

**Röntgenstrukturanalyse des mikrobiellen Enzyms Creatininase  
aus *Pseudomonas putida***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Barbara Beuth  
aus Köln

Köln 2001

Berichterstatter:

Prof. Dr. D. Schomburg

Prof. Dr. R. Sterner

Tag der mündlichen Prüfung: 5. November 2001

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 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. D. Schomburg betreut worden.

Barbara Beuth

1. Referent: Prof. Dr. D. Schomburg

2. Referent: Prof. Dr. R. Sterner

Eingereicht: 13. September 2001



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. D. Schomburg danke ich für das interessante und herausfordernde Thema sowie die guten Rahmenbedingungen am Institut für Biochemie.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern der Firma Roche (früher Boehringer Mannheim) für die Zurverfügungstellung der Creatininase.

Besonders möchte ich Dr. Karsten Niefind für seine Erklärungen und Vorträge zur Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse sowie für seine Hilfe bei allen kristallographischen Problemen danken und Dr. Shivani Chatterjee für die geduldige Einführung in molekularbiologische Arbeitstechniken und die nette Stimmung im Büro.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Jan Abendroth, der stets für Fragen zu Computerprogrammen und Diskussionen zur Verfügung stand und der eine hilfreiche Hand am Synchrotron in Hamburg hatte.

Ich bedanke mich weiterhin bei Daniel Schlieper für viele Tipps und Hinweise rund um Kristallisation, Computer und Protein sowie bei Peter Krämer und Michael Köllemann für die Unterstützung bei Linux-Installationen.

Bedanken möchte ich mich bei Guido Sonsmann, Sabine Lohmer und Lejon Martens für die Aufnahme und Auswertung von Massenspektren sowie bei Sabine Lohmer für die Unterstützung bei zahlreichen Messungen und das immer gute Klima im Labor.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die wunderbare Arbeitsatmosphäre und vor allem bei Andrea Eifert für viele Ermutigungen in Form von Striezel und Kinobesuchen.

Jörg Wechselberg danke ich für seine ständigen Ermunterungen während der Erstellung dieser Arbeit.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorspann</b> .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	I
Aminosäuren .....	IV
Kurzzusammenfassung .....	V
Abstract .....	VI
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Bedeutung der Strukturaufklärung von Proteinen .....	1
1.2. Das Enzym Creatininase (CrnA, EC 3.5.2.10) .....	3
1.3. Mikrobielle Abbauwege von Creatin und Creatinin .....	5
1.4. Klinische Bedeutung der CrnA .....	7
1.5. Das Interesse an der Struktur der CrnA .....	9
1.6. Ziel der Arbeit .....	9
<b>2. Material und Methoden</b> .....	10
2.1. Material .....	10
2.1.1. Ausgangszustand der CrnA (Fa. Roche) .....	10
2.1.2. Mikroorganismen und Plasmide .....	10
2.1.3. Verwendete Geräte und Materialien .....	11
2.2. Präparative und analytische Methoden .....	13
2.2.1. Molekularbiologische Methoden .....	13
2.2.1.1. Anzucht von <i>P. putida var. naraenses</i> (DSM 1991) .....	13
2.2.1.2. Präparation genomischer DNA .....	13
2.2.1.3. Konzentrationsbestimmung von genomischer und Plasmid-DNA ..	14
2.2.1.4. Genomische PCR .....	14
2.2.1.5. Agarosegel .....	15
2.2.1.6. Gelextraktion .....	16
2.2.1.7. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen .....	16
2.2.1.8. Ethanol-/Natriumacetatfällung .....	16
2.2.1.9. Ligation .....	17

2.2.1.10. LB-Medium .....	17
2.2.1.11. Agarplatten .....	17
2.2.1.12. Kompetente Zellen .....	17
2.2.1.13. Transformation .....	18
2.2.1.14. Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Minipräparation) .....	18
2.2.1.15. Restriktionsanalyse .....	19
2.2.1.16. Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Midipräparation) .....	19
2.2.1.17. DNA-Sequenzierung .....	20
2.2.1.18. Expression von nativer CrnA .....	21
2.2.1.19. Expression von Selenomethionin (SM)-CrnA in Minimalmedium	21
2.2.2. Proteinbiochemische Methoden .....	23
2.2.2.1. Chromatographische Methoden .....	23
2.2.2.1.1. Ni-Chelat-Affinitätssäule .....	23
2.2.2.1.2. PD10-Säule .....	24
2.2.2.1.3. Hydrophobe Interaktion .....	24
2.2.2.1.4. Ultrafiltration .....	25
2.2.2.1.5. Gelfiltration .....	25
2.2.2.2. Proteinanalytik .....	25
2.2.2.2.1. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	25
2.2.2.2.2. Proteinbestimmung .....	26
2.2.2.2.3. Aktivitätstest .....	26
2.2.2.2.4. Massenspektrometrie .....	27
2.2.2.2.5. Dynamische Lichtstreuung (DLS) .....	27
2.2.2.2.6. Kalorimetrische Messungen .....	28
2.2.2.2.7. Circular dichroismus (CD)-Messungen .....	28
2.3. Proteinkristallisation und Röntgendiffraktionsmessung .....	30
2.3.1. Kristallisation .....	30
2.3.2. Schwermetallerivatisierung .....	30
2.3.3. Montage von Kristallen für Tieftemperaturmessungen .....	30
2.3.4. Röntgendiffraktionsmessung .....	31



2.4. Theoretische Methoden .....	32
2.4.1. Sequenzvergleich und Sekundärstrukturbestimmung .....	32
2.5. Rechenmethoden .....	32
2.5.1. Verwendete Computersysteme und Programme .....	32
2.5.2. Aufbereitung der Diffraktometerdaten .....	32
2.5.3. Strukturlösung und -verfeinerung .....	33
2.5.3.1. Phasierung .....	33
2.5.3.2. Dichtemodifikation .....	33
2.5.3.3. Modellbau .....	35
2.5.3.4. Verfeinerung .....	36
2.5.4. Validierung der Modelle .....	36
2.5.5. Substratmodellierung .....	37
<b>3. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>38</b>
3.1. BM-CrnA .....	38
3.1.1. Ausgangszustand der BM-CrnA .....	38
3.1.2. Analyse des Proteins durch dynamische Lichtstreuung (DLS) .....	40
3.1.3. Kristallisation .....	42
3.1.4. Schwermetallderivate .....	43
3.1.5. Temperaturstabilität der BM-CrnA .....	44
3.1.6. Sequenzvergleich und multiples Sequenzalignment der BM-CrnA .....	45
3.2. CrnA aus <i>Pseudomonas putida</i> var. <i>naraenses</i> .....	48
3.2.1. Isolierung und Klonierung des CrnA-Gens .....	48
3.2.2. Sequenzierung und Sequenzvergleich .....	51
3.2.3. Expression und Reinigung .....	54
3.3. Selenomethionin-creatininase (SeMet-CrnA) .....	59
3.3.1. Expression .....	59
3.3.2. Massenspektrometrische Analyse und deren Konsequenzen .....	59
3.3.3. Reinigung .....	62
3.3.4. Kristallisation und Diffraktionsmessung .....	64

3.4. Strukturlösung der BM-CrnA .....	65
3.4.1. Nativer Datensatz (Kupferdrehanode) .....	65
3.4.1.1. Selbstrotationsfunktion .....	67
3.4.1.2. Native Pattersonfunktion .....	69
3.4.2. Nativer Datensatz (Synchrotron) .....	71
3.4.3. Derivatdatensatz .....	73
3.4.3.1. Bestimmung von Schweratompositionen .....	74
3.4.3.2. Anfangsphasen und erste Elektronendichte .....	77
3.4.3.3. Dichtemodifikation .....	78
3.4.3.4. Sequenzeinbau .....	82
3.4.3.5. Verfeinerung .....	84
3.4.4. Strukturinterpretation .....	89
3.4.4.1. Qualität der Struktur .....	89
3.4.4.2. Verteilung der Temperaturfaktoren in der Struktur .....	92
3.4.4.3. Globale Faltung des Proteins .....	94
3.4.4.4. Quartärstruktur .....	98
3.4.4.5. Das Doppelzinkzentrum .....	105
3.4.4.6. Das Substrat im aktiven Zentrum - Reaktionsmechanismus .....	108
3.4.4.7. Struktureller Vergleich mit der Familie der zyklischen Amido- hydrolasen sowie weiteren Enzymen mit Bimetallzentrum .....	115
3.4.4.8. Vergleich der $(\beta\alpha)_4$ -Struktur mit dem $(\beta\alpha)_8$ - <i>barrel</i> .....	119
3.4.4.9. Konvergente Evolution - Vergleich mit einer Met-Aminosäure- peptidase .....	122
3.4.4.10. Vergleich struktureller Vorhersagen mit den endgültigen Strukturergebnissen .....	125
3.4.4.11. Position der Pt-Atome im Schwermetallderivat .....	126
3.5. Ausblick .....	127

<b>4. Zusammenfassung</b> .....	128
<b>5. Literaturverzeichnis</b> .....	130
<b>6. Anhang</b> .....	140
I. Abbildungsverzeichnis .....	140
II. Tabellenverzeichnis .....	143
III. Verwendete Internetadressen .....	144



**Abkürzungsverzeichnis**

$a, b, c$	Gitterachsen im direkten Raum
$\alpha, \beta, \gamma$	Winkel zwischen den Gitterachsen
AS	Aminosäure
au	Asymmetrische Einheit der Elementarzelle eines Kristalls oder <i>atomic units</i> in der Massenspektrometrie
B-Faktor	Temperaturfaktor
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BM-CrnA	Creatininase (Boehringer Mannheim)
bzw.	beziehungsweise
CD	Circularer Dichroismus
Cu	Kupfer
CrnA	Creatininase (allgemein und selbstexprimiert)
d	minimaler gemessener Gitterabstand von Röntgenbeugungsdaten ("Auflösung")
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
e	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	enzyme catalogue
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-di-Natriumsalz
ESI	Elektrosprayionisation
Fa.	Firma
$F_C, F_{calc}$	berechnete Strukturfaktoramplituden
$F_O, F_{obs}$	gemessene Strukturfaktoramplituden
FPLC	fast performance liquid chromatography
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
I	Intensität
$\sigma(I)$	Standardabweichung der Intensität

---

IEF	isoelektrische Fokussierung
l	Liter
$\lambda$	Wellenlänge [nm] oder [Å]
m	Meter
M	molar
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption and ionization</i>
MD	Moleküldynamik
min	Minute
MLKF	<i>maximum likelihood function</i>
mol	Teilchenzahl (1 mol = $6.023 \cdot 10^{23}$ Teilchen)
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektrum
$N_A$	Avogadro-Zahl ( $6.023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )
NCS	nichtkristallographische Symmetrie
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
$\varphi, \psi, \kappa$	Winkel im Polarkoordinatensystem
$R_{\text{free}}$	freier R-Wert
$R_{\text{work}}$	R-Wert des Arbeitsdatensatzes
$R_{\text{sym}}$	linearer R-Wert
RMS	Standardabweichung ( <i>root mean square</i> )
RSA	Röntgenstrukturanalyse
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGAP	Aminosäurepeptidase aus <i>Streptomyces griseus</i>
SM	Selenomethionin
SeMet	Selenomethionin

---

SM-CrnA	Creatininase (SeMet-Derivat)
SRF	Selbstrotationsfunktion
TFA	Trifluoressigsäure
$\Theta$	Elliptizität
Tm	Schmelztemperatur
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
UV	ultraviolettes Licht
Vm	Matthews-Koeffizient

**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



## Kurzzusammenfassung

Die Creatininase (CrnA) aus *Pseudomonas putida* ist ein homohexamerer Enzym und besitzt ein Molekulargewicht von 28.4 kDa pro Untereinheit. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse des zyklischen Amids Creatinin zu Creatin unter Ringspaltung und konnte bisher in Bakterien und Archaea nachgewiesen werden. CrnA hat biomedizinische Bedeutung bei der Quantifizierung von Creatinin, das in der medizinischen Analytik einen Indikator für Nierenfunktionsstörungen darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wird die Klonierung des Creatininasegens aus *P. putida var. naraenses* in *E. coli* sowie die Expression, Reinigung und Kristallisation des Proteins und des SeMet-Derivats (SeMet-CrnA) ebenso beschrieben wie die Kristallisation und Bestimmung der 3D-Struktur der von der Firma Roche (früher Boehringer Mannheim) hergestellten Creatininase (BM-CrnA).

CrnA und SeMet-CrnA wurden in dem *E. coli*-Stamm M15 exprimiert. Nach der Expression der CrnA sowie SeMet-CrnA zeigte sich im SDS-Gel eine zweite starke Bande, die während der Proteinreinigung nicht abgetrennt werden konnte. Die Kristallisation des SeMet-Proteins führte nicht zu für die Röntgenstrukturanalyse geeigneten Kristallen.

Die BM-CrnA kristallisierte in der Raumgruppe  $P2_1$  mit den Gitterkonstanten  $a = 74.4 \text{ \AA}$ ,  $b = 94.1 \text{ \AA}$ ,  $c = 115.2 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 104.3^\circ$ . Die Kristalle wurden röntgendiffraktometrisch charakterisiert. Die Auflösungsgrenze der Diffraktionsdaten lag bei  $2.1 \text{ \AA}$ . Da keine homologen Strukturen in der Strukturdatenbank biologischer Makromoleküle (PDB) gefunden wurden, wurde die Phasierung nach der MAD-Methode durchgeführt. Aus MAD-Daten eines Platinderivats der BM-CrnA konnten erste grobe Anfangsphasen bestimmt werden, die mit Hilfe von Mittelung durch nichtkristallographische Symmetrie stark verbessert werden konnten. Nachdem ein Strukturmodell erstellt worden war, führte die Verfeinerung der Daten zu einem  $R_{\text{work}}$  von knapp 21 %.

Das aktive Zentrum der CrnA enthält zwei Zinkatome, die von einem Aspartatrest überbrückt werden. Die Faltung des Enzyms besteht aus einem zentralen viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt, das von vier Helices umgeben ist. Damit unterscheidet sich die CrnA von der Familie der zyklischen Amidohydrolasen, die typischerweise eine  $(\beta/\alpha)_8$ -Fasstruktur aufweisen.

## Abstract

Creatininase (CrnA) from *Pseudomonas putida* is a homohexameric protein with a molecular weight of 28.4 kDa per subunit. The enzyme catalyzes the cleavage of the cyclic amid bond of creatinine to creatine. So far CrnA has been found in Bacteria and Archaea. CrnA is biomedically relevant because it can serve to create biosensors for the determination of creatinine. The concentration of creatinine in blood, serum and urine gives valuable information about renal function.

In this thesis the cloning, expression, purification and crystallization of CrnA from *P. putida* var. *naraenses* is described and furthermore the crystallization and structural analysis of CrnA (BM-CrnA) from *P. putida* which was produced by Roche (former Boehringer Mannheim).

CrnA and SeMet-CrnA were both expressed in *E. coli* strain M15. After expression of CrnA and SeMet-CrnA one strong band was found beneath the CrnA-band in an SDS-gel which could not be removed during purification. Crystallization of SeMet-CrnA did not succeed in crystals suitable for x-ray-measurements.

Crystals of BM-CrnA belong to space group  $P2_1$  with cell dimensions  $a = 74.4 \text{ \AA}$ ,  $b = 94.1 \text{ \AA}$ ,  $c = 115.2 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 104.3^\circ$ . They were analyzed by an x-ray diffraction experiment and showed diffraction to 2.1  $\text{\AA}$  resolution.

As there were no homologous structures in the protein data bank (PDB), phasing was performed by MAD methods. MAD data of a platinum derivative of BM-CrnA were used to derive phases. The phases could strongly be improved by non-crystallographic symmetry averaging so that the electron density map could be interpreted and a molecular model could be built. Refinement ended up with an  $R_{\text{work}}$  of 21 %.

The active site of the enzyme contains a binuclear zinc-centre bridged by an aspartate side chain. The fold of the CrnA monomer consists of a four stranded parallel  $\beta$ -sheet which is surrounded by four  $\alpha$ -helices. By this it differs from the family of cyclic amidohydrolases which typically possess a  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel fold.





## 1. Einleitung

### 1.1. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Bedeutung der Strukturaufklärung von Proteinen

Die dreidimensionale Struktur von Proteinen kann Aufschluss über ihre Faltung, die Bindung von Cofaktoren und Substraten/Inhibitoren sowie über den Kontakt zwischen ihren Untereinheiten bzw. zwischen Ligand und Rezeptor in Ligand-Rezeptor-Komplexen geben. Daraus lassen sich Schlüsse über die Funktionsweise des Proteins, den Aufbau des katalytischen Zentrums und die Substratbindung sowie das funktionelle Wechselspiel verschiedener Domänen bzw. Untereinheiten ziehen.

Das wissenschaftliche Interesse an Strukturen bezog und bezieht sich auf das biochemische Verständnis von Proteineigenschaften und Katalysemechanismen sowie Proteininteraktionen. Durch das exponentielle Anwachsen an Strukturinformation, die in der Proteindatenbank PDB (Abb. 1, Berman et al., 2000) verfügbar ist, wachsen heute und künftig die Möglichkeiten, diese Informationen für die Entwicklung von theoretischen Methoden zur Vorhersage von Sekundärstrukturen und Funktionalitäten, zur Bestimmung von Protein-Ligand-Kontaktstellen sowie zur Vorhersage bestimmter Proteineigenschaften wie Thermostabilität zu nutzen.

Auch die Genauigkeit bei der Untersuchung von evolutiver Verwandtschaft auf der Grundlage von Faltungsfamilien wächst mit zunehmender Anzahl an bekannten Strukturen.

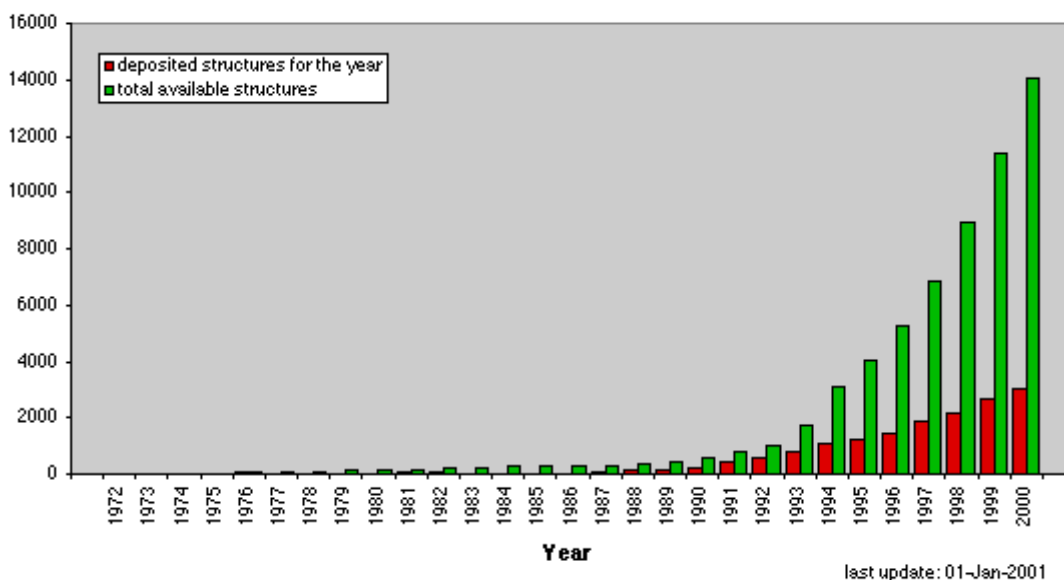


Abb. 1: Wachstum der Proteindatenbank (Abbildung aus: <http://pdb.ccdc.cam.ac.uk/pdb/holdings.html>)

Das Verständnis von Funktionsmechanismen und Bindungseigenschaften eines Proteins ist eine Grundlage für die gezielte Entwicklung von pharmazeutischen Wirkstoffen, die Proteinwirkungen modifizieren oder Interaktionen mit Proteinen beeinflussen.

Nach der Entschlüsselung des humanen Genoms ist es nun in umfassendem Maß möglich, medizinisch relevante, krankheitsassoziierte Gene aufzufinden und die Strukturen dieser Genprodukte aufzuklären. Weiterhin ist die Bestimmung möglichst vieler Protein-Ligand-Strukturen und damit das Verständnis von Reaktionsmechanismus und Bindung ein wesentlicher Schritt bei der Optimierung von Leitstrukturen (rationales Design).

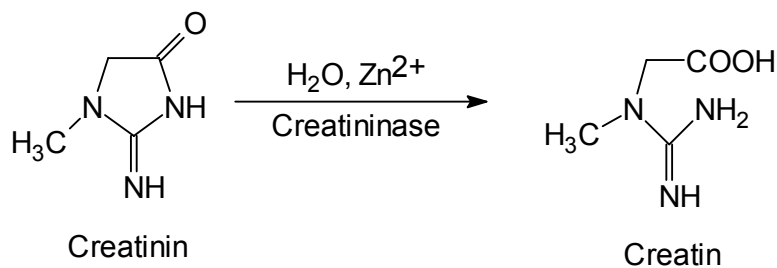
Die Entwicklung von Hochdurchsatztechniken in den Bereichen Klonierung, Expression, Proteinreinigung, Kristallisation, Röntgendatensammlung sowie Auswertung von Röntgendaten scheint die Röntgenstrukturanalyse zu einem wirtschaftlichen Arbeitsschritt beim rationalen Design von pharmakologisch wirksamen Substanzen zu machen.

Ein weiterer wirtschaftlich relevanter Aspekt der Proteinkristallographie ist die Nutzung von Enzymen als Biokatalysatoren für chemische Synthesen insbesondere bei der Herstellung von enantiomerenreinen Verbindungen, die häufig nur schwer auf klassisch organisch-synthetischem Weg hergestellt werden können. Auch hier ist die genaue strukturelle Kenntnis des aktiven Zentrums und des Funktionsmechanismus des Enzyms hilfreich, um durch gezielte Mutationen die Substratspezifität eines Enzyms zu erhöhen oder das Substratspektrum auf bestimmte Zielsubstanzen zu erweitern.

## 1.2. Das Enzym Creatininase (CrnA, EC 3.5.2.10)

Die Creatininamidohydrolase (Creatininase, CrnA) wurde bisher in verschiedenen Arten von Bakterien der Gattung *Alcaligenes* (Inouye et al., 1986), *Arthrobacter* (Kaplan und Naugler, 1974), *Flavobacterium* (Akamatsu und Kanai, 1951) und *Pseudomonas* (Rikitake et al., 1979, Yamamoto et al., 1995) nachgewiesen (Wyss et al., 2000). Nach multiplen Sequenzvergleichen (s. 3.1.6) wird außerdem vermutet, dass die CrnA in Archaea vorkommt. CrnA-induzierbare Bakterien sind in der Lage, Creatinin als Stickstoff- und/oder Kohlenstoffquelle zu nutzen.

CrnA katalysiert die hydrolytische Spaltung des zyklischen Amids Creatinin zu Creatin unter Ringöffnung:



Bereits 1936 waren von Miller und Dubos (Miller und Dubos, 1936, 1937) einzelne Stämme von Bodenbakterien beschrieben worden, die auf creatininhaltigem Medium wuchsen und dieses verstoffwechselten. Sie nutzten einen solchen Zellextrakt erstmals, um quantitativ Creatinin in Blut und Urin zu bestimmen (s. 1.4).

Akamatsu und Miyashita vermuteten 1951 (Kaplan und Naugler, 1973), dass ein Enzym innerhalb ihres Zellextrakts die reversible Umwandlung von Creatinin zu Creatin katalysiert und nannten es deshalb Creatinomutase. Sie stellten außerdem fest, dass dieses Enzym unter Hitze- einwirkung (55 °C, 30 min) stabil blieb.

1973 gelang es dann Kaplan und Naugler (Kaplan und Naugler, 1973), ausgehend von einem zellfreien Extrakt aus *Arthrobacter ureafaciens*, die Existenz dieses Enzyms zu beweisen und es von dem creatinkatabolisierenden Enzym zu trennen. Sie konnten den Stoffwechselweg in die reversible Umwandlung von Creatinin zu Creatin sowie den weiteren Abbau zu Sarcosin und Harnstoff unterteilen. Auch sie bestätigten die Hitzestabilität der Creatininase.

Rikitake et al. zeigten 1979 (Rikitake et al., 1979) dass es sich bei der Creatininase um ein Zink-Metalloprotein handelt; Aktivitätsuntersuchungen dieser Arbeitsgruppe wiesen auch die zweiwertigen Kationen  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$  als aktivitätssteigernd aus, teilweise mit Aktivitäten über 100 % im Vergleich zu Zink. Sie bestimmten den pH-Bereich zwischen 7 und 9 als pH-Optimum des Proteins sowie den isoelektrischen Punkt bei 4.7.

1995 klonierten Yamamoto et al. (Yamamoto et al., 1995) das Creatininasegen aus *Pseudomonas* sp. PS-7 in *E. coli* und bestimmten die Nucleotidsequenz. Das Protein ist aus 259 Aminosäuren zusammengesetzt und besitzt ein Molekulargewicht von 28437 Da.

Das in dieser Arbeit für die Strukturaufklärung verwendete Protein stammt von der Firma Roche (früher Boehringer Mannheim), deren Mitarbeiter das Creatininasegen ebenfalls in *E. coli* kloniert und anschließend sequenziert haben. Das Ergebnis (persönliche Mitteilung) unterscheidet sich von dem der Arbeitsgruppe um Yamamoto in der Proteinsequenz in 8 Aminosäuren, was 97 % Sequenzidentität entspricht. Die Boehringer-Creatininase (BM-CrnA) besitzt ein Molekulargewicht von 28399 Da (Abb. 2).

```
1   MSKSVFVGEL TWKEYEARVA AGDCVLMMLPV GALEQHGHHM CMNVDVLLPT
51  AVCQ RVAERI GALVLPGLQY GYKSQQKSGG GNHFPGTTSL DGATLTGTVQ
101 DIIRELARHG VRRVLVLMNGH YENSMFIVEG IDLALRELRY AGIHDFKVVV
151 LSYWDFVKDP AVIQRLYPEG FLGWDIEHGG VFETSLMLAL YPDLVDLERV
201 VDHPPATFPP YDVFPVDPAR TPAPGTLSSA KTASREKGEL ILEVCVQGIA
251 DAIGQEFPPPT
```

Abb.2: Aminosäuresequenz der BM-CrnA

Im Rahmen der Diplomarbeit (Beuth, 1997) hatten chromatographische Untersuchungen an einer Gelfiltrationssäule ein Molekulargewicht für die CrnA von etwa 170000 Da ergeben. Danach sollte es sich bei dem Enzym um ein Homohexamer handeln. Lichtstreuexperimente (s. 3.1.2) sowie kristallographische Selbstrotationsrechnungen (s. 3.4.1.1) und letztendlich die Röntgenstruktur bestätigten dieses Ergebnis. Rikitake et al. (Rikitake et al., 1979) gingen in ihrer Arbeit von einem Molekulargewicht von 175000 Da, bestimmt durch Ultrazentrifugation, aus.

Da Sequenzvergleiche mit Einträgen aus Protein- sowie Gendatenbanken (EMBL, SWISS-PROT) keine signifikanten Homologien (< 30 %) mit anderen Amidohydrolasen oder sonstigen Proteinen aufzeigten, wurde vermutet, dass die CrnA eine von den bekannten Amidohydrolasen abweichende Struktur aufweist, was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte.



### 1.3. Mikrobielle Abbauege von Creatin und Creatinin

Bislang konnten in verschiedenen bakteriellen Gattungen und Arten unterschiedliche Abbauege ausgehend von Creatinin beobachtet werden, die teilweise parallel ablaufen und teilweise für eine Art oder Gattung spezifisch sind (Abb. 3).

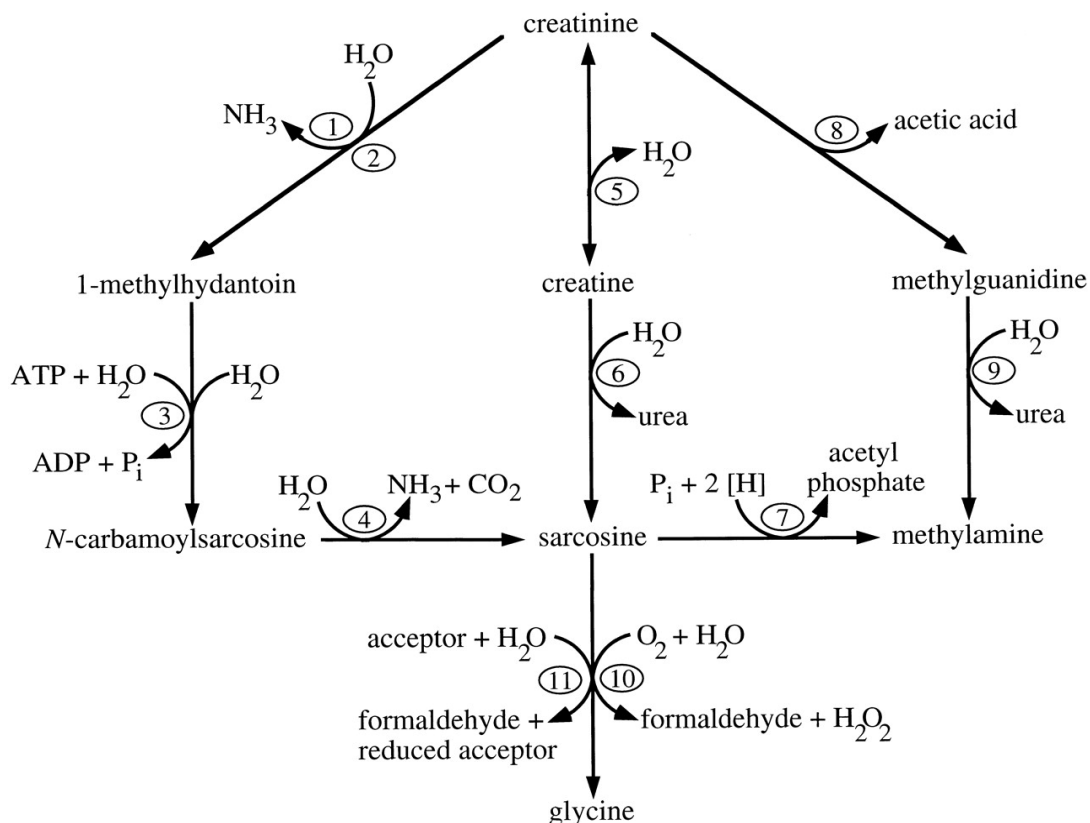


Abb. 3: Schematische Darstellung der mikrobiellen Abbauege von Creatinin und Creatin sowie der beteiligten Enzyme (die Graphik stammt aus: <http://physrev.physiology.org/cgi/content/full/80/3/1107#F7>, Wyss und Kaddurah-Daouk, 2000); die entsprechenden Enzyme sind nummeriert dargestellt: 1) Creatinindeaminase (EC 3.5.4.21), 2) Cytosindeaminase (EC 3.5.4.1), 3) N-Methylhydantoinamidohydrolase (ATP-abhängig, EC 3.5.2.14), 4) N-Carbamoylsarcosinamidohydrolase (EC 3.5.1.59), 5) Creatininamidohydrolase (EC 3.5.2.10), 6) Creatinamidohydrolase (EC 3.5.3.3), 7) Sarcosinreduktase (1.4.4.-), 8) noch nicht charakterisiert, 9) Methylguanidinamidohydrolase (EC 3.5.3.16), 10) Sarcosinoxidase (EC 1.5.3.1), 11) Sarcosindehydrogenase (EC 1.5.99.1)

In den Organismen, in denen CrnA-Aktivität nachgewiesen werden konnte, verläuft die Umwandlung von Creatinin zu Creatin weiter zu Sarcosin und Harnstoff in einer zweiten hydrolytischen Reaktion. Dieser Reaktionsschritt wird von der Creatinase (Enzym 6 in Abbildung 3) katalysiert. Im folgenden Schritt wird Sarcosin von der Sarcosinoxidase (Enzym 10 in Ab-

bildung 3) zu Glycin demethyliert.

In einigen Stämmen von *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Moraxella*, *Micrococcus*, und *Arthrobacter* sowie in anaeroben *Clostridium*- und *Tissierella*-Stämmen wird Creatinin von der Creatinindeaminase (Enzym 1 in Abbildung 3) zu N-Methylhydantoin umgesetzt, welches von der N-Methylamidohydrolase (Enzym 3 in Abbildung 3) unter ATP-Verbrauch weiter zu N-Carbamoylsarcosin verstoffwechselt wird. Dieses wird von der N-Carbamoylsarcosinamidohydrolase (Enzym 4 in Abbildung 3) zu Sarcosin hydrolysiert, welches wie oben beschrieben weiter umgesetzt wird.

Ein bisher nur von van Eyk et al. (van Eyk et al., 1968) beschriebener, in *Pseudomonas stutzeri* ablaufender Stoffwechselweg führt von Creatinin zu Methylguanidin und Essigsäure (Reaktion 8 in Abbildung 3). Die von der Methylguanidinamidohydrolase katalysierte Hydrolyse von Methylguanidin zu Methylamin (Reaktion 9 in Abbildung 3) wurde 1980 von Nakajima et al. (Nakajima et al., 1980) in *Alcaligenes sp.* beschrieben.

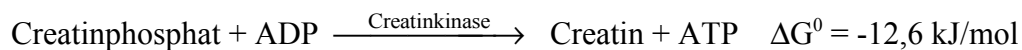
Innerhalb der Pseudomonaden und vermutlich einiger weiterer Bakterien werden die beschriebenen Creatinin-Abbauwege über Creatin sowie N-Methylhydantoin als Zwischenstufen nebeneinander beobachtet. Wie die Regulation zwischen diesen beiden Stoffwechselwegen abläuft, ist ebenso unklar wie die Bedeutung dieser beiden alternativen Wege. Von Kim et al. wurde 1987 (Kim et al., 1987) die Umsetzung von Creatinin durch die Cytosindeaminase zu N-Methylhydantoin innerhalb einiger Mikroorganismen beschrieben, so dass gefragt werden kann, ob - zumindest in einigen Mikroorganismen - Creatinindeaminase und Cytosindeaminase identisch sind und ob somit tatsächlich zwei parallele Stoffwechselwege ausgehend von Creatinin vorliegen oder ob die Umsetzung zu N-Methylhydantoin nur einen Nebenweg darstellt.

Die Strukturen aller beteiligten Enzyme und systematische multiple Sequenzvergleiche sowie Kenntnisse über die Quantität der einzelnen Metaboliten innerhalb der Organismen sind nötig, um diese Fragen endgültig zu beantworten.

#### 1.4. Klinische Bedeutung der CrnA

Bei Vertebraten stellt Creatinin ein Endprodukt des Stoffwechsels dar, welches in den Nieren glomerulär filtriert und mit dem Urin ausgeschieden wird.

Die direkten Vorstufen von Creatinin im Stoffwechsel sind Creatin und Creatinphosphat, welche nichtenzymatisch durch Ringschluss zu Creatinin unter Abspaltung von Wasser bzw. Phosphat reagieren können. Creatin wird in zwei Stufen ausgehend von L-Arginin und Glycin gebildet. Den ersten Schritt bildet die Übertragung einer Amidinogruppe von L-Arginin auf Glycin unter Bildung von L-Ornithin und Guanidinoessigsäure. Diese Reaktion verläuft überwiegend in den Nieren und wird von dem Enzym L-Arginin-Glycin-Amidino-transferase katalysiert. Guanidinoessigsäure wird mit dem Blut weitertransportiert und anschließend in der Leber in Anwesenheit von S-Adenosylmethionin unter Bildung von Creatin methyliert. Die S-Adenosylmethioninmethyltransferase katalysiert diesen Reaktionsschritt. Von der Leber aus wird Creatin mit dem Blut in besonderem Umfang in Muskelzellen verteilt (Wyss et al., 2000, Spencer, 1986). Dort wird es unter ATP-Verbrauch in Creatinphosphat umgewandelt, welches als energiereiches Phosphat die Aufrechterhaltung einer möglichst konstanten ATP-Konzentration bei Arbeit gewährleistet, indem sein Phosphatrest durch die Creatinkinase auf ADP übertragen wird:



Da die Bildung von Creatinin konstant und der Muskelmasse proportional ist, weist eine erhöhte Creatininkonzentration im Serum auf Nierenfunktionsstörungen hin.

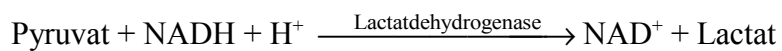
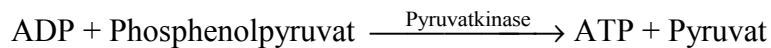
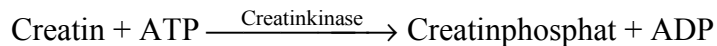
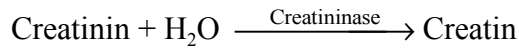
Die Bedeutung dieses Zusammenhangs für die medizinische Diagnostik wurde schon früh erkannt und bereits 1936 nutzten Dubos und Miller (Dubos und Miller, 1936) einen bakteriellen Zellaufschluss für die enzymatische Konzentrationsbestimmung von Creatinin. Sie bestimmten die Creatininkonzentration aus der Differenz zweier Serumproben, von denen eine mit dem Zellaufschluss behandelt worden war. Als Indikator für Creatinin diente die alkalische Reaktion mit Pikrinsäure (Jaffé, 1886, s. 2.2.2.2.3).

Als nichtenzymatische Creatinin-Indikatorreaktion wird in der klinischen Analytik bis heute die Jaffé-Reaktion eingesetzt, die billig und einfach in der Durchführung ist. Allerdings ist die Reaktion recht unspezifisch und deshalb ungenau, was über die Jahre von vielen Autoren detailliert beschrieben wurde (Kemperman et al., 2000, Watkins, 1967, Spencer, 1986).

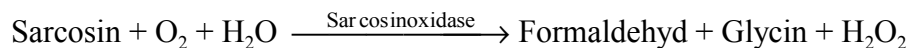
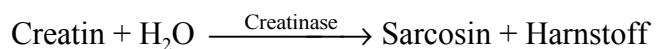
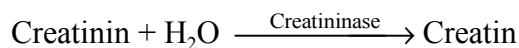
Ausgehend von der CrnA-Reaktion wurden unterschiedliche gekoppelte enzymatische Tests für die Creatininbestimmung beschrieben, die sich jedoch aufgrund ihrer hohen Kosten, hohem experimentellen Aufwand sowie mäßiger Präzision nicht vollständig gegenüber der Jaffé-

Reaktion durchgesetzt haben.

1972 beschrieben Wahlefeld et al. (Wahlefeld et al., 1972) einen kompletten enzymatischen Test zur Creatininbestimmung, dessen Verlauf photometrisch über die Extinktionsabnahme bei 340 nm aufgrund der Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> verfolgt werden kann:



In einer weiteren enzymatischen Reaktionsfolge werden Farbreaktionen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Indikator zur Creatininbestimmung genutzt (Suzuki, 1994) sowie Biosensoren, welche elektrochemisch O<sub>2</sub> (Nguyen et al., 1991, Rowe et al., 2001) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tsuchida et al., 1983) detektieren:



Bei den oben erwähnten Biosensoren sind alle beteiligten Enzyme an einer Matrix immobilisiert, was zu einer einfacheren Durchführung des Tests führt sowie geringere Kosten zur Folge hat. Auch die von Madaras und Buck (Madaras und Buck, 1996) beschriebenen miniaturisierten Biosensoren, die ebenfalls auf den letztgenannten Enzymreaktionen basieren und bei denen alle beteiligten Enzyme über Glutardialdehyd vernetzt und an eine feste Matrix gekoppelt sind, sind sicherlich zukunftsweisend.

### 1.5. Das Interesse an der Struktur der CrnA

Es bestand zum einen ein wissenschaftliches Interesse an der Struktur der CrnA, da aufgrund von Sequenzvergleichen vermutet wurde, dass sich die Struktur des Enzyms von allen bekannten Amidohydrolasestrukturen sowie den Strukturen sonstiger Proteine unterscheidet, was in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. In der Arbeit wurden die interessierenden Unterschiede zu den bekannten Amidohydrolasen, der Aufbau der Metallionenbindungsstelle sowie die Faltung des Proteins im Vergleich zu bekannten Faltungstypen betrachtet. Auf diesen Grundlagen wurde nach möglichen Verwandtschaften gesucht.

Zum anderen besitzt die CrnA vom wirtschaftlichen Standpunkt aus betrachtet seit Jahrzehnten große Bedeutung in der klinischen Analytik (s. 1.4). Eine Optimierung des aktiven Zentrums der CrnA durch gezielte Mutagenese könnte die Auflösung der beschriebenen enzymatischen Tests verbessern. Für die Biosensoren nach Madaras (Madaras, 1996) wäre z. B. eine höhere Bindungskonstante der CrnA bezogen auf Creatinin wünschenswert.

Des Weiteren sind das breite pH-Optimum und die Hitzestabilität der CrnA für biotechnologische Anwendungen interessant. Durch gezielte Mutagenese könnte man versuchen, das aktive Zentrum des Enzyms an unterschiedliche Substrate anzupassen.

### 1.6. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Bestimmung der dreidimensionalen Struktur der CrnA auf der Grundlage von röntgenographischen Methoden.

Den Ausgangspunkt der Arbeit bildete die BM-CrnA der Firma Roche, die bereits während der Diplomarbeit (Beuth, 1997) für Kristallisationsexperimente zur Verfügung stand. Aus dieser Zeit stammten zwei unterschiedliche Kristallisationsbedingungen, die jedoch schwer reproduzierbar waren und bis zum Beginn dieser Arbeit zu nicht auswertbaren Datensätzen geführt hatten. Aus diesem Grund stand die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen am Anfang der Arbeit.

Im Verlauf der Arbeit entwickelte sich mit der selbst durchgeführten Klonierung eines CrnA-Gens aus *Pseudomonas putida* var. *naraenses* in *E. coli* ein weiteres Forschungsfeld mit dem Ziel der Expression, Reinigung und Kristallisation von nativer und Selenomethionin-CrnA.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Ausgangszustand der Creatininase (Fa. Roche)

Das Enzym Creatininase (CrnA) wurde uns von der Firma Roche (vorher Boehringer Mannheim) zur Verfügung gestellt. Zur Unterscheidung des im Haus exprimierten Enzyms wurde in dieser Arbeit die Abkürzung BM-CrnA verwendet. Das Enzym lag in lyophilisierter Form in einer Gesamtmenge von etwa 5 g vor.

#### 2.1.2. Mikroorganismen und Plasmide

Mikroorganismen:

*P. putida* var. *naraenses* (DSM 1991)

DSM

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

*E. coli* XLIBLue

Fa. Stratagene, La Jolla, California

Genotyp:

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F<sup>c</sup> *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)]

*E. coli* M15 (pREP4)

Fa. Qiagen, Hilden

Genotyp:

*nal<sup>S</sup> str<sup>S</sup> rif<sup>S</sup> lac<sup>c</sup> ara<sup>c</sup> gal<sup>-</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>+</sup> recA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup> lon<sup>+</sup>*

Plasmide:

pQE70

Fa. Qiagen, Hilden

Lac/T5-Promotor, β-Lactamase-Gen

pQE70\_Cr

PQE70-Derivat, Gen der CrnA inseriert in die SphI- und BamHI-site von pQE70

pREP4

Fa. Qiagen, Hilden

Lac-Repressorgen, Kanamycin-Resistenzgen

## 2.1.3. Verwendete Geräte und Materialien

Gerät	Hersteller
ABIPrism DNA-Sequenzierer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Äkta Explorer	Amersham Pharmacia, Freiburg
CD-Spektropolarimeter J-715	Jasco Germany, Gross Umstadt
Cryostream Cooler	Oxford Cryosystems, Oxford, England
Differential Scanning Calorimeter	MicroCal, Northhampton MA, USA
Drehanoden (Cu): FR 591	Nonius, Delft, Niederlande
Rotaflex RU-200 B	Rigaku, Düsseldorf
DynaPro-801 (Dynamische Lichtstreuung)	Protein Solutions, Charlottesville VA, USA
ESI-MS LCQ (T)	Finnigan MAT, Bremen
Flächenzähler:	
DIP-2030H	MAC Science, Yokohama, Japan
MAR 345	MAR Research, Hamburg
FPLC-System	Amersham Pharmacia, Freiburg
MALDI-MS Biflex III (TOF)	Bruker, Bremen
Mikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Monochromatoren:	
MAC-XOS Doppelspiegel	MAC Science, Yokohama, Japan
CMF12-38Cu6 Doublemirror	Osmic, Northwood MI, USA
PCR Mastercycler 5330	Eppendorf, Hamburg
PCR Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Phast Elektrophoresesystem	Amersham Pharmacia, Freiburg
Pipettierautomat Multiprobe 104	Packard, Meriden CT, USA
Reinstwasseranlage	Seralpur
Speed Vac concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Spektralphotometer Ultrospec 2000	Amersham Pharmacia, Freiburg
Spiegelreflexkamera EOS 500N	Canon, Tokyo, Japan
Waagen:	
Analysenwaage FA-210-4	Faust, Köln
Laborwaage SBA 52	Scaltec, Heiligenstadt
Zentrifugen:	
RC 3B Plus und RC 5B Plus	Sorvall, Newtown CT, USA
5417 C und 5810 R	Eppendorf, Hamburg

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Bradford-Kit	BioRad, München
Celluloseacetatfilter 0.2 µm	Satorius, Göttingen
Celluloseacetatfilter 0.02 µm	Whatman, Maidstone, England
Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
Cryoloops	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
sonstige Cryowerkzeuge	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
Goniometerköpfe	Stoe, Darmstadt
Linbro-Schalen	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA oder ICN, Eschwege
Markröhrchen (0.1-1 mm Durchmesser)	Hilgenfeld, Malsfeld
MonoQ HR5/5 und 10/10 (Anionenaustausch)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Nucleotrap Gelextraktionskit	Macherey und Nagel, Düren
Nucleotrapkit für Midipräparationen	Macherey und Nagel, Düren
PD10-Säulchen	Amersham Pharmacia, Freiburg
PhastGel Gradient 8-25 %	Amersham Pharmacia, Freiburg
PhastGel IEF pH 2.5-6	Amersham Pharmacia, Freiburg
PhastGel IEF pH 3-9	Amersham Pharmacia, Freiburg
Phenyl Superose HR 5/5 (hydrophobe Interaktion)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Superdex 200 HR10/30 (Gelfiltration)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ultrafiltration: Centricon-10 und -30	Millipore, Eschborn



## 2.2. Präparative und analytische Methoden

### 2.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Anzucht von *P. putida* var. *naraenses* (DSM 1991)

Die lyophilisiert gelieferten *P. putida* Zellen wurden mit 1 ml Medium (7.5 g Pepton, 4.5 g Fleischextrakt, 1500 ml Wasser, pH 7.0 mit 2 N NaOH einstellen, 15 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) versetzt und 30 min quellen gelassen. Anschließend wurde die Suspension vorsichtig geschüttelt.

500 ml Medium (s. o.) wurden mit 800  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension inokuliert und über Nacht im Schüttler bei RT und 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien in einen Zentrifugenbecher überführt und unter Kühlung (4°C) 25 min bei 4500 rpm in der Sorvall-Zentrifuge RC 3B pelletiert. Die Zellen wurden bei -70°C gelagert.

#### 2.2.1.2. Präparation genomischer DNA

Eine Spatelspitze Bakterienpellet (*P. putida*-Zellen) wurde mit 500  $\mu\text{l}$  STE-Puffer (0.4 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA) gewaschen und anschließend bei 13000 rpm 2 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500  $\mu\text{l}$  GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA) resuspendiert, mit 10  $\mu\text{l}$  10 mg/ml Lysozym versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Suspension mit 50  $\mu\text{l}$  10 % SDS, 5  $\mu\text{l}$  10 mg/ml RNase und 10  $\mu\text{l}$  20 mg/ml ProteinaseK versetzt und nochmals 30 min bei 37°C inkubiert.

Das Zelllysate wurde mit dem gleichen Volumen mit TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA) gesättigtem Phenol ausgeschüttelt und 3 min bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die phenolische Phase wurde verworfen. Der Überstand wurde weitere drei Male mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) ausgeschüttelt, 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die organische Phase jeweils verworfen. Zuletzt wurde einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und wieder zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase wurde nun die DNA durch Zugabe von 0.7 Volumenanteilen 100 % Isopropanol gefällt und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 70 % Ethanol gewaschen und in 50  $\mu\text{l}$  TE-Puffer resuspendiert. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.3. Konzentrationsbestimmung von genomischer und Plasmid-DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte über die photometrische Messung der Absorption ihrer Basen bei 260 nm. Dabei entspricht eine Absorption ( $E_{260}$ ) von eins einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}$  DNA pro 1 ml Lösung.

$$C_{\text{DNA}} = E_{260} \cdot 50 \mu\text{g/ml} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Hieraus kann die molare Konzentration der DNA ( $C_{\text{DNA, molar}}$ ) in Lösung abgeschätzt werden. Man nimmt für das Molekulargewicht einer Base den durchschnittlichen Wert 330 g/mol und geht davon aus, dass das *E. coli*-Genom aus 10 Millionen Basen zusammengesetzt ist. Daraus ergibt sich ein Molekulargewicht des *E. coli*-Genoms ( $M_{\text{Genom}}$ ) von  $3.3 \cdot 10^9$  g/mol.

$$C_{\text{DNA, molar}} = C_{\text{DNA}} / M_{\text{Genom}}$$

Berücksichtigt man die Avogadrosche Zahl ( $N_A = 6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ), kann nun die Anzahl der DNA Moleküle ( $n_{\text{DNA}}$ ) in der Lösung berechnet werden.

$$n_{\text{DNA}} = C_{\text{DNA, molar}} \cdot N_A$$

Die Reinheit der DNA wurde aus dem Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  bestimmt. Ein Quotient zwischen 1.8 und 2.0 spricht für saubere DNA, die nicht mit Protein oder RNA kontaminiert ist.

### 2.2.1.4. Genomische PCR

Die *primer* zum „Fischen“ des CrnA Gens aus dem *P. putida*-Genom wurden auf der Grundlage des von Yamamoto et al. (1995) veröffentlichten CrnA-Gens konzipiert. Sie sollten zusätzlich die Endonukleaseschnittstellen SphI und BamHI enthalten, die das CrnA-Gen flankieren sollten, um einen späteren Einbau in das Plasmid pQE70 (Fa. Qiagen) zu ermöglichen.

Die folgenden Primer wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt (synthetisiert von Fa. MWG-Biotech):

Primer 1 (enthält die SphI Schnittstelle sowie das Startcodon ATG):

5'-TATTTGCATGCGCAAGAGTGT'TTTTGTAGG-3'

Primer 2 (enthält die **BamHI** Schnittstelle sowie die komplementäre Sequenz zum Stopcodon TGA):

AGT

5'-AATGGATCCTCAGGTGGGCGGGAAC-3'

Die PCR-Reaktion fand in dünnwandigen Reaktionsgefäßen in einem Volumen von 50 µl statt. Es liefen 6 Reaktionen parallel ab, in denen die *annealing*-Temperatur in dem gewählten Temperaturbereich von 64.5 +/- 7°C (abhängig von der Schmelztemperatur der Primer) variiert wurde. Für die Reaktion wurden 1 µl genomische DNA (enthält ca.  $7.5 \cdot 10^8$  Genkopien), je 1 µl der *primer* 1 und 2 (100 pmol/µl in H<sub>2</sub>O), 3 µl dNTP-Mix (10 mM je dNTP) sowie 10 µl Taq Polymerase-Puffer zusammengegeben und mit sterilem Wasser auf 100 µl aufgefüllt.

Protokoll der PCR-Reaktion (Gradienten-PCR am Mastercycler gradient, Fa. Eppendorf):

1. Heißstart            5 min 95°C

Enzymzugabe (2.5 µl Taq Polymerase, Fa. SIGMA)

2. Denaturierung    1 min 95°C

3. Annealing        30 s 64.5 +/- 7 °C

4. Synthese         50 s 72°C

Die Schritte zwei bis vier wurden dreißigmal wiederholt.

5.                     1 min 72°C

Im Anschluss an die Reaktion wurden die Proben bei 4°C gelagert.

#### 2.2.1.5. Agarosegel

Sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke wurden 1 %ige Agarosegele angefertigt. Die Agarose wurde in 1 x TAE Puffer (40 mM Tris/Acetat, pH 8.0, 1 mM EDTA) durch Aufkochen in einem Mikrowellenherd gelöst. Beim Erkalten wurde 1 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) pro 10 ml Lösung zugegeben, bevor die noch warme zähflüssige Agaroselösung in einen Gelträger (Fa. E. C. Apparatus Corporation) gegossen wurde. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen 10 x Gelladepuffer (50 % Glycerin, 0.4 % Bromphenolblau, 0.4 % Xylen Cyanol FF) vermischt, vorsichtig in die Probetaschen des Gels eingefüllt und in einer mit 1 x TAE gefüllten Elektrophoresekammer bei 80 mV 1-1.5 h aufgetrennt. Nach dem Lauf wurden die Gele unter UV-Licht betrachtet und zur Dokumentation fotografiert. Als Größenstandards wurden der 100 bp-Marker, der 1 kb-Marker sowie der λBstEIIDigest der Firma NEB verwendet.

### 2.2.1.6. Gelextraktion

Die unter UV-Durchleuchtung sichtbaren DNA-Banden wurden mit einem Skalpell möglichst exakt aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Die weitere Extraktion und Reinigung der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit dem Nucleotrap Extraktionskit (Fa. Macherey und Nagel, Nr. 740584). Je 100 mg Agarosegel wurden mit 300 µl Puffer NT1 versetzt. Anschließend wurden 12 µl Nucleotrap-Suspension (Glasmilch) zugegeben und die Mischung unter regelmäßigem leichtem Vortexen 10 min bei 50°C inkubiert. Die Probe wurde 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das DNA/Glasmilch-Pellet wurde mit 500 µl Puffer NT2 versetzt, gevortext, erneut 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Schritt wurde wiederholt. Dann wurden 500 µl Puffer NT3 zum Pellet gegeben und gemäß den beiden letzten Schritten vorgegangen. Man ließ DNA/Glasmilch bei 37°C trocknen und versetzte mit 25 µl TE-Puffer (s. 2.2.1.2.), vortexte die Probe und inkubierte 10 min bei RT. Anschließend wurde noch einmal gevortext und 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Zum Schluß wurde der DNA enthaltende Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die verwendeten Puffer entstammten dem Nucleotrap Extraktionskit.

### 2.2.1.7. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Amplifizierte DNA aus dem PCR Ansatz sowie Plasmid-DNA wurden mit den Restriktionsendonukleasen SphI und BamHI geschnitten. Es wurden ca. 10 µg DNA pro Spaltungsansatz eingesetzt. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes schwankte zwischen 20 µl und 30 µl. Für einen 30 µl Ansatz wurde das Volumen an DNA, das 10 µg DNA enthielt, mit 3 µl BamHI Puffer (10 x), 0.3 µl BSA (100 x), 1 µl BamHI-Endonuklease und 1 µl SphI-Endonuklease versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 30 µl mit autoklaviertem Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde 3 h bei 37°C inkubiert und nach abgeschlossener Reaktion bei -20°C aufbewahrt oder direkt weiterverarbeitet. Die Spaltungsansätze wurden entweder über ein präparatives Agarosegel (s. 2.2.1.5.) und anschließende Gelextraktion (s. 2.2.1.6.) oder über eine Ethanol-/Natriumacetatfällung gereinigt.

#### 2.2.1.8. Ethanol-/Natriumacetatfällung

Das eingesetzte Volumen DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc, pH 5.2 sowie 2.5 Volumen 100 % Ethanol versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Im Folgenden wurde der Fällungsansatz 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand sehr vorsichtig abgenommen. Häufig konnte man bei diesem Schritt das Pellet wegen geringer Größe und hoher Transparenz kaum erkennen. Das Pellet wurde mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die DNA 10 min bei 37°C getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer (s. 2.2.1.2.) aufgenommen.

#### 2.2.1.9. Ligation

Das für die Ligation eingesetzte geschnittene Plasmid wurde über ein präparatives Agarosegel (s. 2.2.1.5.) und anschließende Gelextraktion (s. 2.2.1.6.), das PCR-Fragment über Ethanol-Natriumacetatfällung gereinigt. Für die Reaktion wurden 1 µl Plasmid mit 15 µl PCR-Fragment, 4 µl Ligase Puffer (5 x) und 1 µl Ligase (Fa. Gibco BRL) versetzt. Dabei wurden zunächst Vektor und Fragment gemischt und 5 min bei 45°C inkubiert, um unspezifische Basenpaarungen zu lösen. Daraufhin wurde die Probe auf Eis gesetzt, und es wurden Ligase-Puffer und Ligase zugegeben. Die Ligation verlief über Nacht bei 16°C.

#### 2.2.1.10. LB-Medium

Für dieses Medium wurden 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt sowie 10 g NaCl gemischt, mit 950 ml Reinstwasser versetzt und unter Rühren gelöst. Die Lösung wurde mit 5 N NaOH auf pH 7.0 gebracht und autoklaviert.

#### 2.2.1.11. Agarplatten

Es wurden 500 ml LB-Medium (s. 2.2.1.10) mit 7.5 g Agar gemischt, die Mischung autoklaviert und anschließend bei 50°C temperiert. Der temperierten Agarlösung wurden gegebenenfalls Antibiotika zugefügt. Die Lösung wurde unter der Sterilbank in Kulturplatten gegossen.

#### 2.2.1.12. Kompetente Zellen

Es wurden kompetente Zellen des Stamms M15 (pREP4, Fa. Qiagen) sowie kompetente XLIBLue-Zellen hergestellt. Dazu wurde zunächst mit einer Impföse *E. coli*-Material aus einem Glycerinstock der entsprechenden Zellkultur geschabt und auf einer Agarplatte (s. 2.2.1.11)

ausgestrichen. Die M15-Zellen wiesen Kanamycin-Resistenz auf, die XLIBLue-Zellen besaßen keine Antibiotika-Resistenz. Kanamycin wurde der Agarplatte in einer Konzentration von 30 µg/ml beigemischt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den Agarplatten wurde eine einzelne Zellkolonie mit einer Impföse gepickt und in 3 ml LB-Medium/ (Kanamycin) überführt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C geschüttelt (ÜN-Kultur). 100 ml LB-Medium/(Kanamycin) wurden mit 1 ml ÜN-Kultur angeimpft und bis zu einer Zelldichte von  $OD_{600}=0.6-0.8$  bei 37°C geschüttelt (ca. 4 h). Dann wurde der Ansatz auf zwei 50 ml Falconröhrchen verteilt und 10 min bei 4°C und 4000 rpm (Sorvall-Zentrifuge RC 5B) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 12.5 ml eiskaltem 0.1 M  $CaCl_2$  resuspendiert. Nun wurden die Zellen 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut 10 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 2 ml eiskaltem 0.1 M  $CaCl_2$ /15 % Glycerin resuspendiert, und unter der Sterilbank wurden je 100 µl in 1.5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Zellen wurden sofort bei -70°C eingefroren.

#### 2.2.1.13. Transformation

10 µl Ligationsansatz (s. 2.2.1.9) bzw. 1 µl gereinigte Plasmidlösung (s. 2.2.1.14), die etwa 20 ng Plasmid-DNA enthielt, wurden zu 100 µl kompetenter Zellen (s. 2.2.1.12) gegeben und 20 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Probe 90 s bei 42°C im Wasserbad inkubiert, dann sofort auf Eis gestellt und dort weitere 3 min inkubiert. Dem Ansatz wurden 300 µl LB-Medium zugegeben, anschließend wurde er 45 min bei 37°C auf einem Rollinkubator bewegt. Die Transformationsansätze wurden auf Agarplatten ausgestrichen, die Ampicillin (Amp, 150 µg/ml) enthielten (die gewünschten Plasmide enthielten ein Ampicillin-Resistenzgen). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2.2.1.14. Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Minipräparation)

Von einer Agarplatte wurde eine einzelne Kultur mit einer Impföse gepickt und in 3 ml LB-Medium/Antibiotikum überführt. Die Anzucht erfolgte über Nacht im Schüttler bei 37°C (ÜN-Kultur). 1 ml der ÜN-Kultur wurde in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 8000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet in 300 µl Puffer P1 (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Es wurde mit 300 µl Lösung P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) versetzt, vorsichtig geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 300 µl Lösung P3 (2.55 M Kaliumacetat, pH 4.8) zugegeben, wiederum vorsichtig gemischt und danach 15 min bei 13000 rpm

zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 600 µl abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde vorsichtig mit dem gleichen Volumen P/C/I (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1) versetzt, gründlich geschüttelt und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige DNA-enhaltende Phase wurde abgenommen, mit 0.6 Volumen Isopropanol gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Probe 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 300 ml 70 % Ethanol gewaschen und bei RT ca. 15 min getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer (s. 2.2.1.2), der 20 µg/ml RNase enthielt, aufgenommen und bei -20°C gelagert.

#### 2.2.1.15. Restriktionsanalyse

Die Restriktionsanalyse des Plasmids pQE70\_Cr (pQE70 + CrnA-Gen) wurde mit der Restriktionsendonuklease BsaI durchgeführt. Das korrekt zusammengesetzte Plasmid pQE70\_Cr wies zwei BsaI-Schnittstellen auf (Programm Clone). Spaltung mit BsaI sollte zu zwei Fragmenten der Größe 2618 bp und 1586 bp führen. Das einfach geschnittene Plasmid bestand aus 4204 bp, das Plasmid ohne CrnA-Gen war 3427 bp lang.

Es wurden 4 µl Plasmid-DNA aus einer Minipräparation (s. 2.2.1.14) mit 14 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl Puffer 4 (10 x, Fa. NEB) und 1 µl BsaI (5 U, Fa. NEB) versetzt und 3 h bei 50°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe direkt mit 2 µl Gelladepuffer (s. 2.2.1.5) versetzt und auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen.

#### 2.2.1.16. Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Midipräparation)

250 ml LB/Amp-Medium wurden mit 200 µl Bakteriensuspension aus einer 3 ml ÜN-Kultur (s. 2.2.1.12) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Die Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab erfolgte mit Hilfe des Nucleotrap-Kits für Midipräparationen (Fa. Macherey und Nagel). Die Bakterienkultur wurde 25 min bei 4200 rpm zentrifugiert und mit 4 ml Puffer S1 resuspendiert. Dann wurde die Kultur mit 4 ml Puffer S2 versetzt, vorsichtig geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Es wurden 4 ml Puffer S3 dazu gegeben, gründlich gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe 25 min bei 17000 x g zentrifugiert. Eine AX100-Säule wurde mit 2 ml Puffer N2 äquilibriert. Der Überstand der Zentrifugation wurde durch einen Faltenfilter auf die Säule aufgetragen. Die DNA wurde mit 2 x 4 ml Puffer N3 gewaschen und mit 2 x 2 ml Puffer N5 von der Säule eluiert. Das Eluat wurde mit 0.7 Volumen Isopropanol versetzt und 60 min bei RT inkubiert. Die gefällte DNA wurde anschließend 30 min bei 6000 rpm zentrifugiert, mit 1 ml kaltem 70 % Ethanol gewaschen und wiederum 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand

wurde abgenommen und das Pellet ca. 15 min bei RT getrocknet. Es wurde in 50 µl autoklaviertem Merck-Wasser gelöst und bei -20°C gelagert. Die verwendeten Puffer entstammten dem Nucleotrap-Midipräparationskit.

#### 2.2.1.17. DNA-Sequenzierung

In PCR-Reaktionsgefäßen wurden 4 µg Plasmid-DNA mit Merck-Wasser auf 10 µl verdünnt und mit 1 µl Sequenzierprimer (10 pmol/µl) und 4 µl Big Dye-Mix (Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit, Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt) versetzt.

Protokoll der PCR Reaktion (PCR Mastercycler 5330, Fa. Eppendorf):

- |                     |       |       |
|---------------------|-------|-------|
| 1. Heißstart        | 4 min | 95°C  |
| 2. Denaturierung    | 15 s  | 95°C  |
| 3. <i>annealing</i> | 15 s  | 55 °C |
| 4. Synthese         | 4 min | 60°C  |

Die Schritte zwei bis vier wurden dreißigmal wiederholt.

Im Anschluss an die Reaktion wurden die Proben bei 8°C gekühlt. Die PCR-Ansätze wurden für die folgende Sequenzierung durch Ethanol-fällung aufgereinigt. Dazu wurde ein PCR-Ansatz mit 85 µl Merck-Wasser, 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 5.2 und 250 µl Ethanol versetzt und anschließend 30 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol versetzt und wiederum 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde 5 min im Speed Vac (Fa. Eppendorf) getrocknet. Der getrocknete Ansatz wurde in 25 µl TSR-Puffer aufgenommen und 2 min bei 90°C denaturiert. Die Probe wurde dann in Sequenziergefäße überführt und über Kapillargelelektrophorese mit dem DNA-Sequenzierer ABIPrism analysiert. Aus dem erhaltenen Chromatogramm wurde die Basensequenz abgeleitet.



Die Sequenzierung des CrnA-Gens wurde von beiden Seiten des Gens ausgehend von flankierenden Sequenzabschnitten auf dem Plasmid pQE70 (CreaPri1, CreaRev1) sowie Sequenzabschnitten innerhalb des CrnA-Gens (CreaPri2, CreaRev2) überlappend durchgeführt. Es wurden die folgenden Primer (synthetisiert von Fa. MWG-Biotech, Ebersberg) für die Sequenzierung verwendet:

CreaPri1      5' -cccgaaaagtgccacctg-3'  
CreaRev1      5' -gttctgaggtcattactgg-3'  
CreaPri2      5' -gtgtgccagcgggtcg-3'  
CreaRev2      5' -gatcaccgccgggtcc-3'

#### 2.2.1.18. Expression von nativer CrnA

Zunächst wurden M15 (pREP4)-Zellen mit dem Plasmid pQE70\_Cr transformiert (s. 2.2.1.13) und über Nacht auf LB/Amp-Agarplatten ausgestrichen. Die bewachsenen Platten wurden mit 3 ml LB-Medium versetzt und die Bakterien mit dem Glasstab aufgeschlämmt. Es wurden 200 ml LB-Medium/Ampicillin (150 µg/ml) mit der Bakteriensuspension angeimpft. In einem 1-2 l Erlenmeyerkolben wurden die Zellen bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6-0.8 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Dreieinhalb Stunden nach der Induktion wurden die Bakterien in einen Zentrifugenbecher überführt und 20 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -20°C eingefroren oder direkt weiter verarbeitet. Die Zellen wurden durch Ultraschall lysiert. Dazu wurde das Bakterienpellet in 10 ml Tris/HCl, pH 8.0 resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Unter Eiskühlung wurden die Zellen mit dem Ultraschallstab (SS73) 4 x 30 s bei 40 % Power beschallt. Die Suspension wurde 30 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand (Lysat) wurde die Creatininase durch chromatographische Methoden gereinigt.

#### 2.2.1.19. Expression von Selenomethionin(SM)-CrnA in Minimalmedium (M9)

Kompetente M15 (pREP4)-Zellen wurden mit dem Plasmid pQE70\_Cr transformiert und über Nacht auf LB/Amp-Platten inkubiert. Es wurde eine Kolonie gepickt und damit 3 ml LB/Amp-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (Vorkultur). Die Vorkultur wurde 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in M9-Medium (2.9 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g NaCl, 2 g NH<sub>4</sub>Cl mit Reinstwasser auf 2 l auffüllen, autoklavieren) resuspendiert. Je 420 ml ergänztes M9-Medium (400 ml M9-Medium, 18 ml 9 % Gluco-

se, 400 µl Vitaminmix (1 mg/ml Niacinamid, 1 mg/ml Riboflavin, 1 mg/ml Pyridoxalphosphat, 1 mg/ml Thiamin), 800 µl 1 M MgSO<sub>4</sub>, 800 µl 12.5 mg/ml FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 400 µl 1000 x Amp) wurden mit 900 µl resuspendierter Zellen angeimpft. Die Zellen wurden in 2-3 l Erlenmeyerkolben bei 37°C geschüttelt. Bei einer Zelldichte von OD<sub>600</sub>=0.6 (nach 6-7 h) wurde die Bakterien-suspension mit 400 µl 100 mg/ml L-Lysin, 4 ml 20 mg/ml D,L-Phenylalanin, 3.2 ml 25 mg/ml D,L-Threonin, 2 ml 20 mg/ml D,L-Isoleucin, 1 ml 20 mg/ml L-Leucin, 240 µl 85 mg/ml L-Valin, 1.2 ml 20 mg/ml L-Selenomethionin versetzt und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Vier Stunden nach der Induktion wurden die Zellen in einen Zentrifugenbecher überführt und 25 min bei 4°C und 4500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet bei -20°C bzw. -70°C eingefroren. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellen in 10 ml Tris/HCl, pH 8.0 resuspendiert und unter dreimaliger Passage in der *French Pressure Cell* bei einem Druck von 1500 bar aufgeschlossen. Die erhaltene Suspension wurde 30 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (Lysat) wurde anschließend weiter verarbeitet.

## 2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1. Chromatographische Methoden

Es wurden unterschiedliche Reinigungsprotokolle für die Enzyme BM-CrnA, CrnA sowie SeMet-CrnA verwendet:

Tab. 1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Reinigungsprotokolle

<b>CrnA</b>	<b>SeMet-CrnA</b>	<b>BM-CrnA</b>
\	\	\
Lyse	Lyse	Ultrafiltration (Amicon, Centricon30)
\	\	
PD10	Ni-Chelat (1 ml)	
\	\	
Ni-Chelat (2 ml, Pharmacia, Che- lating Sepharose Fast Flow)	PD10	
\	\	
Ultrafiltration (Amicon, Centricon30)	Phenylsuperose (1 ml, Pharmacia)	
\	\	
Gelfiltration (Pharmacia, Superdex200)	Ultrafiltration (Amicon, Centricon30)	
\		
Ultrafiltration (Amicon, Centricon30)		

#### 2.2.2.1.1. Ni-Chelat-Affinitätssäule

Für die Reinigung der SeMet-CrnA wurde zunächst eine 1 ml Ni-Chelat-Durchflusssäule mit 5 ml Puffer A (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) äquilibriert. Dann wurden 10 ml durch 0.2  $\mu$ m filtrierte Lysat auf die Säule aufgetragen. Es wurde mit 5 ml Puffer A gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu waschen. Anschließend wurde das Enzym mit 5 ml Puffer B (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) von der Säule eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt.

Die native CrnA wurde über eine 2 ml Ni-chelating Sepharose Fast Flow-Säule an einer Mitteldruckchromatographieanlage (FPLC) gereinigt. Das Lysat wurde dafür zunächst über eine PD10-Säule (s. 2.2.2.1.2) in Puffer A (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) umgepuffert. Dann wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen Puffer A äquilibriert. Anschließend wurde die Probe über einen 10 ml Superloop bei einer Flussrate von 0.3 ml/min auf die Säule aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 10 ml Puffer A von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte innerhalb eines linearen steigenden Gradienten über ein Volumen von 20 ml mit Puffer B' (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 250 mM Imidazol, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol). Alle Elutionsfraktionen wurden vereinigt (10 ml).

#### 2.2.2.1.2. PD10-Säule

Die Hälfte des Lysats der nativen CrnA wurde über PD10-Säulen (Fa. Amersham Pharmacia), welche mit Sephadex G 25 gepackt sind, in Puffer A (s.2.2.2.1.1) für den Ni-Chelat Säulengang umgepuffert. Der Rest des Lysats wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die PD10-Säulchen wurden mit 20 ml Puffer A äquilibriert. Pro Säule wurden 2.5 ml Lysat aufgetragen (2 Fraktionen). Mit 3.5 ml des Äquilibrierungspuffers wurde eluiert.

Die SeMet-CrnA wurde im Anschluss an den Ni-Chelat-Säulengang über PD10-Säulen umgepuffert. Es wurden in zwei Fraktionen jeweils 2.5 ml Ni-Chelat-Eluat über ein PD10-Säulchen in Auftragspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) für die Phenylsuperose-Säule umgepuffert.

#### 2.2.2.1.3. Hydrophobe Interaktion

In einem zweiten Reinigungsschritt wurde die SeMet-CrnA über eine 2 ml Phenylsuperose-Säule gereinigt. Die Trennung beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Säulenmaterial. Das in Auftragspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) umgepufferte Protein (s. 2.2.2.1.2) wurde über einen 10 ml Superloop mit einer Flussrate von 0.2 ml/min am Chromatographiesystem FPLC auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte über einen zweistufigen linearen abfallenden Gradienten: 500-150 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  innerhalb 20 ml, 150-0 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  innerhalb 6 ml mit dem Elutionspuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8.0. Bei diesem Reinigungsschritt wurde in erster Linie Aggregat abgetrennt. Die Fraktionen unter dem ersten Peak im Elutionsgradienten entsprachen dem nicht aggregierten Protein (native PAGE, s. 2.2.2.2.1) und wurden vereinigt (4 ml).

#### 2.2.2.1.4. Ultrafiltration

Es wurden Ultrafiltrationsröhrchen der Firma Amicon mit einer Ausschlussgrenze von 30000 Da (Centricon30) verwendet. Sie wurden in allen Arbeitsschritten zum Umpuffern und Aufkonzentrieren der Proteinproben verwendet und stellten den letzten Schritt in den Reinigungsprotokollen dar. Die Röhrchen wurden mit 2.5 ml Probe beschickt und gegen den Puffer 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 bei 3000 x g in 4 Zyklen ultrafiltriert.

Die native CrnA wurde vor dem Schritt der Gelfiltration auf ein Volumen von 400 µl eingengt.

#### 2.2.2.1.5. Gelfiltration

Die durch Ultrafiltration aufkonzentrierte (s. 2.2.2.1.4) native CrnA wurde mit einer Flussrate von 0.4 ml/min auf die Säule Superdex 200 (Fa. Amersham Pharmacia) aufgetragen und chromatographiert. Die Säule wurde zuvor mit dem Puffer 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl äquilibriert.

#### 2.2.2.2. Proteinanalytik

##### 2.2.2.2.1. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Polyacrylamidgelelektrophorese wurde ausschließlich das Phast System von Pharmacia verwendet. Für die SDS-PAGE wurden sehr dünne vorgefertigte Gradientengele (PHAST-Gradientengel) verwendet, die aus Sammelgelzone mit geringer Acrylamidkonzentration und Trenngelzone (8-25 % Acrylamid) bestehen. Auf das Gel wurden SDS-haltige Pufferstreifen gelegt. Die Proteinprobe wurde mit Verdünnungspuffer (60 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) auf eine Konzentration von etwa 50 µg/ml gebracht. 20 µl des verdünnten Proteins wurden mit 10 µl Auftragspuffer (8 ml Verdünnungspuffer, 1 g SDS, 4 mg Bromphenolblau, 2 ml β-Mercaptoethanol) gemischt, 10 min bei 95°C inkubiert und anschließend scharf zentrifugiert. 1-2 µl der Probe wurden auf das Gel aufgetragen.

Nach abgeschlossener elektrophoretischer Trennung (Pharmacia Separation Technique File No. 110) wurden die Gele silbergefärbt und die Proteine dadurch sichtbar gemacht (Pharmacia Development Technique File No. 210). Als Proteinmarker wurde der Low Molecular Weight Standard (14.4, 20.1, 30, 43, 67, 94 kDa) von Pharmacia verwendet.

Bei der nativen PAGE wurden 1-2 µl einer nativen Proteinprobe mit einer Proteinkonzentration von 0.1-0.3 mg/ml auf ein 8-25 % PHAST-Gradientengel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mit nativen Pufferstreifen nach dem Pharmacia Separation Technique File No. 120. Es wurde

kein Standard aufgetragen, da die Wanderung des Proteins im Gel von der Größe und Ladung des Proteins abhängt.

#### 2.2.2.2.2. Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des Standard Assays von BioRad nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Der Assay enthält das Reagenz Coomassie Brilliant Blue, das mit dem Protein einen gefärbten Komplex bildet, welcher bei 595 nm absorbiert.

Die Komplexbildung verläuft linear mit zunehmender Proteinkonzentration. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin. Es wurden 200 µl BioRad-Reagenz (unverdünnt) mit 800 µl Proteinlösung (1-25 µg/ml, BioRad-Microassay) gemischt und nach 5 min Inkubation bei RT die Extinktion bei 595 nm gegen einen Blindwert, bestehend aus 200 µl BioRad-Reagenz und 800 µl Puffer, spektralphotometrisch gemessen.

#### 2.2.2.2.3. Aktivitätstest

Die Aktivität der CrnA wurde mit Hilfe eines Färbetests, der sog. Jaffé-Reaktion (Jaffé, 1886) bestimmt. Bei dieser Reaktion bildet sich im Alkalischen ein roter Komplex zwischen Creatinin und Pikrinsäure, dessen Absorption bei 520 nm gemessen wird. Obwohl die Reaktion schon seit über 100 Jahren bekannt ist, ist der Aufbau des Komplexes noch immer unklar (Spencer, 1986, Wyss, 2000).

Es wurden 100 µl Enzymlösung mit 900 µl 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.1 M Creatin gemischt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Gemischs abgenommen und mit 1 ml 1 N NaOH, 1 ml 1 % Pikrinsäurelösung und 900 µl Reinstwasser versetzt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 520 nm gegen einen Blindwert, der statt des Enzyms 100 µl Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 8.0) enthielt, gemessen.

Die Aktivität in U/ml erhielt man nach Rikitake et al. (Rikitake et al., 1979) gemäß folgender Gleichung:

$$U/ml = E_{520} \cdot 6.45 \cdot \text{Verdünnung}$$

Die spezifische Aktivität in U/mg wurde über die Proteinkonzentration ermittelt.

#### 2.2.2.2.4. Massenspektrometrie

Für die Charakterisierung von Reinheit, Größe und Zusammensetzung des Proteins wurden zwei Verfahren der Massenspektrometrie angewendet: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) (Karas, 1988) sowie Electron Spray Ionization (ESI) (Fenn, 1989). Beim MALDI-Verfahren wird die Probe zusammen mit einem Überschuss an Matrixsubstanz auf einem Target kokristallisiert. Unter Hochvakuum wird die Probe anschließend mit Laserlicht bestrahlt und dadurch mit der Matrixsubstanz in die Gasphase gerissen. Im elektrischen Feld wird die durch Matrixteilchen ionisierte Probe abhängig von Masse und Ladung beschleunigt und schließlich in einem Flugzeitanalysator detektiert. Man erhält Aussagen über das Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) der untersuchten Substanz. Es wurde über die externen Standards Myoglobin (16952 Da) und Trypsinogen (23981 Da) kalibriert.

Zur Präparation wurden 5  $\mu$ l 1-5 mg/ml Enzymprobe mit 15  $\mu$ l 0.1 % Trifluoressigsäure (TFA) sowie mit 30  $\mu$ l gesättigter Sidapinsäurelösung (gesättigt in Acetonitril/H<sub>2</sub>O 1:2, 0.1 % TFA) versetzt. Auf dem Target wurden die Spots zunächst mit 0.5  $\mu$ l gesättigter Sidapinsäurelösung benetzt und antrocknen gelassen. Anschließend wurden 0.5  $\mu$ l Probe/Matrix auf den Spot pipettiert und ebenfalls trocknen gelassen.

Mithilfe des MALDI-Verfahrens wurde insbesondere die SeMet-CrnA eindeutig neben nativer CrnA nachgewiesen.

Beim ESI-Verfahren wird die Probe durch eine positiv geladene Metallkapillare geleitet und beim Austritt fein verstäubt. Die dabei entstehenden Tröpfchen verlieren kontinuierlich Lösungsmittel, verbunden mit einem Anstieg der Oberflächenladung. Sie teilen sich nach Erreichen der Grenzladungsdichte an der Tropfenoberfläche (Rayleigh-Limit). Man erhält auf diese Weise hochgeladene lösungsmittelfreie Molekülonen, die in einem Quadrupolanalysator getrennt und detektiert werden.

Die Proteinproben wurden für die ESI-Analyse mit Methanol/Wasser 1:1, 0.1 % Essigsäure auf eine Proteinkonzentration von etwa 0.5 mg/ml verdünnt.

#### 2.2.2.2.5. Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Mit der Methode der dynamischen Lichtstreuung erhält man Informationen über das Molekulargewicht des Proteins und sein Aggregationsverhalten. Man misst den translationalen Diffusionskoeffizienten ( $D_T$ ), berechnet darüber den hydrodynamischen Radius der Partikel in Lösung, woraus abschließend das Molekulargewicht abgeleitet wird:

$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot D_T}$$

$R_H$	hydrodynamischer Radius
$k_B$	Boltzmannkonstante
$T$	absolute Temperatur
$\eta$	Viskosität der Lösung

Die Messungen wurden an dem Gerät DynaPro-801 (Fa. ProteinSolutions) durchgeführt. Die Proteinprobe wurde für die Messung in einer Konzentration von etwa 1 mg/ml eingesetzt und vor der Messung durch einen 0.2  $\mu\text{m}$  Filter filtriert. Die Küvetten wurden vor der Verwendung gründlich mit Wasser und 20 % Ethanol gespült und getrocknet. Es wurden etwa 20  $\mu\text{l}$  Probe in die Küvette eingefüllt. Pro Probenlösung wurden 20 Einzelmessungen aufgenommen. Die Auswertung erfolgte unter Annahme einer monomodalen Verteilung (nur eine Partikelgröße in Lösung) und mit der Eingabe *average protein 149-370 kDa* für die Berechnung der Molmasse mit der Software des Gerätes.

#### 2.2.2.2.6. Kalorimetrische Messungen

Es wurden kalorimetrische Messungen mittels DSC (Differential Scanning Calometry) am VP-DSC-Microcalorimeter (Fa. Microcal) zur Bestimmung des Schmelzpunktes des Proteins durchgeführt. Bei dieser Technik wird die Änderung der Wärmekapazität eines Proteins in Lösung in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Neben der Temperatur der hitzebedingten Entfaltung kann auch die Enthalpie ( $\Delta H$ ) des Phasenübergangs bestimmt werden.

Die Proteinprobe wurde in einer Konzentration von 0.6 mg/ml in 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 und in einem Volumen von ca. 800  $\mu\text{l}$  für die Messung eingesetzt. Es wurde gegen Wasser gemessen bei einer Heizrate von 60°C/h. Eine Basislinienkorrektur wurde durch Abzug eines reinen Pufferspektrums durchgeführt. Die Schmelztemperatur wurde über das Kurvenanpassungsmodell *non-2-state* des Auswertungsprogramms (DSC Data Analysis in Origin, MicroCal Incorporated) bestimmt.

#### 2.2.2.2.7. Circular Dichroismus (CD)-Messungen

Der Circulare Dichroismus ist eine spektroskopische Methode, mit der die Sekundärstrukturanteile von Proteinen in Lösung abgeschätzt werden können. Der Messung zugänglich sind die prozentualen Anteile von Helix und Faltblatt, nicht aber deren Position innerhalb der Sequenz. Physikalisch gesehen basiert das Phänomen auf dem unterschiedlichen Verhalten chiraler



Moleküle rechts- bzw. links-polarisierten Lichts gegenüber. Die wichtigsten UV/VIS-spektroskopisch aktiven Gruppen eines Proteins sind die Amidgruppen des Peptidgerüsts und die aromatischen Reste der Seitenketten. Bei bestimmten Sekundärstrukturelementen liegen die Amidgruppen des Peptidgerüsts geordnet vor. Durch Wechselwirkung zwischen den absorbierenden Zentren kommt es zur Aufspaltung der optischen Übergänge (sog. „Exciton-Splitting“, Snatzke, 1981). Als Konsequenz zeigen Sekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt,  $\beta$ -Turn und Polyprolinhelix sehr charakteristische CD-Spektren im Bereich von 180 nm bis etwa 250 nm.

Ein für Helices charakteristisches Minimum im Spektrum liegt bei etwa 222 nm. Misst man ein Spektrum bei dieser einen Wellenlänge und heizt dabei die Probe kontinuierlich auf, ist es möglich, die Schmelztemperatur des Proteins anhand der Auflösung des Sekundärstrukturelements Helix zu bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Schmelzpunkt der BM-CrnA bestimmt. Für die CD-Messungen wurde ein Jasco-CD-Spektroskop verwendet. Die Messungen wurden bei 222 nm durchgeführt und die Temperatur von RT auf 100 °C mit einer Heizrate von 40 °C/h erhöht. Es wurde eine Küvette mit einer Schichtdicke von 0.1 cm verwendet. Während der Messung wurde das Gerät mit N<sub>2</sub> gespült, um Ozonbildung im UV-Licht zu verhindern. Die Proteinkonzentration betrug 0.27 mg/ml in 5 mM Tris/HCl, pH 8.0. Es wurde die Elliptizität ( $\theta_\lambda$ ) der Probe gegen die Temperatur gemessen und zur Bestimmung des Schmelzpunkts nach der Temperatur abgeleitet.

## 2.3. Proteinkristallisation und Röntgendiffraktionsmessung

### 2.3.1. Kristallisation

Für die Kristallisationsansätze wurde durch Ultrafiltration umgepuffertes und aufkonzentriertes Protein in Konzentrationen von 7.5-15 mg/ml verwendet. Die Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode mit sitzendem oder hängendem Tropfen durchgeführt. Die Kristallisation fand in LINBRO-Platten (Fa. ICN oder Hampton Research) mit Polystyrol- oder Polypropylenbrücken bzw. Deckgläschen aus Glas statt. Die Tropfen wurden zu gleichen Teilen aus Reservoirlösung und Proteinlösung sowie unter Umständen Additiven zusammenpipettiert. Die Ergebnisse wurden in regelmäßigen Abständen unter einem Stereomikroskop untersucht und protokolliert. Die Reservoirs wurden überwiegend von Hand pipettiert und gemischt, in einzelnen Vorversuchen wurde ein Pipettierroboter (Fa. Canberra Packard) verwendet. Die Zusammensetzung der Reservoirs wurde durchgehend mit der Software des Pipettierroboters (Diplomarbeit, M. Schröder, 1997) berechnet. Anfangsbedingungen für die Kristallisation wurden aus den Ergebnissen von Aggregationstests (DLS, s. 2.2.2.2.5) abgeleitet. Diese Bedingungen wurden durch zufällige Variation von sechs Parametern im Rahmen eines studentischen Kurspraktikums sowie systematische Variation von einem oder zwei Parametern optimiert.

### 2.3.2. Schwermetallderivatisierung

Für die platinhaltige Schwermetalllösung wurden 50 mg  $K_2PtCl_4$  in 1 ml Stabilisierungslösung (15 % Ethanol, 27 % PEG 8000, 0.1 M HEPES, pH 7.5) eingebracht. Dabei konnte das Schwermetallsalz nur unvollständig (etwa zur Hälfte) in Lösung gebracht werden, so dass eine gesättigte Lösung mit einer Konzentration von 50-100 mM vorlag. Die Lösung wurde in dunkelbraunen Reaktionsgefäßen im Kühlschrank aufbewahrt. Zu einem Tropfen, der BM-CrnA-Kristalle mit einer Kantenlänge von 0.2-0.3 mm in jeder Dimension enthielt, wurde 1  $\mu$ l Pt-Lösung pipettiert (Pt-Konzentration im Tropfen ca. 5 mg/ml), das Reservoir wieder luftdicht abgeschlossen und 24 h bei RT inkubiert.

### 2.3.3. Montage von Kristallen für Tieftemperaturmessungen

Die Kristalle wurden mit einem Cryoloop ( $\varnothing$  0.2-0.3 mm) vorsichtig in 10  $\mu$ l Cryopuffer, welcher zuvor in eine Mikrobrücke pipettiert wurde, überführt. Die Bedingungen im Cryopuffer entsprachen den Reservoirbedingungen zuzüglich 12-15 % Glycerin. Nach dem Umbetten wurde der Kristall sofort wieder mit dem Cryoloop aus dem Cryopuffer gefischt, auf dem Goniometerkopf montiert und möglichst schnell in den 100 K kalten  $N_2$ -Strom gebracht. Anschließend

wurde der Kristall justiert, so dass er bei Drehung um die Goniometerachse in der Strahlebene lag.

### 2.3.4. Röntgendiffraktionsmessung

Datensätze des Pt-Derivats mit anomalem Streuanteil sowie ein nativer Datensatz wurden an Messplätzen der EMBL-Outstation bei 100 K am DORIS-Speicherring des DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron) in Hamburg an den *beamlines* BW7A bzw. BW7B gemessen (Tab. 2). Am Messplatz BW7B wurden die Daten auf einer MAR345 Bildspeicherplatte detektiert, am Messplatz BW7A auf einem MAR CCD-Detektor. Von einem Derivatkristall wurde ein Röntgenfluoreszenzspektrum im Bereich der Pt-L<sup>III</sup>-Absorptionskante zur Bestimmung der Wellenlängen für den *peak*- und *inflection*-Datensatz gemessen. Das Spektrum wurde mit dem Programm CHOOCH (Evans und Pettifer, 2001) ausgewertet. Ein für das MAD-Experiment geplanter dritter Datensatz, der bei einer entfernten Wellenlänge (*remote*) gemessen werden sollte, konnte aus Zeitgründen nicht angefertigt werden.

Tab. 2: Messbedingungen der Synchrotrondatensätze

Datensatz	peak	inflection	P2 <sub>1</sub>
Wellenlänge [Å]	1.07138	1.07164	0.84200
Auflösung [Å]	30-3.0	30-3.0	50-2.1
Kristall-Detektorabstand [mm]	200	200	360
Dosis	3000-5000	3000	3000
Rotation pro Bild [°]	0.5	0.5	0.5
Gesamtrotation [°]	180	170	180

Ein weiterer Datensatz wurde mit CuK<sub>α</sub>-Strahlung an einer hauseigenen Drehanode (Fa. Nonius, 45 kV, 100 mA) auf einer DIP2030H Bildspeicherplatte (Fa. MAC Science) bei 100 K gemessen. Die Monochromatisierung der Strahlung erfolgte durch ein Spiegelsystem (Fa. Nonius). Während der Messung wurde der Kristall pro Bild um 1° gedreht und 20 min pro Aufnahme belichtet. Der Kristall-Detektorabstand betrug 160 mm, es wurden insgesamt 208 Bilder aufgenommen.

## 2.4. Theoretische Methoden

### 2.4.1. Sequenzvergleich und Sekundärstrukturbestimmung

Sequenzvergleiche gegen DNA-Datenbanken sowie gegen redundante und nichtredundante Proteindatenbanken wurden auf verschiedenen *servern* mit den Programmen FASTA (Pearson und Lipman, 1988) und BLAST (Altschul et al., 1997) durchgeführt. Die Internetadressen sind am Ende der Dissertation im Internetseitenverzeichnis aufgeführt. Wurden zwei Proteinsequenzen gegeneinander verglichen, sind die Programme BESTFIT oder GAP aus dem GCG-Programmpaket verwendet worden (Version 10.1, Genetics Computer Group, 1982-2001), die auf Algorithmen von Needleman und Wunsch (Needleman, 1970) und Smith und Waterman (Smith, 1981) beruhen. Multiple Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm CLUSTALW (Thompson et al., 1994) durchgeführt.

Die Sekundärstruktur der BM-CrnA aus ihren Koordinaten wurde mit dem Programm DSSP (Kabsch und Saender, 1983) bestimmt.

## 2.5. Rechenmethoden

### 2.5.1. Verwendete Rechnersysteme und Programme

Rechner und Betriebssystem	Hersteller
Indigo 2 mit Irix 6.5	Silicon Graphics (SGI), München
Octane mit Irix 6.5	Silicon Graphics (SGI), München
O2 mit Irix 6.5	Silicon Graphics (SGI), München
IBM-kompatibler PC mit RedHat Linux und Windows95	Schönsee Loose Datentechnik, Köln
Drucker:	
HP LJ 5MP	Hewlett Packard, Böblingen
HP LJ 4500N	Hewlett Packard, Böblingen

### 2.5.2. Aufbereitung der Diffraktometerdaten

Die Messdaten wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK aus dem HKL-Programmpaket (Otwinowski und Minor, 1997) indiziert, prozessiert und skaliert. Die MAD-Datensätze wurden mit der Option *scale anomalous* skaliert.

Die Strukturfaktoramplituden wurden mit dem Programm *truncate* (CCP4, 1994) aus den Intensitäten berechnet. Peak- und Inflection-Datensatz wurden mit dem Programm *cad* (CCP4,

1994) zusammengefasst und die Daten sortiert. Mit dem Programm *scaleit* (CCP4, 1994) wurden die daraus resultierenden Daten skaliert sowie statistisch (isomorphe/anomale Differenzen, Wilsonplot, Intensitätsverteilung im Auflösungsbereich u. a.) analysiert. Die freien Reflexe für die Kreuzvalidierung bei der Strukturverfeinerung wurden mit *uniqueify* (CCP4, 1994) bestimmt, die native Pattersonfunktion wurde mit *fft* (CCP4, 1994) berechnet, die Selbstrotationsfunktion mit GLRF (Tong und Rossmann, 1997).

Für die Phasierung mit dem Programmpaket CNS (Brünger, 1998) mussten die skalierten MAD-Datensätze aus SCALEPACK zunächst mit dem CNS-Skript *to\_cns* in CNS-Format umgewandelt werden. Die Daten für die zwei Wellenlängen wurden dann mit dem Skript *merge.inp* zusammengefasst und anschließend mit dem Skript *scale.inp* skaliert. Eine statistische Analyse der Daten erfolgte in *analyse.inp*.

### 2.5.3. Strukturlösung und -verfeinerung

#### 2.5.3.1. Phasierung

Mit dem CNS (Brünger, 1998)-Skript *patterson\_map.inp* wurde eine anomale Differenzpattersonfunktion aus den anomalen Differenzen der Peakwellenlänge berechnet. Die Pattersonfunktion wurde mit dem Skript *heavy\_search.inp* analysiert, wobei sechs Pt-Positionen bestimmt werden konnten. Aus den so bestimmten Pt-Positionen wurden mit dem Skript *mad\_phase.inp* im Auflösungsbereich 30-3.0 Å die ersten experimentellen Phasen berechnet sowie die Pt-Positionen und anomalen ( $f^c$ ) sowie dispersen ( $f^d$ ) Streubeiträge verfeinert.

#### 2.5.3.2. Dichtemodifikation

Die Dichtemodifikation mit Hilfe von Solvensglättung, *histogram matching*, sechsfacher Mittelung über nichtkristallographische Symmetrie (NCS-Mittelung) sowie Phasenerweiterung wurde im Programm *dm* (CCP4, 1994) durchgeführt. Dabei führten Solvensglättung und *histogram matching* zu einer verbesserten Trennung von Molekül- und Lösemittelanteil innerhalb der Dichte. Eine interpretierbare Elektronendichte konnte jedoch erst nach gelungener NCS-Mittelung erhalten werden. Dazu mussten die NCS-Matrizen sowie die NCS-Monomermaske genau bestimmt werden.

Die NCS-Matrizen wurden mit dem Programm *findnscs* (CCP4, 1994) aus den Positionen der Schweratome ermittelt, wobei der Rotationsraum in allen drei Raumrichtungen zwischen +50 und -50 gewählt wurde. Die Symmetrieeoperatoren wurden als Rotationsmatrix  $\underline{M}$  und Translationsvektor  $\underline{t}$  dargestellt. Die so ermittelten 120°-Matrizen erwiesen sich als zu schlecht definiert, so dass sie für die NCS-Mittelung aus den 180°-Matrizen berechnet wurden.

Für die Berechnung wurden Rotationsmatrix und Translationsvektor als 4x4-Matrix (augmentierte Matrix,  $\underline{\underline{M}}_{4 \times 4}$ ) dargestellt:

$$\underline{\underline{M}} = \begin{pmatrix} r_{11} & r_{12} & r_{13} \\ r_{21} & r_{22} & r_{23} \\ r_{31} & r_{32} & r_{33} \end{pmatrix}$$

$$\underline{t} = \begin{pmatrix} t_1 \\ t_2 \\ t_3 \end{pmatrix}$$

$$\underline{\underline{M}}_{4 \times 4} = \begin{pmatrix} r_{11} & r_{12} & r_{13} & t_1 \\ r_{21} & r_{22} & r_{23} & t_2 \\ r_{31} & r_{32} & r_{33} & t_3 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Produkte aus 4x4-Matrizen lassen sich mit gewöhnlicher Matrixmultiplikation berechnen. Die Matrizenmultiplikation wurde mit dem Programm *MapleV*, das im regionalen Rechenzentrum Köln verfügbar ist, ausgeführt.

Für die Bestimmung einer Monomermaske wurde aus der solvensgeglätteten Elektronendichte mit dem Programm *mapman* (Kleywegt und Jones, 1996) ein Skelett (*bones*) der Dichte berechnet. Hieraus konnten die Abmessungen eines Monomers graphisch in dem Programm *O* (Jones et al., 1991) in x-, y-, z-Richtung sehr grob abgeschätzt werden. Innerhalb dieser Abmessungen wurde eine erneute Elektronendichte berechnet und diese wiederum in ein Skelett überführt. Das Skelett des Monomers wurde in *O* mit dem Befehl *sam-atom-out* in eine pdb-Datei überführt. Die Maske wurde letztendlich in dem Programm *nscmask* (CCP4, 1994) verfeinert, in dem sie in alle drei Raumrichtungen vergrößert wurde, anschließend entsprechend der Symmetrieoperationen rotiert und translatiert wurde und schließlich die dabei überlappenden Bereiche abgezogen wurden (Option *no overlaps*).

Für die Phasenerweiterung wurden Strukturfaktoramplituden des 2.1 Å Datensatzes mit den Phasen nach NCS-Mittlung im Programm *cad* (CCP4, 1994) kombiniert. Die Phasen wurden in 600 Zyklen unter Verwendung von sechsfacher NCS-Mittlung in kleinen Schritten von 3.0 Å auf 2.1 Å erweitert. Während der Phasenerweiterung wurden die NCS-Operatoren verfeinert.

## 2.5.3.3. Modellbau

Der Modellbau wurde von Hand innerhalb des Graphikprogramms O (Jones et al., 1991) anhand der phasenerweiterten und NCS-gemittelten Elektronendichte durchgeführt. Dabei wurden zunächst Poly-Alanin-Sequenzen in sehr gut definierte Dichtebereiche gelegt. Eine Poly-Ala-Helix wurde dabei als Modell für Helices verwendet, ebenso ein Poly-Ala- $\beta$ -Faltblattabschnitt. Loopregionen wurden als einzelne Aminosäure oder Dipeptid angefügt. Die verschiedenen Sequenzabschnitte wurden zunächst nicht zusammengefügt, sondern in einzelnen pdb-Dateien gespeichert, die erst nach und nach miteinander verknüpft wurden. Nach etwa 50 % Aminosäureeinbau wurde mit dem sequenzrichtigen Einbau der Aminosäuren begonnen. In einigen gut definierten Bereichen der Dichte konnten Aminosäurereste erkannt und nach individueller Einschätzung eingebaut werden. So entstandene Sequenzabschnitte wurden anhand einer Ähnlichkeitsmatrix (Reinemer, 1993, Abb. 4) mit der bekannten Aminosäuresequenz des Enzyms aligniert:

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	
A	10																				
C	3	10																			
D	3	5	10																		
E	3	4	8	10																	
F	0	4	2	3	20																
G	8	1	2	2	0	10															
H	2	5	4	5	15	0	20														
I	2	4	3	3	3	0	4	10													
K	2	3	7	8	3	1	5	2	10												
L	1	4	3	4	5	0	5	8	3	10											
M	1	3	4	5	8	0	6	8	5	9	10										
N	2	2	10	8	3	2	5	4	6	4	4	10									
P	1	5	3	2	4	0	4	8	2	4	4	3	10								
Q	2	2	8	10	5	2	8	5	10	4	4	8	2	10							
R	2	2	7	8	7	2	7	3	9	4	7	7	2	8	10						
S	6	8	4	4	1	2	3	4	4	3	4	3	5	3	3	10					
T	3	5	4	4	2	1	5	4	4	3	4	4	4	3	2	6	10				
V	2	7	2	2	2	1	3	9	3	5	5	3	10	2	2	5	9	10			
W	0	2	1	1	15	0	5	3	1	3	15	2	4	3	4	2	2	3	30		
Y	0	3	1	2	20	0	15	4	4	7	8	2	3	3	5	2	3	3	15	20	

Abb.4: Ähnlichkeitsmatrix nach Remington (übernommen aus Dissertation Reinemer, 1993)

Die Sequenzvergleiche aufgrund der Ähnlichkeitsmatrix nach Remington wurden mit dem Programm *bestfit* (Needleman und Wunsch, 1970, Smith und Waterman, 1981) innerhalb des GCG-Pakets (Version 10.1, Genetics Computer Group, 1982-2001) des regionalen Rechenzentrums Köln durchgeführt. In der Kommandozeile des Programmaufrufs kann eine beliebige Vergleichsmatrix gewählt werden (-MATRIX=xxxx.cmp). Die oben dargestellte Matrix wurde von Hand im erforderlichen Format editiert. Die Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm *reformat* in GCG-Format gebracht.

#### 2.5.3.4. Verfeinerung

Während der Verfeinerung wurde das Modell in wechselnden Zyklen manuell im Graphikprogramm O verändert sowie in dem Programmpaket CNS verfeinert. In CNS wurde die Verfeinerung zunächst anhand eines Monomers unter Einbeziehung der nicht-kristallographischen Symmetrieoperatoren (*NCS-constraints*) durchgeführt. Später wurden alle Monomere für die Verfeinerung mit einbezogen, wobei die Zwänge durch nicht-kristallographische Symmetrie im Laufe der Verfeinerung weiter gesenkt wurden (*NCS-restraints*). Die Verfeinerung wurde mit dem CNS-Skript *refine.inp* durchgeführt, welches Moleküldynamik (*simulated annealing*), Energieminimierung und B-Faktorverfeinerung beinhaltet. Es wurden sowohl automatisch mit dem Skript *water\_pick.inp* Wassermoleküle mit  $\sigma > 2.5$  in der  $F_oF_c$ -Differenzdichte eingebaut als auch manuell. R-Werte für einzelne Aminosäuren und Wassermoleküle wurden mit dem Skript *model\_map.inp* berechnet. Die in CNS benötigten Parameter- und Topologiedateien des in der Struktur fixierten Glycerins wurden über den HICUP-server erstellt (Kleywegt, 1998, <http://xray.bmc.uu.se/hicup/>).

#### 2.5.4. Validierung der Modelle

Das Modell wurde nach jedem Verfeinerungszyklus mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) auf seine stereochemische Stimmigkeit überprüft. Des Weiteren wurden individuelle R-Werte für die einzelnen Aminosäuren und Wassermoleküle sowie statistische Werte über Bindungslängen und -winkel anhand der Validierungsroutinen von CNS überprüft. Das stärkste Gewicht bei der Beurteilung der Frage, ob sich eine Struktur im Rahmen der Verfeinerung verbessert hatte oder nicht, erhielten die Werte von  $R_{work}$  und  $R_{free}$ . Fiel der Wert von  $R_{free}$  im selben Maß wie  $R_{work}$  nach einem Verfeinerungsschritt, so war das Strukturmodell durch diesen Schritt signifikant verbessert worden.  $R_{work}$  gibt die Übereinstimmung zwischen berechneten ( $F_{calc}$ ) und beobachteten Struktur Faktoren ( $F_{obs}$ ) an, die im Laufe der Verfeinerung optimiert wird:



$$R_{\text{work}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \left| |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$$

Der  $R_{\text{free}}$ -Wert basiert auf dem statistischen Prinzip der Kreuzvalidierung und wurde 1992 von Brünger (Brünger, 1992) in der Kristallographie eingeführt. Bei dieser Methode wird zufallsbasiert ein Testsatz von 5-10 % aller Observationen eines Datensatzes ausgewählt, der bei den Verfeinerungsrechnungen nicht mit einbezogen wird. Für die Berechnung des  $R_{\text{free}}$ -Werts werden jedoch ausschließlich diese Daten verwendet. In der Praxis wurden mit dem Programm *uniqueify* (CCP4, 1994) 5 % der Daten zu einem Testdatensatz zusammengefasst.

### 2.5.5. Substratmodellierung

Das Substrat der BM-CrnA Creatinin wurde zunächst als einfache Valenzstrichformel in das Programm Hyper Chem (Version 5, Fa. Hypercube) eingegeben und die Struktur im ersten Schritt über eine mechanische Kraftfeldberechnung bestimmt (Eingabe: *molecular mechanics force field*). Die Struktur wurde innerhalb des Programms auf semiempirischer Grundlage durch Geometrieanalyse bis zur Konvergenz (209 Zyklen) verbessert (Eingabe: *semi-empirical Y geometry analysis*). Die Koordinaten wurden in das Programm O (Jones et al., 1991) eingelesen und manuell an das aktive Zentrum der BM-CrnA angepasst. Dabei wurden die OH-Gruppen des Diols sowie die Iminogruppe an die im aktiven Zentrum vorhandenen Wassermoleküle angeglichen. Des Weiteren wurde auf hydrophobe Kontaktmöglichkeiten geachtet sowie sterische Konflikte vermieden. Beide manuell gefundenen möglichen Positionen des Creatinins wurden anschließend mit den CNS-Routinen *model\_anneal.inp* (Rice und Brünger, 1994) sowie *model\_minimize.inp* energieminiert. Die in CNS benötigten Topologie- und Parameterdaten des Creatinins wurden über den HICUP-server (Kleywegt, 1998) bestimmt.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. BM-CrnA

##### 3.1.1. Ausgangszustand der BM-CrnA

Das Gen der BM-CrnA wurde im Haus Boehringer Mannheim aus dem Bakterium *P. putida* in *E. coli* kloniert (nach Herstellerangaben). Das Enzym wurde mir in gereinigter Form zur Verfügung gestellt. Es zeigte sowohl im SDS-Gel als auch im MALDI-Massenspektrum eine Hauptbande bei 28.4 kDa. Untersuchungen an einer Gelfiltrationssäule (Diplomarbeit, Beuth, 1997) ergaben für das native Enzym ein Molekulargewicht von etwa 170 kDa. Aus diesem Grund wurde das Vorliegen eines Homohexamers postuliert. Ultrazentrifugationsexperimente (Rikitake et al., 1979) ergaben ein Molekulargewicht von 175 kDa und stützten somit das Ergebnis. Auch die Ergebnisse aus Lichtstreuexperimenten stehen mit diesem Resultat in Einklang (s. 3.1.2). Neben der Hauptbande bei 28.4 kDa beobachtete man im SDS-Gel zwei Subbanden bei 12.7 und 15.7 kDa (Abb. 5 und 6). Die spezifische Aktivität der BM-CrnA, ermittelt aus der Jaffé-Reaktion (Jaffé, 1886), lag bei 180 U/mg.

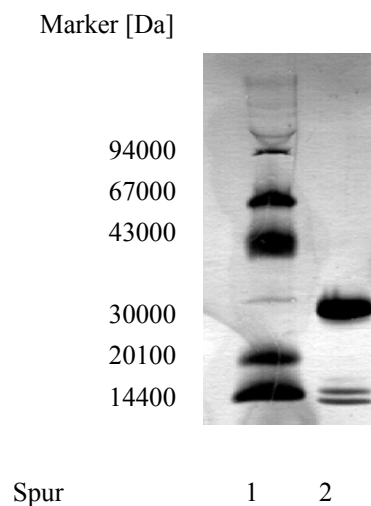


Abb. 5: SDS-Gel der BM-CrnA (Spur 1: Marker, Spur 2: BM-CrnA)

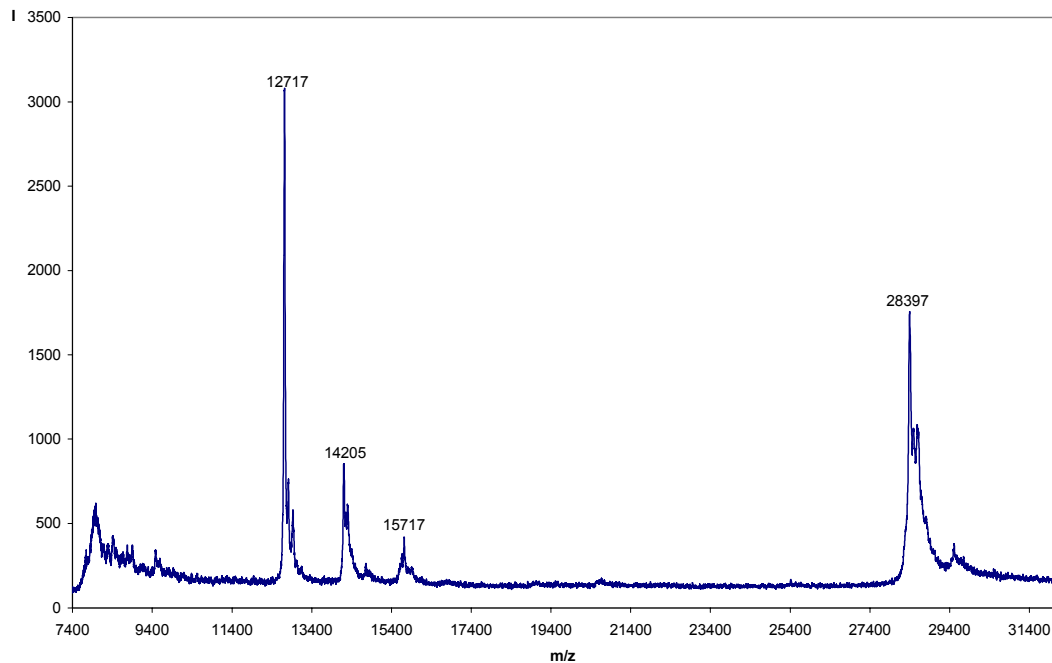


Abb. 6: MALDI-Massenspektrum der BM-CrnA

Das aus dem Massenspektrum ermittelte Molekulargewicht der BM-CrnA von 28.4 kDa pro Untereinheit ist rechnerisch nur mit einer Abspaltung des Methionins in Position 1 zu erklären. Nach Hirel et al. (Hirel et al., 1989) beträgt die Wahrscheinlichkeit der Abspaltung von Methionin vor der Aminosäure Serin in Position 2 (gemäß Sequenzabfolge in der BM-CrnA) in *E. coli* 84 %, was mit dem beobachteten Ergebnis in Einklang steht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden etliche chromatographische und elektrophoretische Methoden getestet, um die beiden Subbanden bei 12.7 und 15.7 kDa abzutrennen, was aber ohne Erfolg blieb. Bei der Analyse dieser Versuche fiel auf, dass im nativen Polyacrylamidgel im Vergleich zum SDS-Gel nur eine Proteinbande zu erkennen war (Abb. 7).

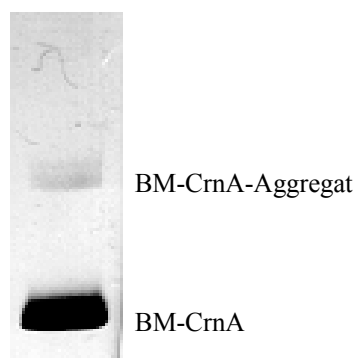


Abb. 7: Natives Polyacrylamidgel der BM-CrnA

Das führte zu der Annahme, dass die beiden Subbanden Abbauprodukte des Enzyms darstellen, was auch durch die Summe der Größen der Subbanden bestätigt wird, die entweder enzymatisch durch Proteolyse oder durch mechanischen Bruch direkt nach der Expression entstehen. Die Abbauprodukte werden vermutlich in das native Hexamer eingebaut und sind somit von dem Enzym nicht abzutrennen. Die demnach vorhandene Homogenität des Proteins ermutigte dazu, Kristallisationsexperimente mit der BM-CrnA fortzusetzen.

### 3.1.2. Analyse des Proteins durch dynamische Lichtstreuung (DLS)

Durch dynamische Lichtstreuexperimente sollte die Homogenität der Proteinlösung in Bezug auf ihr Aggregationsverhalten sowohl in reinem Lösungsmittel als auch unter Zugabe von Salzen und anderen potenziellen Fällungsmitteln für die Kristallisation getestet werden. Eine wichtige Voraussetzung für die Kristallisation besteht darin, eine aggregatfreie Proteinausgangslösung für Kristallisationsexperimente einzusetzen. Des Weiteren sollte ein potenzielles Fällungsmittel bei Zugabe zur Proteinlösung nicht zur Aggregation des Proteins führen (Feher, 1978, D’Arcy, 1994). Feher et al. erstellten 1978 ein Modell der Kristallisation, in dem nichtspezifische Aggregation der Moleküle zu heterogenen Polymeren führt, wohingegen für die Kristallisation eine kooperative, schrittweise Addition der Moleküle über geordnete Komplexe Voraussetzung ist. D’Arcy et al. zeigten in Experimenten, dass Proteine, die aus Oligomermischungen heraus kristallisiert wurden, nur in 8 % der Fälle zu Kristallen führten.

Die BM-CrnA wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml im Puffer 20 mM Tris/HCl pH 8.0 getestet sowie in Puffer plus 10 % Ethanol, 10 % Isopropanol, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 M NaOAc sowie 0.2 M Ca(OAc)<sub>2</sub> (Tab. 3).

Tab. 3: Ergebnisse der DLS-Messungen

Probe	R <sub>H</sub> [nm]	P [nm]	P [%]	MW [kDa]	Basislinie	Fehler
Puffer	4.9	0.8	16.3	173	1.001	1.178
CaCl <sub>2</sub>	4.7	1.0	21.3	149	1.002	2.538
MgCl <sub>2</sub>	5.7	2.0	35.1	268	1.005	5.538
MnCl <sub>2</sub>	7.5	4.3	57.3	620	1.014	16.659
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.6	3.9	51.3	627	1.009	14.103
NaOAc	5.5	1.1	20.0	236	1.002	1.518
Ca(OAc) <sub>2</sub>	5.7	1.6	28.1	274	1.003	2.415
Ethanol	6.2	1.1	17.7	351	1.001	0.605
Isopropanol	6.8	1.4	20.6	458	1.002	1.122

$R_H$	hydrodynamischer Radius
P	Polydispersion
MW	Molekulargewicht

Nach Herstellerangaben (Fa. Protein Solutions) entsprechen Werte für die Polydispersion (Abweichung vom hydrodynamischen Radius) von unter 20 %, eine Basislinie # 1.001 sowie ein Fehler zwischen 0.5 und 5 einer monomodalen Verteilung der Messwerte. Das bedeutet, unter diesen Bedingungen liegen in der Versuchslösung nur Teilchen einer Größe vor, die Lösung ist homogen.

Dies traf nach Tabelle 3 lediglich auf das Enzym in reiner Pufferlösung sowie in 10 % Ethanol zu. BM-CrnA in 20 mM Tris/HCl pH 8.0 war somit als Ausgangsbedingung für Kristallisationsexperimente geeignet. Auch das aus den Messwerten berechnete Molekulargewicht des Enzyms stimmte sehr gut mit dem erwarteten Wert von 170 kDa überein. Calcium-, Magnesium- und Manganchlorid führten bereits bei einer Konzentration von 50 mM zur Aggregation des Enzyms. Die Aggregatbildung nahm in der Richtung Calcium-, Magnesium-, Manganchlorid zu. Diese Salze dürften kaum als Fällungsmittel für Kristallisationsexperimente geeignet sein. Ihre Eignung als Zusatz zur Ausgangslösung des Enzyms mit dem Ziel der Stabilisierung durch die zweiwertigen Kationen konnte nach diesem Experiment nur bedingt bewertet werden, da für diesen Zweck noch geringere Salzkonzentrationen benötigt werden. Ein Zusatz an  $MnCl_2$  schien nach den Messwerten auf jeden Fall kritisch zu sein.

Natrium- und Calciumacetat sowie Ammoniumsulfat wurden in der Konzentration 0.2 M für die DLS-Messung eingesetzt, in welcher sie auch als Zusatz in Kristallisationsansätzen getestet wurden. Natrium- und Calciumacetat und in besonderem Maß Ammoniumsulfat führten zur Aggregation der BM-CrnA. Auch diese für die Proteinkristallisation klassischen Salzzusätze schieden nach diesem Test zumindest in Konzentrationen  $\geq 0.2$  M für die Kristallisation der BM-CrnA aus.

Bemerkenswert waren die Werte für 10 % Ethanol. Die Werte für Polydispersion, Basislinie und Fehler sprachen eindeutig für eine monomodale Verteilung der Teilchen in der Lösung. Der hydrodynamische Radius und die daraus bestimmte Größe der Partikel lagen jedoch deutlich über dem Molekulargewicht der BM-CrnA. Die Viskosität von reinem Ethanol liegt bei  $1.19 \cdot 10^{-3} \text{ Nsm}^{-2}$  im Vergleich zu  $1.02 \cdot 10^{-3} \text{ Nsm}^{-2}$ , der Viskosität von Wasser. Demnach konnte die Viskosität nicht die Ursache für das zu hoch berechnete Molekulargewicht des Proteins sein. Möglicherweise bildete sich unter den Lösungsbedingungen ein geordneter Proteinkomplex aus etwa 2 hexameren Molekülen. Eine solche geordnete Anlagerung könnte nach Feher eine mögliche Vorstufe der Kristallisation sein.

Die Ergebnisse dieser Experimente wurden dahin gehend genutzt, Kristallisationsexperimente mit Ethanol und weiteren niedermolekularen Alkoholen als Fällungsmittel zu starten.

### 3.1.3. Kristallisation

Zu Beginn der Arbeit lagen zwei unterschiedliche Kristallisationsbedingungen vor, die zu nichtisomorphen Kristallen führten. Diese Kristallisationsbedingungen waren im Rahmen der eigenen Diplomarbeit (Beuth, 1997) gefunden worden. Unter den Bedingungen 0.2 M  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , 20.4 % PEG 6000, 0.1 M Cacodylatpuffer pH 6.5 wuchsen monokline Kristalle mit den Gitterparametern  $a = 75.4 \text{ \AA}$ ,  $b = 95.7 \text{ \AA}$ ,  $c = 117.3 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 104^\circ$ . In 0.2 M  $\text{Na}(\text{OAc})$ , 20 % PEG 8000, 0.1 M Cacodylatpuffer pH 6.6 bildeten sich hexagonale Kristalle mit den Gitterparametern  $a = 96.8 \text{ \AA}$ ,  $b = 96.8 \text{ \AA}$ ,  $c = 155.8 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 120^\circ$ . Die Kristalle waren in beiden Fällen nicht gut reproduzierbar. Datensätze der Kristalle ließen sich nicht skalieren, was vermutlich auf Fehlordnung der Kristalle oder auf einen nicht richtig eingestellten Detektor (Inbetriebnahme der Röntgenanlage, 1997) zurückzuführen war.

Nach den Ergebnissen aus den Lichtstreuexperimenten (s. 3.1.2) wurden Kristallisationsansätze mit niedermolekularen Alkoholen durchgeführt. Für erste Tests in dieser Richtung wurden Proteinkonzentrationen von 10 bzw. 20 mg/ml und als Fällungsmittel die Alkohole Ethanol, Isopropanol, Dioxan und tert.-Butanol in einer Konzentration von 5 - 40 % eingesetzt. Der pH-Wert wurde zwischen 7.5 und 9.0 variiert. Unter Verwendung von 33 - 40 % Ethanol als Fällungsmittel bei pH 7.5 - 8.5 und einer Proteinkonzentration von 20 mg/ml wuchsen Nadeln im Tropfen. Im weiteren Verlauf wurden die Alkohole in Kombination mit verschiedenen PEG's als Fällungsmittel getestet. Die Parameter wurden zufallsbasiert 6-dimensional im Rahmen eines studentischen Praktikums variiert. Art und Konzentration von PEG und Alkohol sowie pH-Wert und Temperatur konnten in den Ansätzen beliebig verändert werden. Als Ergebnis wurden Einkristalle bis zu einer Größe von 0.2 mm in jeder Dimension unter den Bedingungen 20 - 32 % Isopropanol, 16 % PEG4000, pH 7.0 gefunden sowie verwachsene und kleine Kristalle ( $< 0.1 \text{ mm}$ ) unter den Bedingungen 20 - 28 % Isopropanol, 20 - 22 % PEG4000, pH 7.0, RT sowie 18 - 30 % Ethanol, 20 % PEG8000, pH 7.5, RT. Die Fällungssysteme Isopropanol/PEG4000 sowie Ethanol/PEG8000 wurden optimiert und führten zu Kristallen mit einer maximalen Größe von  $0.3 \times 0.3 \times 0.2 \text{ mm}$  (Abb. 5), die reproduzierbar in dem allerdings weiten Bereich von 16 - 22 % Ethanol, 20 - 27 % PEG8000, pH 7.5, 12 - 18 mg/ml Proteinkonzentration wuchsen. Der erste vollständige native Datensatz wurde an einem Kristall gemessen, der bei einer Proteinkonzentration von 12 mg/ml, unter den Fällungsbedingungen 22 % Ethanol, 20 % PEG8000, 0.1 M MOPS pH 7.5 gewachsen war. Die Kristalle gehörten zum monoklinen Kristallsystem und zeigten die Gitterparameter  $a = 74.8 \text{ \AA}$ ,  $b = 94.0 \text{ \AA}$ ,  $c = 116.2 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 104.3^\circ$ . Es zeigte sich hier also die gleiche Kristallform wie unter den Fällungsbedingungen PEG6000/ $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , die bereits bekannt waren.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass es schwierig war, reproduzierbare Kristallisationsbedingungen für die BM-CrnA zu finden. Das größte Problem waren immer wieder auftretende

Kristalle mit ausgeprägten Baufehlern (Abb. 9), die im selben Bereich wie Einkristalle ohne Baufehler auftraten. Die Tendenz des Enzyms zur Ausbildung von fehlgeordneten Kristallen zeigte sich auch bei Diffraktionsmessungen, die mehrfach nicht skalierbare Daten hervorbrachten sowie in der hohen Mosaizität aller berechneten Datensätze ( $0.7^\circ - 1.2^\circ$ ). Es liegt nahe, die Begründung hierfür in der heterogenen Zusammensetzung der Proteinprobe zu sehen. Da dieser Punkt nicht verbessert werden konnte (s. 3.1.1), mussten diese - in Bezug auf Reproduzierbarkeit und Flüchtigkeit des Fällungsmittels - schwierigen Kristallisationsbedingungen in Kauf genommen werden, was letztlich zum Erfolg führte.

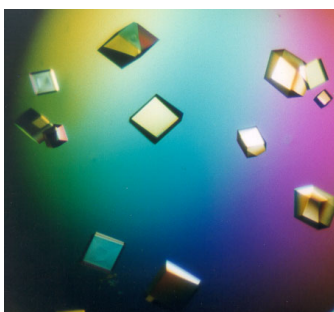


Abb. 8: Einkristalle

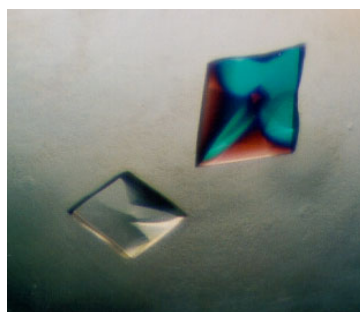
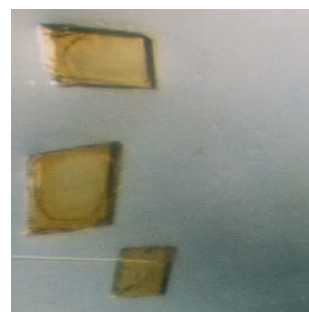


Abb. 9: Kristalle mit Baufehlern

Abb. 10: Kristalle nach Pt-Soaking  
(hier: angelöste Kristalle)

#### 3.1.4. Schwermetallderivate

Für eine gelungene Derivatisierung wurde die Platinverbindung  $K_2PtCl_4$  direkt zu dem Tropfen pipettiert (Endkonzentration etwa 5 mg/ml), in dem der Kristall gewachsen war. Das Platinsalz wurde dazu zunächst bis zur Sättigung in künstlicher Mutterlauge in Lösung gebracht (etwa 50 mg/ml). Die Kristalle blieben auf diese Weise nach Schwermetallzugabe auch über Nacht äußerlich unversehrt. Ein Umbetten der Kristalle in Schwermetalllösung oder künstliche Mutterlauge war vermutlich wegen der Flüchtigkeit des Fällungsmittels schwierig und führte in der Regel bei Verweilzeiten des Kristalls in Lösung  $> 10$  min zu Rissen im Kristall. Ein Umbetten der Kristalle führte lediglich bei Verwendung der wirklichen Reservoirolösung zum Erfolg. Soakingzeiten von 1 h bei einer Pt-Konzentration von 5 mg/ml reichten für eine Derivatisierung des Enzyms nicht aus (nach Absorptionsspektrum). Soaking über Nacht führte zum geordneten Einbau von Pt-Atomen in den Kristall; man konnte über Nacht eine schwache Gelbfärbung der Kristalle erkennen, nach mehreren Tagen wurde die Gelbfärbung der Kristalle intensiver und sie begannen allmählich zu zerfallen (Abb. 10). Mechanischer Stress innerhalb der Kristalle nach Einbau der Schweratome spiegelte sich in einer Mosaizität von  $0.7^\circ$  und verringerter Auflösung ( $3.0 \text{ \AA}$ ) im Vergleich zu nativen Daten wider.

### 3.1.5. Temperaturstabilität der BM-CrnA

Das Temperaturverhalten der BM-CrnA wurde kalorimetrisch (DSC, Abb. 11) sowie mittels Circular dichroismus (Abb. 12) untersucht. Die Messungen ergaben einen einzigen Schmelzpunkt der Struktur, an dem sich Quartär- und Sekundärstruktur auflösen bzw., beachtet man das leichte *tailing* im DSC-Spektrum zu niedrigeren Temperaturen hin, zwei sehr dicht beieinander liegende Temperaturen für das Aufbrechen der Quartärstruktur sowie Sekundärstruktur.

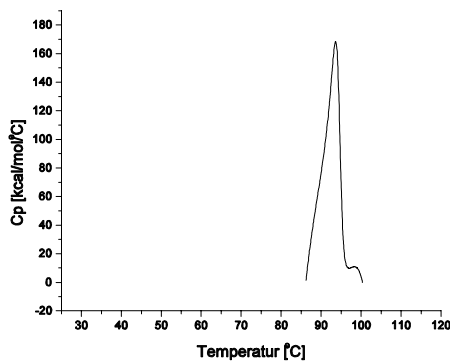


Abb. 11: DSC-Spektrum der BM-CrnA

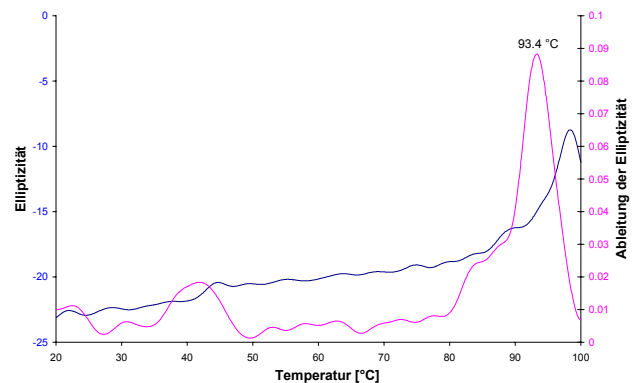


Abb. 12: CD-Temperaturscan der BM-CrnA

Die nach den beiden Methoden berechneten Schmelzpunkte lagen bei 93,5 °C bzw. 93,4 °C und stimmten somit sehr gut überein. Der durch CD-Messung bei einer Wellenlänge von 222 nm erfasste Schmelzpunkt bezieht sich im Gegensatz zu den kalorimetrischen Messwerten lediglich auf das Verschwinden von Helices in der Struktur, d. h. die Auflösung der Sekundärstrukturelemente des Proteins. Der sehr hohe Schmelzpunkt der BM-CrnA von über 90 °C zeichnet das Enzym als thermostabil aus. Da das Protein aus einem mesophilen Organismus stammt, ist die hohe Temperaturverträglichkeit des Enzyms ungewöhnlich. Man würde hier evolutive Verwandtschaft zu entsprechenden Enzymen aus thermophilen Organismen erwarten. In der Tat zeigten Sequenzvergleiche (BLAST) Homologien zwischen 24 % und 29 % über den gesamten Sequenzbereich zu Proteinen aus thermophilen Organismen, die 100 %ige Konservierung der Aminosäurereste der BM-CrnA-Metallbindungsstelle des aktiven Zentrums aufwiesen und dadurch mit ziemlicher Sicherheit als Creatininasen charakterisiert werden können (s. 3.1.6). Ein typisches Merkmal von thermophilen Proteinen ist ihr Vorliegen als Homomultimerkomplex (Vetriani et al., 1998), was mit der hexameren Struktur der BM-CrnA in Einklang steht.



### 3.1.6. Sequenzvergleich und multiples Sequenzalignment der BM-CrnA

Es wurden Sequenzvergleiche gegen die nichtredundante SWISS-PROT- und TREMBLE-Proteindatenbank auf dem NCBI-Server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) auf der Ebene von Proteinsequenzen (BLASTP) bzw. Nucleotidsequenzen (Übersetzen in alle *open reading frames* (TBLASTN)) durchgeführt. Es zeigten sich Sequenzhomologien zwischen 42 % und 24 % über den gesamten Sequenzbereich. Viele dieser Sequenzen stammten aus Sequenzierungsprojekten, bei denen die Charakterisierung des entsprechenden Proteins noch ausstand. Als charakteristisch ähnlich und vermutlich der Creatininase zuzuordnen, wurden diejenigen Sequenzen eingestuft, die eine vollständige Sequenzhomologie zu den Aminosäuren des aktiven Zentrums der BM-CrnA besaßen. Es zeigte sich, dass BM-CrnA-homologe Sequenzen lediglich in Bakterien und Archaea vorkommen, Ähnlichkeiten zu eukaryotischen Proteinen wurden nicht gefunden. Dieses Ergebnis stimmt mit der Zuordnung der Creatininase innerhalb der Proteinfamilien-Datenbank PFAM (Bateman et al., 2000) überein. Hier wurde die Creatininase aus *P. putida* nach Yamamoto et al. (Yamamoto et al., 1995) als Ausgangspunkt der Proteinfamilie der Creatininasen gewählt und Verwandtschaft zu Sequenzen in Bakterien und Archaea nachgewiesen.

Von diesen Ergebnissen ausgehend, wurde ein multiples Sequenzalignment mit neun Creatininasesequenzen aus *P. putida* (3), *Arthrobacter sp.*, *Bacillus halodurans*, *Streptomyces coelicolor*, *Halobacterium sp.*, *Aeropyrum pernix* und *Sulfolobus solfataricus* durchgeführt (Tab. 4, Abb. 13), wobei die drei letztgenannten zu den Archaea gehören und gleichzeitig thermophile Organismen darstellen.

Tab. 4: Nummerierung der Sequenzen und *score* in Bezug auf Sequenz eins

Nummer	Organismus (Autor)	<i>score</i> (in Bezug auf 1)	Datenbankeintrag
1	<i>P. putida</i> (BM)	100	-
2	<i>P. putida</i> (Yamamoto)	96	pir    T48846
3	<i>P. putida</i> (Tang)	37	gb   AAD45612.1
4	<i>Arthrobacter sp.</i>	34	pir    T44251
5	<i>Bacillus halodurans</i>	27	dbj   BAB03945.1
6	<i>Streptomyces coelicolor</i>	22	emb   CAC16449.1
7	<i>Halobacterium sp.</i>	24	gb   AAG18747.1
8	<i>Aeropyrum pernix</i>	23	pir    B72692
9	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	20	emb   CAC23898.1

```

1      MRKSVFVGELTWKEYEARVAAGDCVLMPLVPGALEEQHGHHMCMNVDVLLPTAVCQ RVAERI
2      MSKSVFVGELTWKEYEARVAAGDCVLMPLVPGALEEQHGHHMCMNVDVLLPTAVCKRVAERI
3      MNDSVIVIGELTWPEYARRVASG-SPIFLPVGALEQHGHHMCMNVDVLLPTALCKAVARNV
4      -----ISNMTWNEYQDKVDKG--FLILPVGSTEQHGPHLPLGVDAVISTQFSLAIAREL
5      -----IAILPIGAIEAHGPHLPLETDNLLAERLSILVAKRV
8      -----VLPVGSTEQHGPHAPLGTDHITAHAVAAAGADAY
6      -----ELTWREVR RAGERG--IALLPIGSEQHAGHLPMTDTLLVVEEVDRALDLL
7      -----EAKDLPGRALPVL PFGSVEQH-CSLPLATDALLAEAAAARGACELL
9      -----GDLVGLVPVGSIEQHGPHLPMGTDGIISEYIASKAEKLL
          .:*.*: * *      : .* :

1      G-----ALVLPGLQYGYKSQQKSGGGNHFPGTTSLDGATLTGTVQDI IRELARHG
2      G-----ALVMPGLQYGYKSQQKSGGGNHFPGTTSLDGATLTGTVQDI IRELARHG
3      D-----GLVLP---IGLRLQVAAKIGRRKPLSRHHQPGWRNTDTYHPGHHQGAGP
4      N-----AAVAPVLSYGYKSLPASGGGPMFPGTIDLKGSTLTSLVYDLEEFIADG
5      G-----AFVLP TLPYQVWSLKN----FPGSITVSNESLVNMLVDLGE SLYNQG
8      S-----DGEVIVAPPITVG--VSAEHRQFTGTLWVAPDTFRATVRDVGSLASHG
6      DREAPGASEGTGAPVPEIVRLPALPFGHSPHHLFAAAVLSAATLGAVLDDVLDLSLVTSG
7      ER-----EHGVA CLLPTMYYGFSPEWAGYPGTLSLSLSTISGVVRD LLESLSRSWG
9      KD-----ITLLFP TIIYGV SLEHKGF PFVSLSFQTAISFFTDLLESVFN DLG
          .
          .

1      VRRLLVMNGHYENSMFIVEGIDLALRELRYAGIHDFKVVVLSYWDFVKDPAVIQRLYPEG
2      ARRLVLMNGHYENSMFIVEGIDLALRELRYAGIQDFKVVVLSYWDFVKDPAVIQQLYPEG
3      ARRASAGD--DERALRETPCSSWKASTWRCANSVMPASPIRSWSCPTGTSSTRLSSRN
4      WKKILIFSAHFENEAF LSEACDLLRNQKEE--FPKVLICNWDNLSAETMSKVDFEVR
5      FSIFSMVNGHLGNSVALKEAARKLYER-----Y PDLQVLYFFYPGMSEVVSSIRETP
8      WDRVVVVNGHGGNTAALGEVCATITRQ-----DDAYAVPFTWFDVAVG
6      YHRIMVVNGHGGND EIMRLAVKRFALRAR-----VTVAACSYWTLTAGDDAG
7      FDRAAI INGHGNTSVLEAAAREASRSL-----MVVG VASYWAF
9      LRRIIIVNGHGGNSYFLPLVQREFNMKHS-----DAKVIVFNTFGEEKI
          .
          .

1      FLGWDIEHGGVFETS-----LMLALYPDLVDLERVVDHPPATFPPYDVFPVD-----P
2      FLGWDIEHGGVFETS-----LMLALYPDLVDLDRVVDHPPATFPPYDVFPVD-----P
3      STLTDSVGT LNTVASSRLRWMLALHPEKVDLTRAVDHPPATFPPYDVFPPII-----A
4      FPGWALEHAAISETS-----LMMHFSPELVKEDLITDEGVNPPPTYQSFPPS-----K
5      SSHNTYFHACIETS-----LMLYL APEYVDMERAICDIPVILSADATPTP-----W
8      DHSSDMGHAGPLETA-----FLRHTDPELIREDRV-----
6      RPDVTPGHAGWFETS-----LMLAAHPGLVRTVPVARTPVEPPPLFDRPPHPGLTVERHG
7      LPAQDLGHGDVEAS-----LL-----
9      LFNVNDLHAGTIETS-----KIWAIGKSLVRVNKI-----
          .
          .
          .

1      ARTPAPGTLSSAKTASREKGELILEVCVQGIADAIGQEFPPPT
2      ARTPAPGTLSSAKTASREKGELILEVCVQGIADAIREEFPPPT
3      ERTPACGTLSSPKGASREKGELILRVCTEGISNAVREAF---
4      TLIPASGCLHSAYSSSAEKGLIALDATKNIVSFLIKEF---
5      EEFTDTAVLGDATLATKEKGEKVISVVL DNI VQVIEE-----
8      -----
6      EWERVDGSTDDASGADADRGRRLLDDRARGLARAIR-----
7      -----
9      -----

```

Abb. 13: Multiples Sequenzalignment von Creatininasen aus unterschiedlichen Organismen erstellt mit ClustalW (die Aminosäuren der Zinkbindung sind fett unterlegt; vollständig oder teilweise konservierte Reste sind mit einem Stern bzw. einem Punkt oder Doppelpunkt gekennzeichnet)

Deutlich erkennt man anhand des *Alignments* die Konservierung der Aminosäurereste, die an der Koordination des Zinks beteiligt sind. Hier fällt lediglich die Sequenz drei (CrnA aus *P. putida*, Tang et al., 1999) aus dem Rahmen, die sehr hohe Homologie im N- und C-terminalen Bereich aufweist, jedoch nur sehr geringe Übereinstimmung im mittleren Sequenzbereich besitzt. Da diese Diskrepanz innerhalb der gleichen Art unwahrscheinlich ist, umso mehr, da sie sich auch über Reste des aktiven Zentrums erstreckt, lag möglicherweise ein falsches Klonierungs- oder Sequenzierungsergebnis der Autoren vor. Neben den fett unterlegten Resten der Zinkbindungsstelle lagen in allen Sequenzen einige weitere konservierte Reste vor, die entweder strukturgebend oder funktionell von besonderer Bedeutung sein dürften. Außer der Zuordnung zur Creatininasefamilie machten diese Sequenzvergleiche deutlich, dass die BM-CrnA-Sequenz evolutive Verwandtschaft zu Sequenzen aus entwicklungsgeschichtlich alten Organismen besitzt.

### 3.2. CrnA aus *Pseudomonas putida* var. *naraenses*

Für die Isolierung des CrnA-Gens wurde der Stamm *P. putida* var. *naraenses* gewählt, da nach Rikitake et al. (Rikitake et al., 1979) das gesuchte Enzym in diesem *Pseudomonas*-Stamm exprimiert wird. Das Ziel der selbst durchgeführten Klonierung und Expression bestand zum einen darin, größeren Einfluß auf die Reinheit des Proteins zu haben und zum anderen, Selenomethionin-CrnA für MAD-Experimente exprimieren zu können.

#### 3.2.1. Isolierung und Klonierung des CrnA-Gens

Zunächst wurde die genomische DNA aus den *P. putida*-Zellen isoliert. Diese wurde für die genomische PCR des CrnA-Gens verwendet. Für das Design der PCR-Primer mussten die folgenden Gesichtspunkte berücksichtigt werden:

- C Einfügen von geeigneten Restriktionsschnittstellen für die anschließende Klonierung in ein Expressionsplasmid
- C geeignete Länge der Primer (25-30 b)
- C Schmelztemperatur der Primer ungefähr gleich
- C möglichst hohe Komplementarität der Primer zum CrnA-Gen

Die sequentielle Grundlage für die Primersynthese bildete die von Yamamoto et al. (Yamamoto et al., 1995) veröffentlichte Sequenz des CrnA-Gens. Es wurden die Restriktionsschnittstellen BamHI und SphI benötigt, die das CrnA-Gen flankieren sollten, um den späteren Einbau in das Plasmid pQE70 zu ermöglichen. Das zu amplifizierende Gen wurde mit einer Größe von 800 bp erwartet.

Aus diesen Überlegungen folgte die Wahl der Primer.

Primer 1 (SphI-Schnittstelle, Startcodon ATG):

5' - TATTTGCATGCGCAAGAGTGTTTTTGTAGG-3'

Primer 2 (BamHI-Schnittstelle, komplementäres Stopcodon TGA):

AGT

5' - AATGGATCCTCAGGTGGGCGGGAAC - 3'

Es wurden mehrere PCR-Ansätze bei unterschiedlicher *Annealing*-Temperatur durchgeführt, die schlecht reproduzierbar ein 800 bp Fragment enthielten. Es gelang nicht, diese Genfragmente zu klonieren und zu analysieren. Im Rahmen einer Gradienten-PCR, bei der in parallelen Ansätzen

die *Annealing*-Temperatur variiert wurde, konnte erneut ein 800 bp Fragment neben weiteren unspezifischen Fragmenten amplifiziert werden (Abb. 14).

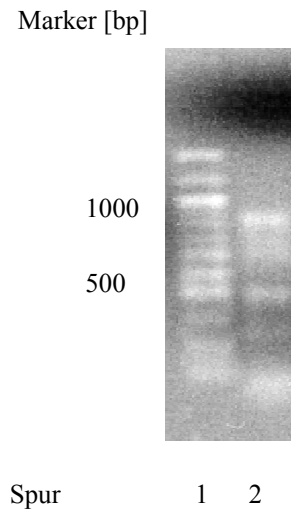


Abb. 14: 1 % Agarosegel der genomischen PCR mit *Annealing*-Temperaturgradienten; Bande bei ca. 800 bp erkennbar (Spur 2)

Das Fragment wurde gereinigt, mit den Restriktionsenzymen BamHI und SphI verdaut und mit dem ebenso verdauten Plasmid pQE70 ligiert und in *E. Coli* XLIBLue-Zellen transformiert.

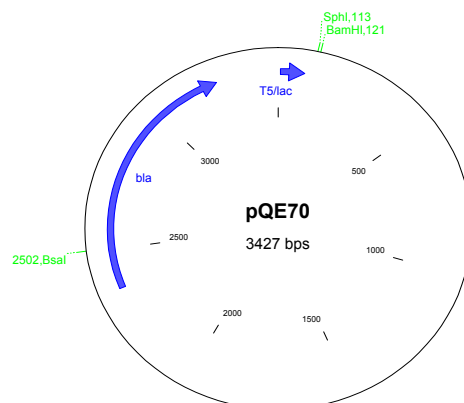


Abb. 15: Schematische Darstellung des Originalplasmids pQE70 (Fa. Quiagen)

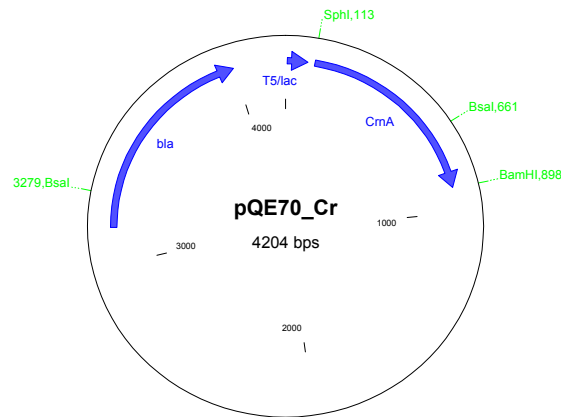


Abb. 16: Schematische Darstellung des Plasmids pQE70 mit dem Insert CrnA

Die Kolonien, die auf Amp-haltigem Medium gewachsen waren, wurden angezüchtet und ihre Plasmide präpariert und analysiert. Die Plasmide wurden zum Teil mit dem Restriktionsenzym BsaI und zum anderen Teil mit den Enzymen BamHI und SphI verdaut. Mit dem Programm CLONE (Scientific & Educational Software, Version 4.01, 1995) wurden diese Restriktionsanalysen theoretisch berechnet. BsaI-Verdau sollte zu zwei Fragmenten der Größen 2618 bp sowie 1586 bp führen, Verdau mit BamHI/SphI zu Fragmenten der Größe 3427 bp und 777 bp führen (Abb. 17).

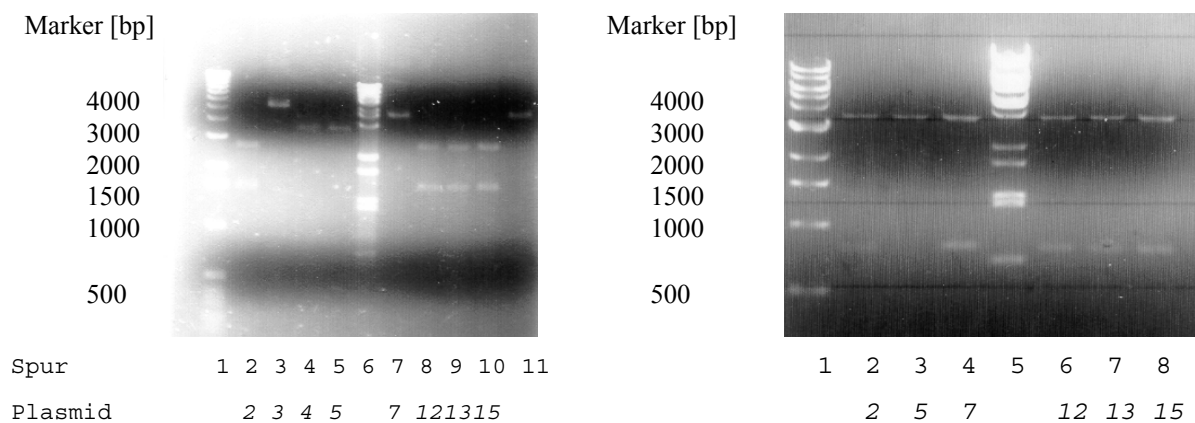


Abb. 17: 1 % Agarosegele des BsaI-Verdau (links) und des BamHI/SphI-Verdau (rechts) verschiedener Plasmidpräparationen

Die theoretisch ermittelten Größen der Fragmente nach Plasmidverdau stimmen hervorragend mit den experimentell für Plasmid 2, 12, 13 und 15 erhaltenen Größen überein. Plasmid 5 wurde für die beiden dargestellten Agarosegele exemplarisch ausgewählt. Insgesamt zeigten 12 von 20 analysierten Plasmiden das Spaltungsmuster von Plasmid 5. Das Spaltungsmuster zeigt in beiden Spaltungsansätzen nur eine Bande bei 3400 bp. Dieses Ergebnis spricht für eine Rückfaltung von unvollständig verdautem Plasmid pQE70 während der Ligation ohne Einbau des PCR-Fragments. Plasmid 7 zeigt bei Verdau mit BsaI nur eine Bande bei etwa 4200 bp, bei BamHI/SphI-Verdau das Bandenmuster 800 bp und 3400 bp. Dieses Aufspaltungsmuster konnte bei 3 von 20 Plasmiden beobachtet werden (teilweise nur BsaI-Verdau). Hier liegt entweder eine Mutation der BsaI-Schnittstelle im Bereich des CrnA-Gens vor, Einbau eines falschen Fragments in das Plasmid oder unvollständiger Verdau mit der Restriktionsendonuclease BsaI. Plasmid 3 zeigt eine Bande bei etwa 5000 bp. Möglicherweise wurde hier das CrnA-Gen zweifach in den Vektor eingebaut bei gleichzeitig unvollständigem Verdau mit BsaI.

Die positiv getesteten Klone 2, 12, 13 und 15 wurden in einer Glycerin-Stockkultur angelegt. Das Ergebnis der Restriktionsanalyse wurde durch Sequenzierung der vier Klone überprüft.

### 3.2.2. Sequenzierung und Sequenzvergleich

Die Insertsequenzen der nach der Restriktionsanalyse positiven Klone 2, 12, 13 und 15 konnten durch die Sequenzierung eindeutig als Gene der CrnA nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde ausschließlich mit Plasmid 12 gearbeitet. Das dargestellte Ergebnis der Sequenzierung bezieht sich ebenfalls auf Plasmid 12, wobei lediglich in Klon 2 eine Punktmutation beobachtet wurde. Die BM-CrnA-Sequenz unterscheidet sich von der CrnA (Klon 12)-Sequenz in zwei Basen. Der Austausch in Position 4 (AYC) kommt durch das Einfügen der

SphI-Schnittstelle zustande. Diese Mutation war in den Primern für die genomische PCR enthalten und führte gleichzeitig zu einem Aminosäureaustausch von Ser nach Arg. Der zweite Austausch in Position 291 (TY C) hat keinen Aminosäureaustausch zufolge. Diese Variation in einer Base liegt in allen vier Klonen vor. An Position 209 hat eine Punktmutation im CrnA-Gen von Klon 2 stattgefunden (AY G), was zu dem Aminosäureaustausch Tyr<sup>Y</sup> Cys führt. Zusammenfassend betrachtet unterscheiden sich BM-CrnA und CrnA (Klon 12) in zwei Basen bzw. einer Aminosäure. Zusätzlich bleibt jedoch bei dem Aminosäureaustausch in Position zwei die Frage offen, ob Methionin in Position 1 abgespalten wird oder nicht. Nach Hirel et al. (Hirel et al., 1989) wird Met vor Ser in 84 % aller Fälle abgespalten (die Abspaltung von Met in der BM-CrnA wurde in Kapitel 3.1.1 dargestellt), wohingegen Met vor Arg nur mit einer Wahrscheinlichkeit von unter 0.1 % abgespalten wird. Der Vergleich mit der CrnA-Sequenz nach Yamamoto et al. führte zu einer Sequenzidentität von 91 % auf Genebene bzw. 97 % auf Proteinebene (Abb. 18).

CrnA 1	atgcgcaagagtgtttttgtaggtgagctgacctggaaagagtacgagggc
BM	atgagcaagagtgtttttgtaggtgagctgacctggaaagagtacgagggc
Yam	atgagcaagagtgtttttgtaggtgagctgacctggaaggagtacgagggc
CrnA 51	acgtgtcgcggcaggtgactgcgtgctgatgctgccggtcggtgccctgg
BM	acgtgtcgcggcaggtgactgcgtgctgatgctgccggtcggtgccctgg
Yam	gcgtgtcgcggcaggtgactgcgtgctcatgctgccggtcggtgccctgg
CrnA 101	aacagcatggccatcacatgtgcatgaacgtagatgtactgctgcccacg
BM	aacagcatggccatcacatgtgcatgaacgtagatgtactgctgcccacg
Yam	aacagcacggccatcacatgtgcatgaacgtagatgtgctgctgcccacg
CrnA 151	gcgggtgtgccagcgggtcgccgagcgcacatcggtgcgctggtgctgccggg
BM	gcgggtgtgccagcgggtcgccgagcgcacatcggtgcgctggtgctgccggg
Yam	gcgggtgtgcaagcgggtcgccgagcgcacatcggtgcgctggtcatgccggg
CrnA 201	cctgcaatacggctacaagtcccagcagaagtccggcggaggcaaccact
BM	cctgcaatacggctacaagtcccagcagaagtccggcggaggcaaccact
Yam	gctgcagtagcggctacaagtcccagcagaagtccggcggaggcaatcact
CrnA 251	tccccggtaccaccagcctggacggcgccaccctcactggcacggtgcag
BM	tccccggtaccaccagcctggacggcgccaccctcactggtagcgggtgcag
Yam	tccccggcaccaccagcctggatggcgccaccctgactggcacggtgcag



CrnA 301      gacatcatccgcgagctggcgcgctcacggcgctgcgccgtctggtgctgat  
BM            gacatcatccgcgagctggcgcgctcacggcgctgcgccgtctggtgctgat  
Yam          gacatcatccgcgagctggcgcgccatggtgcgcgctcgccctggtactgat

CrnA 351      gaacggccactatgagaactcgatgttcatcgtcgaaggcatcgacctcg  
BM            gaacggccactatgagaactcgatgttcatcgtcgaaggcatcgacctcg  
Yam          gaacggccactacgaaaattccatgttcatcgtcgaaggcatcgacctcg

CrnA 401      ccctgcgatgaactgcgctacgccggcatccacgacttcaagggtggtggtg  
BM            ccctgcgatgaactgcgctacgccggcatccacgacttcaagggtggtggtg  
Yam          ccctgcgagctgcgctatgccggcatccaggacttcaaagtggtggtg

CrnA 451      ctctcctactgggatttcgtgaaggaccggctgtgatccagcggctcta  
BM            ctctcctactgggatttcgtgaaggaccggcggtgatccagcggctcta  
Yam          ctctcctactgggacttcgtcaaggaccggctgtgatccagcagctcta

CrnA 501      ccccgagggcttcctcggctgggacatcgagcacgggtggtgtcttcgaga  
BM            ccccgagggcttcctcggctgggacatcgagcacgggtggtgtcttcgaga  
Yam          tcccgagggcttcctcggctgggacatcgagcacggcggcgtcttcgaga

CrnA 551      cctcgctgatgctcgccctgtatccggatttggtggacctggagcgcgctc  
BM            cctcgctgatgctcgccctgtatccggatttggtggacctggagcgcgctc  
Yam          cctccctgatgctggctttgtaccggacctggtggacctggaccgcgctc

CrnA 601      gtcgatcaccgcccgcgaccttcccgccctacgacgtgttcccgggtgga  
BM            gtcgatcaccgcccgcgaccttcccgccctacgacgtgttcccgggtgga  
Yam          gtcgatcaccacactgcaaccttcccaccctatgacgtgttcccgggtcga

CrnA 651      cccggcgcgcaccccggtccgggcaccctgtcctcggcgaagaccgcca  
BM            cccggcgcgcaccccggtccgggcaccctgtcctcggcgaagaccgcca  
Yam          cccggcccgtacgccggcgccgggactctgtcgtcggcgaagaccgcca

CrnA 701      gccgggagaagggcgagctgatcctcgaggtctgcgtccagggcatcgcc  
BM            gccgggagaagggcgagctgatcctcgaggtctgcgtccagggcatcgcc  
Yam          gccgagagaagggcgagttgatcctggaggtctgcgtccagggcattgcc

```

CrnA 751      gacgccatcgggccaggagttcccgccccacctga
BM            gacgccatcgggccaggagttcccgccccacctga
Yam          gacgctatccgcgaggagttcccgccccacctga

```

Abb. 18: Sequenzvergleich von CrnA (Klon 12), BM-CrnA und CrnA (Yamamoto, 1995)

Daraus leitet sich folgende Aminosäuresequenz der nativen CrnA ab:

```

1      MRKSVFVGEL TWKEYEARVA AGDCVLMMLPV GALEQHGHHM CMNVDVLLPT
51     AVCQRVAERI GALVLPGLQY GYKSQQKSGG GNHFPGTTSL DGATLTGTVQ
101    DIIRELARHG VRRLVLMNGH YENSMFIVEG IDLALRELRY AGIHDFKVVV
151    LSYWDFVKDP AVIQRLYPEG FLGWDIEHGG VFETSLMLAL YPDLVDLERV
201    VDHPFATFPP YDVFPVDPAR TPAPGTLSSA KTASREKGEL ILEVCVQGIA
251    DAIGQEFPP

```

### 3.2.3. Expression und Reinigung

Das Enzym wurde in dem *E. coli*-Stamm M15 (pREP4) exprimiert. Die Expressionsanalyse zeigte im SDS-Gel zwei sehr starke Expressionsbanden bei etwa 29 kDa und 31 kDa (Abb. 19).

Marker [Da]    M 0h 4h

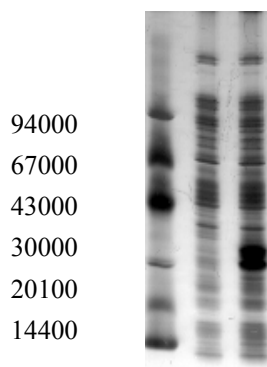


Abb. 19: SDS-Gel der CrnA-Expression vor der Induktion (0 h) und 4 h nach der Induktion

Die massenspektrometrische Analyse (Abb. 20) zeigte, dass diese Banden eine Massendifferenz von 1.4 kDa (Tab. 5) aufweisen.

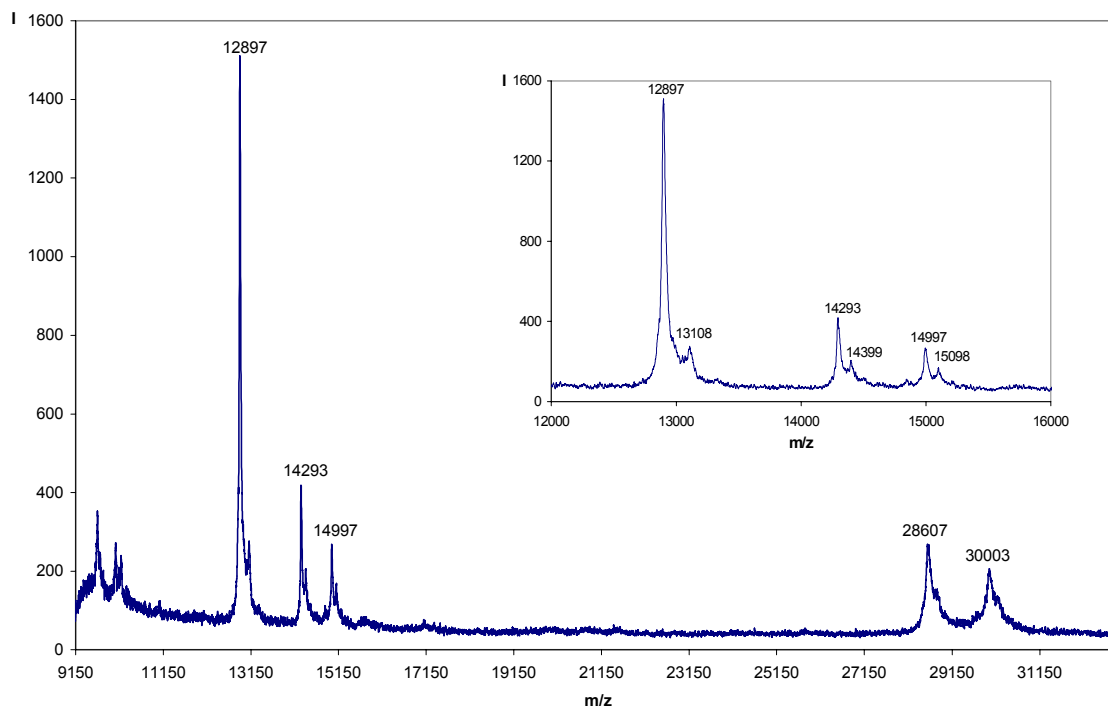


Abb. 20: Massenspektrum der CrnA mit vergrößerter Darstellung der Sidapinsäureaddukte im Massenbereich zwischen 12 kDa und 16 kDa

Tab. 5: Zuordnung der Peaks im Massenspektrum

m/z	Zuordnung
12897	M <sup>+</sup> Y „kl. Fragment“
14293	M <sup>2+</sup> Y CrnA
14997	M <sup>2+</sup> Y CrnA + 1400 Da
28607	M <sup>+</sup> Y CrnA
30003	M <sup>+</sup> Y CrnA + 1400 Da

Neben diesen beiden Banden waren nach der Reinigung des Proteins noch zwei weitere Banden bei geringerem Molekulargewicht sowohl im SDS-Gel als auch im Massenspektrum zu sehen, die mit den beiden Subbanden der BM-CrnA identisch zu sein schienen („kleines“ und „großes“ Fragment). Das „gr. Fragment“ ist im Massenspektrum in Abbildung 20 nur sehr schwach zu erkennen und deshalb im Spektrum und in der Zuordnung nicht aufgeführt (vgl. 3.3.2., Abb. 25). Insgesamt ist die Reinigung des Proteins über eine Ni-Affinitätssäule (Abb. 21) sehr effizient. Das SDS-Gel (Abb. 22) zeigt, dass fast sämtliches Zellprotein in einem einzigen Reinigungs-

schritt abgetrennt werden kann. In Spur 1 erkennt man im Durchlauf den überwiegenden Anteil an Zellprotein sowie CrnA, in den Eluatfraktionen 1 und 2 erkennt man die bereits beschriebenen Banden der CrnA. Die Banden des Markers bei 20 und 30 kDa sind in diesem Gel nur sehr schwach zu erkennen (vgl. Abb. 19).

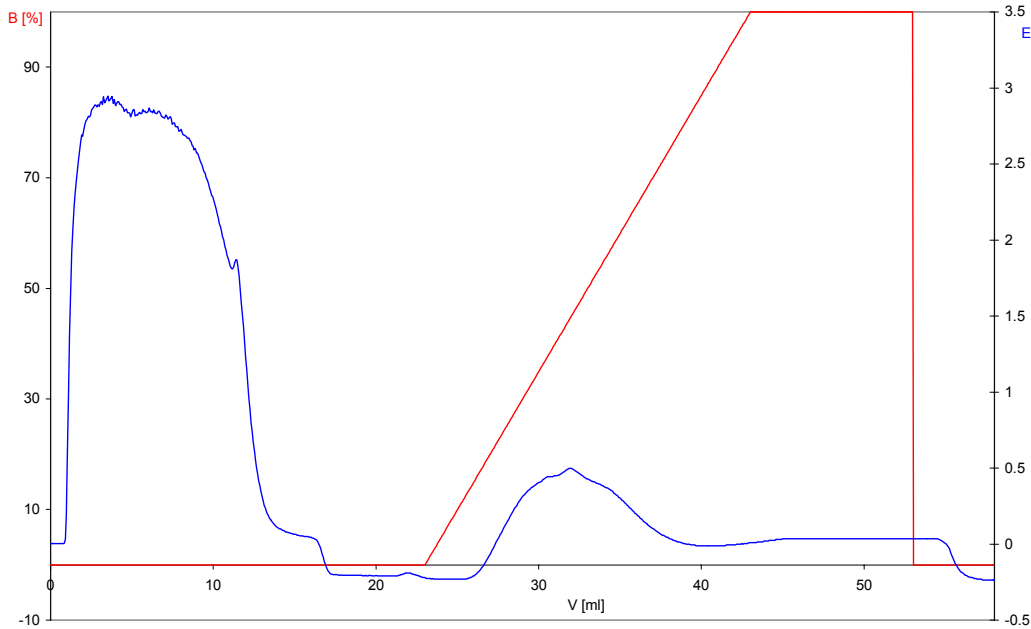
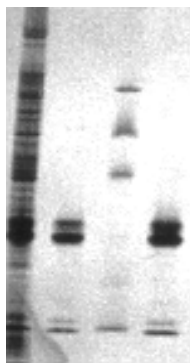


Abb. 21: Chromatogramm der Proteinreinigung über eine Ni-Affinitätssäule



Spur	1	2	3	4
	DL	E1	M	E2

Abb. 22: SDS-Gel der Proteinreinigung über eine Nickel-Affinitätssäule

Da das Enzym keinen His-Tag besitzt, jedoch über eine Zinkbindungsstelle verfügt, dürfte die Bindung an die Säule über diesen Bereich stattfinden. Im zweiten Reinigungsschritt über eine Gelfiltrationssäule wurde lediglich CrnA-Aggregat abgetrennt. Insgesamt ist das Resultat der Aufreinigung, nach SDS-Gel und Massenspektrum beurteilt, unbefriedigend. Eine Abtrennung der zusätzlichen Banden konnte nicht erreicht werden. Im Vergleich dazu sah man im nativen Gel (Abb. 23) wie bei der BM-CrnA (s. Kapitel 3.1.1) lediglich eine breite Bande, was auch hier zu der Annahme führte, dass die beiden Fragmente bei geringerem Molekulargewicht Abbau-produkte des Enzyms darstellen, die im nativen Hexamer eingebaut werden.

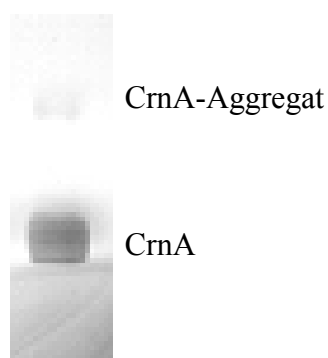


Abb. 23: Natives Gel der CrnA

Die Summe der Molekulargewichte von „kleinem“ und „großem“ Fragment (Abb. 25) entsprach wie erwartet dem Molekulargewicht der CrnA. Eine genaue Analyse des Massenspektrums (Abb. 20) unterstrich diese Analyse. Es konnte ein sehr gut aufgelöstes Spektrum gemessen werden, in dem man deutlich die Sidapinsäureaddukte der einzelnen Peaks erkennt, was zuverlässig Aufschluss darüber gibt, ob es sich um einfach oder zweifach geladene Ionen handelt ( $m/z$  Sidapinsäure  $\cdot$  200 Da). Der Peak bei  $m/z$  12897 stammt demnach mit einer Massendifferenz zwischen Peak und Addukt von etwa 200 Da eindeutig von einem einfach geladenen Ion, die Peaks bei  $m/z$  14293 und  $m/z$  14997, die beide eine Massendifferenz von 100 Da zwischen Peak und Addukt aufweisen, stammen von zweifach geladenen Ionen. Das Zustandekommen der Proteinfraktion bei 30 kDa konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise wurde das Enzym aufgrund seiner starken Expression in *E. coli* mit einer *leader*-Sequenz versehen, die im bakteriellen Organismus zum proteolytischen Abbau des Enzyms führen soll. Ein Größenvergleich mit bekannten *E. coli leader*-Sequenzen führte aber zu keiner prägnanten Übereinstimmung.

Die Masse des CrnA-Monomers lag nach dem Massenspektrum bei 28607 Da. Das berechnete Molekulargewicht betrug 28599 Da, unter der Annahme, dass das Methionin in Position 1 nicht abgespalten wurde. Das Ergebnis des Massenspektrums untermauerte somit die bereits in Kapitel 3.1.2 getroffene Vermutung, dass das Methionin in Position 1 nach der Expression des Proteins im Gegensatz zur BM-CrnA nicht abgespalten wird.

Expression und Reinigung des Proteins führen insgesamt zu einer Ausbeute von 10 mg Protein aus 1 l Kultur. Die Klonierung des CrnA-Gens in *E. coli* ist gelungen, jedoch führte die Expression des Proteins zu einer starken Doppelbande, deren Ursache nicht geklärt werden konnte.

### 3.3. Selenomethionincreatininase (SeMet-CrnA)

Der Ansatz für die Darstellung des Selenomethioninderivats der CrnA besteht darin, die Met-Biosynthese in dem entsprechenden Expressionsstamm zu blockieren. In Prokaryoten wird die Met-Biosynthese durch Lys, Thr, Phe und Leu blockiert. CrnA enthält sieben Methionin-positionen pro Untereinheit.

#### 3.3.1. Expression

SeMet-CrnA wurde im *E. coli*-Stamm M15 (pREP4) im Überschuss von Lys, Phe, Thr, Ile, Val und SeMet exprimiert. Diese Aminosäuren wurden 15 min vor der Induktion zum Expressionsmedium gegeben. Im SDS-Gel (Abb. 24) erkennt man deutlich die starke SeMet-CrnA-Expression.

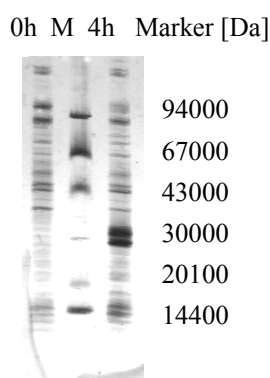


Abb. 24: SDS-Gel der SeMet-CrnA-Expression vor der Induktion (0 h) und 4 h nach der Induktion

Wie beim nativen Protein sind zwei Expressionsbanden um 30 kDa zu erkennen. Der Nachweis, dass es sich bei dem exprimierten Protein um SeMet-CrnA handelte, erfolgte nach Reinigung des Proteins massenspektrometrisch.

#### 3.3.2. Massenspektrometrische Analyse und deren Konsequenzen

Für die massenspektrometrische Analyse wurden native CrnA (Reinigung nur über Ni-Chelatsäule, vgl. 3.2.3) und SeMet-CrnA (Reinigung über Ni-Chelatsäule und Gelfiltration, vgl. 3.3.3) gemischt und getrennt auf den Spots eines Targets präpariert. Der Vergleich der Spektren (Abb. 25 und 26) zeigt, dass es sich bei der exprimierten Creatininase tatsächlich um SeMet-CrnA handelt.

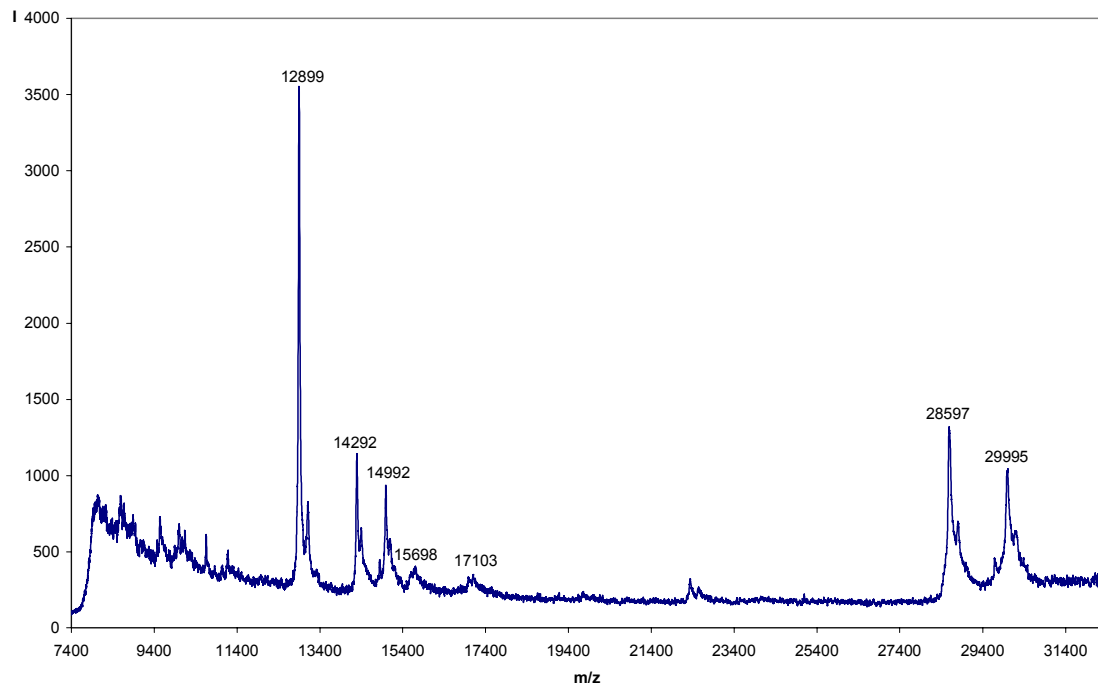


Abb.25: Massenspektrum der nativen CrnA

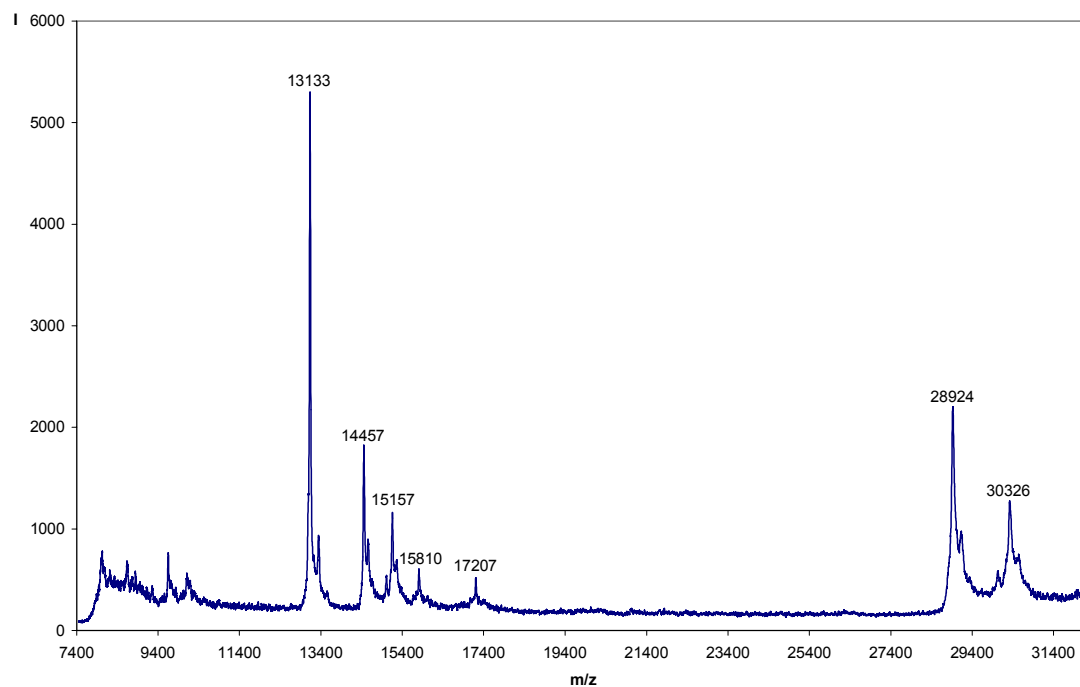


Abb. 26: Massenspektrum der SeMet-CrnA



Tab. 6: Gegenüberstellung der Massenspektren von CrnA (nat) und SeMet-CrnA (sm)

CrnA (nat)			
	m/z	sm - nat [m/z]	Zuordnung
	12899		M <sup>+</sup> Y „kl. Fragment“
	14292		M <sup>2+</sup> Y CrnA
	14992		M <sup>2+</sup> Y CrnA + 1400 Da
	15698		M <sup>+</sup> Y „gr. Fragment“
	17103		unbek. Verunreinigung
	28597		M <sup>+</sup> Y CrnA
	29995		M <sup>+</sup> Y CrnA + 1400 Da
SeMet-CrnA (sm)			
	13133	234	M <sup>+</sup> Y „kl. Fragment“
	14457	165	M <sup>2+</sup> Y CrnA
	15157	165	M <sup>2+</sup> Y CrnA + 1400 Da
	15810	112	M <sup>+</sup> Y „gr. Fragment“
	17207		unbek. Verunreinigung
	28924	327	M <sup>+</sup> Y CrnA
	30326	331	M <sup>+</sup> Y CrnA + 1400 Da

Der *Shift* zwischen den Molekülion-Peaks im Spektrum der SeMet-CrnA und der nativen CrnA beträgt 327 Da, die theoretische Differenz bei 7 Methioninen beträgt 7 x 47 Da, d. h. 329 Da (Tab. 6). Die Massendifferenz der „kleinen Fragmente“ beträgt 234 Da, was fünf SeMet-Positionen entspricht, die Differenz der „großen Fragmente“ 100 Da, was zwei SeMet-Positionen entspricht. Sofern die beiden Fragmente tatsächlich Bruchstücke der CrnA sind, sollte aus der Verteilung der Methionine in der Sequenz (Abb. 27) genau die Position der Bruchstelle bestimmbar sein.

```

1      MRKSVFVGEL TWKEYEARVA AGDCVLMLPV GALEQHGHHM CMNVDVLLPT
51     AVCQ RVAERI GALVLPGLQY GYKSQQKSGG GNHFPGTTSL DGATLTGTVQ
101    DIIRELARHG VRRLVLMNGH YENSMFIVEG IDLALRELRY AGIHDFKVVV
151    LSYWDFVKDP AVIQRLYPEG FLGWDIEHGG VFETSLMLAL YPDLVDLERV
201    VDHP PATFPP YDVFPVDPAR TPAPGTLSSA KTASREKGEL ILEV CVQGIA
251    DAIGQEFPPT

```

Abb. 27: CrnA-Sequenz; Methionine hervorgehoben

Der Vergleich zeigt, dass das „kl. Fragment“ nur dem N-Terminus entsprechen kann, da hier eine entsprechende Häufung der Methionine vorliegt. Die Bruchstelle liegt zwischen Aminosäure Met117 und Met124. Berechnungen der Fragmentgrößen ergeben (server: [http://www.up.univ-mrs.fr/~wabim/d\\_abim/compo-p.html](http://www.up.univ-mrs.fr/~wabim/d_abim/compo-p.html)), dass die Bruchstelle in der Sequenz nach Gly119 kommt. Die Größe von Fragment AS1-AS119 beträgt rechnerisch 12900 Da, die Größe des anderen Fragments beträgt 15717 Da. Die Ergebnisse stimmen sehr gut mit den im Massenspektrum gefundenen Größen von „kl. und gr. Fragment“ überein. Auch der Vergleich mit dem Massenspektrum der BM-CrnA (s. 3.1.1, Abb. 6) spricht für diese Deutung der Fragmente. Das „gr. Fragment“ der BM-CrnA zeigt mit  $m/z$  15718 wie erwartet den errechneten Wert des C-terminalen Fragmentes. Das „kl. Fragment“ weist jedoch ein  $m/z$  12714 auf. Die Differenz von 186 Da im „kl. Fragment“ von BM-CrnA und CrnA entspricht genau dem Unterschied von Met in Position 1 und der Mutation SerY Arg in Position 2 der nativen CrnA. Mögliche Ursachen des für die CrnA typischen Bruchs der Kette an dieser Position lassen sich nur vermuten. Denkbar sind proteolytischer Verdau oder mechanischer Bruch im Verlauf der Proteinfaltung.

### 3.3.3. Reinigung

Das Protein wurde im ersten Schritt über Ni-Chelat-Affinitätschromatographie mit Stoßelution gereinigt und im zweiten Schritt über hydrophobe Interaktionschromatographie. Wie beim nativen Protein ist hier der Reinigungsschritt über eine Ni-Chelatsäule sehr effektiv. Man erkennt im SDS-Gel (Abb. 28) die SeMet-CrnA-Hauptbande bei ca. 29 kDa sowie die Subbanden bei 13 und 16 kDa sowie 31 kDa. Die bei ca 17 kDa im SDS-Gel sichtbare Verunreinigung kann im zweiten Reinigungsschritt stark reduziert werden. Ebenso scheint der Anteil an SeMet-CrnA-Subbande bei 31 kDa nach dem zweiten Reinigungsschritt geringer zu sein. Das Massenspektrum (Abb. 29) bestätigt diese Beobachtung.

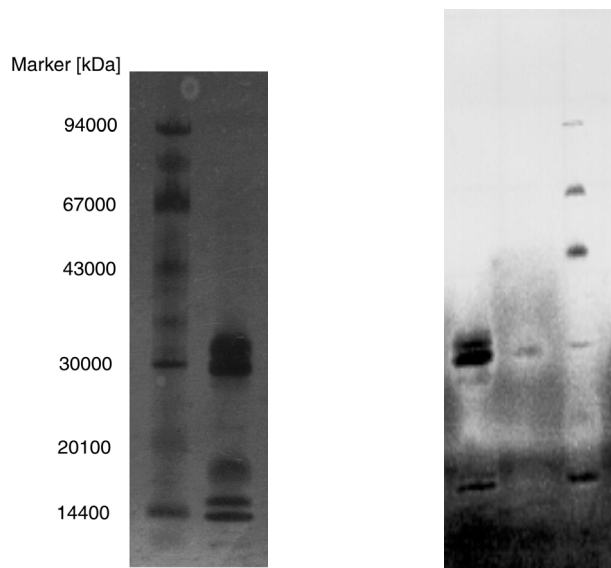


Abb. 28: SDS-Gel der Reinigung der SM-CrnA über Ni-Affinitätschromatographie (links) und hydrophobe Interaktion (rechts)

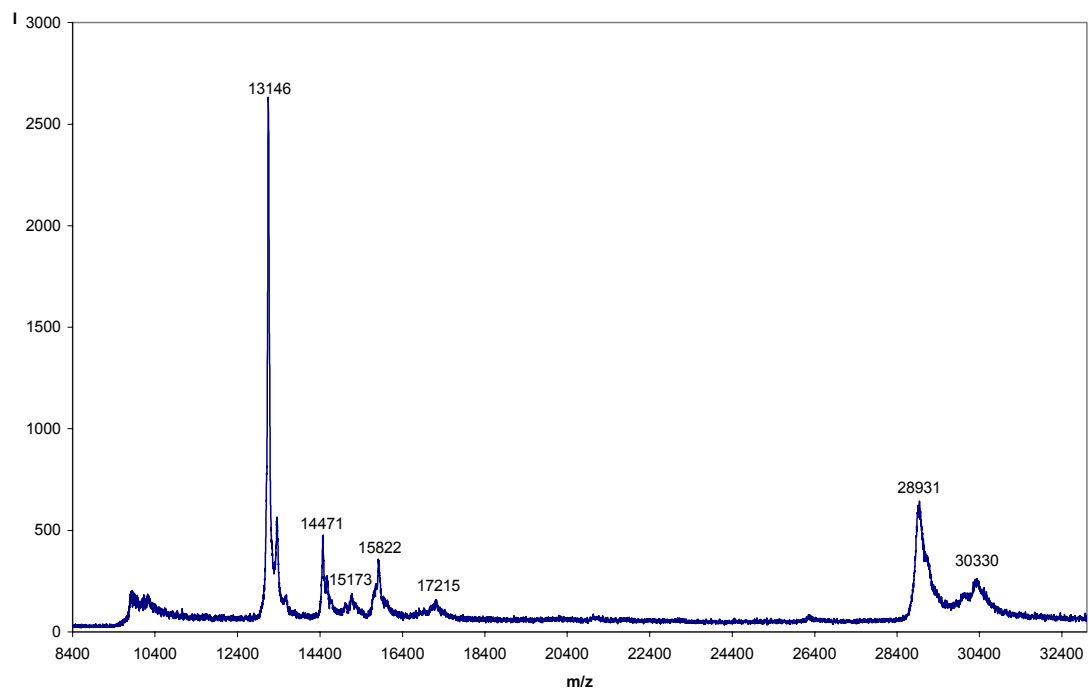


Abb. 29: Massenspektrum der SeMet-CrnA nach der Reinigung

Vergleicht man dieses Spektrum mit dem Massenspektrum in Abb. 26 erkennt man deutlich, dass die Proteinfraction bei 30.3 kDa einen wesentlich geringeren Anteil am Gesamtprotein aufweist. Der Reinigungsverlauf ist insgesamt dem der nativen CrnA vergleichbar. Die Ausbeute an gereinigtem Protein beträgt 7 mg aus 1 l Kultur.

### 3.3.4. Kristallisation und Diffraktionsmessung

Für die Kristallisation wurden Proteinlösungen in einer Konzentration zwischen 8 mg/ml und 20 mg/ml eingesetzt. Die Kristallisationsbedingungen wurden an die erfolgreichen Bedingungen der BM-CrnA angelehnt. Unter den Bedingungen 10-25 % Ethanol, 10-30 % PEG8000, 0.1 M HEPES pH 6.8-7.7 wuchsen in den Kristallisationsansätzen jedoch nur stark verwachsene Kristalle (Abb. 30). Der Wechsel zu PEG3350 führte zu gleichmäßig gewachsenen Einkristallen, die maximale Kantenlängen von 0.15 mm in jeder Dimension aufwiesen (Abb. 31).

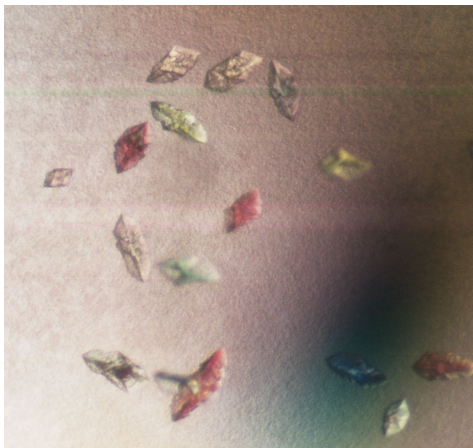


Abb. 30: SeMet-CrnA-Kristalle  
(PEG8000 als Fällungsmittel)

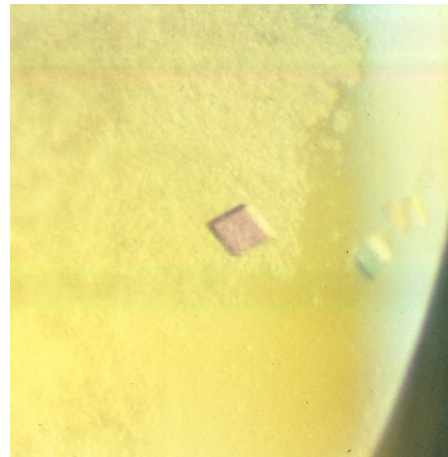


Abb. 31: SeMet-CrnA-Kristalle  
(PEG3350 als Fällungsmittel)

Die Kristalle wuchsen neben amorphem Präzipitat. Die Bedingungen für PEG3350 wurden von 10-30 % EtOH, 10-35 % PEG3350, 0.1 M HEPES pH 7.5 variiert. Die größten Kristalle waren nach 10 Monaten unter den Bedingungen 20 % EtOH, 35 % PEG3350, 0.1 M HEPES pH 7.5 gewachsen.

Kristalle, die eine Größe von 0.1 mm in jeder Dimension besaßen, wurden an der eigenen Röntgenanlage und an einer Synchrotron-*beamline* vermessen. Die Kristalle streuten bis ca. 7 Å. Sie konnten nicht indiziert werden. Die größeren sehr langsam gewachsenen Kristalle wurden nicht vermessen.

### 3.4. Strukturlösung der BM-CrnA

#### 3.4.1. Nativer Datensatz (Kupferdrehanode)

Ein erster nativer Datensatz wurde an einer Kupferdrehanode der Firma Nonius mit angeschlossenenem Mac Science DIP 2030 Detektor bei 100 K bis zu einer Auflösung von 2.5 Å gemessen (Abb. 32). Die Indizierung und Skalierung der Daten mit DENZO und SCALEPACK (Otwinowski, 1997) führte zu der Raumgruppe  $P2_1$  mit den Gitterparametern  $a = 74.8 \text{ \AA}$ ,  $b = 94.0 \text{ \AA}$ ,  $c = 116.2 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 104.3^\circ$ .

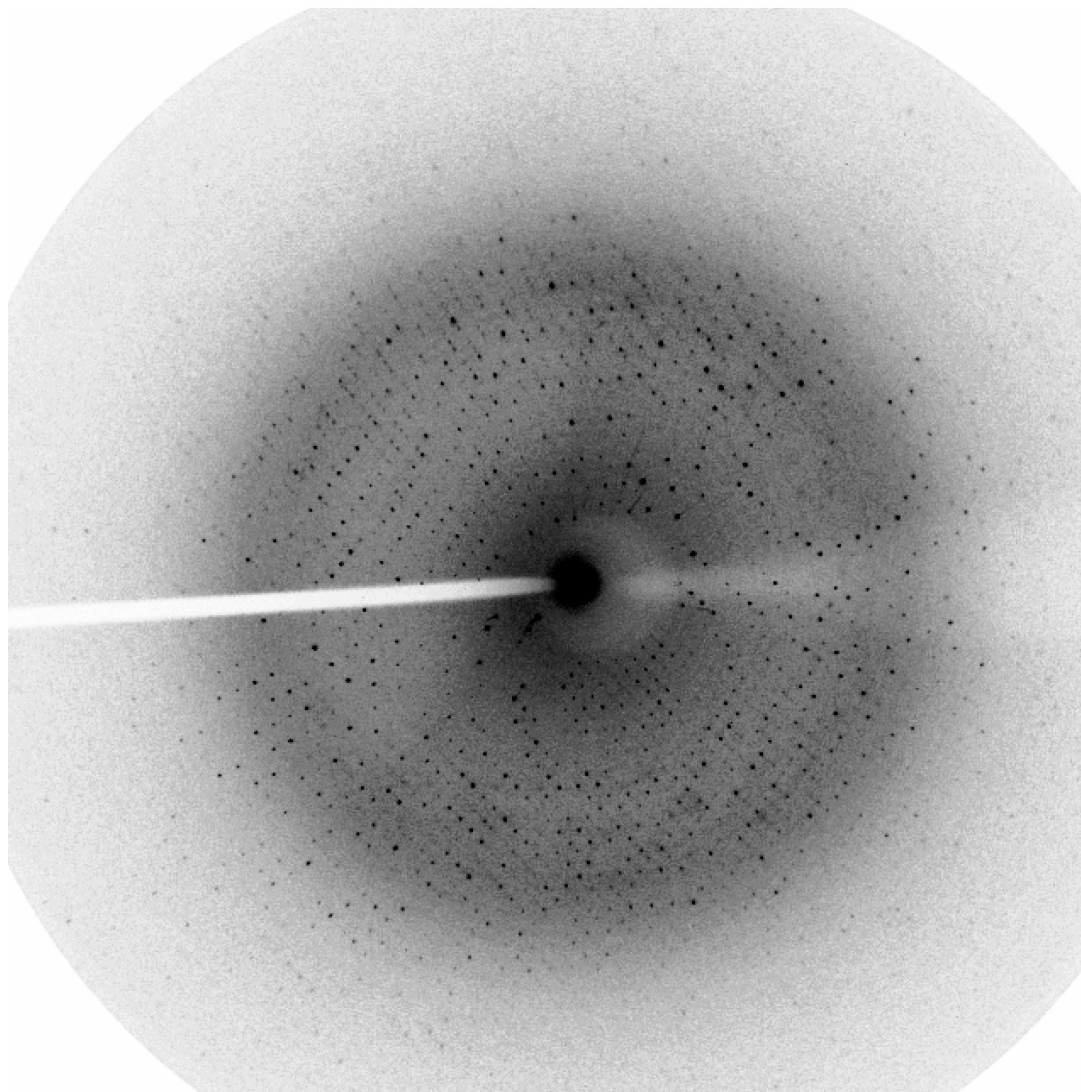


Abb. 32: Eine Beugungsaufnahme des nativen Datensatzes

Als Auflösungsgrenze für die Skalierung wurde die Auflösungsschale mit einem Signal/Rauschverhältnis von  $I/\sigma(I) > 2$  gewählt. Der  $R_{\text{sym}}$ -Wert des Datensatzes über alle Auflösungsschalen beträgt 9.7 % (Tab. 7). Der Datensatz ist zwischen 50 Å und 2.5 Å vollständig, seine Redundanz beträgt 3.9.

Tab. 7: Statistik des nativen Datensatzes: es gehen 208 Aufnahmen bei einer Drehung des Kristalls von 1°/Aufnahme in die Statistik ein; die Zahlen in Klammern geben die Statistik der höchsten Auflösungsschale an.

Wellenlänge [Å]	1.54178
Auflösungsbereich [Å]	50 - 2.5
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>
Anzahl an Reflexen	212677
Anzahl unabhängiger Reflexe	53895
Volumen d. Elementarzelle [Å <sup>3</sup> ]	8.2 · 10 <sup>5</sup>
Vollständigkeit [%]	99.7 (99.3)
$I/\sigma(I)$	13.8 (2.8)
$R_{\text{sym}}$ [%]	9.7 (45.2)

Der  $R_{\text{sym}}$ -Wert gibt die Abweichung der Intensitäten  $I$  symmetrieverwandter Reflexe vom Mittelwert  $\bar{I}$ , des entsprechenden Reflexes an:

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

$i$ :  $i$  Beobachtungen eines „Röntgenreflexes“

Damit sagt er Wesentliches über die Güte des Datensatzes aus. Mit knapp 10 % liegt der  $R_{\text{sym}}$ -Wert dieses Datensatzes relativ hoch. Eine mögliche Ursache dafür wird im später folgenden Abschnitt 3.4.1.2 diskutiert.

1968 führte B. W. Matthews (Matthews, 1968) eine statistische Analyse anhand von 116 bekannten Proteinkristallen durch. Er dividierte das Volumen der asymmetrischen Einheit in Å<sup>3</sup> durch das Molekulargewicht des Proteins in Dalton und die Anzahl der Proteinmoleküle pro asymmetrischer Einheit. Das Ergebnis, der als Matthew-Parameter bekannte Wert  $V_M$  [Å<sup>3</sup>/Da] (eigentlich partielles Molvolumen), lag bei der überwiegenden Zahl der untersuchten Proteine

zwischen 1.7 und 4.0. Anhand dieser statistisch ermittelten Werte kann bei bekannter Größe der Elementarzelle eines Proteinkristalls sowie bekannter Raumgruppe die Anzahl der Proteinmoleküle bzw. seiner Protomeren pro asymmetrischer Einheit abgeschätzt werden.

$$V_M = \frac{V_{AE}}{M_P \cdot n_{Prot}}$$

$V_{AE}$  : Volumen der asymmetrischen Einheit [ $\text{\AA}^3$ ]

$M_P$  : Molekulargewicht des Proteins [Da]

$n_{Prot}$  : Anzahl der Proteinmoleküle pro asymmetrischer Untereinheit

Der monokline Kristall weist zwei asymmetrische Einheiten pro Elementarzelle auf.

Mit  $V_{AE} = 4.1 \cdot 10^5 \text{\AA}^3$  und  $M_P = 170000 \text{ Da}$  errechnete sich für  $n_{Prot} = 1$  ein Wert für den Matthew-Parameter von  $V_M = 2.4 \text{\AA}^3/\text{Da}$ . Demnach sollte ein hexameres BM-CrnA-Molekül in der asymmetrischen Einheit des Kristalls vorliegen. Berücksichtigt man nun weiterhin das spezifische Volumen eines Proteins ( $v_{Prot} = 0.82 \text{ cm}^3/\text{g}$ , Andersson und Hovmüller, 2000), kann man den Gehalt an Lösungsmittel ( $X_S$ ) im Kristall berechnen:

$$X_P = 1.36/V_M \quad ; \quad 1 - X_P = X_S$$

$X_P$  : Proteingehalt im Kristall

Der monokline BM-CrnA-Kristall hat einen Lösungsmittelanteil von 44 %, was mit den durchschnittlichen Lösungsmittelanteilen von Kristallen der Raumgruppe  $P2_1$  übereinstimmt (Andersson und Hovmüller, 2000).

#### 3.4.1.1. Selbstrotationsfunktion

Es wurden Selbstrotationsrechnungen durchgeführt, um nach nichtkristallographischer Symmetrie (NCS) zu suchen. Hierbei wird eine native Pattersonfunktion ( $P_i(u_i)$ ) des Datensatzes in den drei Raumrichtungen rotiert, wobei häufig ein Polarkoordinatensystem ( $\varphi, \psi, \kappa$ ) verwendet wird, und mit der unrotierten Funktion ( $P(u)$ ) überlagert.

Mathematisch betrachtet wird nach denjenigen Winkelpositionen gesucht, bei denen es zu maximaler Überlappung zwischen der rotierten und der unrotierten Funktion kommt:

$$R(\varphi, \psi, \kappa) = \int_U P(u) \times P_r(u_r) du$$

$R(\varphi, \psi, \kappa)$ : Überlappungsfunktion

An diesen Stellen beobachtet man Maxima in der Selbstrotationsfunktion. Sie entsprechen den Symmetrieachsen der Raumgruppe oder NCS-Achsen. Da die Raumgruppensymmetrie bekannt ist, lassen weitere Peaks auf NCS schließen. Als Ergebnis der Selbstrotationsfunktion wurden drei Peaks bei  $\kappa = 180^\circ$  und einer bei  $\kappa = 120^\circ$  gefunden (Abb. 33).

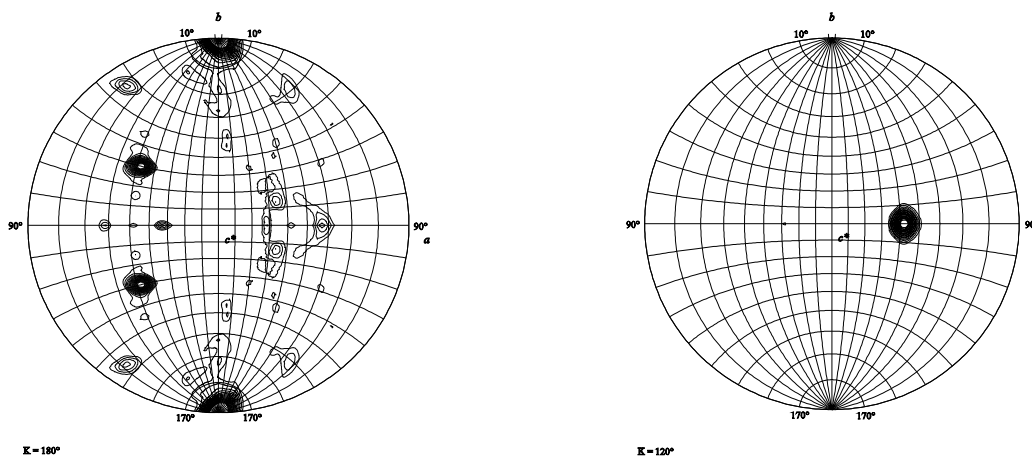


Abb. 33: Selbstrotationsfunktion  $\kappa = 180^\circ$  (links),  $\kappa = 120^\circ$  (rechts)

Der intensivste Peak bei  $\kappa = 180^\circ$ ,  $\varphi = 0^\circ$ ,  $\psi = 0^\circ$  entspricht der kristallographischen zweifachen Achse. Die zwei weiteren Peaks bei  $\kappa = 180^\circ$  wiesen eine Intensität von 55 % im Vergleich zum intensivsten Peak auf und sollten lokale zweizählige Symmetrieachsen darstellen, die die Untereinheiten des oligomeren Proteins ineinander überführen. Es wurde vermutet, dass eine dritte lokale zweizählige Achse parallel zu der kristallographischen Achse liegt. In einem solchen Fall liegen die Peaks von kristallographischer Symmetrie und NCS übereinander. Diese Interpretation führte zu der Annahme, dass drei zweizählige NCS-Achsen vorliegen, die einen Winkel von  $60^\circ$  zueinander aufweisen. Der Peak bei  $\kappa = 120^\circ$  zeigte eine Intensität von 56 % verglichen zum Hauptpeak und stellt eine dreizählige NCS-Achse dar, die senkrecht zu den drei zweizähligen Achsen steht (Tab. 8).



Tab. 8: Polarwinkel der Peaks in der Selbstrotationsfunktion

$\varphi$ [°]	$\psi$ [°]	$\kappa$ [°]	Intensität [%]
0	0	180	100
137	60	180	55
137	120	180	55
48	91	120	56

Die Selbstrotationsfunktion zeigte damit die hexamere Quartärstruktur und eine  $D_3$ -Punktsymmetrie des Enzyms. Man kann sich das Molekül also als Dimer von Trimeren oder auch Trimer von Dimeren vorstellen. Im Laufe der Strukturlösung war die hohe nichtkristallographische Symmetrie von großer Bedeutung bei der molekularen Mittelung der Elektronendichte zur Verbesserung der experimentellen Dichte (s. 3.4.3.3) sowie bei der Strukturverfeinerung (s. 3.4.3.5). Auch bei der Ermittlung der Schwermetallpositionen war die NCS des Moleküls sehr hilfreich (s. 3.4.3.1).

#### 3.4.1.2. Native Pattersonfunktion

Aus dem gemessenen Datensatz wurde eine native Pattersonfunktion berechnet. Die Peaks der Pattersonfunktion stellen die Endpunkte von Vektoren zwischen den Atomen dar. Dabei unterscheiden sich intermolekulare und intramolekulare Vektoren. Von besonderem Interesse sind die Peaks intermolekularer Vektoren. Peaks der Vektoren zwischen Atomen von Molekülen, die durch die Raumgruppensymmetrie verwandt sind, finden sich immer auf ganz bestimmten Schichten, den so genannten Harkerschichten. Diese ergeben sich aus der Differenz der speziellen Lagen der einzelnen Raumgruppen. In der Raumgruppe  $P2_1$  mit der Schraubenachse  $b$  befindet sich zu jedem Atom in der allgemeinen Lage  $(x, y, z)$  ein symmetrieäquivalentes Atom in Position  $(-x, 0.5 + y, -z)$ . Die Endpunkte der Vektoren zwischen diesen Atomen liegen alle auf der Harkerfläche, die den Pattersonraum bei  $y = 0.5$  schneidet  $(2x, 0.5, 2z)$ .

In einer nativen Pattersonfunktion erwartet man einen starken Peak in einer Harkerschicht für den Fall reiner Translation. Dieser tritt ein, wenn eine kristallographische sowie eine nichtkristallographische Drehachse gleicher oder höherer Symmetrie parallel liegen (Abb. 34). Die aus der Selbstrotationsfunktion geschlossene Vermutung kann also durch die Pattersonfunktion theoretisch bestätigt werden.

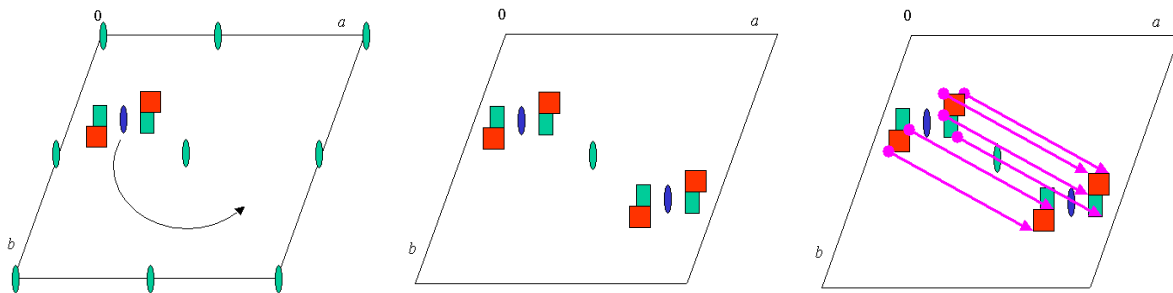


Abb. 34: Zustandekommen eines Peaks in der nativen Pattersonfunktion bei Vorliegen von parallelen kristallographischen (grün) und nichtkristallographischen (blau) zweizähligen Drehachsen (aus: <http://www-structure.llnl.gov/Xray/101index.html>, Bernhard Rupp)

In der Pattersonfunktion zeigte sich ein starker Peak bei  $(0, 0.5, 0.5)$  mit einer Intensität von 11 % des Ursprungspeaks (Abb. 35). Das Auftreten dieses Pseudo-Ursprungspeaks beweist zum einen das Vorhandensein einer zur kristallographischen zweizähligen Drehachse parallelen nichtkristallographischen Achse und weist zusätzlich auf eine Pseudo-A-Flächenzentrierung der Moleküle im Kristall hin.

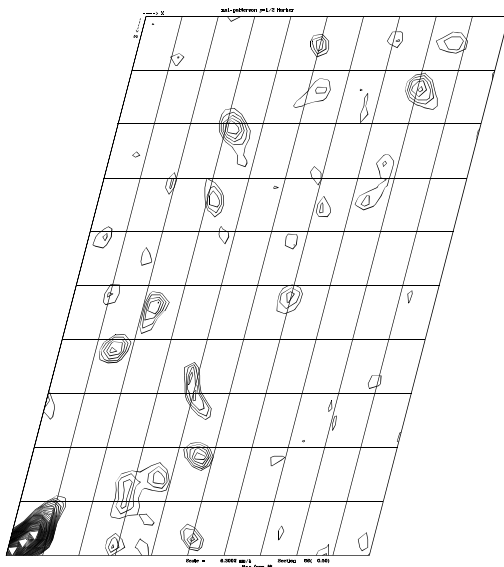


Abb. 35: Native Pattersonfunktion ( $y = 0.5$ )

Bei einer A-Flächenzentrierung im Kristallgitter sollten die Reflexe mit den Indizes  $k+1=2n-1$  systematisch ausgelöscht sein. Vergleicht man die Indizes mit geraden und ungeraden Werten von  $k+1$ , erkennt man, dass die ungeraden tatsächlich systematisch eine geringere

Intensität aufweisen als die geraden. Einen Vergleich dieser Werte erhält man mit dem CCP4-Programm *truncate*. Diese systematisch geschwächten Reflexintensitäten dürften die Ursache für den mit 10 % recht hohen  $R_{\text{sym}}$ -Wert des nativen Datensatzes sein.

Des Weiteren kann man aus der allgemeinen Differenz der Koordinaten in  $P2_1$  ( $2x, 0.5, 2z$ ) die x- und z-Koordinaten des Schwerpunkts des BM-CrnA-Hexamers berechnen nach :

$$(0, 0.5, 0.5) = (2x, 0.5, 2z).$$

Die möglichen Schwerpunktkoordinaten lauten:  $(0, -, 0.25)$ ,  $(0, -, 0.75)$ ,  $(0.5, -, 0.25)$  und  $(0.5, -, 0.75)$ .

### 3.4.2. Nativer Datensatz (Synchrotron)

Mit dem Ziel, einen Datensatz mit verbesserter Auflösung zu erhalten, wurde ein Kristall am DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron) in Hamburg vermessen. Der Kristall streute bis etwa 2.0 Å (Abb. 36) und wurde bis 2.1 Å berechnet (Tab. 9).

Tab. 9: Statistik des nativen Datensatzes (Synchrotron); es gehen 360 Aufnahmen bei einer Drehung des Kristalls von 0.5°/Aufnahme in die Statistik ein; die Zahlen in Klammern geben die Statistik der höchsten Auflösungsschale an.

Wellenlänge [Å]	0.8428
Auflösungsbereich [Å]	50 - 2.1
Raumgruppe	$P2_1$
Zellparameter	$a = 74.6 \text{ \AA}$ , $b = 94.1 \text{ \AA}$ , $c = 115.2 \text{ \AA}$ , $\alpha = \gamma = 90^\circ$ , $\beta = 104.3^\circ$
Anzahl an Reflexen	223797
Anzahl unabhängiger Reflexe	71469
Vollständigkeit [%]	79.1 (52.5)
$I/\sigma(I)$	22.5 (1.8)
$R_{\text{sym}}$ [%]	3.9 (30.9)

Der Kristall zeigte im Röntgenstrahl eine starke Anisotropie in Bezug auf seine Streueigenschaften, woraus die geringe Vollständigkeit in der höchsten Auflösungsschale resultiert. Die Redundanz des Datensatzes beträgt 3.1. Der  $R_{\text{sym}}$ -Wert des Datensatzes ist mit 3.9 % sehr gut, gleichzeitig liegt die Mosaizität mit 1.2° sehr hoch.

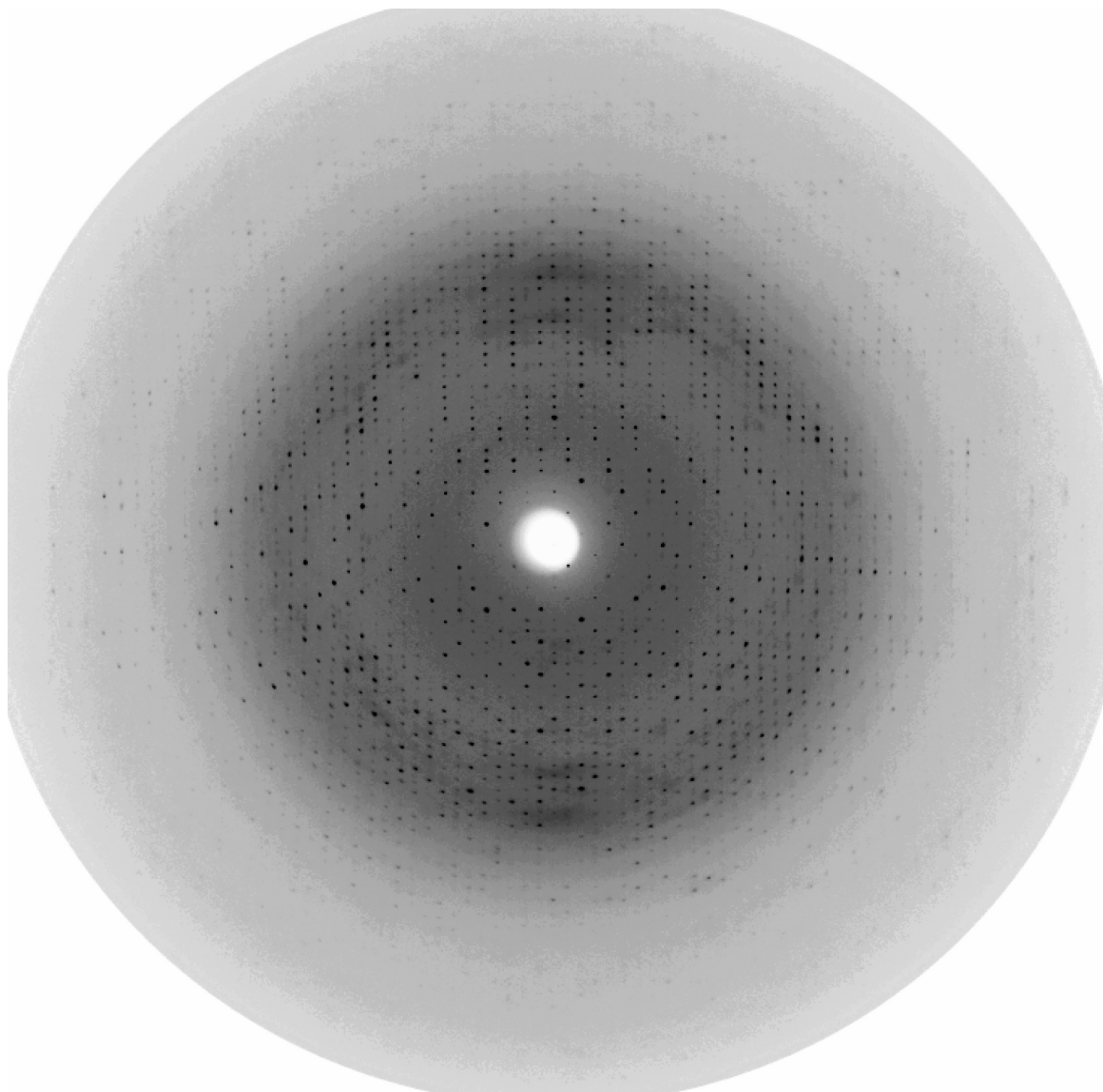


Abb. 36: Beugungsaufnahme des nativen Datensatzes (Synchrotron)

### 3.4.3. Derivatdatensatz

Von einem über Nacht in 5 mg/ml  $K_2PtCl_4$  *gesoakten* Kristall wurden am Elektronenspeicherring DORIS des DESY in Hamburg zwei Datensätze mit der Wellenlänge der  $L^{III}$ -Platinabsorptionskante gemessen. Das Experiment war als MAD-Experiment geplant, so dass ursprünglich bei drei Wellenlängen gemessen werden sollte: am Maximum des Pt-Fluoreszenzspektrums (*peak*,  $\lambda_1$ ), am Umkehrpunkt des Spektrums (*inflection*,  $\lambda_2$ ) und bei einer Wellenlänge außerhalb der Absorptionskante (*remote*,  $\lambda_3$ ). Aus Zeitgründen konnte nur ein *peak*- und ein *inflection*-Datensatz aufgenommen werden.

Die Daten wurden mit dem Programm DENZO (Otwinowski und Minor, 1997) als primitiv monoklin indiziert und mit dem Programm SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) bis zu einer Auflösung von 3.0 Å anomal (*keyword* im Skript: *anomalous*) skaliert. Sie ließen sich ebenso wie die nativen Daten der Raumgruppe  $P2_1$  zuordnen mit den Zellparametern  $a = 74.4$  Å,  $b = 94.1$  Å,  $c = 114.7$  Å,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 104.6^\circ$ . Im Vergleich zu dem ebenfalls in Hamburg gemessenen nativen Datensatz zeigte der Derivatdatensatz nur eine maximale Abweichung in den Gitterparametern von 0.4 % in der c-Achse. Die Datensätze sind damit höchstwahrscheinlich isomorph. Im Gegensatz dazu zeigten sich zu dem an der hauseigenen Kupferdrehanode gemessenen Datensatz Abweichungen in der c-Achse von etwa 1.5 %. Bei der Skalierungsroutine *anomalous* werden die Intensitäten der Friedelpaare nicht zusammengefasst.

Die MAD-Datensätze besaßen einen  $R_{sym}$  von 9.1 % (*peak*) bzw. 8.5 % (*inflection*). Der *peak*-Datensatz konnte vollständig gemessen werden, der *inflection*-Datensatz konnte mangels Messzeit nur bis zu einer Vollständigkeit von 92 % gemessen werden (Tab. 10).

Tab. 10: Statistik der Derivatdatensätze: in die Statistik fließen 360 Aufnahmen bei  $\lambda_1$  mit einer Rotation von 0.5°/Aufnahme und 340 Aufnahmen von  $\lambda_2$  mit einer Rotation von ebenfalls 0.5°/Aufnahme; die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale

	MAD- <i>peak</i>	MAD- <i>inflection</i>
Wellenlänge [Å]	1.0714	1.0716
Auflösungsbereich [Å]	30 - 3.0	30 - 3.0
Raumgruppe	$P2_1$	$P2_1$
Anzahl an Reflexen	124861	109037
Anzahl unabhängiger Reflexe	34341	28737
$I/\sigma(I)$	14.7 (2.5)	15.2 (2.9)
Vollständigkeit [%]	99.8 (99.9)	91.7 (93.6)
$R_{sym}$ [%]	9.1 (41.1)	8.5 (38.6)

Die Mosaizität der Daten lag bei  $0.7^\circ$ , so dass bei einem Drehwinkel von  $0.5^\circ$ /Aufnahme im Auflösungsbereich nicht mit überlappenden Reflexen zu rechnen ist.

### 3.4.3.1. Bestimmung von Schweratompositionen

Mit dem Programmpaket CNS wurden die Schweratompositionen bestimmt sowie die Anfangsphasen berechnet. Zunächst wurde eine anomale Differenzpattersonfunktion des Datensatzes der *peak*-Wellenlänge berechnet (Abb. 37) und aus den Peaks der Funktion automatisch Schweratompositionen bestimmt. Der Algorithmus für die Bestimmung der Schweratompositionen besteht im verwendeten Programm (CNS, Skript: *heavy\_search.inp*, Grosse-Kunstleve und Brünger, 1999) aus kombinierter Pattersonsuche im direkten sowie im reziproken Raum und anschließender Patterson-Korrelationsverfeinerung (Grosse-Kunstleve und Brünger, 1999, Brünger, 1990). Im Programm wurden sechs zu suchende Schweratompositionen vorgegeben. Das Ergebnis mit der höchsten Korrelation zwischen berechneten und beobachteten Strukturfaktordifferenzen wurde für die Berechnung einer theoretischen Pattersonfunktion verwendet (Abb. 38).

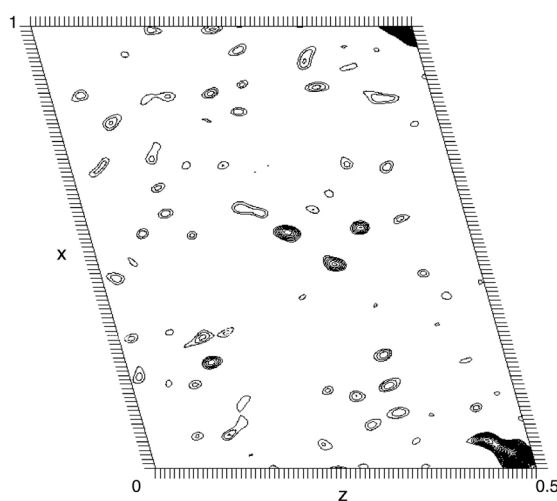


Abb. 37: Anomale Differenzpattersonfunktion ( $y = 0.5$ )

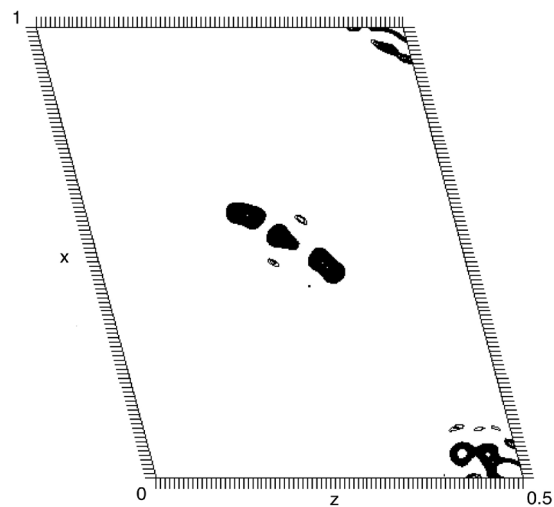


Abb. 38: Aus den Schweratompositionen berechnete Differenzpattersonfunktion ( $y = 0.5$ )

Man erkennt an der Differenz von berechneter und gemessener Pattersonfunktion das starke Hintergrundrauschen der anomalen Differenzpattersonfunktion, welches zum einen durch die geringen Differenzen in den Intensitäten der Friedelpaare hervorgerufen wird und zum anderen mathematisch zu erklären ist. Die Quadrate der anomalen Differenzen der Strukturfaktoramplituden setzen sich nämlich aus den Quadraten der reinen Strukturfaktoramplituden des Schwermetalls und einem Mischterm zusammen, der zum Rauschen in der Pattersonfunktion

führt. Erst die Summe der Quadrate von isomorphen Strukturfaktordifferenzen und anomalen Strukturfaktordifferenzen kann theoretisch zu einer rauschfreien Pattersonfunktion führen (Drenth, 1994).

Die Plausibilität der auf diese Weise bestimmten Schweratompositionen wurde durch graphische Beurteilung ihrer Substruktur (Abb. 39) sowie durch die Symmetriebeziehung zwischen den Atomen beurteilt.

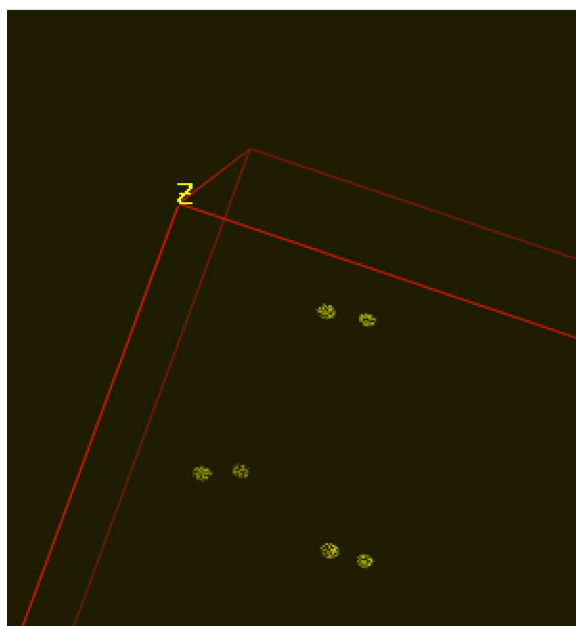


Abb. 39: Substruktur der Pt-Atome in der Elementarzelle

Die Substruktur von sechs Pt-Atomen bildete zwei parallel übereinander liegende Dreiecke aus, was gut mit der in 3.4.1.1 hergeleiteten Vorstellung des Proteinmoleküls als Dimer von Trimeren übereinstimmte. Die Symmetriebeziehungen zwischen den Atomen wurden mit dem CCP4-Programm *findncs* (Lu, 1997) berechnet. Die hier gefundenen Symmetrieeoperationen waren mit denen aus Selbstrotationsrechnungen des nativen Datensatzes in Einklang (vgl. 3.4.1.1, Tab. 8). Auf dasselbe Zentrum bezogen fanden sich auch hier drei zweizählige Symmetrieachsen und eine dreizählige Drehachse (Tab. 11).

Tab. 11: Symmetrieachsen der Pt-Atome im Zentrum 30.07, -10.45, 27.66; in Klammern stehen die entsprechenden Winkel aus der Selbstrotationsfunktion des nativen Datensatzes der BM-CrnA

Nummer	$\phi$ [°]	$\psi$ [°]	$\kappa$ [°]	RMS
1	-36.43 (321.71)	55.37 (53.79)	180.00 (180.00)	0.145
2	92.95 (90.00)	87.81 (90.00)	180.00 (180.00)	0.351
3	39.84 (38.28)	52.67 (53.79)	180.00 (179.98)	0.377
4	4.96 (358.50)	137.40 (137.99)	-123.52 (120.00)	0.124
5	5.54 (358.50)	137.01 (137.99)	-116.48 (120.00)	0.250

Der RMS-Wert gibt die Abweichung der übereinander gelagerten Atompositionen nach Anwendung der jeweiligen Symmetrieoperation an. Eine ungenaue Positionierung der Pt-Atome wurde anhand der gleichwertigen aber deutlich von 120° abweichenden Achsen vier und fünf erkennbar. Insgesamt war die Übereinstimmung der Symmetrie der Pt-Atome untereinander und der nichtkristallographischen Symmetrie des hexameren Proteinmoleküls ein aussagekräftiger Hinweis auf die Stimmigkeit der Schweratompositionen.



## 3.4.3.2. Anfangsphasen und erste Elektronendichte

Für die Phasierung wurden die Strukturfaktoren aus dem *peak*- und dem *inflection*-Datensatz verwendet sowie die aus der Pattersonfunktion ermittelten Pt-Positionen. Aufgrund der enantiomorphen Ambiguität bei der Berechnung der Schweratompositionen (Blundell, 1976) wurde die Berechnung der Phasen für beide Händigkeiten durchgeführt. Die Anfangsphasen sowie die Händigkeit der Struktur wurden anhand des Gewichtungsfaktors  $m$  (*figure of merit*), der die Gültigkeit der Phasenwinkel bewertet, beurteilt. Der Gewichtungsfaktor  $m$  besitzt für einen Phasenfehler von  $0^\circ$  den Wert 1 und für einen Phasenfehler von  $90^\circ$  den Wert 0. Er stieg im Laufe der Phasierungszyklen für die eine mögliche Händigkeit (Händigkeit 1) von 0.1472 auf 0.2931 und für die andere (*flip*) von 0.1467 auf 0.2928. Obwohl der *figure of merit* der Phasenwinkel insgesamt noch recht gering war, konnten dennoch leichte Unterschiede für beide Händigkeiten beobachtet werden. Da nur eine Händigkeit zu einer interpretierbaren Elektronendichte führen sollte, wurde hier die Entscheidung aufgrund der Beurteilung der unterschiedlichen Elektronendichten getroffen (Abb. 40).

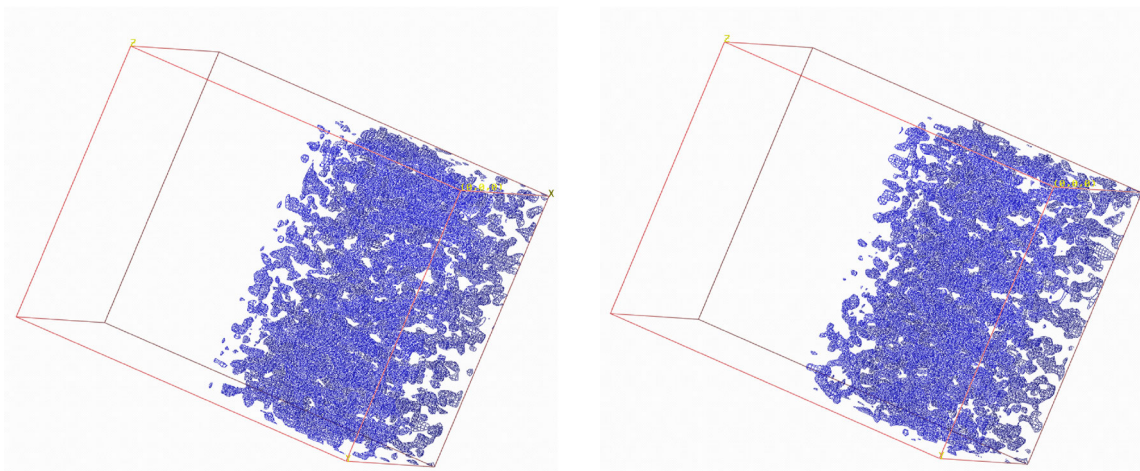


Abb. 40: Elektronendichten der möglichen Händigkeiten (links: Händigkeit 1, rechts: *flip*)

Die Anfangsphasen führten zu kaum interpretierbaren Elektronendichten, allerdings konnte man schwache Unterschiede zwischen Solvensbereich und Protein in der links abgebildeten Dichte erkennen, was in Einklang stand mit den Unterschieden der *figure of merits*. Die enantiomorphe Ambiguität wurde zugunsten dieser Lösung entschieden.

## 3.4.3.3. Dichtemodifikation

In dem ersten Schritt der Dichtemodifikation wurde die Dichte mittels *solvent flipping* (Abrahams und Leslie, 1996) innerhalb des Programmpaketes CNS geglättet. Nach der Solvensglättung erkannte man deutlich die Gestalt des Proteinmoleküls neben den Lösungsmittelbereichen (Abb. 41).

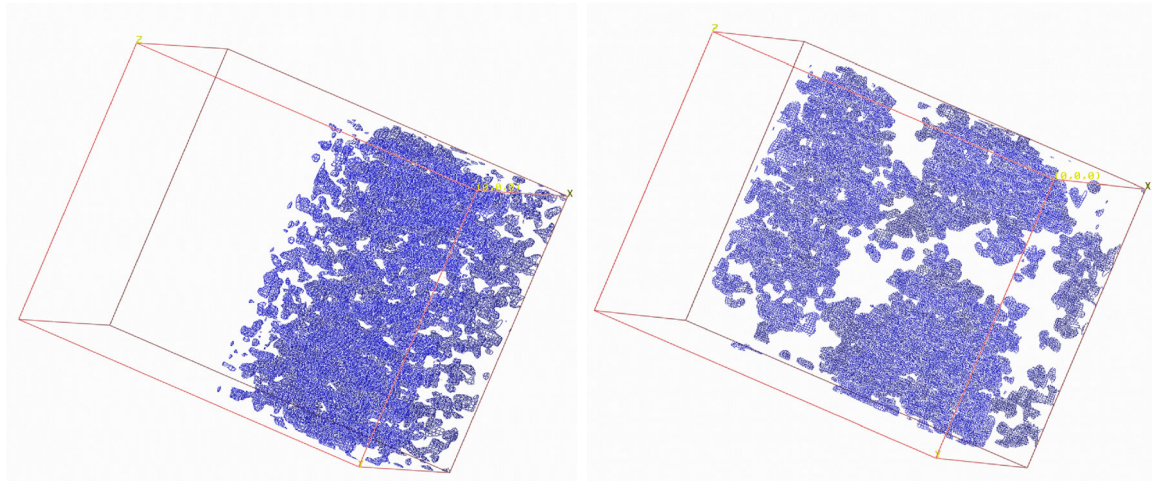


Abb. 41: Elektronendichtekarten vor (links) und nach (rechts) *solvent flipping*

Allerdings war die Dichte zu diesem Zeitpunkt noch nicht interpretierbar, Sekundärstrukturelemente wie Helix und Faltblatt waren nicht in der Dichte erkennbar.

Ein sehr leistungsstarkes Werkzeug in der Dichtemodifikation ist die Mittelung durch nicht-kristallographische Symmetrie (NCS-Mittelung). Die in der Selbstrotationsfunktion ermittelte hohe NCS des hexameren Moleküls (s. 3.4.1.1) sollte hier zu einer starken Verbesserung der Elektronendichte führen. Um eine NCS-Mittelung anwenden zu können, benötigt man die Matrizen aller Symmetrieeoperationen, die aus einem Monomer das gesamte Hexamer darstellen, bestehend aus Rotations- und Translationsanteil. Es wurden somit die folgenden Matrizen gesucht:

Abbildung der Einheitsmatrix:

1) A Y A

Abbildungen der 120°-Matrizen (Abb. 42):

2) A Y B (Symmetrieeoperation I)

3) A Y C (Symmetrieeoperation II)

Abbildungen der 180°-Matrizen (Abb. 42):

4) A Y -A (Symmetrieeoperation a)

5) A Y -B (Symmetrieeoperation c)

6) A Y -C (Symmetrieeoperation b)

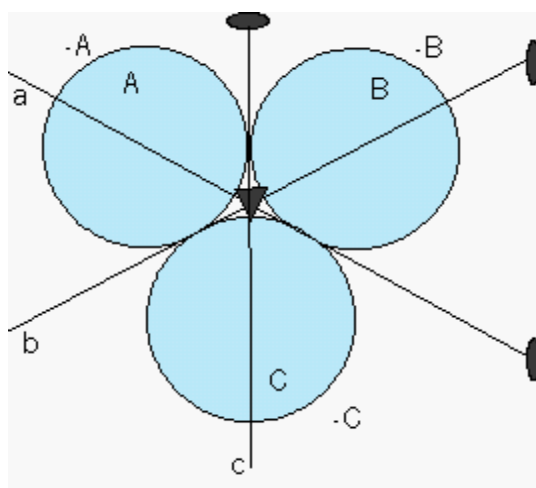


Abb. 42: Mögliche Symmetrieoperationen im idealisierten hexameren Molekül (die Bereiche im Hintergrund sind durch ein negatives Vorzeichen angedeutet)

Aus den Kombinationen der 180°-Matrizen ergeben sich die beiden möglichen 120°-Matrizen:

$$a \times b = \text{II} (A \ Y \ C)$$

$$a \times c = \text{I} (A \ Y \ B)$$

$$b \times c = \text{II}$$

$$b \times a = \text{I}$$

$$c \times a = \text{II}$$

$$c \times b = \text{I}$$

Es wurden die Matrizen verwendet, die aus den Positionen der Pt-Atome im CCP4-Programm *findncs* (Lu, 1997) (s. 3.4.3.1) ermittelt worden waren und die sich auf ein Zentrum beziehen. Neben den Symmetrieoperationen musste eine molekulare Maske von Monomer A erstellt werden. Dies war schwierig, da aus der Elektronendichte lediglich die Kontur des Hexamers zu erkennen war, aber nicht die der einzelnen Monomere. Nach Skelettierung der Elektronendichte wurde graphisch im Programm 0 (Jones, 1991) eine Monomermaske ermittelt.

Die NCS-Mittelung führte zu einer signifikanten Verbesserung der Elektronendichte, nachdem einige „Tricks“ bei der Optimierung der NCS-Operatoren sowie der Monomermaske angewendet worden waren. Es zeigte sich nach ersten Rechnungen in *dm* (Cowton, 1994), dass die 120°-NCS-Matrizen aus *findncs* nicht zu einer Überlappung im Molekülbereich führten (Tab. 12).

Tab. 12: Überlappungen im Molekülbereich nach Anwendung der NCS-Operationen

	E	180°	180°	180°	120°	120°
E	0.997	0.301	0.394	0.302	0.035	0.045
180°	0.300	0.997	0.273	0.256	0.025	-0.022
180°	0.396	0.269	0.997	0.229	0.039	0.000
180°	0.301	0.255	0.231	0.998	0.067	0.026
120°	0.037	0.023	0.035	0.074	0.997	0.005
120°	0.048	-0.023	0.004	0.027	0.005	0.997

Mithilfe von Matrixmultiplikationen innerhalb der 180°-Matrizen wurden neue 120°-Matrizen berechnet (augmentierte 4x4-Matrizen, s. 2.5.3.2). Es zeigte sich eine stark verbesserte Überlappung der Molekülbereiche (Tab. 13).

Tab. 13: Überlappungen im Molekülbereich nach Anwendung der berechneten NCS-Operationen

	E	180°	180°	180°	120°	120°
E	0.997	0.315	0.402	0.293	0.305	0.277
180°	0.313	0.997	0.282	0.246	0.292	0.388
180°	0.398	0.281	0.997	0.233	0.290	0.243
180°	0.290	0.242	0.237	0.997	0.386	0.279
120°	0.308	0.289	0.296	0.386	0.997	0.312
120°	0.271	0.386	0.239	0.284	0.316	0.997

Zur Optimierung der NCS-Maske wurde diese im CCP4-Programm *ncsmask* radial stark vergrößert und im Anschluss wurden die neuen NCS-Operatoren auf die Maske angewendet. Die überlappenden Bereiche wurden weggeschnitten und der resultierende Bereich wurde als neue Monomermaske in *dm* eingesetzt. Nach dieser Änderung verbesserte sich die Elektronendichte immens (Abb. 43), Helices und Faltblätter wurden sichtbar und der komplizierte Aufbau des Hexamers aus den sechs Monomeren wurde erkennbar.

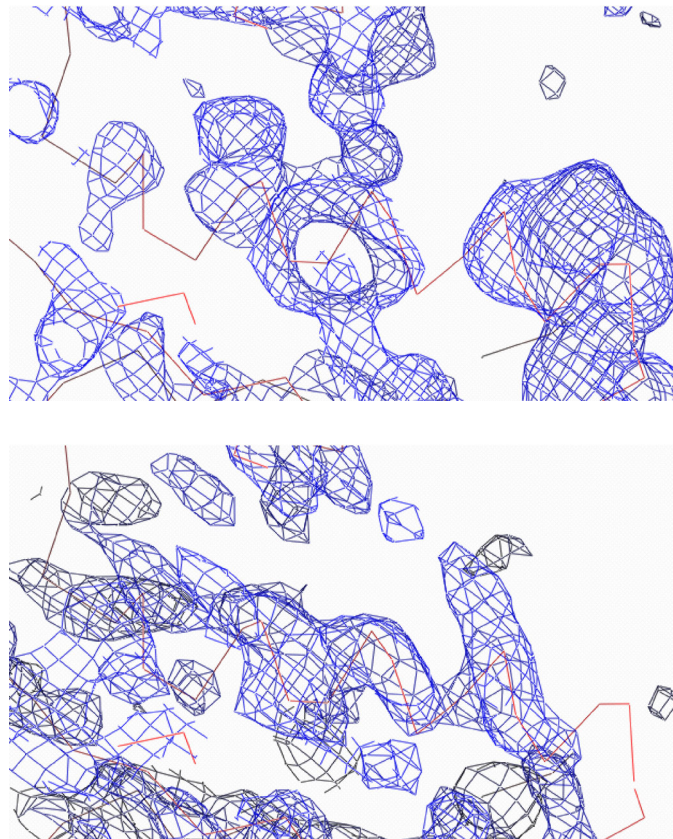


Abb. 43: Helikaler Bereich der Elektronendichte vor (oben) und nach (unten) der NCS-Mittelung (die Struktur wurde zur besseren Übersicht unterlegt)

Im letzten Schritt der Dichtemodifikation wurden die Phasen innerhalb von 200 Zyklen von 3.0 Å auf 2.1 Å erweitert, was zu einer weiteren Verbesserung der Elektronendichte führte. Die im Molekül enthaltene hohe NCS war letztlich entscheidend dafür, eine interpretierbare Elektronendichte zu erhalten und im Weiteren die Struktur der BM-CrnA zu lösen.

## 3.4.3.4. Sequenzeinbau

Nach der Dichtemodifikation waren in der Elektronendichte deutlich helikale Bereiche und Faltblattstrukturen zu erkennen. Deshalb wurde zunächst ein automatischer Modellbau mit dem Programmpaket ARP/WARP (Perrakis und Lamzin, 1999) versucht. Hier konnten jedoch nur kurze Sequenzabschnitte innerhalb der Struktur gefunden werden. Mögliche Gründe hierfür sind in der mit 2.1 Å zu geringen Auflösung zu sehen, die im Grenzbereich der Möglichkeiten des Programms liegt sowie damit verbunden in einem zu schlechten Daten/Parameter-Verhältnis. Das Strukturmodell wurde daher komplett von Hand im Graphikprogramm O (Jones, 1991) erstellt. In die signifikanten Helixbereiche wurden zunächst Polyalanin (Poly-Ala)-Helices gelegt sowie Poly-Ala-Faltblattstrukturen in die charakteristischen Bereiche von  $\beta$ -Faltblättern in der Elektronendichte. Gut erkennbare *loops* oder ungeordnete Abschnitte wurden mit einzelnen Aminosäuren (Ala) oder Dipeptiden (Ala-Ala) Stück für Stück modelliert. Bei einer Vollständigkeit des Modells von 54 % wurden die einzelnen Kettenabschnitte zusammengefasst und mit dem sequenzrichtigen Bau des Modells begonnen. Für die Bewertung der Sequenzen wurde eine Aminosäureähnlichkeitsmatrix nach Remington (übernommen aus Dissertation Reinemer, 1993) (s. 2.5.3.3) verwendet, die die Ähnlichkeiten der einzelnen Aminosäuren zueinander in Bezug auf ihre Erscheinung in der Elektronendichte beurteilt. Dieser Sequenzvergleich war extrem leistungsstark, was die folgenden Ergebnisse der Sequenzvergleiche exemplarisch belegen sollen (Abb. 44). Es wäre ansonsten nur mit großer Unsicherheit oder überhaupt nicht möglich gewesen, die Elektronendichte vollständig zu interpretieren.

```
visuell      1 SG.LSWAEYEAY 11
              :| |:|.||||:
BM-CrnA     7 VGELTWKEYEAR 18

visuell      1 LVVEACARAVASALGATF 18
              |::|.:::|:|:|.::|
BM-CrnA    240 LILEVVCVQGIADAIGQEF 257

visuell      1 KAAHNGAVFGVVDCAA 16
              ...:|:|:|:|:|:|
BM-CrnA    174 WDIEHGGVFETSLMLA 189
```

Abb. 44: Sequenzvergleiche anhand einer Aminosäureähnlichkeitsmatrix (nach Remington, übernommen aus Dissertation Reinemer, 1993)

Man erkennt die starken Abweichungen zwischen der individuellen Beurteilung der Dichte und dem wirklichen Sequenzgehalt. Alle durchgeführten Sequenzvergleiche führten zu einer richtigen Sequenzzuordnung. Auf diese Weise konnte das gesamte Modell des Enzyms gebaut werden, allerdings mit Einschränkungen im N- und C-terminalen Bereich des Enzyms sowie in zwei weiteren flexiblen Bereichen. Der Verlauf der Aminosäuren 2 bis 8 im N-terminalen Bereich (es wurde davon ausgegangen, dass Aminosäure 1, Methionin, abgespalten wurde, s. 3.1.1) sowie die Lage der C-terminalen Aminosäurereste 259 und 260 konnten aufgrund der schwachen Elektronendichte in diesen Bereichen nicht genau bestimmt werden. Das Gleiche gilt für einen kurzen flexiblen *loop* zwischen Position 20 und 23. Ein ausgedehnter flexibler Bereich zwischen den Positionen 158 und 172 war am schlechtesten definiert und zu Beginn in der Elektronendichte kaum zu erkennen. Dieser Sequenzbereich wurde zuletzt in die Struktur eingebaut und konnte nur ganz vage positioniert werden. Hier wurden Hilfsoptionen des Graphikprogramms O verwendet, wie der Vergleich mit *loop*-Regionen bekannter Strukturen, die in den Datenbanken des Programms enthalten sind. Das wachsende Strukturmodell wurde ab einer Vollständigkeit von etwa 50 % in Verfeinerungsrechnungen eingesetzt, um eine Verbesserung der Elektronendichte zu erzielen.

### 3.4.3.5. Verfeinerung

Vor dem Beginn der Verfeinerung wurden mit dem CCP4-Programm *uniqueify* zufallsgeneriert 5 % der Daten eines Datensatzes als Testset innerhalb eines Datensatzes markiert, um während der Verfeinerung eine *cross*-Validierung (Brünger 1992, 1997) zu ermöglichen. Die Verfeinerung wurde bis auf einige abschließende Berechnungen im Programmpaket CNS mit der Verfeinerungsroutine *refine.inp* (Brünger 1987, 1990, 1994) durchgeführt. Sie wurde in Zyklen von manueller Korrektur des Strukturmodells am Graphikrechner sowie Moleküldynamik- und Energieminimierungsrechnungen innerhalb der Verfeinerungsroutine bearbeitet.

Bei Moleküldynamikrechnungen (*simulated annealing*) wird das Strukturmodell auf ein hohes Temperaturniveau gebracht (5000 K) und anschließend langsam abgekühlt. Der Vorteil der Methode besteht darin, dass auf diese Weise lokale Energieminima überwunden werden können und so größere räumliche Veränderungen im Strukturmodell möglich werden (Verschiebungen bis zu mehreren Å, Drenth, 1994), die zu globalen Minima in der Struktur führen. Da zu Beginn der Verfeinerung noch größere manuelle Veränderungen am Modell vorgenommen werden, ist diese Minimierungsroutine sehr leistungsstark.

Während der ersten Verfeinerungsrechnungen bei noch inkomplettem Strukturmodell wurde nach der *maximum likelihood*-Methode (Pannu und Read, 1996) gegen experimentelle Strukturfaktoramplituden sowie Phasen verfeinert (*mlhl*-Target). Es wurde eine Solvensmaske vorgegeben sowie strikte NCS (*constraints*). Der R-Wert lag nach den ersten Verfeinerungsrunden bei knapp 50 %. Bei wachsendem Strukturmodell fiel der  $R_{\text{work}}$  allmählich bis auf 41.9 %. Eine sichtbare Verbesserung der Elektronendichte sowie der R-Werte konnte nach Fertigstellung des Strukturmodells, automatischer Solvensberechnung und Umschwenken auf lose NCS (*restraints*) beobachtet werden. Der  $R_{\text{work}}$  fiel auf 32.1 %.

Die Verbesserung der Dichte wurde besonders an den schlecht definierten Bereichen sichtbar (Abb. 46). Der Verlauf der N-terminalen sieben Aminosäuren wurde während der Verfeinerung vollständig verändert. Der Verlauf des Rückgrats war hier ursprünglich durch den Aminosäurerest Glu 9 (Abb. 46, unten) gelegt worden. Die Dichte zwischen Position 20 und 23 wurde gut erkennbar, und sogar der gesamte Verlauf der  $C_{\alpha}$ -Kette und der meisten Reste des sehr flexiblen Bereichs zwischen Aminosäure 158 und 172 wurde interpretierbar (Abb. 46). In diesem teilweise helikalen Bereich waren am Ende der Verfeinerung die Seitenketten der Aminosäuren Gln 164, Glu 169 und Leu 172 nicht und die Seitenketten Lys 158, Ile 163 und Pro 168 nur teilweise definiert. Das  $C_{\alpha}$ -Rückgrat war bei Position Gly 170 bei einer Konturierung von  $0.8 \sigma$  erkennbar. Im Übrigen waren die N- bzw. C-terminalen Reste Ser 2, Lys 3 und Thr 260 bezüglich der Seitenketten teilweise nicht definiert, ebenso die an der Oberfläche liegenden ausladenden Reste Lys 231, Arg 235 und Gln 247.



Gegen Ende der Verfeinerung wurde nur noch gegen die Strukturfaktoramplituden verfeinert (*mlf*-Target) und die NCS stark gelockert.

Bereits zu Beginn des Struktureinbaus fielen in der Elektronendichte im Bereich des hexameren Moleküls insgesamt zwölf Bereiche mit einer hohen Konturierung von 6 - 7  $\sigma$  auf, weshalb an diesen Positionen Metallatome vermutet wurden. In der Literatur war diskutiert worden (Rikitake et al. 1979), dass die Creatininase ein Zn-bindendes Enzym ist, was die Vermutung nahe legte, dass in der Struktur Zn-Atome vorliegen. Diese müssten während der Expression und Reinigung des Enzyms beim Hersteller von dem Molekül aufgenommen worden sein. Die im Rahmen der Verfeinerung sich ergebenden Abstände zwischen den Metallatomen von 3.5 Å bestätigten das Vorhandensein von Zink in der Struktur durch Vergleich zu weiteren Proteinen mit Zink-Zink-Zentren (Thoden et al. 2001, Wilcox, 1996). Auch die Abstände zu den koordinierenden Sauerstoff- und Stickstoffatomen von 1.9 Å bis 2.5 Å sprachen dafür, dass Zinkionen in der Struktur vorliegen (Abb. 45).

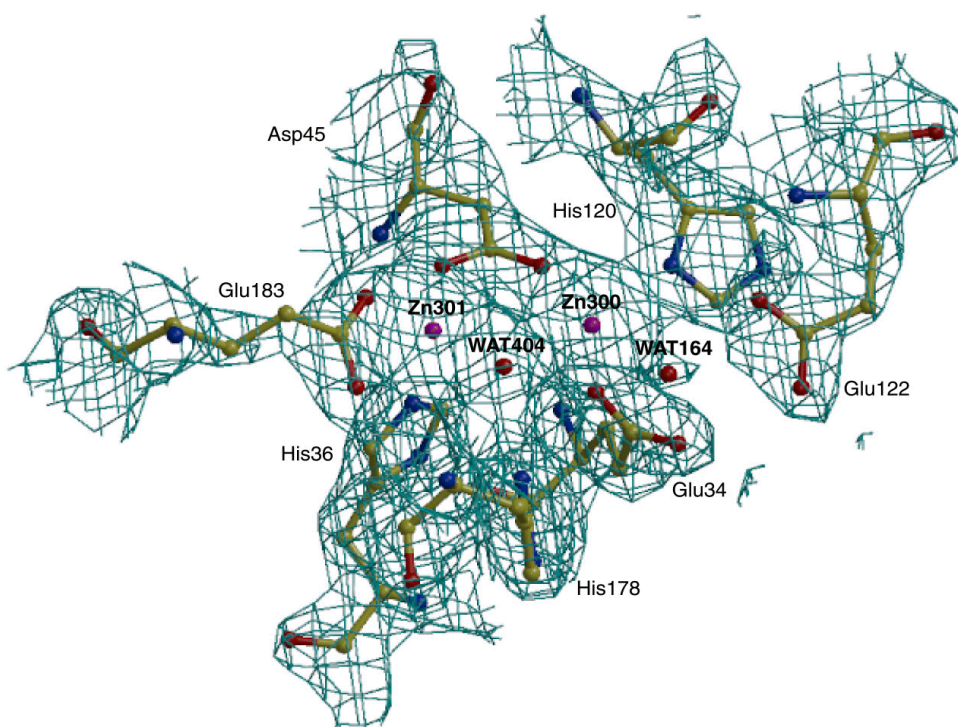


Abb. 45: Elektronendichte im Bereich der Zinkbindungsstelle (Untereinheit A)

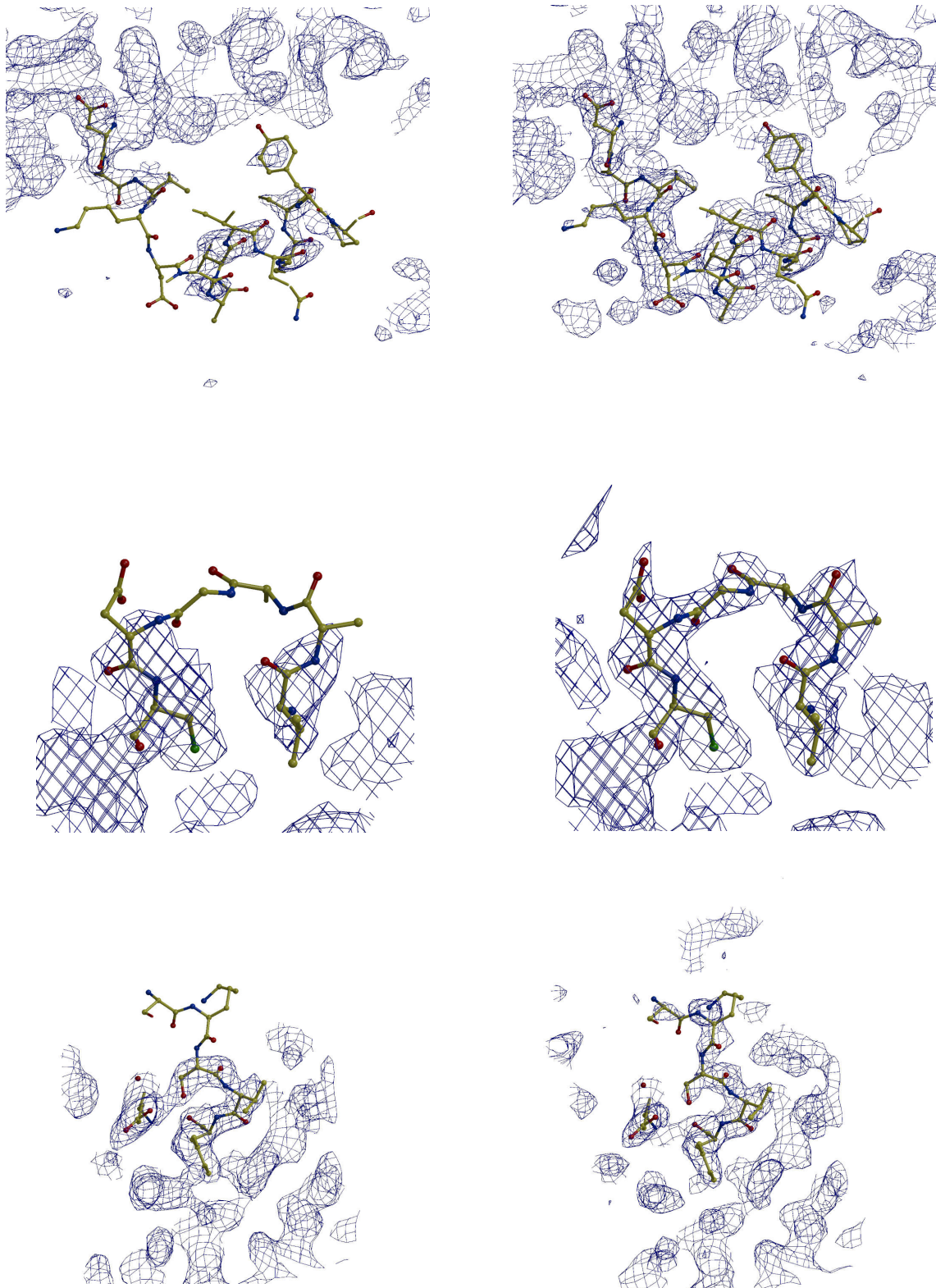


Abb. 46: Verbesserung der Elektronendichte im Laufe der Verfeinerung anhand von herausragenden Beispielen (alle Abbildungen wurden mit dem Programm BOBSCRIPT (Kraulis, 1997)) erstellt:

oben: flexibler Bereich zwischen den Resten 158 bis 172 vor (links) und nach (rechts) der Verfeinerung

Mitte: *loop* zwischen Aminosäurerest 20 und 23 vor (links) und nach (rechts) der Verfeinerung

unten: N-Terminus vor (links) und nach (rechts) der Verfeinerung

Tab. 14: Übersicht über die wesentlichen Zyklen der Verfeinerung

Verfeinerungs- Optionen	Auflö- sung [Å]	Anzahl AS im Strukturmodell	Anzahl Wasser/Glycerin	R <sub>work</sub> [%]	R <sub>free</sub> [%]
starre NCS, Solvensmaske, mlf	50 - 2.1	125	0/0	49.9	50.5
starre NCS, Solvensmaske, mlhl	50 - 2.1	173	0/0	45.6	47.3
starre NCS, Solvensmaske, mlhl	50 - 2.1	237	0/0	41.9	44.1
lockere NCS (-), Solvensmaske, mlhl	50 - 2.1	260	0/0	35.5	39.7
lockere NCS (-), Solvenskorrektur, mlhl	50 - 2.1	260	0/0	32.1	33.1
lockere NCS (-), Solvenskorrektur, mlf	50 - 2.1	260	311/3	24.0	26.5
lockere NCS (--), Solvenskorrektur, mlf	50 - 2.1	260	521/3	23.2	25.0
lockere NCS (--), Solvenskorrektur, mlf	50 - 2.1	260	725/3	21.8	24.8
Refmac: lockere NCS, Wasserstoffanteil	50 - 2.1	260	725/3	20.7	24.7

Es wurden insgesamt 725 Wassermoleküle und drei Glycerinmoleküle in die Elektronendichte eingebaut. Der  $R_{\text{work}}$  fiel dadurch bis auf 21.8 %. Nach einer statistischen Untersuchung von Carugo und Bordo (Carugo und Bordo, 1998) wären bei einer Auflösung von 2.1 Å etwa 1000 Wassermoleküle in der Struktur zu erwarten. Die geringere Zahl an gefundenen Wassermolekülen spiegelt vermutlich die bis zu dieser Auflösung nur unvollständigen Daten wider (s. 3.4.2, Vollständigkeit (alle Daten): 79 %, Vollständigkeit (höchste Auflösungsschale): 52 %). Nach der statistischen Analyse der Autoren würde man die in der BM-CrnA-Struktur gefundene Anzahl an Wassermolekülen bei einer Auflösung von 2.4 Å erwarten. Diese Auflösung entspricht möglicherweise der Qualität der verfeinerten Elektronendichte. Die Anzahl an Wassermolekülen lässt sich aber auch anhand des Ablaufs der Verfeinerung selbst rechtfertigen. Alle Versuche, weitere Wassermoleküle in die Struktur einzufügen, führten zwar zu einer Senkung des  $R_{\text{work}}$ , aber zu einer Erhöhung des  $R_{\text{free}}$ . Zum Abschluss wurden in dem Verfeinerungsprogramm *refmac* (Murshudov, Dodson 1996) aus der CCP4-Suite noch zusätzlich die Anteile der H-Atome an der Elektronendichte berücksichtigt, was den  $R_{\text{work}}$  auf 20.7 % senkte. Einen Überblick über die Zyklen der Verfeinerung gibt Tabelle 14.

Die in Abschnitt 3.3.2 besprochene posttranslationale Spaltung des Enzyms hinter Gly119, die in SDS-Gel und Massenspektrum in Form von zwei Abbruchbanden erkennbar war, ließ sich anhand der Elektronendichte nicht nachvollziehen. Die Bruchstelle liegt im rigiden Bereich der BM-CrnA-Struktur, direkt an ein Faltblatt anschließend. In diesem Bereich ist die Elektronendichte geschlossen und weist eine gleichmäßige Konturierung auf.

### 3.4.4. Strukturinterpretation

#### 3.4.4.1. Qualität der Struktur

Bei der Beurteilung der Qualität einer Struktur werden in der Regel einige charakteristische stereochemische Größen dargestellt, welche im Vergleich zu **statistisch ermittelten Standardabweichungen** ( $\sigma_z$ , Engh und Huber, 1991) betrachtet werden. In Tabelle 15 sind diese Werte für die BM-CrnA-Struktur zusammengestellt, ausgehend von der in *refmac* (s. 3.4.3.5, Murshudov et al., 1997) endverfeinerten Struktur.

Tab.15: Vergleich von statistisch ermittelten Standardabweichungen (Engh und Huber, 1991) charakteristischer stereochemischer Größen mit den realen RMS-Werten der endverfeinerten BM-CrnA-Struktur

Stereochemische Größe	$\sigma_z$	RMS (Struktur)
<b>Interatomare Abstände:</b>		
Bindungslängen (1-2-Abstände) [Å]	0.020	0.020
Bindungswinkel [°]	2.000	1.542
Chirales Volumen [Å <sup>3</sup> ]	0.150	0.103
<b>Kontakte zwischen nicht gebundenen Atomen:</b>		
Kontakte (alle Atome) [Å]	0.300	0.228
Wasserstoffbrücken (Donor - Akzeptor) [Å]	0.500	0.186
<b>Planare Gruppen:</b>		
Torsionswinkel ( $\omega = 180^\circ$ ) [°]	3.000	2.568
Planarität der Peptidbindung [Å]	0.030	0.008
<b>Korrelation der Temperaturfaktoren:</b>		
1-2-Nachbarn in der Hauptkette [Å <sup>2</sup> ]	2.000	1.024
1-3-Nachbarn in der Hauptkette [Å <sup>2</sup> ]	3.000	1.749
1-2-Nachbarn in der Seitenkette [Å <sup>2</sup> ]	2.000	2.290
1-3-Nachbarn in der Seitenkette [Å <sup>2</sup> ]	3.000	3.521

Man kann der Tabelle entnehmen, dass sich die RMS-Abweichungen innerhalb der Struktur überwiegend im Bereich der Standard-RMS-Werte bewegen. Die realen RMS-Abweichungen werden allerdings innerhalb der Verfeinerung von dem Verhältnis des Gewichts von Röntgentermen zu stereochemischen Restriktionen beeinflusst. Das Gewicht der Röntgenterme wurde in Übereinstimmung mit der Auflösungsgrenze und der Qualität der Daten bei der Verfeinerung niedrig gehalten.

In stärkerem Maße unabhängig von den Restriktionen der Verfeinerung - und damit sehr aussagekräftig bei der Beurteilung der Qualität des Strukturmodells - sind die Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  (Dodson et al., 1996). In einem **Ramachandranplot** (Ramachandran, 1965) sind die charakteristischen  $\phi$ - und  $\psi$ -Werte des  $C_{\alpha}$ -Rückgrats dargestellt. Bestimmte Winkelkombinationen kommen besonders häufig vor und sind sterisch bevorzugt, andere sind sterisch ungünstig. Die sterisch günstigen Bereiche sind in dem Ramachandrandiagramm gekennzeichnet. Lediglich Glycin kann aufgrund seiner kleinen Seitenkette einen größeren Bereich an Torsionswinkeln einnehmen.

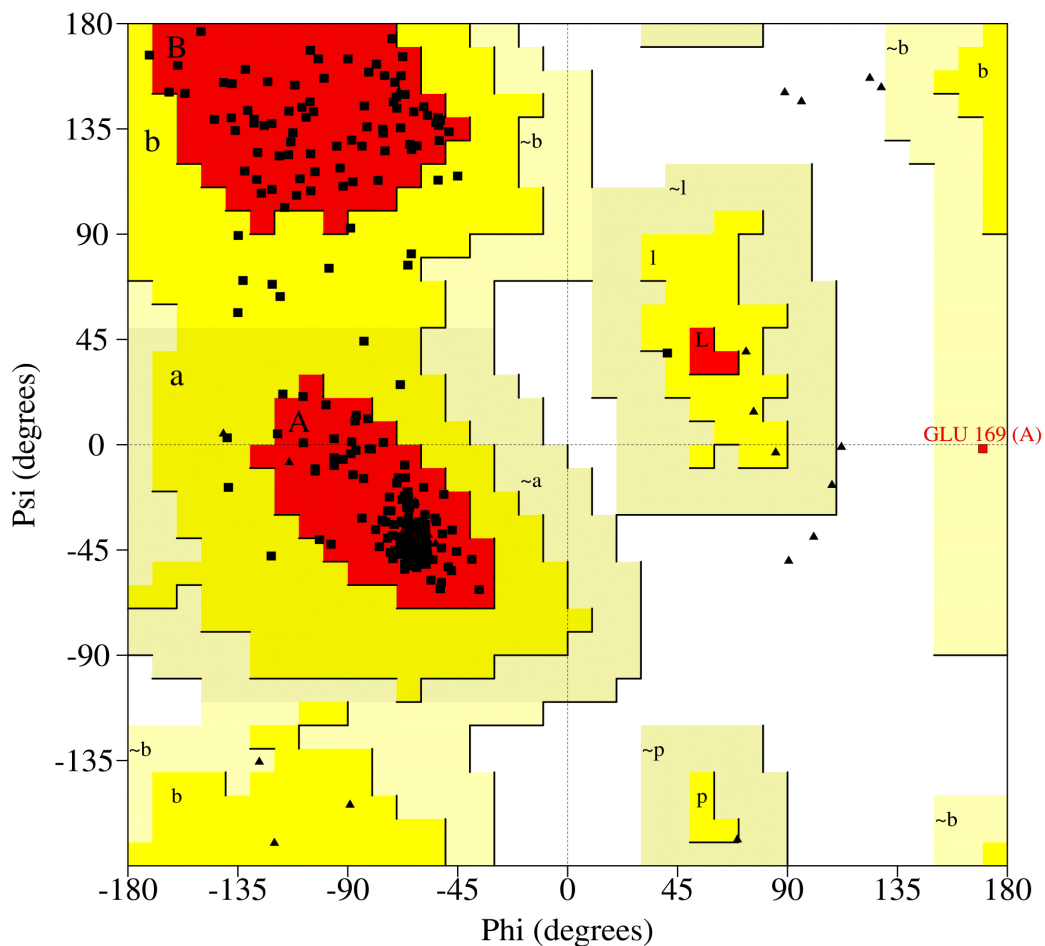


Abb. 47: Ramachandranplot der BM-CrnA (Untereinheit A); das Diagramm wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) erstellt.

Der Abbildung 47 ist zu entnehmen, dass alle Aminosäuren, mit Ausnahme von Glu169, in bevorzugten Winkelbereichen vorliegen. Dieser Rest liegt in dem am schlechtesten definierten Bereich der Elektronendichte, so dass das Modell an dieser Stelle den Kettenverlauf höchstwahrscheinlich nicht korrekt wiedergibt. Der vorliegende Ramachandranplot wurde, ausgehend von Strukturdaten der Untereinheit A, erstellt, ist aber für alle Untereinheiten äquivalent.

Der **durchschnittliche Koordinatenfehler** des Modells wurde nach der Methode von Luzzati (Luzzati, 1952) bestimmt. Bei dieser Methode wird die Auftragung des  $R_{\text{work}}$  gegen die Auflösung mit für bestimmte Koordinatenfehler berechneten Kurven verglichen. Aus den Koordinatenfehlern der nächstgelegenen Kurven wird der mittlere Koordinatenfehler der Struktur abgeleitet. Diese Berechnung wurde mit dem Eingabeskript *model\_stats.inp* des CNS-Programms für die in *refmac* (Murshudov et al., 1997) endverfeinerte Struktur durchgeführt. Es ergab sich ein Wert von 0.31 Å für den mittleren Koordinatenfehler der Struktur der BM-CrnA. Die auf diese Weise bestimmten Koordinatenfehler liegen für gut verfeinerte Strukturen typischerweise zwischen 0.2 Å und 0.3 Å (Drenth, 1994).

Ein höherer Wert für den Koordinatenfehler resultiert, trägt man nicht den  $R_{\text{work}}$ , sondern den  $R_{\text{free}}$  gegen die Auflösung auf. Auf der Grundlage dieser Berechnung ergibt sich für den Koordinatenfehler der Struktur der BM-CrnA ein Wert von 0.35 Å. Nach Brünger (Brünger, 1997) geben die so bestimmten Koordinatenfehler realistischere Werte an.

## 3.4.4.2. Verteilung der Temperaturfaktoren in der Struktur

Flexible und rigide Bereiche einer Struktur sowie ihre Unordnung können anhand der Temperaturfaktoren (B-Faktoren) erkannt und unterschieden werden. Es wurden die B-Faktoren der  $C_{\alpha}$ -Atome der Hauptkette gegen die Position innerhalb der Aminosäuresequenz aufgetragen (Abb. 48). Bei der Auftragung wurde von Monomer A ausgegangen, die Auftragung ist allerdings für alle sechs Untereinheiten äquivalent. Dabei ergaben sich die fünf höchsten Maxima an den Positionen Glu169, an den C- und N-terminalen Aminosäuren Ser2 und Thr260 sowie Glu198 und Arg235. Der in der Elektronendichte am schlechtesten definierte *loop*-Bereich zwischen Lys158 und Phe171 wurde bereits im Rahmen des Modellbaus (s. 3.4.3.4) sowie der Verfeinerung (s. 3.4.3.5) diskutiert. Er liegt an der Oberfläche der Struktur und ist vermutlich um den helikalen Bereich scharnierartig beweglich. Ebenso wurden die oberflächennahen flexiblen Reste von N- und C-Terminus bereits besprochen. Die Reste 235 und 198 sind ebenfalls im Oberflächenbereich des Enzyms positioniert. Analog verhält es sich mit den Resten, die die vier Minima mit den niedrigsten B-Faktoren innehaben. Die Aminosäuren Tyr72, Gly92 und Glu129 liegen im Bereich der starren  $(\beta/\alpha)_4$ -Struktureinheit. Interessanterweise zeigt sich ein herausstechendes Minimum bei Phe214. In diesem Bereich liegt eine  $\beta$ -faltblattähnliche Kontaktfläche zwischen zwei Untereinheiten (s. 3.4.4.4).

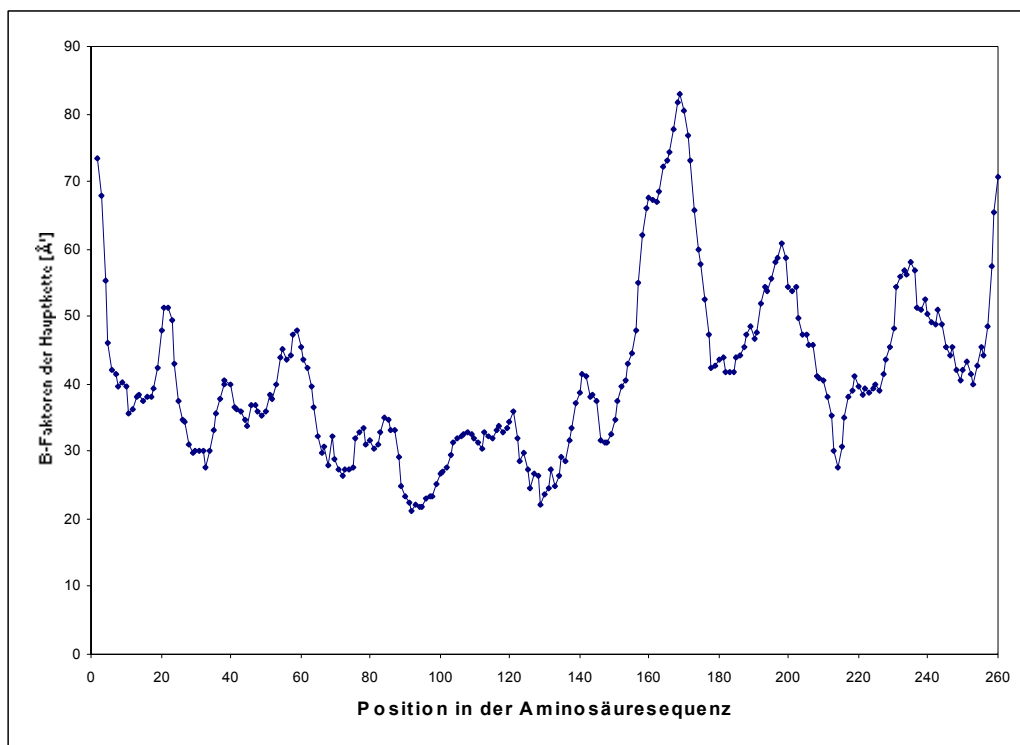


Abb. 48: B-Faktoren der Hauptkette im Verlauf der Aminosäuresequenz



Der gemittelte B-Faktor über alle Aminosäuren beträgt  $38 \text{ \AA}^2$  und liegt damit relativ hoch. Zum einen kommt dies durch die ausgedehnten Bereiche mit sehr hohen B-Faktoren zustande (dynamische Unordnung, nach Drenth, 1994), zum anderen führen leicht veränderte Atomlagen in unterschiedlichen Elementarzellen ebenfalls zu einer gleichmäßigen Erhöhung der Temperaturfaktoren, die nicht von dem Einfluss der dynamischen Unordnung zu unterscheiden ist. Diese sogenannte statische Unordnung (Drenth, 1994) im Kristall zeigte sich bereits nach der Skalierung der Daten in der hohen Mosaizität ( $1.2^\circ$ , s. 3.4.2) des nativen Datensatzes. Da die niedrigsten B-Faktoren in den rigiden Bereichen der Struktur bei  $20 \text{ \AA}^2$  liegen, ist die Unordnung im Kristall höchstwahrscheinlich der Grund für die insgesamt hohen Temperaturfaktoren.

Der gemittelte B-Faktor der Struktur stimmt gut mit dem im CCP4-Programm *truncate* aus dem Wilsonplot (Wilson, 1942) ermittelten Wert für den B-Faktor überein. Aus dem Wilsonplot wurde ein Wert von  $31.5 \text{ \AA}^2$  für den B-Faktor bestimmt. Der auf diese Weise ermittelte B-Faktor ergibt sich aus dem Anteil an thermischer Bewegung, der in den Streufaktoren ( $f_i$ ) der einzelnen Atome (i) steckt:

$$f_i^2 = e^{-2B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}} \cdot (f_i^0)^2$$

$\theta$ : Glanzwinkel [ $^\circ$ ]

$\lambda$ : Wellenlänge [ $\text{\AA}$ ]

$f_i^0$ : Streufaktor der einzelnen Atome im Ruhezustand



Das zentrale viersträngige  $\beta$ -Faltblatt ist linkshändig verdrillt, die Winkel zwischen den einzelnen Strängen betragen etwa  $25^\circ$ . Die  $(\beta/\alpha)_4$ -Einheit bildet den rigiden Kern der Struktur, was auch an den unterdurchschnittlichen Temperaturfaktoren in diesem Bereich deutlich wird, die hier zwischen 20 und  $45 \text{ \AA}^2$  bezogen auf die  $C_\alpha$ -Atome der Hauptkette liegen, im Vergleich zu durchschnittlich  $38 \text{ \AA}^2$  innerhalb der Struktur (s. 3.4.4.1). Bezieht man den  $(\beta/\alpha)_4$ -Kern auf die sequentielle Abfolge der Aminosäuren, so ist er in etwa zwischen den Positionen 29 und 152 lokalisiert. Die Helix  $\alpha 4$  bildet eine Ausnahme, denn sie ist separiert von diesem Zentrum im C-terminalen Bereich der Sequenz zwischen den Resten 234 und 257 lokalisiert. Der ausgedehnteste *loop*-Bereich (*loop*5) erstreckt sich von Rest 190 bis Rest 233. Er liegt im Oberflächenbereich des Monomers, ist jedoch über das einsträngige Pseudo-Faltblatt ( $\psi\beta 1$ ) in der Quartärstruktur fixiert (s. 3.4.4.4). Innerhalb dieses Bereiches liegen drei  $3_{10}$ -Helices. Der flexibelste Bereich liegt zwischen Aminosäure 158 und 172 und beinhaltet einen helikalen Anteil zwischen Rest 160 und 166 ( $\alpha$ II). Er liegt an der Oberfläche des Moleküls. In der Abbildung 49 kann man sich Helix  $\alpha$ II über die flankierenden *loops* (*loop*3 und *loop*4) scharnierartig beweglich vorstellen mit den Angelpunkten etwa bei AS Val157 und Gly170. Möglicherweise wird hier auch die Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum reguliert (s. 3.4.4.6). Die Helices  $\alpha$ I -  $\alpha$ III liegen außerhalb des  $(\alpha/\beta)_4$ -Kernbereichs:  $\alpha$ I liegt im N-terminalen Bereich zwischen den Aminosäureresten 12 und 22,  $\alpha$ II und  $\alpha$ III im C-terminalen Bereich zwischen Helix  $\alpha 4$  und Faltblatt  $\beta 4$  (Abb.50, Tab. 16).

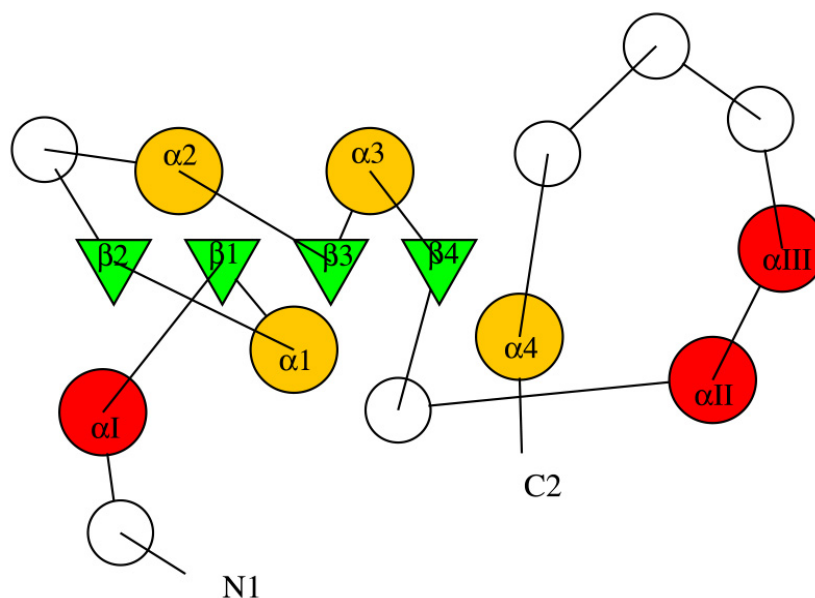


Abb. 50: Topologie der BM-CrnA (erstellt mit DSSP und TOP, Kabsch und Sander, 1983)

Tab. 16: Tabellarische Topologie der BM-CrnA (berechnet mit DSSP, Kabsch und Sander, 1983)

Position	Sekundärstrukturelement
7 - 9	$3_{10}$ -Helix $3_{10}A$
12 - 20	Helix $\alpha I$
26 - 30	Faltblatt $\beta 1$
31 - 43	loop1
44 - 60	Helix $\alpha 1$
63 - 68	Faltblatt $\beta 2$
76 - 79	Helix $\alpha I^*$
69 - 91	loop2
92 - 109	Helix $\alpha 2$
113 - 118	Faltblatt $\beta 3$
124 - 140	Helix $\alpha 3$
147 - 152	Faltblatt $\beta 4$
153 - 156	$3_{10}$ -Helix $3_{10}B$
153 - 159	loop3
160 - 166	Helix $\alpha II$
167 - 180	loop4
181 - 188	Helix $\alpha III$
192 - 194	$3_{10}$ -Helix $3_{10}C$
197 - 199	$3_{10}$ -Helix $3_{10}D$
211 - 215	$\psi\beta 1$
218 - 220	$3_{10}$ -Helix $3_{10}E$
189 - 233	loop5
234 - 257	Helix $\alpha 4$

Ein weiterer auffälliger Bereich in der Struktur ist das cis-Prolin an Position 215 (Abb. 51), das hier zu einer starken Krümmung im  $C_\alpha$ -Rückgrad führt. Des weiteren befinden sich pro Unter-einheit zwei benachbarte Zinkatome in der Struktur, die über einen Aspartatrest (Asp 45) verbrückt sind (s. 3.4.4.5). Sie liegen räumlich an den jeweils N-terminalen Enden der Helices  $\alpha 1$  und  $\alpha 3$ , dem C-terminalen Ende von Faltblatt  $\beta 1$  sowie dem sich anschließenden *loop* (loop1).

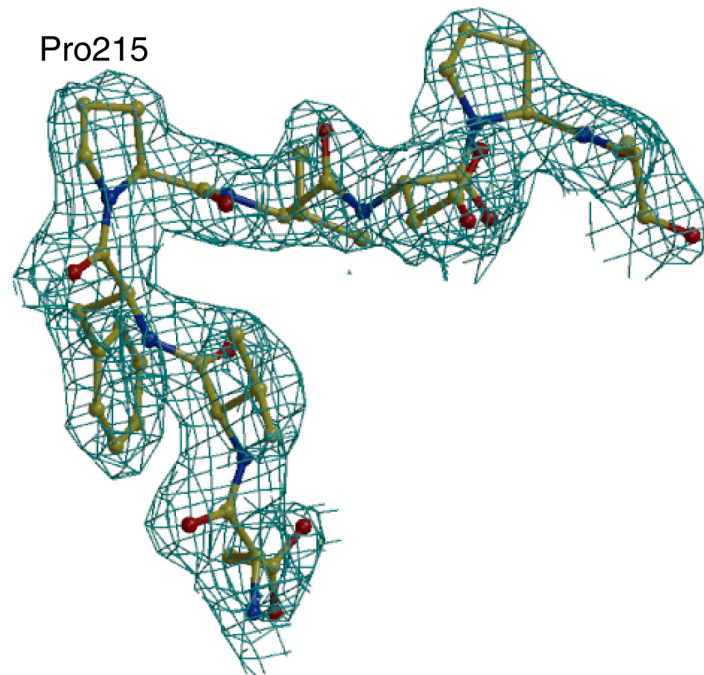


Abb. 51: Struktur und Elektronendichte im Bereich des cis-Prolin 215 (Abbildung erstellt mit BOBSCRIPT, Kraulis, 1997)

Das gesamte Monomer bildet eine einzige Domäne, deren funktionelles Zentrum der Bereich der beiden Zn-Atome ist, der in den Zn-kordinierenden und stabilisierenden sowie in den substratbindenden Teil gegliedert werden kann (s. 3.4.4.5 und 3.4.4.6). Das strukturelle Zentrum bildet der bereits besprochene  $(\beta\alpha)_4$ -Kern.

## 3.4.4.4. Quartärstruktur

Die BM-CrnA setzt sich in ihrer Quartärstruktur zu einem Homohexamer zusammen, welches eine Ausdehnung von etwa  $70 \text{ \AA} \times 90 \text{ \AA} \times 55 \text{ \AA}$  besitzt. Das Hexamer weist, wie bereits besprochen (s. 3.4.1.1),  $D_3$ -Punktsymmetrie auf. In der Aufsicht von der dreizähligen Achse aus auf das Molekül (Abb. 52) kann man die  $120^\circ$ -Symmetrie, die quasi von drei Dimeren gebildet wird, deutlich erkennen.

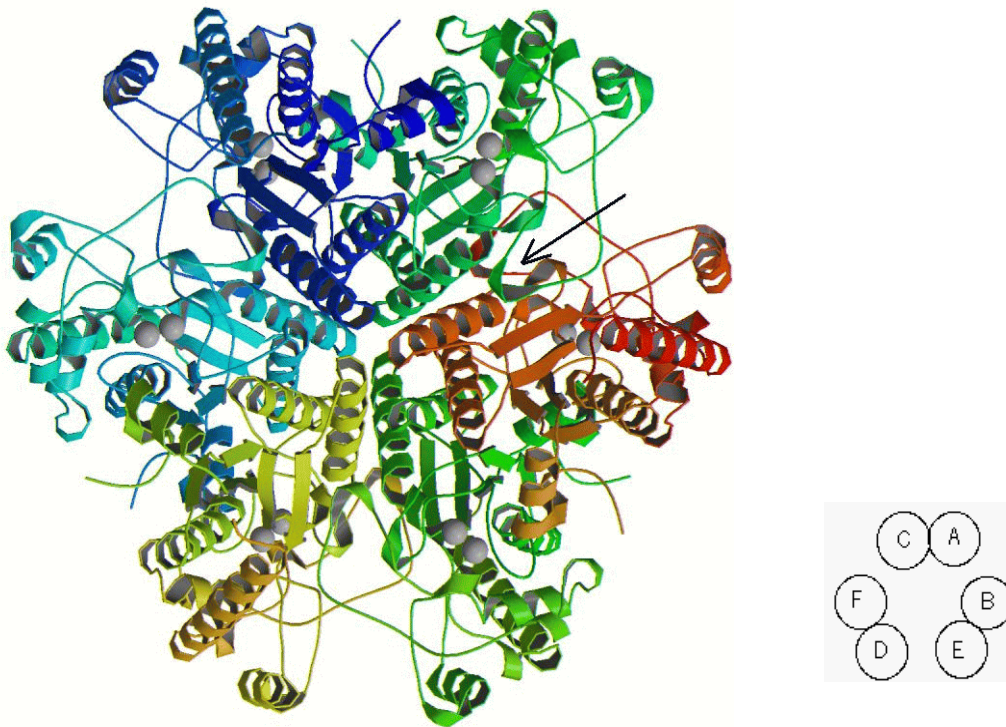


Abb. 52: Das hexamere Molekül in Richtung der dreizähligen Achse, rechts unten: schematisch

Diesem Aufbau folgend, findet man für jedes Monomer zwei unterschiedliche Kontaktflächen. Die deutlich größere Kontaktfläche, die die Monomere A und C, B und E sowie F und D zum Quasi-Dimer verbindet (Kontaktfläche 1), erstreckt sich über 19 Aminosäurereste pro Untereinheit, die an Wasserstoffbrücken beteiligt sind, sowie 13 Aminosäurereste, die hydrophobe Kontakte bilden. Innerhalb der Kontaktfläche werden 24 Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet (Programm: HBPLUS, McDonald und Thornton, 1994) sowie 19 hydrophobe Kontakte (CCP4-Programm *contact*). Die AC-Kontaktfläche verläuft in etwa parallel zur z-Achse der Elementarzelle über eine Länge von  $50 \text{ \AA}$  (Abb. 53).

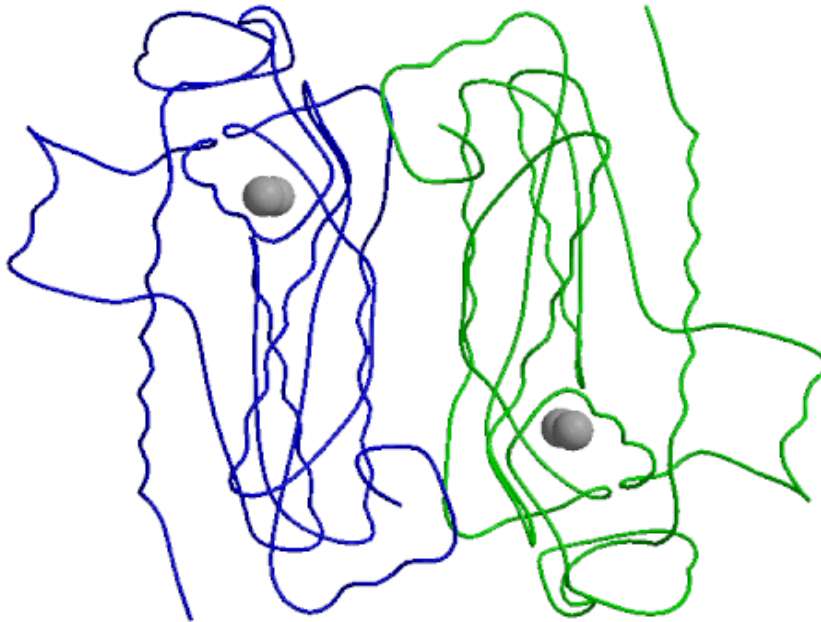


Abb. 53: Kontaktfläche im Bereich der Untereinheiten A und C (Grafik erstellt mit MOLSCRIPT, Kraulis, 1997)

Die Kontaktfläche, die die „Dimere“ miteinander verbindet (Kontaktfläche 2 zwischen A und B, E und D sowie F und C), wird zu einem Teil von den ausgedehnten *loops* (Position 189 - 233) der beteiligten Monomere ausgebildet. Ein Teilbereich dieser *loops* bildet im Bereich der Aminosäuren 211 bis 215 ein Pseudofaltblatt ( $\psi\beta 1$ , s. 3.4.4.3), das sich an den  $\beta$ -Faltblattstrang  $\beta 4$  anlagert (der schwarze Pfeil in der Abbildung 52 markiert diesen Bereich) und mit diesem über Wasserstoffbrücken verknüpft ist (Abb. 54, Tab. 17). Insgesamt werden innerhalb dieser Kontaktfläche 26 Wasserstoffbrücken gebildet sowie 11 hydrophobe Kontakte. Damit weist diese Kontaktfläche im Vergleich zur AC-Kontaktfläche einen höheren Anteil an Wasserstoffbrücken im Vergleich zu hydrophoben Kontakten auf. Um diese Aussagen zu quantifizieren, wird im Folgenden die Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zu der Größe der jeweiligen Kontaktfläche in Beziehung gesetzt.

Tab. 17: Wasserstoffbrücken in der  $\beta$ -faltblattähnlichen Kontaktfläche (berechnet mit *contact*, CCP4-Suite)

Ausgangsatom	Zielatom	Abstand [ $\text{\AA}$ ]
Val148A-N	Phe214B-O	2.70
Val148A-O	Phe214B-N	2.92
Val150A-N	Asp212B-O	2.90
Val150A-O	Asp212B-N	2.72
Asp212A-N	Val150B-O	2.78
Asp212A-O	Val150B-N	2.95
Phe214A-N	Val148B-O	2.95
Phe214A-O	Val148B-N	2.75

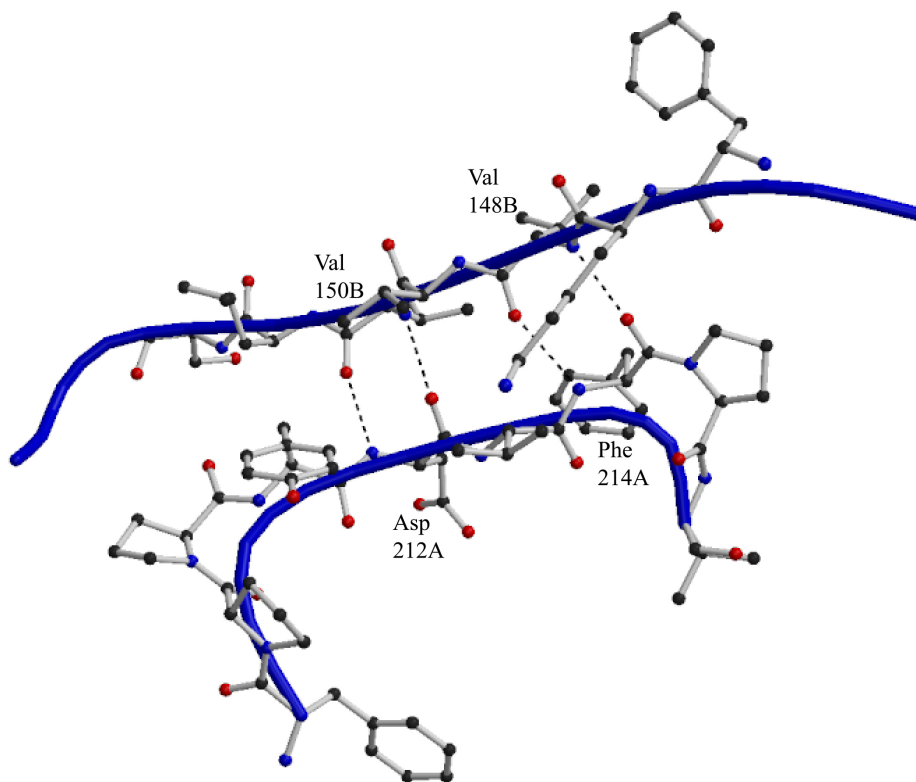


Abb.54:  $\beta$ -faltblattähnliche Kontaktfläche zwischen Monomer A und B



Die Größe der Kontaktfläche wurde als die Hälfte der Summe der Oberflächen der beteiligten Monomere abzüglich der Oberfläche des komplexierten Moleküls berechnet (Jones und Thornton, 1996). Die Oberflächen wurden mit dem CCP4-Programm *areaimol* berechnet, das mit einem abgewandelten Algorithmus nach Lee und Richards (Lee und Richards, 1971) rechnet. Wassermoleküle an der Proteinoberfläche oder der Kontaktfläche wurden bei der Berechnung nicht mit berücksichtigt. Die Oberfläche eines BM-CrnA-Monomers beträgt  $12076 \pm 41 \text{ \AA}^2$ , die Oberfläche des „Dimers“ um Kontaktfläche 1 beträgt  $20295 \pm 80 \text{ \AA}^2$  und die des „Dimers“ um Kontaktfläche 2 beträgt  $21206 \pm 53 \text{ \AA}^2$ . Daraus ergibt sich für Kontaktfläche 1 eine Größe von  $1928 \pm 5 \text{ \AA}^2$  und für Kontaktfläche 2 eine Größe von  $1473 \pm 9 \text{ \AA}^2$ . Nach Jones und Thornton (Jones und Thornton, 1996) hat die Kontaktfläche innerhalb eines Homodimers eine durchschnittliche Ausdehnung von  $1685 \text{ \AA}^2$ . Damit liegt die Größe von Kontaktfläche 1 deutlich über dem Durchschnitt. Das gibt zum einen die langgezogene Gestalt der Berührungsfläche zwischen Monomer A und C wieder zum anderen spricht dies für einen außerordentlich festen Kontakt, der typisch ist für Homooligomere, deren Untereinheiten in der Natur nie in dissoziierter Form vorliegen.

Die zweite Kontaktfläche weist eine unterdurchschnittliche Ausdehnung im Vergleich zu dem nach Jones und Thornton bestimmten Mittelwert auf. Da die Größe einer Kontaktfläche im Wesentlichen mit ihrer Bindungsstärke einhergeht, ist an der Kontaktfläche 2 eher ein Aufbrechen der hexameren Struktur zu erwarten als an Kontaktfläche 1. Allerdings wird die Kontaktfläche 2 durch die besprochene faltblattähnliche Struktur gestärkt. In diesem Faltblatt liegen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Atomen der Hauptketten vor (Tab. 17), die von ihrer Bindungslänge und Bindungsgeometrie nach Xu et al. (Xu et al., 1997) stabiler sind als Wasserstoffbrücken zwischen Seitenkettenatomen oder zwischen Seitenkette und Hauptkette.

Bezieht man die zu Beginn dieses Abschnitts ermittelte Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen auf die Größe der berechneten Kontaktflächen, so ergeben sich für die Kontaktfläche 1 1.2 Wasserstoffbrücken pro  $100 \text{ \AA}^2$  und für die Kontaktfläche 2 1.7 Wasserstoffbrücken pro  $100 \text{ \AA}^2$ . Nach Jones und Thornton sind in den Kontaktflächen von Homodimeren durchschnittlich  $0.70 \pm 0.46$  Wasserstoffbrücken pro  $100 \text{ \AA}^2$  zu erwarten und in den Kontaktflächen von Enzym-Inhibitor-Komplexen durchschnittlich  $1.37 \pm 0.37$  Wasserstoffbrücken pro  $100 \text{ \AA}^2$ . Danach ist der Gehalt an Wasserstoffbrücken in den Kontaktflächen der BM-CrnA hoch, was zu der Annahme führen könnte, dass das Enzym zeitweise in dissoziierter Form vorliegt. Dieses Verhalten wurde in Lösung jedoch nie beobachtet. Der besonders hohe Wasserstoffbrückenanteil in der Kontaktfläche 2 ist zudem durch die stabilisierenden  $\psi\beta$ -Faltblattkontakte zu erklären.

Neben den bereits diskutierten großen Kontaktflächen zwischen den Monomeren gibt es im Zentrum des hexameren Moleküls einen Bereich, in welchem sich alle sechs Untereinheiten nahe kommen und jedes Monomer Kontakte zu zwei weiteren Untereinheiten ausbildet. Von Monomer A ausgehend sind dies Kontakte zu den Untereinheiten E und F (Tab. 18). Dieser Bereich im Schwerpunkt des Moleküls ist weiterhin gekennzeichnet durch eine Häufung an polaren Resten und Wassermolekülen, die ein ausgeprägtes und auffälliges Netz an Wasserstoffbrücken bilden. An diesem Netzwerk sind die Reste Lys73, Asn82, Asp91, Asp101, Arg104, Glu105, Arg108, Glu129, Asp132, Arg136, Glu137 und Tyr140 beteiligt (Tab. 18, Abb. 55). Die Anzahl von 12 polaren Resten, von denen zehn Reste über zwei Zentren Wasserstoffbrücken bilden können, ist sehr auffällig. Der Rest Tyr140 ist mit erwähnt, da er eine zentrale Stellung innerhalb des H-Brückennetzwerks einnimmt. Er ist außerdem unter symmetrischen Gesichtspunkten interessant, denn die Hydroxylgruppen der Reste A140, E140 und F140 liegen quasi auf den Eckpunkten eines Dreiecks, durch dessen Schwerpunkt die dreizählige nicht-kristallographische Symmetrieachse führt. Die Tabelle 18 zeigt, dass in diesem begrenzten Bereich der Struktur zwölf Reste 31 Wasserstoffbrücken ausbilden.

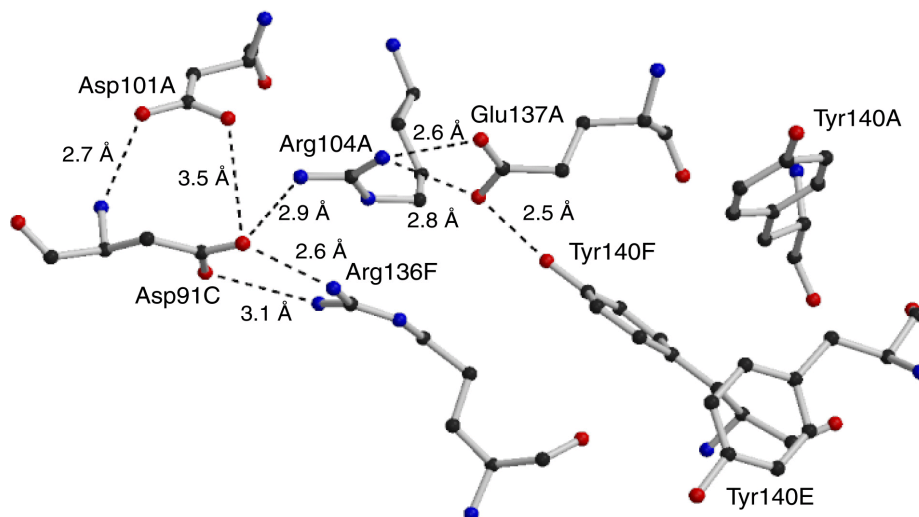


Abb. 55: Ausschnitt des Wasserstoffbrückennetzwerks im Kontaktbereich der Untereinheiten A, C und F (Grafik erstellt mit MOLSCRIPT, Kraulis, 1997)

Tab. 18: Wasserstoffbrückennetzwerk im Kontaktbereich der sechs Untereinheiten (dargestellt sind die Bindungen ausgehend von Monomer A, fett unterlegt sind die Kontakte zu den Untereinheiten E und F); die Bindungslängen wurden entweder mit CONTACT berechnet oder stammen aus O (Jones, 1991)

Partneratom 1	Partneratom 2	Bindungslänge [Å]
Asn82A-OD1	Glu105C-OE1	2.8
Asn82A-OD1	Glu105C-OE2	3.3
Asn82A-O	Arg108C-NE	2.7
Asn82A-O	Arg108C-NH2	2.7
Asp91A-N	Asp101C-OD2	2.8
Asp91A-OD1	Arg136B-NH2	3.4
Asp91A-OD1	Arg136B-NH1	3.1
Asp91A-OD2	Arg136B-NH2	2.5
Asp91A-OD2	Asp101C-OD1	3.5
Asp91A-OD2	Arg104C-NH2	2.8
Asp101A-OD1	Asp91C-OD2	3.5
Asp101A-OD2	Asp91C-N	2.7
Arg104A-NH2	Asp91C-OD2	2.9
Arg104A-NH1	Glu137A-OE1	2.8
Arg104A-NH1	Glu137A-OE2	2.6
Glu105A-OE1	Asn82C-OD1	2.9
Glu105A-OE2	Asn82C-OD1	3.2
Arg108A-NE	Asn82C-O	2.6
Arg108A-NH2	Asn82C-O	2.8
Glu129A-OE1	Tyr72B-OH	2.5
Glu129A-OE1	Lys73B-NZ	2.7
Glu129A-OE2	Lys73B-NZ	3.3
Asp132A-OD2	Lys73B-NZ	2.7
Arg136A-NH1	Asp91B-OD1	3.0
Arg136A-NH2	Asp91B-OD1	3.4
Arg136A-NH2	Asp91B-OD2	2.5
Glu137A-OE1	Arg104A-NH1	2.8
Glu137A-OE2	Arg104A-NH1	2.6
<b>Glu137A-OE2</b>	<b>Tyr140F-OH</b>	<b>2.5</b>
<b>Tyr140A-OH</b>	<b>Glu137E-OE2</b>	<b>2.6</b>

Eine starke Vernetzung durch Wasserstoffbrücken zwischen den Untereinheiten wurde von Vetriani et al. (Vetriani et al., 1998) als Ursache für besondere Thermostabilität diskutiert. Ein ganz ähnliches Netzwerk von Wasserstoffbrücken wurde von den Autoren in dem ebenfalls hexameren Enzym Glutamatdehydrogenase aus den hyperthermophilen Organismen *Pyrococcus furiosus* bzw. *Thermococcus litoralis* beobachtet. Das Enzym weist starke Analogien zur BM-CrnA auf: die hexamere Glutamatdehydrogenase besitzt die gleiche interne dreizählige Symmetrieachse, die aus drei Quasi-Dimeren gebildet wird. Das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk befindet sich bei diesem Enzym ebenfalls im Zentrum des Hexamers an der Kontaktfläche von drei Untereinheiten, entsprechend den Untereinheiten A, C, F und B, D, E der BM-CrnA (Abb. 55).

Vetriani et al. untersuchten Mutanten, bei denen Reste, die an dem H-Brückennetzwerk beteiligt sind, ausgetauscht waren. Vor allem Austausch von Aminosäuren, die an der Trimerbildung beteiligt waren, führten zu deutlich reduzierter Hitzestabilität (104 °C Y 80 °C). Ausgehend von der Bedeutung gerade dieser Reste diskutierten die Autoren den Zerfall des Proteins als kooperative irreversible Dissoziation der Untereinheiten, was mit der Beobachtung nur eines Phasenübergangs im DSC-Experiment der BM-CrnA übereinstimmt (s. 3.1.5). Diese Fülle an Analogien stärkt die Annahme, dass auch bei der BM-CrnA das Wasserstoffbrückennetzwerk im Bereich der Kontaktfläche von drei Untereinheiten des Enzyms für dessen Thermostabilität von entscheidender Bedeutung ist.

Um diese Hypothese zu untermauern, könnte man nun untersuchen, ob ein Aminosäureaustausch von Asp101, Arg136, Arg104 oder Glu137 gegen einen hydrophoben Rest wie Valin oder aber auch Threonin, das nicht über zwei Zentren an einem Wasserstoffbrückennetzwerk beteiligt sein kann, zu einer Erniedrigung des Schmelzpunkts der CrnA führen würde.

## 3.4.4.5. Das Doppelzinkzentrum

Die BM-CrnA besitzt zwei Zinkatome im aktiven Zentrum, die einen Abstand von 3.5 Å zueinander aufweisen. Der Elektronenmangel dieser Lewissäure im Zentrum des Enzyms wird durch koordinative Bindung zu basischen nucleophilen Aminosäureresten ausgeglichen. An der Koordination sind in der ersten Sphäre fünf Aminosäurereste und mindestens zwei Wassermoleküle beteiligt. Die Anzahl und Position der Wassermoleküle war auch nach der Verfeinerung nicht für jedes Monomer identisch. Daraus ergaben sich pro Zinkatom vier bis sechs Liganden, die zu einer verzerrt tetraedrischen, zu einer verzerrt trigonal bipyramidalen sowie zu einer oktaedrischen Koordination der Zinkatome beitrugen. Der charakteristischste Ligand ist das Asp45, dessen Carboxylat-Sauerstoffatome an je ein Zinkatom koordinieren und diese somit verbrücken. Zn300 zeigte im Wesentlichen die fünffache (oder sechsfache) Koordination, an der Asp45, His120, Glu34 und zwei (oder drei) Wassermoleküle beteiligt sind. Beide Wassermoleküle besitzen in der zweiten Koordinationssphäre Wasserstoffbrückenbindungspartner, die die Geometrie stabilisieren, und die elektronenziehende Wirkung des Zinks kompensieren. Das Wassermolekül 404 (Monomer A), das ungleichmäßig zwischen den beiden Zinkatomen positioniert ist, wird von His 178 stabilisiert, das Wassermolekül 164 von Glu122. Aufgrund der stark basischen Umgebung im Bereich der Zinkbindungsstelle liegt das Wassermolekül 404 vermutlich als Hydroxidion vor. Die Bindungslängen zwischen den Sauerstoff- bzw. Stickstoffatomen und den Zinkatomen schwanken zwischen 1.9 Å und 2.5 Å. Die Bindungslängen sind sehr kurz und sprechen damit für koordinative Bindungen (Tab. 19, Abb. 56).

Tab. 19: Koordination und Bindungslängen zu den Zinkatomen 300 und 301

Paaratom 1	Paaratom 2	Abstand [Å]
Asp45-OD2	Zn300	2.1
Asp45-OD1	Zn301	2.0
His120-ND1	Zn300	2.4
Glu34-OE1	Zn300	2.0
WAT164	Zn300	2.4
WAT404	Zn300	2.5
His36-NE2	Zn301	2.1
Glu183-OE2	Zn301	1.9
WAT404	Zn301	1.9
His178-ND1	WAT404	2.2

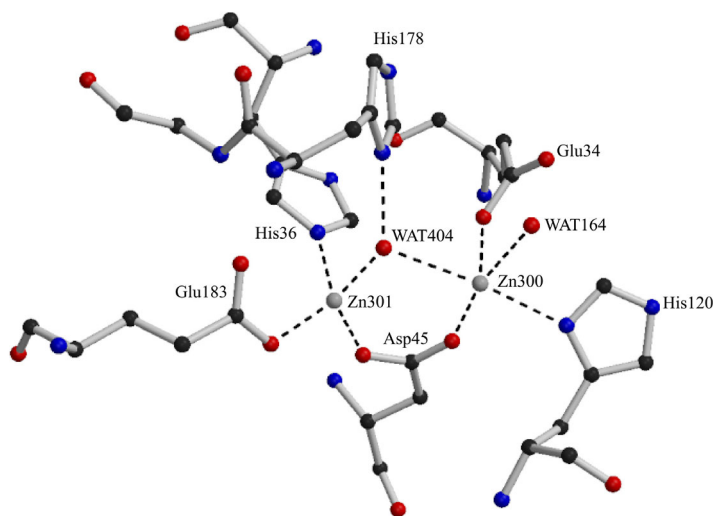


Abb. 56: Koordination des Zinkzentrums in Untereinheit D (Abbildung erstellt mit MOLSCRIPT, Kraulis, 1997)

In der obigen Abbildung erkennt man deutlich die tetraedrische Koordination an Zn301 sowie die trigonal bipyramidale Anordnung an Zn300. Diese Nicht-Äquivalenz der Zinkatome wurde bereits von anderen Autoren in Bezug auf Bimetallzentren von Hydrolasen diskutiert (Wilcox, 1996, Thoden et al., 2001, s. 3.4.4.5). Als Ursache wurde von den Autoren die unterschiedliche, nicht symmetrische Funktion der Zinkionen bei der Katalyse genannt.

Betrachtet man die Lage der Wassermoleküle in allen sechs Untereinheiten, erkennt man deutlich, dass diese sehr diffus verteilt sind (Abb. 57). Den Wasserpositionen w1 und w2 in Abbildung 57 entsprechen die Wassermoleküle 404 und 164 in der obigen Abbildung, die Monomer D wiedergibt. Alle vier Wasserpositionen sind in den Untereinheiten C, E und F besetzt. Die uneinheitliche Anzahl von Liganden an den Zinkionen stimmt mit den möglichen Koordinationszahlen und -symmetrien, die bei niedermolekularen Verbindungen an zweiwertigem Zink beobachtet werden, überein (Greenwood und Earnshaw, 1984). Berücksichtigt man weiter die Überlegung, dass die Bindung zu Wasser energetisch weniger günstig sein dürfte als zu dem entsprechenden Substrat, erscheint es verständlich, dass verschiedene mögliche Koordinationen eingenommen werden. Auf der anderen Seite muss man auch die Grenzen der Verfeinerung bei einer Auflösung von 2.1 Å und mögliche Besetzungszahlen unter eins für die verschiedenen Wassermoleküle berücksichtigen. Diese Faktoren führen dazu, dass die Elektronendichte im Bereich der elektronenreichen Zinkionen schwer interpretierbar wird.

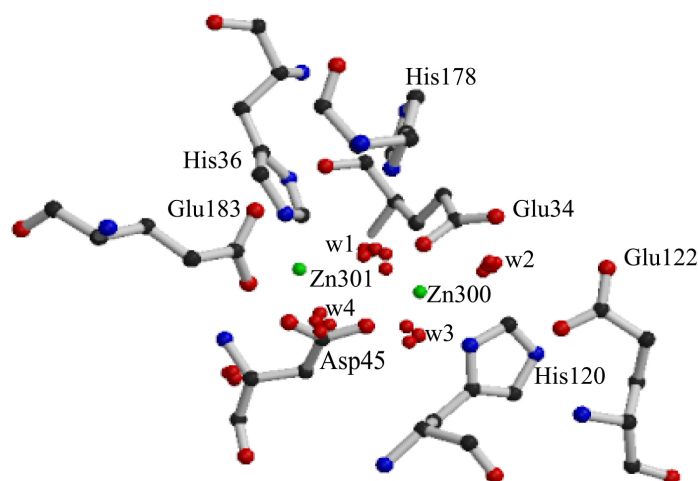


Abb. 57: Die Wassermoleküle innerhalb der Zinkbindungsstellen der sechs Untereinheiten. Die Positionen der Aminosäurereste sowie Zinkionen gehören zu Monomer A (Abbildung erstellt mit MOLSCRIPT, Kraulis, 1997)

Eine variable Koordination durch Wassermoleküle wurde auch von Karplus und Pearson (Karplus und Pearson, 1997) für den Fall der Urease beschrieben. Die Urease besitzt ebenfalls ein Bimetallzentrum, in welchem sich zwei Nickelionen befinden. In der genannten Untersuchung wurden 14 Ureasestrukturen mit einer Auflösung von 2.5 Å und besser übereinander gelegt. Es zeigte sich, dass die koordinierenden Aminosäurereste und die Nickelionen sehr gut übereinstimmten, die Wasserstruktur jedoch sehr variabel war. Auch wenn in dieser Studie nicht die Strukturen der Untereinheiten eines Moleküls untersucht wurden, sondern Strukturen, deren Daten bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen worden waren sowie Strukturen von nativem Protein ohne Substrat und von Mutanten, so zeigt der Vergleich doch die allgemein recht geringe Determination der Wasserpositionen im Doppelmetallzentrum.

#### 3.4.4.6. Das Substrat im aktiven Zentrum - Reaktionsmechanismus

Es wurde manuell versucht, den vermutlich als Diol vorliegenden Übergangszustand des Substrats Creatinin in das aktive Zentrum des Enzyms einzufügen. Dazu wurden die OH-Gruppen des Creatinins sowie die Iminogruppe an in der Struktur fixierte Wassermoleküle angeglichen. Gleichzeitig wurde auf hydrophobe Bindungsbereiche geachtet sowie sterische Konflikte vermieden. Auf dieser Grundlage ergaben sich zwei mögliche Positionen des Creatinins im aktiven Zentrum. Im folgenden Abschnitt sollen diese beiden Positionen beschrieben und beurteilt werden und im Anschluss denkbare Reaktionsmechanismen ausgehend von den zwei beschriebenen Positionen diskutiert werden.

Beide Positionen wurden mit den Routinen *model\_anneal.inp* (Brünger und Rice, 1994) und *model\_minimize.inp* des Programmpaketes CNS mittels Moleküldynamik bzw. Energieminimierung optimiert; die Reste des aktiven Zentrums und der Zinkatome wurden dabei starr gehalten. Die Rechnungen ergaben zwei energieminierte Positionen für Creatinin (Position 1 und Position 2), die annähernd übereinander liegen, aber einen um  $180^\circ$  gegeneinander verdrehten Ring aufweisen. Position 1 des Creatinins im aktiven Zentrum ermöglicht seine Stabilisierung durch Wasserstoffbrücken und hydrophobe Kontakte. Die diolischen Hydroxylgruppen ersetzen recht gut Wassermoleküle der Struktur, so dass sich von dort aus Bindungen zu den Zinkionen mit einer Länge von etwa 2.1 Å ergeben. Weiterhin bestehen für diese Gruppen Möglichkeiten zu Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Ringstickstoff ND1 von His178 sowie mit dem Hauptkettenstickstoff Tyr121. Der Amidstickstoff des Creatinins besitzt die Möglichkeit zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke (2.8 Å) zum Carbonylsauerstoff von Ser78. Auch der Iminostickstoff des Creatinins besetzt die Position eines in der Struktur fixierten Wassermoleküls. Von dieser Position aus gibt es mehrere Möglichkeiten für Wasserstoffbrückenbindungen jeweils zu Carbonyl-O-Atomen der Hauptkette. Die mit 2.7 Å kürzeste Bindung führt zu Trp174. Die Ring-Methylen- und Stickstoff-Methylgruppe können mit den Resten Trp154, Glu183 sowie Tyr121 hydrophob wechselwirken (Abb. 58, Abb. 60).

Position 2 von Creatinin hat weniger Möglichkeiten zur Stabilisierung über hydrophobe Kontakte oder Wasserstoffbrücken. Die OH-Gruppen des Diols können wiederum Bindungen zu den Zinkionen ausbilden, mit einer Länge von 2.3 Å bzw. 2.1 Å sowie zum Ringstickstoff ND1 von His178. Der Amidstickstoff des Creatinins wird durch eine H-Brücke zur Carboxylatgruppe von Glu183 stabilisiert. Die Iminogruppe bildet in dieser Position eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff von Glu177, hydrophobe Kontakte sind möglich zu Tyr121 (Abb. 59, Abb. 60).

Die eben besprochenen Positionen des Creatinins lassen sich rechtfertigen, da es verschiedene Möglichkeiten der Stabilisierung gibt und keine sterischen Konflikte, allerdings sind sie damit keinesfalls bewiesen, da die Energieminimierung in CNS bereits von einer vorgegebenen



Position des Creatinins ausgeht und nicht von einer beliebigen Lage des Substrats und somit nicht beliebig große Veränderungen in der Position des Substrats möglich sind.

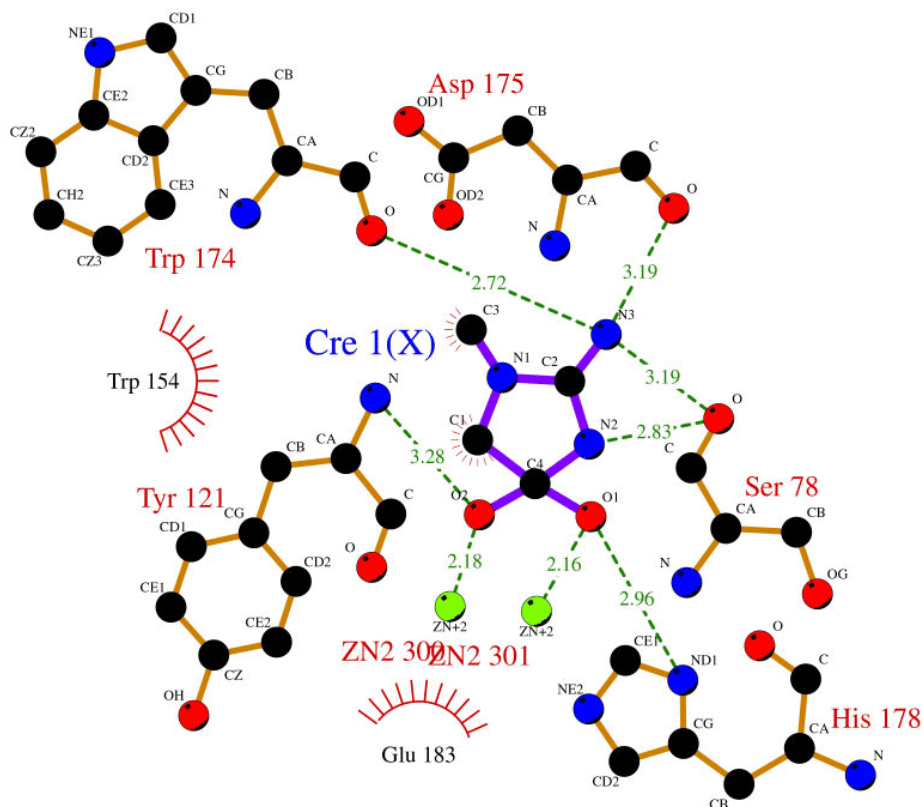


Abb. 58: Schematische Darstellung der Umgebung des Creatinins (Position 1) im aktiven Zentrum (dargestellt mit dem Programm LIGPLOT (Wallace et al., 1995)); die gestrichelten Halbkreise zeigen die hydrophoben Kontakte

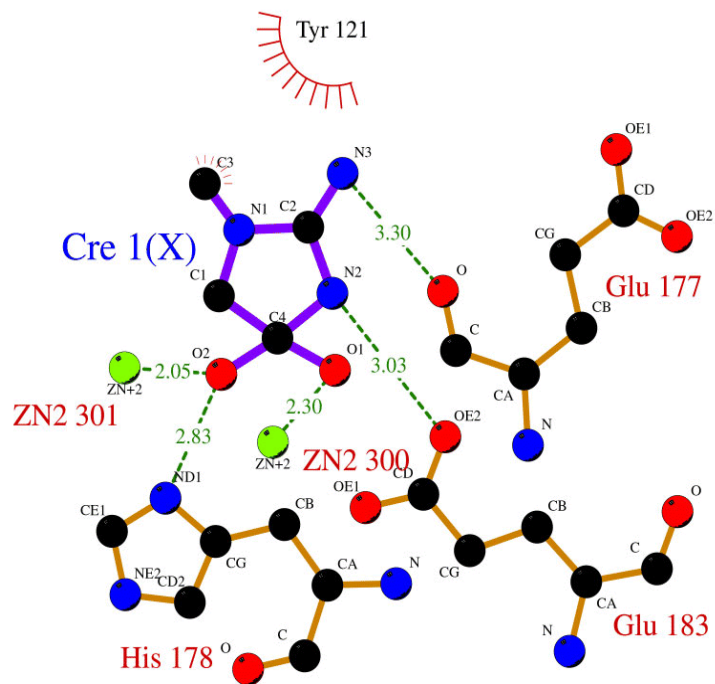


Abb. 59: Schematische Darstellung der Umgebung des Creatinins (Position 2) im aktiven Zentrum (dargestellt mit dem Programm LIGPLOT (Wallace et al., 1995)); die gestrichelten Halbkreise zeigen die hydrophoben Kontakte

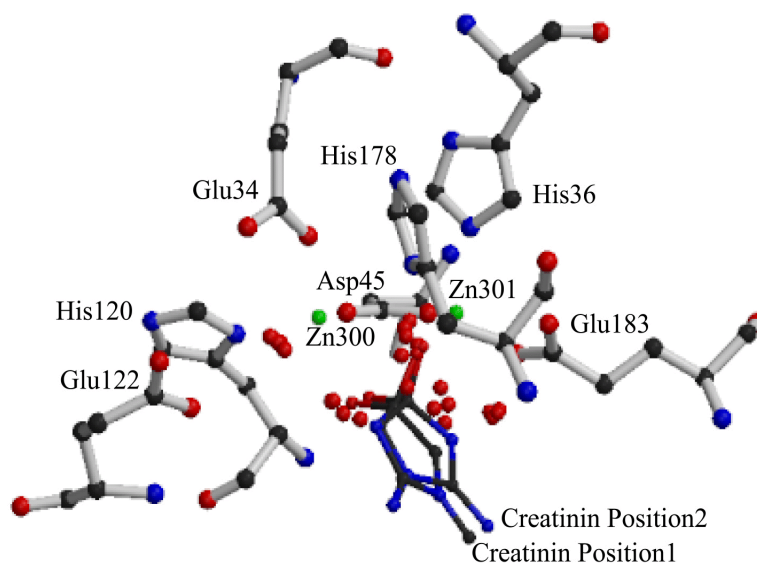


Abb. 60: Räumliche Lage des Creatinins (beide möglichen Positionen) im aktiven Zentrum (Abbildung erstellt mit MOLSCRIPT, Kraulis, 1997)

Eine Entscheidung für die eine oder andere Position würde auf der Grundlage ihrer Wechselwirkungen wohl zugunsten von Position 1 ausfallen. Betrachtet man jedoch zusätzlich die in den Programmen *model\_anneal.inp* und *model\_minimize.inp* berechneten Gesamtenergien am Ende der Minimierung, so liegen diese bei beiden Rechnungen für Creatinin in Position 2 niedriger als für Creatinin in Position 1 (Tab. 20), was zu einer Präferenz von Position 2 führen sollte.

Tab. 20: Gesamtenergien für Creatinin in Position 1 und Position 2 nach Moleküldynamik- und Energieminimierungsrechnungen

	Position 1	Position 2
Gesamtenergie nach Moleküldynamik [kcal/mol]	64981	64654
Gesamtenergie nach Energieminimierung [kcal/mol]	11622	11560

Obwohl dies im Rahmen des oben Diskutierten sehr spekulativ ist, sollen nun zwei denkbare Reaktionsmechanismen diskutiert werden, von denen einer exemplarisch als Reaktionsschema vorgestellt wird (Abb. 61).

Das als Diol im vorangehenden Abschnitt dargestellte Creatinin impliziert den ersten Schritt der Katalyse, nämlich den nukleophilen Angriff des Wassermoleküls oder vermutlich Hydroxylions w1 (Abb. 57, s. auch 3.4.4.5), das die beiden Zinkionen verbrückt, auf den Carbonylkohlenstoff des Creatinins (Schritt 1). Gleichzeitig findet eine allgemein basische Katalyse ausgehend von Glu183 statt. Es bildet sich das dargestellte Diol mit einem stark positiv polarisierten Kohlenstoff, das als zweizähniger Ligand an beide Zinkionen bindet. Bezogen auf die Creatinin-Position 2 startet im nächsten Schritt möglicherweise eine saure Katalyse ausgehend von Glu183. Die Ringspaltung wird dann vermutlich durch Übertragung eines Protons von Glu183 auf den Amidstickstoff des Creatinins eingeleitet (Schritt 2). Dieser Reaktionsmechanismus ist aus sterischen Gesichtspunkten für Creatinin in Position 2 denkbar. Ein zyklischer Übergangszustand zwischen der Carboxylatgruppe von Glu183, Zn301 und dem Amidstickstoff des Creatinins ist denkbar (Abb. 61) und stünde in Analogie zu dem von Thoden et al. (Thoden et al., 2001) für die Dihydroorotase, einem Enzym mit Doppelzinkzentrum, welches ebenfalls zyklische Amide umsetzt, vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus.

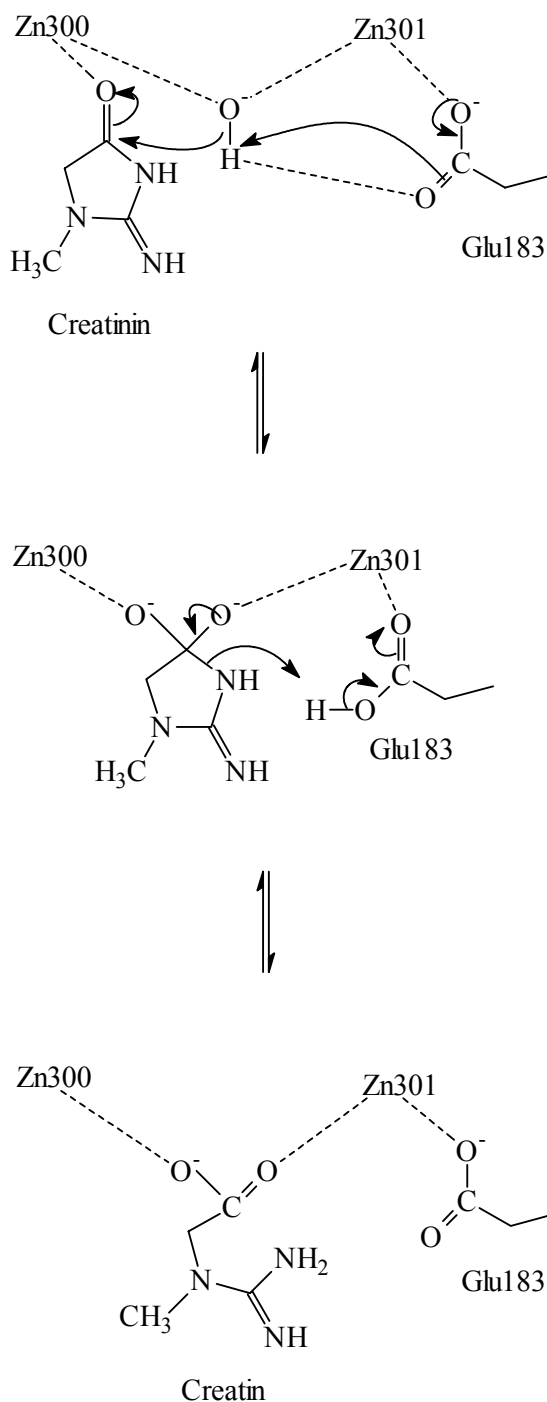


Abb. 61: Möglicher Reaktionsmechanismus für Creatinin in Position 2 mit wesentlicher Beteiligung des Restes Glu183 (Abbildung erstellt mit CHEMWIND (Version 2.1, 1987-1992, Fa. SoftShell))

Eine ähnliche Betrachtung für Creatinin in Position 1 legt allenfalls eine Beteiligung von His178 bei der Protonierung des Amidstickstoffs von Creatinin nahe. Der Abstand von His178-ND1 zum Amidstickstoff von Creatinin in Position 1 beträgt 4.0 Å. Geht man davon aus, dass das Creatinin ungenau positioniert ist, ist eine Annäherung auf unter 3 Å denkbar. Eine Protonenübertragung ausgehend von Histidin stünde in Analogie zu dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus der Urease (Karplus et al., 1997), ebenfalls einem Enzym mit Doppelzinkzentrum. Der beschriebene Reaktionsmechanismus unter Beteiligung von Glu183 sowie die berechneten Gesamtenergien führen zu einer Präferenz von Creatinin in Position 2, wohingegen die Wechselwirkungen, die Creatinin in Position 1 ausbilden kann, für diese Möglichkeit sprechen. Für gesicherte Aussagen über die Lage des Substrats sowie den Reaktionsmechanismus sind Datensätze mit eingebautem Substrat bzw. Inhibitor nötig.

Auf festerem Boden lässt sich der Zugang zum aktiven Zentrum diskutieren. Das Substrat liegt verschlossen in einer Tasche des Enzyms. Besonders die ausladenden hydrophoben Reste Trp154, Trp174 und Tyr121 versperren den Zugang zum aktiven Zentrum. Eine Darstellung des Enzyms, in der van-der-Waals-Radien um alle Atome abgebildet sind, verdeutlicht die dichte Oberfläche in diesem Bereich (Abb. 62).

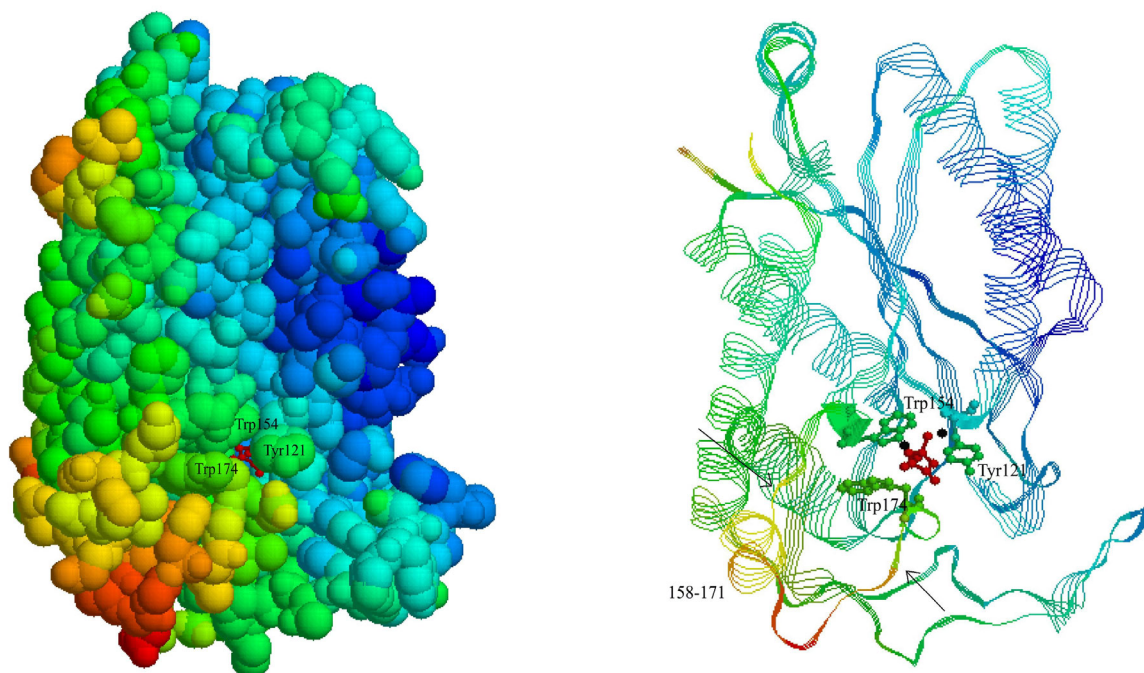


Abb. 62: links: Van-der-Waals-Oberfläche der BM-CrnA mit Blick auf den möglichen Zugang zum aktiven Zentrum; rechts: Sekundärstruktur des Enzyms aus der gleichen Perspektive; das Enzym ist nach Temperaturfaktoren gefärbt (blau: niedrige Temperaturfaktoren, rot: hohe Temperaturfaktoren). Das Substrat ist der besseren Übersichtlichkeit halber rot gefärbt.

In der Abbildung 62 ist deutlich der bereits in Kapitel 3.4.4.4 angesprochene sehr flexible helikale *loop* zwischen den Aminosäuren 158 und 171 zu erkennen. Eine Bewegung des *loops* an den durch Pfeile markierten Bereichen nach „hinten-unten“ (gemäß der obigen Abbildung) sollte auch den Rest Trp174 leicht nach „unten“ ziehen. Diese Bewegung ist über den Rest 174 hinaus eingeschränkt, da His178 an der Koordination der Zinkatome beteiligt ist. Des Weiteren ist eine Drehung des Restes Tyr121 nach „rechts-hinten“ denkbar. Eine koordinierte Abfolge dieser Bewegungen würde den möglichen Zugang zum aktiven Zentrum stark vergrößern, so dass angenommen wird, dass das Substrat auf diesem Weg ins aktive Zentrum gelangt. In der Abbildung 62 (rechts) erkennt man auch, dass aus dieser Richtung das Rückgrad des Proteins den Zugang zum aktiven Zentrum freigibt.

#### 3.4.4.7. Struktureller Vergleich mit der Familie der zyklischen Amidohydrolasen sowie weiteren Proteinen mit Bimetallzentrum

Mittlerweile sind etliche hydrolytische Enzyme bekannt, die ein Doppelmetallzentrum besitzen. Zu ihnen gehören verschiedene Peptidasen, die die Amidbindung von Proteinen spalten sowie Phosphatasen und Nukleasen, die Phosphorsäureesterbindungen von phosphorylierten Aminosäuren, Sacchariden, Nukleotiden, DNA, RNA und anderen spalten.

Ebenso wie **Dihydropyrimidinasen**, **Allantoinasen** und **Dihydroorotasen** spaltet die Creatinase die zyklische Amidbindung ihres Substrats. Sie besitzt genau wie die vorher genannten Enzyme ein Doppelmetallzentrum, das von einer Carboxygruppe überbrückt ist. Bezogen auf die Funktion gehören somit alle diese Enzyme zur Familie der zyklischen Amidohydrolasen. Dennoch fällt die CrnA innerhalb dieser Familie aus dem Rahmen, denn sie zeigt zu den übrigen Mitgliedern der Familie keine Ähnlichkeit in Struktur und Sequenz. Die Familie der zyklischen Amidohydrolasen bildet eine große Unterfamilie in einer Superfamilie von Proteinen, die strukturell ein konserviertes  $(\beta\alpha)_8$ -Zentrum aufweisen und zum überwiegenden Teil ein konserviertes Sequenzmotiv zeigen, das vier Histidine und einen Aspartatrest umfasst (Holm und Sander, 1997). Diese Reste sind an der Metallbindung beteiligt, die fast allen Proteinen dieser Familie gemein ist. Im Vergleich dazu weist die BM-CrnA-Struktur kein  $(\beta\alpha)_8$ -barrel auf (s. 3.4.4.3 und 3.4.4.8) und zeigt im multiplen Sequenzalignment auch nicht die Konsensussequenz dieser Familie. Innerhalb der Unterfamilie von Dihydropyrimidinasen, Allantoinasen und Dihydroorotasen (gemäß der Klassifizierung von Holm und Sander) zeigen die Dihydroorotase aus *E. coli* (Thoden et al. 2001) sowie die D-Hydantoinase aus *Thermus sp.* (Abendroth, Dissertation, 2001) ein carbamyliertes Lysin, welches die beiden Metallatome im aktiven Zentrum überbrückt. Dieses Motiv teilen sie mit der Urease aus *Klebsiella aerogenes* (Karplus et al., 1997) sowie der Phosphotriesterase aus *Pseudomonas diminuta* (Benning et al., 2001). Alle diese Enzyme besitzen ein Wassermolekül, das die Metallatome überbrückt. In der D-Hydantoinase, Phosphotriesterase, Dihydroorotase sowie Urease liegen zusätzlich vier Histidine und ein Aspartatrest in der ersten Koordinationssphäre der Metallatome. Die Koordinationssphäre der BM-CrnA setzt sich wie bereits beschrieben (s. 3.4.4.5) gänzlich anders zusammen. Die Metallionen werden von einem Aspartatrest überbrückt und es koordinieren zwei Histidine, zwei Glutamatreste sowie zwei bis vier Wassermoleküle in der ersten Koordinationssphäre (Tab. 21). In den beschriebenen Enzymen sind die Metallionen vier- bis sechsfach koordiniert. Im nativen Zustand besitzt die Urease zweiwertige Nickelionen in ihrem Metallzentrum, Dihydroorotase und Phosphotriesterase kommen in der Natur als Zinkenzyme vor, ebenso wie die D-Hydantoinase und die BM-CrnA. Die Phosphotriesterase ist zusätzlich eingehend auf die Bindung der zweiwertigen Kationen Nickel, Cadmium und Mangan untersucht worden, sie ist also nicht auf Zinkionen spezialisiert. Auch für die D-Hydantoinase und die CrnA (Rikitake et al., 1979) ist die

Bindung weiterer zweiwertiger Kationen beschrieben worden. Die Abstände zwischen Metall (Zink) und Ligand betragen in allen Enzymen 1.9 Å bis 2.5 Å. An vierfach ligierten Zinkionen sind die Bindungsabstände im Mittel etwa 0.1 Å kürzer als an fünffach oder sechsfach ligierten. Die Zink-Zink-Abstände betragen in allen Enzymen 3.5 Å, der Nickel-Nickel-Abstand in der Urease beträgt ebenfalls 3.5 Å. Die in die Phosphotriesterase eingebauten, teilweise von ihrem Ionenradius her im Vergleich zu Zink größeren Metallionen, führen zu einer Aufweitung der Ligand-Metall-Abstände. Bei dem gemischten Metallzentrum Zink/Cadmium wurden am Cadmiumion Metall-Ligand-Abstände bis 2.8 Å beobachtet. Es zeigte sich außerdem, dass die größeren Ionen bevorzugt die Position des stärker koordinierten Zinkions einnehmen.

Aus der Familie der **Aminopeptidasen** besitzt die Leucinaminopeptidase aus Rind (Burley et al., 1992) ein Doppelzinkzentrum, das von drei Aspartatresten, einem Glutamatrest und einem Lysin koordiniert wird. Die Zinkionen werden von dem Glutamatrest überbrückt. Der Abstand zwischen den Zinkionen ist in diesem Enzym mit 2.9 Å sehr kurz, ein überbrückendes Wassermolekül wird nicht beschrieben. Die Abstände zwischen den Liganden und Zink schwanken zwischen 1.9 Å und 2.4 Å, vergleichbar zu den Abständen in den bisher beschriebenen Zinkenzymen. Ein Zinkatom wird in diesem Enzym als deutlich schwächer gebunden beschrieben, es wird nur von drei Liganden koordiniert und ist austauschbar mit Mangan, Magnesium und Cobalt. Die Methioninaminopeptidase aus *Streptomyces griseus* (Gilboa et al., 2000) wird in Kapitel 3.4.4.8 genau beschrieben und weist eine zur BM-CrnA sehr ähnliche erste Koordinationssphäre der Zinkionen auf. Struktur und Sequenz der beiden Enzyme unterscheiden sich jedoch völlig. Die Methioninaminopeptidase aus *E. Coli* (Roderick und Matthews, 1993) besitzt zwei Cobaltatome im aktiven Zentrum, die einen Abstand von 2.9 Å zueinander aufweisen. Die Metallionen werden von zwei Aspartat-, zwei Glutamat- und einem Histidinrest koordiniert. Interessanterweise werden die Metallionen in diesem Enzym von zwei Resten überbrückt, nämlich von einem Aspartat- und einem Glutamatrest. Die Metall-Ligand-Abstände sind mit 1.6 Å bis 2.3 Å kürzer als in den bisher beschriebenen Enzymen (Tab. 21).

Ein in Bezug auf die Metallionen interessantes Beispiel aus der Familie der **Phosphatasen** ist die *purple acid* Phosphatase aus Kidneybohne (Klabunde et al., 1996). Das Doppelmetallzentrum wird von einem Eisen(III)ion und einem Zink(II)ion aufgebaut, welche über ein Wassermolekül und einzähnig über ein Carboxylat-O-Atom eines Aspartatrestes verbrückt sind. Beide Ionen sind oktaedrisch von sechs Liganden umgeben. Das Zinkion wird von einem Aspartatrest, einem Asparagin, zwei Histidinen und zwei Wassermolekülen koordiniert, das Eisenion von zwei Aspartatresten, einem Tyrosin, einem Histidin und ebenfalls zwei Wassermolekülen. Die beiden Metallionen sind 3.3 Å voneinander entfernt. Die Ligand-Metall-Abstände liegen für Zink zwischen 2.0 Å und 2.3 Å und für Eisen zwischen 2.0 Å und 2.5 Å. Bei dem hier vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus bindet Phosphat an das Zinkion und wird nukleophil von einem an Fe(III) gebundenen Hydroxidion angegriffen. Es wird von den Autoren explizit nicht



von einem nukleophilen Angriff des überbrückenden Hydroxidions ausgegangen (Tab. 21). Abschließend soll die **Ribonuklease H**-Domäne der HIV-1 Reversen Transkriptase (Davies et al., 1991) beschrieben werden. Im Metallzentrum dieses Enzyms befinden sich zwei Manganionen, die einen Abstand von 4 Å zueinander aufweisen. Welche Kationen nativ im Metallzentrum des Enzyms binden, wird von den Autoren nicht beschrieben. Auch dieses Doppelmetallzentrum scheint nicht spezifisch für nur eine Ionensorte zu sein. In der ersten Koordinationssphäre der Metallatome werden lediglich drei Aspartatreste und ein Glutamatrest beobachtet, wobei ein Aspartatrest die beiden Ionen über eine Carboxylatgruppe verbrückt (Tab. 21). Weitere Nukleasen sind in der Literatur beschrieben, die drei Metallionen im Metallzentrum enthalten (P1-Nuklease aus *Penicillium citrinum*, Volbeda et al., 1991).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die zwei Metallzentren in den besprochenen Proteinen jeweils unterschiedlich koordiniert sind. In der erstgenannten Gruppe der zyklischen Amidohydrolasen und ihrer Superfamilie sind diese Unterschiede für die Substratbindung und die Katalyse verantwortlich. Die Substratbindung findet bei diesen Enzymen zunächst am niedriger koordinierten Metallion statt, der nukleophile Angriff am Carbonyl-C-Atom des Substrats erfolgt über ein an beide Metallionen gebundenes Hydroxidion. Dieser Reaktionsmechanismus lässt sich möglicherweise auf die BM-CrnA übertragen (s. 3.4.4.6), obwohl zu der Familie keine Ähnlichkeit in Sequenz und Struktur besteht. Bei der *purple acid* Phosphatase findet der nukleophile Angriff am Carbonyl-C-Atom des Substrats auch über ein aktiviertes Hydroxidion statt, allerdings ist dieses nur an Fe(III) gebunden. Die Substratbindung verläuft im ersten Schritt über Zn(II). Bei weiteren Enzymen gehen die Unterschiede in den Metallpositionen so weit, dass wie bei der Leucinaminopeptidase Temperatur- und Besetzungsfaktoren für beide Positionen unterschiedlich sind, so dass die Bindung des zweiten Ions gleichzeitig mit dem Substrat diskutiert wird. Auch für die Nuklease H wird die Ähnlichkeit zur 3',5'-Exonuklease beschrieben, die bei Abwesenheit von Substrat oder Produkt ein zweiwertiges Kation im aktiven Zentrum aufweist und in Enzym-Substrat-Komplexen zwei. Einen Überblick über die diskutierten Ähnlichkeiten und Unterschiede gibt Tabelle 21.

Tab. 21: Vergleich von Enzymen mit Doppelmetallzentrum

Enzym	Organismus	Substrat	Metallion	Ligand an Metall A	Ligand an Metall B	Brückenliganden	Abstand der Metallatome [Å]
BM-CrnA	<i>P. putida</i>	Creatinin	2 Zn <sup>2+</sup>	Glu, His, μ-Asp, H <sub>2</sub> O, μ-OH <sup>-</sup>	Glu, His, μ-Asp, μ-OH <sup>-</sup>	Asp, OH <sup>-</sup>	3.5
Urease	<i>K. aerogenes</i>	Harnstoff	2 Ni <sup>2+</sup>	Asp, 2 His, μ <sup>*</sup> -Lys- CO <sub>2</sub> <sup>**</sup> , H <sub>2</sub> O	2 His, μ-Lys-CO <sub>2</sub> ,	Lys-CO <sub>2</sub>	3.5
Dihydroorotase	<i>E. coli</i>	Dihydroorotat	2 Zn <sup>2+</sup>	Asp, 2 His, μ <sup>*</sup> -Lys- CO <sub>2</sub> <sup>**</sup> , μ-OH <sup>-</sup>	2 His, μ-Lys-CO <sub>2</sub> , μ-OH <sup>-</sup>	Lys-CO <sub>2</sub> , OH <sup>-</sup>	3.5
Leucinamino-peptidase	Rind	N-terminale Reste (bevorzugt Leucin)	2 Zn <sup>2+</sup>	2 Asp, μ-Glu	Asp, Lys, μ-Glu	Glu	2.9
Methioninamino-peptidase	<i>E. coli</i>	N-terminales Methionin	2 Co <sup>2+</sup>	His, Glu, μ-Asp, μ- Glu	Asp, μ-Asp, μ-Glu	Asp, Glu	2.9
<i>purple acid</i> Phosphatase	Kidneybohne	Alkylphosphorsäuresäurester	Fe <sup>3+</sup> /Zn <sup>2+</sup>	Asp, Tyr, His, μ-O <sup>δ1</sup> - Asp <sup>***</sup> , H <sub>2</sub> O, μ-OH <sup>-</sup>	Asn, 2 His, μ-O <sup>δ1</sup> - Asp, H <sub>2</sub> O, μ-OH <sup>-</sup>	O <sup>δ1</sup> -Asp, OH <sup>-</sup>	3.3
RibonukleaseH-Domäne	HIV-1	Phosphodiesterbindung gen im RNA-DNA-Komplex	2 Mn <sup>2+</sup>	2 Asp, μ-Asp	Glu, μ-Asp	Asp	4.0

\* μ: überbrückender Ligand

\*\* Carboxyliertes Lysin

\*\*\* Aspartat als einzähliger Brückenligand

3.4.4.8. Vergleich der  $(\beta\alpha)_4$ -Struktur mit dem  $(\beta\alpha)_8$ -barrel

Topologisch fällt die Ähnlichkeit der  $(\beta\alpha)_4$ -Struktur der CrnA mit der Struktur eines halben  $(\beta\alpha)_8$ -Fasses auf. Die Supersekundärstruktur des  $(\beta\alpha)_8$ -barrels ist ein sehr verbreitetes Strukturelement, das bei Enzymen mit einer Häufigkeit von 10 % gefunden wird. Die  $(\beta\alpha)_8$ -Struktur zeichnet sich durch eine alternierende Abfolge von parallelen  $\beta$ -Faltblattsträngen und  $\alpha$ -Helices aus, welche gleichermaßen in Sequenz und Struktur vorliegt. Charakteristischerweise liegen die Helices alle auf einer Seite der Faltblattstränge, welche sich fassförmig schließen, so dass Faltblattstrang 1 und Faltblattstrang 8 miteinander in Kontakt treten. Die Abfolge der Faltblattstränge verläuft gemäß der Sequenz in einer Richtung (Abb. 63, links). Im Gegensatz dazu verläuft die Abfolge der Faltblattstränge in der CrnA-Struktur von der Mitte nach außen in eine Richtung, von außen über eine Helix wieder in die Mitte und von dort anschließend in die andere Richtung. Dieser Richtungswechsel macht es möglich, dass die offene  $\beta_4$ -Anordnung beidseitig von Helices bedeckt ist (Abb. 63, rechts: Beispiel für ein zweifach gewundenes sechssträngiges Faltblatt, vgl. 3.4.4.3).

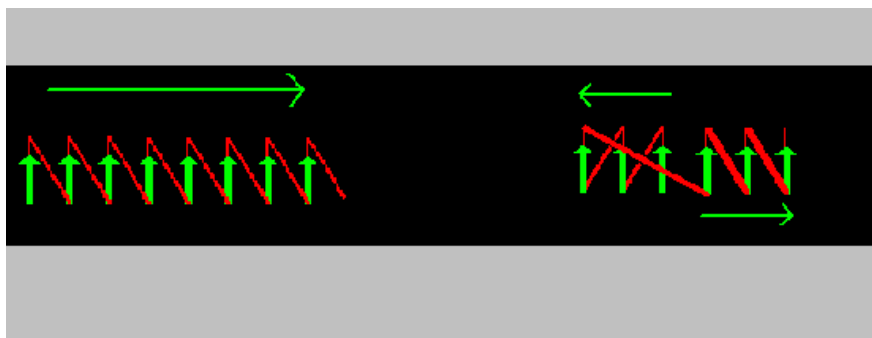


Abb. 63: links: einfach gewundene  $\beta\alpha$ -Anordnung ( $(\beta\alpha)_8$ -barrel); rechts: zweifach gewundene  $\beta\alpha$ -Anordnung am Beispiel eines sechssträngigen Faltblatts (Abbildung aus: <http://www.expsy.ch/swissmod/course/text/chapter4.htm>)

Die dennoch vorhandene Ähnlichkeit der  $(\beta\alpha)_4$ - und der  $(\beta\alpha)_8$ -Faltung wird am Vergleich der Struktur der CrnA und der  $(\beta\alpha)_8$ -barrel-Struktur der D-Hydantoinase aus *Thermus sp.* (Abendroth, Dissertation, 2001) deutlich (Abb. 64). Vier Faltblätter und zwei Helices der Strukturen lassen sich sehr gut übereinander legen. Über 52 Aminosäuren ergibt sich ein RMS-Wert der  $C_\alpha$ -Atome von 5.1 Å (CCP4-Programm: TOPP, Lu, 1996).



Abb. 64: Übereinandergelegte Strukturen der Enzyme D-Hydantoinase (rot) und BM-CrnA (grün) (Abbildung erstellt mit MOLSCRIPT, Kraulis, 1997)

Es wird diskutiert, ob  $(\beta\alpha)_8$ -Fass-Strukturen von einem gemeinsamen Vorläufermolekül mit  $(\beta\alpha)_4$ -Struktur abstammen. Von Höcker et al. (Höcker et al., 2001) wurden Studien an den  $(\beta\alpha)_8$ -Enzymen Imidazolglycerolphosphatsynthase und N'-((5'-phosphoribosyl)-formimino)-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotidisomerase aus *Thermotoga maritima* durchgeführt, die zeigen, dass ihre N- und C-terminalen  $(\beta\alpha)_4$ -Strukturen sequentiell und strukturell hohe Übereinstimmung zeigen. Dies kann als Indiz dafür gedeutet werden, dass in der Evolution eine Genverdopplung stattgefunden hat, die zu den heutigen  $(\beta\alpha)_8$ -Enzymen führte. Diese Hypothese würde durch ein in der Natur vorkommendes  $(\beta\alpha)_4$ -Protein gestärkt werden.

Der Vorstellung, dass die  $(\beta\alpha)_4$ -Struktur der CrnA der Struktur eines gemeinsamen Vorläufers heutiger  $(\beta\alpha)_8$ -Enzyme evolutiv nahe steht, ist die am Anfang des Kapitels dargestellte Beschreibung ihrer Struktur als zweifach gewunden entgegenzusetzen, die nicht mit der typischen einfach gewundenen  $(\beta\alpha)_8$ -barrel-Struktur identisch ist. Auf der anderen Seite stehen einer in der Natur vorkommenden offenen einfach gewundenen  $(\beta\alpha)_4$ -Struktur mangelnde Kontakte zu einer Seite des  $\beta_4$ -Bündels entgegen. Eine derartige  $(\beta\alpha)_4$ -Struktur würde vermutlich als Homomultimerkomplex vorliegen. Eine weitere Analogie der vorliegenden  $(\beta\alpha)_4$ -Struktur mit dem  $(\beta\alpha)_8$ -barrel besteht in der globalen Lokalisierung des aktiven Zentrums. Das aktive Zentrum ist bei beiden Strukturtypen im C-terminalen Bereich der Faltblattstränge, in den *loops* die Faltblatt

und Helix verbinden bzw. im N-terminalen Bereich der Helices lokalisiert (Jürgens et al., 2000, s. 3.4.4.3). Der Strukturvergleich zwischen D-Hydantoinase und CrnA zeigte jedoch keine Übereinstimmung in der Position der aktiven Zentren.

Ob die Struktur der CrnA mit derjenigen eines möglichen  $(\beta\alpha)_4$ -Vorläufermoleküls verwandt ist, aus welchem sich durch Genverdopplung während der Evolution die  $(\beta\alpha)_8$ -Enzyme mit Fassstruktur bildeten, ist also fraglich.

Eine alternative Erklärung für die Ähnlichkeit der CrnA- $(\beta\alpha)_4$ -Struktur zur  $(\beta\alpha)_8$ -Struktur der D-Hydantoinase beruht auf physiko-chemischen Zwängen, die die Ursache für die vergleichbare  $\beta_4\alpha_2$ -Unterstruktur, bestehend aus dem viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt sowie den zwei auf einer Seite des Faltblatts liegenden Helices, sein können (Abb. 64). Das würde bedeuten, dass die  $\beta_4\alpha_2$ -Faltung stabil ist, unabhängig davon, auf welchem Weg die Faltblattstränge angeordnet sind.

## 3.4.4.9. Konvergente Evolution - Vergleich mit einer Met-Aminosäurepeptidase

Ein schönes Beispiel für konvergente Evolution ist der Vergleich der Zinkbindungsstelle der BM-CrnA mit derjenigen der Aminopeptidase aus *Streptomyces griseus* (SGAP, PDB: 1CP7) (Gilboa et al., 1999), einer Peptidase, die große, hydrophobe, N-terminale Reste abspaltet. Die SGAP besitzt ebenso wie die BM-CrnA ein Doppelzinkzentrum, in welchem beide Zinkatome über einen Aspartatrest verbrückt sind. Obwohl diese Enzyme strukturell und sequentiell keine charakteristische Ähnlichkeit zueinander aufweisen (in Abb. 65 ist ein Sequenz-alignment der beiden Enzyme dargestellt), besitzen die Zn-Zentren doch eine bemerkenswerte Übereinstimmung.

```

BM      1 .....MSKSVFVGELTWKEY.EARV.A 20
          : : . : | . | : . |
SG      1 APDIPLANVKAHLTQLSTIAANNGGNRAHGRPGYKASV...DYVKAKLDA 47

BM     21 AGDCVLMPLPVGALEQHGHHMCNMVDVLLPTAVCKRVAERIGALVMPGLQY 70
          || : . | : : | | : | || : .
SG     48 AGYTTTLQQFTSGGATGYNLIAN...WPGGDPNKVL.MAGAHLDSVSS 91

BM     71 GYKSQQKSGGGNHFPGTTSLDGATLTGTVQDIIRELARHGARRLVLMNGH 120
          | . | | . | . | | | | | | | | . |
SG     92 G.AGINDNGSGSAAVLETAL.AVSRAGYQPDKHLRFAWWGAEELGLI.G. 137

BM    121 YENSMFIVEGIDLALRELRYAGIQDFKVVVL...SYWDFVKDPAVIQQLY 167
          | | | : | | : || . | . : | | | | : :
SG    138 ...SKFYVNNLPSADRS.KLAGYLNEDMIGSPNPGYFVYDDDP.VIEKTF 182

BM    168 PEGFLGWDIEEHGGVFETSLMLALYPDLVDLDRVVDHPPATFPPYDVFPVD 217
          | | . : | | | | | | | | | | | |
SG    183 KNYFAGLNVP..TEIETE.....GD....GR.SDHAP..FKNVGV.PVG 216

BM    218 PARTPAPGTLSSAKTASREKGEL..ILEVCVQGIADAIREEFPPT..... 260
          | | | | | : | : | | . : |
SG    217 GLFTGA.GYTKSAAQAQKWGGTAGQAFDRCYHSSCDSL.SNINDTALDRN 264

```

Abb. 65: Sequenzalignment von BM-CrnA mit SGAP; die Aminosäuren der Zinkbindungsstellen sind fett unterlegt (durchgeführt mit dem Programm GAP (Needleman und Wunsch, 1970) des GCG-Pakets, Version 9.1, Matrix: BLOSUM62 (Henikoff und Henikoff, 1992))

Nach dem Sequenzalignment ergab sich eine Identität der beiden Sequenzen von 26 %, die für nicht verwandte Proteine zwar recht hoch ist, sich jedoch in keiner Weise über die Aminosäuren der Zinkbindungsstellen erstreckte und zusätzlich etliche Lücken enthielt.

Ein manueller Vergleich des Zn-Zentrums mit den Aminosäureresten der ersten Koordinationssphäre beider Enzyme zeigte, dass die koordinierenden Atome nahezu perfekt übereinander liegen, wohingegen die C<sub>α</sub>-Atome des Rückgrats eine völlig unterschiedliche Orientierung aufweisen (Abb. 66, Tab. 22). Der RMS-Wert aller an der Koordination des Zinks beteiligten Atome beträgt 0.6 Å.<sup>1</sup>

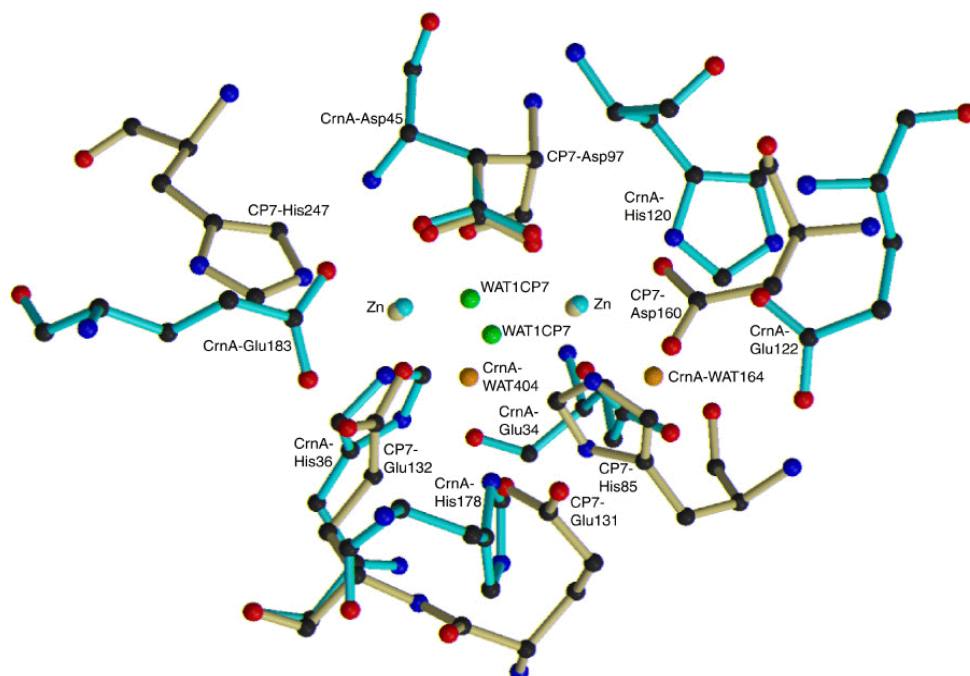


Abb. 66: Struktureller Vergleich der Zn-Zentren von BM-CrnA (türkis) und SGAP (braun)

1

Die Berechnung der RMS-Werte erfolgte nach L. Ellis ([www.biophysics.org/biophys/society/btol](http://www.biophysics.org/biophys/society/btol)) gemäß:

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum |d|^2}{N}}$$

d: Abstand der übereinander gelegten Atome  
N: Anzahl aller übereinander gelegter Atome

Tab. 22: Übereinstimmende an der Koordination der Zinkatome beteiligte Reste von BM-CrnA und SGAP

BM-CrnA	SGAP	Abstand [ $\text{\AA}$ ]
Glu34-OE1	His85-NE2	0.54
His36-ND1	Glu132-OE2	0.65
Asp45-OD1	Asp97-OD2	0.27
Asp45-OD2	Asp97-OD1	0.22
His120-ND1	Asp160-OD1	1.19
His178-ND1	Glu131-OE1	0.58
Glu183-OE2	His247-NE2	1.10
S164-H <sub>2</sub> O	Asp160-OD2	1.07

Die Ähnlichkeit der Aminosäurereste in der ersten Koordinationssphäre der Zinkatome ist signifikant, dahingegen sind in der Substratbindung aufgrund der unterschiedlichen Positionierung der Wassermoleküle im Zinkzentrum (Abb. 66) sowie der unterschiedlichen Größe der Substrate Unterschiede zu erwarten.



## 3.4.4.10. Vergleich struktureller Vorhersagen mit den endgültigen Strukturergebnissen

Im Rahmen der Diplomarbeit (Beuth, 1997) wurden theoretische Sekundärstrukturvorhersagen sowie CD-Spektren der BM-CrnA durchgeführt bzw. gemessen. Die jetzt aus der Struktur ermittelten prozentualen Anteile an  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt betragen 41 % und 9 %. Die theoretischen Vorhersagemethoden nach Levin und Garnier (Levin und Garnier, 1986), Garnier et al. (Garnier et al., 1978) und Gibrat et al. (Gibrat et al., 1987) geben dieses Verhältnis in Bezug auf den  $\alpha$ -Helix-Anteil sehr gut und auf den  $\beta$ -Faltblatt-Anteil recht gut wieder. Der  $\alpha$ -Helix-Anteil wird zwischen 36 % und 42 % vorhergesagt, der  $\beta$ -Faltblatt-Anteil zwischen 5 % und 20 %. Die Vorhersage nach Levin und Garnier liegt mit 41 % bzw. 5 % nahezu ideal. Lediglich nach Deléage und Roux (Deléage und Roux, 1987) wurde mit 27 % ein zu geringer Anteil an  $\alpha$ -Helix und mit 23 % ein zu hoher Anteil an  $\beta$ -Faltblatt vorhergesagt (Tab. 22). Auch bezogen auf die sequentielle Abfolge der Sekundärstrukturelemente sind die Vorhersagemethoden der drei erstgenannten Autoren in hohem Maß zutreffend. Die fünf ausgedehnten Helizes a1, a2, a3 und a4 (s. 3.4.4.3) im Molekül werden nach den drei Methoden richtig vorhergesagt.

Die Bestimmung der Sekundärstrukturanteile mit Hilfe von CD-Messungen führte dagegen zu zu hohen Werten für den Anteil an  $\alpha$ -Helix, der zwischen 42 % und 59 % je nach Vorhersagemethode lag. Ein  $\alpha$ -Helix-Anteil von 42 % wurde mit dem Programm SELCON (Sreerama und Woody, 1993) vorhergesagt, was allerdings mit 37 % beim  $\beta$ -Faltblattanteil deutlich zu hoch lag. Mit den Programmen CONTIN (Provencher und Glöckner, 1981) und K2D (Andrade et al., 1993) wurde ein  $\alpha$ -Helix-Gehalt von 52 % bzw. 59 % bestimmt (Tab. 23). Bei den stark von der Konzentration abhängigen CD-Messungen liegt eine mögliche Ursache von zu hoch bestimmtem Helixanteil in zu niedrig bestimmtem Proteingehalt.

Zusammenfassend betrachtet waren demnach die theoretischen Methoden zur Sekundärstrukturbestimmung deutlich zutreffender als die experimentelle Methode der CD-Messung.

Tab. 23: Vergleich der prozentualen Anteile der Sekundärstrukturelemente Helix und Faltblatt innerhalb der BM-CrnA-Struktur, bestimmt nach verschiedenen theoretischen Vorhersagemethoden (weiß unterlegt), CD-Messung (hellgrau unterlegt) sowie Röntgenstrukturanalyse (dunkelgrau unterlegt)

	Levin	Deléage	Gibrat	Garnier	CONTIN	SELCON	K2D	<i>x-ray</i>
$\alpha$ -Helix [%]	41	27	42	36	52	42	59	41
$\beta$ -Faltblatt [%]	5	23	20	18	31	37	8	9
Sonstige [%]	54	50	38	45	17	21	34	50

## 3.4.4.11. Position der Pt-Atome im Schwermetallderivat

Der Datensatz des Schwermetallderivats wurde gegen die native Struktur verfeinert, um Informationen über die Bindung der Pt-Atome zu erhalten.

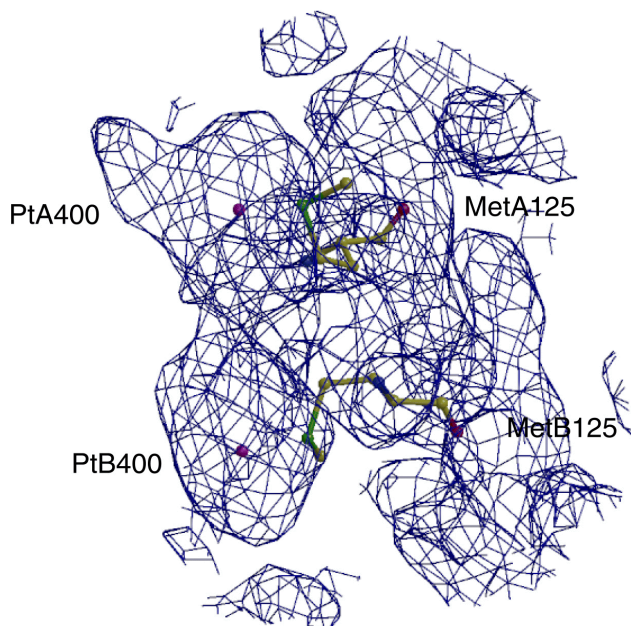


Abb. 67: Bindung der Pt-Atome an Met125 im Bereich der Kontaktfläche zwischen Untereinheit A und B

Man erkennt in Abbildung 67, dass die Pt-Atome jeweils an die Aminosäure Met125 gebunden sind. Die Reste Met125 liegen im Kontaktbereich der Untereinheiten A und B sowie D und E und C und F (s. 3.4.4.4) und sind in diesem Bereich unmittelbar benachbart. Das führt dazu, dass sich auch die koordinierten Pt-Atome in direkter Nachbarschaft befinden, wodurch die globale Anordnung im BM-CrnA-Molekül in Form von drei Pt-Paaren erklärt werden kann (s. 3.4.3.1). Der Pt-Pt-Abstand beträgt 7.6 Å. Der nukleophile Schwefel des Methionins koordiniert an den Pt(II)-Komplex unter Substitution eines Liganden. Das komplexe Anion  $[\text{PtCl}_4]^{2-}$  liegt in wässriger Lösung zum Teil hydrolysiert vor und ist bevorzugt quadratisch planar koordiniert (Holleman, Wiberg, 1985). Die Geometrie der Koordination in der BM-CrnA lässt sich anhand der Elektronendichte nicht bestimmen, aber es ist anzunehmen, dass der Pt-Komplex teilweise hydrolysiert ist. An PtA400 erkennt man in Abbildung 67 eine deutliche Ausbeulung der Elektronendichte, was für einen Chloroliganden in dieser Position spricht.

### 3.5. Ausblick

Das zukünftige Ziel der Expression und Aufreinigung der nativen CrnA sowie SM-CrnA sollte in einer höheren Reinheit und Homogenität der Proteinlösung liegen.

Ein denkbarer Ansatzpunkt ist die Zugabe von Zink- oder Mangansalzen zum Expressionsmedium, um einen Einbau von zweiwertigen Kationen im aktiven Zentrum sicherzustellen. In dieser Hinsicht ist auch die Durchführung der Proteinreinigung über eine Ni-Chelatsäule fraglich, da hier vermutlich die Bindung an das Säulenmaterial über die Zinkbindungsstelle der CrnA stattfindet. Es wäre interessant, Reinheit und Aktivität der CrnA nach Expression in zinkhaltigem Medium und Reinigung über klassische chromatographische Methoden (Ionenaustausch, hydrophobe Interaktion, Gelfiltration) zu überprüfen.

Auch über eine Mutation von Arg in Position 2 zu Ser (wie in der BM-CrnA) ist nachzudenken. Möglicherweise ist die Klonierung eines Affinitätstags mit eingefügter Proteaseschnittstelle (z. B. TEV-*site*) an das Protein für die Aufreinigung von Vorteil.

Der nächste Schritt in der strukturellen Analyse der BM-CrnA sollte in der Cokristallisation des Enzyms mit Substrat oder Inhibitor bestehen, um die hypothetischen Aussagen, die in der Arbeit über Substratbindung und -katalyse getroffen wurden, zu verifizieren oder zu korrigieren. Für die Cokristallisation kommen Creatin bzw. Creatinin in Frage sowie die von Rikitake et al. (Rikitake et al., 1979) bestimmten Inhibitoren: N-Methylguanidin, Guanidin, 2-Pyrrolidon oder Guanidinoessigsäure. Auch eine Variation der Metallionen im aktiven Zentrum kann Aufschlüsse über den Reaktionsmechanismus liefern und ist somit eine sinnvolle Ergänzung zum Einbau von Substrat oder Inhibitor. Da die Beschreibung von Substratbindung und Reaktionsmechanismus eine der wesentlichen Aussagen der Strukturanalyse darstellt, sind diese noch durchzuführenden Experimente von besonderer Bedeutung, um im Anschluss mögliche Aussagen über gezielte Mutagenesen zur Veränderung des Substratspektrums oder zur Erhöhung der Substratspezifität zu treffen.

## 4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Klonierung des Creatininasegens aus *Pseudomonas putida* var. *naraenses* in *E. coli* sowie die Expression, Reinigung und Kristallisation des Proteins ebenso beschrieben wie die Kristallisation und Bestimmung der 3D-Struktur der von der Firma Roche (früher Boehringer Mannheim) hergestellten Creatininase.

Das Gen der Creatininase (CrnA) aus *P. putida* var. *naraenses* wurde in *E. coli* kloniert und das Enzym sowie das SeMet-Derivat (SeMet-CrnA) wurden exprimiert, gereinigt und kristallisiert. Weiterhin wurde von der Firma Roche hergestellte und gereinigte Creatininase aus *Pseudomonas putida* (BM-CrnA) kristallisiert und mittels röntgenographischer Methoden strukturell analysiert. Das Enzym liegt nativ als Homohexamer vor, besitzt ein Molekulargewicht von 28.4 kDa pro Untereinheit und katalysiert die Hydrolyse des zyklischen Amids Creatinin zu Creatin unter Ringspaltung. Obwohl das Enzym aus einem mesophilen Organismus stammt, weist es eine Schmelztemperatur von über 90° auf.

Die Expression der SeMet-CrnA gelang - unter Verwendung von Minimalmedium plus Selenomethionin - in einem beliebigen *E. coli*-Stamm, in welchem die Methioninbiosynthese durch Zugabe eines Überschusses bestimmter Aminosäuren inhibiert wurde. Sowohl CrnA als auch SeMet-CrnA wurden in *E. coli* stark exprimiert und zeigten im SDS-Gel nach der Expression eine deutliche zweite Bande ( $M_{\text{CrnA}} + 1400$  Da), die während der Proteinreinigung nicht abgetrennt werden konnte. Die Kristallisation der SeMet-CrnA führte nicht zu für die Röntgenstrukturanalyse geeigneten Kristallen.

Die BM-CrnA kristallisierte in der Raumgruppe  $P2_1$  mit den Gitterparametern  $a = 74.4$  Å,  $b = 94.1$  Å,  $c = 115.2$  Å,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 104.3^\circ$ . Die Kristalle wurden röntgendiffraktometrisch charakterisiert. Die Auflösungsgrenze der Daten lag bei 2.1 Å. Selbstrotationsrechnungen an einem nativen Diffraktionsdatensatz zeigten eine  $D_3$ -Punktsymmetrie des hexameren Moleküls an, bestehend aus drei zweizähligen und einer dreizähligen nichtkristallographischen Symmetrieachse, so dass man sich das Enzym als Trimer von Dimeren vorstellen konnte.

Es wurden Platinderivate ( $K_2PtCl_4$ ) der BM-CrnA hergestellt und für ein MAD-Experiment eingesetzt. Aus diesen Daten konnten erste grobe Anfangsphasen ermittelt werden, die durch Mittelung über nichtkristallographische Symmetrie stark verbessert werden konnten. Helix- und Faltblattstrukturen wurden sichtbar, so dass von Hand das komplette Strukturmodell erstellt werden konnte. Die Verfeinerung wurde schließlich bei einem  $R_{\text{work}}$  von knapp 21 % abgeschlossen.

Der markanteste Bereich innerhalb der Struktur ist ein Doppelzinkzentrum, in welchem die zwei Zinkionen 3.5 Å voneinander entfernt sind und von einem Aspartatrest überbrückt werden. An der Koordination der Zinkatome sind weiterhin zwei Glutamatreste und zwei Histidine sowie zwei bis vier Wassermoleküle beteiligt. Ein Wassermolekül bildet wiederum eine Brücke

zwischen den zwei Zinkionen. Von diesem aktivierten Wassermolekül ausgehend, dürfte der nukleophile Angriff auf die Amidbindung des Creatinins starten. In Bezug auf die katalysierte Reaktion ist die BM-CrnA in die Familie der zyklischen Amidohydrolasen einzuordnen, zu deren Vertretern unter anderem Dihydroorotasen und Dihydropyrimidinasen gehören. Dennoch fällt die Creatininase innerhalb dieser Familie aus dem Rahmen, da sie keine Ähnlichkeit in Struktur und Sequenz zu den restlichen Vertretern zeigt. Obwohl auch diese Enzyme, soweit bekannt, ein Doppelmetallzentrum aufweisen, setzt sich die Koordinationssphäre der Metallatome anders zusammen.

Eine weitere strukturelle Auffälligkeit der CrnA ist ein stark vernetztes Wasserstoffbrückenbindungssystem im Zentrum des Hexamers im Kontaktbereich dreier Untereinheiten, dem eine zentrale Rolle beim Zustandekommen der Thermostabilität des Enzyms zugesprochen wird. Diese Beobachtung sowie multiple Sequenzvergleiche zeigten, dass die Creatininase Verwandte in sehr alten thermophilen Archaeabakterien besitzt.

## 5. Literaturverzeichnis

J. Abendroth, Röntgenstrukturanalyse mikrobieller Dihydropyrimidinasen, Dissertation, Köln (2001).

J. P. Abrahams, A. G. W. Leslie, Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase, *Acta Cryst.* **D52**, 30-42 (1996).

D. Adams, N. S. Pannu, R. J. Read, A. T. Brünger, Cross-validated maximum likelihood enhances crystallographic simulated annealing refinement, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **94**, 5018-5023 (1997).

S. Akamatsu, Y. Kanai, Bacterial decomposition of creatinine. I. Creatinomutase, *Enzymol.* **15**, 122-125 (1951).

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

K. M. Andersson, S. Hovmöller, The protein content in crystals and packing coefficients in different space groups, *Acta Cryst.* **D56**, 789-790 (2000).

M. A. Andrade, P. Chacon, J. J. Merelo, F. Moran, Evaluation of secondary structure of proteins from UV-circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network, *Prot. Eng.* **6**, 383-390 (1993).

A. Bateman, E. Birney, R. Durbin, S. R. Eddy, K. L. Howe, E. L. Sonnhammer, The Pfam Protein Families Database, *Nucleic Acids Research* **28**, 263-266 (2000).

M. M. Benning, H. Shim, F. M. Raushel, H. M. Holden, High Resolution X-ray Structures of Different Metal-Substituted Forms of Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*, *Biochemistry* **40**, 2712-2722 (2001).

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

B. Beuth, Charakterisierung und Kristallisation des Enzyms Creatininamidohydrolase aus *Pseudomonas putida*, Diplomarbeit, Köln (1997).

T. L. Blundell, L. N. Johnson, Protein Crystallography, *Acedemic press NewYork* (1976).

M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-binding dye, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).

A. T. Brünger, Crystallographic R-factor refinement by molecular dynamics, *Science* **225**, 458-460 (1987).

A. T. Brünger, J. Kuriyan, M. Karplus, Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics, *Science* **235**, 458-460 (1987).

A. T. Brünger, Extension of Molecular Replacement: A New Search Strategy based on Patterson Correlation Refinement, *Acta Cryst.* **A46**, 46-57 (1990).

A. T. Brünger, A. Krukowski, J. Erickson, Slow-Cooling Protocols for Crystallographic Refinement by Simulated Annealing, *Acta Cryst.* **A46**, 585-593 (1990).

A. T. Brünger, The free R value: A novel statistical quality assessing the accuracy of crystal structures, *Nature* **355**, 472-475 (1992).

A. T. Brünger, L. M. Rice Torsion Angle Dynamics: Reduced Variable Conformational Sampling Enhances Crystallographic Structure Refinement, *Proteins: Structure, Function and Genetics* **19**, 277-290 (1994).

A. T. Brünger, The free R value: Cross-validation in crystallography, *Meth Enzymol.* **277**, 366-396 (1997).

A. T. Brünger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren, Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Cryst.* **D54**, 905-921 (1998).

S. K. Burley, P. R. David, R. M. Sweet, A. Taylor, W. N. Lipscomb, Structure Determination and Refinement of Bovine Lens Leucine Aminopeptidase and its Complex with Bestatin, *J. Mol. Biol.* **224**, 113-140 (1992).

O. Carugo, D. Bordo, How many water molecules can be detected by protein crystallography?, *Acta Cryst.* **D55**, 479-483 (1998).

K. Cowton, *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography* **31**, 34-38 (1994).

Collaborative Computational Project, Number 4, The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Cryst.* **D55**, 760-763 (1994).

A. D'Arcy, Crystallizing proteins - a rational approach, *Acta Cryst.* **D50**, 467-471 (1994).

J. F. Davies, I. Z. Hostomska, Z. Hostomsky, S. R. Jordan, D. A. Matthews, Crystal Structure of the Ribonuclease H Domain of HIV-1 Reverse Transcriptase, *Science* **252**, 88-95 (1991).

G. Deléage, B. Roux, An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction, *Prot. Eng.* **1**, 289-294 (1987).

E. Dodson, G. J. Kleywegt, K. Wilson, Report of a Workshop on the Use of Statistical Validators in Protein X-ray Crystallography, *Acta Cryst.* **D52**, 228-234 (1996).

J. A. Drenth, *Principles of X-ray Crystallography*, Springer Verlag, New York (1994).

R. A. Engh, R. Huber, Accurate bond and angle parameters for x-ray protein structure refinement, *Acta Cryst.* **A47**, 392-400 (1991).

G. Evans, R. Pettifer, CHOOCH: a program for deriving anomalous scattering factors from x-ray fluorescence spectra, *J. Appl. Cryst.* **34**, 82-86 (2001).

J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science* **246**, 64-71 (1989).



J. Garnier, D. J. Osguthorpe, B. Robson, Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins, *J. Mol. Biol.* **120**, 97-120 (1978).

J. F. Gibrat, J. Garnier, B. Robson, Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. new parameters and consideration of residue pairs, *J. Mol. Biol.* **198**, 425-443 (1987).

R. Gilboa, H. M. Greenblatt, M. Perach, A. Spungin-Bialik, U. Lessel, G. Wohlfahrt, D. Schomburg, S. Blumberg, G. Shoham, Interactions of *Streptomyces griseus* aminopeptidase with a methionine product analogue: a structural study at 1.53 Å resolution, *Acta Cryst.* **D56**, 551-558 (2000).

N. N. Greenwood, A. Earnshaw, Chemistry of the elements, Pergamon Press, London (1984).

R. W. Grosse-Kunstleve, A. T. Brünger, A highly automated heavy-atom search procedure for macromolecular structures, *Acta Cryst.* **D55**, 1568-1577 (1999).

W. A. Hendrickson, J. L. Smith, R. P. Phizackerley, E. A. Merritt, Crystallographic structure analysis of lamprey myoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation, *Proteins* **4**, 77-78 (1988).

S. Henikoff, J. G. Henikoff, Amino acid substitution matrices from protein blocks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10515-10519 (1992).

P. H. Hirel, J. M. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, S. Blanquet, Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* protein is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8247-8251 (1989).

B. Höcker, S. Beismann-Driemeyer, S. Hettwer, A. Lustig, R. Sterner, Dissection of a  $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzyme into two folded halves, *Nat. Struct. Biol.* **8**, 32-36 (2001).

A. Hodel, S. H. Kim, A. T. Brünger, Model Bias in Macromolecular Crystal Structures, *Acta Cryst.* **A48**, 851-858 (1992).

A. F. Holleman, E. Wiberg, Lehrbuch der anorganischen Chemie, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin (1985).

L. Holm, C. Sander, An Evolutionary Treasure: Unification of a Broad Set of Amidohydrolases Related to Urease, *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* **28**, 72-82 (1997).

Y. Inouye, Y. Matsuda, T. Naid, S. Arai, Y. Hashimoto, K. Asano, M. Ozaki, S. Nakamura, Purification and characterization of creatinine amidohydrolase of *Alcaligenes* origin, *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 269-274 (1986).

M. Jaffé, Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins, *Zeitschrift für physiologische Chemie* **10**, 391-400 (1886).

J. Jancarik, S. H. Kim, Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins, *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411 (1991).

S. Jones, J. M. Thornton, Principles of protein-protein interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13-20 (1996) .

T. A. Jones, J.Y. Zou, S. W. Cowan, M. Kjeldgaard, Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models, *Acta Cryst.* **A47**, 110-119 (1991).

C. Jürgens, A. Strom, D. Wegener, S. Hettwer, M. Wilmanns, R. Sterner, Directed evolution of a ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9925-9930 (2000).

W. Kabsch, C. Sander, How good are predictions of secondary structure?, *FEBS Lett.* **155**, 179-182 (1983).

W. Kabsch, C. Sander, Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers* **22**, 2577-2637 (1983).

A. Kaplan, D. Naugler, Creatinine hydrolase and creatine amidinohydrolase. I. Presence in cell-free extracts of *Arthrobacter ureafaciens*, *Mol. Cell. Biochem.* **3**, 9-15 (1974).

M. Karas, F. Hillenkamp, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 Dalton, *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301 (1988).

P. A. Karplus, M. A. Pearson, R. P. Hausinger, 70 Years of Crystalline Urease: What Have We Learned?, *Acc. Chem. Res.* **30**, 330-337 (1997).

J. M. Kim, S. Shimizu, H. Yamada, Cytosine deaminase that hydrolyzes creatinine to N-methylhydantoin in various cytosine deaminase-forming microorganisms, *Arch. Microbiol.* **147**, 58-63 (1987).

T. Klabunde, N. Sträter, R. Fröhlich, H. Witzel, B. Krebs, Mechanism of Fe(III)-Zn(II) Purple Acid Phosphatase Based on Crystal Structures, *J. Mol. Biol.* **259**, 737-748 (1996).

G. J. Kleywegt, Validation of protein crystal structures [in process citation], *Acta Cryst.* **D56**, 249-265 (2000).

G. J. Kleywegt, T. A. Jones, xdlMAPMAN and xdIDATAMAN - programs for reformatting, analysis and manipulation of biomacromolecular electron-density maps and reflection data sets, *Acta Cryst.* **D52**, 826-828 (1996).

G. J. Kleywegt, T. A. Jones, Good model-building and refinement practice, *Meth Enzymol.* **277**, 208-230 (1997).

G. J. Kleywegt, T. A. Jones, Databases in protein crystallography. *Acta Cryst.* **D54**, 1119-1131 (1998).

P. J. Kraulis, Molscript: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J. Appl. Cryst.* **24**, 946-950 (1997).

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

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

J. M. Levin, B. Robson, J. Garnier, An algorithm for secondary structure determination in proteins based on sequence similarity, *FEBS Lett* **205**, 303-308 (1986).

G. Lu, FINDNCS: A program which automatically find out the NCS operations from heavy atoms sites, in press

- P. V. Luzzati, Stereochemistry of polypeptide chain configurations, *Acta Cryst.* **5**, 802-810 (1952).
- M. B. Madaras, R. P. Buck, Miniaturized biosensors employing electropolymerized permselective films and their use for creatine assays in human serum, *Anal. Chem.* **68**, 3832-3839 (1996).
- B. W. Matthews, Solvent Content of Protein Crystals, *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497 (1968).
- I. K. McDonald, J. M. Thornton, Satisfying hydrogen bonding potential in proteins, *J. Mol. Biol.* **238**, 777-793 (1994).
- E. A. Merritt, M. E. P. Murphy, Raster3d version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics, *Acta Cryst.* **D50**, 869-873 (1994).
- B. F. Miller, R. Dubos, Enzyme for decomposition of creatinine and its action on the apparent creatinine of blood, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **35**, 335 (1936).
- B. F. Miller, R. Dubos, Studies on the presence of creatinine in human blood, *J. Biol. Chem.* **121**, 447 (1937).
- G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, Application of Maximum Likelihood Refinement, Refinement of Protein structures, Proceedings of Daresbury Study Weekend, (1996).
- G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method, *Acta Cryst.* **D53**, 240-255 (1997).
- Needleman, Wunsch, A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins, *J. Mol. Biol.* **48**, 443-453 (1970).
- V. K. Nguyen, C. M. Wolff, J. L. Seris, J. P. Schwing, Immobilized enzyme electrode for creatinine determination in serum, *Anal. Chem.* **63**, 611-614 (1991).
- Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* **276**, 307-326 (1997).
- N. S. Pannu, R. S. Read, Improved structure refinement through maximum likelihood, *Acta Cryst.* **A52**, 659-668 (1996).

- W. R. Pearson, D. J. Lipman, Improved tools for biological sequence comparison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-2448 (1988).
- A. Perrakis, R. Morris, V. S. Lamzin, Automated protein model building combined with iterative structure refinement, *Nat. Struct. Biol.* **6**, 458-463 (1999).
- J. C. Phillips, K. O. Hodgson, The use of anomalous scattering effects to phase diffraction pattern from macromolecules, *Acta Cryst.* **A36**, 856-864 (1980).
- S. W. Provencher, J. Glöckner, Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism, *Biochemistry* **20**, 33-37 (1981).
- G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan, Stereochemistry of polypeptide chain configurations, *J. Mol. Biol.* **7**, 95-99 (1963).
- P. Reinemer, Röntgenkristallographische Strukturanalysen von Klasse  $\pi$  Glutathion S-Transferasen, Dissertation, München (1993).
- K. Rikitake, I. Oka, M. Ando, T. Yoshimoto, D. Tsuru, Creatinine Amidohydrolase (Creatinase) from *Pseudomonas putida*, *J. Biochem.* **86**, 1109-1117 (1979).
- S. L. Roderick, B. W. Matthews, Structure of the Cobalt-Dependent Methionine Aminopeptidase from *Escherichia coli*: A New Type of Proteolytic Enzyme, *Biochemistry* **32**, 3907-3912 (1993).
- D. J. Rowe, H. Omar, S. L. Barratt, P. Biggs, An evaluation of blood creatinine measurement by creatinase on the NOVA M7 blood gas analyzer, *Clin. Chim. Acta* **307**, 23-25 (2001).
- M. Schröder, Untersuchungen zur automatisierten Ermittlung idealer Kristallisationsbedingungen von Proteinen, Diplomarbeit, Köln (1997).
- T. F. Smith, M. S. Waterman, Identification of common molecular subsequences, *J. Mol. Biol.* **147**, 195-197 (1981).
- G. Snatzke, Chiroptische Methoden in der Stereochemie I, *Chem. i. u. Z.* **15**, 78-87 (1981).

- K. Spencer, Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine, *Ann. Clin. Biochem.* **23**, 1-25 (1986).
- N. Sreerama, R. W. Woody, A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism, *Anal. Biochem.* **209**, 32-44 (1993).
- H. Suzuki, Sarcosine oxidase: structure, function, and the application to creatinine determination, *Amino Acids* **7**, 27-43 (1994).
- T. Y. Tang, C. J. Wen, W. H. Liu, Expression of the creatininase gene from *Pseudomonas putida* RS65 in *Escherichia coli*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **24**, 2-6 (1999).
- J. B. Thoden, G. N. Phillips, Jr., T. M. Neal, F. M. Raushel, H. M. Holden, Molecular Structure of Dihydroorotase: A Paradigm for Catalysis through the Use of a Binuclear Metal Center, *Biochemistry* **40**, 6989-6997 (2001).
- J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson, Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680 (1994).
- L. Tong, M. Rossmann, Rotation function calculations with GLRF program, *Meth. Enzymol.* **276**, 594-611 (1997).
- T. Tsuchida, K. Yoda, Multi-enzyme membrane electrodes for determination of creatinine and creatine in serum, *Clin. Chem.* **29**, 51-55 (1983).
- H. G. Van Eyk, R. J. Vermaat, H. J. Leijnse-Ybema, B. Leijnse, The conversion of creatinine by creatininase of bacterial origin, *Enzymol.* **34**, 198-202 (1968).
- C. Vetriani, D. L. Maeder, N. Tollyday, K. S. P. Yip, T. J. Stillman, K. L. Britton, D. W. Rice, H. H. Klump, F. T. Robb, Protein thermostability above 100°C: A key role for ionic interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12300-12305 (1998).
- A. Volbeda, A. Lahm, F. Sakiyama, D. Suck, Crystal structure of *Penicillium citrinum* P1 nuclease at 2.8 Å resolution, *The EMBO Journal* **10**, 1607-1618 (1991).
- A. W. Wahlefeld, G. Herz, H.U. Bergmeyer, Completely Enzymatic Determination of Creatinine

in Human Sera or Urine, Abstract 30.1, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **29**, Suppl. 126 (1972).

A. C. Wallace, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, „Ligplot: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions“, *Prot. Eng.* **8**, 127-134 (1995).

P. J. Watkins, The effect of ketone bodies on the determination of creatinine, *Clin. Chim. Acta* **18**, 191-196 (1967).

D. E. Wilcox, Binuclear Metallohydrolases, *Chem. Rev.* **96**, 2435-2458 (1996).

A. J. C. Wilson, Determination of absolute from relative x-ray intensity data, *Nature* **150**, 152ff (1942).

M. Wyss, R. Kaddurah-Daouk, Creatine and creatinine metabolism, *Physiol. Rev.* **80**, 1107-1213 (2000).

D. Xu, C.-J. Tsai, R. Nussinov, Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces, *Prot. Eng.* **10**, 999-1012 (1997).

K. Yamamoto, M. Oka, T. Kikuchi, S. Emi, Cloning of the creatinine amidohydrolase gene from *Pseudomonas sp.* PS-7, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1331-1332 (1995).

## 6. Anhang

### I. Abbildungsverzeichnis

- [1] Wachstum der Proteindatenbank PDB (Abbildung aus: <http://pdb.ccdc.cam.ac.uk/pdb/holdings.html>)
- [2] Aminosäuresequenz der BM-CrnA
- [3] Schematische Darstellung der mikrobiellen Abbauewege von Creatinine und Creatin sowie der beteiligten Enzyme (die Grafik stammt aus: <http://physrev.physiology.org/cgi/content/full/80/3/1107#F7>, Wyss und Kaddurah-Daouk, 2000)
- [4] Ähnlichkeitsmatrix nach Remington (übernommen aus Dissertation Reinemer, 1993)
- [5] SDS-Gel der BM-CrnA (Spur 1: Marker, Spur 2: BM-CrnA)
- [6] MALDI-Massenspektrum der BM-CrnA
- [7] Natives Polyacrylamidgel der BM-CrnA
- [8] Einkristalle
- [9] Kristalle mit Baufehlern
- [10] Kristalle nach Pt-*Soaking*
- [11] DSC-Spektrum der BM-CrnA
- [12] CD-Temperaturscan der BM-CrnA
- [13] Multiples Sequenzalignment von Creatininasen aus unterschiedlichen Organismen erstellt mit ClustalW (die Aminosäuren der Zinkbindung sind fett unterlegt; vollständig oder teilweise konservierte Reste sind mit einem Stern bzw. einem Punkt oder Doppelpunkt gekennzeichnet)
- [14] 1 % Agarosegel der genomischen PCR mit *annealing*-Temperaturgradienten; Bande bei ca. 800 bp erkennbar (Spur 2)
- [15] Schematische Darstellung des Originalplasmids pQE70 (Fa. Qiagen)
- [16] Schematische Darstellung des Plasmids pQE70 mit dem Insert CrnA
- [17] 1 % Agarosegele des BsaI-Verdaus (links) und des BamHI/SphI-Verdaus (rechts) verschiedener Plasmidpräparationen
- [18] Sequenzvergleich von CrnA (Klon 12), BM-CrnA und CrnA (Yamamoto, 1995)
- [19] SDS-Gel der CrnA-Expression vor der Induktion (0 h) und 4 h nach der Induktion
- [20] Massenspektrum der CrnA mit vergrößerter Darstellung der Sidapinsäureaddukte im Massenbereich zwischen 12 kDa und 16 kDa
- [21] Chromatogramm der Proteinreinigung über eine Ni-Affinitätssäule
- [22] SDS-Gel der Proteinreinigung über eine Nickel-Affinitätssäule
- [23] Natives Gel der CrnA



- [24] SDS-Gel der SeMet-CrnA-Expression vor der Induktion (0 h) und 4 h nach der Induktion
- [25] Massenspektrum der nativen CrnA
- [26] Massenspektrum der SeMet-CrnA
- [27] CrnA-Sequenz; Methionine hervorgehoben
- [28] SDS-Gel der Reinigung der SM-CrnA über Ni-Affinitätschromatographie und hydrophobe Interaktion
- [29] Massenspektrum der SeMet-CrnA nach der Reinigung
- [30] SeMet-CrnA-Kristalle (PEG8000 als Fällungsmittel)
- [31] SeMet-CrnA-Kristalle (PEG3350 als Fällungsmittel)
- [32] Eine Beugungsaufnahme des nativen Datensatzes
- [33] Selbstrotationsfunktion  $\kappa = 180^\circ$  (links),  $\kappa = 120^\circ$  (rechts)
- [34] Zustandekommen eines Peaks in der nativen Pattersonfunktion bei Vorliegen von parallelen kristallographischen (grün) und nichtkristallographischen (blau) zweizähligen Drehachsen (aus: <http://www-structure.llnl.gov/Xray/101index.html>)
- [35] Native Pattersonfunktion ( $y = 0.5$ )
- [36] Beugungsaufnahme des nativen Datensatzes (Synchrotron)
- [37] Anomale Differenzpattersonfunktion ( $y = 0.5$ )
- [38] Aus den Schweratompositionen berechnete Differenzpattersonfunktion ( $y = 0.5$ )
- [39] Substruktur der Pt-Atome in der Elementarzelle
- [40] Elektronendichten der möglichen Händigkeiten (links: Händigkeit 1, rechts: *flip*)
- [41] Elektronendichtekarten vor (links) und nach (rechts) *solvent flipping*
- [42] Mögliche Symmetrieoperationen im idealisierten hexameren Molekül (die Bereiche im Hintergrund sind durch ein negatives Vorzeichen angedeutet)
- [43] Helikaler Bereich der Elektronendichte vor (oben) und nach (unten) der NCS-Mittelung (die Struktur wurde zur besseren Übersicht unterlegt)
- [44] Sequenzvergleiche anhand einer Aminosäurenähnlichkeitsmatrix (nach Remington)
- [45] Elektronendichte im Bereich der Zinkbindungsstelle (Untereinheit A)
- [46] Verbesserung der Elektronendichte im Laufe der Verfeinerung anhand von herausragenden Beispielen (alle Abbildungen wurden mit dem Programm BOBSCRIPT (Kraulis, 1997)) erstellt:  
oben: flexibler Bereich zwischen den Resten 158 bis 172 vor (links) und nach (rechts) der Verfeinerung; Mitte: *loop* zwischen Aminosäurerest 20 und 23 vor (links) und nach (rechts) der Verfeinerung; unten: N-Terminus vor (links) und nach (rechts) der Verfeinerung
- [47] Ramachandranplot der BM-CrnA (Untereinheit A); das Diagramm wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) erstellt

- [48] B-Faktoren der Hauptkette im Verlauf der Aminosäuresequenz
- [49] Eine Untereinheit der BM-CrnA mit Benennung der Strukturelemente (Abbildung erstellt mit MOLSCRIPT, Kraulis, 1997)
- [50] Topologie der BM-CrnA (erstellt mit DSSP und TOP, Kabsch und Sander, 1983)
- [51] Struktur und Elektronendichte im Bereich des cis-Prolin 215 (Abbildung erstellt mit BOBSCRIPT, Kraulis, 1997)
- [52] Das hexamere Molekül in Richtung der dreizähligen Achse, rechts unten: schematisch
- [53] Kontaktfläche im Bereich der Untereinheiten A und C (Grafik erstellt mit MOLSCRIPT, Kraulis, 1997)
- [54]  $\beta$ -faltblattähnliche Kontaktfläche zwischen Monomer A und B
- [55] Ausschnitt des Wasserstoffbrückennetzwerks im Kontaktbereich der Untereinheiten A, C und F (Grafik erstellt mit MOLSCRIPT, Kraulis, 1997)
- [56] Koordination des Zinkzentrums in Untereinheit D (Abbildung erstellt mit MOLSCRIPT, Kraulis, 1997)
- [57] Die Wassermoleküle innerhalb der Zinkbindungsstellen der sechs Untereinheiten. Die Positionen der Aminosäurereste sowie Zinkionen gehören zu Monomer A (Abbildung erstellt mit MOLSCRIPT, Kraulis, 1997)
- [58] Schematische Darstellung der Umgebung des Creatinins (Position 1) im aktiven Zentrum (dargestellt mit dem Programm LIGPLOT (Wallace, 1995); die gestrichelten Halbkreise zeigen die hydrophoben Kontakte
- [59] Schematische Darstellung der Umgebung des Creatinins (Position 2) im aktiven Zentrum (dargestellt mit dem Programm LIGPLOT (Wallace, 1995); die gestrichelten Halbkreise zeigen die hydrophoben Kontakte
- [60] Räumliche Lage der Creatinins (beide möglichen Positionen) im aktiven Zentrum (Abbildung erstellt mit MOLSCRIPT, Kraulis, 1997)
- [61] Möglicher Reaktionsmechanismus für Creatinin in Position 2 mit wesentlicher Beteiligung des Restes Glu183 (Abbildung erstellt mit CHEMWIND (Version 2.1, 1987-1992, Fa. SoftShell))
- [62] links: Van-der-Waals-Oberfläche der BM-CrnA mit Blick auf den möglichen Zugang zum aktiven Zentrum; rechts: Sekundärstruktur des Enzyms aus der gleichen Perspektive; das Enzym ist nach Temperaturfaktoren gefärbt (blau: niedrige Temperaturfaktoren, rot: hohe Temperaturfaktoren). Das Substrat ist der besseren Übersichtlichkeit halber rot gefärbt (die Abbildung wurde mit RASMOL erstellt)
- [63] links: einfach gewundene  $\beta\alpha$ -Anordnung ( $(\beta\alpha)_8$ -barrel); rechts: zweifach gewundene  $\beta\alpha$ -Anordnung am Beispiel eines sechssträngigen Faltblatts (Abbildung aus: <http://www.expasy.ch/swissmod/course/text/chapter4.htm>)

- [64] Übereinandergelegte Strukturen der Enzyme D-Hydantoinase (rot) und BM-CrnA (grün) Abbildung erstellt mit MOLSCRIPT, Kraulis, 1997)
- [65] Sequenzalignment von BM-CrnA mit SGAP; die Aminosäuren der Zinkbindungsstellen sind fett unterlegt (durchgeführt mit dem Programm GAP (Needleman und Wunsch, 1970) des GCG-Pakets, Version 9.1, Matrix: BLOSUM62 (Henikoff und Henikoff, 1992))
- [66] Struktureller Vergleich der Zn-Zentren von BM-CrnA (türkis) und SGAP (braun)
- [67] Bindung der Pt-Atome an Met125 im Bereich der Kontaktfläche zwischen Untereinheit A und B

## II. Tabellenverzeichnis

- [1] Schematische Darstellung der unterschiedlichen Reinigungsprotokolle.
- [2] Meßbedingungen der Synchrotron Datensätze.
- [3] Ergebnisse der DLS-Messungen.
- [4] Nummerierung der Sequenzen und *score* in Bezug auf Sequenz eins.
- [5] Zuordnung der Peaks im Massenspektrum.
- [6] Gegenüberstellung der Massenspektren von CrnA (nat) und SeMet-CrnA (sm).
- [7] Statistik des nativen Datensatzes: es gehen 208 Aufnahmen bei einer Drehung des Kristalls von 1°/Aufnahme in die Statistik ein; die Zahlen in Klammern geben die Statistik der höchsten Auflösungsschale an.
- [8] Polarwinkel der Peaks in der Selbstrotationsfunktion.
- [9] Statistik des nativen Datensatzes (Synchrotron); es gehen 360 Aufnahmen bei einer Drehung des Kristalls von 0.5°/Aufnahme in die Statistik ein; die Zahlen in Klammern geben die Statistik der höchsten Auflösungsschale an.
- [10] Statistik der Derivatdatensätze: in die Statistik fließen 360 Aufnahmen bei  $\lambda_1$  mit einer Rotation von 0.5°/Aufnahme und 340 Aufnahmen von  $\lambda_2$  mit einer Rotation von ebenfalls 0.5°/Aufnahme; die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.
- [11] Symmetrieachsen der Pt-Atome im Zentrum 30.07, -10.45, 27.66; in Klammern stehen die entsprechenden Winkel aus der SRF des nativen Datensatzes des BM-CrnA.
- [12] Überlappungen im Molekülbereich nach Anwendung der NCS-Operationen.
- [13] Überlappungen im Molekülbereich nach Anwendung der berechneten NCS-Operationen
- [14] Übersicht über die wesentlichen Zyklen der Verfeinerung.
- [15] Vergleich von statistisch ermittelten Standardabweichungen (Engh und Huber, 1991) charakteristischer stereochemischer Größen mit den realen RMS-Werten der endverfeinerten BM-CrnA-Struktur.

- [16] Tabellarische Topologie der BM-CrnA (berechnet mit DSSP, Kabsch und Sander, 1983)
- [17] Wasserstoffbrücken in der  $\beta$ -faltblattähnlichen Kontaktfläche (berechnet mit *contact*, CCP4-Suite).
- [18] Wasserstoffbrückennetzwerk im Kontaktbereich der sechs Untereinheiten (dargestellt sind die Bindungen ausgehend von Monomer A, fett unterlegt sind die Kontakte zu den Untereinheiten E und F); die Bindungslängen wurden entweder mit CONTACT berechnet oder stammen aus O (Jones, 1991).
- [19] Koordination und Bindungslängen zu den Zinkatomen 300 und 301.
- [20] Gesamtenergien für Creatinin in Position 1 und Position 2 nach Moleküldynamik- und Energieminimierungsrechnungen.
- [21] Vergleich von Enzymen mit Doppelmetallzentrum.
- [22] Übereinstimmende an der Koordination der Zinkatome beteiligte Reste von BM-CrnA und SGAP.
- [23] Vergleich der prozentualen Anteile der Sekundärstrukturelemente Helix und Faltblatt innerhalb der BM-CrnA-Struktur, bestimmt nach verschiedenen theoretischen Vorhersagemethoden (weiß unterlegt), CD-Messung (hellgrau unterlegt) sowie Röntgenstrukturanalyse (dunkelgrau unterlegt).

### III. Verwendete Internetadressen

- [1] <http://pdb.ccdc.cam.ac.uk/pdb/holdings.html>
- [2] <http://physrev.physiology.org/cgi/content/full/80/3/1107#F7>
- [3] <http://xray.bmc.uu.se/hicup>
- [4] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- [5] [http://www.up.univ-mrs.fr/~wabim/d\\_abim/compo-p.html](http://www.up.univ-mrs.fr/~wabim/d_abim/compo-p.html)
- [6] <http://www-structure.llnl.gov/Xray/101index.html>
- [7] <http://www.expasy.ch/swissmod/course/text/chapter4.htm>
- [8] <http://cns.csb.yale.edu/v1.0/>
- [9] <http://www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html>

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Barbara Beuth  
Adresse: Biobadstrasse 27, 51766 Engelskirchen  
Telefon: 02263/60689  
Geburtsdatum: 16.12.1970  
Geburtsort: Köln  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: verheiratet

## Schulausbildung

1977 - 1981: Gesamtgrundschule Antwerpenerstrasse, Köln  
1981 - 1987: Apostelgymnasium, Köln  
1987 - 1990: Georg-Büchner-Gymnasium, Köln  
Mai 1990: Abitur

## Hochschulausbildung

1990 - 1994: Studium der Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
März 1994: Vordiplom  
1994 - 1997: Studium der Chemie an der Universität zu Köln  
Jan. - Okt. 1997: Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln, Arbeitskreis Prof. Dr. D. Schomburg, Thema:  
*“Charakterisierung und Kristallisation des Enzyms Creatininamido-  
hydrolase aus Pseudomonas putida”*  
Oktober 1997: Diplom  
Nov. 1997 -  
Sept. 2001: Anfertigung der Dissertation am Institut für Biochemie der Universität zu Köln, Arbeitskreis Prof. Dr. D. Schomburg