyl-Enzym Intermediats führte. Der Kristall der E175A Mutante wurde, wie in Abschnitt 3.6.1.3

beschrieben, für kurze Zeit in eine mit dem Substrat angereicherte Lösung eingebracht und zum Abstoppen der Reaktion bei 100 K eingefroren (*cryo trapping*). Die resultierende Elektronendichte zeigt zweifelsfrei die kovalente Bindung zwischen dem Nukleophil Glu294 und dem anomeren Kohlenstoffatom der Arabinofuranose (Abbildung 3-31 D). Die starke Wasserstoffbrückenbindung mit einer Länge von 2.6 Å zwischen Glu294 ($O^{\delta 2}$) und dem 2-Hydroxyl der Furanose liefert in den Arabinofuranosidasen der Glykosid Hydrolase Familie 51, ebenso wie in den untersuchten Pyranosidasen, wahrscheinlich einen wichtigen Beitrag zur Stabilisierung des Übergangszustands. Sehr wahrscheinlich ist das katalytische Nukleophil darüber hinaus nicht nur für die Reaktion sondern auch für die Substratbindung essentiell, denn die Struktur der E294A Mutante, die mit 4-Nitrophenyl-Ara kokristallisiert wurde, zeigte kein gebundenes Substrat im aktiven Zentrum der AbfA.

Die Bildung des kovalenten Reaktionsintermediats führt im Vergleich zur nativen AbfA nicht zu einer signifikanten Veränderung der Struktur (r.m.s.d. = 0.18 Å für alle Hauptkettenatome). Bei keiner Glykosidase, für die ein kovalentes Reaktionsintermediat berichtet worden ist, wurden signifikante Konformationsänderungen in den Strukturen festgestellt (Tabelle 3-28) (Zechel and Withers, 1999).

3.16.1 Massenspektrometrischer Nachweis des kovalenten Intermediats

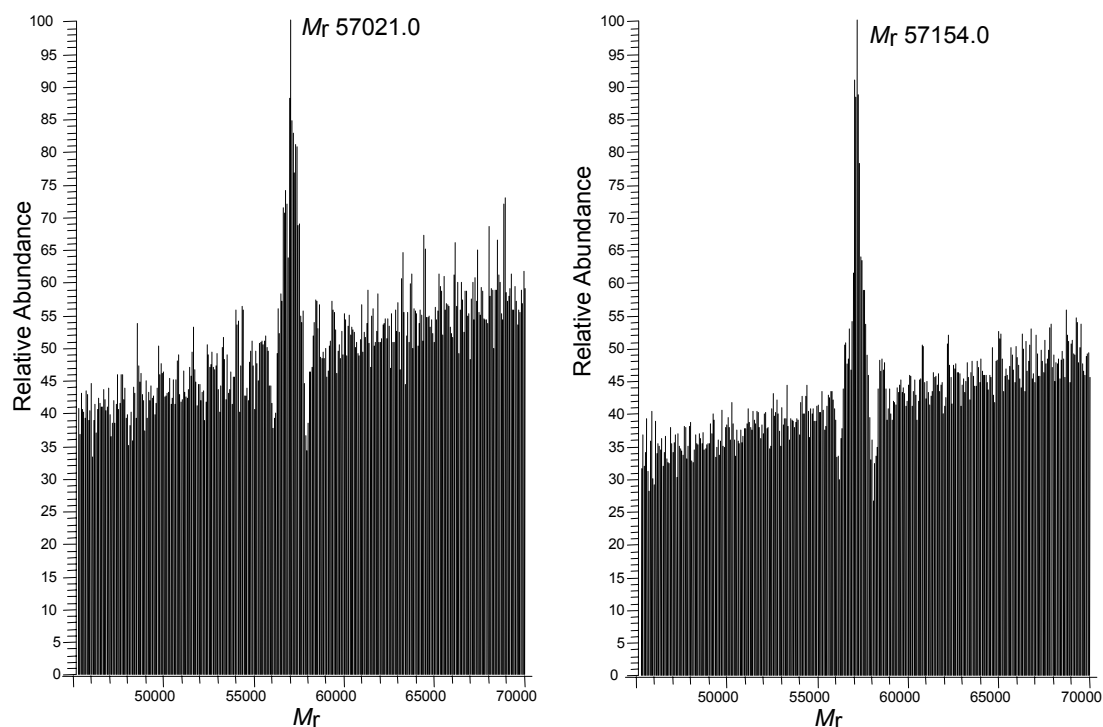


Abbildung 3-33 ESI-MS Spektren der E175A Mutante der AbfA (links) und des kovalenten Reaktionsintermediats (rechts). Die Differenz von 133 Da entspricht dem Molekulargewicht der Arabinofuranose.

Zur weiteren Absicherung wurde die Bildung des kovalenten Intermediats ebenfalls mit ESI-MS bestätigt. Die experimentell bestimmte Massendifferenz zwischen der freien E175A

Mutante der AbfA (Abbildung 3-33, links) und dem kovalenten Reaktionsintermediat (Abbildung 3-33, rechts) lag bei 133 Da, was genau dem Molekulargewicht der Arabinofuranose entspricht.

Die ESI-MS Experimente wurden von A. Admon und T. Ziv am Smoler Protein Center (Technion) in Haifa durchgeführt. Die Proteinlösung der E175A Mutante wurde mit 10 mM des reaktiven Substrats 2,5-Dinitrophenyl-Ara versetzt. Anschließend wurde die Reaktion mit 0.2%-iger Ameisensäure abgestoppt, und die Proteinprobe wurde massenspektrometrisch analysiert.

3.16.2 Die 2T_1 -Konformation des kovalenten Intermediats

Da dies die erste Struktur eines kovalenten Übergangszustands mit einem furanosidischen Substrat ist, ist es interessant, die beobachtete Zuckerkonformation mit denen der pyranosidischen Intermediate zu vergleichen. Alle bisher berichteten kovalenten Reaktionsintermediate pyranosidischer Substrate zeigten entweder eine 4C_1 -Sessel- oder eine ${}^{2,5}B$ -Boot-Konformation des Substrats. Die 4C_1 -Sesselkonformation der Pyranose, die die unverzerrte und energetisch niedrige Konformation darstellt, wurde in den meisten β -*retaining* Glykosidasen beobachtet. Die Bootkonformation hingegen fixiert die Atome C-5, O-5, C-1 und C-2 in einer Ebene, eine ideale Konformation zur Stabilisierung des Oxocarbeniumion-artigen Übergangszustands. Diese Konformation wurde für zwei Xylanasen Bcx (Sidhu et al., 1999) und Xyn11 (Sabini et al., 1999) der Glykosid Hydrolase Familie 11 berichtet.

Der kovalente Übergangszustand der AbfA zeigt den Furanosezucker in einer 2T_1 Konformation (unsymmetrischer Twist mit C2 oberhalb und C1 unterhalb der Ebene). Wie bereits in Abschnitt 3.15 beschrieben, ist die Verzerrung des furanosidischen Substrats im Michaelis-Menten Komplex aufgrund der geringen energetischen Unterschiede zwischen den *Envelope*- und *Twist*-Konformation kein Charakteristikum der Arabinofuranosidasen. Die unverzerrte Konformation des kovalenten Übergangszustands, die bis auf Familie 11 für kovalent gebundene Pyranosen typisch ist, scheint daher ebenfalls kein Charakteristikum der Arabinofuranosidasen zu sein.

3.17 Strukturen entlang der Reaktionskoordinaten

3.17.1 Lokalisation und Funktion der katalytischen Residuen

Wie für ein Mitglied des Clan GH-A erwartet worden war, befinden sich die katalytischen Residuen der AbfA - die Säure/Base Glu175 und das Nukleophil Glu294 - an den C-terminalen Enden der β -Stränge 4 und 7 (Abbildung 3-31) (Henrissat and Davies, 1997; Zverlov et al., 1998). Daher wurde der Clan GH-A früher auch als 4/7 Superfamilie bezeichnet. Die durchschnittliche Distanz zwischen den Sauerstoffatomen der Carboxylgruppen der katalytischen Residuen beträgt 4.7 Å und ist konsistent mit dem Mechanismus einer *retaining* Glykosidase. Die exakte Position der katalytischen Residuen relativ zum Substrat kann durch die Superposition der nativen AbfA und des Komplexes mit Ara- α (1,3)-Xyl näher beschrieben werden.

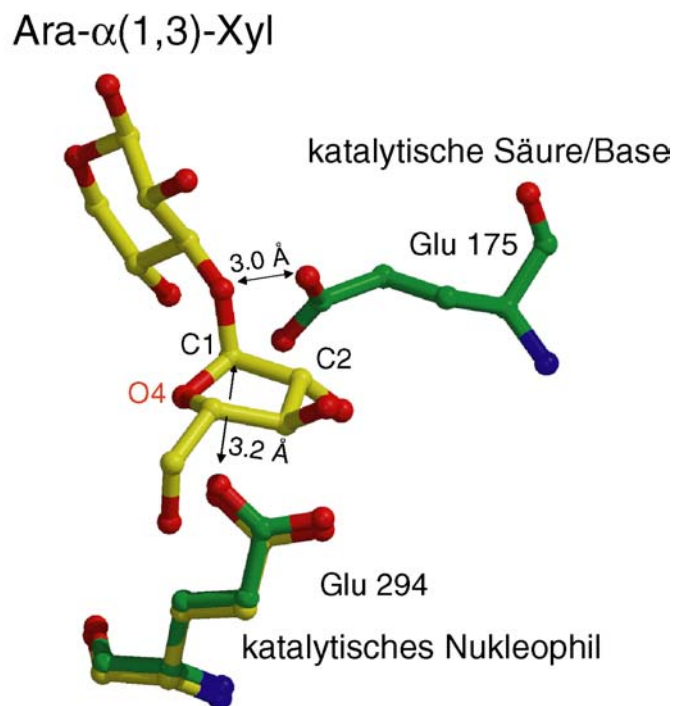


Abbildung 3-34 Superposition der Strukturen der nativen AbfA (grün) und dem Komplex mit Ara- α (1,3)-Xyl (gelb). Glu175 ist 3.0 Å vom glykosidischen Sauerstoff des Ara- α (1,3)-Xyl entfernt. Glu294 ist in einer plausiblen Entfernung von 3.2 Å für einen nukleophilen Angriff auf den anomeren Kohlenstoff der Arabinofuranose.

Der Carboxyl-Sauerstoff der Glu175 ist 3.0 Å vom glykosidischen Sauerstoff des Substrates, Ara- α (1,3)-Xyl, entfernt. Dies entspricht einer geeigneten Entfernung für eine Wasserstoffbrückenbindung und erlaubt die saure Katalyse und die direkte Protonierung des abgehenden Aglykons durch Glu175. Das katalytische Nukleophil ist in einer geeigneten

Entfernung (3.2 Å) für den nukleophilen Angriff am anomeren Kohlenstoff des Substrats und für die Ausbildung eines kovalenten Glykosyl-Enzym Übergangszustands. Im zweiten Schritt der Katalyse aktiviert Glu175 ein Wassermolekül für die Hydrolyse der Glykosyl-Enzym Intermediats. Die Superposition der Glu175 (native AbfA) mit der Struktur des kovalenten Intermediats zeigte, daß die Glu175 in einer Entfernung von 3.9 Å vom anomeren Kohlenstoffatom der Arabinofuranose positioniert ist. Dies entspricht einer geeigneten Entfernung für die Positionierung und Deprotonierung des katalytischen Wassers, welches am anomeren Kohlenstoffatom nukleophil angreift (Superposition der Strukturen nicht gezeigt).

3.17.2 *Syn* und *Anti* Protonierungs-Trajektorien

Retaining Glykosidasen können weiterhin aufgrund ihrer Protonierungs-Trajektorien kategorisiert werden (Vasella et al., 2002): In *anti*-Protonierer, in denen der Protonendonator *anti* zur Bindung zwischen dem endozyklischen Sauerstoff (O4) und dem C1-Kohlenstoffatom positioniert ist, und in *syn*-Protonierer, in denen der Protonendonator *syn* positioniert ist (Heightman and Vasella, 1999)(Abbildung 3-35).

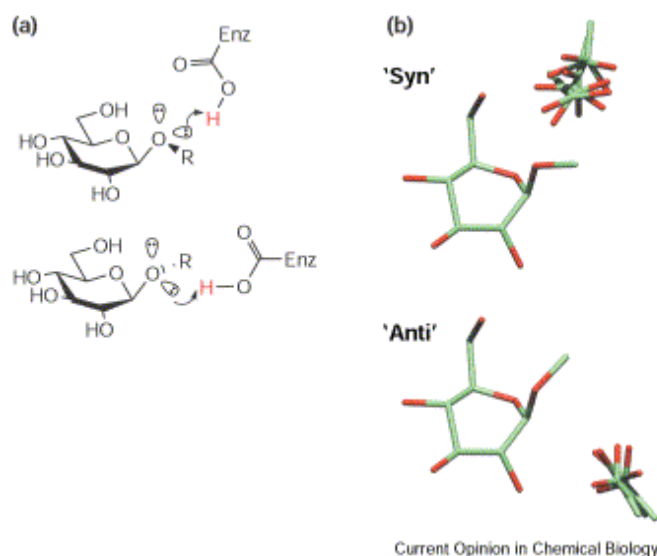


Abbildung 3-35 Die „Syn-“ und „Anti-“ Protonierungs-Trajektorien am Beispiel pyranosidischer Substrate. In dieser Abbildung ist die Positionierung des Protonendonors relativ zur equivalenten Bindung zwischen dem C1-Kohlenstoff und dem O5-Sauerstoff dargestellt. In furanosidischen Substraten bezieht es sich dementsprechend auf die Bindung zwischen C1 und O4 (siehe Text). Die Abbildung ist Vasella et al., 2002 entnommen.

In der AbfA ist die Säure/Base Glu175 auf der Seite des C2-Kohlenstoffatoms der Furanose positioniert und nicht auf der Seite des endozyklischen Sauerstoffs (Abbildung 3-34), daher kann die AbfA zu den *anti*-Protonierern gezählt werden. Bisher gehören alle Glykosid Hydrolase Familien des Clan GH-A, für die Strukturen bestimmt wurden (GH-1, 2, 5, 10 und 26) zu den *anti*-Protonierern (Ducros et al., 2002; Heightman and Vasella, 1999; Vasella et al., 2002). Es ist dem zur Folge wahrscheinlich, daß alle Clan GH-A Familien, unabhängig von der Frage, ob sie eine Spezifität bezüglich furanosidischer oder pyranosidischer Substrate zeigen, die *anti*-Protonierungs-Trajektorie zeigen.

3.17.3 Elektrophile Wanderung des anomeren Kohlenstoffs

Wie in Abschnitt 3.16.2 dargestellt, liegt die kovalent gebundene Arabinofuranose im Übergangszustand in der 2T_1 Konformation vor. Die Superposition der Strukturen des kovalenten Intermediats mit den Strukturen der Michaelis-Menten Komplexe zeigt, daß sich die Hydroxylgruppen 2-OH, 3-OH und 5-OH des furanosidischen Substrats in beiden Komplexen an der gleichen Stelle befinden. Die größte Veränderung, die die Bildung des kovalenten Intermediats mit sich bringt, ist die Bewegung des anomeren Kohlenstoffatoms in Richtung des katalytischen Nucleophils um 1.7 Å (Abbildung 3-36).

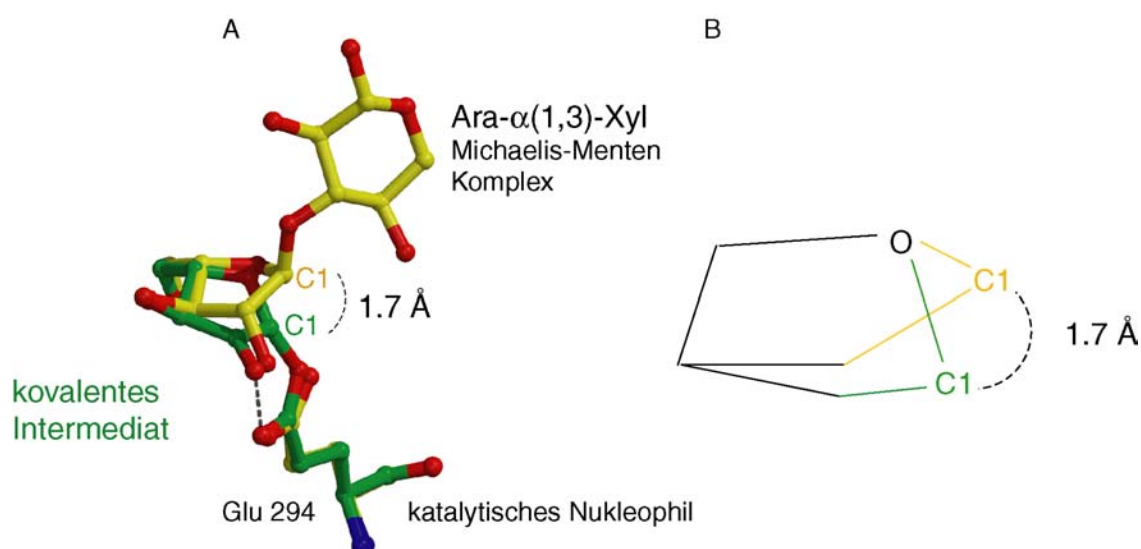


Abbildung 3-36 Elektrophile Wanderung des anomeren Kohlenstoffs. (A) Superposition der beiden Schlüsselschritte der Glykosylierung der AbfA: Der Michaelis-Menten Komplex mit Ara- α (1,3)-Xyl (gelb) und das kovalente Reaktionsintermediat (grün). C1 wandert ungefähr 1.7 Å, um die kovalente Bindung mit dem Carboxyl-Sauerstoff des katalytischen Nucleophils zu bilden. (B) Vereinfachte schematische Darstellung der elektrophilen Wanderung des C1-Kohlenstoffs.

Diese Bewegung des anomeren Kohlenstoffs, die als „elektrophile Wanderung“ bezeichnet wird, wurde bereits für das Hühnereiweiß-Lysozym der Familie 22 (Vocadlo et al., 2001) und die Endoglukanase Cel5A der Familie 5 (Varrot and Davies, 2003) beobachtet. Bei beiden Enzymen handelt es sich um Pyranose-spezifische Glykosidasen. In den Strukturen der AbfA ist diese „elektrophile Wanderung“ zum ersten Mal für ein furanosidisches Substrat beschrieben worden, die Bewegung des anomeren Kohlenstoff in Richtung des katalytischen Nucleophils scheint daher auch ein Merkmal der Furanose hydrolysierenden Glykosidasen zu sein.

Der Mechanismus der elektrophilen Wanderung des anomeren Kohlenstoffs bei Furanosen wurde bereits in N-Ribosyl-Transferasen wie der Purin Nucleosid Phosphorylase intensiv

untersucht. Diese katalysiert die reversible Spaltung der Bindungen zwischen der Ribose und dem Purin als Teil des Purin Rückgewinnungs-Systems (Schramm, 2002) (Schramm and Shi, 2001). Wie in Glykosidasen vollzieht sich der Reaktionsmechanismus dieser Enzyme über einen Oxocarbeniumion-artigen Übergangszustand. Aber im Gegensatz zu den Glykosidasen, in denen die zwei katalytischen Residuen direkt an der Stabilisierung des Übergangszustands partizipieren, sind in den N-Ribosyl-Transferasen keine enzymatischen Anionen nah genug an der fraglichen Bindung lokalisiert, um den Übergangszustand zu stabilisieren. In diesen Enzymen wird die katalytische Beschleunigung der Reaktion durch die Platzierung des Nucleophils - Phosphat, Wasser oder Pyrophosphat - nahe der Ribose erreicht. Darüber hinaus wird in den Phosphotransferasen durch den Ausschluß von Wasser aus dem aktiven Zentrum der Hydrolyse vorgebeugt. Die Kombination aus den Vergleich der Kristallstrukturen der Purin Nucleosid Phosphorylasen im Komplex mit Inhibitoren, die Analoga des Übergangszustands darstellen, und kinetischen Analysen der Isotopeneffekte zeigen für die Bildung des Übergangszustands die Wanderung des anomeren Kohlenstoffs vom Purinring in Richtung des Phosphats, während alle andere Teile des Reaktanden in ihrer Bewegung stärker eingeschränkt sind (Fedorov, 2001).

3.17.4 Reaktionsmechanismus der AbfA

Insgesamt stellen die beschriebenen Strukturen einen eleganten Weg dar, stabile Zustände entlang der Koordinaten des Reaktionsmechanismus der AbfA und der Glykosidasen der Familie 51 im Allgemeinen zu visualisieren. Das furanosidische Substrat bindet in das aktive Zentrum des Enzyms, in dem die zwei katalytischen Residuen in einer optimalen Konformation positioniert sind, um den nukleophilen Angriff am anomeren Kohlenstoffatom und die Protonierung des abgehenden Aglykons zu gestatten (Abbildung 3-37 A und B).

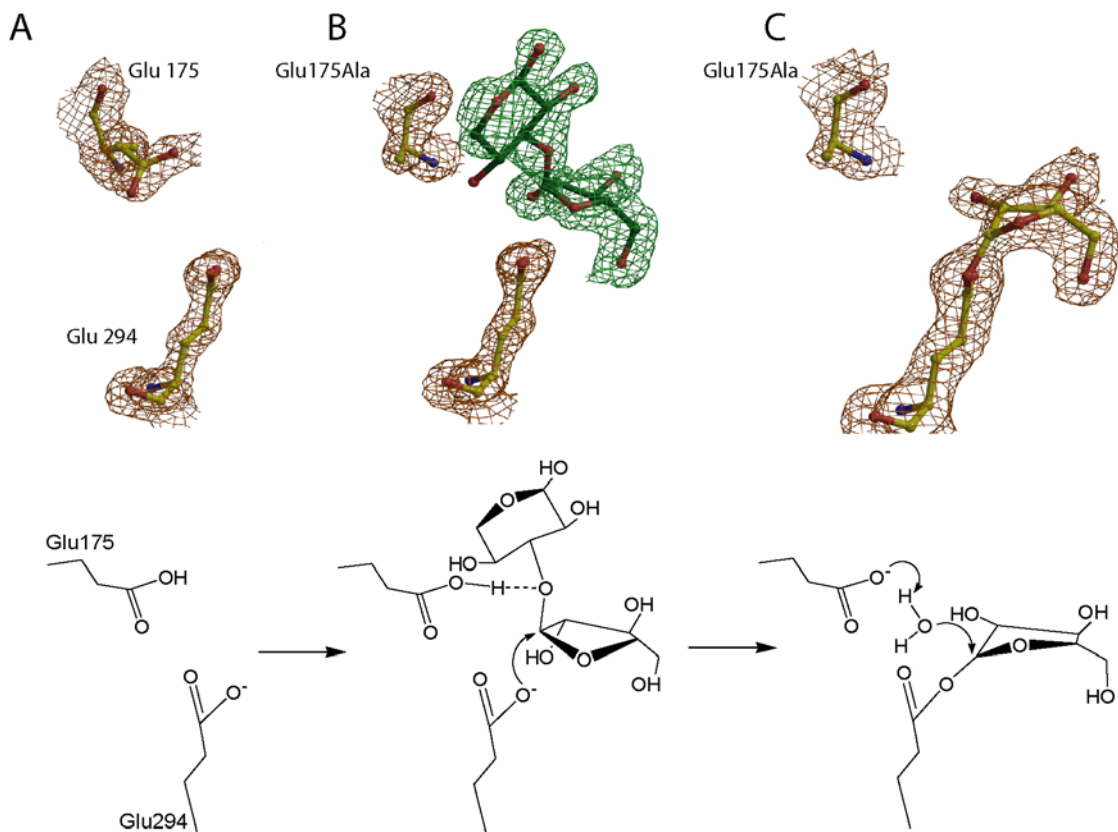


Abbildung 3-37 Momentaufnahmen entlang des Reaktionsmechanismus, die mit Hilfe der Röntgenkristallographie erhalten wurden (oben) und eine schematische Darstellungsweise der korrespondierenden Stufen des Glykosilierungsschritts (unten). (A) Die katalytischen Residuen der nativen AbfA. (B) Michaelis-Menten Komplex mit Ara-α(1,3)-Xyl, das in den *Subsites* -1 und +1 lokalisiert ist. Das furanosidische Substrat in *Subsite* -1 ist in der 4T_0 Konformation. Die fehlende Elektronendichte bei dieser Konturierung für das 4-OH der Xylose in der +1 *Subsite* resultiert aus der Heterogenität des Substrats. Eine zweite Xylose, die lediglich bei einem Teil der Substratmoleküle vorhanden ist (β-1,4 verknüpft), verzerrt wahrscheinlich das O-4 der ersten Xylose. (C) Struktur des kovalenten Reaktionsintermediats. Der furanosidische Zucker ist in einer verdrehten 2T_1 Konformation. Die 2Df_o-mF_c Elektronendichte ist mit 1.5 σ konturiert.

Im Oxocarbeniumion-artigen Übergangszustand verlängert sich die Bindung zwischen dem glykosidischen Sauerstoff und dem anomeren Kohlenstoffatom und schiebt den anomeren

Kohlenstoff in Richtung des katalytischen Nucleophils (Abbildung 3-37 C), was zur Bildung des kovalenten Glykosyl-Enzym Intermediats führt. Dies wird anschließend durch das eintretende Wasser hydrolysiert, das durch die katalytische Säure/Base deprotoniert und damit aktiviert wird. Dieser Mechanismus führt zu einem Produkt mit gleicher Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom wie im nicht hydrolysierten Edukt.

3.17.5 Das „Schlüssel und Schloß Prinzip“ der AbfA

Es ist wichtig herauszustellen, daß bis auf die Wanderung des C1 Kohlenstoffs zwischen den Zuckerkonformationen der Michaelis-Menten Komplexe (E^4 und 4T_0) und des Reaktionsintermediats (2T_1) wenig Bewegung der übrigen Zuckeratome entlang der Reaktionskoordinaten zu beobachten ist (Abbildung 3-38). Auf dem halben Weg zwischen Michaelis-Menten Komplex und Intermediat erreicht der anomere Kohlenstoff Koplanarität zu den Ringatomen O4, C2 und C4, was zur Ausbildung und Stabilisierung des Oxocarbenium artigen Übergangszustands (sp^2 – Hybridisierung) wichtig ist.

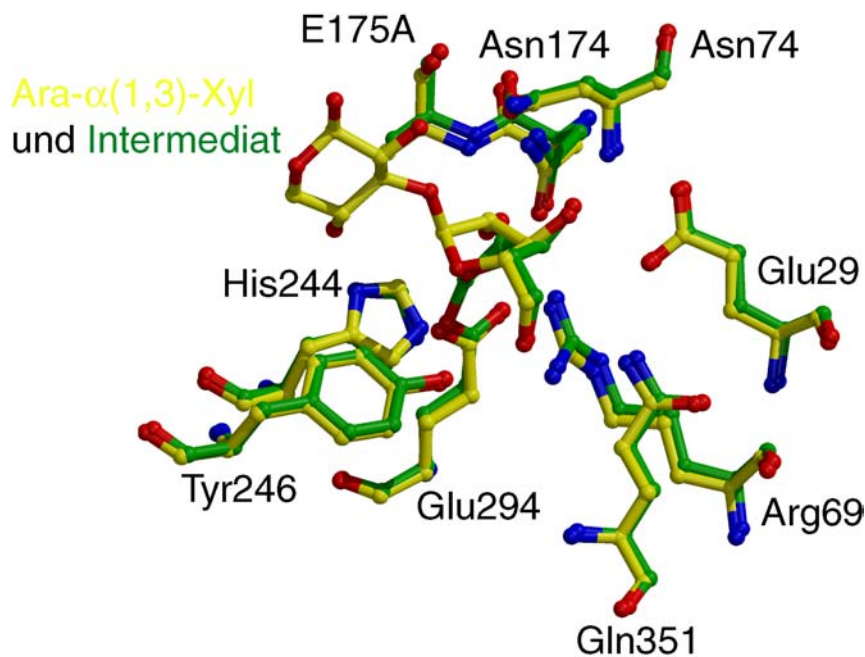


Abbildung 3-38 Schlüssel und Schloß Prinzip der AbfA. Die Kohlenstoffatome des Komplexes mit Ara- $\alpha(1,3)$ -Xyl sind gelb und die der Struktur des kovalenten Reaktionsintermediats grün koloriert. Sauerstoffatome sind rot und Stickstoffatome blau dargestellt.

In der Proteinstruktur sind im Laufe der beschriebenen Reaktionsschritte keine signifikanten strukturellen Veränderungen zu beobachten (Tabelle 3-28). Eine Überlagerung der Strukturen des Komplexes mit Ara- $\alpha(1,3)$ -Xyl und dem kovalenten Glykosyl-Enzym Intermediat zeigt auch für die Residuen im aktiven Zentrum der AbfA sehr wenig Konformationsänderungen (Abbildung 3-38). Die Arbeitsweise der Glykosidasen des Clan

GH-A ähnelt daher sehr stark dem Modell der „Schüssel und Schloß“ – Enzyme, das von Fischer 1894 (Fischer, 1894) beschrieben wurde.

Tabelle 3-28 R.m.s.d. – Plots in [Å] der Hauptkettenatome (C, O, N, C α) der unterschiedlichen AbfA Strukturen.

	R3				P2 ₁	
	AbfA (nativ)	Ara- α (1,3)-Xyl	4-Nitrophenyl-Ara	Intermediat	AbfA (nativ)	E294A
AbfA (nativ)	X	0.131	0.156	0.181	0.457	0.425
Ara- α (1,3)-Xyl		X	0.111	0.135		
4-Nitrophenyl-Ara			X	0.142		
Intermediat				X		
AbfA (nativ) E294A					X	0.249 X

Konformationsänderungen im Zuckersubstrat sind im Vergleich zu Konformationsänderungen im Protein schnell, und dies liefert ein plausibles Erklärungsmodell für die hohe Geschwindigkeit mit einer Wechselzahl von bis zu 1000 s⁻¹, mit der Glykosidasen arbeiten: Der Zucker erfährt im Laufe der Reaktion eine Konformationsänderung, und es sind keine größeren Veränderungen in der Proteinstruktur zu beobachten.

4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die röntgenkristallographische Charakterisierung der α -L-Arabinofuranosidase aus *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (E.C. 3.2.1.55, AbfA) beschrieben. Dabei handelt es sich um die ersten Strukturinformationen aus der Glykosid Hydrolase Familie 51. Die Strukturen der Michaelis-Menten Komplexe und des kovalenten Zucker-Enzym Reaktionsintermediats repräsentieren die ersten Strukturen einer Glykosid Hydrolase im Komplex bzw. mit einem kovalent gebundenen furanosidischen Substrat. Die Strukturen gestatteten eine intensive Studie der Architektur des aktiven Zentrums, der Substratspezifität der AbfA, der Atomkoordinaten des Reaktionsmechanismus dieser Enzymfamilie und einen Vergleich zu Glykosidasen, die pyranosidische Substrate hydrolisieren.

Die α -L-Arabinofuranosidase aus *Geobacillus stearothermophilus* T-6 wurde in zwei verschiedenen Kristallformen, $P2_1$ und $R3$ kristallisiert. Da keine Struktur mit ausreichender Homologie bekannt war, mußte die Struktur *de novo* gelöst werden. Die beiden Kristallformen lieferten unterschiedliche Voraussetzungen für den nachfolgenden Phasierungsprozess. Wo hingegen die MAD Phasierungsexperimente mit der monoklinen Kristallform nicht zum Erfolg führten, lieferten die höhere Symmetrie, die kleinere asymmetrische Einheit und das gute Diffraktionsvermögen der rhomboedrischen Kristalle günstigere Voraussetzungen für den Phasierungsprozess. Die kristallographische Phaseninformation konnte mit diesen Kristallen sowohl durch die MAD Phasierungstechnik unter Einsatz des Selen-Methionin Derivats, als auch durch ein Quecksilber- und Platinderivat mit Hilfe der MIR Methode gewonnen werden: Bei dem Se-Met MAD-Phasierungsexperiment wurden bei 3 Wellenlängen Datensätze bis 1.68 Å Auflösung gemessen. Mit 2 Monomeren mit jeweils 12 Selenpositionen in der asymmetrischen Einheit mußte eine Se-Substruktur von 24 Selen-Positionen bestimmt werden. Aufgrund der Qualität der daraus berechneten Anfangsphasen konnten große Teile des AbfA Strukturmodells automatisch modelliert werden.

Das Enzym ist als Hexamer organisiert und jedes Monomer besteht aus zwei Domänen: Einer $(\beta/\alpha)_8$ -Domäne und einer 12-strängigen β -Faltblattdomäne mit *jelly roll* Topologie. Wie für eine Glykosid Hydrolase des Clans GH-A typisch, sind die katalytische Säure/Base Glu175 und das katalytische Nukleophil Glu294 4.7 Å voneinander entfernt und auf den Faltblättern 4 und 7 der $(\beta/\alpha)_8$ -Domäne positioniert.

Im Laufe der Arbeit konnten mit der rhomboedrischen Kristallform ($R3$) einige hoch aufgelöste Strukturen des Wildtyps und der katalytischen Mutanten im Komplex mit verschiedenen Substraten bestimmt werden (1.2-2.0 Å). Dabei handelt es sich um Michaelis-Menten Komplexe mit natürlichem (Ara- α (1,3)-Xyl) und synthetischem (4-Nitrophenyl-Ara) Substrat und dem kovalenten Arabinose-Enzym Reaktionsintermediat. Diese Strukturen

repräsentieren zwei stabile Zwischenzustände entlang des Reaktionsmechanismus der AbfA und gestatteten eine eingehende Analyse der Atomkoordinaten des Reaktionsmechanismus' und der Substratspezifität der AbfA: Basierend auf diesen Strukturen kann die Protonierungs-Trajektorie als *anti* kategorisiert werden. Der Arabinosezucker ist durch ein komplexes Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindungen im aktiven Zentrum der AbfA gebunden. Die zwei katalytischen Glutaminsäuren und die anderen konservierten Residuen im aktiven Zentrum der AbfA tragen durch Ladungsdelokalisierung und spezifische Protein-Substrat Interaktionen zur Stabilisierung des Oxocarbenium-artigen Übergangszustands bei. Im Gegensatz zu Glykosidasen, die pyranosidische Substrate hydrolysieren, liefert die Verzerrung des Zuckersubstrats keinen wesentlichen Beitrag zur Stabilisierung des Übergangszustands und ist daher kein Charakteristikum der Arabinofuranosidasen. Während der Hydrolyse findet durch Konformationsänderungen im furanosidischen Substrat eine elektrophile Wanderung des anomeren Kohlenstoffatoms um 1.7 Å in Richtung des katalytischen Nukleophils Glu294 statt. Durch den Vergleich des aktiven Zentrums der AbfA mit dem der Endoglukanasen der Glykosid hydrolase Familie 5 (GH-5) konnten zwei Residuen, Trp 298 und Gln351, identifiziert werden, die scheinbar die Substratspezifität hinsichtlich glukopyranosidischer und arabinofuranosidischer Substrate in diesen Enzymen definieren.

Darüber hinaus wurden die Struktur der nativen AbfA und der katalytischen Mutante E294A der primitiv monoklinen Raumgruppe ($P2_1$) mittels Molekularen Ersatzes gelöst (2.6 bzw. 2.35 Å). Sehr wahrscheinlich ist das katalytische Nukleophil (Glu294) nicht nur für die Reaktion sondern auch für die Substratbindung essentiell, denn die Struktur der E294A Mutante, die mit 4-Nitrophenyl-Ara kokristallisiert wurde, zeigte kein gebundenes Substrat im aktiven Zentrum der AbfA.

Anhang

A.1 Kurzzusammenfassung

Die α -L-Arabinofuranosidase aus *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (E.C. 3.2.1.55, AbfA) gehört zur Glykosid Hydrolase Familie 51 und hydrolisiert α -1,2, α -1,3 und α -1,5 verknüpfte arabinofuranosidische Seitenketten in Hemicellulosen. Die native AbfA und das Seleno-Methionin Derivat der AbfA wurden in zwei verschiedenen Kristallformen, $P2_1$ and $R3$, kristallisiert. Da keine homologe Struktur einer Glykosidase der Familie 51 bekannt ist, wurde die kristallographische Phaseninformation durch Einsatz der MAD Phasierungstechnik mit Hilfe des Seleno-Methionin Derivats der AbfA gewonnen. Unabhängig davon konnte die Struktur durch den Einsatz eines Platin- und Quecksilberderivats mit Hilfe der MIR Methode gelöst werden.

Das Enzym ist als Hexamer organisiert und jedes Monomer besteht aus zwei Domänen: Einer $(\beta/\alpha)_8$ -Domäne und einer 12-strängigen β -Faltblattdomäne mit *jelly roll* Topologie. Die katalytische Säure/Base Glu175 und das katalytische Nukleophil Glu294 sind 4.7 Å voneinander entfernt und, wie es für eine Glykosid Hydrolase des Clans GH-A typisch ist, auf den Faltblättern 4 und 7 der $(\beta/\alpha)_8$ -Domäne positioniert. Im Laufe der Arbeit konnten einige hoch aufgelöste Strukturen des Wildtyps und der katalytischen Mutanten im Komplex mit verschiedenen Substraten bestimmt werden (1.2-2.0 Å).

Dabei handelt es sich um Michaelis-Menten Komplexe mit natürlichem und synthetischem Substrat und dem kovalenten Zucker-Enzym Reaktionsintermediat. Diese Strukturen repräsentieren zwei stabile Zwischenzustände entlang des Reaktionsmechanismus der AbfA und gestatteten eine eingehende Analyse des Mechanismus'. Basierend auf diesen Strukturen kann die Protonierungs-Trajektorie als *anti* kategorisiert werden. Der Arabinosezucker ist durch ein komplexes Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindungen im aktiven Zentrum der AbfA gebunden. Die zwei katalytischen Glutaminsäuren und die anderen konservierten Residuen im aktiven Zentrum der AbfA tragen durch Ladungsdelokalisierung und spezifische Protein-Substrat Interaktionen zur Stabilisierung des Oxocarbenium-artigen Übergangszustands bei. Während der Hydrolyse findet eine elektrophile Wanderung des anomeren Kohlenstoffatoms um 1.7 Å in Richtung des katalytischen Nukleophils Glu294 statt.

A.2 Abstract

The α -L-Arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (E.C. 3.2.1.55, AbfA), a family 51 glycosidase, catalyzes the hydrolysis of α -1,2, α -1,3 and α -1,5 L-arabinofuranosidic bonds in arabinose-containing hemicelluloses. Native and Se-Met AbfA were crystallized in two different space groups, $P2_1$ and $R3$. As no homologous structure is known to date for GH-51 enzymes, the phases were obtained using MAD technique with the Se-Met derivative of the enzyme, as well as MIR experiments with mercury and platinum derivatives.

The enzyme is a hexamer, and each monomer is organized into two domains: a $(\beta/\alpha)_8$ -barrel and a 12-stranded β -sandwich with jelly roll topology. The catalytic acid base residue Glu175 and the nucleophile Glu294 are located 4.7 Å apart on β -strands 4 and 7 of the $(\beta/\alpha)_8$ -domain, as expected from a GH-A clan enzyme. Several high resolution structures of the wild type and mutant enzymes were obtained in complex with different substrates (1.2-2.0 Å). Michaelis complexes with natural and synthetic substrate, and of the covalent arabinofuranosyl-enzyme intermediate represent two stable states in the double displacement mechanism, and allow thorough examination of the catalytic mechanism. Based on the structures, AbfA utilizes *anti*-protonation trajectory. The arabinofuranose sugar is tightly bound and distorted by an extensive network of hydrogen bonds. The two catalytic glutamic acids, together with other conserved residues contribute to the stabilization of the oxocarbenium ion-like transition state via charge delocalization and specific protein-substrate interactions. A 1.7 Å electrophilic migration of the anomeric carbon takes place during the hydrolysis as observed for other glycoside hydrolases.

A.3 Lebenslauf

19. April 1974	geboren in Bochum
Staatsangehörigkeit	deutsch
1980 - 1984	Grundschule in Hattingen
1984 - 1993	Gymnasium Waldstraße in Hattingen
1994 - 1998	Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine Universität in Düsseldorf
November 1998 - April 1999	Straussen-Apotheke in Hattingen
Mai 1999 - Oktober 1999	Bayer AG in Leverkusen
November 1999	3. Staatsexamen, Approbation als Apotheker
Januar 2003 - Juni 2004	Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. D. Schomburg, Institut für Biochemie, Universität zu Köln "Kristallstruktur und Momentaufnahmen entlang des Reaktionsmechanismus der α -L-Arabinofuranosidase"
seit Juli 2004	Selbstständig als Apotheker in Bochum

A.4 Vorabveröffentlichungen

- Hövel, K., Shallom, D., Niefind, K., Baasov, T., Shoham, G., Shoham, Y. and D., Schomburg (2003) - Crystallization and preliminary X-ray analysis of a family 51 glycoside hydrolase, the α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **D59**, 913-915.
- Hövel, K., Shallom, D., Niefind, K., Belakhov, V., Shoham, G., Baasov, T., Shoham, Y. and D., Schomburg (2003) – Crystal structure and snapshots along the reaction pathway of a family 51 α -L-arabinofuranosidase. *EMBO J.*, **22**, 4922-4932.

A.5 Posterbeiträge

- Hövel, K., Martens, L., Sonsmann, G., Schomburg, D. (2001) – Direct screening methods for the fast identification of heavy metal derivatives in protein crystals and subsequent peptide mass mapping. 49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and allied topics, Chicago, Illinois, USA.
- Hövel, K., Niefind, K., Schomburg, D. (2002) – Crystallization und Preliminary X-ray analysis of a native and selenomethionine α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6, ICCBM9, Jena, Germany
- Hövel, K., Shallom D., Belakhov, V., Baasov, T., Shoham, G., Shoham, Y., Schomburg, D. (2003) – The First 3D Structure of a Family 51 Glycosidase: Crystal Structures of Enzyme – Substrate Complexes of a Arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, 5th Carbohydrate Bioengineering Meeting, Groningen, Netherlands (1st prize poster award)

A.6 Literaturverzeichnis

- Andersson, K.M. and Hovmoller, S. (2000) The protein content in crystals and packing coefficients in different space groups. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56**, 789-790.
- Blake, C.C.F.e.a. (1965) Structure of hen-egg-white lysozyme. A three dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, **206**, 757-761.
- Blundell, T.L. and Johnson, L.N. (1976) Protein Crystallography. *Academic Press, New York*.
- Bourne, Y. and Henrissat, B. (2001) Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 593-600.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D*, **54**, 905-921.
- CCP4. (1994) The CCP4 suite: programmes for protein crystallography. *Acta Cryst. D*, **50**, 760-763.
- Collins, T. and Ferrier, R. (1995) Monosaccharides, their Chemistry and their Roles in Natural Products. *John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK*.
- Colman, P.M., Hoyne, P.A. and Lawrence, M.C. (1993) Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin- neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J Virol*, **67**, 2972-2980.
- Cromer, D.T. and Libermann, D. (1970) Relativistic Calculation of Anomalous Scattering Factors for X Rays. *J. Chem. Phys.*, **53**, 1891-1898.
- Dauter, Z., Dauter, M., de La Fortelle, E., Bricogne, G. and Sheldrick, G.M. (1999) Can Anomalous Signal of Sulfur Become a Tool for Solving Protein Crystal Structures? *J. Mol. Biol.*, **289**, 83-92.
- Davies, G. and Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, **3**, 853-859.
- Davies, G., Sinnott, M.L. and Withers, S.G. (1998) Glycosyl Transfer. In Sinnott, M.L. (ed.), *Comprehensive biological catalysis*. Academic Press Limited, London, Vol. 1, pp. 119-209.

- Davies, G.J. (1998) Substrate distortion in glycoside hydrolysis: the use of modified oligosaccharides to study cellulase structure and function. In Claeysens, M., Nerinckx, W. and Piens, K. (eds.), *Carbohydrases from Trichoderma reesei and other microorganisms, Structures, biochemistry, genetics and applications*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Debeche, T., Bliard, C., Debeire, P. and O'Donohue, M.J. (2002) Probing the catalytically essential residues of the α -L- arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*. *Protein Eng.*, **15**, 21-28.
- Doublet, S. (1997) Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Meth. Enzymol.*, **276**, 523-529.
- Ducros, V.M., Zechel, D.L., Murshudov, G.N., Gilbert, H.J., Szabo, L., Stoll, D., Withers, S.G. and Davies, G.J. (2002) Substrate distortion by a β -mannanase: snapshots of the Michaelis and covalent-intermediate complexes suggest a $B_{(2,5)}$ conformation for the transition state. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **41**, 2824-2827.
- Ducruix, A.G., R. (1999) Crystallization of nucleic acids and proteins, a practical approach. *Oxford University Press, Oxford*.
- Esnouf, R.M. (1997) An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J Mol Graph Model*, **15**, 132-134, 112-133.
- Evans, G. and Pettifer, R. (1996) Stabilization and calibration of x-ray wavelengths for anomalous diffraction measurements using synchrotron radiation. *Rev. Sci. Instrum.*, **67**, 3428-3433.
- Evans, G. and Pettifer, R. (2001) CHOOCH: a program for deriving anomalous scattering factors from X-ray fluorescence spectra. *J. Appl. Cryst.*, **34**, 82-86.
- Fedorov, A.e.a. (2001) Transition state structure of purine nucleoside phosphorylase and principles of atomic motion in enzymatic catalysis. *Biochemistry*, **40**, 853-860.
- Ferre-D'Amare, A.R.B., S.K. (1997) Dynamic light scattering in evaluating crystallizability of macromolecules-. *Meth. Enzymol.*, **276**, 157-166.
- Fischer, E. (1894) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **27**, 2985-2993.
- Fort, S., Boyer, V., Greffe, L., Davies, G.J., Moroz, O., Christiansen, L., Schulein, M., Cottaz, S. and Driguez, H. (2000) Highly efficient synthesis of b(1-4)-oligo- and -polysaccharides using a mutant cellulase. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5429-5437.

- Fujimoto, Z., Takase, K., Doui, N., Momma, M., Matsumoto, T. and Mizuno, H. (1998) Crystal structure of a catalytic-site mutant α -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. *J Mol Biol*, **277**, 393-407.
- Garman, E.F. and Schneider, T.R. (1997) Macromolecular Cryocrystallography. *Appl Cryst*, **30**, 211-237.
- Gilead, S. and Shoham, Y. (1995) Purification and characterization of α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearotherophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 170-174.
- Gonzalez, A., Pedelacq, J., Sola, M., Gomis-Ruth, F.X., Coll, M., Samana, J. and Benini, S. (1999) Two-wavelength MAD phasing: in search of the optimal choice of wavelengths. *Acta Cryst. D*, **55**, 1449-1458.
- Hajdu, J., Neutze, R., Sjogren, T., Edman, K., Szoke, A., Wilmouth, R.C. and Wilmot, C.M. (2000) Analyzing protein functions in four dimensions. *Nat Struct Biol*, **7**, 1006-1012.
- Heightman, T.D. and Vasella, A.T. (1999) Recent insights into inhibition, structure, and mechanism of configuration-retaining glycosidases. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 750-770.
- Hendrickson, W.A. and Ogata, C.M. (1997) Phase determination from multiwavelength anomalous diffraction measurements. *Meth. Enzymol.*, **276**, 494-523.
- Hendrickson, W.A., Pähler, A., Smith, J.L., Satow, Y., Merritt, E.A. and Phizackerley, R.P. (1989) Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2190-2194.
- Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J.P. and Davies, G. (1995) Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**, 7090-7094.
- Henrissat, B. and Davies, G. (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 637-644.
- Hövel, K., Shallom, D., Niefind, K., Baasov, T., Shoham, G., Shoham, Y. and D., S. (2003) Crystallization and preliminary X-ray analysis of a family 51 glycoside hydrolase, the α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearotherophilus* T-6. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **D59**, 913-915.
- Iriyama, N., Takeuchi, N., Shiraishi, T., Izumi, K., Sawada, M.T., Takahashi, N., Furuhashi, K., Ogura, H. and Uda, Y. (2000) Enzymatic properties of sialidase from the ovary of the starfish, *Asterina pectinifera*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **126**, 561-569.

- Jancarik, J.K., S.-H. (1991) Sparse matrix sampling. a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409-411.
- Jenkins, J., Lo Leggio, L., Harris, G. and Pickersgill, R. (1995) β -glucosidase, β -galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold β/α architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of β -strands four and seven. *FEBS Lett.*, **362**, 281-285.
- Jones, S. and Thornton, J.M. (1996) Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13-20.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, **47**, 110-119.
- Kamitori, S., Kondo, S., Okuyama, K., Yokota, T., Shimura, Y., Tonozuka, T. and Sakano, Y. (1999) Crystal structure of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase II (TVAll) hydrolyzing cyclodextrins and pullulan at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **287**, 907-921.
- Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 Da. *Anal. Chem.*, **60**, 2299-2301.
- Koshland, D.E. (1953) Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev. Camb. Phil. Soc.*, **28**, 416-436.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. and Thornton, J.M. (1985) PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291.
- Lawrence, M.C. and Colman, P.M. (1993) Shape complementarity at protein/protein interfaces. *J Mol Biol*, **234**, 946-950.
- Lee, R.C., Hrmova, M., Burton, R.A., Lahnstein, J. and Fincher, G.B. (2003) Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from Barley with α -L-Arabinofuranosidase and β -D-Xylosidase activity characterization, primary structures and COOH-terminal processing. *J. Biol. Chem.*, **289**.
- Mackenzie, L.F., Wang, Q., Warren, R.A. and Withers, S.G. (1998) Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 5583-5584.
- Malet, C. and Planas, A. (1998) From β -glucanase to β -glucansynthase: glycosyl transfer to α -glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile. *FEBS Lett.*, **440**, 208-212.

- Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, **33**, 491-497.
- Mechaly, A., Teplitsky, A., Belakhov, V., Baasov, T., Shoham, G. and Shoham, Y. (2000) Overproduction and characterization of seleno-methionine xylanase T-6. *J. Biotechnol.*, **78**, 83-86.
- Merritt, E.A. and Bacon, D.J. (1997) Raster3D: Photorealistic Molecular Graphics. *Meth. Enzymol.*, **277**, 505-524.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. and Dodson, E.J. (1997) Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst. D*, **53**, 240-255.
- Namchuk, M.N. and Withers, S.G. (1995) Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase: kinetic analysis of the role of noncovalent enzyme/substrate interactions. *Biochemistry*, **34**, 16194-16202.
- Navas, J. and Beguin, P. (1992) Site-directed mutagenesis of conserved residues of *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**, 807-812.
- Notenboom, V., Birsan, C., Nitz, M., Rose, D.R., Warren, R.A. and Withers, S.G. (1998a) Insights into transition state stabilization of the β -1,4- glycosidase Cex by covalent intermediate accumulation in active site mutants. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 812-818.
- Notenboom, V., Birsan, C., Warren, R.A., Withers, S.G. and Rose, D.R. (1998b) Exploring the cellulose/xylan specificity of the β -1,4-glycanase cex from *Cellulomonas fimi* through crystallography and mutation. *Biochemistry*, **37**, 4751-4758.
- Nurizzo, D., Turkenburg, J.P., Charnock, S.J., Roberts, S.M., Dodson, E.J., McKie, V.A., Taylor, E.J., Gilbert, H.J. and Davies, G.J. (2002) *Cellvibrio japonicus* α -L-arabinanase 43A has a novel five-blade β -propeller fold. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 665-668.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-Ray Diffraction Data Collection in Oscillation Mode. *Meth. Enzymol.*, **276**, 407-426.
- Palcic, M.M. (1999) Biocatalytic synthesis of oligosaccharides. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10**, 616-624.
- Perrakis, A., Morris, R. and Lamzin, V.S. (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat Struct Biol*, **6**, 458-463.
- Pitson, S.M., Voragen, A.G. and Beldman, G. (1996) Stereochemical course of hydrolysis catalyzed by arabinofuranosyl hydrolases. *FEBS Lett.*, **398**, 7-11.

- Ryttersgaard, C., Lo Leggio, L., Coutinho, P.M., Henrissat, B. and Larsen, S. (2002) *Aspergillus aculeatus* β -1,4-galactanase: substrate recognition and relations to other glycoside hydrolases in clan GH-A. *Biochemistry*, **41**, 15135-15143.
- Sabini, E., Sulzenbacher, G., Dauter, M., Dauter, Z., Jorgensen, P.L., Schulein, M., Dupont, C., Davies, G.J. and Wilson, K.S. (1999) Catalysis and specificity in enzymatic glycoside hydrolysis: a $^{2.5}B$ conformation for the glycosyl-enzyme intermediate revealed by the structure of the *Bacillus agaradhaerens* family 11 xylanase. *Chem. Biol.*, **6**, 483-492.
- Saha, B.C. (2000) α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol. Adv.*, **18**, 403-423.
- Sakka, K., Yoshikawa, K., Kojima, Y., Karita, S., Ohmiya, K. and Shimada, K. (1993) Nucleotide sequence of the *Clostridium stercorarium* xylA gene encoding a bifunctional protein with β -D-xylosidase and α -L- arabinofuranosidase activities, and properties of the translated product. *Biosci Biotechnol Biochem*, **57**, 268-272.
- Sakon, J., Adney, W.S., Himmel, M.E., Thomas, S.R. and Karplus, P.A. (1996) Crystal structure of thermostable family 5 endocellulase E1 from *Acidothermus cellulolyticus* in complex with cellotetraose. *Biochemistry*, **35**, 10648-10660.
- Schneider, T.R. and Sheldrick, G.M. (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**, 1772-1779.
- Schramm, V.L. (2002) Development of transition state analogues of purine nucleosid phosphorylase as anti-T-cell agents. *Biochim Biophys Acta*, **1587**, 107-117.
- Schramm, V.L. and Shi, W. (2001) Atomic motion in enzymatic reaction coordinates. *Curr Opin Struc Biol*, **11**, 657-665.
- Shallom, D., Belakhov, V., Solomon, D., Gilead-Gropper, S., Baasov, T., Shoham, G. and Shoham, Y. (2002a) The identification of the acid-base catalyst of α -arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase. *FEBS Lett.*, **514**, 163-167.
- Shallom, D., Belakhov, V., Solomon, D., Shoham, G., Baasov, T. and Shoham, Y. (2002b) Detailed kinetic analysis and identification of the nucleophile in α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 43667-43673.
- Shnueli, U. (1996) International tables for crystallography, Vol B reciprocal space. *Kluwer Academic Press, Dordrecht*.

- Sidhu, G., Withers, S.G., Nguyen, N.T., McIntosh, L.P., Ziser, L. and Brayer, G.D. (1999) Sugar ring distortion in the glycosyl-enzyme intermediate of a family G/11 xylanase. *Biochemistry*, **38**, 5346-5354.
- Sierks, M.R., Ford, C., Reilly, P.J. and Svensson, B. (1990) Catalytic mechanism of fungal glucoamylase as defined by mutagenesis of Asp176, Glu179 and Glu180 in the enzyme from *Aspergillus awamori*. *Protein Eng.*, **3**, 193-198.
- Sinnott, M.L. (1990) Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.*, **90**, 1171-1202.
- Terwilliger, T.C. (2001) Maximum-likelihood density modification using pattern recognition of structural motifs. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 1755-1762.
- Terwilliger, T.C. and Berendzen, J. (1999) Evaluation of macromolecular electron-density map quality using the correlation of local r.m.s. density. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55**, 1872-1877.
- Tews, I., Perrakis, A., Oppenheim, A., Dauter, Z., Wilson, K.S. and Vorgias, C.E. (1996) Bacterial chitobiase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 638-648.
- Tong, L. and Rossman, M. (1997) Rotation Function Calculations with GLRF Programm. *Meth. Enzymol.*, **276**, 594-611.
- Tormo, J., Lamed, R., Chirino, A.J., Morag, E., Bayer, E.A., Shoham, Y. and Steitz, T.A. (1996) Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *Embo J*, **15**, 5739-5751.
- Totsuka, A., Nong, V.H., Kadokawa, H., Kim, C.S., Itoh, Y. and Fukazawa, C. (1994) Residues essential for catalytic activity of soybean β -amylase. *Eur. J. Biochem.*, **221**, 649-654.
- Trincone, A., Perugino, G., Rossi, M. and Moracci, M. (2000) A novel thermophilic glycosynthase that effects branching glycosylation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 365-368.
- Uitdehaag, J.C., Mosi, R., Kalk, K.H., van der Veen, B.A., Dijkhuizen, L., Withers, S.G. and Dijkstra, B.W. (1999) X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nat Struct Biol*, **6**, 432-436.
- Utt, E.A., Eddy, C.K., Keshav, K.F. and Ingram, L.O. (1991) Sequencing and expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens* xylB gene encoding a novel bifunctional protein with β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase activities. *Appl Environ Microbiol*, **57**, 1227-1234.

- Varrot, A. and Davies, G.J. (2003) Direct experimental observation of the hydrogen-bonding network of a glycosidase along its reaction coordinate revealed by atomic resolution analyses of endoglucanase Cel5A. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **59**, 447-452.
- Vasella, A., Davies, G.J. and Bohm, M. (2002) Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6**, 619-629.
- Vocadlo, D.J., Davies, G.J., Laine, R. and Withers, S.G. (2001) Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, **412**, 835-838.
- Walsh, M.A., Evans, G., Sanishvili, R., Dementieva, I. and Joachimiak, A. (1999) MAD data collection - current trends. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55**, 1726-1732.
- Weeks, C.M., DeTitta, G.T., Hauptman, H.A., Thuman, P. and Miller, R. (1994) Structure solution by minimal-function phase refinement and Fourier filtering. II. Implementation and applications. *Acta Crystallogr A*, **50**, 210-220.
- White, A., Tull, D., Johns, K., Withers, S.G. and Rose, D.R. (1996) Crystallographic observation of a covalent catalytic intermediate in a β -glycosidase. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 149-154.
- Wicki, J., Rose, D.R. and Withers, S.G. (2002) Trapping covalent intermediates on β -glycosidases. *Methods Enzymol.*, **354**, 84-105.
- Wolfenden, R., Lu, X. and Young, G. (1998) Spontaneous hydrolysis of glycosides. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 6814-6815.
- Zechel, D.L. and Withers, S.G. (1999) Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.*, **33**, 11-18.
- Zverlov, V.V., Liebl, W., Bachleitner, M. and Schwarz, W.H. (1998) Nucleotide sequence of *arfB* of *Clostridium stercoarium*, and prediction of catalytic residues of α -L-arabinofuranosidases based on local similarity with several families of glycosyl hydrolases. *FEMS Microbiol. Lett.*, **164**, 337-343.

A.7 Abbildungsverzeichnis

1-1 DIE STRUKTURELLEN KOMPONENTEN DES XYLANS.	- 1 -
1-2 DER REAKTIONSMECHANISMUS DER <i>RETAINING</i> GLYKOSIDASEN.	- 5 -
1-3 DER PHILLIPS MECHNISMUS DER <i>INVERTING</i> GLYKOSIDASEN.	- 6 -
1-4 WIEDERHERSTELLUNG DER AKTIVITÄT DER SÄURE/BASE MUTANTE.	- 9 -
1-5 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON 4-NITROPHENYL-ARA.	- 10 -
1-6 WIEDERHERSTELLUNG DER KATALYTISCHEN AKTIVITÄT DER E294A MUTANTE.	- 11 -
3-1 SDS GELELEKTROPHORESE UND NATIVE GELELEKTROPHORESE	- 32 -
3-2 PRIMITIV MONOKLINE KRISTALLE DER RAUMGRUPPE $P2_1$.	- 37 -
3-3 RHOMBOEDRISCHE KRISTALLE DER RAUMGRUPPE $R3$.	- 38 -
3-4 SELBSTROTATIONSFUNKTIONEN DER $R3$ KRISTALLE.	- 41 -
3-5 SELBSTROTATIONSFUNKTION DER $P2_1$ KRISTALLE.	- 43 -
3-6 VERBESSERUNG DER ELEKTRONENDICHTE DURCH DICHEMODIFIKATION.	- 48 -
3-7 DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE DES SIDE CHAIN DOCKINGS.	- 51 -
3-8 MONTAGE DES PROTEINKRISTALLS AUF DEN MALDI PROBENHALTER.	- 53 -
3-9 MS-SPEKTREN DER DIREKT VERMESSENEN PROTEINKRISTALLE.	- 53 -
3-10 NATIVE GELELEKTROPHORESE DER NATIVEN UND DERIVATISIERTEN ABFA.	- 55 -
3-11 REPRÄSENTATIVER AUSSCHNITT DER NATIVEN ELEKTRONENDICHTE.	- 66 -
3-12 RAMACHANDRAN-PLOT DER NATIVEN ABFA.	- 68 -
3-13 RAMACHANDRAN-PLOTS DES 4-NITROPHENYL-ARA KOMPLEXES	- 70 -
3-14 REPRÄSENTATIVER AUSSCHNITT AUS DEN $2DF_O$ - MF_C – ELEKTRONENDICHTEN.	- 71 -
3-15 RAMACHANDRAN-PLOT EINES MONOMERS DER E294A MUTANTE.	- 73 -

3-16 DIE FALTUNG DES ABFA MONOMERS ALS BANDDIAGRAMM.	- 75 -
3-17 SEQUENZ UND SEKUNDÄRSTRUKTURELEMENTE DER ABFA.	- 76 -
3-18 C-ALPHA TRACE DER ABFA ALS STEREOGRAMM.	- 77 -
3-19 DIE BEIDEN DOMÄNEN DER ABFA.	- 78 -
3-20 β -SANDWICH DOMÄNEN DER ABFA UND DER CELLULOSE BINDENDEN DOMÄNE.	- 79 -
3-21 VERGLEICH DER INTERFACEARCHITEKTUR.	- 79 -
3-22 DIE HEXAMERE ABFA IN DER RHOMOEDRISCHEN KRISTALLFORM.	- 80 -
3-25 KONTAKTFLÄCHEN DES ABFA HEXAMERS.	- 83 -
3-26 STRUKTURVERGLEICH DER ABFA MIT CELC.	- 85 -
3-27 STRUKTURVERGLEICH ZWISCHEN ABFA UND DER α -AMYLASE AUS <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (CLAN GH-H).	- 86 -
3-28 EINFLUSS DER MUTATION AN POSITION 175.	- 87 -
3-29 ANFÄRBUNG DER SEKUNDÄRSTRUKTURELEMENTE DER ABFA NACH ISOTROPEN TEMPERATURFAKTOREN.	- 89 -
3-30 ANFÄRBUNG DES KOMPLETTEN ABFA HEXAMERS NACH ISOTROPEN TEMPERATURFAKTOREN.	- 90 -
3-31 INTERAKTIONEN DER LIGANDEN MIT DEN RESIDUEN DES AKTIVEN ZENTRUMS.	- 92 -
3-32 SUBSTRATSPEZIFITÄT DER ABFA UND CEL5A.	- 96 -
3-33 ESI-MS SPEKTREN DER E175A MUTANTE UND DES KOVALENTEN INTERMEDIATS	- 100 -
3-34 SUPERPOSITION DER STRUKTUREN DER NATIVEN ABFA (GRÜN) UND DEM KOMPLEX MIT ARA- α (1,3)-XYL (GELB).	- 102 -
3-35 DIE „SYN-“ UND „ANTI-“ PROTONIERUNGS-TRAJEKTORIEN.	- 104 -
3-36 ELEKTROPHILE WANDERUNG DES ANOMEREN KOHLENSTOFFS.	- 105 -
3-37 MOMENTAUFNAHMEN ENTLANG DES REAKTIONSMECHANISMUS.	- 107 -
3-38 SCHLÜSSEL UND SCHLOSS PRINZIP DER ABFA.	- 108 -

A.8 Tabellenverzeichnis

2-1 VERWENDETE GERÄTE.	- 18 -
2-2 SONSTIGE MATERIALIEN.	- 19 -
2-3 COMPUTERPROGRAMME.	- 19 -
2-4 MESSPARAMETER DER MAD DATENSÄTZE.	- 24 -
2-5 MESSPARAMETER DER MIR PHASIERUNG.	- 25 -
2-6 MESSPARAMETER DES 4-NITROPHENYL-ARA DATENSATZES.	- 26 -
2-7 MESSPARAMETER DER MIT $\text{CuK}\alpha$ -STRAHLUNG GEMESSENEN R3 DATENSÄTZE.	- 26 -
2-8 MESSPARAMETER FÜR DEN NATIVEN DATENSATZ DER $P2_1$ RAUMGRUPPE.	- 26 -
2-9 MESSPARAMETER DES DATENSATZES DER E294A MUTANTE.	- 27 -
3-1 DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG DER NATIVEN UND SE-MET-ABFA.	- 33 -
3-2 DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG DER KATALYTISCHEN MUTANTEN.	- 34 -
3-3 RETENTIONSOLUMINA DER GELPERMEATIONSSCHROMATOGRAPHIE.	- 35 -
3-4 ERGEBNISSE DER ESI MASSENSPEKTROMETRIE.	- 36 -
3-5 DIFFERENZ DER MOLMASSEN ZWISCHEN NATIVER ABFA UND SELENO-METHIONIN DERIVAT.	- 36 -
3-6 AUSGEWÄHLTE KRISTALLOGRAPHISCHE PARAMETER DER NATIVEN DATENSÄTZE.	- 40 -
3-7 PACKUNGSDICHTE	- 40 -
3-8 POLARWINKEL DER INTENSIVSTEN PEAKS DER SELBSTROTATIONSFUNKTION	- 42 -
3-9 POLARWINKEL DER INTENSIVSTEN PEAKS DER SELBSTROTATIONSFUNKTION	- 42 -
3-10 DATENSTATISTIKEN DER $P2_1$ SE-MET-MAD EXPERIMENTE (A)	- 45 -
3-11 DATENSTATISTIKEN DER $P2_1$ SE-MET-MAD/SAD EXPERIMENTE (B)	- 46 -
3-12 DATENSTATISTIKEN DER R3 SE-MET-MAD EXPERIMENTE	- 46 -

3-13 FOM-WERTE DER MAD-PHASIERUNG UND DICHEMODIFIKATION.	- 49 -
3-14 FORTSCHRITT DES ABFA HYBRIDMODELLS.	- 50 -
3-15 DIE VERÄNDERUNG DES MOLEKULARGEWICHTS IM VERGLEICH ZUM NATIVEN PROTEIN.	- 54 -
3-16 ITERATIVE VORGEHENSWEISE BEI DER DARSTELLUNG GEEIGNETER DERIVATE.	- 57 -
3-17 QUECKSILBER (10 MM, 120 STD.) UND PLATIN (10MM, 13 STD.)-DERIVATDATENSÄTZE FÜR DIE MIR-PHASIERUNG.	- 58 -
3-18 FOM-WERTE DER MIR PHASIERUNG UND DICHEMODIFIKATION.	- 58 -
3-19 ERGEBNISSE DER KREUZROTATIONS / TRANSLATIONSFUNKTIONEN AUS MOLREP.	- 59 -
3-20 DIE GEMESSENEN SUBSTRAT-ENZYM KOMPLEXE DER E175A MUTANTE.	- 60 -
3-21 MOSAIZITÄT DER E175A KOMPLEX-KRISTALLE IM VERGLEICH	- 62 -
3-22 AUSGEWÄHLTE KRISTALLOGRAPHISCHE PARAMETER DES DATENSATZES DER E294A MUTANTE.	- 63 -
3-23 INHALT / QUALITÄT DES VERFEINERTEN MODELLS AUS DER MAD-PHASIERUNG.	- 65 -
3-24 VERFEINERUNG DER NATIVEN STRUKTUR.	- 67 -
3-25 VERFEINERUNG DER E175A-KOMPLEXE.	- 69 -
3-26 AUSGEWÄHLTE PARAMETER DER VERFEINERUNG DER NATIVEN P_2 STRUKTUR UND DER KATALYTISCHEN MUTANTE E294A.	- 72 -
3-27 KINETISCHE PARAMETER DER ABFA.	- 97 -
3-28 R.M.S.D. – PLOTS DER HAUPTKETTENATOME DER ABFA STRUKTUREN.	- 109 -