

**Die
Substratbindung
der
L-2-Hydroxyisocaproat-
Dehydrogenase**

Inaugural - Dissertation

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

vorgelegt von
Daniel Schlieper
aus Hilden
Köln 2002

Berichtersteller: Prof. Dr. Dietmar Schomburg
Priv.-Doz. Dr. Sabine Waffenschmidt
Eingereicht: 2. Mai 2002
Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 2002

Meinen Eltern
und
Elisabeth

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg danke ich für das interessante Thema, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und für die freundliche Unterstützung.

Bei Frau Priv.-Doz. Dr. Sabine Waffenschmidt möchte ich mich nicht nur für die Übernahme des Coreferats bedanken, sondern auch für die Förderung, die sie mir seit Beginn meines Studiums hat zukommen lassen.

Herrn Dr. Karsten Niefind danke ich für die Freundschaft, die er mir viele Male bewiesen hat, und den vielen Hilfen und Diskussionen, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Außerdem möchte ich ihm für die Einführung in die Proteinkristallographie und den "Friday Club" danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jan Abendroth, Frau Dr. Andrea Eifert, Herrn Klaus Hövel und Herrn Dr. Peter Krämer für ihre Kooperation und die vielen interessanten Diskussionen.

Frau Sabine Lohmer danke ich für ihre Hilfe und für ein klasse Labor.

Meinen Praktikanten Frau Maren Mierau und Herrn Sascha Marek gilt mein herzlicher Dank für ihre engagierte und erfolgreiche Arbeit.

Frau Inessa Ermakova, Herrn Dr. Gerd Wohlfahrt, Herrn Dr. Oliver Leven und allen anderen Kollegen danke ich für die Kollegialität und die nette Arbeitsatmosphäre.

Für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich bei Frau Elisabeth Stratmann, Herrn Dr. Karsten Niefind, Herrn Dr. Jan Abendroth, Herrn Klaus Hövel, Herrn Sascha Marek und Herrn Dr. Dirk Petersohn herzlich bedanken.

Herrn Dr. Jan Abendroth und Herrn Dr. Jörg Müller danke ich für die Aufnahme des L-HicDH-NAD⁺-2-Oxoisocaproat Datensatzes. Frau Sabine Lohmer, Herrn Lejon Martens und Herrn Dr. Guido Sonsmann möchte ich für die Aufnahme und Auswertung der Massenspektren danken. Herrn Dr. Michael Massow bin ich für die Bereitstellung der Gelfiltrationssäule Superdex 200 PrepGrade zu Dank verpflichtet.

Den Betreuern der EMBL Außenstation am DESY, vor allem Herrn Dr. Ehmke Pohl, möchte ich für ihre erstklassige Unterstützung danken, und dafür, daß ich einen Tag lang alle *beamlines* bereit gestellt bekam.

Herrn Prof. Dr. Randy Read und Herrn Prof. Dr. George Sheldrick danke ich für die wertvollen Tips und Erklärungen zur Proteinkristallographie.

Herrn Dr. Jan Löwe danke ich dafür, daß er mir das Endverfeinern der Strukturen ermöglichte und mir die Gelegenheit zum Zusammenschreiben gegeben hat.

Meinen Eltern danke ich für die fortwährende Unterstützung, meinem Bruder für die Motivation und Elisabeth für ihre Hilfe.

Kurzzusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (L-HicDH, E.C. 1.1.1.27, Synonym L-2-Hydroxy-4-methylpentanoat-dehydrogenase) aus *Weissella confusa* DSM 20196 untersucht. Die L-HicDH gehört zur Familie der Lactat/Malat-Dehydrogenase. Das Enzym ist NAD(H)-abhängig und katalysiert stereospezifisch und reversibel die Reduktion von verzweigten und unverzweigten aliphatischen 2-Oxocarbonsäuren zu ihren L-2-Hydroxycarbonsäuren.

L-HicDH wurde in *Escherichia coli* heterolog überexprimiert und gereinigt. Das Enzym wurde im binären Komplex mit NAD⁺ kristallisiert. Außerdem wurden die Substrate 2-Oxocaproat, 2-Oxoisocaproat und Phenylglyoxylat sowie der Inhibitor Oxamat verwendet, um ternäre L-HicDH-NAD⁺-Substrat/Inhibitor Komplexe zu kristallisieren. Von diesen Kristallen wurden Diffraktionsdaten gemessen, deren Auflösung 1.99–2.35 Å betrug.

Die Strukturen wurden mit molekularem Ersatz gelöst. Die durchschnittliche Genauigkeit der Atompositionen liegt im Bereich von 0.4 Å. Jeweils zwei Untereinheiten des Homotetramers sind in einer offenen Konformation und haben NAD⁺ gebunden. Die beiden anderen Untereinheiten liegen in einer geschlossenen Konformation vor und haben zusätzlich Substrat in ihren aktiven Zentren gebunden, das in einem internen wässrigen Hohlraum liegt. Diese „Vakuole“ wird hauptsächlich durch die geschlossene Konformation des sogenannten Coenzym-Loops gebildet.

Die Dynamik dieser „Vakuole“, ihre Bildung und ihr Einfluß auf die Substratspezifität wird in dieser Arbeit diskutiert. Dazu wurden die Strukturen der Komplexe mit den verschiedenen Substraten miteinander verglichen, die Elektrostatik des Proteins untersucht und die Unterschiede zwischen den offenen und den geschlossenen Konformationen betrachtet. Außerdem wurden die Aminosäuren bestimmt, die wichtig für den Reaktionsmechanismus und die Substratspezifität sind. Es wurde durch manuelles Docking ein theoretisches Modell des ternären LHicDH-NAD⁺-Keto-tertiär-Leucin Komplexes erstellt und eine Variante vorgeschlagen, die Keto-tertiär-Leucin besser binden und umsetzen könnte.

Abstract

This thesis discusses the L-2-Hydroxyisocaproate-dehydrogenase (L-HicDH, E.C. 1.1.1.27) from *Weissella confusa* DSM 20196. L-HicDH is a homotetramer and member of the lactate/malate-dehydrogenase family. It is a NAD(H)-dependent oxidoreductase which catalyses the reversible and stereospecific oxidation of aliphatic branched and unbranched (S)-2-hydroxy carboxylic acids to 2-oxo carboxylic acids.

The enzyme was produced by heterologous gene expression in *Escherichia coli*, and co-crystallized as a binary complex with NAD⁺ and as ternary complexes with NAD⁺ and various substrate or inhibitor molecules (2-oxocaproate, 2-oxoisocaproate, phenylglyoxylate and oxamate). X-ray diffraction data sets ranging from 1.99 to 2.35 Å resolution were collected from these crystals.

The corresponding structures were solved by molecular replacement. In the refined structures the accuracy of the atomic positions were calculated to around ± 0.4 Å. Two subunits of the L-HicDH homotetramer possess an open conformation with an NAD⁺ molecule bound to either active site, whereas the other two subunits show a closed conformation and are each complexed with a substrate molecule, in addition to the NAD⁺ molecule. The active site is located in an internal “vacuole” which is formed by the closure of the coenzyme loop.

In this work the formation and dynamics of this vacuole are discussed together with its influence on the substrate specificity of L-HicDH. The structural differences of the examined L-HicDH–substrate complexes were analysed, as well as the electrostatic potentials of the protein surfaces. Furthermore the amino acids involved in the reaction mechanism and the substrate specificity were identified. The structure of a ternary L-HicDH, NAD⁺ and keto-*tert*-leucine complex was modelled. Based on this model an L-HicDH variant with enhanced activity for keto-*tert*-leucine was proposed.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Kurzzusammenfassung	III
<i>Abstract</i>	IV
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Enzyme	1
1.2 L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (L-HicDH)	2
1.2.1 Die Struktur der L-HicDH	2
1.2.2 Die Familie der Lactat/Malat-Dehydrogenase	7
1.2.3 Die biologische Bedeutung der L-HicDH	10
1.2.4 Die biochemischen Eigenschaften der L-HicDH	10
1.2.5 Der Reaktionsmechanismus	11
1.2.6 Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion	13
1.2.7 Substratspezifität	15
1.2.8 Protein Engineering	17
1.2.9 Eine mögliche biotechnologische Anwendung	18
1.3 Ziele dieser Arbeit	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Chemikalien	21
2.2 Bakterien, Plasmide, Medien und Lösungen	22
2.3 Bakterienkultur und Proteinexpression	23
2.3.1 Plasmidsystem	23
2.3.2 Phasmidsystem	23
2.4 Proteinreinigung	24

2.4.1	Protein aus dem Plasmidsystem	25
2.4.2	Protein aus dem Phasmidsystem	27
2.5	Proteinanalytik	27
2.5.1	Massenspektrometrie	27
2.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	27
2.5.3	Bestimmung der Enzymaktivität	27
2.5.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	28
2.6	Proteinkristallisation	29
2.7	Diffractionsmessungen	30
2.8	Strukturlösung	31
2.8.1	Geometrievorgaben für die Verfeinerung	32
2.8.2	Numerierung der Aminosäuren	33
2.8.3	Bestimmung der Kontaktflächen	33
2.9	Weitere Computerprogramme und -programmpakete	33
2.9.1	Auswertung der Diffractionsdaten	33
2.9.2	Datenbanken	34
2.9.3	Abbildungen	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Übersicht	35
3.2	Expression der L-HicDH	35
3.3	Proteinreinigung	36
3.3.1	Protein aus dem Plasmidsystem	36
3.3.2	Protein aus dem Phasmidsystem	40
3.4	Kristallographie: Übersicht	43
3.5	Apoenzym-Kristalle der Form 5	44
3.5.1	Kristallzüchtung mit PEG und MPD als Fällungsmittel	44
3.5.2	Diffractionsmessungen mit Kristallen der Form 5	45

3.6	Kristalle der Form 1 des binären Komplexes (native L-HicDH-Kristalle)	46
3.6.1	Ammoniumsulfat als Fällungsmittel	46
3.6.2	Künstliche Mutterlauge	47
3.6.3	Macroseeding	47
3.6.4	Cryomessungen	48
3.7	Ternäre Komplexe: L-HicDH–NAD ⁺ –Substrat Cokristalle	50
3.7.1	L-HicDH mit 2-Oxocaproat — <i>Drying Drops</i>	51
3.7.2	L-HicDH mit 2-Oxoisocaproat	56
3.7.3	L-HicDH mit Phenylglyoxylat	56
3.7.4	L-HicDH mit Oxamat	57
3.8	Strukturlösung	59
3.8.1	L-HicDH ohne Substrat (native binäre Komplexe)	59
3.8.2	L-HicDH mit 2-Oxocaproat	71
3.8.3	L-HicDH mit 2-Oxoisocaproat	84
3.8.4	L-HicDH mit Phenylglyoxylat	94
3.8.5	L-HicDH mit Oxamat	107
3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	118
3.10	Einordnung der Ergebnisse	124
4	Diskussion	127
4.1	Von der Expression bis zur Struktur	129
4.1.1	Proteinexpression und -reinigung	129
4.1.2	Kristallisation	130
4.1.3	Röntgendiffraktionsmessung	131
4.1.4	Strukturlösung und Verfeinerung	132
4.2	Überblick über die Struktur	134
4.3	Sekundärstruktur und Topologie	135
4.4	Tertiärstruktur	139

4.4.1	Die geschlossene Untereinheit	139
4.4.2	Die Unterschiede zwischen der offenen und der geschlossenen Untereinheit	139
4.4.3	Die Dynamik der Substratbindung	145
4.4.4	Die Rolle von Arg111	145
4.4.5	Raumfüllende Modelle	147
4.5	Quartärstruktur	150
4.6	Kristallisationskräfte	154
4.7	Elektrostatik	156
4.8	Die „Vakuole“	158
4.9	Das aktive Zentrum	163
4.10	Substratspezifität	165
4.11	Manuelles Docking von Keto-tertiär-Leucin	168
5	Ausblick	171
5.1	L-HicDH im Komplex mit NAD ⁺ und weiteren Substraten	171
5.2	Die Variante Thr248Ser	172
5.3	Mikrokalorimetrie	172
5.4	Variation des Coenzym	172
5.5	Apoenzym-Kristalle und binäre Komplexe	173
5.6	Die Variante Gly223Ile	173
5.7	Der offene Coenzym-Loop	174
6	Zusammenfassung	177
	Literaturverzeichnis	181
	Anhang A	193
A.1	Kristallsymmetrie	193
A.1.1	Kristalle	193

A.1.2	Nichtkristallographische Symmetrie (NCS)	194
A.1.3	Kristallzwillinge	196
A.1.4	Zwillingsdomänen	196
A.1.5	Klassifizierung	200
A.1.6	Warnzeichen	200
A.1.7	Umgang mit meroedrischen Zwillingen	203
A.1.8	Vermeidung von Zwillingen	203
A.2	Die Aussagekraft von Kristallstrukturen	204
A.2.1	Kristallkontakte	204
A.2.2	Lösungsmittelkanäle	206
A.2.3	Gleiche Strukturen trotz unterschiedlicher Umgebungen	207
A.2.4	Wiederholbarkeit der Kristallstrukturen	208
A.3	Qualitätskriterien	208
A.3.1	Auflösung und Daten/Parameter-Verhältnis	208
A.3.2	Genauigkeit der Atompositionierung	211
A.3.3	Qualität des Modells	212
A.3.4	Validierung und Fehlerbestimmung	213
Anhang B		214
B.1	Sekundärstrukturanalyse	214
Anhang C		221
C.1	Abkürzungen	221
C.1.1	Aminosäuren	221
C.1.2	Sonstige Abkürzungen	221
C.2	Teilveröffentlichungen	223
C.3	Erklärung	224
C.4	Lebenslauf	225

1 Einleitung

1.1 Enzyme

Enzyme sind die universellen „Biokatalysatoren“ der Zelle. Es gibt Einige, die aus Nucleinsäuren bestehen. Die überwältigende Mehrheit aber sind Proteine. Enzyme sind die wichtigsten Instrumente der Zelle bei der Vermittlung und Realisierung der Aktivität der Gene, denn sie katalysieren Tausende von chemischen Reaktionen, die in ihrer Gesamtheit den Intermediärstoffwechsel und die Ausprägung des Phänotyps eines Lebewesens ausmachen.

Seit den 30er Jahren des 19. Jahrhunderts, als Faraday und Mitscherlich die Katalyse entdeckten und Berzelius ihr eine generelle Theorie gab, stehen Enzyme im Interesse der Wissenschaft. Die wichtigsten Eigenschaften, die Enzyme unter allen Katalysatoren hervorheben, sind ihre hohe Leistungsfähigkeit und Spezifität. Sie sind nicht nur spezifisch in der Reaktion, die sie katalysieren, sondern auch in den verwendeten Substraten.

Lange Zeit war unklar zu welcher Stoffklasse die Enzyme gehören. 1926 bewies Sumner (1926), daß sie Proteine sind: Er kristallisierte Urease und wies nach, daß die Kristalle aus Proteinen bestehen. Allgemein akzeptiert wurde dies allerdings erst nach der Kristallisation von Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin durch Northrop (1930–1936). Dieser Durchbruch hat die Erforschung der Enzyme stark vereinfacht und der Proteinbiochemie den Stellenwert gegeben, den sie heute hat.

Die Zusammenstellung aller Enzymdaten, etwa im „Biochemie-Atlas“ (Michal, 1999) oder in der Datenbank BRENDA (Schomburg & Stephan, 1998), erlaubt einen Einblick in das Netzwerk der gesamten Biochemie der verschiedenen Zellen. Darüber hinaus erleichtert das Wissen über die Enzyme ihren technischen Einsatz. Durch gezielte Veränderungen der Proteine, dem *protein engineering*, können die Eigenschaften der Enzyme beeinflußt werden, was das mögliche Anwendungsspektrum noch erweitert.

1.2 L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (L-HicDH)

Die L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (L-HicDH, E.C. 1.1.1.27, Synonym L-2-Hydroxy-4-methylpentanoat-dehydrogenase) aus dem gram-positiven Bakterium *Weissella confusa*¹ (DSM 20196) ist eine NAD(H)-abhängige Oxidoreduktase. Sie katalysiert stereospezifisch und reversibel die Reduktion von verzweigten und unverzweigten aliphatischen 2-Oxocarbonsäuren zu ihren L-2-Hydroxycarbonsäuren (Abbildung 1.1). Der aliphatische Rest kann 3–4 Kohlenstoffatome lang sein. Außerdem wird ein aromatischer Rest an C3 oder C4 von dem Enzym akzeptiert (siehe Abschnitt 1.2.7). Kleinere 2-Oxocarbonsäuren werden schlechter und größere gar nicht umgesetzt.

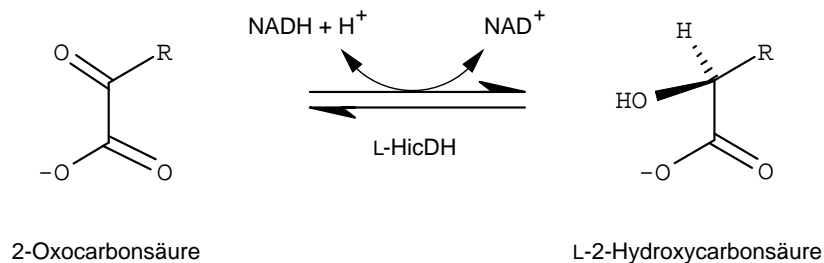


Abbildung 1.1: Die von L-HicDH katalysierte Reaktion. R steht für einen aliphatischen Rest mit 3–4 C oder für einen aromatischen Rest an C3 oder C4.

1.2.1 Die Struktur der L-HicDH

Die Struktur der L-HicDH wurde von Niefind *et al.* (1995) gelöst (PDB-Code 1HYH). Sie ist ähnlich der Struktur der L-Lactatdehydrogenase (L-LDH, siehe Abschnitt 1.2.2) und liegt entsprechend als Homotetramer mit einer 222 Symmetrie vor. Die zweizähligen Symmetrieachsen werden nach Rossmann *et al.* (1973) mit *P*, *Q*, und *R* bezeichnet. Die Gesamtstruktur ist in der Abbildung 1.2 wiedergegeben.

Die Sekundärstruktur und die Topologie der L-HicDH sind in den Abbildungen 1.3–1.5 dargestellt und folgen der L-LDH-Nomenklatur von Abad-Zapatero *et al.* (1987). Allerdings werden in dieser Arbeit die Aminosäuren der L-HicDH ausschließlich in der von Niefind *et al.* (1995) verwendeten Weise bezeichnet: Sie werden von

¹*W. confusa* ist in der Literatur bekannt unter dem Basonym *Lactobacillus confusus*. Es wurde von Collins *et al.* (1993) nach 16S rRNA-Sequenzvergleichen der Gattung *Weissella* zugeordnet.

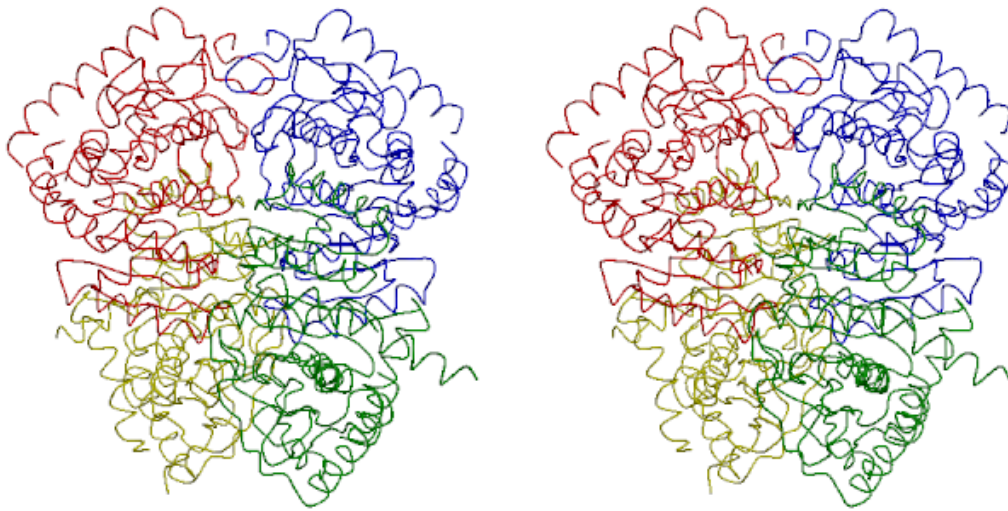


Abbildung 1.2: Die Struktur der L-HicDH (PDB-Kürzel 1HYH, Niefind *et al.*, 1995). Stereoabbildung des *trace*-Diagramms, d. h. des Verlaufs der C α -Atome. Der Farbcode der Untereinheiten folgt Rossmann *et al.* (1973): Die Untereinheit A ist rot, B ist blau, C ist gelb und D ist grün.

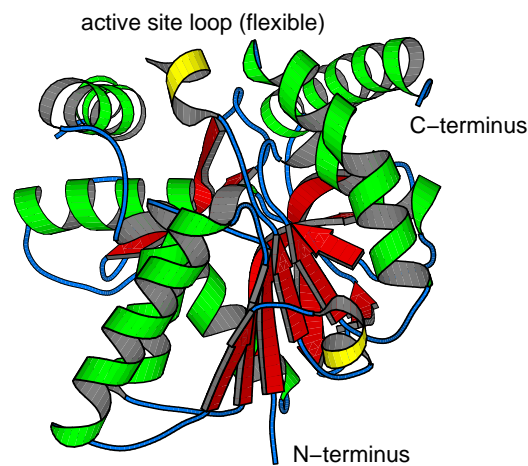


Abbildung 1.3: Faltung eines L-HicDH Monomers (Untereinheit A, nach Niefind *et al.*, 1995). Die Farben geben die Sekundärstrukturen an. Grün, α -Helices, rot, β -Faltblätter, gelb: 3_{10} -Helices, blau: Turns und Coil.

Ala21 an strikt sequentiell durchnummeriert. Das Protein besteht aus einer NAD(H)-bindenden und einer katalytischen Domäne. Der zentrale Teil der katalytischen Domäne besteht aus zwei stark verdrehten antiparallelen β -Faltblättern. Diese sind von vier α -Helices umgeben.

Die NAD-bindende Domäne besteht aus zwei verbundenen β - α - β - α - β -Einheiten mit einem zentralen parallelen β -Faltblatt („Rossmann-Faltung“ nach Rossmann *et al.*, 1975; Schulz & Schirmer, 1979). Der N-terminale Adenosindiphosphat-bindende Teil beinhaltet das charakteristische Sequenzmotiv GXGXXG...D (Wierenga *et al.*, 1986). Die Nicotinamidmononucleotid-bindende Faltung bildet eine hydrophobe Tasche (u. a. mit Ile250 und Val252), so daß NADH stärker als NAD⁺ gebunden wird. Entsprechend vergrößert die L-LDH-Mutante Ile250Asn das NAD⁺/NADH-Verhältnis (Dunn *et al.*, 1991).

Der äußere *active site*-Loop (auch „Coenzym-Loop“ genannt) ist in der Struktur 1HYH zwar nicht vollständig ersichtlich, es läßt sich jedoch die Dynamik des Loops erkennen. Nachdem der ternäre Komplex aus Enzym, NAD und Substrat gebildet ist, legt sich dieser flexible Loop wie ein Deckel über das aktive Zentrum. Dabei wird das Wasser, das sich im aktiven Zentrum befindet, eingefroren und das restliche Wasser ausgeschlossen (Niefind *et al.*, 1995; Dunn *et al.*, 1991; Gerstein & Chothia, 1991).

1HYH erfüllt die oben beschriebene 222 Symmetrie insofern nicht, als daß zwei Untereinheiten (A und B) in einer geschlossenen und die beiden anderen (C und D) in einer offenen Konformation vorliegen. Diese Asymmetrie ist so stark, daß sie in einer Selbstrotationsrechnung im reziproken Raum erkennbar ist. Besonders ausgeprägt ist sie in dem inneren und in dem äußeren *active site*-Loop und in den beiden α -Helices α 1G und α 2G (Niefind *et al.*, 1995). Diese Konformationsunterschiede finden sich auch in L-LDH. Hier sind die aktiven Zentren der offenen Untereinheiten mit Sulfat und die geschlossenen Untereinheiten mit dem Substratanalogen und Inhibitor Oxamat besetzt (Dunn *et al.*, 1991). L-HicDH wurde jedoch ohne Substrat(analogen) kristallisiert, und trotzdem liegen die beschriebenen Unterschiede zwischen den Untereinheiten vor. Es scheint sich hier um eine bevorzugte Konformation der L-HicDH zu handeln.

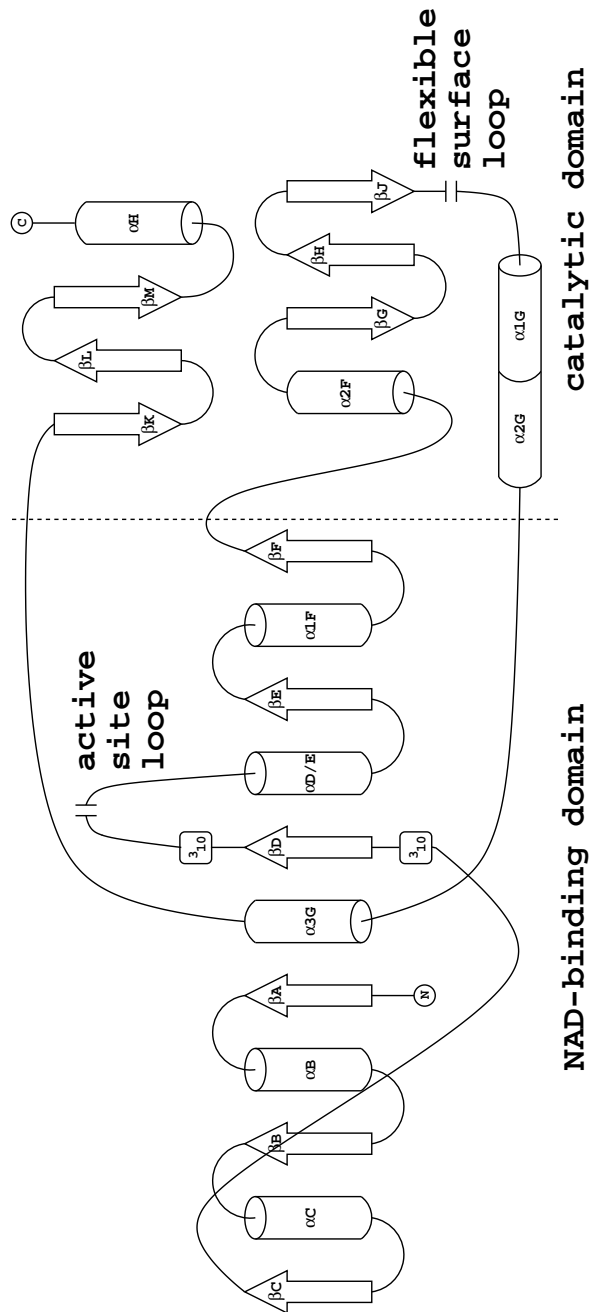


Abbildung 1.4: Die Topologie der L-HicDH nach Niefind *et al.* (1995). Dargestellt sind die NAD-bindende Domäne, der flexible Oberflächen-Loop und der Coenzym-Loop (*active site loop*).

Position	30	40	50	60	70		
Sequenz	ARKIGIIGLGNVGA AVAHGLIAQGVADDDYVFIDANEAKVKADQIDFQDAMANLEA						
A/B	EEEE	SHHHHHHHHHHHHT	SEEEEE	SSHHHHHHHHHHHHHGGSSS			
C/D	EEEE	SHHHHHHHHHHHHTT	SEEEEE	S HHHHHHHHHHHHHHTTSSS			
	-βA--	-----αB-----	-βB--	-----αC-----			
Position	80	90	100	110	120	130	
Sequenz	HGNIVINDWAALADADVISTLgniklqqdnptgdrFAELKFTSSMVQSVGTNLK						
A/B	EEEE	GGGGTT	SEEE	S GGGT	TTHHHHHHHHHHHHHHH		
C/D	EEEE	GGGGTT	SEEE		HHHHHHHHHHHHHHHH		
	-βC-		-βD-	(outer) active site loop	-----αD/E----		
Position	140	150	160	170	180		
Sequenz	ESGFHGVLVVISNPVDVITALFQHVTGFP AHKVI GTGTL LDTARMQRAVGEAFDL						
A/B	HTT	SEEE	SSSHHHHHHHHHHH	GGEEEE	TTHHHHHHHHHHHHHHT		
C/D	HHT	SEEE	TTHHHHHHHHHHH	GGEEEE	TTHHHHHHHHHHHHHHT		
	--	-βE-i.a.s.l.-	----α1F----	βF-	-----α2F-----		
Position	190	200	210	220	230	240	
Sequenz	DPRSVSGYNLGEHGNSQFVAWSTVVRVMGQPIVTLadagdIDLAAIEEEARKGGFT						
A/B	GGG B	EEB	TTTT	EE	TTT	EETTEEGGG	HHHHHHHHHHHHHH
C/D	GGG	EEEB	TTTT	EEEGG	EETTEHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHH	
		βG-		---βH----	βJ-	flex. surf. l.	---α1G---- ---
Position	250	260	270	280	290		
Sequenz	VLNGKGYTSYGVATS AIRIAKAVMADAHAE LVSNRRDDMGMYLSYP AIIGRDGV						
A/B	HHHHHSS	HHHHHHHHHHHHHHHTT	EEEEEEEE	TTT	SEEEEEEEETTEE		
C/D	HHHHHSS	HHHHHHHHHHHHHHHTT	EEEEEEEE	TTT	SEEEEEEEETTEE		
	-α2G-	-----α3G-----	---βK---		---βM----		
Position	300	310	320				
Sequenz	LAETTLDLTTDEQEKLQSRDYIQRFD EIVdt1						
A/B	EEE	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHTT					
C/D	EEE	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHTT					
	βM-	-----αH-----					

Abbildung 1.5: Sekundärstruktur und Sequenz der L-HicDH nach Niefind *et al.* (1995). Die Untereinheiten A/B sind geschlossen, C/D offen; (outer) active side loop: Coenzym-Loop; i.a.s.l: inner active site loop, Loop im Inneren des aktiven Zentrums; flex. surf. l.: flexibler Loop an der Oberfläche; DSSP-Bezeichnungen der Sekundärstrukturen (Kabsch & Sander, 1983): H = α -Helix, B = β -Brücke, E = β -Faltblatt, G = 3_{10} -Helix, I = π -Helix, T = wasserstoffgebundener Turn, S = Krümmung $> 70^\circ$.

1.2.2 Die Familie der Lactat/Malat-Dehydrogenase

Schon Lerch *et al.* (1989) bemerkten eine Homologie der L-HicDH zu den L-Lactat-Dehydrogenasen (L-LDH, Rossmann *et al.*, 1975; Holbrook *et al.*, 1975) von 20–30 % Sequenzidentität. Auch spätere Sequenzvergleiche (Feil, 1992; Feil *et al.*, 1994; Niefind *et al.*, 1995) zeigen die Ähnlichkeit zu anderen L-LDHs (Abbildung 1.6).

Tatsächlich ist die Homologie zwischen L-HicDH und L-LDHs verschiedener Herkunft so groß, daß sie zur Familie der Lactat/Malat-Dehydrogenase (Birktoft & Banaszak, 1983) gezählt wird, zumal sie auch in der Lage ist, Pyruvat umzusetzen. Die Datenbanken INTERPRO (Apweiler *et al.*, 2001) und HOMSTRAD (HOMologous STRucture Alignment Database, Mizuguchi *et al.*, 1998) führen L-HicDH unter dieser Familie. L-HicDH ist zu L-LDH aus Wildschwein (*Sus scrofa*, 9LDB, Dunn *et al.*, 1991) strukturell so ähnlich, daß L-HicDH in dem HOMSTRAD-Alignment durch 9LDB repräsentiert wird. Auch funktionell sind die Proteine ineinander überföhrbar: Dunn *et al.* (1991) haben die L-LDH (9LDB) durch einen Aminosäureaustausch (Gln102Arg) in eine Malat-Dehydrogenase und durch einige wenige Aminosäureaustausche (Gln102Met, Lys103Val, Pro105Ser, Ala235Gly, Ala236Gly) in eine L-HicDH überföhrt. Diese hat allerdings eine deutlich geringere Aktivität als L-HicDH aus *W. confusa*: Für 2-Oxoisocaproat ist die Wechselzahl (k_{cat}) der synthetischen L-HicDH 19 s^{-1} , während die natürliche L-HicDH aus *W. confusa* einen k_{cat} -Wert von 2400 s^{-1} hat (Dunn *et al.*, 1991; Feil *et al.*, 1997).

Während die Sequenzhomologie zwischen L-HicDH und 9LDB nicht besonders hoch ist (31 % über 268 Aminosäuren, siehe Abbildung 1.7), ist die strukturelle Ähnlichkeit groß: Die C α -Atome des Rückgrats haben in diesem Bereich eine Abweichung (*root mean square deviation*, RMSD) von 1.14 Å. Eine strukturelle Überlagerung von 9LDB und L-HicDH (PDB-Kürzel 1HYH, Niefind *et al.*, 1995) ist in Abbildung 1.8 gezeigt. Die Struktur ist wesentlich stärker konserviert als die Sequenz.

```

L-HicDH Numerierung:          21      30      40      50
L-HicDH      ..... ARKIGIIGLG NVGAAVAHGL IAQGVADDYV
9LDT      .ATLKDQLIH NL.LKEEHVP HNKITVVGVG AVGMACAISI LMKELADEIA
1LDM      .ATLKDCLIG HLATSQEPRS YNKITVVGVG AVGMACAISI LMKDLADEVA
1LLC      ..... ..ASITDKD HQKVILVGDG AVGSYAFAM VLQGGIAQEIG
1LDN      ..... ..MKNNG GARVVVIGAG FVGASYVFAL MNQGIADIEIV
Konsensus          * * ** *

Nummer      51      60      70      80      90      100
L-HicDH      FIDANEAKVK ADQIDFQDAM ANLEAHGNIV INDWAALADA DVVISTLGNL
9LDT      LVDVMEDKLK GEMMDLQHGS LFLRTPKIVS GKDYNTVANS RLVVITAGAR
1LDM      LVDVMEDKLK GEMMDLQHGS LFLHTAKIVS GKDYNSVAGS KLVVITAGAR
1LLC      IVDIFKDKTK GDAIDLS.NA LPFTSPKKIY SAEYSDAKDA DLVVITAGAP
1LDN      LIDANESKAI GDAMDFNHGK VFAPKPVDIW HGDYDDCRDA DLVVICAGAN
Konsensus      * * * * * *

Nummer      101     110     120     130     140     150
L-HicDH      KLQQdnptgd rFAELKFTSS MVQSVGTNLK ESGFHGVLVV ISNPVDVITA
9LDT      ..QQ..EGES RLNLVQRNVN IFKFIIPNIV KYSPNCKLLV VSNPVDILTY
1LDM      ..QQ..EGES RLNLVQRNVN IFKFIIPNIV KHSPDCIILV VSNPVDVLTLY
1LLC      ..KQ..PGET RLDLVNKNLK ILKSIVDPIV DSGFNLIPLV AANPVDILTY
1LDN      ..QK..PGET RLDLVKNIA IFRSIVESVM ASGFQGLFLV ATNPVDILTY
Konsensus          * * * * *

Nummer      151     160     170     180     190     200
L-HicDH      LFQHVTFGPA HKVIGTGTLT DTARMQRAVG EAFDLDPKRSV SGYNLGEHGN
9LDT      VAWKISGFPK NRVIGSGCNL DSARFRYLMG ERLGVHPLSC HGWILGEHGD
1LDM      VAWKLSGLPM HRIIGSGCNL DSARFRYLMG ERLGVHSCSC HGWVIGEHDG
1LLC      ATWKLSGFPK NRVVGSGTSL DTARFRQSLA EMVNVDAKRSV HAYIMGEHGD
1LDN      ATWKFSGLPH ERVIGSGTIL DTARFRFLG EYFSVAPQNV HAYIIGEHDG
Konsensus          * * * * *

Nummer      201     210     219     220 225 230     240 245
L-HicDH      SQFVAWSTVR VMGQPIVTL. ...adagdi DLAAIEEEAR KGGFTVLNGK
9LDT      SSVPVWSGVN VAGVSLKNLH PELGTDADKE HWKAVHKEV DSAYEVIKLG
1LDM      SVPSVWSGMN VASI...KLH PELGTNKDKQ DWKKLHKDVV DSAYEVIKLG
1LLC      TEPVWVSHAN IGGVTI.AEW VKAHPEIKED KLVKMFEDVR DAAYEIIKLG
1LDN      TELPVWSQAY IGVMPIRKLV ESKGEEAQK. DLERIFVNVV DAAYQIIEKK
Konsensus          ** * * * *

Nummer      246 250     260     270     280 281     290
L-HicDH      GYTSYGVATS AIRIAKAVMA DAHAELVVSN RRDDM...G .MYLSYPAII
9LDT      GYTSWAIGLS VADLAESIMK NLRVHPVIST MIKGLYGIKE NVFLSVPCLL
1LDM      GYTSWAIGLS VADLAETIMK NLCRVHPVST MVKDFYGIKD NVFLSLPCVL
1LLC      GATFYGIATA LARISKAILN DENAVLPLSV YMDGQYGIND .LYIGTPAVI
1LDN      GATYYGIAMG LARVTRAILH NENAILTVSA YLDGLYGERD .VYIGVPAVI
Konsensus      * * * * *

Nummer      291     300     310     320     329
L-HicDH      GRDGVLAETT LDLTTDEQEK LLQSRDYIQQ RFDEIVDTL. ....
9LDT      GQNGISDVVK VTLTPVEEAH LKKSADTLWG IQKELQF... ....
1LDM      NDHGISNIVK MKLKPDEEQQ LQKSATTLWD IQKDLKF... ....
1LLC      NNRNGIQNILE IPLTDHEEES MQKSASQLKK VLTDAFAKND ietqrq
1LDN      NNRNGIREVIE IELNDDEKNR FHHSAAATLKS VLARAFTR.. ....
Konsensus      * * * * *

```

Abbildung 1.6: Sequenzalignment von L-HicDH und L-LDHs, die mit ihren PDB-Codes bezeichnet sind (nach Niefind *et al.*, 1995).

9ldb	X A T L K D Q L I	H N L L K E E H V P	H N K I T V V G V G	A V G M A C A I S I	L M K E L	45
lhicdh			A R K I G I I G L G	N V G A A V A H G L	I A Q G V	45
9ldb	A D E I A L V D V M	E D K L K G E M M D	L Q H G S L F L R T	P . K I V S G K D Y	N V T A N	89
lhicdh	A D D Y V F I D A N	E A K V K A D Q I D	F Q D A M A N L E A	H G N I V I . N D W	A A L A D	89
9ldb	S R L V V I T A G A	R . . Q Q E G E S .	. R L N L V Q R N V	N I F K F I I P N I	V K Y S P	130
lhicdh	A D V V I S T L G N	I K L Q Q D N P T G	D R F A E L K F T S	S M V Q S V G T N L	K E S G F	134
9ldb	N C K L L V V S N P	V D I L T Y V A W K	I S G F P K N R V I	G S G C N L D S A R	F R Y L M	175
lhicdh	H G V L V V I S N P	V D V I T A L F Q H	V T G F P A H K V I	G T G T L L D T A R	M Q R A V	179
9ldb	G E R L G V H P L S	C H G W I L G E H G	D S S V P V W S G V	N V A G V S L K N L	H P E L G	220
lhicdh	G E A F D L D P R S	V S G Y N L G E H G	N S Q F V A W S T V	R V M G Q P I V T L	219
9ldb	T D A D K E H W K A	V H K E V V D S A Y	E V I K L K G Y T S	W A I G L S V A D L	A E S I M	265
lhicdh	A D A G D I D L A A	I E E E A R K G G F	T V L N G K G Y T S	Y G V A T S A I R I	A K A V M	264
9ldb	K N L R R V H P I S	T M I K G L Y G I K	E N V F L S V P C I	L G Q N G I S D V V	K V T L T	310
lhicdh	A D A H A E L V V S	N R R D D M G M Y L S Y P A I	I G R D G V L A E T	T L D L T	304
9ldb	P E E E A H L K K S	A D T L W G I Q K E	L Q F			333
lhicdh	T D E Q E K L L Q S	R D Y I Q Q R F D E	I V D T L			329

Abbildung 1.7: Handoptimiertes Alignment aus TOP3D (CCP4-Paket) und LINEUP (GCG-Paket) der L-LDH (9LDB) und der L-HicDH.



Abbildung 1.8: Die Strukturen von L-HicDH (grün, 1HYH, Niefind *et al.*, 1995) und L-LDH aus Wildschwein (blau, mit NAD^+ und SO_4^{2-} , 9LDB, Dunn *et al.*, 1991). Nur der Verlauf der jeweiligen Hauptkette ist dargestellt. 9LDB hat einen N-terminalen Teil, der über das Alignment hinausgeht, der Rest ist L-HicDH sehr ähnlich. Das Alignment ist mit TOP3D (Collaborative Computational Project Number 4, 1994), die Abbildung mit BRAGI (Schomburg & Reichelt, 1988) erstellt worden.

1.2.3 Die biologische Bedeutung der L-HicDH

Da das Hauptaugenmerk bei der Untersuchung der L-HicDH auf biotechnologischen Fragestellungen lag, ist ihre biologische Bedeutung nicht gut charakterisiert. Schütte *et al.* (1984) untersuchten das natürliche Vorkommen in *W. confusa*: Das Enzym wird zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase exprimiert. Allerdings kommt es mit 0.5 u/mg im Rohextrakt nur in geringen Mengen vor. In *W. confusa* ist eine explizite L-LDH nicht nachweisbar (Lerch *et al.*, 1989). Es könnte sein, daß L-HicDH diese Aufgabe übernimmt.

L-HicDH ist das einzige bekannte natürliche NAD(H)-abhängige Enzym, das L-2-Hydroxyisocaproat umsetzen kann. Es wäre interessant, die Stoffwechselwege zu sehen, in die das Enzym eingebunden ist. Vielleicht spielt es bei der Leucin-Synthese, der NAD(H)-Regulation oder im Stickstoffhaushalt eine Rolle. 2-Oxoisocaproat kommt im bakteriellen Leucin-Stoffwechsel vor. Die L-Leucin-Dehydrogenase katalysiert die Reaktion von 2-Oxoisocaproat zu Leucin (Abbildung 1.9).

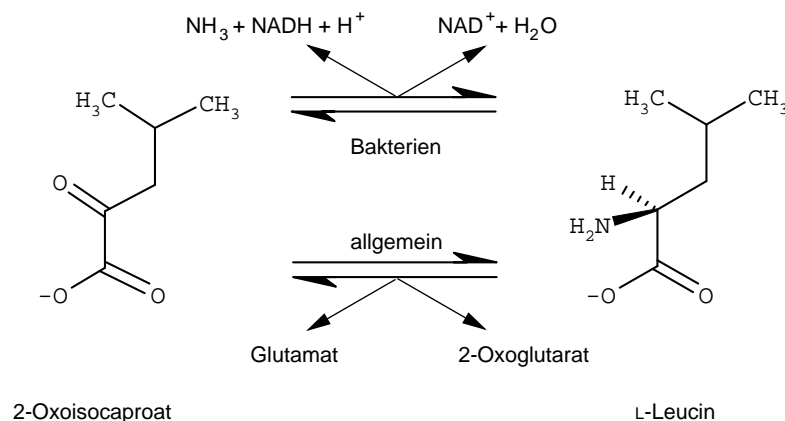


Abbildung 1.9: Die Reaktion von 2-Oxoisocaproat zu Leucin. Die obere Reaktion wird von der Leucin-Dehydrogenase katalysiert und kommt nur in Bakterien vor, die untere wird von der Leucintransaminase katalysiert und ist ein allgemeiner Stoffwechselweg (nach Michal, 1999).

1.2.4 Die biochemischen Eigenschaften der L-HicDH

L-HicDH ist ein Homotetramer von je 33 kDa (33 049 Da mit 309 Aminosäuren, Schütte *et al.*, 1984; Lerch *et al.*, 1989; Niefind *et al.*, 1995).

Schütte *et al.* (1984) charakterisierten das Protein:

- Es ist stabil in einem Bereich von pH 5.5–9.0 mit einem pH-Optimum bei pH 7.0 für die Reduktion und bei pH 8.0–8.5 für die Oxidation.
- Die Reduktion ist siebenmal schneller als die Oxidation (betrachtet wurden die Anfangsgeschwindigkeiten im jeweiligen pH-Optimum).
- Das Temperaturoptimum liegt bei 50°C.
- Gereinigt ist das Protein in Phosphatpuffer über Monate bei 4°C und für eine Stunde bei 40°C stabil.
- Metallionen und Chelatbildner beeinflussen die Enzymaktivität nicht.
- NADH wirkt ab 0.24 mM inhibierend. NADPH wird vom Enzym nicht verwendet.
- Es ist das einzige bekannte natürliche NAD(H)-abhängige Enzym, das L-2-Hydroxyisocaproat umsetzen kann.
- Die spezifische Aktivität ist 480 u/mg. Lerch (1989) hat eine spezifische Aktivität von 650 u/mg gefunden.
- Anders als die verwandte L-LDH wird L-HicDH nicht durch Fructose-1,6-bisphosphat allosterisch aktiviert. Während dieser Aktivator an His191 der L-LDH bindet, ist die entsprechende Aminosäure bei L-HicDH durch Ser ersetzt (siehe Abbildung 1.6, Lerch *et al.*, 1989; Niefind *et al.*, 1995).

1.2.5 Der Reaktionsmechanismus

Die Reaktion der L-HicDH hat einen geordneten, sequentiellen Mechanismus. Die geöffnete Untereinheit bindet erst NADH und dann die 2-Oxocarbonsäure, wobei sich der Coenzym-Loop schließt. Die Reduktion findet statt, worauf sich der Coenzym-Loop öffnet und erst die L-2-Hydroxycarbonsäure und dann das NAD⁺ entläßt. Die Oxidation von 2-Hydroxysäuren läuft entsprechend in der umgekehrten Reihenfolge ab.

Während der Reaktion befindet sich das Substrat in einem internen wäßrigen Hohlraum, der von Dunn *et al.* (1991) als „Vakuole“ bezeichnet wird. Hier liegt das

Wasser stark lokalisiert als Quasi-Eis vor, was eine schnelle Hydridübertragung ermöglicht. Dieser geschlossene Hohlraum erlaubt die Erkennung der Substrate mit richtiger Struktur und Ladung, denn die Substrate selbst besitzen zu wenige funktionelle Gruppen, um an einer lösungsmittelzugänglichen Proteinoberfläche spezifisch gebunden zu werden (Dunn *et al.*, 1991).

Die Reduktion der 2-Oxocarbonsäure (siehe Abbildung 1.1) zur L-2-Hydroxycarbonsäure geschieht an His198 im aktiven Zentrum. Dabei dient His198 als katalytische Säure und wird von Asp171 stabilisiert, während Arg174 das Substrat fixiert (Niefind *et al.*, 1995). Bei L-LDH sind die entsprechenden Aminosäuren His195, Asp168 und Arg171 (Abbildung 1.10, Holbrook *et al.*, 1975; Dunn *et al.*, 1991). Zuerst bildet sich der binäre Komplex aus Enzym und NADH, und erst dann bindet die 2-Oxocarbonsäure (Holbrook *et al.*, 1975; Dunn *et al.*, 1991; Read *et al.*, 2001). Während der Reaktion wird ein Hydridion vom NADH auf das C2-Atom des Substrats sowie ein Proton von His198 auf den Carbonylsauerstoff übertragen, so daß formal ein H₂ eingebaut wird. Die beiden in Abbildung 1.10 durch gestrichelte Linien zusammengefassten Zustände der Elektronen (NADH + 2-Oxocarbonsäure + protoniertes His195 \rightleftharpoons NAD⁺ + 2-Hydroxysäure + ungeladenes His195) wechseln schneller als 1 000 s⁻¹ und befinden sich im Gleichgewicht. Im Übergangszustand ist daher die positive Ladung des His198 zum Teil auch auf das Substrat und das NADH verteilt (Holbrook *et al.*, 1975; Dunn *et al.*, 1991). Die Oxobindung hat zu 40 % den Charakter einer Einfachbindung (Dunn *et al.*, 1991).

Die Reaktion ist in zweifachem Sinne stereospezifisch: Zum einen entstehen L-2-Hydroxysäuren, zum anderen wird das pro-R-Hydrogen auf der A-Seite des C4 des Dihydro-nicotinamid-Rings des NADH auf das Substrat übertragen (Rossmann *et al.*, 1975).

Bei den verschiedenen Isoformen der menschlichen L-LDH resultieren die Unterschiede ihrer Kinetik nicht aus Veränderungen des aktiven Zentrums, sondern aus der Veränderung der Oberflächenladung (besonders in der Peripherie des aktiven Zentrums, Read *et al.*, 2001). Grau *et al.* (1981) schreiben den Ladungen des Substrates und des Loops entscheidende Bedeutung bei dem Elektronenfluß und der Dissoziation zu. Es ist davon auszugehen, daß die Oberflächenladung auch für L-HicDH wichtig ist.

Obwohl D- und L-HicDH keine Sequenzähnlichkeit haben, sind ihre aktiven Zentren zueinander spiegelverkehrt aufgebaut (Niefind *et al.*, 1995; Dengler *et al.*, 1997),

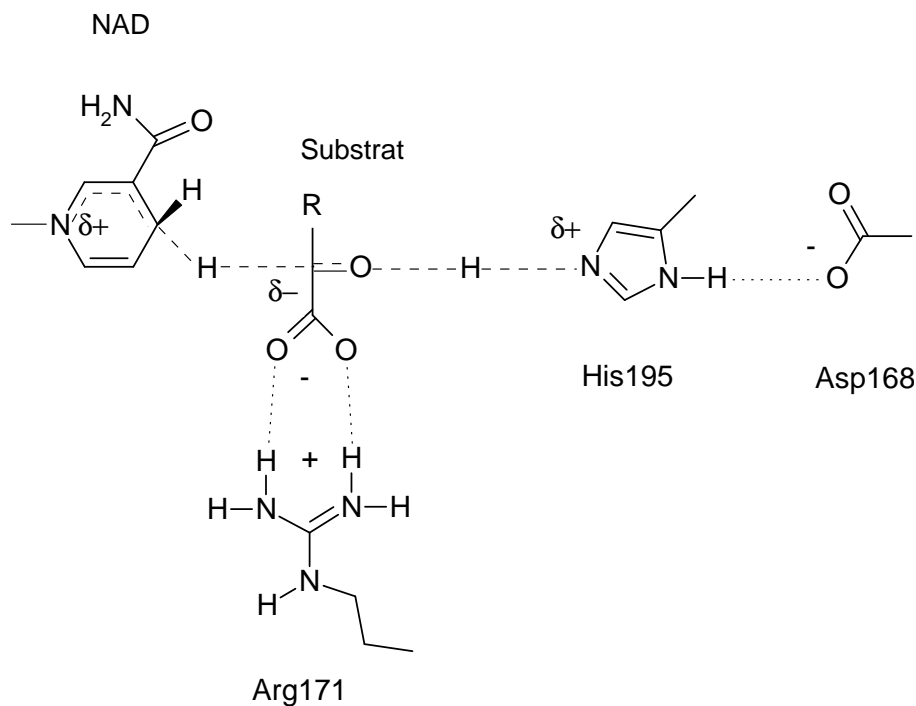


Abbildung 1.10: Der Reaktionsmechanismus der L-LDH aus *Geobacillus stearothermophilus* (Basonym: *Bacillus stearothermophilus*) nach Dunn *et al.* (1991). Die Elektronenübertragung erstreckt sich über 20 Å. His195, Asp168 und Arg171 bilden eine katalytische Triade. R ist in diesem Falle ein Wasserstoff. L-HicDH hat einen analogen Reaktionsmechanismus mit His198, Asp171 und Arg174. Die dabei möglichen Reste R des Substrats werden in Abschnitt 1.2.7 beschrieben.

ähnlich wie D- und L-LDH, bei denen die wesentlichen Aminosäureseitenketten der katalytischen Triade Arg, His und Asp/Glu (siehe Abbildung 1.10) sowie NAD⁺ und das Substratanalogon durch eine Spiegelung in Übereinstimmung zu bringen sind (Lamzin *et al.*, 1994). Es handelt sich hier um einen besonders deutlichen Fall konvergenter Evolution. Da sowohl D- als auch L-HicDH beide eine Rossmann-Faltung besitzen, muß sich die Entwicklung der beiden Enzyme vor der Ausbildung der aktiven Zentren getrennt haben.

1.2.6 Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion

Klassischerweise wird die Enzymkatalyse mit der *transition state theory* beschrieben, die darauf gründet, daß der Enzymsubstratkomplex eine Barriere (die Gibbsche freie

Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger) überwinden muß, um sich zu dem Enzymproduktkomplex umzubilden (Pauling, 1946). Je höher diese Barriere, desto langsamer läuft die Reaktion ab. Die Energiebarriere wird durch den energetisch instabilen Übergangszustand dargestellt. Die Katalyse des Enzyms resultiert aus der Stabilisierung dieses Übergangszustands und damit einer Erniedrigung der Energiebarriere (siehe Lehrbücher wie Creighton, 1993; Stryer, 1995).

Neuere Arbeiten haben bei Wasserstoff-übertragenden Enzymen unterschiedliche Kinetiken festgestellt, wenn ^1H -, ^2H - bzw. ^3H -haltige Substrate verwendet werden (Übersicht in Fersht, 1998; Sutcliffe & Scrutton, 2000). Diese Abhängigkeit von der Art des jeweiligen Wasserstoffisotops ist nicht durch die *transition state theory* erklärbar, denn die Stabilisierung des Übergangszustands ist unabhängig von der Masse des übertragenen Wasserstoffs. Dagegen lassen sich diese Beobachtungen durch quantenmechanisches Tunneln erklären. Danach werden die Wasserstoffteilchen als Welle betrachtet, die von einer Barriere abgeschwächt wird. Eine kleine Masse begünstigt das Tunneln, und so läßt sich erklären, wieso ^1H im Enzym leichter als die schwereren Isotope ^2H und ^3H umgesetzt werden (Fersht, 1998; Sutcliffe & Scrutton, 2000).

Schätzungen gehen davon aus, daß Wasserstoff in einem entsprechenden Enzym mit einer ausreichenden Wahrscheinlichkeit eine Distanz von 0.6 Å durch Tunneln überwinden kann, während eine Elektronenübertragung bis zu 25 Å weit reichen kann (Sutcliffe & Scrutton, 2000). Dabei ist die Dynamik des Enzyms wichtig, denn der Tunneleffekt wird durch thermische Vibration erleichtert (*vibrationally enhanced tunneling*, Basran *et al.*, 1999; Kohen *et al.*, 1999; Sutcliffe & Scrutton, 2000).

Die Kinetikdaten aus Untersuchungen mit Alkohol-Dehydrogenase und anderen Enzymen weisen darauf hin, daß das quantenmechanische Tunneln die Enzymkatalyse nicht vollständig beschreiben kann, sondern die Modelle der *transition state theory* ergänzt (Kohen *et al.*, 1999; Sutcliffe & Scrutton, 2000).

Bei der L-LDH sind jedoch die Wechselzahlen (k_{cat}) von ^1H und ^2H gleich. Also ist die Wasserstoffübertragung nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Wilks *et al.*, 1988). *Stopped flow*-Fluoreszenzmessungen an Proteinvarianten, die nur bestimmte Tryptophanreste besaßen, ergaben, daß der langsamste Schritt die Schließbewegung des *active site*-Loops ist, also die Bildung der „Vakuole“ im aktiven Zentrum. Durch ähnliche Fluoreszenzmessungen am Wildtyp-Protein wurde die dafür benötigte Zeit mit 3 ms bestimmt. Die Konformationsänderung wird durch die höhere Viskosität von 44%igem Glycerin gebremst: k_{cat} verringert sich auf ein Zehntel des

ursprünglichen Wertes — ein weiterer Hinweis darauf, daß es sich um den langsamsten Schritt in der Reaktion handelt (Dunn *et al.*, 1991).

1.2.7 Substratspezifität

Die herausragende biochemische Eigenschaft der L-HicDH ist ihre breite Substratspezifität (Schütte *et al.*, 1984). Die wichtigsten Substrate der L-HicDH sind in Abbildung 1.11 dargestellt, sowie das Pyruvatanalogon Oxamat, das wie bei L-LDH auch für L-HicDH ein kompetitiver Inhibitor ist. Außerdem sind die jeweiligen Synonyme, englischen Bezeichnungen und CAS-Nummern angegeben.

Die für L-HicDH namensgebende Reaktion ist die Oxidation von L-2-Hydroxyisocaproat zu 2-Oxoisocaproat. Daneben setzt das Enzym unter anderem auch 2-Oxocaproat, 3-Phenylpyruvat und Phenylglyoxylat um, sowie Keto-tertiär-Leucin und Pyruvat — diese beiden allerdings schlechter (Abbildung 1.11).

Für den Kinetik-Vergleich sind die Kennzahlen k_{cat} und $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ hilfreich. k_{cat} ist die *katalytische Konstante*, *Wechselzahl* oder *turnover number* und stellt die maximale Geschwindigkeit bei Substratsättigung dar. Sie hat dieselbe Dimension wie eine Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion erster Ordnung.

Dagegen entspricht die *spezifische Konstante* $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k einer Reaktion zweiter Ordnung. Die Erhöhung dieses Wertes ist ein Maß dafür, wie sehr das Enzym die Reaktion beschleunigt. Die maximal mögliche Beschleunigung bewirken diffusionskontrollierte Enzyme. Ihr geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist die diffusionsabhängige Kollision von Enzym und Substrat. $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ist in diesem Fall bei 10^8 – $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Tabelle 1.1 zeigt die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ - und k_{cat} -Werte von L-HicDH mit einigen Substraten (Feil *et al.*, 1997). 2-Oxocaproat ist das beste Substrat. L-HicDH ist mit 2-Oxocaproat und 3-Phenylpyruvat (und annäherungsweise auch 2-Oxoisocaproat) sogar diffusionskontrolliert: die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte liegen zwischen 4×10^7 und $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Bei Keto-tertiär-Leucin und Pyruvat sind die kinetischen und spezifischen Konstanten um mehrere Größenordnungen niedriger (für Pyruvat 90 s^{-1} bzw. $2.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Allerdings zeigt der Vergleich mit L-LDH aus Schwein und Mensch, daß die k_{cat} -Werte nicht ungewöhnlich niedrig sind: L-LDH hat für Pyruvat k_{cat} -Werte zwischen 143 und 450 s^{-1} . Dagegen sind die betreffenden $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte 30 bis 100mal höher als die von L-HicDH (nach Read *et al.*, 2001).

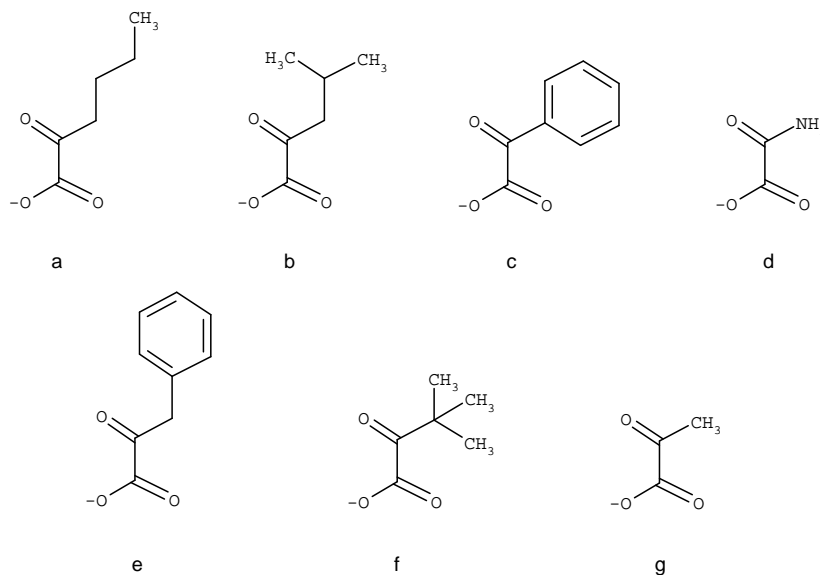


Abbildung 1.11: Die Substrate und der Inhibitor Oxamat von L-HicDH (mit Synonymen, englischer Bezeichnung laut BEILSTEIN COMMANDER und CAS-Nummern). **a:** 2-Oxocaproat (2-Ketocaproat, 2-Ketohexanat, 2-oxo-hexanoic acid, 2492-75-3); **b:** 2-Oxoisocaproat (2-Ketoisocaproat, 4-Methyl-2-oxopentanat, 4-methyl-2-oxo-valeric acid, 816-66-0); **c:** Phenylglyoxylat (2-Ketophenylacetat, oxo-phenyl-acetic acid, 611-73-4); **d:** der Inhibitor Oxamat (Aminooxoacetat, oxalic acid monoamide, 471-47-6); **e:** 3-Phenylpyruvat (2-Oxo-3-phenylpropionat, 2-oxo-3-phenyl-propionic acid, 156-06-9); **f:** Keto-tertiär-Leucin (Tertiär-butylglyoxylat, 3,3-dimethyl-2-oxo-butyric acid, 815-17-8); **g:** Pyruvat (2-Oxopropionat, 2-oxo-propionic acid, 127-17-3).

Tabelle 1.1: Die Substratspezifität der L-HicDH (nach Feil *et al.*, 1997).

	2-Oxo- caproat	2-Oxo- isocaproat	3-Phenyl- pyruvat	Phenyl- glyoxylat	Keto- tertiär- Leucin	Pyruvat
$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	3.3×10^9	3.6×10^7	2.8×10^8	1.9×10^6	1.3×10^5	2.6×10^4
k_{cat} (s^{-1})	3.6×10^5	2400	7300	1.8×10^4	52	90

1.2.8 Protein Engineering

Aus der Struktur der L-LDH aus Hundshai (dogfish, *Squalus acanthius*, PDB-Kürzel 6LDH, Abad-Zapatero *et al.*, 1987) mit 23 % Sequenzidentität ließ sich trotz dieser relativ niedrigen Homologie ein Modell der L-HicDH bauen (Feil, 1992; Feil *et al.*, 1994, 1997). Deletionsmutanten wurden anhand dieses Modells erstellt und lokalisierten den Coenzym-Loop oder (*outer active site loop*). Dieser schließt sich über das gebundene Substrat, verstärkt die Substraterkennung und schließt das Lösungsmittelwasser aus (Adams *et al.*, 1973; White *et al.*, 1976; Grau *et al.*, 1981; Dunn *et al.*, 1991; Gerstein & Chothia, 1991; Feil *et al.*, 1994; Niefind *et al.*, 1995). Der Coenzym-Loop ist bei L-HicDH um vier Aminosäuren größer als bei L-LDH. Die Vierfachdeletion $\Delta(\text{Ile100, Lys101, Asn106, Pro107})$, die den Loop L-LDH ähnlicher macht, macht das Enzym spezifisch für 3-Phenylpyruvat (Feil *et al.*, 1994). Würde allein die Größe des Loops die Größe des Substrats bestimmen, würde die Vierfachdeletion zu einer Spezifität für das kleinere Pyruvat führen.

Das Modell aus dem Sequenzalignment mit 6LDH ermöglichte das Design einer Reihe von Varianten mit neuen Eigenschaften. Aminosäureaustausche in der Bindungstasche auf der anderen Seite des Substrats führten zu gezielten Änderungen in der Substratspezifität. Das Protein Engineering führte zu folgenden Erkenntnissen (Feil *et al.*, 1997):

- Die Doppelmutante Gly237Val/Gly238Asp macht L-HicDH der L-LDH ähnlicher, was eine Steigerung der Kinetikdaten mit Pyruvat bewirkt: eine 3.8fache Steigerung von k_{cat} und eine 2.5fache von $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$. Die anderen gemessenen Substrate werden im Vergleich zum Wildtyp-Protein z. T. drastisch schlechter umgesetzt. Die Ausnahme stellt 2-Oxoisocaproat dar, dessen Kinetik von den Aminosäureaustauschen nicht betroffen ist. Dies läßt darauf schließen, daß Gly237 und Gly238 nur indirekt die Substratspezifität beeinflussen, etwa dadurch, daß sie eine Bewegung der Helices $\alpha 1\text{G}/\alpha 2\text{G}$ bei der Substratbindung begünstigen.
- Die Verkleinerung von Phe239 (Phe239Val und Phe239Ser) beeinträchtigt alle Substrate bis auf 3-Phenylpyruvat. Da Phe239 dem Modell nach keine direkten Kontakte zum Substrat hat, läßt sich dieser Effekt durch die Beeinflussung von Leu242 erklären.
- Leu242 interagiert mit dem Substrat und trägt wesentlich zur Spezifität bei. Die

Variante Leu242Met führt zur Spezifitätsänderung: Während der Wildtyp für 2-Oxocaproat höhere k_{cat} - und $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte als für 2-Oxoisocaproat aufweist, ist es bei Leu242Met genau umgekehrt. Dasselbe gilt auch für die Wechselzahlen von Leu242Ala. Hier scheint jedoch für die Substratbindung die hydrophobe Umgebung zu fehlen, so daß die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte für alle Substrate geringer sind. Leu242Trp reduziert die Enzymaktivität und außer für 2-Oxoisocaproat auch die Enzymspezifität. Dies läßt sich durch unproduktive Bindung der Substrate erklären. Es fällt auf, daß der Wildtyp (Leu242) für die C3-verzweigten Substrate Phenylglyoxylat und Keto-tertiär-Leucin besonders wichtig ist, da jede vorgenommene Änderung an dieser Stelle nachteilig ist.

- Thr248 ist wichtig für die Coenzymbindung, da es in direkter Umgebung des Nicotinamidrings liegt. Der Austausch Thr248Ala führt zu einer drastischen Abnahme von k_{cat} und $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ aller Substrate außer Keto-tertiär-Leucin, für welches diese Variante mehr Platz schafft. Im Vergleich zu $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von 2-Oxocaproat hat sich die Substratspezifität um mehr als das 17 000fache verschoben. Das Ergebnis bestätigt das Modell von Feil *et al.* (1997). Entsprechend reduziert bei L-LDH der Austausch Thr246Gly den k_{cat} -Wert, akzeptiert aber größere Substrate (Wilks *et al.*, 1988).

1.2.9 Eine mögliche biotechnologische Anwendung

Da bei der Reduktion der 2-Oxocarbonsäuren ein chirales Zentrum eingeführt wird, ist es denkbar, L-HicDH in der biotechnologischen Produktion einzusetzen. Eine Möglichkeit ist die Herstellung von L-2-Hydroxysäuren in einem Enzymmembranreaktor (Wichmann *et al.*, 1981). Beispielsweise ist die stereospezifische Produktion des wertvollen Synthons L-2-Hydroxytertiärleucin aus Keto-tertiär-Leucin (siehe Abbildung 1.11) eine interessante Anwendung. Der Cofaktor NADH kann durch eine Bindung an hochmolekulares Polyethylenglykol von einer Membran zurückgehalten werden (Bückmann *et al.*, 1981). Eine Oxidation von Formiat zu CO_2 durch die Formiat-Dehydrogenase kann NAD^+ zu NADH regenerieren (Wandrey *et al.*, 1984; Kula & Wandrey, 1987; Hummel & Kula, 1989).

In der gekoppelten Anwendung von L-HicDH, D-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (Hummel *et al.*, 1985) und einer L-Aminosäure-Dehydrogenase lassen sich in solchen Enzymmembranreaktoren aus D,L-Hydroxysäure-Racematen L-Aminosäuren herstellen: Die Hydroxysäuren werden von der jeweiligen Hydroxyisocaproat-

Dehydrogenase zu den entsprechenden Oxocarbonsäuren umgesetzt, die wiederum von der Aminosäure-Dehydrogenase unter Ammoniakverbrauch transaminiert werden (siehe Abbildung 1.9). Das für die Transaminierung benötigte NADH wird in der Oxidation der Hydroxysäuren regeneriert (Substratkopplung). Beispielsweise läßt sich mit dem Einsatz von D,L-2-Hydroxyisocaproat und L-Leucin-Dehydrogenase L-Leucin herstellen (Wandrey *et al.*, 1984; Kula & Wandrey, 1987) und entsprechend L-Phenylalanin mit der L-Phenylalanin-Dehydrogenase aus D,L-3-Phenyllactat (Hummel *et al.*, 1984; Hummel & Kula, 1989; Brunhuber *et al.*, 1994). Sollten einmal D-Aminosäure-Dehydrogenasen entdeckt werden, ließen sich auch die entsprechenden D-Aminosäuren auf diese Weise gewinnen. Besonders interessant ist die Herstellung von unnatürlichen Substanzen, die nicht oder nur mit hohem Aufwand durch Fermentation von Bakterien wie *Corynebacterium glutamicum* oder *Escherichia coli* gewonnen werden können, wie beispielsweise ¹⁵N-markierte Aminosäuren oder Tertiärleucin (2-Amino-3,3-dimethyl-butansäure, Hummel & Kula, 1989).

1.3 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die strukturellen Grundlagen der Substratbindung und -spezifität der L-HicDH zu untersuchen.

Die besondere Substratspezifität unterscheidet L-HicDH von allen anderen verwandten Enzymen. Im Unterschied zur L-LDH kann die L-HicDH Substrate, die größer sind als Pyruvat, effizient umsetzen. Hierzu gehören 2-Oxoisocaproat, 2-Oxocaproat und Phenylglyoxylat (siehe Abschnitt 1.2.7).

Während der Großteil der L-HicDH-Struktur bekannt war, war die Struktur des für die Substratbindung wichtigen Coenzym-Loops ungeklärt (Niefind *et al.*, 1995). Die Struktur dieses Coenzym-Loops zu lösen, war daher ein wesentlicher Schritt zum Ziel dieser Arbeit. Da die hohe Flexibilität dieses Loops bei Niefind *et al.* (1995) die Strukturklärung verhinderte, sollten Strukturen aus anderen Kristallen gewonnen werden.

Zum einen sollte geprüft werden, ob eine neue Kristallform die gesuchte Strukturinformation liefert, zum anderen sollten ternäre Komplexe aus L-HicDH, NAD⁺ und Substrat gewonnen und zur Strukturklärung verwendet werden. Die Kristallstruktur von Niefind *et al.* (1995) wurde aus dem binären Komplex aus L-HicDH und NAD⁺ gelöst. Dabei ist im aktiven Zentrum ein Sulfat-Ion gebunden. Die Vermutung lag na-

he, daß bei der Cokristallisation von ternären Komplexen aus L-HicDH, NAD^+ und Substrat dieses Substrat im aktiven Zentrum gebunden sein könnte. Dann könnte durch zusätzliche Interaktionen der Coenzym-Loop in der geschlossenen Form stabilisiert werden. Strukturen, die aus solchen Kristallen gewonnen würden, könnten die für die Substratspezifität wichtigen Interaktionen aufzeigen. Allerdings gab es keine Struktur von L-LDH, die mit ihrem Substrat cokristallisiert wurde; alle bisherigen Strukturen haben Sulfat oder den kompetitiven Inhibitor Oxamat im aktiven Zentrum (Berman *et al.*, 2000).²

Eine Untersuchung der Substratbindung könnte die Vorhersage von Mutanten ermöglichen, die veränderte Eigenschaften besitzen. Im Hinblick auf die mögliche technische Verwendung im Membranreaktor (siehe Abschnitt 1.2.9) sind L-HicDH-Mutanten interessant, die z. B. Keto-tertiär-Leucin zu L-Hydroxy-tertiär-Leucin effizient umsetzen können. Letztere Substanz ist wegen des chiralen Zentrums ein wertvolles Synthone in der organischen Chemie. Anhand neu erworbener Informationen über die Substratbindung von L-HicDH sollten daher Mutanten vorhergesagt werden, die eine höhere Umsatzrate von Keto-tertiär-Leucin aufweisen.

²Eine Ausnahme stellt die Struktur des ternären L-LDH- NAD^+ -Pyruvat Komplexes von White *et al.* (1976) dar, die allerdings von völlig ungenügender Qualität ist (3LDH).

2 Material und Methoden

Alle nicht weiter erläuterten Medien, Lösungen und Methoden wurden aus den entsprechenden Standardwerken unverändert übernommen:

- Medien und Handhabung von *E. coli*: Miller (1992).
- Molekularbiologisches Arbeiten (u. a. Umgang mit Phagen und Phasmiden): Sambrook *et al.* (1989).
- Proteinbiochemie: Jaenicke (1984), Bollag *et al.* (1996) und Amersham (1998).
- Proteinkristallisation und -kristallographie: Bergfors (1999), Drenth (1994), Ducruix & Giegé (1999), Jones *et al.* (1996), McPherson (1999) und McRee (1999).

2.1 Chemikalien

Es wurden nahezu ausschließlich Chemikalien „zur Analyse“ verwendet, nur einige Stoffe waren „reinst“, so z. B. NaN_3 . Die Chemikalien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg), Invitrogen (mit Gibco, Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma (mit Sigma-Aldrich, Fluka und Riedel-de Haën, Taufkirchen) und Roche (Mannheim) bezogen. Das Wasser stammte aus einer Seralpur Delta UV-Reinstwasseranlage von USF Elga Seral (Ransbach-Baumbach). Sämtliche Lösungen wurden durch $0.2 \mu\text{m}$ -Membranen filtriert.

Die wichtigsten Chemikalien waren:

- BSA: *bovine serum albumin*, Fraktion V, Merck 1.12018
- *complete* Proteaseinhibitor, Roche 1 697 498
- 1,2,3-Hexantriol: Aldrich 37.497-0 und Fluka Biochemika 52895
- LiNAD: β -Nicotinamide adenine dinucleotide lithium salt, $\approx 97 \%$, Sigma N-7132
- Li_2SO_4 : Merck 105694
- MPD: 2-Methyl-2,4-pentandiol, zur Synthese, $> 99 \%$, Merck 820819

- NAD⁺: β -NAD, Sigma N-1511
- NADH: *disodium salt, grade I*, $\approx 100\%$, Merck 1.07735
- Oxamat: *Oxamic acid, potassium salt*, $\approx 98\%$, Sigma O-8754
- 2-Oxocaproat: *2-Ketohexanoic acid*, $\approx 98\%$, Sigma K-6625
- 2-Oxoisocaproat: *4-Methyl-2-oxopentanoic acid, sodium salt*, Sigma K-0629
- PEG-400: purum, Roth 0144.1
- Phenylglyoxylsäure, zur Synthese, Merck 8.41629, mit 100 mM NaOH auf pH 6.92 eingestellt.

2.2 Bakterien, Plasmide, Medien und Lösungen

- *E. coli* JM103: New England Biolabs 401, Messing *et al.* (1981), Yanisch-Perron *et al.* (1985), *endA1 supE sbcBC thi-1 rpsL(Str^r) Δ (lac-pro) (P1) (r_k⁺ m_k⁺ r_{P1}⁺ m_{P1}⁺) F'[traD36 lacI^q lacZ Δ M15 proAB⁺]*
- *E. coli* TG1: DSM 6056, Carter *et al.* (1985), *supE hsd Δ 5 thi Δ (lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15]*
- *E. coli* XL1-Blue: Stratagene, La Jolla, CA, USA, Bullock *et al.* (1987), *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F'[proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]*
- LB-Medium: 10 g Gibco Pepton 140, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl, 1 L H₂O, mit ca. 250 μ L 10 N NaOH auf pH 7.0 eingestellt und autoklaviert.
- Phasmid: Feil (1992); Feil *et al.* (1994)
- pHL6: siehe Lerch (1989) und Lerch *et al.* (1989). Hier ist auch die Sequenz des *L-HicDH*-Gens angegeben. Das restliche Plasmid ist mit pHL4 (ebenda) identisch und wurde von Eifert (2001) vollständig sequenziert.
- SR-Medium: Lösung A: 20 g Trypton, 20 g Hefe-Extrakt, 10 g Fleisch-Extrakt, 11 g 99.5%iges Glycerin und 900 mL H₂O. Lösung B: 2.32 g KH₂PO₄, 16.4 g K₂HPO₄ · 3H₂O und 100 mL H₂O. Beide Lösungen wurden getrennt autoklaviert und danach vereinigt (Feil, 1992).

2.3 Bakterienkultur und Proteinexpression

- Kompetente Bakterien wurden nach Inoue *et al.* (1990) erstellt und transformiert.
- Zum Bestimmen der OD₆₀₀ von Bakterienkulturen wurden diese mit Saline so verdünnt, daß der gemessene Wert höchstens 1.0 betrug.
- Für die Expression von rekombinanter L-HicDH wurden zwei verschiedene Systeme verwendet. Das erste beruhte auf dem Plasmid pHL6 von Lerch (1989) und Lerch *et al.* (1989), das andere auf Phasmiden, die auch als Varianten zur Verfügung standen (Feil, 1992).

2.3.1 Plasmidsystem

Das Plasmid pHL6 ist ein Plasmid mittlerer Kopienzahl (ORI und *rop* von ColE1), besitzt das *bla*-Gen für Ampizillinresistenz und das Gen für die thermosensitive Variante des λ Repressors *cI857*. Außerdem trägt es das *L-HicDH*-Gen unter der Kontrolle der λ Promotoren P_R und P_L. Daher ist das *L-HicDH*-Gen bei Temperaturen unter 30°C abgeschaltet, während eine Temperaturerhöhung auf 42°C die Expression bewirkt.

Die gesamte Anzucht der Bakterien erfolgte bei 30°C. Je 500 μ L einer Übernachtskultur von *E. coli* TG1 mit dem Plasmid pHL6 wurden in 250 mL SR-Medium mit Ampicillin inkubiert. Zwei dieser Kulturen wurden in 2L-Kolben geschüttelt, bis sie eine OD₆₀₀ von 0.8–0.9 erreichten (Dauer etwa 7 Stunden). Die Bakterien wurden daraufhin 4 h lang bei 42°C geschüttelt. Während dieser Proteinexpression wuchsen sie bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 5. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und das Naßgewicht bestimmt. Sie wurden in der gleichen Menge 100 mM KP_i, pH 7.0, mit *complete* Proteaseinhibitor suspensiert und bei –20°C eingefroren.

2.3.2 Phasmidsystem

Das Phasmidsystem war komplizierter als das Plasmidsystem und wurde von Feil (1992) ausführlich beschrieben. In Kürze: Es beruhte darauf, daß M13-Phagen hergestellt wurden, die in ihrem Genom das *L-HicDH*-Gen trugen. Bakterien, die mit diesen Phagen infiziert wurden, erhielten das Gen und produzierten L-HicDH. Da sich das

Gen für Chloramphenicol-Resistenz gleichfalls auf dem Vektor befand, wurde mit diesem Antibiotikum das Wachstum von nicht-infizierten Bakterien gehemmt.

Die Produktion der Phagen, sowie die Anzucht und Infektion der Bakterien ist von Feil (1992) genau beschrieben worden und wurde unverändert übernommen. Die Phasmide wurden mit Helferphagen in *E. coli* JM103 produziert. Die Proteinexpression erfolgte in einer 500 mL SR-Kultur *E. coli* XL1-Blue bei einer OD₆₀₀ von 1.0. Eine Stunde nach Zugabe der Phagen wurde der Bakterienkultur Chloramphenicol (25 µg/mL Kultur) zugegeben. Die OD₆₀₀ betrug zu diesem Zeitpunkt 3.5. Nach weiteren 14.5 h Inkubation hatten die Bakterien eine OD₆₀₀ von 9.5, wurden abzentrifugiert und bei -70°C eingefroren.

2.4 Proteinreinigung

Als Proteaseinhibitor wurde der *complete* Cocktail von Roche nach Angaben des Herstellers verwendet.

Zentrifugiert wurde in den Sorvall-Zentrifugen RC3 B Plus und RC5 B Plus mit den Rotoren H-6000A bzw. SS-34.

Das Protein wurde mit FPLC-Geräten und Säulen von Amersham Pharmacia Biotech (Pharmacia), Freiburg, chromatographisch aufgetrennt. Für die Steuerung der Anlagen und die Auswertung der Chromatogramme wurde das Softwarepaket FPLCDIRECTOR von Pharmacia verwendet. Die Säulen waren im einzelnen:

- Phenylsepharose CL-4B gepackt in einer XK50-Leersäule mit einem Innendurchmesser von 50 mm und einem Volumen von 200 mL zur hydrophoben Interaktionschromatographie.
- MonoQ HR 10/10, 8 mL Säulenvolumen, Anionenaustauschchromatographie.
- MonoQ HR 5/5, 1 mL, zum Aufkonzentrieren durch Laden und Stoßelution.
- ResourceQ 1 mL, zur Aufkonzentrierung.
- HiPrep Sepharose S-300 High Resolution 16/60, 120 mL Säulenvolumen, zur Gelfiltration.
- Superdex 200 PrepGrade, 124 mL Volumen, gepackt in einer XK16-Säule, zur Gelfiltration, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Michael Massow,

Abt. Prof. Dr. Krämer, Institut für Biochemie der Universität zu Köln.

- HiPrep Superdex G25 fine 26/10 Desalting-Säule, 15 mL Volumen, zum Entsalzen.

Der verwendete Dialyseschlauch hatte eine Ausschlußgrenze von 12–14000 Dalton und stammte von der Firma Medicell International, London, UK. Er wurde vor Gebrauch 30 Minuten lang in 10 mM NaHCO₃, 1 mM EDTA gekocht und anschließend mit Reinstwasser ausgewaschen. Bei Bedarf wurde er bei 4°C in 0.02 % NaN₃, 1 mM EDTA gelagert.

Das Protein wurde mit 15 mL Amicon Centriplus Concentrator-Ultrafiltrationsröhrchen der Firma Millipore, Bedford, MA, USA, aufkonzentriert und umgepuffert. Die Membran dieser Röhrchen hat eine Ausschlußgrenze von 10 kDa.

Die durchgeführte Proteinreinigung war eine Anpassung des Reinigungsprotokolls, das von Schütte *et al.* (1984), Lerch (1989), Feil (1992), Niefind (1993) und Feil *et al.* (1994) entwickelt worden ist. Die wichtigsten Änderungen waren:

- Die Bakterien wurden mit einer French Press aufgebrochen.
- Die Dialyse vor der hydrophoben Interaktionschromatographie wurde umgangen.
- Die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde mit einer Phenylsepharosesäule statt einer Sepharose 4B-Säule durchgeführt. Das Protein wurde mit Wasser von der Säule eluiert.
- Nach dem Aufbrechen der Bakterien wurde das Protein nie wieder eingefroren.

2.4.1 Protein aus dem Plasmidsystem

Die Bakterien wurden in einem 20°C warmen Wasserbad unter Schwenken aufgetaut und in allen folgenden Schritten, auch bei der Zentrifugation, auf 4°C oder Eis gehalten. Die Bakterien wurden mit zwei Passagen in einer vorgekühlten French Press von SLM Aminco (bezogen über Sopra, Büttelborn) bei einer Druckdifferenz von ca. 100 MPa aufgebrochen. Die Bakterientrümmen wurden abzentrifugiert (5 Minuten bei 50 000 g).

Der Überstand (Rohfraktion) wurde durch langsames Zutropfen des doppelten Volumens 55%igem Ammoniumsulfat, 50 mM KP_i , pH 7.5 und anschließender Zentrifugation (20 Minuten, 50 000 g) von ersten Fremdproteinen getrennt (Aussalzung) und für die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) vorbereitet.

Dazu wurde die Phenylsepharose-Säule mit Puffer B (35 % Ammoniumsulfat in Puffer A, siehe unten) äquilibriert und mit dem Überstand der Ammoniumsulfat-Fällung beladen. Zuerst wurde die Säule mit 3 Säulenvolumen Puffer B gewaschen, dann folgte ein Gradient zu 100 % Puffer A (50 mM KP_i , pH 7.5, 1 mM DTT) über 4 Säulenvolumen. Danach wurde mit weiteren 3 Volumen Puffer A sämtliches Fremdprotein von der Säule gewaschen. Das Protein wurde mit einer Stoßelution mit 1 mM DTT in Wasser eluiert und in Fraktionen zu 10 mL aufgefangen. Zur Stabilisierung des Proteins wurde in jedes Fraktionsröhrchen 500 μ L 1M KP_i , pH 7.5, vorgelegt. Die Fraktionen mit aktivem Protein wurden vereinigt und gegen 50 mM NaCl dialysiert. Nach der Dialyse wurde unlösliches Protein abzentrifugiert.

Der nächste Trennungsschritt war eine Anionenaustausch-Chromatographie (IEX) mit einer MonoQ Säule (8 mL). Die Säule wurde mit Puffer C (50 mM NaCl, 50 mM Imidazol/HCl, 1 mM DTT, pH 7.0) äquilibriert und mit dem Dialysat beladen. Die Trennung erfolgte durch einen Gradienten von 10 bis 70 % Puffer D (wie Puffer C, mit 1 M NaCl). Die jeweilige Reinheit der Fraktionen mit aktivem Protein wurde durch SDS-PAGE überprüft. Die Fraktionen mit aktivem und möglichst homogenem Protein wurden vereinigt.

Das Protein wurde mit Wasser von 50 auf 150 mL verdünnt und anschließend mit einer 1 mL MonoQ-Säule aufkonzentriert. Dazu wurden die Puffer C und D verwendet, jeweils 38 mL Protein auf die Säule geladen und in einem Stoß eluiert. Nur die Proteinpeaks wurden aufgefangen und vereinigt. Das Volumen betrug danach 5 mL.

Die weitere Aufreinigung geschah durch eine Gelfiltration mit einer HiPrep 16/60 Sephacryl S300-Säule. Verwendet wurde Puffer E (150 mM NaCl, 50 mM Imidazol/HCl, 5 mM NaN_3 , 1 mM DTT, pH 7.0).

Das erhaltene Protein (16 mL) mit den geringsten Unreinheiten wurde in einem Centriplus-Ultrafiltrationsröhrchen aufkonzentriert und mit Puffer F (50 mM Imidazol/HCl, 5 mM NaN_3 , 1 mM DTT, pH 7.0) umgepuffert, bis die NaCl-Konzentration kleiner als 0.5 mM war. Die Proteinkonzentration überschritt dabei zeitweise 100 mg/mL. Das Protein wurde bei einer Konzentration von 48.5 mg/mL bei 0–4°C aufbewahrt.

2.4.2 Protein aus dem Phasmidsystem

Die Bakterienpellets wurden im Wasserbad aufgetaut und mit dem gleichen Volumen 100 mM KP_i , pH 7.0 versetzt. Die weitere Reinigung erfolgte genau der Reinigung von L-HicDH aus plasmidtragenden Bakterien (siehe Abschnitt 2.4.1). Für die Gelfiltration wurde eine Superdex 200 PrepGrade-Säule verwendet.

2.5 Proteinanalytik

2.5.1 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen wurden freundlicherweise von Dr. Guido Sonsmann und Sabine Lohmer mit einem MALDI-MS Biflex III (TOF) der Firma Bruker, Bremen durchgeführt.

2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Kit der Firma BioRad, München, nach der Beschreibung des Herstellers bestimmt (Bradford, 1976). Das Protein wurde auf eine Konzentration von unter $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ gebracht. $10 \mu\text{L}$ dieser Verdünnung wurden mit $790 \mu\text{L}$ Wasser vermischt, mit $200 \mu\text{L}$ Bradford Reagenz versetzt und sofort durch Umschwenken vermischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ gemessen. Für den Nullwert wurde statt der Proteinprobe Puffer verwendet.

Parallel zu jeder Bestimmung wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) als Referenzprotein durchgeführt. Um Störungen durch Substanzen aus dem Proben- bzw. Verdünnungspuffer zu vermeiden, wurden $10 \mu\text{L}$ BSA (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 und $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ in Wasser) mit $10 \mu\text{L}$ des jeweiligen Puffers und $780 \mu\text{L}$ Wasser versetzt. Die Referenzmessungen wurden mit Proben aus zwei unabhängigen Verdünnungsreihen bestimmt.

2.5.3 Bestimmung der Enzymaktivität

Der Aktivitätstest folgt dem Ansatz von Schütte *et al.* (1984), Feil (1992) und Niefind (1993). Allerdings wurde die Aktivität nicht bei 0.24 mM NADH, sondern bei 0.2 mM

NADH gemessen. Eine Enzymeinheit (1 u, *unit*) ist die L-HicDH-Menge, die bei 30°C 1 μmol NADH pro Minute unter Verbrauch von 1 μmol 2-Oxoisocaproat umsetzt (Schütte *et al.*, 1984).

Der Testansatz bestand aus 1 mL 100 mM KPi , pH 7.0, 40 μL 2-Oxoisocaproat (3.6 mg/mL in Wasser), 15 μL NADH (10 mg/mL in Wasser) und 20 μL Enzymlösung. Die Reaktion wurde durch Zugabe und Verquirlen der Enzymlösung gestartet. Die Extinktionsabnahme bei 340 nm und damit der Umsatz von NADH zu NAD^+ wurde mit einem Ultrospec 2000 Spektralphotometer von Pharmacia verfolgt. Die Quarzküvette wurde durch die Temperatur Control Unit von Pharmacia auf 30°C temperiert. Ab 10 Sekunden nach dem Start wurden automatisch 10 OD_{340} -Messungen im Abstand von 2 Sekunden vorgenommen. Die Daten wurden mit dem Programmpaket SWIFT (Pharmacia) ausgewertet. Alle Messungen wurden 3 Mal mit unabhängigen Verdünnungen durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

Die Enzymlösung wurde mit Verdünnungspuffer (10 mg/mL BSA, 100 mM KPi , pH 7.0) so verdünnt, daß die Extinktionsabnahme 0.1–0.15 OD_{340} pro Minute betrug.

Aus dem Lambert-Beerschen Gesetz ergibt sich die Konzentrationsabnahme Δc in u/mL. Sie ist mit $\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$, der Extinktionsabnahme ΔE , dem Verdünnungsfaktor F , dem Ansatzvolumen ohne Probe in μL $A = 1055 \mu\text{L}$ und dem Volumen der Probe in μL $V = 20 \mu\text{L}$:

$$\Delta c = \frac{\Delta E \times F \times (A + V)}{6.22 \times V} \quad (2.1)$$

2.5.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für die Gelelektrophorese wurden PhastGel Gradient 8–25 %-Gele und SDS-Pufferstreifen in einem Phast-Elektrophoresesystem (Pharmacia) verwendet. Die Trennung wurde nach dem Pharmacia *Separation Technique File No. 110* durchgeführt. Anschließend wurden die Gele nach dem Pharmacia *Development Technique File No. 110* mit Silber gefärbt und an der Luft getrocknet. Als Größenmarker wurde die Proteinstandardmischung IV von Pharmacia verwendet, die eine Leiter von 78, 66.25, 42.7, 30 (Doppelbande), 17 und 12.3 kDa bildet.

2.6 Proteinkristallisation

Markröhrchen mit einem Durchmesser von 0.1 bis 1 mm wurden von der Firma Hilgenfeld, Malsfeld bezogen. Alle anderen Werkzeuge für den Umgang mit Kristallen stammten von Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA.

Für die Dokumentation der Experimente wurden die Anfangs- und nicht die Endbedingungen der Äquilibration festgehalten. Während die Protein- und Salzkonzentrationen zur Zeit der Kristallernte nur durch zum Teil aufwendige Analytik bestimmbar gewesen wären, waren die Anfangsbedingungen dadurch bekannt, daß der pH und die Konzentration der verwendeten Lösungen eingestellt wurden. Zudem ermöglichte die Kenntnis der Anfangsbedingungen die Reproduktion des Experimentes.

Die Kristallisation erfolgte in Linbro-Platten (ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA), die 24 Vertiefungen (*wells*) à ca. 3.5 mL in 4 Reihen (A–D) bzw. 6 Spalten (1–6) haben. Die Reservoirlösungen wurden so gewählt, daß in den Reihen der pH-Wert und in den Spalten die Fällungsmittelkonzentration variiert wurden. Dabei wurde darauf verzichtet, pH und Konzentrationen aller 24 Lösungen zu bestimmen. Statt dessen wurden die vier Ecklösungen für die Vertiefungen A1, A6, D1 und D6 eingestellt und für die restlichen Vertiefungen so gemischt, daß sich rechnerisch gleichmäßige Gradienten in pH und Konzentration ergaben. Vereinfachend wurde ein lineares Verhältnis zwischen den Pufferkonzentrationen und dem pH-Wert angenommen. Um allzu große Abweichungen zwischen rechnerischem und tatsächlichem pH in den Lösungen zu vermeiden, wurden nur Ecklösungen verwendet, die sich weniger als 0.9 pH-Differenzen unterschieden.

Die Kristallisationsansätze wurden mit der Hand angesetzt. Bei den Mischungen der Reservoirlösungen aus den Ecklösungen wurde auch ein Pipettierroboter (Multi-probe 104 von Packard, Meriden, CT, USA) verwendet. Die Vertiefungen wurden mit 800–1 000 μL Reservoirlösung gefüllt, danach wurden die Kristallisationstropfen aus der Proteinlösung, den Additiven und dem Reservoir in dieser Reihenfolge angesetzt.

Hängende Tropfen (*hanging drops*) wurden auf gespülten und siliconisierten (Serva 35 130) Deckgläschen angesetzt und mit mittelviskoser Baysilone-Paste von Bayer, Leverkusen, abgedichtet. Sitzende Tropfen wurden auf Brücken (*microbridges*) aufgetragen und mit Crystal Clear Sealing Tape abgeklebt (beides von Hampton Research).

Vor der Kristallisation wurde das Protein mit Puffer F (50 mM Imidazol/HCl,

5 mM NaN_3 , 1 mM DTT, pH 7.0) auf eine Konzentration von 7.8–12 mg/mL verdünnt und mit 0.2 μm -Celluloseacetatfiltern (Nalgene 171-0020, Rochester, NY, USA) filtriert.

Die Tropfen wurden mit einem Stemi 2000-C Binokular von Zeiss, Jena, durchmustert und mit einer Spiegelreflexkamera EOS 500N von Canon, Tokyo, Japan, fotografiert. Die Größe der Kristalle wurde im Vergleich zu einem Spatel mit $1/10$ mm-Skalierung (Hampton Research) abgeschätzt.

2.7 Diffraktionsmessungen

Für erste Röntgenbeugungsexperimente wurden zwei Meßplätze im Haus verwendet, deren Ausstattung in der Tabelle 2.1 aufgeführt ist. Beide Drehanoden produzierten Cu $K\alpha$ -Röntgenstrahlung ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$).

Tabelle 2.1: Die Ausstattung der heimischen Röntgenmeßplätze.

Gerät	Hersteller
1 Drehanode FR 591	Nonius, Delft, Niederlande
Monochromator MAC-XOS	MAC Science, Yokohama, Japan
Flächenzähler DIP-2030H	MAC Science, Yokohama, Japan
2 Drehanode Rotaflex RU-200 B	Rigaku, Düsseldorf
Monochromator CMF12-38Cu6	Osmic, Northwood, USA
Flächenzähler MAR 345	MAR Research, Hamburg

Diffraktionsmessungen mit Synchrotronstrahlung wurden an den EMBL-*beamlines* BW7A und BW7B am DORIS Speicherring, DESY, Hamburg, durchgeführt. Der BW7A-Meßplatz war mit einem MAR CCD-Detektor mit 165 mm Durchmesser ausgestattet, während der BW7B-Meßplatz mit einem MAR 345-Flächenzähler ausgerüstet war.

Die *beamlines* unterscheiden sich hauptsächlich dadurch, daß die Wellenlänge des Strahls der BW7A durchstimbar war, während die BW7B eine feste Wellenlänge von 0.8424 \AA hatte. Der Strahl der BW7B war etwa doppelt so intensiv wie der BW7A.

Sowohl die heimischen Röntgenanlagen als auch die Meßplätze am EMBL wa-

ren mit Cryostream Cooler 600 Cryoanlagen von Oxford Cryosystems, Oxford, UK, ausgestattet. Alle Cryomessungen wurden bei 100 K ausgeführt.

2.8 Strukturlösung

Alle Datensätze wurden mit SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) skaliert. SCALEPACK2MTZ und TRUNCATE (French & Wilson, 1978) dienten dazu, die Amplituden der Strukturfaktoren zu gewinnen. Die dabei erstellten Statistikanalysen der Intensitäten ergaben den anhand der Beugungsdaten berechneten *B*-Faktor (aus dem Wilson-Plot) sowie Hinweise auf eine Verzwilligung (u. a. in dem *N*(*Z*)-Plot). Danach wurden die Daten mit CAD sortiert.

Bei Bedarf wurden mit AMORE (Navaza, 1994) Rechnungen für den molekularen Ersatz durchgeführt. Außerdem wurde mit MTZ2VARIOUS ein Datensatz im XPLOR/CNS-Format erstellt. Dieser wurde dem Zwillingstest (Yeates, 1997) unterzogen. Je nach Ergebnis dieses Tests wurde die Struktur mit CNS (Brünger *et al.*, 1998) oder SHELXL (Sheldrick & Schneider, 1997) verfeinert: Bei keiner oder einer perfekten Verzwilligung wurde CNS verwendet. Bei einem detektierbaren Zwillingsanteil von 1–45 % wurde SHELXL benutzt, da dieses Programm den Zwillingsanteil als eigenen Parameter verfeinerte.

Bei CNS wurde der Verfeinerungsalgorithmus "*maximum likelihood conjugate gradient*" für unverzwilligte und "*least square gradient*" für verzwilligte Strukturen verwendet. Bei SHELXL wurde mit dem Algorithmus "*conjugate gradient least-square*" (Instruktion CGLS) gerechnet.

2–5 % der Reflexe (bei der Verwendung von CNS höchstens 1 500 Reflexe) wurden zufällig ausgewählt, für die Berechnung des freien *R*-Wertes markiert und nicht zur Verfeinerung verwendet. Bei Zwillingskristallen befanden sich die freien Reflexe in dünnen Schalen (*thin shells*). Bei einer Verfeinerung mit SHELXL war eine ausreichend große Anzahl der freien Reflexe besonders wichtig, um anhand der Entwicklung des freien *R*-Wertes die Verfeinerungsbedingungen einzustellen, also etwa die Stärke der Zwänge oder Einschränkungen und die Vollständigkeit des Modells und die Anzahl der Wasser. Um die statistischen Schwankungen des freien *R*-Wertes zu minimieren, wurden für SHELXL mit 5 % vergleichsweise viele Reflexe von der Minimierung ausgeschlossen.

Die Modelle wurden in mehreren Runden gebaut und verfeinert. Für den manuellen Modellbau wurden die Programme O (Jones *et al.*, 1991) und XTALVIEW (McRee, 1993) verwendet, dabei wurden Loops mit BRAGI (Schomburg & Reichelt, 1988) vorhergesagt und eingebaut. Die Modelle wurden ständig durch PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft. Wasser wurde automatisch mit CNS bzw. SHELXWAT und manuell mit O und XTALVIEW eingebaut.

Bei der jeweils ersten Verfeinerung wurden über den gesamten Bereich aller vier Monomere NCS-Einschränkungen (*restraints*) vorgegeben. In den weiteren Verfeinerungs-/Modellbau-Zyklen wurden die Einschränkungen überprüft und gegebenenfalls aufgegeben, wenn die Elektronendichten dies erforderlich machten. Dabei wurden möglichst die NCS-Einschränkungen zwischen den beiden offenen bzw. geschlossenen Untereinheiten erhalten. Bei der Verwendung von CNS wurden die Verfeinerungsrechnungen, die sich an einen größeren Modellbau anschlossen, mit einem *simulated annealing* begonnen (mit den Optionen *cartesian*, *slowcool* und *temperature* = 2500). Es wurden durchgehend starke NCS-Einschränkungen verwendet (*weight* = 300, *sigb* = 2 bei CNS, SIMU 0.04 bei SHELXL).

Die Qualitätskriterien der Strukturen wurden mit CNS oder SHELXPRO (im SHELX-97-Paket) durchgeführt. Zum Schluß wurde mit SHELXL eine Rechnung gegen alle Reflexe durchgeführt, die die vollständige, umkehrbare Matrix (*least-squares*, Instruktion L.S.) berechnete, aber das Modell nicht mehr veränderte. Dabei wurden keine Einschränkungen (*restraints*) vorgegeben. Um den Arbeitsspeicher-Bedarf der Rechnung nicht zu groß werden zu lassen, wurde sie in 29 Blöcken (Instruktion BLOC) ausgeführt. Aus dem Ergebnis konnten Abschätzungen zu den Standard-Unsicherheiten (S.U.) gemacht werden.

Zur zusätzlichen Überprüfung der Modelle wurden PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), MOLEMAN2 (Kleywegt & Jones, 1996) und WHATIF (Vriend, 1990) verwendet.

2.8.1 Geometrievorgaben für die Verfeinerung

Zur Erstellung der idealen Geometrieparameter eines organischen nicht-Protein-Moleküls wurde die jeweilige Struktur aus der Cambridge Structural Database (CSDS; Allen & Kennard, 1993) verwendet. Sie mußte bei Bedarf auf das gesuchte Molekül gestutzt werden. Alternativ wurde die Struktur mit HYPERCHEM (Hypercube, Gai-

nesville, FL, USA) semiempirisch oder *ab initio* berechnet. Aus der erhaltenen Struktur wurde auf dem HICUP-Server (Kleywegt & Jones, 1998) Topologie- und Parameterdateien für CNS erstellt. Die entsprechenden geometrischen Vorgaben für SHELXL wurden mit SHELXPRO generiert.

2.8.2 Numerierung der Aminosäuren

Wie in der Einleitung erwähnt, werden in dieser Arbeit die Aminosäuren der L-Hic-DH ausschließlich in der von Niefind *et al.* (1995) vorgeschlagenen Weise bezeichnet. Sie werden von Ala21 an strikt sequentiell durchnummeriert.

Bei der Verfeinerung mit SHELXL wurden die Untereinheiten nicht mit A, B, C und D bezeichnet. Statt dessen wurden zu den Nummern der Aminosäuren 1000, 2000, 3000 bzw. 4000 addiert, so daß die Aminosäuren 21–329 der Untereinheit A mit 1021–1329 bezeichnet werden. Entsprechend sind die Aminosäuren der Untereinheit B ab 2021 numeriert, C ab 3021 und D ab 4021.

2.8.3 Bestimmung der Kontaktflächen

Die vom Wasser erreichbare Oberfläche A der Proteine wurde mit dem Programm AREAIMOL (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) berechnet. Als Vergleich dient die Oberfläche, die dem Lösungsmittel zur Verfügung steht, wenn sämtliche Monomere dissoziiert sind ($A_{\Sigma M}$). Die Differenz zu der Oberfläche des Tetramers A_T ist die Kontaktfläche ΔA_T . Entsprechend ergibt sich die Größe der Kristallkontakte ΔA_K aus:

$$\Delta A_K = A_T - A_{KT} \quad (2.2)$$

Dabei ist A_{KT} die Oberfläche des Tetramers im Kristallverband. Für einen besseren Vergleich wurden die Flächen auch auf $A_{\Sigma M}$ normiert.

2.9 Weitere Computerprogramme und -programmpakete

2.9.1 Auswertung der Diffraktionsdaten

- HKL: Prozessierung und Auswertung der Diffraktionsdaten (Version 1.96, Otwinowski & Minor, 1997).

- PrOW: Dekonvolution überlappender Reflexe (Bourgeois, 1999).
- PREDICT: Planung der Meßstrategie, Laboratory of Molecular Biophysics, Oxford, UK (<http://biop.ox.ac.uk/www/distrib/predict.html>).
- CCP4: Für die meisten proteinkristallographischen Aufgaben (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).

2.9.2 Datenbanken

- BEILSTEIN COMMANDER: MDL Information Systems, Frankfurt.
- BRENDA: Schomburg & Stephan (1998).
- GCG: Sequenzalignments, u. a. zur Darstellung der Vollständigkeit der Modelle, sowie weiterer Sequenzanalysen, Accelrys, Cambridge, UK.
- HOMSTRAD: Mizuguchi *et al.* (1998).
- INTERPRO: Apweiler *et al.* (2001).
- PDB: Berman *et al.* (2000).

2.9.3 Abbildungen

- GRASP: Nicholls *et al.* (1991).
- ISIS DRAW: MDL Information Systems, Frankfurt.
- RASTER3D: Merritt & Bacon (1997).
- MOLSCRIPT: Kraulis (1991).
- XTALVIEW: McRee (1993).

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht

Die hier vorgestellte Arbeit umfaßt die gesamte Proteinkristallographie von der Expression des Proteins über die Kristallzucht und die Diffraktionsmessung bis zur Strukturlösung. Die methodische Vorgehensweise war im einzelnen:

1. Expression der L-HicDH aus dem Plasmid- bzw. Phasmid-Expressionssystem
2. Proteinreinigung der L-HicDH
3. Kristallisation und Diffraktionsmessungen von L-HicDH mit unterschiedlichen Fällungsmitteln sowie im Komplex mit Substraten und dem Substratanalogon Oxamat
4. Strukturlösung: Modellbau, Auswertung und Fehleranalyse

Die für diese Arbeit wichtigen konzeptionellen Aspekte der Proteinkristallographie, wie Proteinkristallisation, nichtkristallographische Symmetrie (NCS), Verzwilgung und Modellqualität, werden im Anhang A ausführlich behandelt.

3.2 Expression der L-HicDH

Die Expression von rekombinanter L-HicDH wurde in zwei verschiedenen Systemen vorgenommen: das erste ist das „Plasmidsystem“ nach Lerch (1989) und Lerch *et al.* (1989), das zweite das „Phasmidsystem“ (Feil, 1992).

Die Kultur von Bakterien mit dem Plasmid pHL6 (Plasmidsystem) ergab ein Naßgewicht von 5.8 g Bakterien, während das Phasmidsystem 6 g Bakterien (Naßgewicht) pro Kultur erbrachte. Das Expressionssystem mit Phasmiden wurde verwendet, um zu prüfen, wie gut sich damit Protein produzieren läßt und ob sich dieses Protein für die Kristallisation eignet.

3.3 Proteinreinigung

3.3.1 Protein aus dem Plasmidsystem

Der Rohextrakt aus 5.8 g Bakterien wurde auf eine 37%ige Ammoniumsulfat-Konzentration eingestellt, zentrifugiert und auf eine Phenylsepharose-Säule zur hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) aufgetragen. Bei einer Sepharose 4B-Säule eluiert der L-HicDH-Peak in einem Gradienten zwischen den Puffern B und A (Puffer A: 50 mM KP_i , pH 7.5, 1 mM DTT; Puffer B: 35% Ammoniumsulfat in Puffer A, Schütte *et al.*, 1984) — dort ließ sich jedoch in keiner Fraktion Aktivität nachweisen. Daher wurde mit weiteren 3 Volumen Puffer A sämtliches Fremdprotein von der Säule gewaschen. Eine Stoßelution mit 1 mM DTT (kein Salz oder Puffer, also eigentlich reines Wasser) führte zu einem Peak mit aktivem Protein, von dem 12 Fraktionen vereinigt wurden (siehe Abbildung 3.1).

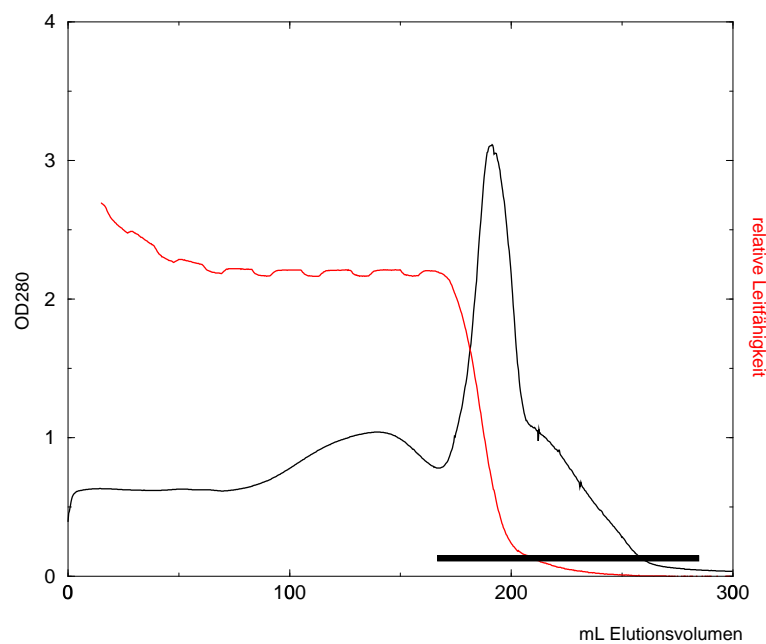


Abbildung 3.1: Chromatogramm der hydrophoben Interaktionschromatographie: Das Protein wurde mit Wasser eluiert. Vor Beginn der Chromatographie wurde die Säule mit Puffer A gewaschen. Schwarze Linie: Absorption bei $\lambda = 280$ nm, rote Linie: relative Leitfähigkeit. Der Proteinpeak eluierte bei der stoßartigen Erniedrigung der Leitfähigkeit. Hier war aktives Protein nachweisbar. Der Bereich der vereinigten Fraktionen ist mit einem schwarzen Balken markiert.

Das Protein wurde gegen 50 mM NaCl dialysiert und in einer Anionenaustausch-Chromatographie (IEX) weiter gereinigt (siehe Abbildung 3.2). Aktives Enzym ließ sich in den Fraktionen mit einem Puffer D-Anteil von 23–40 % D nachweisen (siehe Abschnitt 2.4.1, dies entspricht einer Leitfähigkeit von 17–27 mS/cm). Vereinigt wurden die Fraktionen mit aktivem und in SDS-PAGE möglichst homogen erscheinendem Protein.

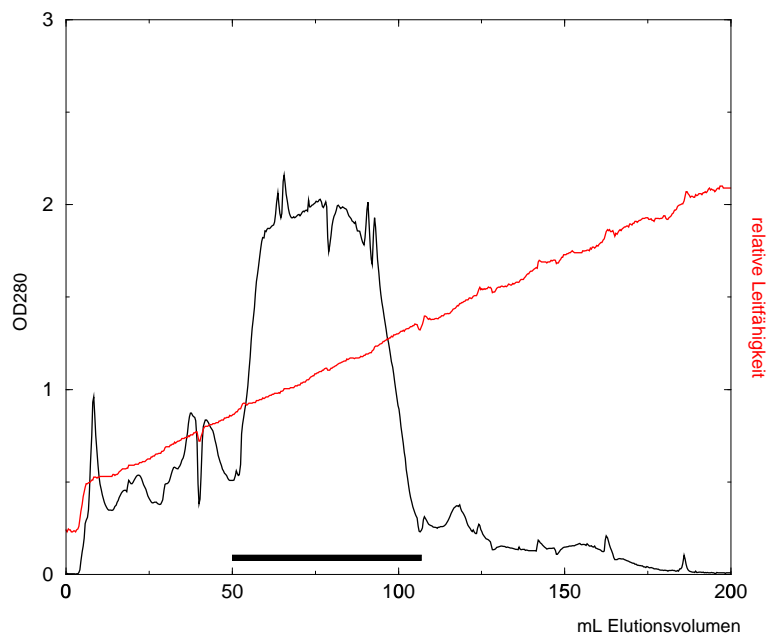


Abbildung 3.2: Anionenaustauschchromatogramm. Schwarze Linie: Absorption bei $\lambda = 280$ nm, rote Linie: relative Leitfähigkeit. Der Bereich der vereinigten Fraktionen aus aktivem Protein ist mit einem schwarzen Balken markiert.

Mit einer 1 mL MonoQ-Säule wurde das Protein aufkonzentriert. Dann wurde es durch eine Gelfiltration bis zur Homogenität gereinigt. Nach dem Lauf wurden die Fraktionen im SDS-Gel auf Fremdproteine überpüft. Diejenigen 16 Fraktionen à 1 mL wurden vereinigt, die im silbergefärbten und überladenen SDS-Gel die geringste Menge an zusätzlichen Banden aufwiesen. Das Chromatogramm ist in Abbildung 3.3 gezeigt.

Aus dieser Aufreinigung wurden 126 mg L-HicDH erhalten. Die Reinigungsbilanz ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Ein silbergefärbtes SDS-Gel, auf dem Proben der einzelnen Schritte aufgetrennt wurden, ist in Abbildung 3.4 gezeigt. Spur 8, die Probe nach der Proteinreinigung, zeigt nur eine einzige Bande. Das Protein war also elek-

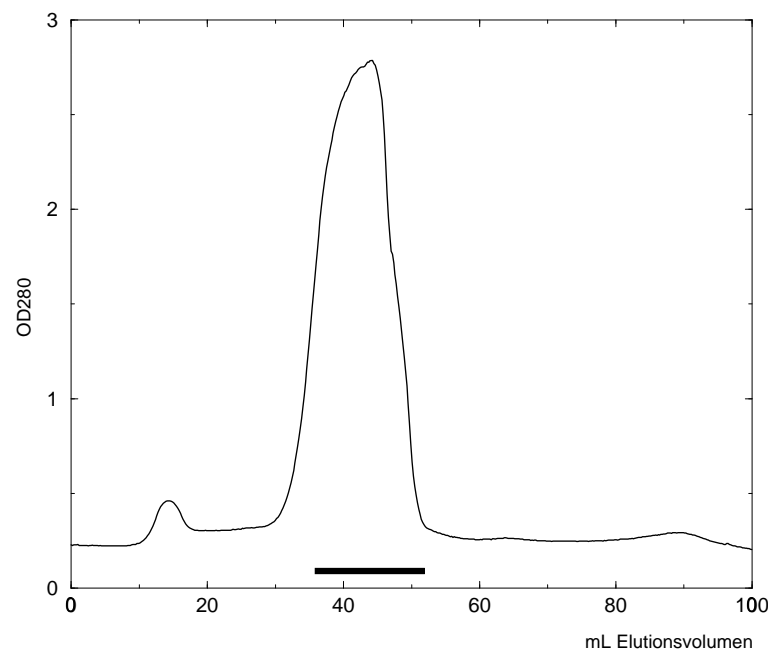


Abbildung 3.3: Gelfiltrationschromatogramm. Absorption bei $\lambda = 280$ nm. Der Bereich der vereinigten Fraktionen ist mit einem schwarzen Balken markiert.

trophoretisch rein.

Ein natives Gel, das mit bis zu $6.4 \mu\text{g}$ Protein pro Spur beladen wurde, zeigt, daß das Protein nahezu homogen war (Abbildung 3.5). Erst das erhebliche Überladen der dünnen und empfindlichen Gele des Phastsystems konnte in Verbindung mit der Sensitivität der Silberfärbung eine Verunreinigung in Form von dünnen Banden sichtbar machen (Spuren 3 und 4 in Abbildung 3.5). Die Menge der nicht-homogenen Proteine in der Spur 4 ließ sich anhand von Vergleichen mit anderen Gelen auf 100 ng schätzen, betrug also ungefähr 2 % des gesamten Proteins. Entsprechend war das L-HicDH-Protein zu etwa 98 % homogen.

Ein MALDI-TOF-Massenspektrum (Abbildung 3.6) von dieser Probe zeigt fünf markante Peaks bei 8866.1 Da , 16419.2 Da , 32970.9 Da , 66038.4 Da und 98960.8 Da . Diese fünf MALDI-Peaks stammten alle von dem selben Protein und resultierten aus den unterschiedlichen Ladungs- und Oligomerisierungszuständen: einfache Masse mit einfacher Ladung ($[M + H]^+$) führte zu einem Peak bei 32970.9 Da , entsprechend führten $[M + 3H]^{3+}$ zu einem Peak bei 8866.1 Da , $[M + 2H]^{2+}$ zu 16419.2 Da , $[2M + H]^+$ zu 66038.4 Da und $[3M + H]^+$ zu 98960.8 Da . Andere Peaks, die von einem

Tabelle 3.1: Reinigungsbilanz der L-HicDH-Reinigung.

Reinigungs- schritt	Volumen [mL]	Proteinkonzen- tration [mg/mL]	Gesamtpro- tein [mg]
Rohfraktion	9	41.5	374
Aussalzung	27	11.9	321
HIC	132	1.31	173
Dialyse	146	1.35	197
IEX	150	1.15	173
Gelfiltration	16	8.0	128
Ultrafiltration	2.6	48.5	126

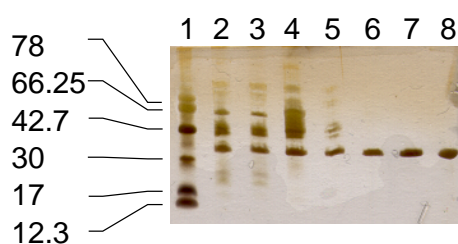


Abbildung 3.4: Silbergefärbtes SDS-Gel, das den Verlauf der Proteinreinigung zeigt. Aufgetragen sind jeweils $0.2 \mu\text{g}$ Protein. Spur 1: Marker-Proteine ($0.1 \mu\text{g}$), Spur 2: Rohfraktion, Spur 3: Aussalzung, Spur 4: HIC, Spur 5: Dialyse, Spur 6: IEX, Spur 7: Gelfiltration, Spur 8: Ultrafiltration. Links neben dem Gel sind die Größen der Markerproteine in kDa angegeben.

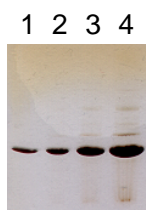


Abbildung 3.5: Silbergefärbtes natives Gel. Aufgetragen sind verschiedene Mengen des gereinigten Proteins (nach der Ultrafiltration). Spur 1: $0.8 \mu\text{g}$, Spur 2: $1.6 \mu\text{g}$, Spur 3: $3.2 \mu\text{g}$, Spur 4: $6.4 \mu\text{g}$ Protein. Dünne Banden, die auf Verunreinigungen hindeuten, sind erst ab Spur 3 zu erkennen.

kontaminierenden Protein stammen könnten, sind nicht zu erkennen (Abbildung 3.6).

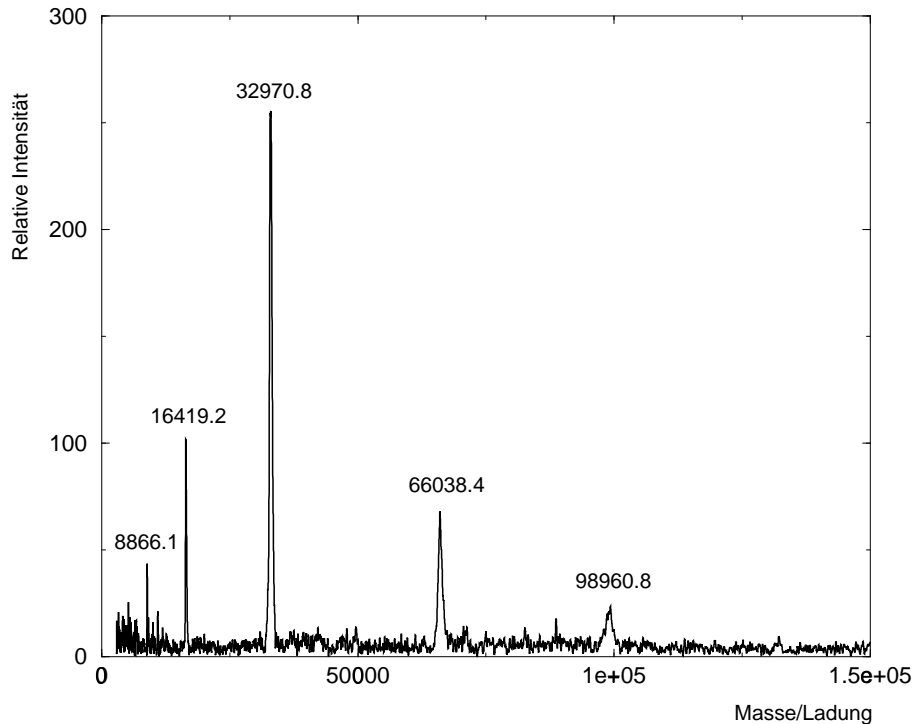


Abbildung 3.6: MALDI-TOF-Spektrum des gereinigten L-HicDH-Proteins. Das Spektrum wurde auf eine gemeinsame Basislinie korrigiert.

Nach der differentiellen Aussalzung des Rohextrakts sowie mit der gereinigten Charge („Ultrafiltration“) wurden Aktivitätstests durchgeführt, deren Resultate Tabelle 3.2 zeigt. Dabei wurde eine maximal mögliche spezifische Aktivität von 650 u/mg angenommen (Lerch, 1989).

3.3.2 Protein aus dem Phasmidsystem

Insgesamt 18 g (Naßgewicht) Bakterien wurden zur Proteinreinigung verwendet, die analog zur oben beschriebenen Methode durchgeführt wurde. Abbildung 3.7 zeigt das Chromatogramm des letzten Reinigungsschrittes, der Gelfiltration.

Die Fraktionen des Haupt-Peaks wurden mit SDS-PAGE auf Reinheit überprüft. Zusätzlich wurden Aktivitätstests durchgeführt. Daraufhin wurden neun Fraktionen (11.7 mL, siehe Abbildung 3.7) vereinigt. Sie wurden mit einer ResourceQ-Säule durch

Tabelle 3.2: Aktivitätsbilanz der L-HicDH-Reinigung.

	Aussalzung	Ultrafiltration
Volumen [mL]	27	2.6
Volumenaktivität [u/mL]	6510	2.24×10^4
Proteinkonzentration [mg/mL]	11.9	48.5
Gesamtprotein [mg]	321	126
Gesamtaktivität [u]	1.8×10^5	58200
Gesamtes aktives Protein [mg]	280	89.6
Ausbeute [%]	100	32
spezifische Aktivität [u/mg]	547	460
Reinigungsfaktor	1	0.84

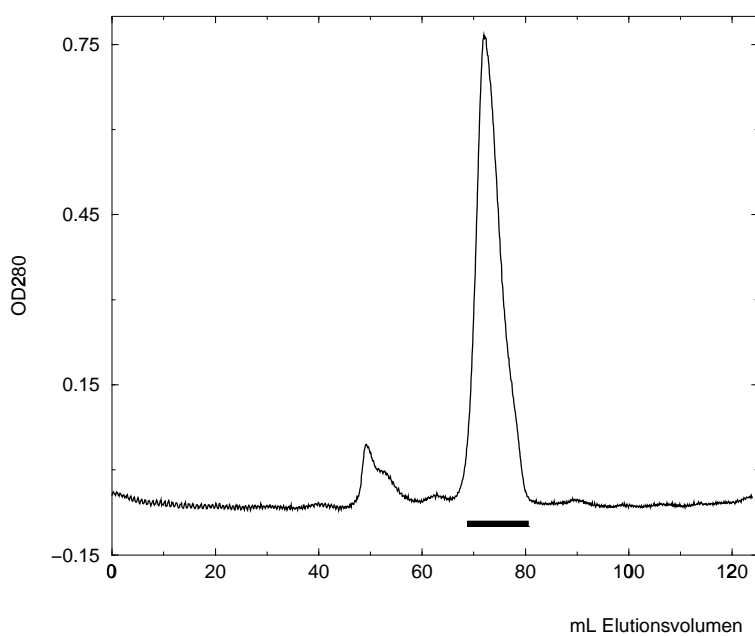


Abbildung 3.7: Chromatogramm der Gelfiltration als letztem Schritt der Reinigung von L-HicDH aus dem Phasmid-Expressionssystem. Die vereinigten Fraktionen sind mit einem schwarzen Balken markiert.

Stoßelution aufkonzentriert, mit einer HiPrep Superdex G25 fine 26/10-Säule umgepuffert und mit Centriplus-Ultrafiltrationsröhrchen aufkonzentriert. Dieser Weg war bedeutend schneller als ein Umpuffern durch Ultrafiltration. Es ergaben sich 18 mg Protein, das in einem MALDI-TOF-Spektrum rein erschien (siehe Abbildung 3.8).

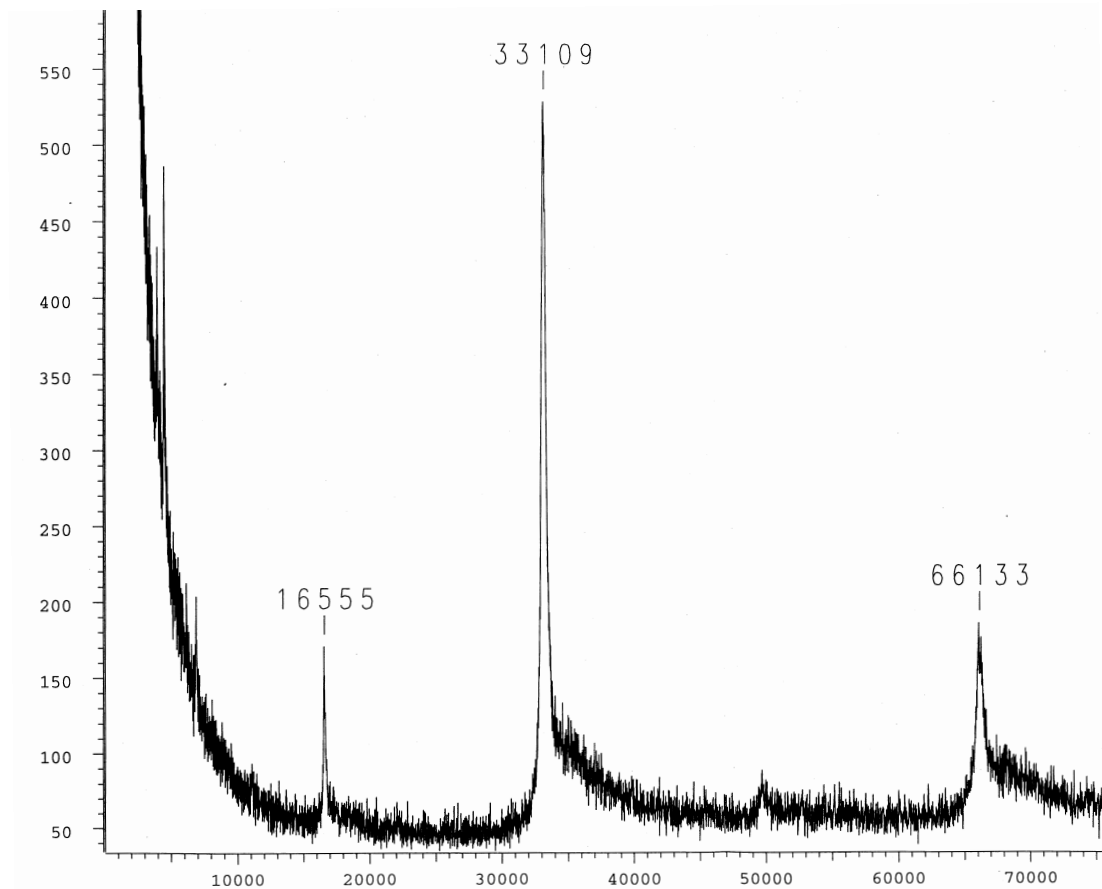


Abbildung 3.8: MALDI-TOF-Spektrum des gereinigten L-HicDH-Proteins aus dem Phasmid-Expressionssystem. Die Peaks lassen sich alle durch das Vorliegen eines Proteins mit 33109 Da Molekulargewicht erklären: $[M + 2H]^{2+}$ führte zu 16555 Da, $[M + H]^+$ zu 33109 Da und $[2M + H]^+$ zu 66133 Da. Im Unterschied zu Abbildung 3.6 wurde hier keine Basislinienkorrektur durchgeführt.

3.4 Kristallographie: Übersicht

In dieser Arbeit wurden einige L-HicDH-Kristalle gezüchtet, von denen ein Teil für Diffraktionsexperimente eingesetzt wurden. Bei einer ausreichenden Streufähigkeit der Kristalle wurden die Strukturen gelöst und verfeinert. Die folgende Liste gibt eine Übersicht über die untersuchten Kristalle:

- **Apoenzym:** L-HicDH wurde mit MPD als Apoenzym (kein NAD^+ , kein Substrat) kristallisiert. Die Kristalle wuchsen in der Form 5 (Niefind, 1993). Sie hatten nur eine geringe Streufähigkeit, so daß keine Struktur gelöst werden konnte (siehe Abschnitt 3.5f).
- **Binärer Komplex:** Der binäre Komplex aus L-HicDH und NAD^+ wurde mit Ammoniumsulfat als Fällungsmittel kristallisiert und unter Cryobedingungen vermessen.¹ Die maximale Auflösung betrug 2.7 \AA an einer $\text{CuK}\alpha$ -Drehanode (Abschnitt 3.6.4) und 2.07 \AA bei der Verwendung von Synchrotronstrahlung. Letzterer Datensatz wurde zur Strukturlösung verwendet (Abschnitt 3.8.1).
- **Ternäre Komplexe:** Ausgehend von der Kristallisationsbedingung des binären Komplexes wurden Kristalle gewonnen, die aus den ternären Komplexen aus L-HicDH, NAD^+ und Substrat bzw. Inhibitor bestanden. Die folgenden Kristalle wurden zur Strukturlösung verwendet (in Klammern die maximale Auflösung der Daten, siehe auch Abschnitt 3.7):
 - L-HicDH- NAD^+ -2-Oxocaproat (2.35 \AA)
 - L-HicDH- NAD^+ -2-Oxoisocaproat (2.35 \AA)
 - L-HicDH- NAD^+ -Phenylglyoxylat (2.14 \AA)
 - L-HicDH- NAD^+ -Oxamat (1.99 \AA)

Ferner wurden noch LHicDH- NAD^+ -Substrat Cokristalle mit den folgenden Substraten gewonnen. Diese Kristalle wurden jedoch nicht zur Diffraktionsmessung und Strukturlösung verwendet:

- L-HicDH- NAD^+ -3-Phenylpyruvat
- L-HicDH- NAD^+ -Pyruvat

¹Zur Unterscheidung zu den ternären L-HicDH- NAD^+ -Substrat/Inhibitor Komplexen wird hier der binäre Komplex als „nativer Komplex“ bezeichnet.

Alle Kristallisationsexperimente sind mit L-HicDH-Protein durchgeführt worden, das mit dem Plasmid-Expressionssystem gewonnen wurde. Lediglich die Kristallisation mit Ammoniumsulfat als Fällungsmittel (siehe Abschnitt 3.6) wurde auch mit Protein durchgeführt, das mit dem Phasmidsystem exprimiert wurde. Dieses Protein führte bei äquivalenten Bedingungen zu gleichen Kristallen (siehe Abschnitt 3.6.4).

3.5 Apoenzym-Kristalle der Form 5

3.5.1 Kristallzüchtung mit PEG und MPD als Fällungsmittel

Niefind (1993) hat fünf verschiedene Kristallformen der L-HicDH gefunden, von denen eine zur Strukturlösung verwendet wurde, nämlich die Form 1 (Niefind *et al.*, 1995). In dieser Struktur war jedoch der Coenzym-Loop nicht gut definiert. Da dieser für das Verständnis der Substratbindung wichtig ist und die Möglichkeit bestand, daß er in einer anderen Kristallumgebung geordneter ist, wurde in dieser Arbeit nach neuen Kristallformen gesucht. Es wurden die faktoriellen Tests von Hampton-Research verwendet (*Crystal Screen und Crystal Screen 2*; Jancarik & Kim, 1991; Cudney *et al.*, 1994). Dazu wurden je 3 μL L-HicDH (10 mg/mL) jeweils mit dem gleichen Volumen 30 mM LiNAD und Reservoirlösung in sitzenden Tropfen angesetzt. Kleine, nadel-förmige Kristalle wurden bei folgenden Bedingungen gefunden:

- 10 % Jeffamine M-600, 0.01 M FeCl_3 , 0.1 M Na-Citrat, pH 5.6
- 18 % PEG-8000, 200 mM Ca-Acetat, 100 mM Na-Cacodylat, pH 6.5
- 20 % PEG-8000, 200 mM Mg-Acetat, 100 mM Na-Cacodylat, pH 6.5
- 25 % PEG MME-550, 0.01 M ZnSO_4 , 0.1 M MES, pH 6.5
- 28 % PEG-400, 200 mM CaCl_2 , 100 mM Na-HEPES, pH 7.5
- 30 % PEG-4000, 200 mM Ammoniumacetat, 100 mM Na-Citrat, pH 5.6
- 30 % PEG-4000, 200 mM MgCl_2 , 100 mM Tris/HCl, pH 8.5

Sowohl die Bedingungen als auch das Aussehen der Kristalle erinnerten an die Nadeln und Stäbchen, die Niefind (1993) als Form 5 beschrieben hat (gezüchtet mit 60 % MPD, 50 mM Ammoniumacetat, pH 6.3), die dort aber nicht näher charakterisiert wurden.

Alle Kristalle der Form 5 wurden mit ähnlichen Fällungsmitteln erhalten. Diese Bedingungen waren hydrophober als die der Form 1 (aus 1.5 M Ammoniumsulfat, trigonal $P3_221$, $a = b = 136 \text{ \AA}$, $c = 206 \text{ \AA}$, Niefind, 1993; Niefind *et al.*, 1995). In der Hoffnung, daß die neu gefundenen Fällungsmittel die Konformation des Coenzym-Loops stabilisierten, wurde die Kristallisation mit MPD so verfeinert, daß Einkristalle gewonnen wurden, die zu ersten Röntgendiffraktionsmessungen verwendbar waren. Nach einer Kristallisationszeit von 4 Wochen wurden die Kristalle maximal $0.6 \times 0.4 \times 0.3 \text{ mm}^3$ groß. Die optimierten Bedingungen waren:

- sitzender Tropfen: 3 μL L-HicDH-Lösung (7.8 mg/mL), 3 μL H_2O , und 2 μL Reservoirlösung, überschichtet mit 2 μL Gemisch aus 25 % (v/v) Paraffin und 75 % Silikon. Reservoir: 55 % MPD, 50 mM MES, pH 6.7, Reservoirvolumen: 800 μL . Temperatur: 20°C. *Kein* NAD(H). Abbildung 3.9 links.
- Wie zuvor — Änderungen: pH 6.3 und 12°C. Abbildung 3.9 rechts.

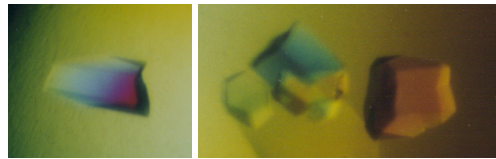


Abbildung 3.9: L-HicDH-Kristalle mit 55 % MPD im Reservoir. Diese Kristalle wurden bis zu $0.6 \times 0.4 \times 0.3 \text{ mm}^3$ groß. Sie sind *ohne* NAD(H) gewachsen und daher Apoenzym-Kristalle. Wachstumstemperatur links: 20°C, rechts: 12°C.

3.5.2 Diffraktionsmessungen mit Kristallen der Form 5

Kristalle der Form 5 wurden am heimischen Meßplatz (Drehanode FR 591 mit Monochromator MAC-XOS) bei Raumtemperatur und unter Cryobedingungen vermessen. Die Raumtemperaturmessung ergab erste Diffraktionsdaten mit Reflexen mit einer maximalen Auflösung von etwa 3 \AA . Die Indizierung zeigte, daß die Kristalle zur primitiv hexagonalen Kristallklasse gehörten, und daß die Achsenlängen der Elementarzelle $a = b = 201.8 \text{ \AA}$, $c = 87.1 \text{ \AA}$ betragen.

Die Mutterlauge war durch ihren hohen MPD-Anteil ein Cryopuffer, d. h. es bildeten sich beim schnellen Abkühlen auf 100 K keine Eiskristalle. Daher waren die

Kristalle direkt ohne Wechseln des Puffers für Cryomessungen geeignet. Allerdings streute der verwendete Kristall schlecht. Er hatte nur wenige Diffraktionsreflexe, die von niedriger Auflösung waren.

Diese ersten Tests zeigten, daß die Apoenzym-Kristalle der Form 5 schlechte Diffraktionseigenschaften hatten und nur bedingt für die Strukturlösung geeignet waren. Da trotz der Variation einer ganzen Reihe von Wachstumsparametern keine besseren Kristalle gefunden werden konnten, wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt. Die variierten Parameter waren: Fällungsmittel- bzw. Proteinkonzentration, Art und pH des Puffers, Temperatur, Äquilibrationsgeschwindigkeit (durch Silikon/Paraffin-Überschichtung) und Zugabe von verschiedenen Additiven.

3.6 Kristalle der Form 1 des binären Komplexes (native L-HicDH-Kristalle)

Obwohl die Struktur der L-HicDH schon von Niefind *et al.* (1995) gelöst worden ist, gab es Gründe, diese Kristalle noch einmal zu züchten und die Struktur zu lösen. Erstens war es hilfreich, eine Kontrolle zu haben, die zeigte, daß die beschriebene Proteinreinigung und Kristallisation reproduzierbar durchgeführt werden konnte. Zweitens ermöglichten die L-HicDH-Kristalle sogenannte *soaking*-Experimente, bei denen die Kristalle in substrathaltigem Cryopuffer getränkt werden. Drittens war es so möglich, die Einflüsse von Cryobedingungen oder Änderungen der Kristallisationsbedingungen zu vergleichen. Viertens bestand die Möglichkeit, daß durch Cryobedingungen oder durch das Verwenden neuer Programme die Strukturlösung verbessert werden könnte.

3.6.1 Ammoniumsulfat als Fällungsmittel

Trigonale Kristalle der Kristallform 1, die Niefind (1993) gefunden hatte, wurden in dieser Arbeit reproduziert. Typische Bedingungen waren: 6 Wochen Kristallisationszeit bei Raumtemperatur; sitzender Tropfen mit 1 mL Reservoirvolumen; Reservoir: 1.7 M Ammoniumsulfat, 50 mM KP_i , pH 6.7. Der Tropfen wurde aus jeweils 5 μ L L-HicDH-Proteinlösung (12 mg/mL), 30 mM LiNAD, 1 % (w/v) Hexantriol und Reservoirlösung angesetzt. Die Kristalle wurden bis ca. $0.4 \times 0.3 \times 0.2 \text{ mm}^3$ groß. Kristalle dieses Typs sind in Abbildung 3.10 gezeigt.

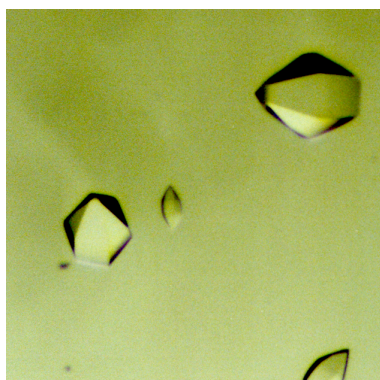


Abbildung 3.10: Trigonale Kristalle der Form 1, gezüchtet mit Ammoniumsulfat als Fällungsmittel.

3.6.2 Künstliche Mutterlauge

Zur Handhabung von Proteinkristallen ist es hilfreich, eine künstliche Mutterlauge zur Verfügung zu haben: also eine proteinfreie Lösung, in die sich die Kristalle überführen lassen, ohne daß sie zerbrechen oder sich auflösen. Diese künstliche Mutterlauge wurde gefunden: 1 % (w/v) 1,2,3-Hexantriol, 30 mM LiNAD, 1.8 M Ammoniumsulfat, 50 mM KP_i , pH 6.5. In dieser Lösung konnten die Kristalle monatelang inkubiert werden.

3.6.3 Macroseeding

Niefind (1993) hatte L-HicDH-Kristalle mit Ammoniumsulfat als Fällungsmittel gezüchtet, die eine Größe von bis zu $0.6 \times 0.6 \times 1.1 \text{ mm}^3$ hatten. Dazu wurden pro Tropfen bis zu 0.5 mg Protein eingesetzt, ein Verfahren, das auch bei einer produktiven Reinigung nur wenige Ansätze erlaubte. Das sogenannte *Macroseeding* war eine Verbesserung, da es ermöglichte, große Kristalle aus kleineren Proteinmengen (0.1 mg) zu züchten.

In der Praxis ist die maximale Größe von Proteinkristallen auf wenige Millimeter begrenzt (nach Ducruix & Giegé, 1999), weil die Baufehler an der Kristalloberfläche akkumulieren. Dann ist das weitere Wachstum an diesen Stellen verhindert (McPherson *et al.*, 2001). Bei dem *Macroseeding* wird die Oberfläche des Kristalls abgelöst („abgeätzt“). Dann wird der Kristall als Impfkern in eine neue Mutterlauge

überführt, wo sich an den neuen, möglichst fehlerfreien Oberflächen neues Protein anlagern kann: Der Kristall wächst weiter.

Für das Macroseeding wurden Tropfen angesetzt, bei denen keine Kristallisation stattfand [Tropfen: je 5 μL von: L-HicDH (12 mg/mL), 30 mM NAD^+ , 1 % (w/w) 1,2,3-Hexantriol und Reservoir (1.1 M Ammoniumsulfat, 100 mM Kalium/Natrium-Phosphatpuffer, pH 6.7)]. Diese Tropfen wurden zwei Wochen lang voräquiliert, so daß eine Protein- und Fällungsmittelkonzentration eingestellt wurde, die Kristalle anzüchte, aber nicht vollständig auflöste. Die Tropfen wurden mit einzelnen kleinen Kristallen geimpft und gegen ein Reservoir mit höherer Fällungsmittelkonzentration (1.5 M) äquiliert. Innerhalb von 3 Wochen entstanden so Kristalle mit einer typischen Größe von $0.5 \times 0.3 \times 0.2 \text{ mm}^3$ (wie in Abbildung 3.11 links).

Es war wichtig, die Ammoniumsulfat-Konzentration der Ätzlösung zu optimieren. Idealerweise geht nur Protein der äußeren Schichten in Lösung. Dadurch steigt die Proteinkonzentration der Mutterlauge und es stellt sich ein Gleichgewicht ein. In dieser Bedingung wird ein Kristall rund, und ist dann stabil. Ein abgerundeter Kristall wurde mit 0.8 M Ammoniumsulfat in der Voräquilibrierung und 1.2 M Ammoniumsulfat in der Äquilibrierungslösung gewonnen (restliche Bedingungen wie zuvor, Abbildung 3.11 rechts).

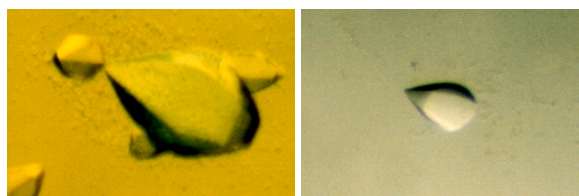


Abbildung 3.11: Kristalle aus dem Macroseeding. Links: ein $0.5 \times 0.3 \times 0.2 \text{ mm}^3$ großer Kristall, rechts: ein Kristall von der ursprünglichen Größe, der rund geätzt wurde. Die Vergrößerung ist in beiden Photos gleich.

3.6.4 Cryomessungen

Die Diffraktionsmessung von Kristallen bei 100 K (Cryomessung) kann zu Daten mit höherer Auflösung führen. Das hat zwei Gründe: Zum einen werden die Strahlenschäden des Proteins minimiert werden, was höhere Strahlendosen erlaubt. Zum anderen wird die thermische Schwingung der Atome verringert, und damit deren Streu-

fähigkeit erhöht. Deshalb können Cryomessungen bei der Verwendung von kleineren Kristallen zu einer höheren Auflösung führen. Benötigt wird ein Stabilisierungspuffer, der die Bildung von Eiskristallen verhindert und das Lösungsmittel vitrifiziert: ein sogenannter Cryopuffer.

Die künstliche Mutterlauge mit 12.5 % (w/v) Glycerin ließ sich als Cryopuffer verwenden. Ein nativer L-HicDH-Kristall aus dem Phasmidsystem mit einer Größe von $0.44 \times 0.24 \times 0.15 \text{ mm}^3$ wurde wenige Sekunden in Cryopuffer getränkt und lieferte an dem heimischen Meßplatz (mit MAC-XOS-Monochromator) Röntgendaten bis zu einer Auflösung von 2.7 \AA . Der Kristall hatte eine Mosaizität von 0.38° . Der zu 99.4 % vollständige Datensatz hat eine Multiplizität von 4.96. Mit einem R_{sym} -Wert von 12.2 % (7 % in der äußersten Schale) und einem I/σ_I -Wert von 11.2 (2.1) sind die Daten von befriedigender Qualität, was somit auch für die Expression (aus dem Phasmidsystem), die Reinigung, die Kristallisation und die Cryobedingung gilt.

Allerdings lösten sich die Kristalle auf, wenn sie länger als nur wenige Sekunden in diesem Cryopuffer inkubiert wurden. Deshalb wurde ein anderer Cryopuffer entwickelt, der auch als Stabilisierungslösung verwendbar war: 2 M Li_2SO_4 , 50 mM MES, 0.02 % (w/v) NaN_3 , 5 % (w/v) PEG-400. Dieser Puffer wurde mit NaOH auf pH 6.5 eingestellt und in die Reservoirkammer (*well*) einer Kristallisationsplatte gegeben. In ein Aliquot des Puffers wurde 3 mM LiNAD und 1 % (w/v) 1,2,3-Hexantriol eingewogen. Dieser Puffer wurde als sitzender Tropfen in die Brücke der Kristallisationsplatte gegeben, bei Bedarf mit der entsprechenden Menge Substrat/Inhibitor-Lösung versetzt und gegen den Cryopuffer im Reservoir äquilibriert. Dann wurden die Kristalle in die Tropfen überführt.

Ein etwa $0.2 \times 0.2 \times 0.1 \text{ mm}^3$ großer L-HicDH-Kristall, der in 1.6 M Ammoniumsulfat, 50 mM KP_i , pH 6.9 gewachsen ist, wurde an der *beamline* BW7B unter Cryobedingungen vermessen. Das sollte unter anderem einen Vergleich hinsichtlich des Streuverhaltens und der Mosaizität ermöglichen, wenn andere Kristalle in Cryolösung mit Substrat getaucht und dann vermessen werden (*soaking*). Die Daten hatten eine Auflösung von 2.07 \AA , waren also geringfügig besser als die 2.2 \AA -Daten von Niefind *et al.* (1995). Die weiteren Kennwerte sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3: Nativer L-HicDH–NAD⁺ Komplex: Kenndaten aus der SCALEPACK-Ausgabe (BW7B).

Wellenlänge [Å]	0.8424
Temperatur [K]	100
Anzahl unabhängiger Reflexe	128 545
Multiplizität	4.6
Auflösungsbereich [Å]	30–2.07
erste Schale der Skalierung [Å]	30–4.46
letzte Schale der Skalierung [Å]	2.14–2.07
I/σ_I	17.5
I/σ_I (erste Schale)	36.1
I/σ_I (letzte Schale)	2.02
Vollständigkeit [%]	99.6
Vollständigkeit (erste Schale) [%]	99.5
Vollständigkeit (letzte Schale) [%]	97.0
R_{sym} -Wert [%]	7.4
R_{sym} -Wert (erste Schale) [%]	3.7
R_{sym} -Wert (letzte Schale) [%]	50.0

3.7 Ternäre Komplexe: L-HicDH–NAD⁺–Substrat Cokristalle

Um ternäre Komplexe zu erhalten, wurden L-HicDH–NAD⁺–Substrat Cokristalle gezüchtet. Prinzipiell wäre es vielleicht auch möglich gewesen, L-HicDH–NAD⁺ Kristalle in substrathaltigem Stabilisierungspuffer zu tränken, aber der Besetzungsfaktor des Substrats ist bei solchen Experimenten meist niedriger als bei Cokristallen.

Wenn nicht explizit anders angegeben, wurden alle L-HicDH–NAD⁺–Substrat Cokristallen bei den gleichen Bedingungen gezüchtet. Die Tropfen wurden so angesetzt wie in Abschnitt 3.6 beschrieben, jedoch unter Hinzufügung von 5 μL 50 mM Substratlösung. Substrathaltige Cryolösungen wurden als sitzende Tropfen hergestellt, indem 10 μL Li₂SO₄-haltiger Cryopuffer mit 1 μL 0.1 M Substrat gemischt und gegen Cryopuffer im Reservoir äquilibriert wurde.

Es wurden Kristalle mit folgenden Substraten gezüchtet:

- 2-Oxocaproat
- 2-Oxoisocaproat
- Phenylglyoxylat
- 3-Phenylpyruvat
- Pyruvat
- Oxamat (Inhibitor)

Wie in Abschnitt 3.7.1 genauer beschrieben, wuchsen die L-HicDH–2-Oxocaproat Cokristalle in einer neuen Kristallform. Alle anderen Kristalle hatten die bekannten Wachstumseigenschaften (Niefind, 1993) und waren von der Kristallform 1. Diffraktionsdaten wurden aus den Kristallen ohne Substrat, mit 2-Oxocaproat, mit 2-Oxoisocaproat, mit Phenylglyoxylat und mit Oxamat gewonnen. Die Besonderheiten der Kristallisation sowie die Ergebnisse der Datensammlung der jeweiligen Kristalle sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.7.1 L-HicDH mit 2-Oxocaproat — *Drying Drops*

Während alle anderen untersuchten L-HicDH–NAD⁺–Substrat Cokristalle im wesentlichen unter den gleichen Bedingungen und in der gleichen Form wie Kristalle ohne Substrat wuchsen, bewirkte ein Zusatz von 2-Oxocaproat, daß sich andere Kristalle bildeten: bei einer Platte mit 1.3–1.8 M Ammoniumsulfat, 50 mM KP_i, pH 6.3–6.9 und hängenden Tropfen mit 5 µL Protein (12 mg/mL), 15 µL 1+1+1-Mix aus 30 mM LiNAD, 1 % (w/v) 1,2,3-Hexantriol und H₂O, 5 µL 100 mM 2-Oxocaproat und 5 µL Reservoir blieben die Tropfen mit weniger als 1.6 M Ammoniumsulfat klar, während sich in den restlichen Ansätzen Nadeln bildeten.

Lediglich in einem undichten und daher langsam austrocknenden Ansatz bei 1.7 M Ammoniumsulfat, pH 6.3, wuchsen massive Kristalle, die eine bisher unbekannte Form hatten. Sie hatten nur {1000}- und {0001}-Flächen und erinnerten daher an Basaltblöcke (siehe Abbildung 3.12). Demnach wurden sie „Basalt-Form“ oder Form 6 genannt.

Eine weitere konventionelle Verfeinerung dieser Kristallisationsbedingung brachte kein zufriedenstellendes Ergebnis: bei der Variation der Fällungsmittelkonzentration oder bei Microseeding (Impfkristallisation aus zerstoßenen Kristallen) entstan-

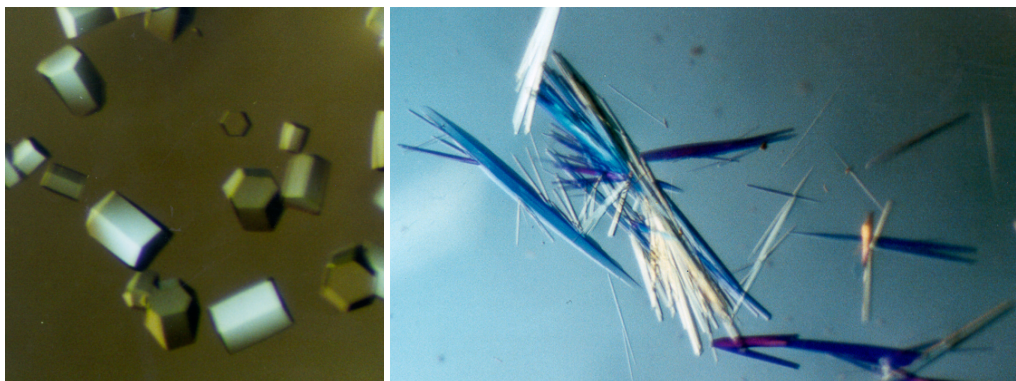


Abbildung 3.12: Rechts: Trigonale Kristalle einer neuen Kristallform, der „Basalt-Form“ oder Form 6. Der Unterschied zur Form 1 in Abbildung 3.10 auf Seite 47 ist ersichtlich. Diese Kristalle wuchsen in offenen Ansätzen (*drying drops*). Links: Kristalle aus einem vergleichbaren, aber geschlossenen Ansatz.

den nur Nadeln oder verwachsene Kristalle (siehe Abbildung 3.12 rechts). Erst als Platten mit ausschließlich undichten Ansätzen angesetzt wurden, entstanden wieder massive L-HicDH-2-Oxocaproat Cokristalle.

Undichte Ansätze (*drying drops*) wurden dadurch gemacht, daß Platten mit sitzenden Tropfen mit Klebeband abgedichtet wurden und dieses Klebeband mit einer Nähnadel durchstochen wurde. Jeder Ansatz hatte ein etwa 0.3 mm^2 großes Loch.

Offensichtlich bewirkten solche undichten Ansätze eine Beschleunigung der Kristallisation. Da es sich um ein offenes System handelte, aus dem immer ein wenig Wasser entwich, war die Wasserkonzentration im Gasraum niedriger als in einem geschlossenen System. Die Tropfen wurden daher schneller konzentriert als im konventionellen, geschlossenen Ansatz. Da der Endzustand von *drying drops* dem von geschlossenen Ansätzen gleicht, ist hier die Kinetik der Kristallisation entscheidend. Bei dieser Kristallisation ist es nicht ausreichend, nur die thermodynamischen Bedingungen (wie z. B. pH und Fällungsmittelkonzentration) einzustellen. Die Platten wurden nach der Zucht von Kristallen genügender Größe abgeklebt und konnten so einige Monate aufbewahrt werden.

Die Kristallgröße ließ sich durch Microseeding nicht verbessern, ergab aber auch keine schlechteren Kristalle. Es wurde ein Kristall aus einem Microseeding-Ansatz vermessen. Dabei wurden Kristalle, die in den oben beschriebenen geschlossenen Tropfen (mit 1.8 M Ammoniumsulfat, 50 mM KP_i , pH 6.3 als Reservoirlösung) ge-

wachsen waren, zerstoßen und in 1.8 M Ammoniumsulfat, 10 mM 2-Oxocaproat, 10 mM LiNAD, 1 % 1,2,3-Hexantriol 3200fach verdünnt. 0.5 μL dieser Suspension wurden in sitzende Tropfen gegeben, die mit 5 μL Protein (12 mg/mL), 10 μL 1+1-Mix aus 30 mM LiNAD, 1 % Hexantriol, 2.5 μL 100 mM 2-Oxocaproat und 5 μL Reservoir (1.7 M Ammoniumsulfat, 50 mM KPi , pH 6.3) angesetzt wurden und bis auf ein Volumen von 6.5 μL äquilibriert waren. Auch diese Ansätze waren offen. Das Ergebnis waren wieder nadelförmige Kristalle, sowie ein einzelner kompakter Kristall.

Dieser Kristall wurde an der *beamline* BW7A bis zu einer Auflösung von 2.44 Å vermessen. Nach der Diffraktionsmessung war zunächst unklar, welche Raumgruppe vorlag. Eine Skalierung mit SCALEPACK schränkte die Suche auf primitiv hexagonale Raumgruppen ein; es gab jedoch keinen klaren Unterschied in den Statistikwerten. Der normierte χ^2 -Wert und der R_{sym} -Wert (*linear R fac*) variierten kaum bei der Skalierung in den verschiedenen Raumgruppen (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Statistikwerte der Skalierung des 2-Oxocaproat-Datensatzes in verschiedenen Raumgruppen (30–3.5 Å, SCALEPACK-Ausgabe. Bis auf die Raumgruppe waren alle Eingabeparameter gleich).

Raumgruppe	χ^2	R_{sym}
$P3_121$	1.040	0.040
$P6_1$	1.053	0.041
$P6_422$	1.045	0.042

Es gab kaum Reflexe, die zur Überprüfung von systematischen Auslöschungen und damit zur Raumgruppenbestimmung hätten verwendet werden können. Diese „blinde Zone“ ist sichtbar an der hellen Mittellinie in Abbildung 3.13.

Die ungewöhnlicherweise fehlenden Reflexe und der Verlauf der R_{sym} -Werte waren Warnhinweise auf eine Verzwilligung.² Dies bestätigte auch der Verlauf des $N(Z)$ -Plot von TRUNCATE, der stark vom theoretischen Modell abwich (Abbildung 3.14). Die Verteilung der Intensitäten der in $P3_121$ skalierten Daten im Yeates-Test auf *partielle* Verzwilligung (Yeates, 1997) ergab dann auch einen Zwillingsanteil $\alpha = 47.3 \pm 0.4$ %. Die Zwillingsregel war $(-h-kl)$, d. h. die Reflexe hkl und $-h-kl$ überlagerten sich.

²Die Warnhinweise sind in Anhang A beschrieben, zusammen mit einer allgemeinen Einführung zu Kristallzwillingen.

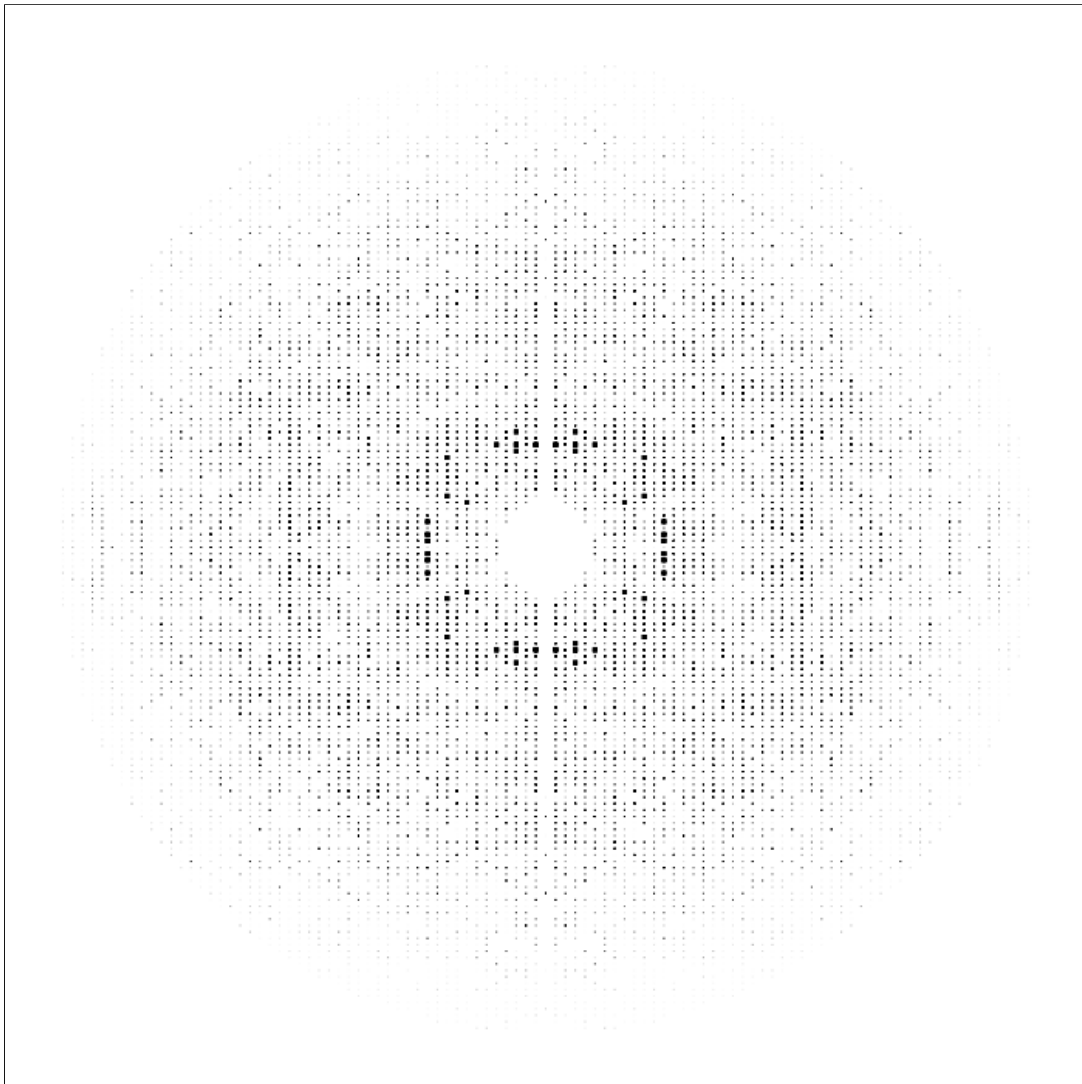


Abbildung 3.13: Pseudopräzessionsaufnahme des L-HicDH-2-Oxocaproat-Kristalls (in $P6_422$). Dargestellt ist die Schicht $(0kl)$. Der helle vertikalen Mittelstreifen resultiert aus einer ungewöhnlichen „blinden Zone“, wobei nur die $(00l)$ -Reflexe fehlen.

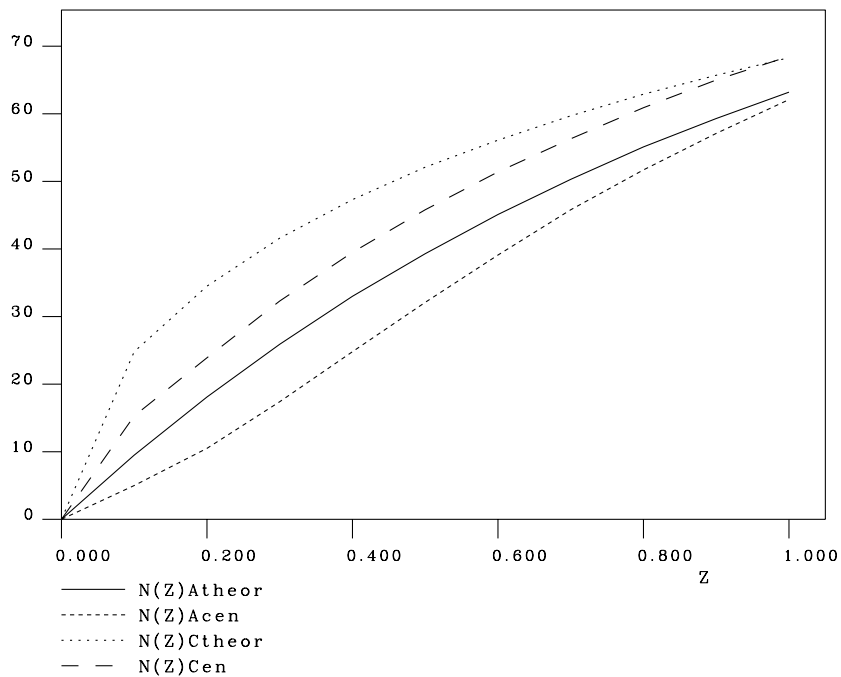


Abbildung 3.14: Die kumulative Verteilung der azentrischen (A) und der zentrischen (C) Intensitäten (TRUNCATE N(Z)-Plot). Die Abweichung der tatsächlichen Kurven („Acen“ und „Cen“ von den theoretischen „Atheor“ bzw. „Ctheor“ ist offensichtlich und ein Hinweis auf Verzwillingung.

Bei der Messung wurde der Kristall bei jeder Aufnahme um $\Delta\phi=1^\circ$ gedreht. Der Kristall hatte eine Mosaizität von 0.8° und so waren viele der Reflexe zwischen 2.44 und 2.35 \AA überlappend und wurden von DENZO aus dem HKL-Paket verworfen. Mit PrOW wurden diese Reflexe dekonvolutiert, so daß sie für die Strukturlösung zur Verfügung standen. Das Ergebnis war ein in Auflösung, Vollständigkeit und Signal/Rausch-Verhältnis verbesserter Datensatz (Tabelle 3.5).

Die Skalierung bestätigte, daß es sich um eine neue Kristallform handelte: Sie war trigonal $P3_121$ mit den Achsenlängen $a = b = 134 \text{ \AA}$, $c = 178 \text{ \AA}$. Dadurch, daß die Kristalle in der enantiomorphen Raumgruppe gewachsen sind und eine kürzere c -Achse haben, war der Lösungsmittelgehalt in diesen Kristallen etwas niedriger als in denen der Form 1: 69 % statt 74 % (Niefind, 1993).

Tabelle 3.5: SCALEPACK-Kenngrößen nach Auswertung des Datensatzes von L-HicDH mit 2-Oxocaproat (BW7A) ohne und mit PrOW.

	ohne PrOW	mit PrOW
Wellenlänge [Å]	0.9	0.9
Temperatur [K]	100	100
Anzahl unabhängiger Reflexe	66 392	78 043
Multiplizität	4.7	9.3
Auflösungsbereich [Å]	30–2.44	30–2.35
erste Schale der Skalierung [Å]	30–5.25	30–5.78
letzte Schale der Skalierung [Å]	2.53–2.44	2.40–2.35
I/σ_I	19.2	23.9
I/σ_I (erste Schale)	62.2	49.7
I/σ_I (letzte Schale)	2.03	3.7
Vollständigkeit [%]	95.1	99.7
Vollständigkeit (erste Schale) [%]	99.2	99.4
Vollständigkeit (letzte Schale) [%]	87.6	95.8
R_{sym} -Wert [%]	5.3	8.6
R_{sym} -Wert (erste Schale) [%]	3.4	4.0
R_{sym} -Wert (letzte Schale) [%]	34.8	48.0

3.7.2 L-HicDH mit 2-Oxoisocaproat

Drei L-HicDH–NAD⁺–2-Oxoisocaproat Cokristalle der Form 1 wurden durch Macro-seeding gewonnen und an der *beamline* BW7B bei Raumtemperatur vermessen. Dieser Diffraktionsdatensatz ist in Tabelle 3.6 charakterisiert.

3.7.3 L-HicDH mit Phenylglyoxylat

Ein Kristall, der aus einem hängenden Tropfen aus 5 μL Protein (12 mg/mL), 10 μL 1+1-Mix aus 30 mM LiNAD und 1 % (w/v) Hexantriol, 2.5 μL 100 mM Phenylglyoxylat/NaOH, pH 6.92 und 5 μL Reservoir (1.7 M Ammoniumsulfat, 50 mM KP_i, pH 6.3) gewachsen war, wurde an der *beamline* BW7B unter Cryobedingungen vermessen (siehe Tabelle 3.7).

Tabelle 3.6: Kenndaten aus der SCALEPACK-Ausgabe des Datensatzes von L-HicDH mit 2-Oxoisocaproat (BW7B).

Wellenlänge [Å]	0.8439
Temperatur [K]	298
Anzahl unabhängiger Reflexe	87 605
Multiplizität	5.14
Auflösungsbereich [Å]	30–2.35
erste Schale der Skalierung [Å]	30–7.27
letzte Schale der Skalierung [Å]	2.38–2.35
I/σ_I	12.3
I/σ_I (erste Schale)	28.0
I/σ_I (letzte Schale)	2.17
Vollständigkeit [%]	95.6
Vollständigkeit (erste Schale) [%]	90.8
Vollständigkeit (letzte Schale) [%]	95.6
R_{sym} -Wert [%]	15.9
R_{sym} -Wert (erste Schale) [%]	6.9
R_{sym} -Wert (letzte Schale) [%]	77.0

3.7.4 L-HicDH mit Oxamat

Dieser Kristall wuchs in der gleichen Bedingung wie der Kristall mit Phenylglyoxylat, nur daß 2.5 μL 100 mM Oxamat statt Phenylglyoxylat verwendet wurde. Mit diesem Kristall wurde der mit einer maximalen Auflösung von 1.99 Å bisher beste Datensatz erhalten. Die Kenndaten sind in der Tabelle 3.8 zusammengefaßt.

Tabelle 3.7: Kenndaten aus der SCALEPACK-Ausgabe des Datensatzes von L-HicDH mit Phenylglyoxylat (BW7B).

Wellenlänge [Å]	0.8424
Temperatur [K]	100
Anzahl unabhängiger Reflexe	115 941
Multiplizität	8.38
Auflösungsbereich [Å]	30–2.14
erste Schale der Skalierung [Å]	30–4.61
letzte Schale der Skalierung [Å]	2.22–2.14
I/σ_I	21.2
I/σ_I (erste Schale)	34.1
I/σ_I (letzte Schale)	3.20
Vollständigkeit [%]	99.4
Vollständigkeit (erste Schale) [%]	99.7
Vollständigkeit (letzte Schale) [%]	94.4
R_{sym} -Wert [%]	9.4
R_{sym} -Wert (erste/letzte Schale) [%]	6.1/46.5

Tabelle 3.8: Kenndaten aus der SCALEPACK-Ausgabe des Datensatzes von L-HicDH mit Oxamat (BW7B).

Wellenlänge [Å]	0.8424
Temperatur [K]	100
Anzahl unabhängiger Reflexe	143 623
Multiplizität	8.55
Auflösungsbereich [Å]	30–1.99
erste Schale der Skalierung [Å]	30–4.28
letzte Schale der Skalierung [Å]	2.06–1.99
I/σ_I	31.3
I/σ_I (erste Schale)	35.8
I/σ_I (letzte Schale)	6.26
Vollständigkeit [%]	99.1
Vollständigkeit (erste Schale) [%]	98.4
Vollständigkeit (letzte Schale) [%]	93.2
R_{sym} -Wert [%]	5.3
R_{sym} -Wert (erste/letzte Schale) [%]	3.7/24.3

3.8 Strukturlösung

Während für die Raumgruppenbestimmung die Verzwilligung des 2-Oxocaproat-Datensatzes noch vor der Skalierung ermittelt werden mußte, war bei den anderen Datensätzen die Raumgruppe von vorneherein klar, da die Kristalle der Form 1 von Niefind (1993) bereits beschrieben waren. Allerdings wurden die N(Z)-Plots genau beachtet und die Daten auf partielle Verzwilligung getestet, um eine in dieser Raumgruppe mögliche Verzwilligung nicht zu übersehen.

Die Strukturlösung umfasste das Umrechnen von Reflexintensitäten in Strukturfaktoramplituden, den Test der Datensätze auf Verzwilligung, die Phasierung sowie Verfeinerung und Modellbau in mehreren Runden. Anschließend wurde die Qualität des Modells überprüft. Die methodische Vorgehensweise ist in Abschnitt 2.8 beschrieben. Im folgenden werden die Resultate wiedergegeben.

3.8.1 L-HicDH ohne Substrat (native binäre Komplexe)

Die Struktur von L-HicDH ohne Substrat wurde gelöst, da die Möglichkeit bestand, daß der flexible Coenzym-Loop eine hohe thermische Schwingung besitzt. In diesem Fall würden Cryobedingungen diese Schwingung drastisch herabsetzen, was mit einer größeren Streukraft des entsprechenden Bereiches einherginge. Dies würde zu klareren Elektronendichten des Coenzym-Loops führen. Auf der anderen Seite verbessern tiefere Temperaturen nicht die Streufähigkeit von fehlgeordneten Bereichen. So läßt sich tendenziell Fehlordnung von thermischer Schwingung unterscheiden.

Der N(Z)-Plot (Abbildung 3.15) zeigt leichte Abweichungen der Intensitätsverteilung von der theoretischen Kurve: ein Hinweis auf NCS oder eine leichte Verzwilligung. Nach Yeates wurde aus den Intensitäten eine Verzwilligung von 4.1 % berechnet. Dieser Wert wurde jedoch unter der Annahme berechnet, daß ein isotroper Kristall vorlag, und daß die Intensitäten der Reflexe zufällig verteilt waren (Yeates, 1997). Diese beiden Idealisierungen sind in der Praxis jedoch nicht erfüllt, so daß der Zwillingsanteil mit den Strukturparametern mitverfeinert werden sollte. Es wurde SHELXL verwendet, da nur dieses Programm diese Berechnungsmöglichkeit bot.

Die Struktur besteht aus vier Untereinheiten, von denen zwei (A und B) eine geschlossenen Konformation aufweisen, während die anderen beiden (C und D) offen sind (Niefind *et al.*, 1995). Das Modell beinhaltet neben den Protein- und Wasserato-

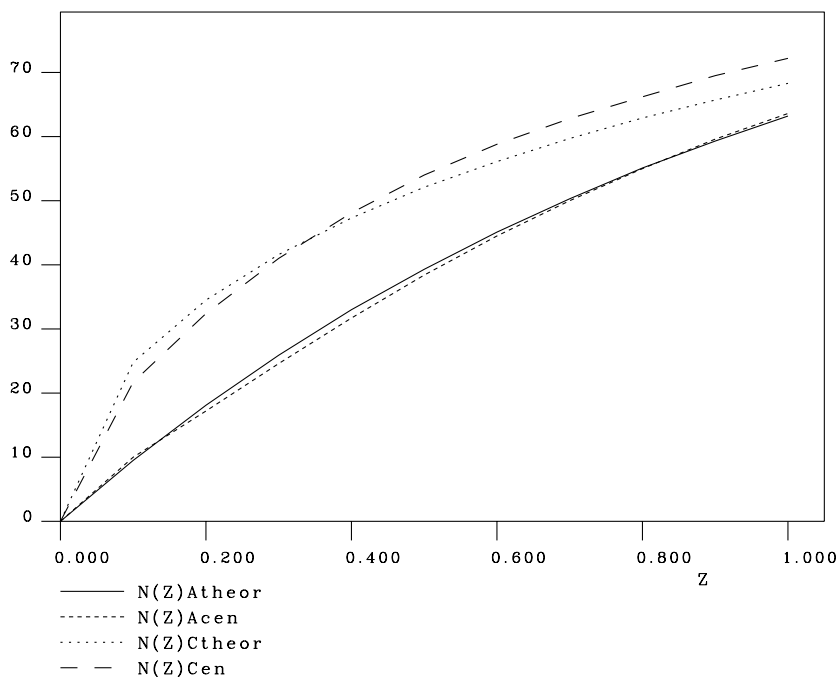


Abbildung 3.15: Dieser $N(Z)$ -Plot des nativen Datensatzes zeigt eine, wenn auch geringe, Abweichung von dem theoretischen Verlauf. Besonders die Verteilung der zentralen Reflexe (Cen) deckt sich nicht völlig mit der theoretischen Verteilung eines unverzweigten Kristalls (Ctheor).

men auch ein Sulfation im aktiven Zentrum der Untereinheit C. Die Details dieser Strukturlösung sind in Tabelle 3.9 aufgeführt. Tabelle 3.10 zeigt die Größe der Kontaktflächen der Untereinheiten sowie der Kristallkontakte.

Die Abbildung 3.16 faßt zusammen, welche Aminosäuren im Modell fehlen und bei welchen die Seitenkette ignoriert wurden (sie wurden als Gly oder Ala behandelt). Die Elektronendichten in einigen flexibleren Bereichen sind weniger deutlich als in der restlichen Struktur, und entsprechend ist die Strukturlösung weniger sicher. Auf die Seitenketten einiger Aminosäuren, sowie auf Teile der Polypeptidketten in den Coenzym-Loops der Untereinheiten B, C und D wurde daher verzichtet.

In Abbildung 3.17 ist der Verlauf der B -Faktoren der Polypeptidkettenatome dargestellt. Der Coenzym-Loop der Kette A hat hohe B -Faktoren, genau wie der *flexible surface loop* (Residuen 222–224, alle Untereinheiten). Die hohen B -Faktoren spiegeln die hohe Fehlordnung dieser Bereiche wider. Der Versuch, durch die Reduktion der

Tabelle 3.9: Ergebnis der Strukturlösung von L-HicDH ohne Substrat.

Raumgruppe	$P3_221$ (Nr. 154)
Zellgröße [Å]	$a = b = 134.7, c = 201.5$
Verfeinerungsprogramm	SHELXL
Anzahl der freien/gesamten Reflexe	6 725/128 494
Atome des Modells (davon Wasser/NAD ⁺ /Sulfat)	9 458 (252/176/5)
Zwillingsregel	$(-h-kl)$
Zwillingsanteil α nach Yeates/verfeinert [%]	$4.1 \pm 0.2/6.4$
maximale Auflösung [Å]	2.07
Ramachandran: bevorzugt/erlaubt/toleriert/verboten [%]	90.9/8.7/0.3/0.2
R-Wert ($F_o > 4\sigma F_o$ /alle F_o) [%]	23.7/26.8
freier R-Wert ($F_o > 4\sigma F_o$ /alle F_o) [%]	28.0/31.4
Durchschnittlicher B-Faktor nach Wilson/verfeinert [Å ²]	24/39
Bindungslängen: RMSD von der idealisierten Geometrie [Å]	0.011
Bindungswinkel: RMSD von der idealisierten Geometrie [°]	1.60

Tabelle 3.10: Kontaktflächen im nativen L-HicDH Kristall.

Oberfläche der dissoziierten Monomere	$A_{\Sigma M}$	52 604 Å ²	100 %
Kristallkontakte	ΔA_K	3 714 Å ²	7.1 %
Kontakte im Tetramer	ΔA_T	13 787 Å ²	26.2 %
Kontakte der P-Achse (AB/CD)	ΔA_P	3 386 Å ²	6.4 %
Kontakte der Q-Achse (AC/BD)	ΔA_Q	8 369 Å ²	15.9 %
Kontakte der R-Achse (AD/BC)	ΔA_R	2 243 Å ²	4.3 %

lhicdh			ARKIGIIGLG	NVGA AVAHGL	40
nativ_a			ARKIGIIGLG	NVGA AVAHGL	
nativ_b			ARKIGIIGLG	NVGA AVAHGL	
nativ_c			ARKIGIIGLG	NVGA AVAHGL	
nativ_d			ARKIGIIGLG	NVGA AVAHGL	
lhicdh	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	80
nativ_a	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
nativ_b	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
nativ_c	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
nativ_d	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
lhicdh	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N I	K L Q Q D N P T G D	R F A E L K F T S S	120
nativ_a	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N I	A L Q A D N G G G A	A F A E L A F T S S	
nativ_b	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G G G	A G G G A A A A F G S S	
nativ_c	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N A A . G D	R F A E L K F T S S	
nativ_d	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N A A T G D	A F A E L K F T S S	
lhicdh	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	160
nativ_a	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
nativ_b	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
nativ_c	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
nativ_d	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
lhicdh	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	200
nativ_a	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
nativ_b	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
nativ_c	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
nativ_d	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
lhicdh	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G D I D L A A I	E E E A R K G G F T	240
nativ_a	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G A I D L A A I	E E E A R K G G F T	
nativ_b	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G A I D L A A I	E E E A R K G G F T	
nativ_c	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G A I D L A A I	E E E A R K G G F T	
nativ_d	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G A I D L A A I	E E A A R K G G F T	
lhicdh	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	280
nativ_a	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R A D M	
nativ_b	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	
nativ_c	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	
nativ_d	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	
lhicdh	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	320
nativ_a	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L A Q S R D Y I Q Q	
nativ_b	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	
nativ_c	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	
nativ_d	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	
lhicdh	R F D E I V D T L				329
nativ_a	A F D E I V D T L				
nativ_b	R F D E I V D T L				
nativ_c	R F D E I V D T L				
nativ_d	R F D E I V D T L				

Abbildung 3.16: Dieses Quasi-Sequenzalignment zeigt die Vollständigkeit der nativen L-HicDH-Struktur. Gezeigt ist die Sequenz der L-HicDH (lhicdh) und des Modells (nativ_a: Untereinheit A, nativ_b: Untereinheit B, nativ_c: Untereinheit C, nativ_d: Untereinheit D). Die Abweichungen (schwarz) markieren die Residuen, deren Struktur nicht oder nur teilweise bestimmt wurde. Punkt: die Aminosäure fehlt, G: sie wurde wie Gly behandelt (nur Hauptkette), A: sie wurde wie Ala behandelt (Hauptkette und C β).

thermischen Schwingung die Struktur des Coenzym-Loops klar hervorzubringen, ist also nur zu einem kleinen Teil erfolgreich gewesen.

Die durchschnittlichen Standard-Unsicherheiten (S.U.) der Hauptkettenatome sind in Abbildung 3.18 gegen die Aminosäure-Position aufgetragen. Es ist ersichtlich, daß hohe Bereiche (vor allem Loops) mit hohen B -Faktoren auch eine erhöhte Positionsunsicherheit haben. Allerdings ist die Standard-Unsicherheit der Hauptkette an keiner Stelle höher als ca. 3 Å. Zu beachten ist hier und bei allen folgenden S.U.-Berechnungen, daß diese Werte etwa 10 % zu niedrig sind, weil die Matrices in 29 Blöcke unterteilt berechnet wurden (Merritt *et al.*, 1998). Dies war nötig, da die Rechnungen sonst viel zu aufwendig geworden wären.

Abbildung 3.19 zeigt die Beziehung zwischen den B -Faktoren und den Standard-Unsicherheiten (S.U.). Diese Darstellungsweise kommt ohne Durchschnittswerte aus und gibt stattdessen die ungemittelten Positionsungenauigkeiten aller Atome an. Sie bietet zusätzlich eine leichte Vergleichsmöglichkeit mit denen anderer Strukturen.³

Die große Mehrzahl der Atome sind genauer als 1.5 Å positioniert. Zwar gibt es einige Atome mit hohen Standard-Unsicherheiten, doch fällt auf, daß es sich hier hauptsächlich um Kohlenstoffatome handelt. Die Stickstoff- und besonders die Sauerstoffatome haben niedrigere Unsicherheiten. Es gibt kein Sauerstoffatom mit einer höheren S.U. als 2 Å. Da die meisten Sauerstoffatome als Carbonylsauerstoff im Proteinrückgrat vorkommen, kann deren Genauigkeit eine Einschätzung für die Hauptkette geben. Die unsicher positionierten Kohlenstoffatome (in der Punktwolke über 3 Å) befinden sich hauptsächlich in den Seitenketten. Dies ist konsistent mit der Beobachtung aus Abbildung 3.18, in der gezeigt ist, daß die durchschnittlichen S.U. der Hauptketten nicht über 3 Å hinausgehen.

Bei genauem Betrachten der Abbildung 3.19 fällt auf, daß sich die Sauerstoffatome in zwei distinkte Teilmengen trennen lassen: die eine, kleinere Teilmenge verläuft auf einer etwas niedrigeren und flacheren Kurve als die restlichen Punkte (siehe Pfeil). Es handelt sich hier um die Sauerstoffatome der Wassermoleküle, die offensichtlich genauer positioniert sind als die Atome der restlichen Struktur. Eine Überverfeinerung durch falsch positionierte Kristallwasser ist also nicht gegeben. Das gleiche ist auch bei den anderen Strukturen zu beobachten (besonders deutlich in Abbildung 3.39).

Der Ramachandran-Plot der fertigen Struktur ist in der Abbildung 3.20 dargestellt. 90.9 % (964 Residuen) befinden sich in bevorzugten Bereichen (*most favoured*

³Zum leichteren Vergleich sind alle äquivalenten Plots in der selben Skalierung dargestellt.

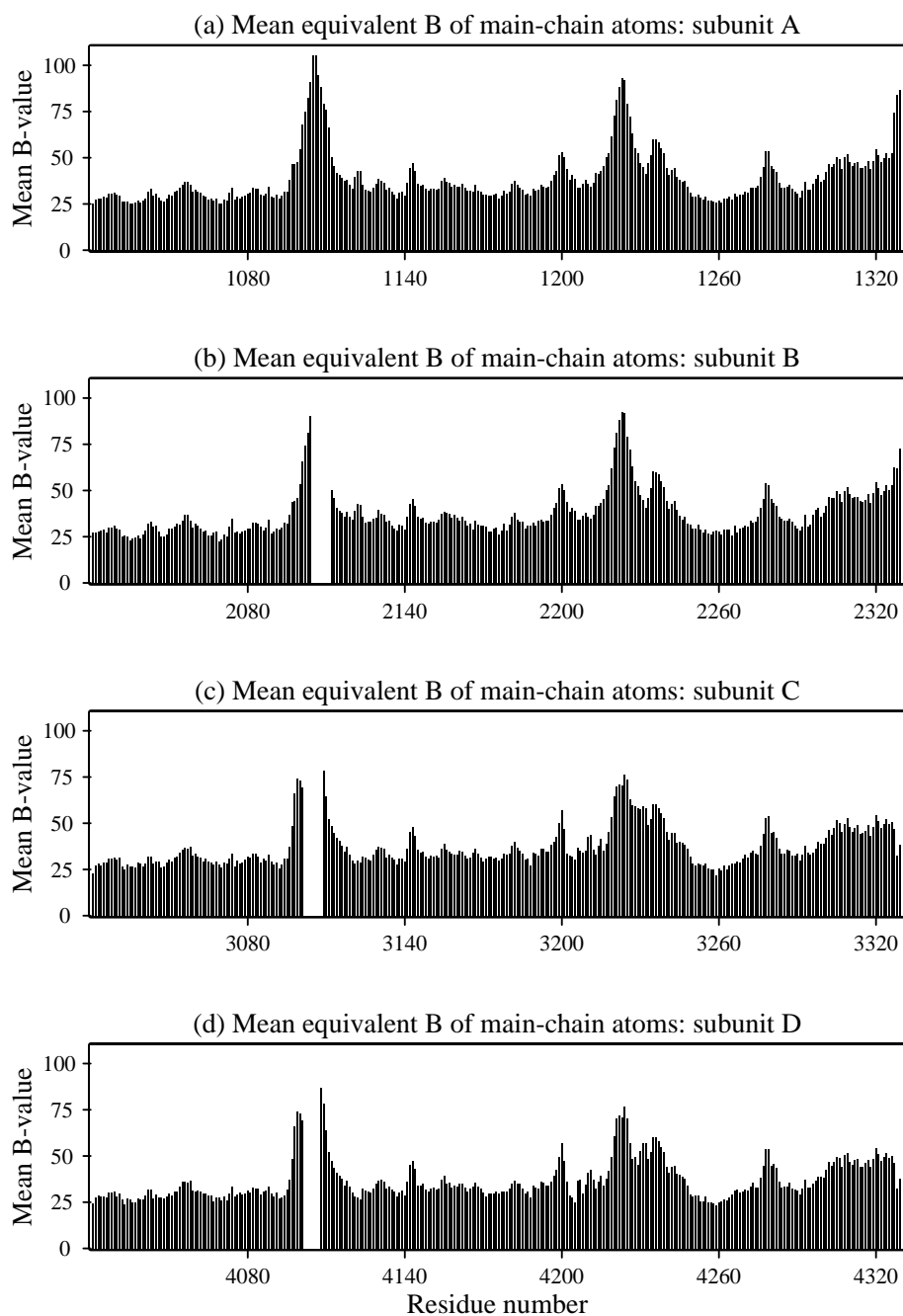


Abbildung 3.17: Die B -Faktoren (in \AA^2) der Hauptketten des nativen L-HicDH-Proteins (ohne Substrat).

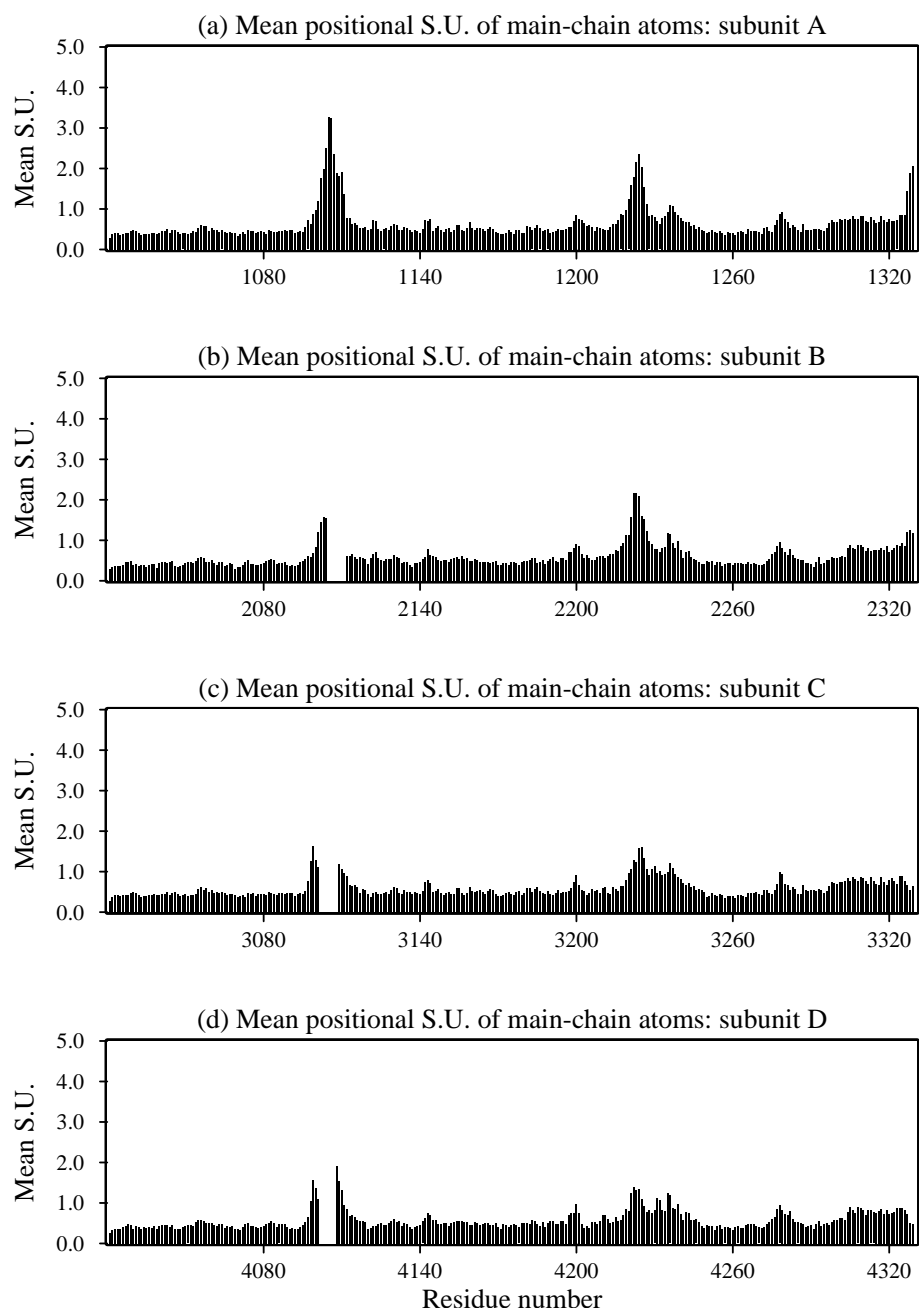


Abbildung 3.18: Die durchschnittlichen Standard-Unsicherheiten (S.U., in Å) der Hauptkettenatome der nativen L-HicDH-Struktur.

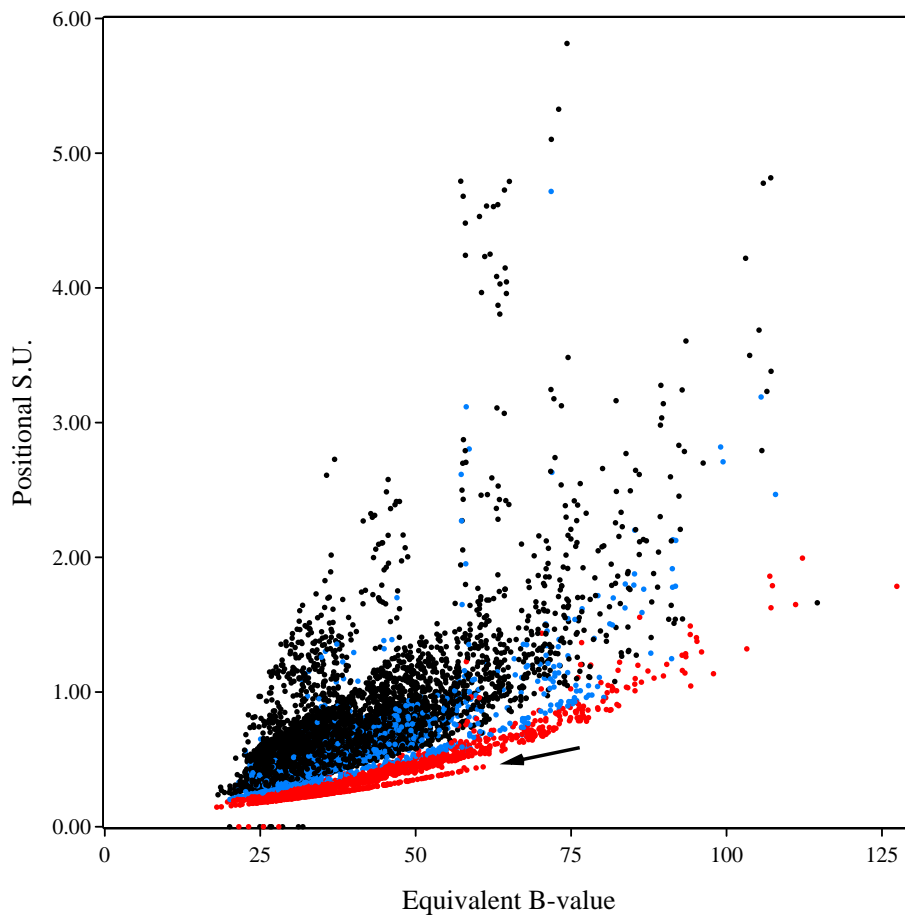


Abbildung 3.19: Die Standard-Unsicherheiten (S.U., in Å) der Atompositionen der nativen L-HicDH-Struktur in Abhängigkeit vom jeweiligen B -Faktor (in Å²). Schwarz: Kohlenstoff, Blau: Stickstoff, Rot: Sauerstoff. Die Kristallwasser sind mit einem Pfeil markiert.

regions), 8.7 % (92 Residuen) in erlaubten Bereichen (*additionally allowed regions*), 0.3 % (3 Residuen) in tolerierten Bereichen (*generously allowed regions*) und 0.2 % (2 Residuen) in verbotenen Bereichen (*dissallowed regions*).

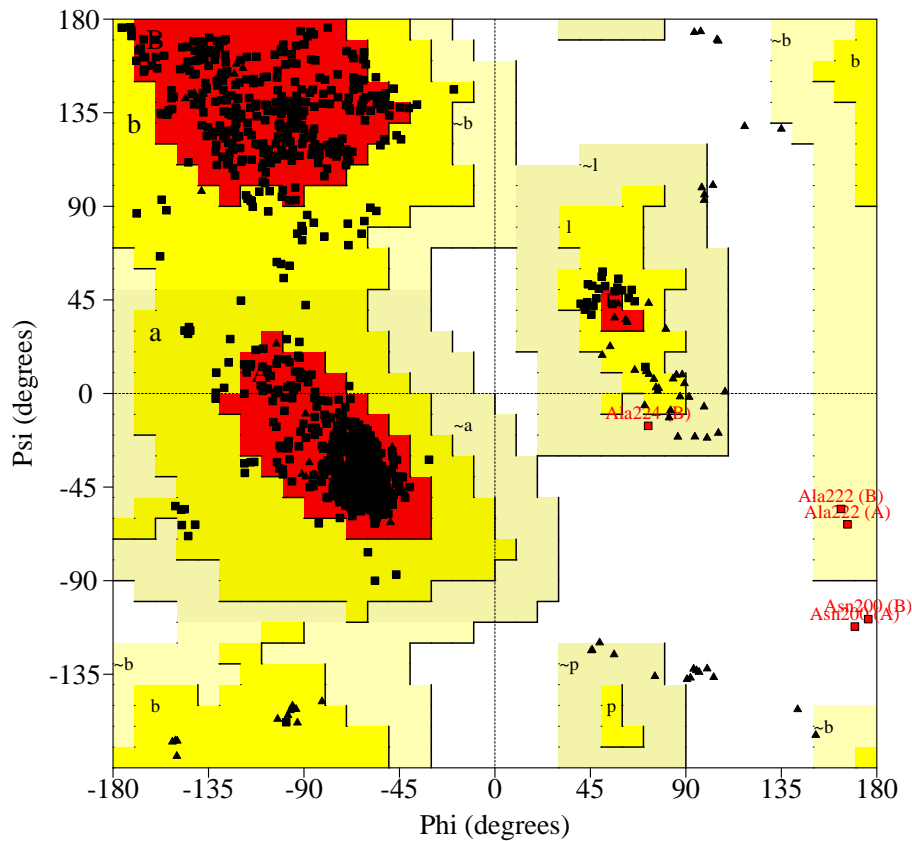


Abbildung 3.20: Ramachandran-Plot des L-HicDH-Modells ohne Substrat. A, B, L (rot): bevorzugte Bereiche; a, b, l, p (gelb): erlaubte Bereiche; ~a, ~b, ~l, ~p (hellgelb): tolerierte Bereiche (mit Ala222 der Untereinheiten A und B und Ala224 der Untereinheit B); Weiß: ungewöhnliche, verbotene ϕ/ψ -Kombinationen (mit Asn200 der Untereinheiten A und B).

Um einer Überverfeinerung vorzubeugen, wurde die nichtkristallographische Symmetrie (NCS) beachtet (siehe dazu Anhang A). Abbildung 3.21 zeigt den Kleywegt-Plot (nach Kleywegt, 1996)⁴ des nativen L-HicDH-Modells. In den Bereichen, in denen sich die offene von der geschlossenen Struktur unterscheidet, wurde auf eine vierfache NCS verzichtet. Statt dessen wurde eine zweifache NCS angewen-

⁴Der Kleywegt-Plot und seine Vorzüge werden auf Seite 195 erläutert.

det (Untereinheiten A und B zusammen, sowie C und D). Das Resultat sind lange, schmale Cluster im Kleywegt-Plot. Der Übersichtlichkeit halber sind in der Abbildung 3.22 nur die Aminosäuren der Untereinheiten A und B bzw. C und D miteinander verbunden. Hier sind keine Abweichungen von der NCS zu beobachten.

Abbildung 3.23 zeigt den Verlauf des Coenzym-Loops der Untereinheit A. Der Coenzym-Loop schließt das aktive Zentrum ein, das in Abbildung 3.24 gezeigt ist. Bei dem hier vorgestellten Modell befindet sich ein Wasser im aktiven Zentrum, während bei Niefind *et al.* (1995) sich dort ein Sulfat befindet. Bei dem Versuch, Sulfat an dieser Stelle einzubauen, wurde es mit *B*-Faktoren über 140 \AA^2 verfeinert. Das Wasser hat einen *B*-Faktor von 34 \AA^2 und ist damit plausibler. Niefind *et al.* (1995) schlagen in einem ähnlichen Fall eine 20 %ige Besetzung von Sulfat vor. Um die Struktur nicht mit Teilbesetzungen zu verkomplizieren, wurde das Sulfat hier vernachlässigt.

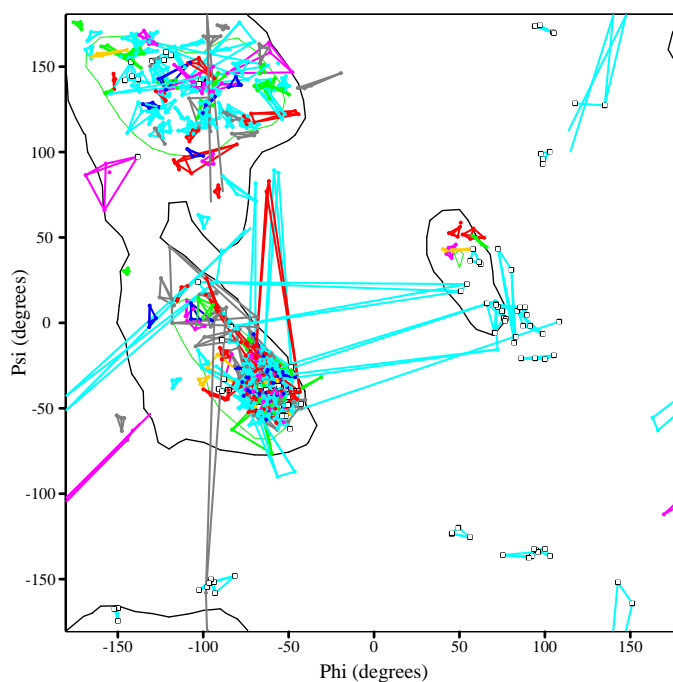


Abbildung 3.21: Kleywegt-Plot (nach Kleywegt, 1996) des nativen L-HicDH-Modells (ohne Substrat). Gezeigt sind alle vier Untereinheiten. Die Farbkodierung entspricht den Eigenschaften der Aminosäuren: Gelb = Cys und Met; Grün = Phe, Tyr, Trp und His; Cyan = Ala, Leu, Ile, Val und Pro; Rot = Glu und Asp; Blau = Arg und Lys; Purpur = Gln und Asn; Grau = Ser und Thr. Gly sind durch offene Rechtecke bezeichnet. Die langen Linien zeigen Abweichungen von der nichtkristallographischen Symmetrie.

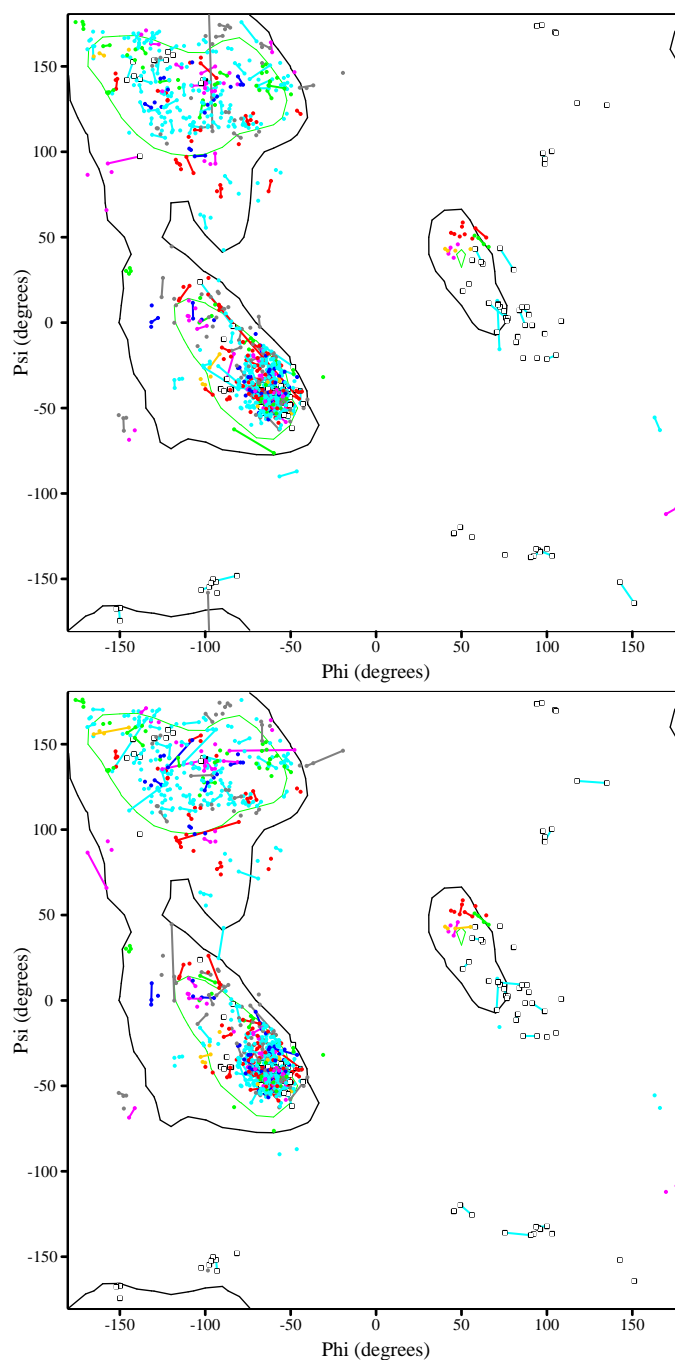


Abbildung 3.22: Kleywegt-Plot des L-HicDH-Modells ohne Substrat. Oben sind die Residuen der Untereinheiten A und B und unten die Untereinheiten C und D miteinander verbunden. Der Farbcode ist in der Legende von Abbildung 3.21 angegeben. Alle äquivalenten Residuen sind in ähnlichen Konformationen.

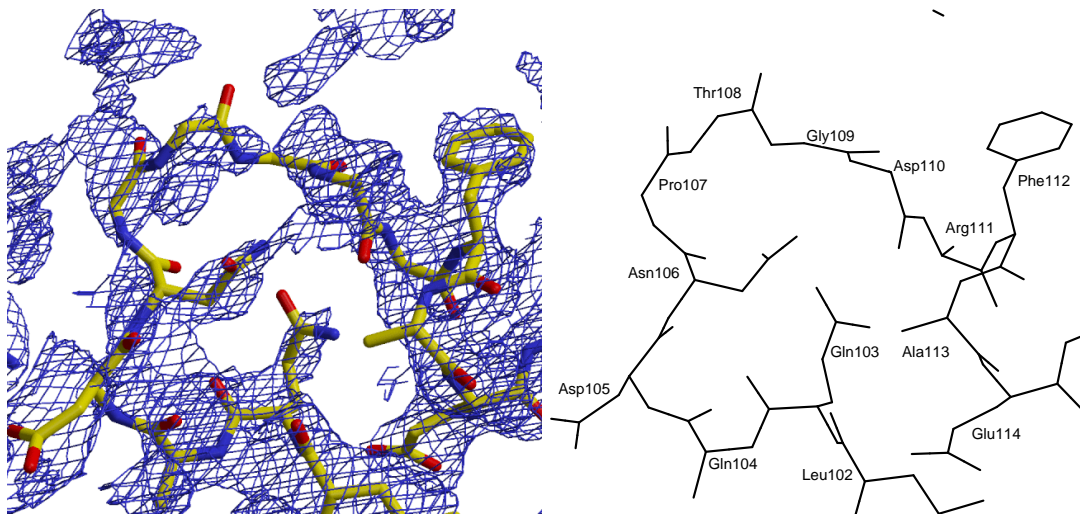


Abbildung 3.23: Der Verlauf des Coenzym-Loops der Untereinheit A. Die Elektronendichte ($\sigma_A(2mF_o - DF_c)$) ist bei 0.7σ konturiert. Wie schon in Abbildung 3.16 dargestellt, wurde der Loop als Variante Q104A P107G T108G D110A R111A verfeinert.

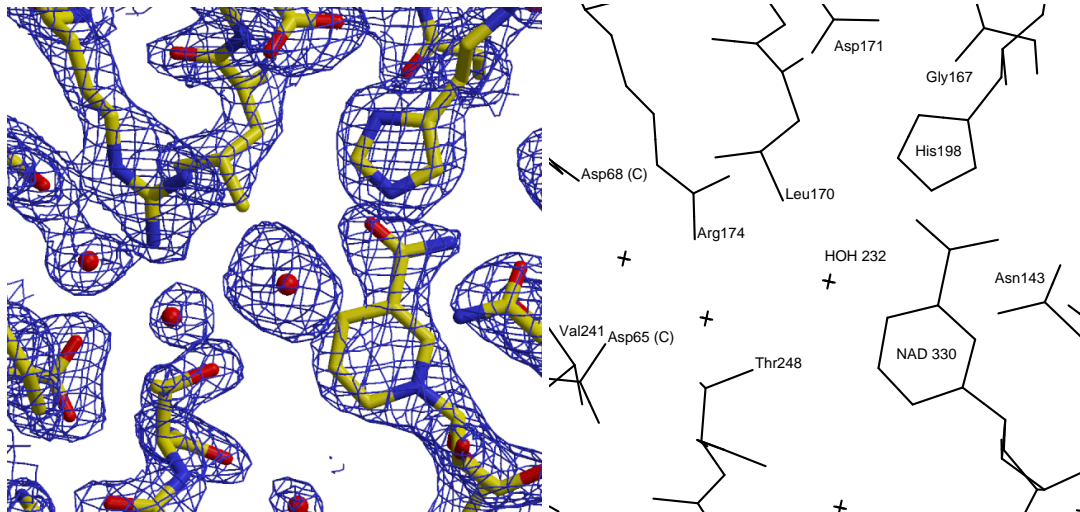


Abbildung 3.24: Das aktive Zentrum der Untereinheit A der L-HicDH-Struktur ohne Substrat. Die σ_A -Elektronendichte ($2mF_o - DF_c$) ist bei 1.6σ konturiert. Das Wasser HOH 232 ist an der Stelle, an der in den ternären Komplexen das jeweilige Substrat ist. Position und Form der Elektronendichte weisen auf eine teilweise Besetzung von Sulfat hin (Niefind *et al.*, 1995).

3.8.2 L-HicDH mit 2-Oxocaproat

Die Struktur der L-HicDH mit 2-Oxocaproat wurde mit CNS gelöst. Tabelle 3.11 faßt das Ergebnis zusammen. Es wurde angenommen, daß ein perfekter meroedrischer Zwilling vorlag. Die von Niefind *et al.* (1995) beschriebene Asymmetrie der Untereinheiten in der Kristallform 1 liegt auch dieser Form 6 vor: zwei Untereinheiten (A und B) sind geschlossen und zwei (C und D) sind offen.

Das Modell beinhaltet jeweils ein 2-Oxocaproat Molekül in den aktiven Zentren der Untereinheiten A und B sowie ein Sulfat im aktiven Zentrum der Untereinheit D. Der R -Wert sowie der freie R -Wert sind mit 17 % bzw. 20 % deutlich niedriger als die R -Werte aus den SHELXL-Verfeinerungen. Allerdings sind die R -Werte aus verschiedenen Verfeinerungsprogrammen nicht ohne weiteres vergleichbar. Um einen Anhalt für einen Vergleich der R -Werte aus SHELXL und CNS zu erhalten, wurden diese zusätzlich mit SHELXL berechnet. Dazu wurde das Modell aus CNS verwendet. Es zeigte sich, daß die R -Werte aus SHELXL höher waren: werden zur Berechnung nur die Reflexe, die sich deutlich vom Hintergrund abheben verwendet ($F_o > 4\sigma F_o$), ist der R -Wert 20.5 %, während er 22.3 % für alle F_o ist. Tabelle 3.11 zeigt die weiteren Kenngrößen des Ergebnisses.

Die Größen der Kontaktflächen sind in Tabelle 3.12 aufgeführt. Sie sind gleich groß der Kontaktflächen der Form 1 (Tabelle 3.10).

Die Vollständigkeit des Modells ist in Abbildung 3.25 in Form eines Quasi-Sequenzalignments gezeigt. Im Unterschied zu allen anderen hier vorgestellten Modellen konnte die Struktur des gesamten Tetramers vollständig gelöst werden — bis auf den Coenzym-Loop der offenen Untereinheiten C und D und zwei Resten des flexiblen Oberflächen-Loop der Untereinheit C (G223 und D224). Außerdem ergab sich aus der Kristallpackung eine höhere Flexibilität des C-Terminus dieser geschlossenen Untereinheiten A und B, wodurch dort einige Aminosäuren undefiniert blieben.

Die B -Faktoren betragen durchschnittlich 41 \AA^2 . Ihre Verteilung ist in Abbildung 3.26 gezeigt. Es fällt auf, daß in dieser Struktur der Coenzym-Loop der Untereinheit A niedrigere B -Faktoren hat als in den anderen Strukturen. Das weist auf einen stabileren Loop mit einer niedrigeren Fehlordnung hin. Entsprechend hat dieser Loop auch keine signifikant erhöhten Positionsungenauigkeiten: Abbildung 3.27 zeigt für diesen Bereich (Residuen 1098–1122 der Untereinheit A) S.U.-Werte unter 2 \AA an, was sich kaum von dem Hintergrund abhebt.

Tabelle 3.11: Ergebnis der Strukturlösung von L-HicDH mit 2-Oxocaproat.

Raumgruppe	$P3_121$ (Nr. 152)
Zellgröße [Å]	$a = b = 134.0, c = 178.6$
Verfeinerungsprogramm	CNS
Anzahl der freien/gesamten Reflexe	1 419/77 420
Atome des Modells (davon Wasser/Sonstige)	9 549 (301/199*)
Zwillingsregel	$(-h-kl)$
Zwillingsanteil α nach Yeates/verfeinert [%]	$47.3 \pm 0.4^{**}/50^{***}$
maximale Auflösung [Å]	2.35
Ramachandran: bevorzugt/erlaubt/toleriert/verboten [%]	91.9/7.9/0.2/—
R-Wert/freier R-Wert [%]	17.2/19.8
freier Luzzati-Wert [Å]	0.30
freier σ_A -Wert [Å]	0.49
Durchschnittlicher B-Faktor nach Wilson/verfeinert [Å ²]	38/41
Bindungslängen: RMSD von der idealisierten Geometrie [Å]	0.007
Bindungswinkel: RMSD von der idealisierten Geometrie [°]	1.20

* 176 Atome in NAD⁺, 18 in 2-Oxocaproat und 5 in Sulfat

** vor der Dekonvolution mit PrOW

*** festgelegt

Tabelle 3.12: Kontaktflächen von L-HicDH mit 2-Oxocaproat.

Oberfläche der dissoziierten Monomere	$A_{\Sigma M}$	52 514 Å ²	100 %
Kristallkontakte	ΔA_K	4 066 Å ²	7.7 %
Kontakte im Tetramer	ΔA_T	13 761 Å ²	26.2 %
Kontakte der P-Achse (AB/CD)	ΔA_P	3 450 Å ²	6.6 %
Kontakte der Q-Achse (AC/BD)	ΔA_Q	8 256 Å ²	15.7 %
Kontakte der R-Achse (AD/BC)	ΔA_R	2 226 Å ²	4.2 %

lhicdh			AR K I G I I G L G	NV G A A V A H G L	40
oca_a			AR K I G I I G L G	NV G A A V A H G L	
oca_b			AR K I G I I G L G	NV G A A V A H G L	
oca_c			AR K I G I I G L G	NV G A A V A H G L	
oca_d			AR K I G I I G L G	NV G A A V A H G L	
lhicdh	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	80
oca_a	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
oca_b	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
oca_c	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
oca_d	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
lhicdh	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N I	K L Q Q D N P T G D	R F A E L K F T S S	120
oca_a	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N I	K L Q Q D N P T G D	R F A E L K F T S S	
oca_b	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N I	K L Q Q D N P T G D	R F A E L K F T S S	
oca_c	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N I	██████████████████	A F A E L K F T S S	
oca_d	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N I	██████████████████	R F A E L K F T S S	
lhicdh	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	160
oca_a	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
oca_b	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
oca_c	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
oca_d	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
lhicdh	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	200
oca_a	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
oca_b	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
oca_c	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
oca_d	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
lhicdh	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G D I D L A A I	E E E A R K G G F T	240
oca_a	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G D I D L A A I	E E E A R K G G F T	
oca_b	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G D I D L A A I	E E E A R K G G F T	
oca_c	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A █████ I D L A A I	E E E A R K G G F T	
oca_d	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G D I D L A A I	E E E A R K G G F T	
lhicdh	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	280
oca_a	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	
oca_b	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	
oca_c	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	
oca_d	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	
lhicdh	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	320
oca_a	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	
oca_b	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	
oca_c	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	
oca_d	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	
lhicdh	R F D E I V D T L				329
oca_a	R F D E I █████				
oca_b	R F D █████				
oca_c	R F D E I V D T L				
oca_d	R F D E I V D T L				

Abbildung 3.25: Die Vollständigkeit der L-HicDH mit 2-Oxocaproat als Quasi-Sequenzalignment analog zu Abbildung 3.16. lhicdh: vollständige Sequenz; oca_a: Struktur der Untereinheit A, oca_b: Untereinheit B; oca_c: Untereinheit C, oca_d: Untereinheit D. Schwarz: Bereiche, in denen Atome oder ganze Aminosäuren fehlen: der Coenzym-Loop in den Untereinheiten C und D (um Pro107) und die Reste G223 und D224 (C). Die Untereinheiten A und B sind nur im C-Terminus undefiniert.

Der durchschnittliche Atomkoordinaten-Fehler liegt bei 0.3 Å (freier Luzzatti-Wert) bis 0.5 Å (freier σ_A -Wert). Die Beziehung zwischen B -Faktor und Koordinatenfehler (S.U.) ist in Abbildung 3.28 dargestellt. In dieser Struktur gibt es mehr Atome mit hohen S.U.-Werten als beispielsweise im nativen Datensatz (vergleiche mit Abbildung 3.19). Dies könnte die niedrigere Auflösung widerspiegeln oder daher rühren, daß die asymmetrischen Bereiche durch die von SHELX verwendete *lokale* NCS besser beschrieben werden können als durch die *globale* NCS von CNS (Usón *et al.*, 1999).

Der Ramachandran-Plot enthält keine Residuen mit verbotenen ϕ/ψ -Kombinationen (Abbildung 3.29). Mit der gesamten Struktur ist damit auch der Coenzym-Loop der geschlossenen Untereinheiten A und B chemisch plausibel. In der Region der tolerierten Konformation befinden sich Asn200 (C und D). In den Kleywegt-Plots (Abbildung 3.30) ist gezeigt, wie sehr sich die Untereinheiten in den meisten Bereichen des gesamten Tetramers ähnlich sind. In den restlichen Bereichen ähneln sich die Untereinheiten A und B sowie C und D.

Wie oben beschrieben, sind die B -Faktoren und Positionsungenauigkeiten des Coenzym-Loops in den Untereinheiten A und B unterschiedlich. Dies resultiert aus unterschiedlichen Kristallkontakten, die den Coenzym-Loop stabilisieren. Bei der Untereinheit A gibt es eine ganze Reihe von Kontakten des Coenzym-Loops zur Untereinheit A eines symmetrieäquivalenten Tetramers. Unter ihnen sind einige, die mit Atomabständen von 3.5–4.7 Å als schwach zu bezeichnen sind. Dagegen gibt es bei dem Coenzym-Loop der Untereinheit B nur einen einzigen, allerdings starken, Kontakt zum Symmetrieäquivalent. Es handelt sich um eine Wasserstoffbrücke, die einen Abstand von 2.64 Å zwischen den Sauerstoffatomen O δ 1 hat (Tabelle 3.13 auf Seite 78). Diese Art von Wasserstoffbrücke zwischen zwei Säuregruppen ist nicht ungewöhnlich und hat meistens einen O–O Abstand zwischen 2.6 und 2.7 Å (Flocco & Mowbray, 1995).

Die Unterschiede in den Kristallkontakten haben nicht zu signifikanten Unterschieden in der Loop-Konformation geführt: Die Coenzym-Loops der Untereinheiten A und B sind fast gleich. Eine Überlagerung der beiden Loops (Reste 99–116, siehe Abbildung 3.31) ergab eine Abweichung (RMSD) von 1.05 Å (146 Atome). Signifikante Unterschiede fanden sich nur in den Seitenketten, nicht aber in den Hauptkettenatomen von Asp105 und Lys116. Bei dem Modellbau wurden diese beiden Loops zuerst unabhängig behandelt, und erst als nach einigen Runden Modellbau, *simulated annealing* und Verfeinerung klar wurde, daß ihre Konformation ähnlich ist, wurden

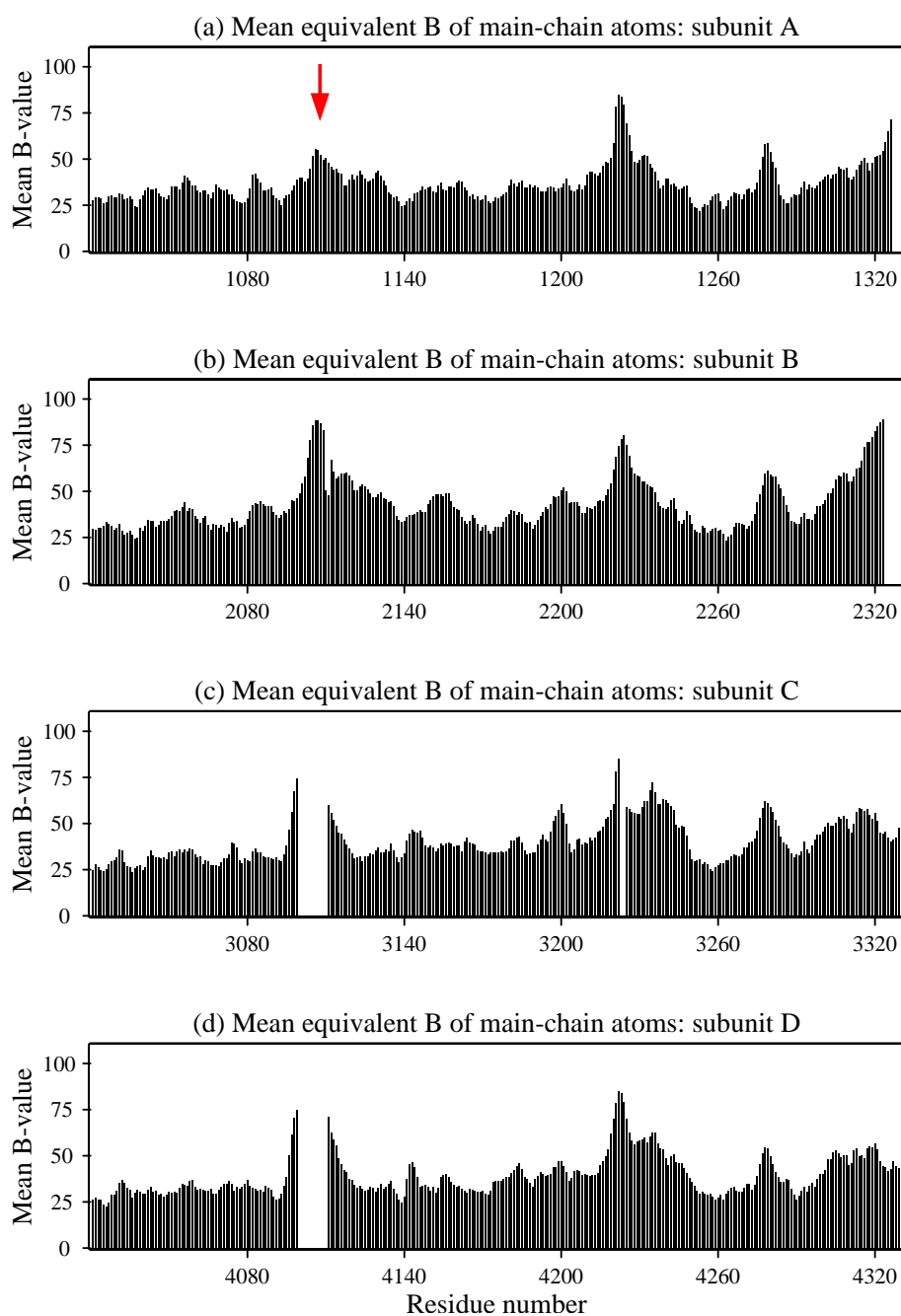


Abbildung 3.26: Die B -Faktoren (in \AA^2) der Hauptketten des L-HicDH-Proteins mit 2-Oxocaproat. Auffällig ist, daß der Coenzym-Loop der Untereinheit A (um Pro107, Pfeil) keine signifikant erhöhten B -Faktoren hat. Dies unterscheidet die Untereinheit A von der Untereinheit B und allen anderen hier vorgestellten Strukturen.

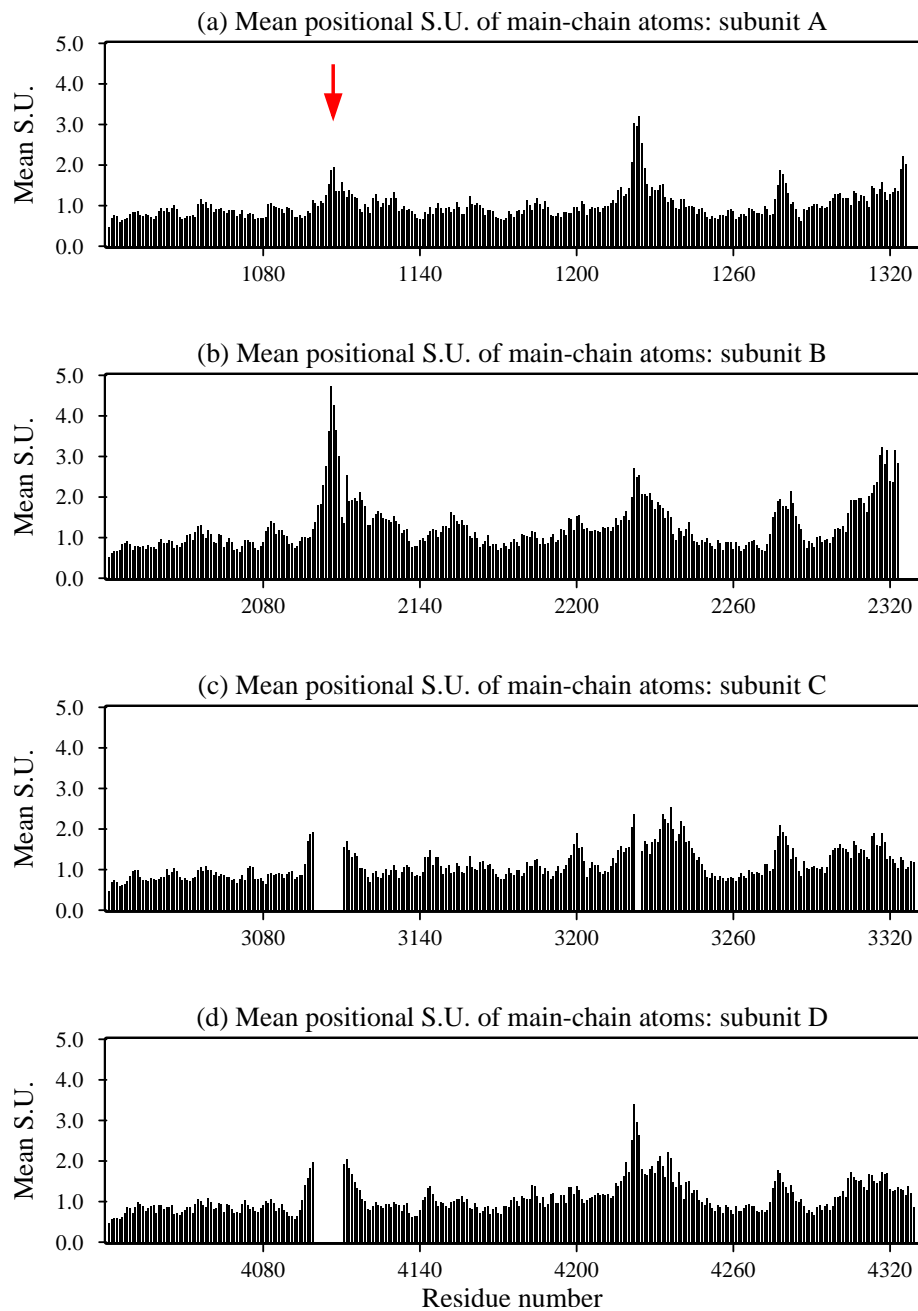


Abbildung 3.27: Die durchschnittlichen Standard-Unsicherheiten (S.U., in Å) der Hauptkettenatome des L-HicDH-Proteins mit 2-Oxocaproat. Der Coenzym-Loop der Untereinheit A (Pfeil) ist sicherer bestimmt als in Untereinheit B und allen anderen hier vorstellten Strukturen.

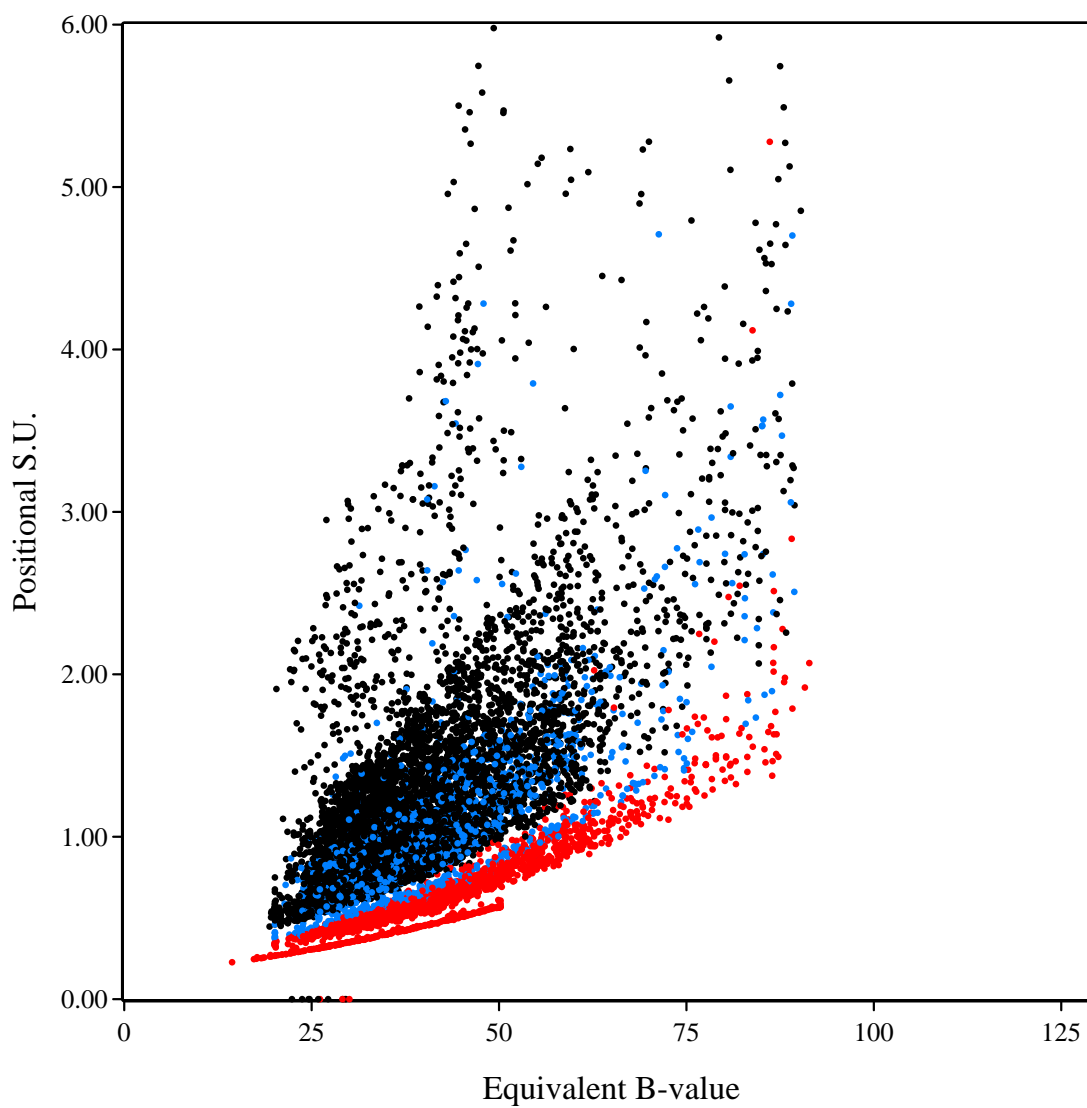


Abbildung 3.28: Die Standard-Unsicherheiten (S.U., in Å) der Atomkoordinaten des L-HicDH-2-Oxocaproat-Modells (aufgetragen gegen den jeweiligen B -Faktor in Å²). 42 Atome haben eine S.U. > 6 Å und sind nicht abgebildet. Schwarz: Kohlenstoff, Blau: Stickstoff, Rot: Sauerstoff.

sie durch NCS *restraints* verbunden (bis auf Gln104 und Asp105).

Die Elektronendichten des Coenzym-Loops der Untereinheit A, sowie die aktiven Zentren der Untereinheiten A und D sind in den Abbildungen 3.32 bis 3.35 gezeigt. Sowohl das Substrat 2-Oxocaproat (PDB-Name OCA) als auch NAD⁺ und alle Seitenketten inkl. Arg111 sind durch die Dichte gut definiert. Nur C6 von OCA ragt aus der bei 1.2 σ konturierten Dichte heraus. Das im Enzym gebundene 2-Oxocaproat ist offensichtlich um die Achse C4–C5 drehbar und daher in C6 fehlgeordnet.

Tabelle 3.13: Kristallkontakte unter 5 Å des Coenzym-Loops (Untereinheiten A und B von L-HicDH mit 2-Oxocaproat).

Asymmetrische Einheit			Symmetrieäquivalent			Distanz [Å]
Untereinheit	Rest	Atom	Untereinheit	Rest	Atom	
A	Leu102	C δ 2	A	Pro107	C γ	4.24
A	Asp105	O δ 2	A	Asp105	O δ 2	3.95
A	Asp105	O	A	Asp105	O	4.44
A	Pro107	C β	A	Ala113	O	3.38
A	Pro107	C β	A	Lys116	N ζ	3.71
A	Pro107	C γ	A	Ala113	C β	4.71
A	Pro107	O	A	Lys116	C ϵ	4.72
A	Thr108	N	A	Lys116	N ζ	4.70
A	Thr108	N	A	Arg321	N η 1	4.37
A	Thr108	O γ	A	Arg321	N η 2	4.70
A	Thr108	O γ	A	Glu324	O ϵ 1	4.32
B	Asp105	O δ 1	B	Asp105	O δ 1	2.64

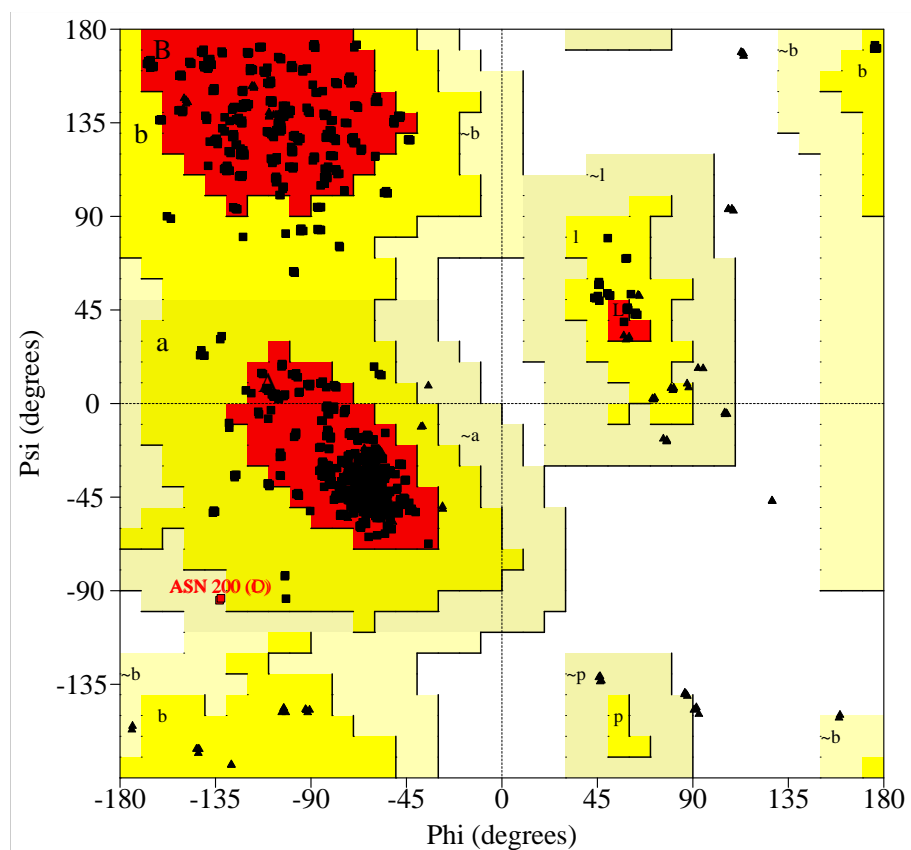


Abbildung 3.29: Ramachandran-Plot des L-HicDH-Modells mit 2-Oxocaproat. A, B, L (rot): bevorzugte Regionen; a, b, l, p (gelb): erlaubte Regionen; \sim a, \sim b, \sim l, \sim p (hellgelb): tolerierte Regionen. In dieser Struktur gibt es keine Residuen mit verbotenen Konformationen. Asn200 (C und D) weisen eine tolerierte Konformation auf.

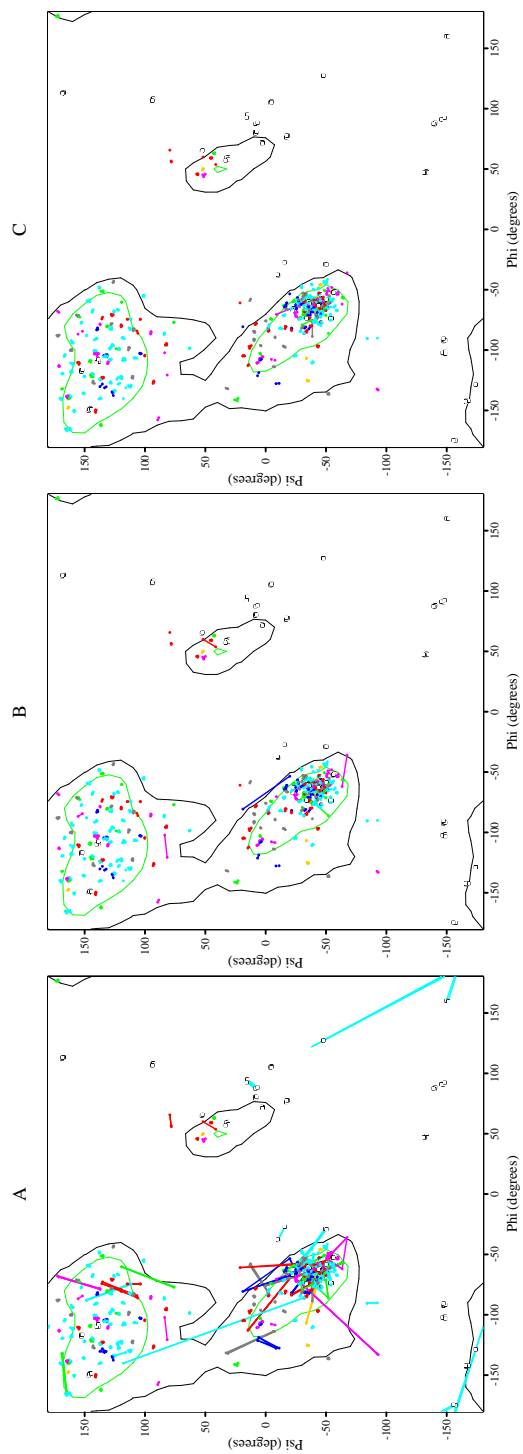


Abbildung 3.30: Kleywegt-Plots des L-HicDH-2-Oxocaproat-Modells. Verbunden sind in A alle vier Untereinheiten; in B die geschlossenen Untereinheiten A und B; und in C die offenen Untereinheiten C und D. Die Aminosäuren sind mit verschiedenen Farben markiert (siehe Legende der Abbildung 3.21). Die Untereinheiten A/B und C/D weichen kaum voneinander ab.

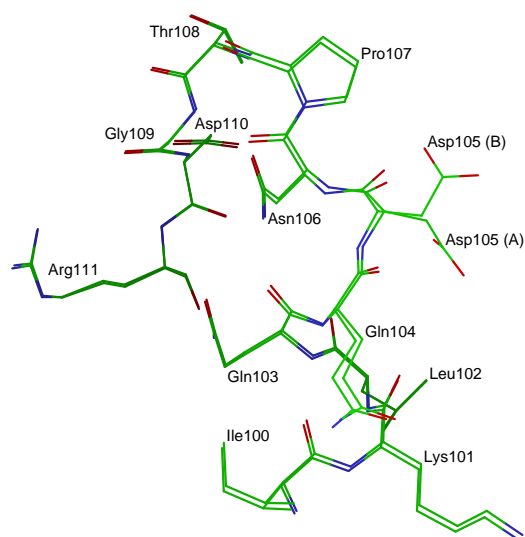


Abbildung 3.31: Der Coenzym-Loop der geschlossenen Untereinheiten (A und B) von L-HicDH mit 2-Oxocaproat. Die Kohlenstoffatome sind grün. Die Strukturen sind überlagert. Sie unterscheiden sich nur in Gln104 und Asp105.

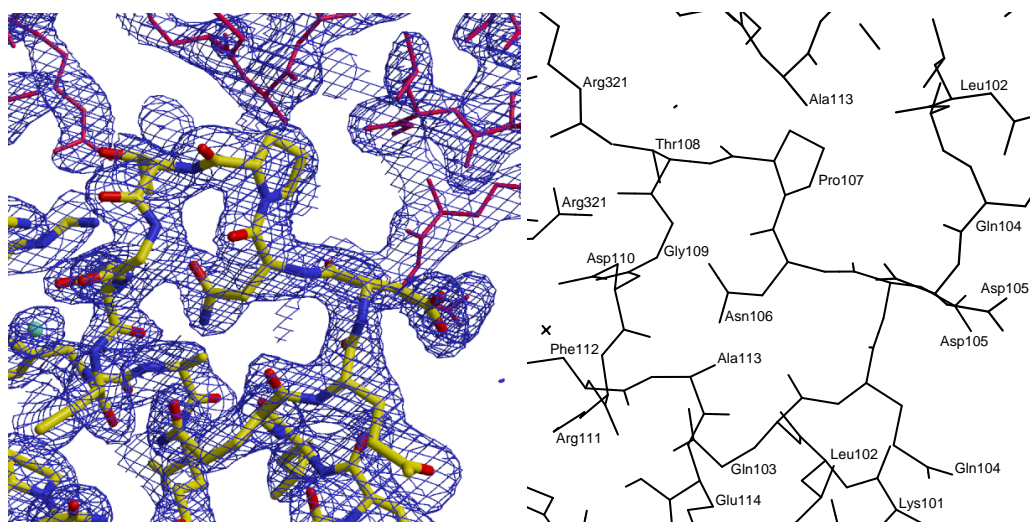


Abbildung 3.32: Der Coenzym-Loop der geschlossenen Untereinheit A von L-HicDH mit 2-Oxocaproat. Die abgebildete σ_A ($2mF_o - DF_c$)-Elektronendichte ist bei 1.2σ konturiert. Rot: symmetrieäquivalenter Bereich.

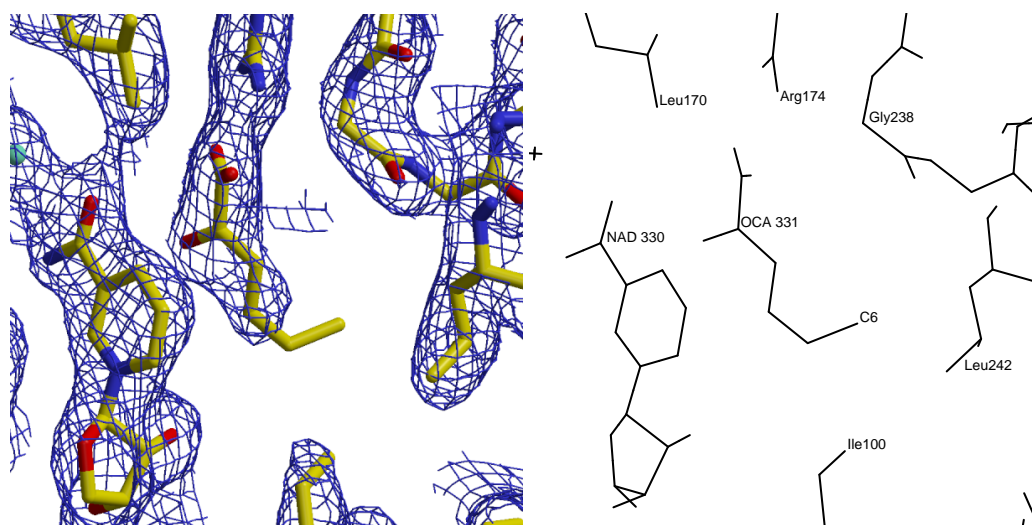


Abbildung 3.33: Das aktive Zentrum der geschlossenen Untereinheit A von L-HicDH mit 2-Oxocaproat. Links mit σ_A ($2mF_o - DF_c$)-Elektronendichte (bei 1.2σ), rechts mit Bezeichnung der Aminosäuren. Das Substrat 2-Oxocaproat (Kürzel OCA) ist gut definiert, nur Atom C6 befindet sich außerhalb der Elektronendichte. Auch das Coenzym NAD^+ liegt in einer deutlichen Elektronendichte.

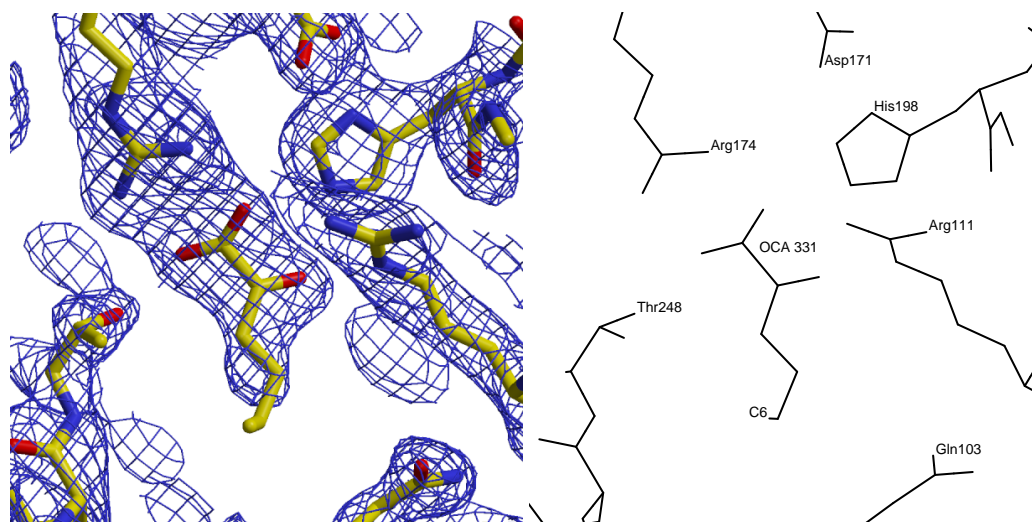


Abbildung 3.34: 2-Oxocaproat im aktiven Zentrum der Untereinheit A aus einem anderen Blickwinkel als Abbildung 3.33. Links mit σ_A ($2mF_o - DF_c$)-Elektronendichte (bei 1.2σ), rechts mit Bezeichnung der Aminosäuren. Auch hier ist zu erkennen, daß 2-Oxocaproat (Kürzel OCA) bis auf Atom C6 gut definiert ist. Außerdem liegt Arg111 in einer deutlichen Elektronendichte.

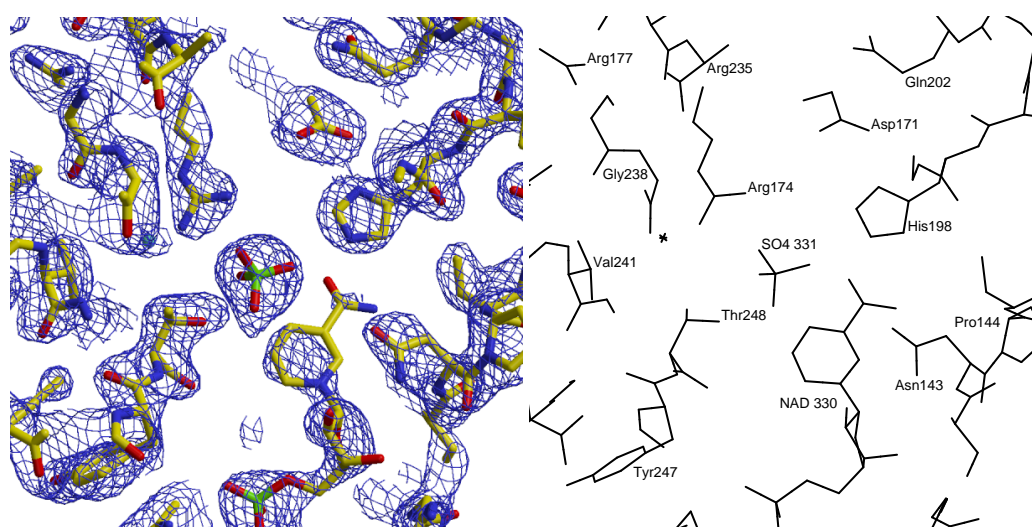


Abbildung 3.35: Das aktive Zentrum der offenen Untereinheit D (L-HicDH mit 2-Oxo-caproat). Links Struktur und σ_A ($2mF_0 - DF_c$)-Elektronendichte (bei 1.2σ), rechts mit den Bezeichnungen. An Stelle des Substrats ist hier ein Sulfat gebunden, dessen tetraedrische Form in der Elektronendichte deutlich zu erkennen ist. NAD^+ ist nicht so gut definiert wie in der Untereinheit A (Abbildung 3.33).

3.8.3 L-HicDH mit 2-Oxoisocaproat

Die Kristalle des ternären Komplexes aus L-HicDH, NAD⁺ und 2-Oxoisocaproat wuchsen in der Form 1. Sie wurden bei Raumtemperatur vermessen und waren unverzwilligt. Die Struktur wurde mit CNS gelöst. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.14 dargestellt. Der *R*-Wert ist 18.6 %, der freie *R*-Wert 20.1 %. SHELXL berechnete aus dem fertigen Modell *R*-Werte von 21.9 % (für $F_o > 4\sigma F_o$) und 22.2 % (für alle F_o).

Tabelle 3.14: Ergebnis der Strukturlösung von L-HicDH mit 2-Oxoisocaproat.

Raumgruppe	$P3_221$ (Nr. 154)
Zellgröße [Å]	$a = b = 135.8, c = 205.4$
Verfeinerungsprogramm	CNS
Anzahl der freien/gesamten Reflexe	1 272/84 024
Atome des Modells (davon Wasser/Sonstige)	9 591 (314/213*)
Zwillingsregel	—
Zwillingsanteil α nach Yeates/verfeinert [%]	$0.014 \pm 0.019/0^{**}$
maximale Auflösung [Å]	2.35
Ramachandran: bevorzugt/erlaubt/toleriert/verboten [%]	92.3/7.3/0.2/0.2
<i>R</i> -Wert/freier <i>R</i> -Wert [%]	18.6/20.1
freier Luzzati-Wert [Å]	0.30
freier σ_A -Wert [Å]	0.31
Durchschnittlicher <i>B</i> -Faktor nach Wilson/verfeinert [Å ²]	39/40
Bindungslängen: RMSD von der idealisierten Geometrie [Å]	0.006
Bindungswinkel: RMSD von der idealisierten Geometrie [°]	1.15

* 176 Atome in NAD⁺, 18 in 2-Oxoisocaproat, 9 in Benzamidin und 10 in Sulfat

** festgelegt

Die Kontaktflächen sind in der Tabelle 3.15 aufgelistet. Die genaue Vollständigkeit des Proteins ist in der Abbildung 3.36 als Quasi-Sequenzalignment ersichtlich. Die *B*-Faktoren sind durchschnittlich 40 Å². Abbildung 3.37 zeigt den Verlauf der Temperaturfaktoren in der Hauptkette, während in Abbildung 3.38 die entsprechenden Standard-Unsicherheiten dargestellt sind.

Die durchschnittliche Positionsungenauigkeit beträgt 0.3 Å (freier Luzzati-Wert und freier σ_A -Wert). Abbildung 3.39 zeigt den Zusammenhang zwischen *B*-Faktoren und Positionsungenauigkeit (Standard-Unsicherheit).

Jede Untereinheit hat ein NAD⁺-Molekül, das in der Elektronendichte gut defi-

lhicdh			AR K I G I I G L G	NV G A A V A H G L	40
coi_a			AR K I G I I G L G	NV G A A V A H G L	
coi_b			AR K I G I I G L G	NV G A A V A H G L	
coi_c			AR K I G I I G L G	NV G A A V A H G L	
coi_d			AR K I G I I G L G	NV G A A V A H G L	
lhicdh	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	80
coi_a	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
coi_b	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
coi_c	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
coi_d	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
lhicdh	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N I	K L Q Q D N P T G D	R F A E L K F T S S	120
coi_a	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N I	A L Q Q D A P A G A	R F A E L K F T S S	
coi_b	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N I	A L Q Q A . . . A	G F A E L A F T S S	
coi_c	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N A A G D	R F A E L K F T S S	
coi_d	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N A G D	R F A E L K F T S S	
lhicdh	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	160
coi_a	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
coi_b	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
coi_c	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
coi_d	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
lhicdh	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	200
coi_a	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
coi_b	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
coi_c	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
coi_d	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
lhicdh	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G D I D L A A I	E E E A R K G G F T	240
coi_a	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G A I D L A A I	E E E A R K G G F T	
coi_b	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G A I D L A A I	E E E A R K G G F T	
coi_c	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G A A D L A A I	E E E A A A G G F T	
coi_d	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G A A D L A A I	E E E A A A G G F T	
lhicdh	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	280
coi_a	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	
coi_b	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	
coi_c	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	
coi_d	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	
lhicdh	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	320
coi_a	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	
coi_b	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	
coi_c	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	
coi_d	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	
lhicdh	R F D E I V D T L	329			
coi_a	R F D E I V D T L				
coi_b	R F D E I V D T .				
coi_c	R F D E I V D T L				
coi_d	R F D E I V D T L				

Abbildung 3.36: Die Vollständigkeit der L-HicDH-Struktur mit 2-Oxoisocaproat als Quasi-Sequenzalignment. lhicdh: vollständige Sequenz; coi_a: Struktur der Untereinheit A, usw. Schwarz: Bereiche, in denen Atome oder ganze Aminosäuren fehlen.

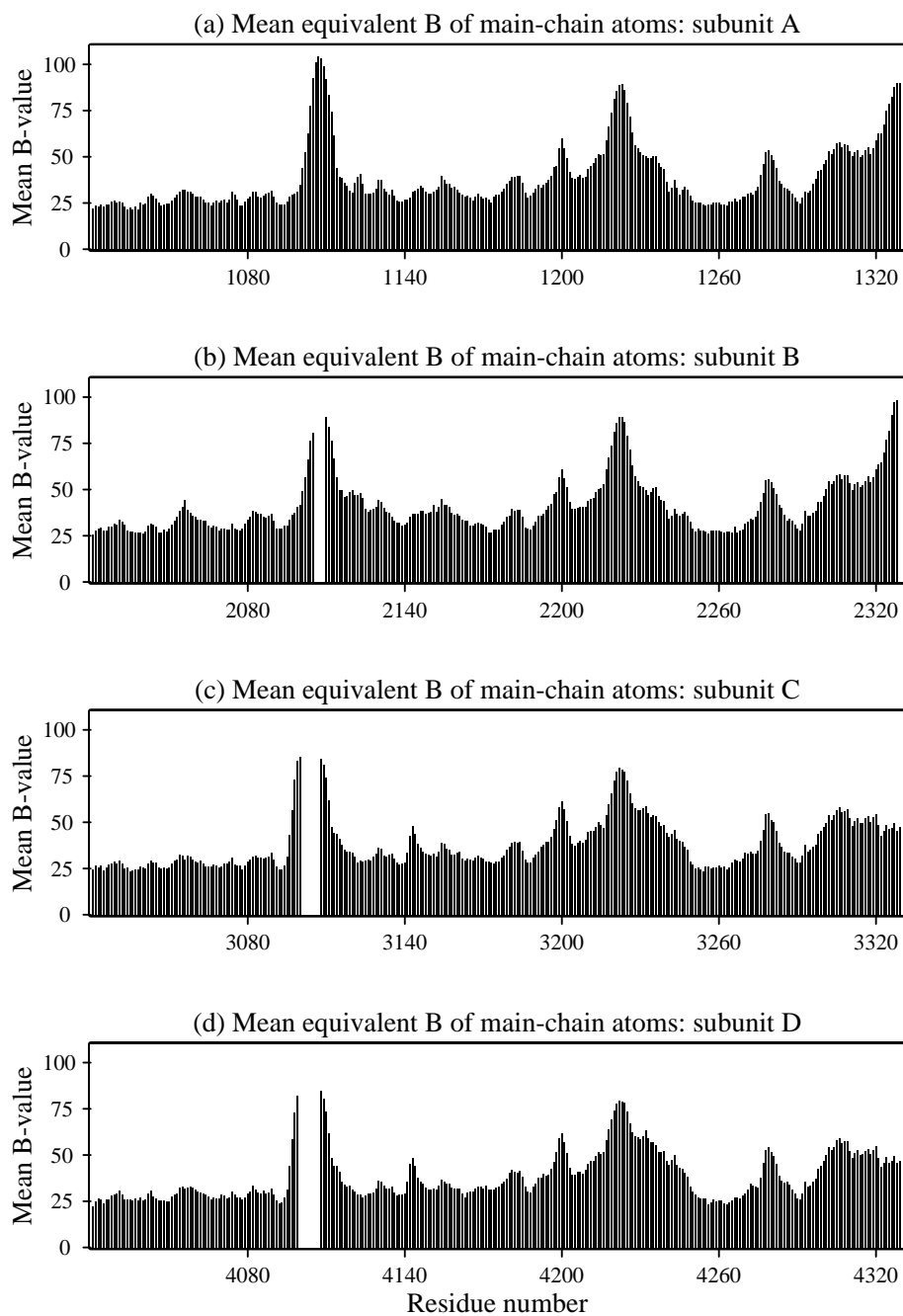


Abbildung 3.37: Die B -Faktoren (in \AA^2) der Hauptketten von L-HicDH im ternären Komplex mit NAD^+ und 2-Oxisocaproat.

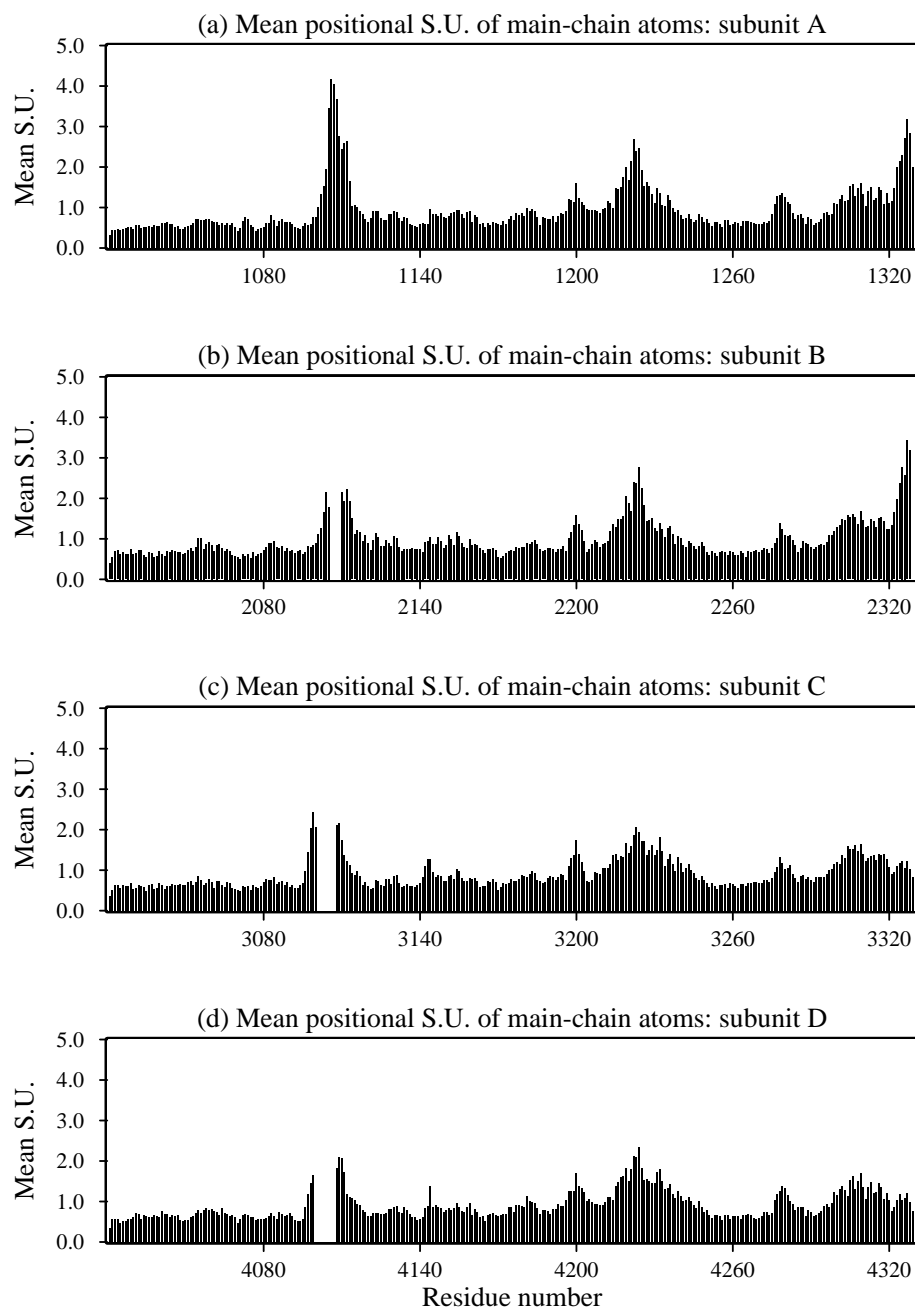


Abbildung 3.38: Die durchschnittlichen Standard-Unsicherheiten (S.U., in Å) der Hauptkettenatome des L-HicDH-Proteins mit 2-Oxoisocaproat.

Tabelle 3.15: Kontaktflächen von L-HicDH mit 2-Oxoisocaproat.

Oberfläche der dissoziierten Monomere	$A_{\Sigma M}$	53 047 Å ²	100 %
Kristallkontakte	ΔA_K	3 098 Å ²	5.8 %
Kontakte im Tetramer	ΔA_T	13 875 Å ²	26.2 %
Kontakte der <i>P</i> -Achse (AB/CD)	ΔA_P	3 489 Å ²	6.6 %
Kontakte der <i>Q</i> -Achse (AC/BD)	ΔA_Q	8 336 Å ²	15.7 %
Kontakte der <i>R</i> -Achse (AD/BC)	ΔA_R	2 227 Å ²	4.2 %

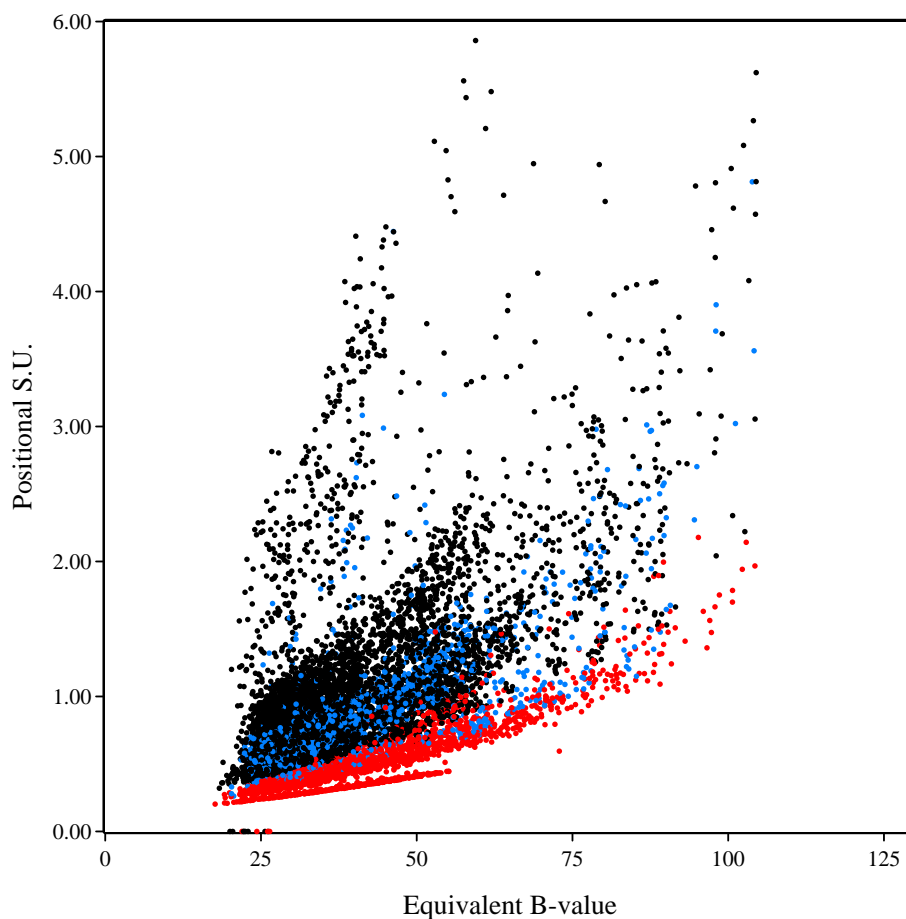


Abbildung 3.39: Die Standard-Unsicherheiten (S.U., in Å) gegen die *B*-Faktoren (in Å²) der Atomkoordinaten des L-HicDH-2-Oxoisocaproat-Modells. 37 Atome haben eine S.U. > 6 Å und sind nicht abgebildet. Schwarz: Kohlenstoff, Blau: Stickstoff, Rot: Sauerstoff.

niert ist. Darüberhinaus ist in den aktiven Zentren der geschlossenen Untereinheiten A und B jeweils ein 2-Oxoisocaproat-Molekül gebunden (PDB-Bezeichnung COI). An den entsprechenden Stellen sind in den offenen Untereinheiten C und D Sulfationen positioniert. Außerdem gab es im Kristallkontakt zwischen den Untereinheiten C und D des Symmetrieäquivalents Rest-Elektronendichte, die sich am besten durch Benzamidin (PDB-Bezeichnung BDN) interpretieren ließ, welches ein Bestandteil des verwendeten Proteaseinhibitors war. Die Abbildungen 3.42 bis 3.44 zeigen die Elektronendichten des Substrats, des Sulfats und des Benzamidins.

Der Ramachandran-Plot (Abbildung 3.40) zeigt vier Aminosäuren in ungewöhnlichen Bereichen. Sie liegen an den Grenzen zur nächstwahrscheinlichen Region. In der verbotenen (*disallowed*) Region liegen Asn200 der Untereinheiten C und D. Ihre Konformation ist gleich. Den Einfluß der NCS auf die Hauptketten ist den Kleywegt-Plots der Abbildung 3.41 zu entnehmen. In den meisten Bereichen gilt eine vierfache NCS. Wo diese nicht anwendbar war, wurde mit wenigen Ausnahmen eine zweifache verwendet.

Die Elektronendichte des Coenzym-Loops der Untereinheit A ist in der Abbildung 3.45 gezeigt. Der Loop war nur in der Untereinheit A bestimmbar und hat dort B -Faktoren über 100 \AA^2 . In diesem Bereich haben die Sauerstoffatome eine Standard-Unsicherheit von $1\text{--}2 \text{ \AA}$ (rote Punkte in Abbildung 3.39). Dies kann als Wert für die Hauptkette des gesamten Loops gelten. In der Elektronendichte war der Verlauf der Hauptkette und die meisten Seitenketten erkennbar. In der Nähe von Pro107 befindet sich die Seitenkette von Asp110 der Untereinheit D eines symmetrieäquivalenten Bereiches. Dieser Kristallkontakt ist allerdings recht schwach: der Abstand zwischen den nächsten Atomen von Pro107 (A) zu Asp110 (D) beträgt 4 \AA .

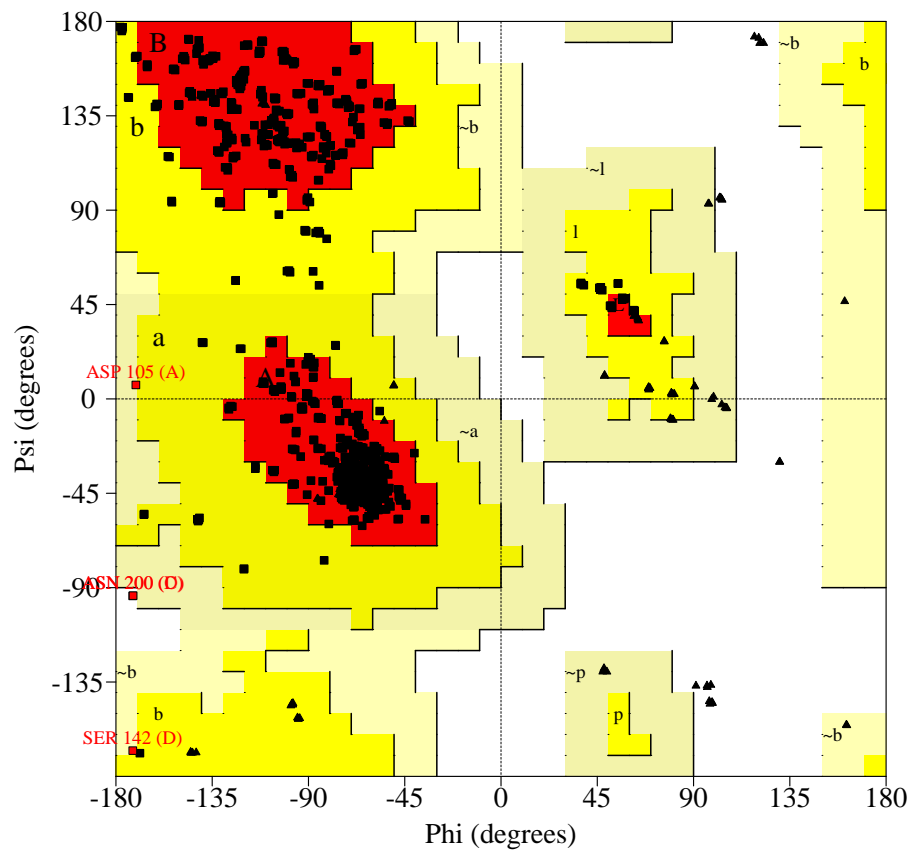


Abbildung 3.40: Ramachandran-Plot des L-HicDH-Modells mit 2-Oxoisocaproat. A, B, L (rot): bevorzugte Bereiche; a, b, l, p (gelb): erlaubte Bereiche; ~a, ~b, ~l, ~p (hellgelb): tolerierte Bereiche. Asp105 (A) und Ser142 (D) haben eine tolerierte und Asn200 (C+D) eine verbotene Konformation.

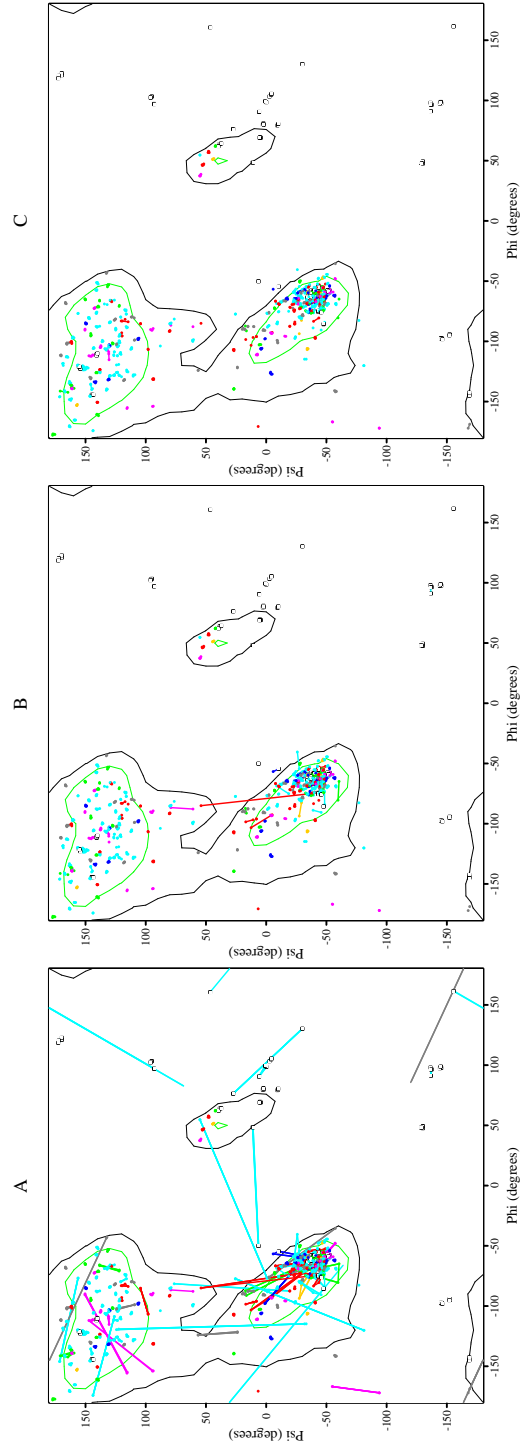


Abbildung 3.41: Kleywegt-Plots der L-HicDH-2-Oxoisocaproat-Struktur. Verbunden sind in A: alle vier Untereinheiten; in B: die geschlossenen Untereinheiten A und B; und in C: die offenen Untereinheiten C und D. Die Aminosäuren sind mit verschiedenen Farben markiert (siehe Legende der Abbildung 3.21).

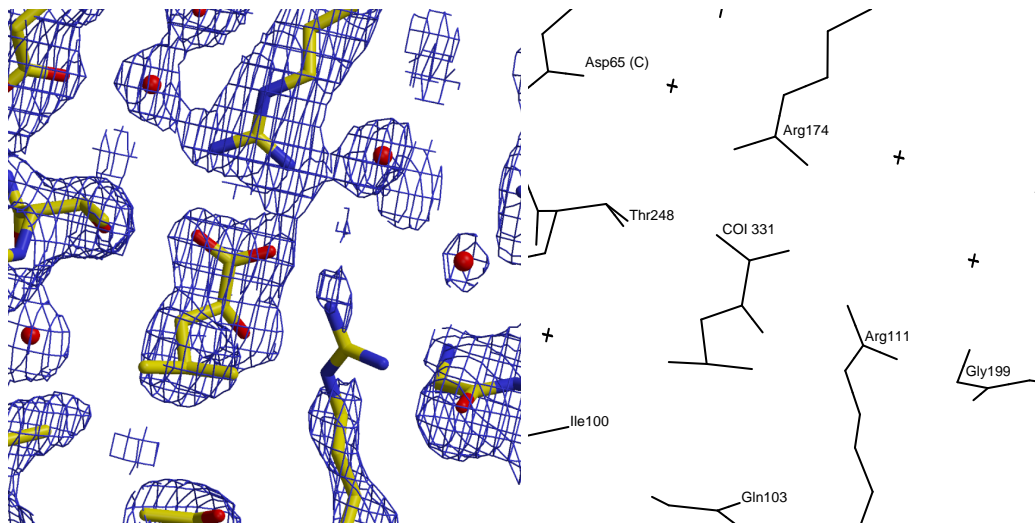


Abbildung 3.42: Das aktive Zentrum der geschlossenen Untereinheit A des ternären Komplexes mit 2-Oxoisocaproat. Die σ_A ($2mF_o - DF_c$)-Elektronendichte ist bei 0.9σ konturiert. Das Substrat 2-Oxoisocaproat (PDB-Bezeichnung COI) ist gut definiert.

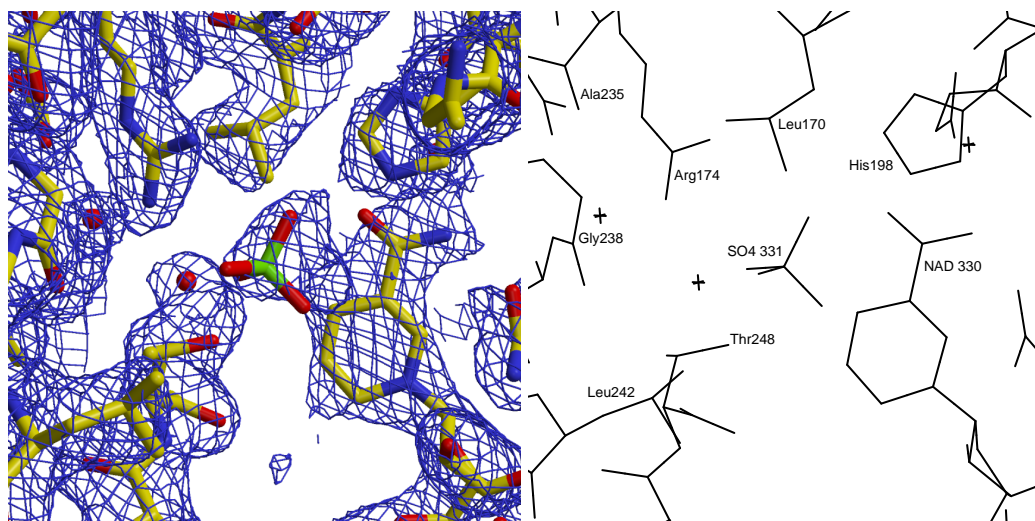


Abbildung 3.43: Die Struktur des aktiven Zentrums der offenen Untereinheit C (L-HicDH) mit 2-Oxoisocaproat). Die σ_A ($2mF_o - DF_c$)-Elektronendichte ist bei 1σ konturiert. An Stelle des Substrats ist ein Sulfation gebunden.

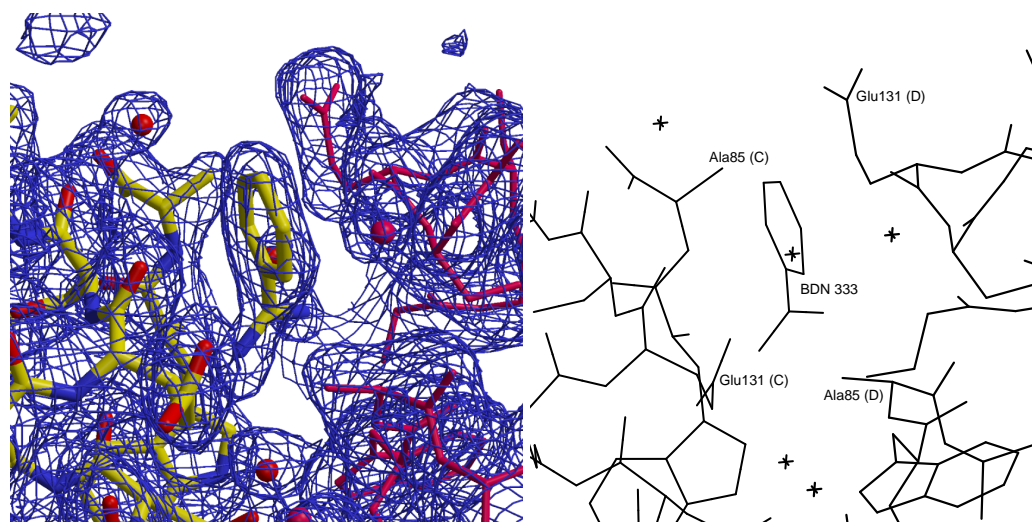


Abbildung 3.44: Bei L-HicDH mit 2-Oxoisocaproat ist im Kristallkontakt zwischen den Untereinheiten C und D des Symmetrieäquivalents ein Benzamidin (BDN) gebunden (mit bei 1σ konturierter σ_A ($2mF_o - DF_c$)-Elektronendichte).

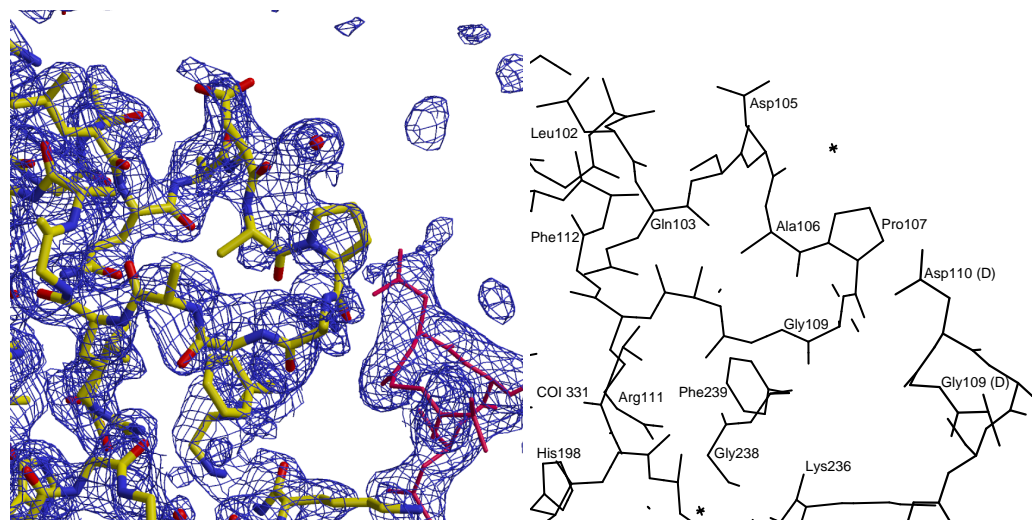


Abbildung 3.45: Der Coenzym-Loop der geschlossenen Untereinheit A (L-HicDH mit 2-Oxoisocaproat). Die Konturierung der σ_A ($2mF_o - DF_c$)-Elektronendichte ist 0.9σ . Rot: Symmetrieäquivalente Struktur (Untereinheit D). Der Abstand zwischen Pro107 (A) und Asp110 (D) ist perspektivisch verkürzt, er beträgt 4 \AA . Arg111 verdeckt das Substrat 2-Oxoisocaproat (OCA).

3.8.4 L-HicDH mit Phenylglyoxylat

Diffractionsdaten des ternären L-HicDH-NAD⁺-Phenylglyoxylat Komplexes führten zu einem N(Z)-Plot (Abbildung 3.46), der eine deutliche Abweichung der Intensitätsverteilung von den theoretischen Werten aufweist: ein Warnhinweis auf eine Verzwilligung. Der Yeates-Test ergab eine Abschätzung des Zwillingsanteils von 11 %. SHELXL wurde verwendet, um den Zwillingsanteil als eigenen Parameter verfeinern und ergab einen Anteil von 14 %. Die Kenndaten des Ergebnisses sind in Tabelle 3.16 zusammengefasst. Tabelle 3.17 zeigt die Größe der Interaktionsflächen.

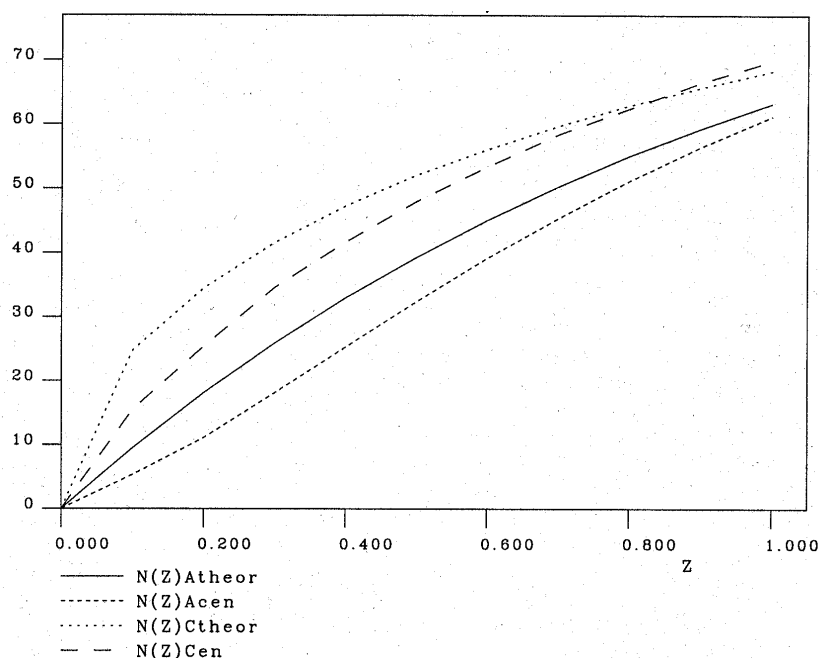


Abbildung 3.46: Der N(Z)-Plot des Datensatzes des L-HicDH-NAD⁺-Phenylglyoxylat Komplexes. Beide Kurven weichen von ihrem theoretischen Verlauf ab.

Die Topologie des Proteins gleicht den anderen hier vorgestellten Komplexen. Die beiden Untereinheiten A und B sind geschlossen und entsprechen der Struktur des Enzyms mit 2-Oxocaproat. Die Untereinheiten C und D sind offen.

In den geschlossenen Untereinheiten befinden sich je ein Phenylglyoxylat (PDB-Bezeichnung PGO) im aktiven Zentrum, während in den offenen Untereinheiten Sulfat bzw. Wasser an der entsprechenden Stelle gebunden sind. Zwischen den Seitenketten von Arg210 (C und D) ist zusätzlich ein Sulfation koordiniert. Außerdem war in

Tabelle 3.16: Ergebnis der Strukturlösung von L-HicDH mit Phenylglyoxylat.

Raumgruppe	$P3_221$ (Nr. 154)
Zellgröße [Å]	$a = b = 134.7, c = 201.4$
Verfeinerungsprogramm	SHELXL
Anzahl der freien/gesamten Reflexe	5 913/115 890
Atome des Modells (davon Wasser/Sonstige)	9 644 (350/217*)
Zwillingsregel	$(-h-kl)$
Zwillingsanteil α nach Yeates/verfeinert [%]	$10.8 \pm 0.6/14.1$
maximale Auflösung [Å]	2.14
Ramachandran: bevorzugt/erlaubt/toleriert/verboten [%]	89.1/10.3/0.6/—
R -Wert ($F_o > 4\sigma F_o$ /alle F_o) [%]	25.0/26.6
freier R -Wert ($F_o > 4\sigma F_o$ /alle F_o) [%]	30.2/32.2
Durchschnittlicher B -Faktor nach Wilson/verfeinert [Å ²]	25/38
Bindungslängen: RMSD von der idealisierten Geometrie [Å]	0.005
Bindungswinkel: RMSD von der idealisierten Geometrie [°]	1.453

* 176 Atome in NAD⁺, in 22 Phenylglyoxylat, 9 in Benzamidin und 10 in Sulfat

Tabelle 3.17: Kontaktflächen von L-HicDH mit Phenylglyoxylat.

Oberfläche der dissoziierten Monomere	$A_{\Sigma M}$	53 418 Å ²	100 %
Kristallkontakte	ΔA_K	3 846 Å ²	7.2 %
Kontakte im Tetramer	ΔA_T	14 149 Å ²	26.5 %
Kontakte der P -Achse (AB/CD)	ΔA_P	3 441 Å ²	6.4 %
Kontakte der Q -Achse (AC/BD)	ΔA_Q	8 534 Å ²	16.0 %
Kontakte der R -Achse (AD/BC)	ΔA_R	2 432 Å ²	4.6 %

den Elektronendichten zwischen den Resten Glu131 der Untereinheit C und der Untereinheit D des symmetrieäquivalenten Komplexes ein Benzamidin (BDN) erkennbar, wie es auch bei L-HicDH mit 2-Oxoisocaproat der Fall war (siehe Abbildung 3.44).

Die Vollständigkeit des Modells ist in Abbildung 3.48 dargestellt. Bis auf die Seitenketten der Residuen Lys101 und Asp110 ist der Coenzym-Loop der geschlossenen Untereinheit A vollständig gelöst. Außerdem war in den Elektronendichten der Verlauf des Coenzym-Loops der offenen Untereinheit C erkennbar. Dort wurden vier Glycine eingebaut. Die *B*-Faktoren und die Standard-Unsicherheiten der Proteinketten zeigen die Abbildungen 3.49 und 3.50. In den Darstellungen finden sich Peaks bei dem Coenzym-Loop um Pro107 mit durchschnittlichen *B*-Faktoren über 75 \AA^2 und Standard-Unsicherheiten über 3 \AA .

Im Ramachandran-Plot sind sieben Residuen im tolerierten Bereich (siehe Abbildung 3.51): Asp105 (A), Asn106 (C), Pro107 (C), Asn200 (A und B) und Ala222 (A und B). Die Kleywegt-Plots veranschaulichen, daß es deutliche Konformationsunterschiede zwischen den einzelnen Untereinheiten gibt (Abbildung 3.52a), daß diese aber nicht zwischen den Untereinheiten A und B bzw. C und D auftreten (Abbildung 3.52b und c).

Um einen Eindruck von dem Ergebnis zu vermitteln, sollen hier Bereiche in der Struktur gezeigt werden, die für das Verständnis der Enzymreaktion wichtig sind, aber zum Teil hohe *B*-Faktoren und Standard-Unsicherheiten aufweisen. Die Abbildung 3.53 zeigt die Bindung des Substrats Phenylglyoxylat (PDB-Kürzel PGO) im aktiven Zentrum der Untereinheit A. Phenylglyoxylat ist bis auf C5–8 gut definiert. Offensichtlich ist auch hier, wie bei 2-Oxocaproat (siehe Abschnitt 3.8.2), der hydrophobe Teil des Substrates nicht vollständig durch die Bindungstasche des Enzyms fixiert und daher mobiler als der hydrophile Teil.

Abbildung 3.54 gibt ein größeres Bild wieder: den gesamten Coenzym-Loop der Untereinheit A. Er ist zwar nicht so gut durch die Elektronendichte definiert wie die restliche Struktur, aber sein Verlauf ist erkennbar. Neben dem Coenzym-Loop ist auch Phe239 Bestandteil der „Vakuolen“-Hülle und schließt das aktive Zentrum vom Solvens aus. Bei genauer Betrachtung ist zu erkennen, daß Arg111, das durch die Elektronendichte gut definiert ist, an das Substrat bindet.

Die Struktur des offenen Coenzym-Loops der Untereinheit C ist in Abbildung 3.56 gezeigt. Hier hat Arg111 eine andere Konformation als in der Untereinheit A: Es bin-

det an Arg321 und Glu324 der C-terminalen Helix α H (Abbildung 3.57). Durch diese trimere Interaktion werden die positiven Ladungen der Arginine durch die negative Ladung von Glu324 teilweise ausgeglichen.

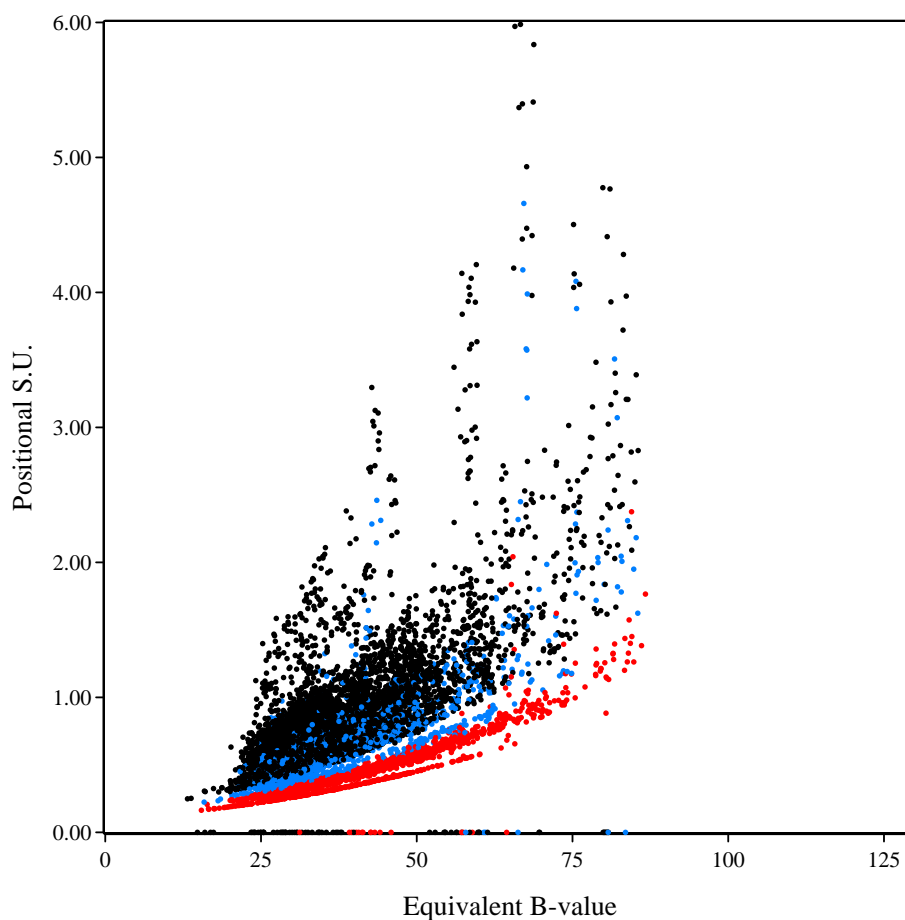


Abbildung 3.47: Die Standard-Unsicherheiten (S.U., in Å) gegen die B -Faktoren (in Å²) der Atomkoordinaten des L-HicDH-Phenylglyoxylat-Modells. 13 Atome haben Standard-Unsicherheiten über 6 Å und sind nicht abgebildet. Schwarz: Kohlenstoff, Blau: Stickstoff, Rot: Sauerstoff.

lhicdh				ARKIGIIGLG	NVGA AVAHGL	40
pg_a				ARKIGIIGLG	NVGA AVAHGL	
pg_b				ARKIGIIGLG	NVGA AVAHGL	
pg_c				ARKIGIIGLG	NVGA AVAHGL	
pg_d				ARKIGIIGLG	NVGA AVAHGL	
lhicdh	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V		80
pg_a	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V		
pg_b	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V		
pg_c	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V		
pg_d	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K	A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V		
lhicdh	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N I	K L Q Q D N P T G D	R F A E L K F T S S		120
pg_a	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N I	A L Q Q D N P T G A	R F A E L A F T S S		
pg_b	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G G G	A G G G A A A A F G S S		
pg_c	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N A	A G G G G N P A G D	R F A E L K F T S S		
pg_d	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N A	A T G D	A F A E L K F T S S		
lhicdh	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A		160
pg_a	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A		
pg_b	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A		
pg_c	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A		
pg_d	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V	I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A		
lhicdh	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N		200
pg_a	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N		
pg_b	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N		
pg_c	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N		
pg_d	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G	E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N		
lhicdh	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G D I D L A A I	E E E A R K G G F T		240
pg_a	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G A I D L A A I	E E E A R K G G F T		
pg_b	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G A I D L A A I	E E E A R K G G F T		
pg_c	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G A I D L A A I	E E E A R K G G F T		
pg_d	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A	D A G A I D L A A I	E E A A R K G G F T		
lhicdh	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M		280
pg_a	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R A D M		
pg_b	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M		
pg_c	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M		
pg_d	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A	K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M		
lhicdh	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q		320
pg_a	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L A Q S R D Y I Q Q		
pg_b	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q		
pg_c	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q		
pg_d	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T	L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q		
lhicdh	R F D E I V D T L	329				
pg_a	A F D E I V D T L					
pg_b	R F D E I V D T L					
pg_c	R F D E I V D T L					
pg_d	R F D E I V D T L					

Abbildung 3.48: Die Vollständigkeit der L-HicDH-Struktur mit Phenylglyoxylat als Quasi-Sequenzalignment. lhicdh: vollständige Sequenz; pg_a: Struktur der Untereinheit A, usw. Schwarz: Bereiche, in denen Atome oder ganze Aminosäuren fehlen.

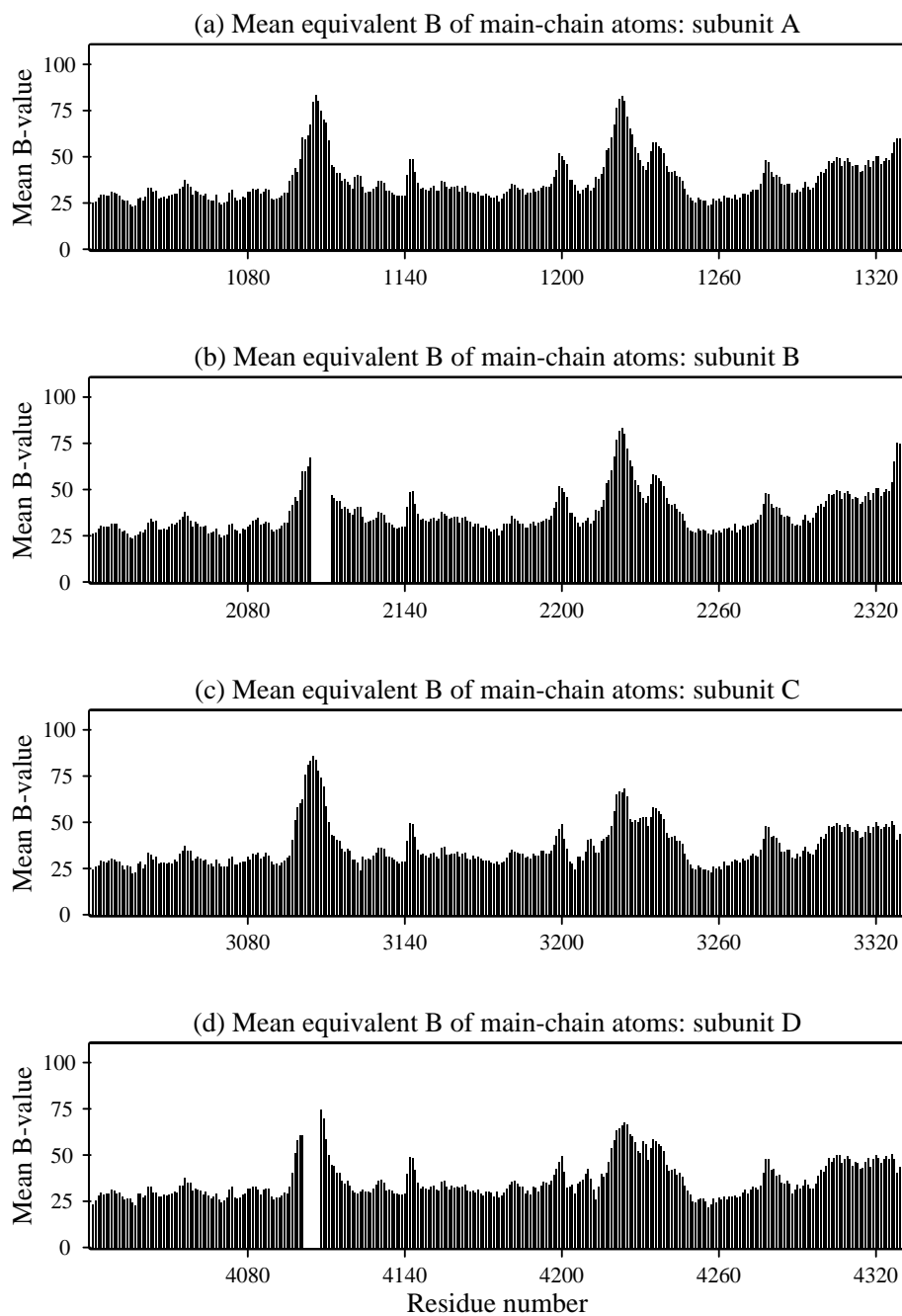


Abbildung 3.49: Die B-Faktoren (in \AA^2) der Hauptketten von L-HicDH im ternären Komplex mit NAD^+ und Phenylglyoxylat.

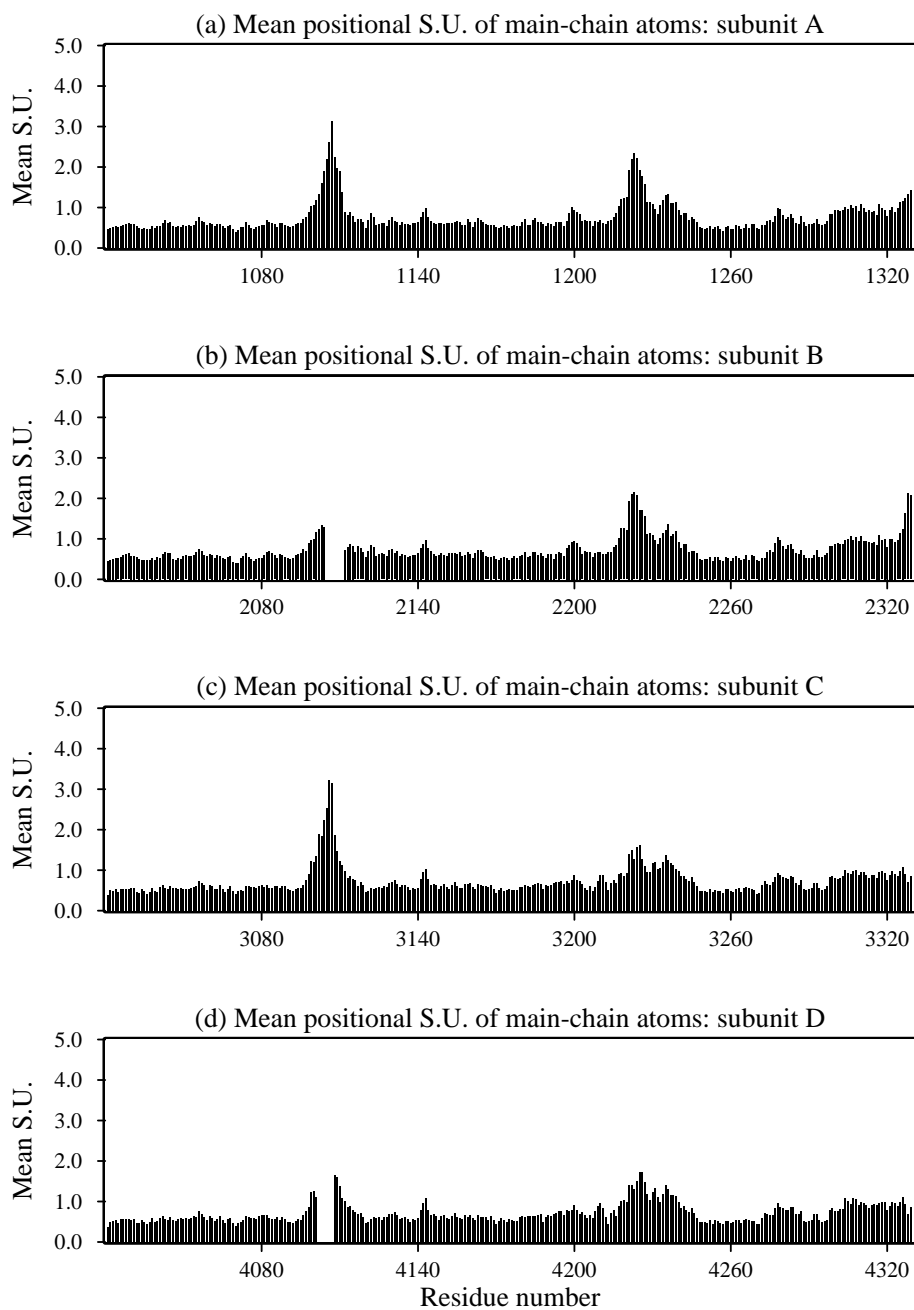


Abbildung 3.50: Die durchschnittlichen Standard-Unsicherheiten (S.U., in Å) der Hauptkettenatome des L-HicDH-Proteins mit Phenylglyoxylat.

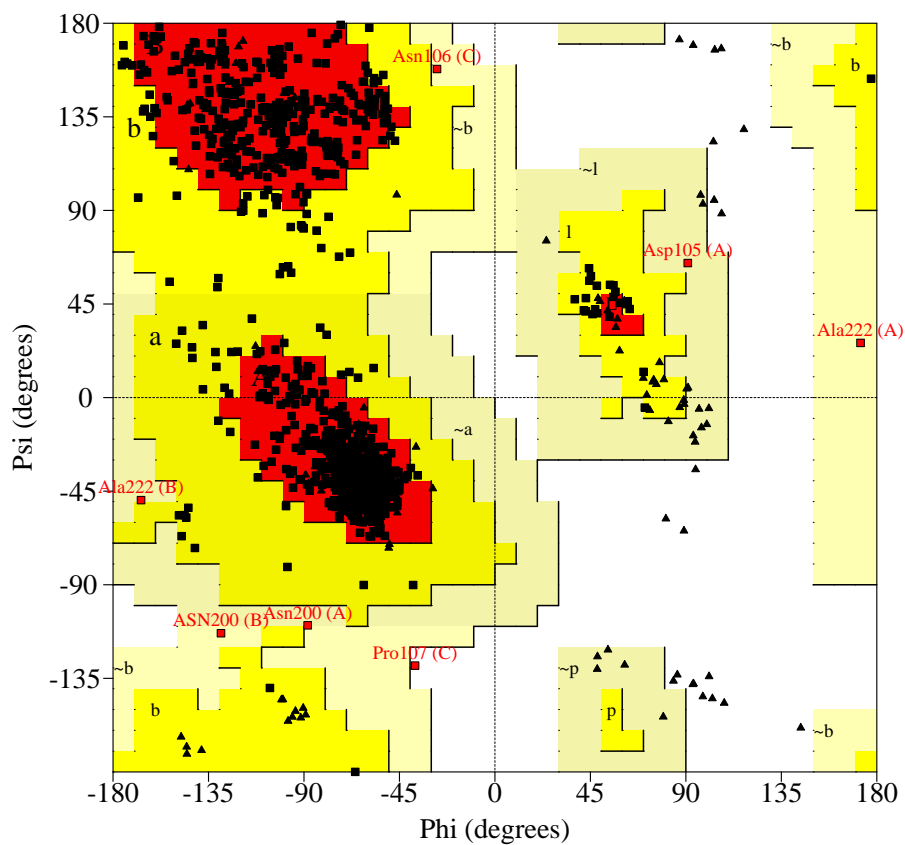


Abbildung 3.51: Ramachandran-Plot des L-HicDH-Modells mit Phenylglyoxylat. A, B, L (rot): bevorzugte Regionen; a, b, l, p (gelb): erlaubte Regionen; ~a, ~b, ~l, ~p (hellgelb): tolerierte Regionen mit Asp105 der Untereinheit A, Asn106 und Pro107 der Untereinheit C, Asn200 und Asp222 der Untereinheiten A und B (Asp222 als Ala verfeinert).

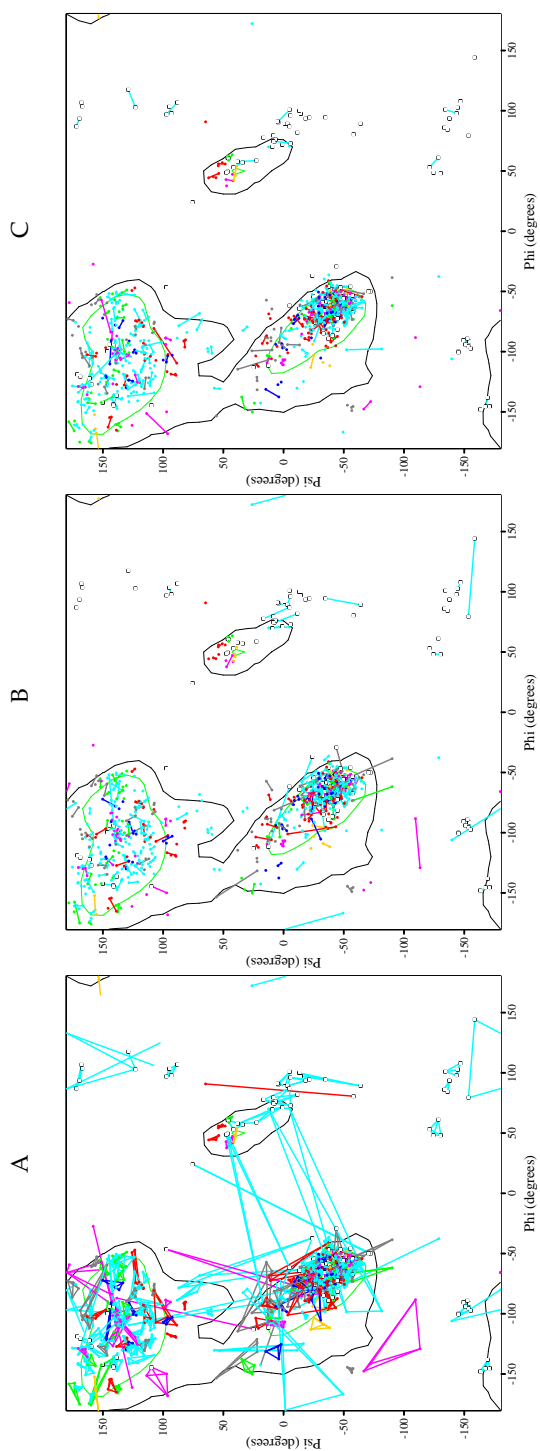


Abbildung 3.52: Kleywegt-Plots der L-HicDH-Phenylglyoxylat-Struktur. Verbunden sind in A: alle vier Untereinheiten; in B: die geschlossenen Untereinheiten A und B; und in C: die offenen Untereinheiten C und D. Die Aminosäuren sind mit verschiedenen Farben markiert (siehe Legende der Abbildung 3.21).

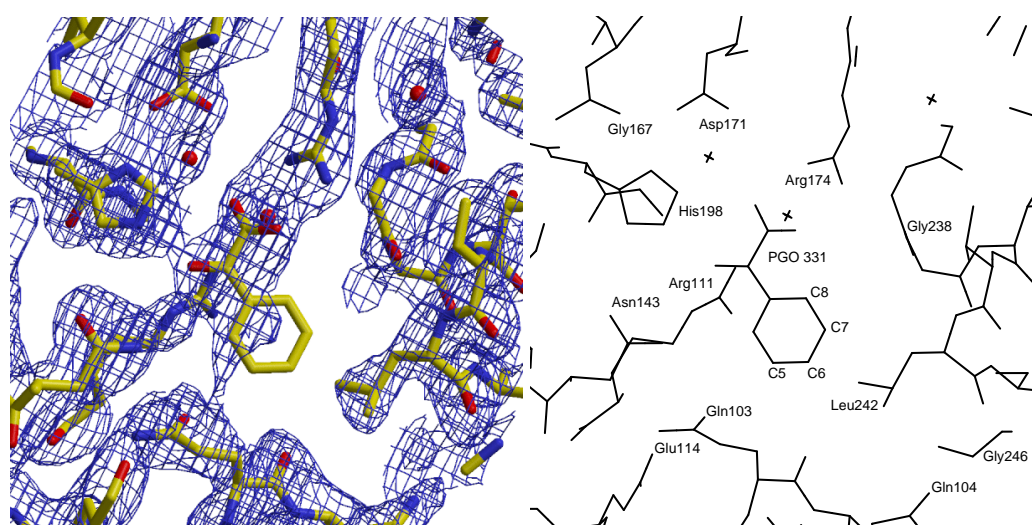


Abbildung 3.53: Das aktive Zentrum der geschlossenen Untereinheit A im L-HicDH-NAD⁺-Phenylglyoxylat Komplex. Die σ_A ($2mF_o - DF_c$)-Elektronendichte ist bei 1 σ konturiert. Bis auf die Kohlenstoffatome C5–8 des aromatischen Rings ist das Phenylglyoxylat (PDB-Kürzel PGO) gut definiert. Zu erkennen ist die katalytische Triade aus Asp 171, Arg174 und His198, sowie die Substratbindung durch Arg111. Kristallwasser sind als rote Kugeln wiedergegeben.

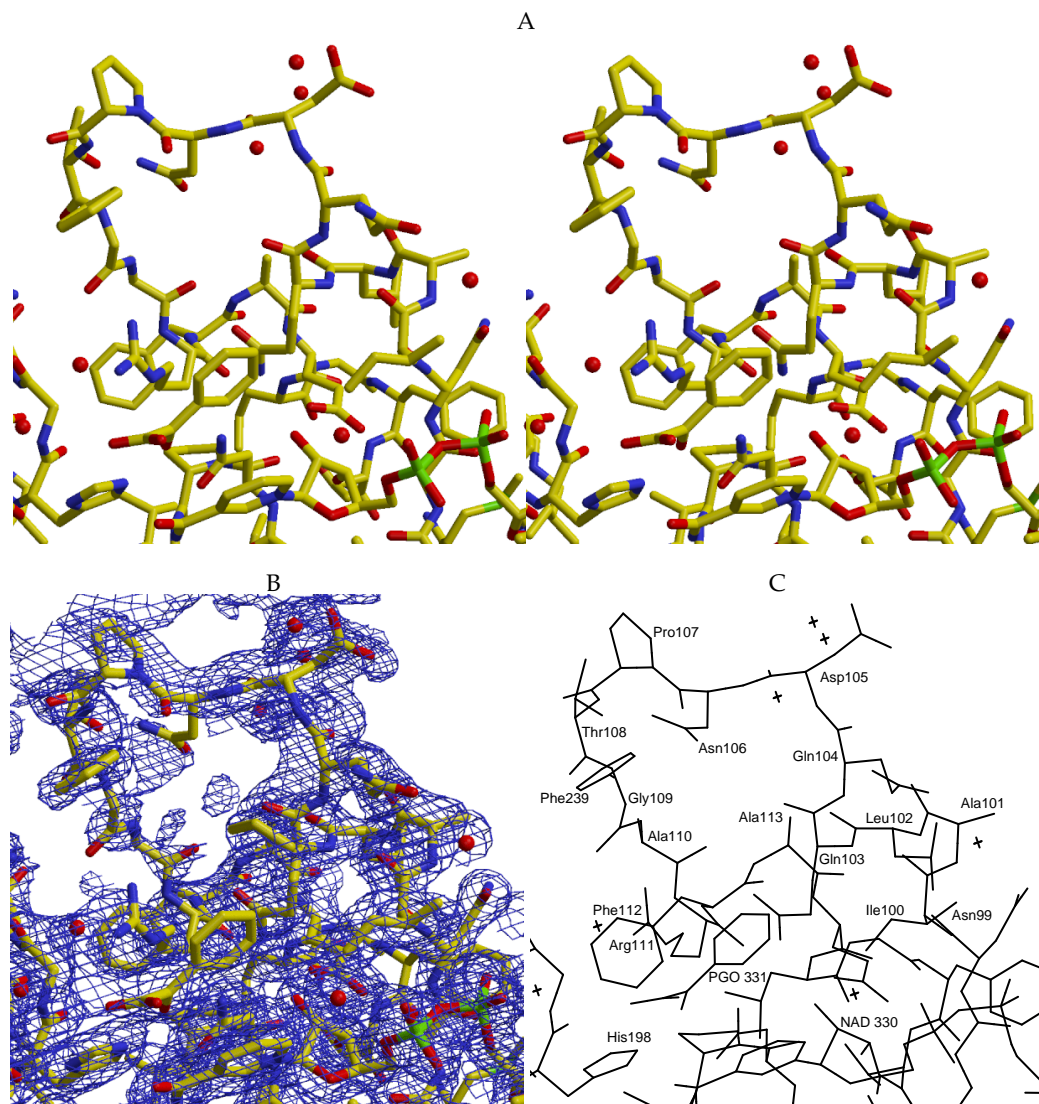


Abbildung 3.54: Blick ins Innere der „Vakuole“. A: Stereoabbildung des Modells, B: Modell mit σ_A ($2mF_0 - DF_c$)-Elektronendichte bei 1σ , C: Zuordnung einiger wichtiger Residuen. — Gezeigt ist das aktive Zentrum der Untereinheit A von L-HicDH mit Phenylglyoxylat. Im Vordergrund (Mitte) ist Phenylglyoxylat zu sehen (PDB-Kürzel PGO). Oben ist der geschlossene Coenzym-Loop erkennbar (Verlauf der Aminosäuren N \rightarrow C gegen den Uhrzeigersinn). Der Phenylring des Substrats bildet eine hydrophobe Stapelung (*stack*) mit dem Nicotinamidring vom NAD (unten). Zusätzlich bilden Ile100 und Gln103 C β und C γ die hydrophobe Umgebung (zusammen mit Leu242 (nicht gezeigt) und Thr248 C γ (Abbildung 3.55)). Arg111 ist an der hydrophilen Substratbindung beteiligt.

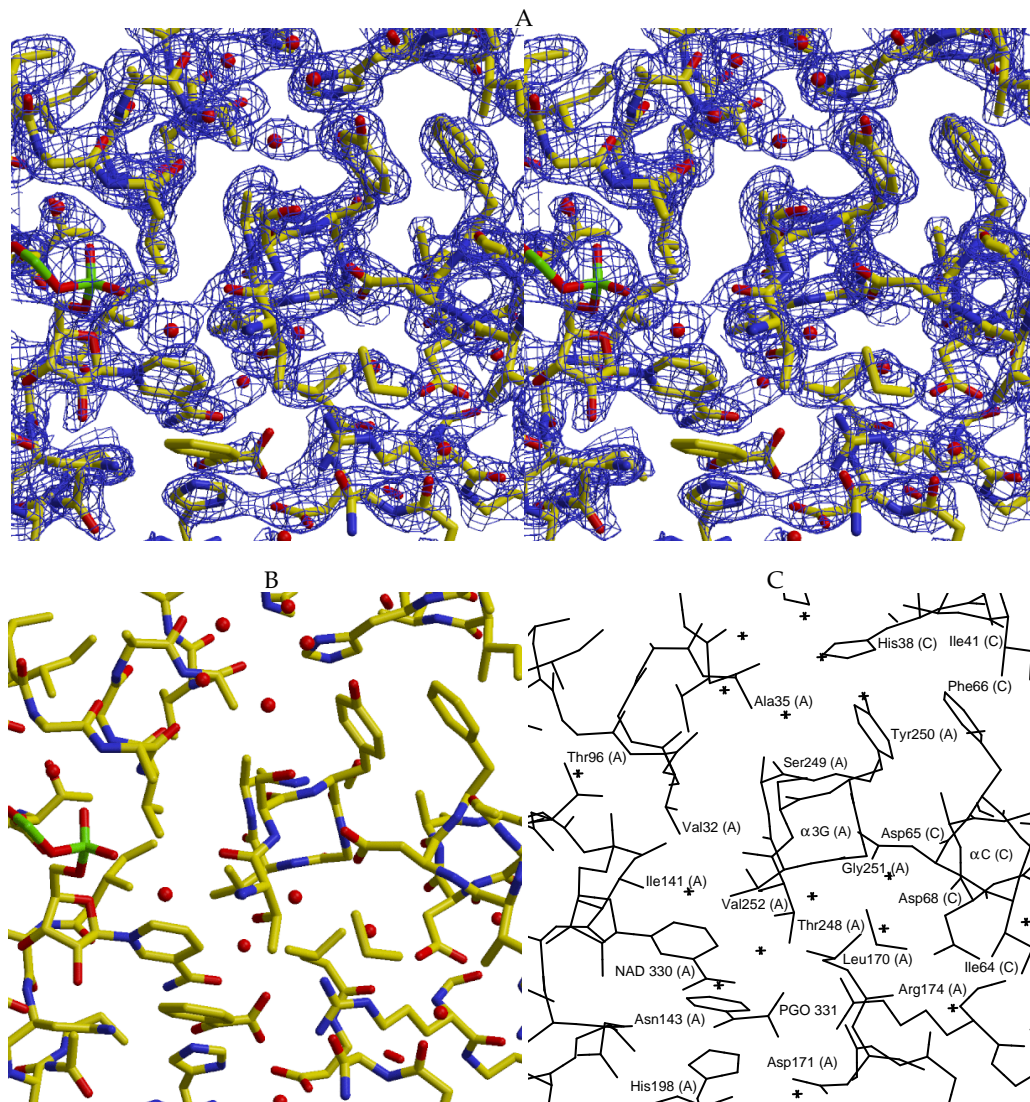


Abbildung 3.55: Ausschnitt des aktiven Zentrums der Untereinheit A von L-HicDH mit Phenylglyoxylat und Beispiel für die Dimerisierung der Untereinheiten A und C (*P*-Achse). A: Stereoabbildung des Modells mit σ_A ($2mF_o - DF_c$)-Elektronendichte bei 2σ , B: Modell, C: Zuordnung einiger wichtiger Residuen. — Die hochkonturierte Elektronendichte gibt das Modell deutlich wieder. Der Blick geht in die an der Dimerisierung beteiligten Helices α 3G (A) und α C (C). Die Dimerisierungskontakte sind hydrophob (wie z. B. die Stapelung von Tyr250 (A) und Phe66 (C, oben rechts)) und hydrophil (beispielsweise die Bindung von Asp65 (C) an Ser249 und Gly251N (A)). Diese Interaktionen sind in direkter Nachbarschaft zu substratbindenden Gruppen, wie z. B. Thr248.

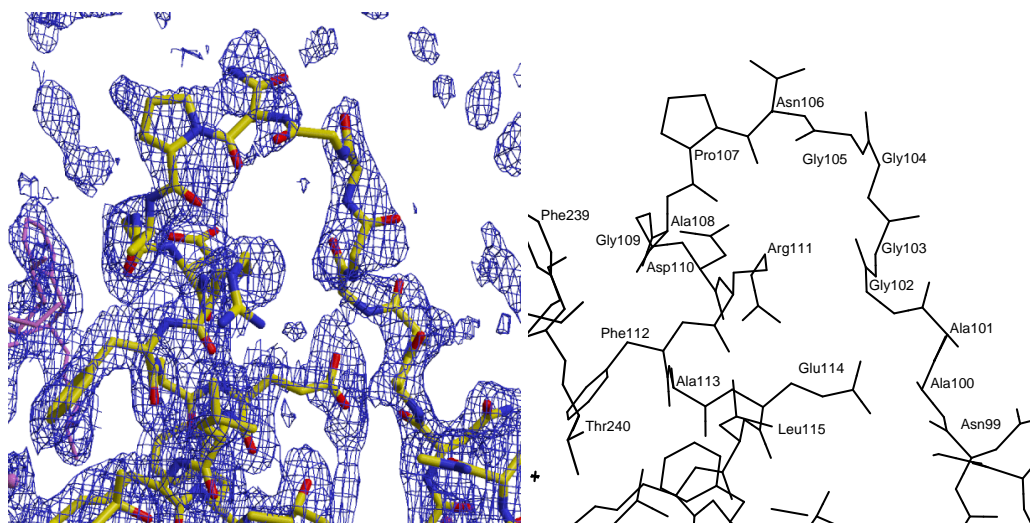


Abbildung 3.56: Der offene Coenzym-Loop der Untereinheit C (L-HicDH mit Phenylglyoxylat). Die σ_A ($2mF_o - DF_c$)-Elektronendichte ist bei 1σ konturiert. Lila: Symmetrie-äquivalenter Bereich. Der Verlauf der Hauptkette ist in dieser Dichte gut zu erkennen. Arg111 ragt aus der Bildebene heraus.

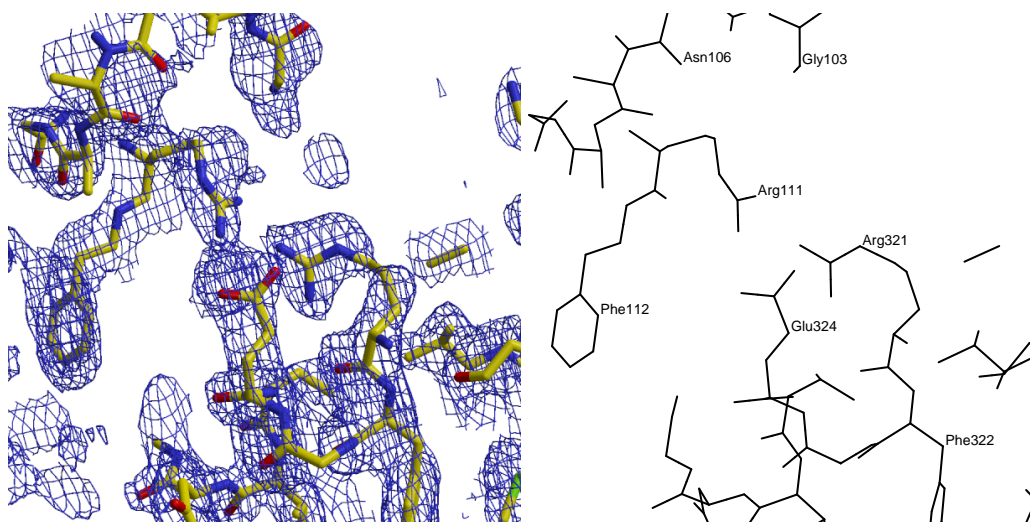


Abbildung 3.57: Arg111 der Untereinheit C (L-HicDH mit Phenylglyoxylat) bindet an Arg321 und Glu324. Gezeigt ist eine bei 1σ konturierte σ_A ($2mF_o - DF_c$)-Elektronendichte.

3.8.5 L-HicDH mit Oxamat

Der verwendete L-HicDH–NAD⁺–Oxamat Cokristall war zu einem geringen Teil verzwillingt. Der N(Z)-Plot zeigt eine leichte Abweichung der tatsächlichen Werte von den theoretischen (Abbildung 3.58), die auch aus der vorliegenden NCS resultieren könnte. Allerdings ergab der Yeates-Test eine Abschätzung des Zwillingsanteils von 3.3 %, und dieser Wert wurde mit SHELXL auf 6.0 % verfeinert.

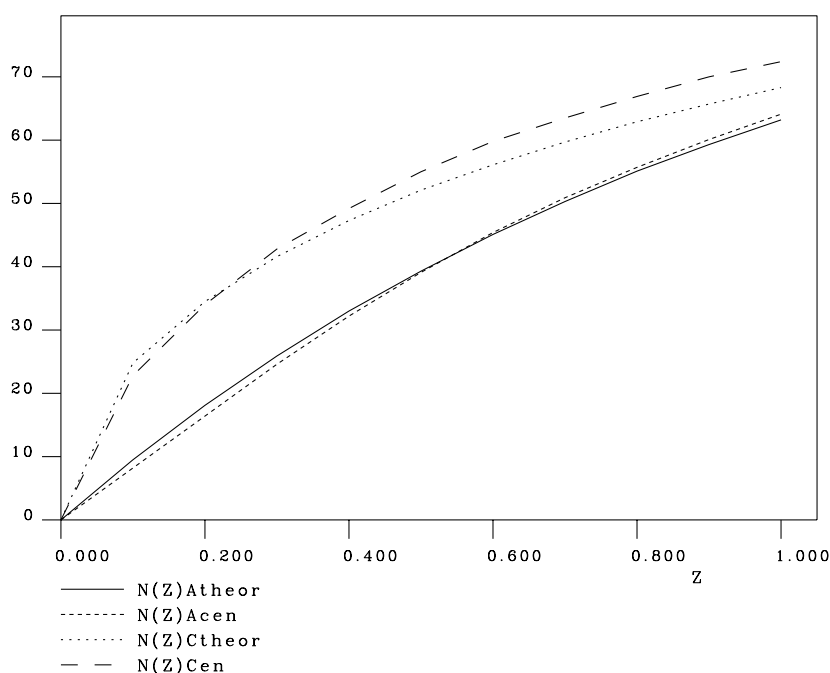


Abbildung 3.58: Der N(Z)-Plot des L-HicDH–NAD⁺–Oxamat Datensatzes zeigt eine geringe Abweichung vom theoretischen Verlauf.

Die weiteren Kenndaten der Strukturverfeinerung sind in der Tabelle 3.18 zusammengefasst. Der verwendete Datensatz hatte eine maximale Auflösung von 1.99 Å. Dies ist die beste Auflösung aller hier vorgestellten Diffraktionsdaten. Entsprechend war auch die Anzahl der gemessenen Reflexe mit ca. 144 000 höher als bei den anderen Messungen. So konnte bei der Verfeinerung bei gleicher Atomanzahl und Detailgenauigkeit (siehe dazu Abschnitt A.3.1) ein höheres Daten/Parameter-Verhältnis verwendet werden. Die R-Werte sind mit 23 % ($F_o > 4\sigma F_o$) bzw. 24 % (alle F_o) niedriger als die der anderen hier vorgestellten Ergebnisse aus SHELXL-Verfeinerungen. Das gleiche gilt für die freien R-Werte (27 % für $F_o > 4\sigma F_o$ und 28 % für alle F_o).

Tabelle 3.18: Ergebnis der Strukturlösung von L-HicDH mit Oxamat.

Raumgruppe	$P3_221$ (Nr. 154)
Zellgröße [Å]	$a = b = 134.9, c = 201.7$
Verfeinerungsprogramm	SHELXL
Anzahl der freien/gesamten Reflexe	7459/143 598
Atome des Modells (davon Wasser/Sonstige)	9 629 (365/203*)
Zwillingsregel	$(-h-kl)$
Zwillingsanteil α nach Yeates/verfeinert [%]	$3.3 \pm 0.1/6.0$
maximale Auflösung [Å]	1.99
Ramachandran: bevorzugt/erlaubt/toleriert/verboten [%]	92.0/7.2/0.4/0.4
R-Wert ($F_o > 4\sigma F_o$ /alle F_o) [%]	22.8/24.3
freier R-Wert ($F_o > 4\sigma F_o$ /alle F_o) [%]	26.7/28.2
Durchschnittlicher B-Faktor nach Wilson/verfeinert [Å ²]	23/32
Bindungslängen: RMSD von der idealisierten Geometrie [Å]	0.011
Bindungswinkel: RMSD von der idealisierten Geometrie [°]	1.671

* 176 Atome in NAD⁺, 12 in Oxamat, und 15 in Sulfat

Die Flächen der Protein–Protein Kontakte sind in Tabelle 3.19 aufgelistet. Sie sind so groß wie in den anderen hier vorgestellten Strukturen.

Tabelle 3.19: Kontaktflächen von L-HicDH mit Oxamat.

Oberfläche der dissoziierten Monomere	$A_{\Sigma M}$	53 238 Å ²	100 %
Kristallkontakte	ΔA_K	3 691 Å ²	6.9 %
Kontakte im Tetramer	ΔA_T	14 387 Å ²	27.0 %
Kontakte der P-Achse (AB/CD)	ΔA_P	3 565 Å ²	6.7 %
Kontakte der Q-Achse (AC/BD)	ΔA_Q	8 597 Å ²	16.1 %
Kontakte der R-Achse (AD/BC)	ΔA_R	2 477 Å ²	4.7 %

Insgesamt besteht das Modell aus 9 629 Atomen, inklusive 4 NAD⁺-Molekülen, je ein Oxamat-Molekül (PDB-Bezeichnung OXM) in den aktiven Zentren der geschlossenen Untereinheiten A und B, sowie ein Sulfation an der entsprechenden Stelle in der offenen Untereinheit C. Außerdem sind noch zwei Sulfationen an anderen Stellen gebunden. Die Untereinheit A ist bis auf die Seitenketten von 8 Residuen vollständig. Auch die Hauptkette des Coenzym-Loops der offenen Untereinheit C ist bis auf Gln105 und Asp106 interpretiert worden. Die Abbildung 3.59 gibt einen Überblick

über die Vollständigkeit des Modells.

Der Coenzym-Loop ist in dieser Struktur mit B -Faktoren von bis zu 97 \AA^2 sehr mobil, wie auch in den anderen hier vorgestellten Strukturen (bis auf Untereinheit A des Komplexes mit 2-Oxocaproat, siehe oben). Der Verlauf der B -Faktoren über die Proteinkette ist in Abbildung 3.60 gezeigt.

Bei der Betrachtung der Standard-Unsicherheiten (Abbildungen 3.61 und 3.62) fällt auf, daß diese Werte niedriger sind als in den anderen Strukturen in dieser Arbeit. Um den Vergleich zu vereinfachen, sind alle Plots der verschiedenen Komplexe in der jeweils gleichen Skalierung aufgetragen. Der Verlauf der Standard-Unsicherheiten (Abbildung 3.61) hat eine Grundlinie mit $0.3\text{--}0.4 \text{ \AA}$ und bleibt in den Peaks unter 3 \AA . Abbildung 3.62 zeigt die Standard-Unsicherheiten der Atompositionen in Abhängigkeit der B -Faktoren. Im Vergleich mit den anderen oben vorgestellten S.U.(B)-Plots ist erkennbar, daß diese Struktur genauer positioniert ist: es gibt deutlich weniger Atome mit hoher S.U. bei niedrigen B -Faktoren. Die vergleichsweise geringe Streuung der Daten erlaubt eine Kurvenanpassung mit ausreichender Korrelation, die die Abhängigkeit der Standardunsicherheiten von den B -Faktoren verdeutlichen (Kurven in der Abbildung 3.62).

Der Ramachandran-Plot (Abbildung 3.63) weist neben Arg111 (A), das nur geringfügig von einer erlaubten Konformation abweicht, noch sieben Residuen mit ungewöhnlichen ϕ/ψ -Kombinationen auf: im tolerierten Bereich befinden sich Ser142 (C) und Asn200 (C und D). Im verbotenen Bereich liegen Asn200 und Ala222 (jeweils A und B).

Bei der Verfeinerung wurden die gleichen NCS-Einschränkungen (*restraints*) angelegt wie auch bei den anderen Strukturen. Die Kleywegt-Plots der Abbildung 3.64 zeigen, daß eine vierfache NCS in dem größten Teil der Struktur vorliegt. In den restlichen Bereichen gibt es eine zweifache NCS (Untereinheiten A/B und C/D), von der nur drei Residuen der Untereinheiten C und D abweichen.

Die Abbildungen 3.65 bis 3.67 zeigen den Coenzym-Loop von Untereinheit A und C sowie das aktive Zentrum von A. Einige Aminosäuren in diesen Bereichen sind nicht so deutlich von Elektronendichten umhüllt wie das restliche Modell. Dennoch war ihre Lage klar erkennbar. Wie auch bei dem Komplex mit Phenylglyoxylat (Abbildungen 3.54 und 3.57) geht Arg111 in A und C verschiedene Interaktionen ein. Während es in der geschlossenen Untereinheit A an den Inhibitor bindet, bindet es in der offenen Untereinheit C an C-terminale Reste.

lhicdh				AR K I G I I G L G	N V G A A V A H G L	40
ox_a				AR K I G I I G L G	N V G A A V A H G L	
ox_b				AR K I G I I G L G	N V G A A V A H G L	
ox_c				AR K I G I I G L G	N V G A A V A H G L	
ox_d				AR K I G I I G L G	N V G A A V A H G L	
lhicdh	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K		A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	80
ox_a	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K		A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
ox_b	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K		A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
ox_c	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K		A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
ox_d	I A Q G V A D D Y V	F I D A N E A K V K		A D Q I D F Q D A M	A N L E A H G N I V	
lhicdh	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N I		K L Q Q D N P T G D	R F A E L K F T S S	120
ox_a	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N I		A L Q Q D A P T G A	R F A E L A F T S S	
ox_b	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G G G		A G G G A A A A F G S S	
ox_c	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N A		A G G . . G P G G D	R F A E L K F T S S	
ox_d	I N D W A A L A D A	D V V I S T L G N A		A T G D	A F A E L K F T S S	
lhicdh	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V		I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	160
ox_a	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V		I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
ox_b	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V		I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
ox_c	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V		I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
ox_d	M V Q S V G T N L K	E S G F H G V L V V		I S N P V D V I T A	L F Q H V T G F P A	
lhicdh	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G		E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	200
ox_a	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G		E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
ox_b	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G		E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
ox_c	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G		E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
ox_d	H K V I G T G T L L	D T A R M Q R A V G		E A F D L D P R S V	S G Y N L G E H G N	
lhicdh	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A		D A G D I D L A A I	E E E A R K G G F T	240
ox_a	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A		D A G A I D L A A I	E E E A R K G G F T	
ox_b	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A		D A G A I D L A A I	E E E A R K G G F T	
ox_c	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A		D A G A I D L A A I	E E E A R K G G F T	
ox_d	S Q F V A W S T V R	V M G Q P I V T L A		D A G A I D L A A I	E E A A R K G G F T	
lhicdh	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A		K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	280
ox_a	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A		K A V M A D A H A E	L V V S N R R A D M	
ox_b	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A		K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	
ox_c	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A		K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	
ox_d	V L N G K G Y T S Y	G V A T S A I R I A		K A V M A D A H A E	L V V S N R R D D M	
lhicdh	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T		L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	320
ox_a	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T		L D L T T D E Q E K	L A Q S R D Y I Q Q	
ox_b	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T		L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	
ox_c	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T		L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	
ox_d	G M Y L S Y P A I I	G R D G V L A E T T		L D L T T D E Q E K	L L Q S R D Y I Q Q	
lhicdh	R F D E I V D T L	329				
ox_a	A F D E I V D T L					
ox_b	R F D E I V D T L					
ox_c	R F D E I V D T L					
ox_d	R F D E I V D T L					

Abbildung 3.59: Die Vollständigkeit der L-HicDH-Struktur mit Oxamat als Quasi-Sequenzalignment. lhicdh: vollständige Sequenz; ox_a: Struktur der Untereinheit A, usw. Schwarz: Bereiche, in denen Atome oder ganze Aminosäuren fehlen.

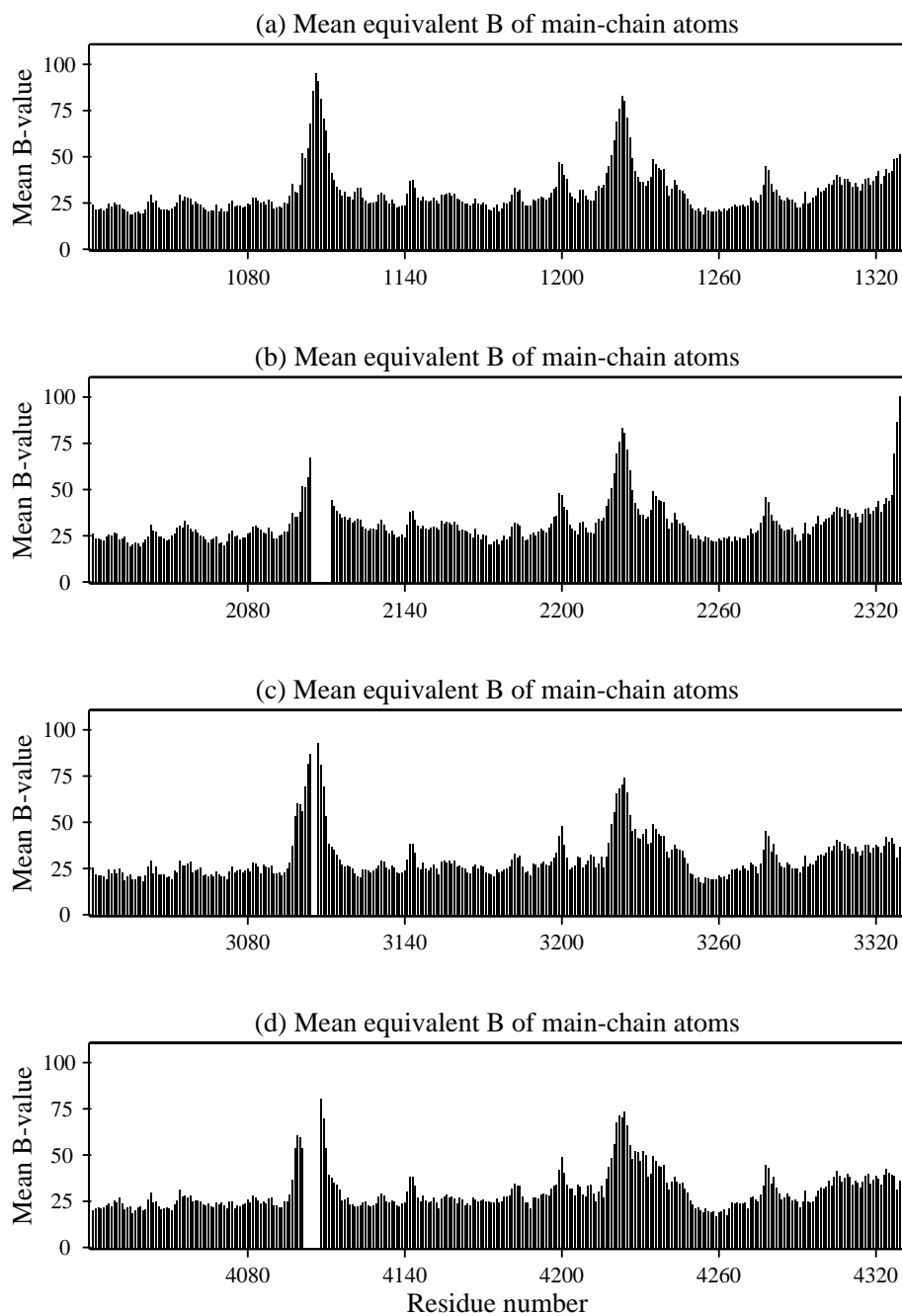


Abbildung 3.60: Die B-Faktoren (in \AA^2) der Hauptkettenatome von L-HicDH im ternären Komplex mit NAD^+ und Oxamat.

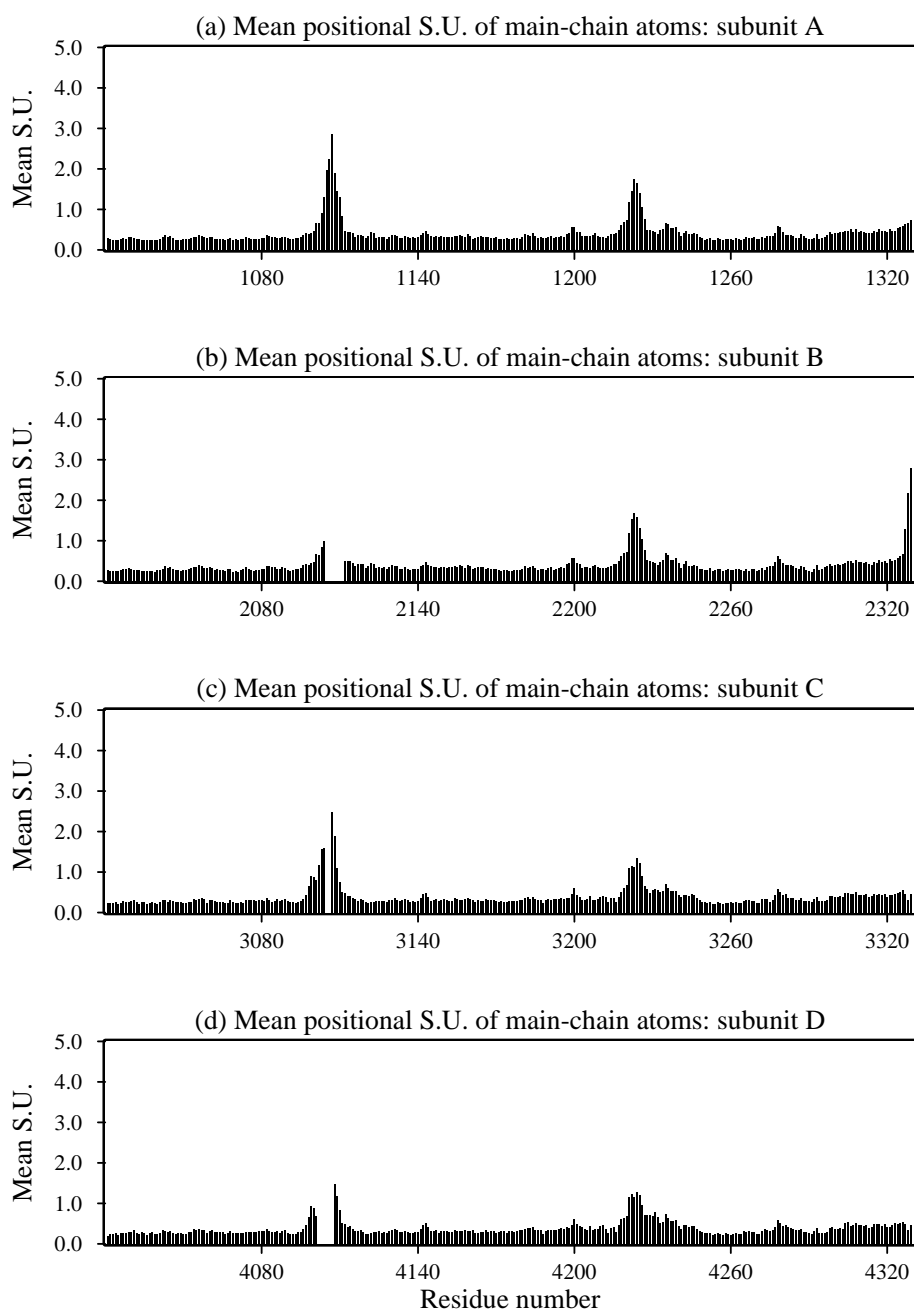


Abbildung 3.61: Die Standard-Unsicherheiten (S.U., in Å) der Hauptkettenatome des L-HicDH-Proteins mit Oxamat. Im Vergleich mit den in der gleichen Skalierung dargestellten Abbildungen der anderen Strukturen fällt auf, daß diese Struktur niedrigere Standard-Unsicherheiten aufweist (siehe Abbildungen 3.18 auf Seite 65, 3.27 auf Seite 76, 3.38 auf Seite 87 und 3.50 auf Seite 100).

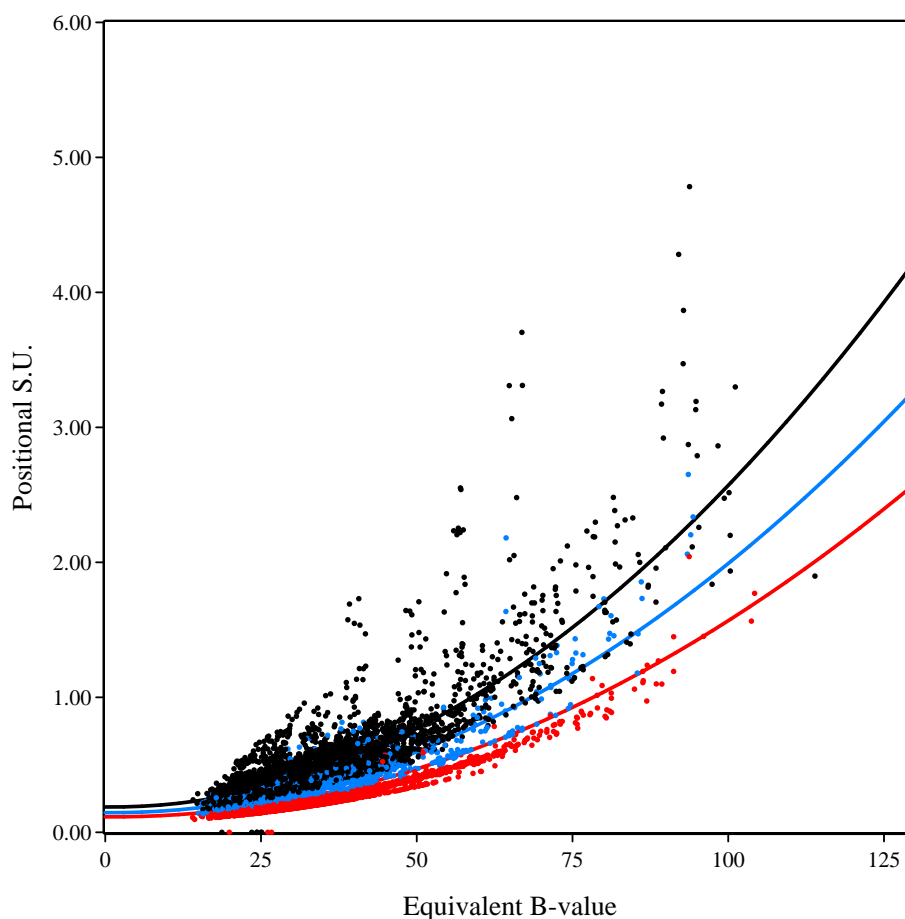


Abbildung 3.62: Die Standard-Unsicherheiten (S.U., in Å) gegen die B -Faktoren (in Å²) der Atomkoordinaten des L-HicDH-Oxamat-Modells. 1 „Außreißer“ ist nicht abgebildet. Schwarz: Kohlenstoff, Blau: Stickstoff, Rot: Sauerstoff. Die Kurven ergeben sich aus der Anpassung (*least squares fit*) der mit $1/B^2$ gewichteten Daten (Sheldrick, 1997). Die Standardunsicherheiten sind demnach $\sigma_r = (0.46838 - 0.001375 \times B + 0.0006078 \times B^2)/Z\#$, wobei $Z\#$ der jeweilige Streufaktor bei $\sin(\theta)/\lambda = 0.3$ ist (Kohlenstoff: 2.494, Stickstoff: 3.219 und Sauerstoff: 4.089). Ein Korrelationsfaktor der Kurven wird von SHELXL nicht angegeben.

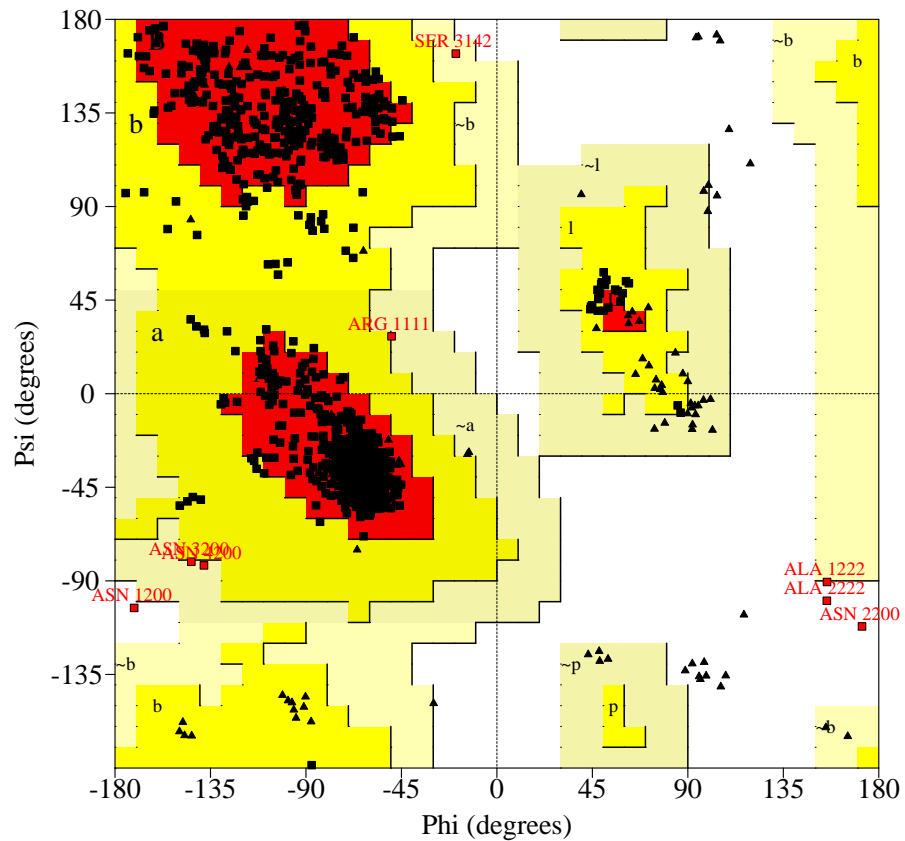


Abbildung 3.63: Ramachandran-Plot des L-HicDH-Modells mit Oxamat. A, B, L (rot): bevorzugte Regionen; a, b, l, p (gelb): erlaubte Regionen; ~a, ~b, ~l, ~p (hellgelb): tolerierte Regionen mit Arg111 (A), Ser142 (C), Asn200 (C und D). Weißer Bereich (verbotene Konformationen) mit Asn200 und Ala222 (je A und B).

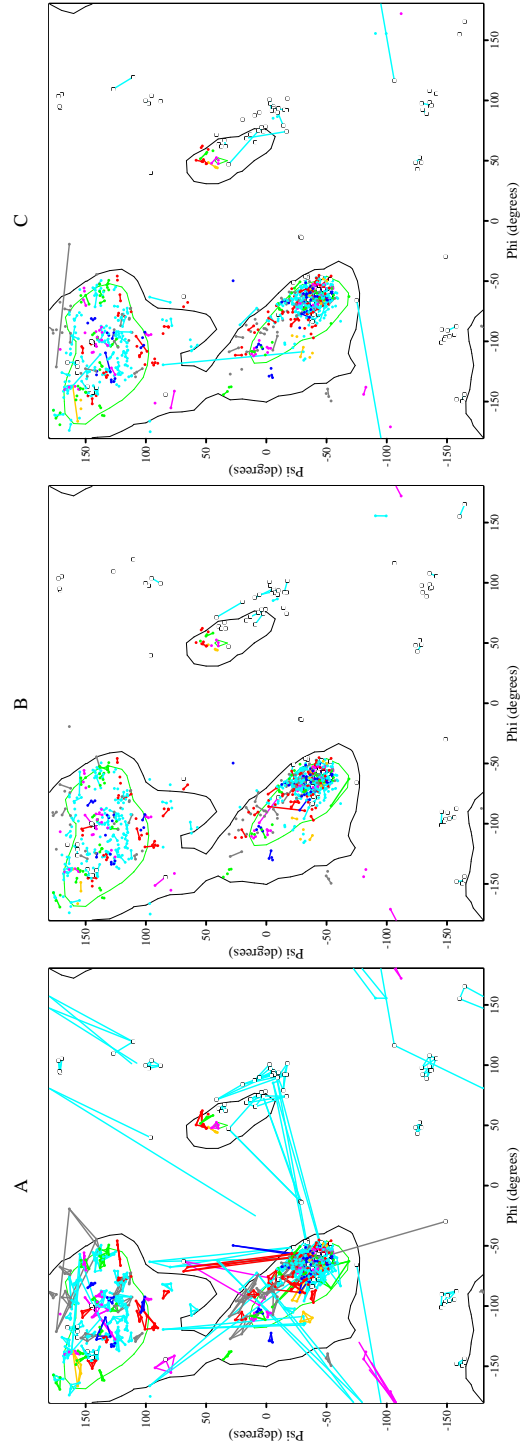


Abbildung 3.64: Kleywegt-Plots der L-HicDH-Oxamat-Struktur. Verbunden sind in A alle vier Untereinheiten; in B die geschlossenen Untereinheiten A und B; und in C die offenen Untereinheiten C und D. Die Aminosäuren sind mit verschiedenen Farben markiert (siehe Legende der Abbildung 3.21). Drei lange Linien in C zeigen an, daß sich bei den Untereinheiten C und D drei Residuen in ihren Konformationen wesentlich unterscheiden (Ausnahmen von der NCS).

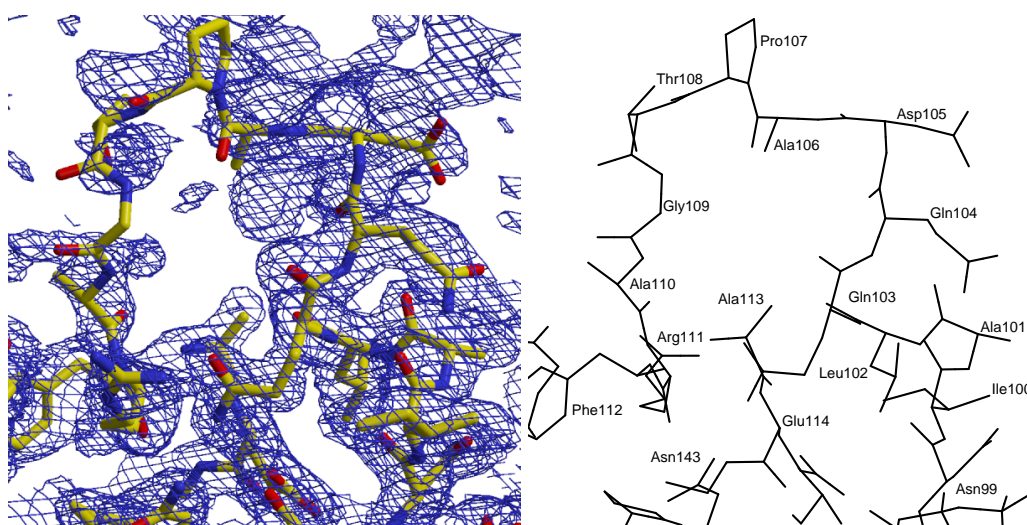


Abbildung 3.65: Der Coenzym-Loop von L-HicDH mit Oxamat: Links das Modell der Untereinheit A mit 0.7σ konturierter σ_A ($2mF_o - DF_c$)-Elektronendichte, rechts die Bezeichnungen der Aminosäuren. Lys101, Asn106 und Asp110 wurden als Ala verfeinert. Der Blick geht vom Inneren der „Vakuole“ nach außen, so daß der Loop gegen den Uhrzeigersinn orientiert ist (vergleichbar mit Abbildung 3.54).

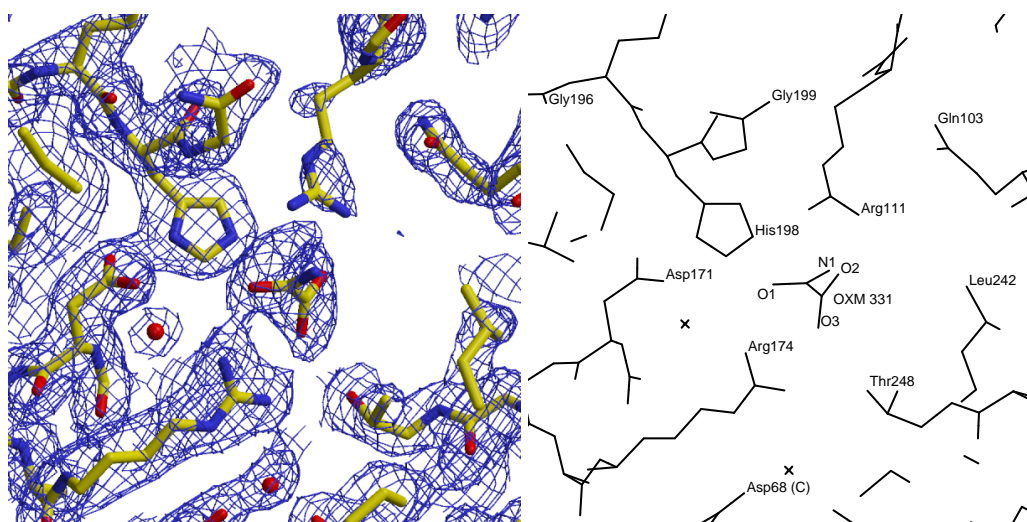


Abbildung 3.66: Das aktive Zentrum des L-HicDH-Oxamat Komplexes (Untereinheit A). Links das Modell und die σ_A ($2mF_o - DF_c$)-Elektronendichte (bei 1σ konturiert), rechts die Bezeichnungen. Anders als die hier vorgestellten Substrate bindet der Inhibitor Oxamat (PDB-Kürzel OXM) mit einem Sauerstoff der Amidgruppe und einem Sauerstoff der Säuregruppe an Arg174 (nämlich O1 und O3).

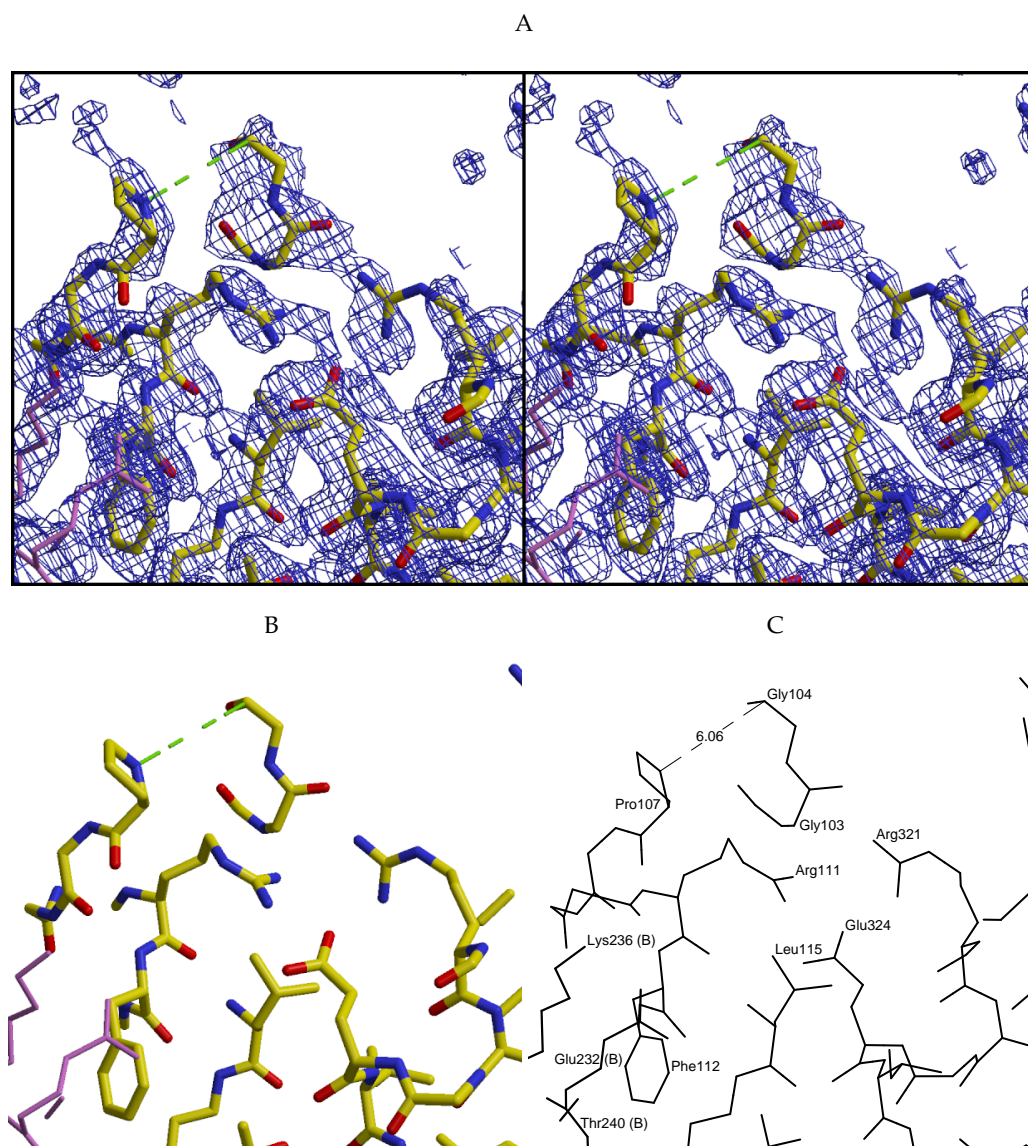


Abbildung 3.67: Der Coenzym-Loop der offenen Untereinheit C. A: Stereoabbildung des Modells mit σ_A ($2mF_o - DF_c$)-Elektronendichte bei 1σ , B: Modell, C: Zuordnung einiger wichtiger Residuen. — Das Modell ist nicht vollständig, Gln105 und Asn106 fehlen; dies ist verdeutlicht durch die grüne/gestrichelte Verbindung zwischen Gln104 und Pro107 (6.06 Å). Gln103 und Gln104 wurden als Gly verfeinert. Lila: Reste der Untereinheit B eines symmetrieäquivalenten Komplexes, die Kristallkontakte ausbilden. Wie auch in Abbildung 3.57 bindet Arg111 an Arg321 und Glu324.

3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

L-HicDH aus *W. confusa* wurde in *E. coli* heterolog überexprimiert, gereinigt und anschließend kristallisiert. Es wurde der binäre L-HicDH–NAD⁺ Komplex kristallisiert (nach Niefind *et al.*, 1995, in dieser Arbeit auch als nativer Komplex bezeichnet). Außerdem wurde der L-HicDH–NAD⁺ Komplex mit den Substraten 2-Oxocaproat, 2-Oxoisocaproat, Phenylglyoxylat, Pyruvat und 3-Phenylpyruvat bzw. dem Inhibitor Oxamat kokristallisiert.

Von fünf Komplexen (nativ bzw. mit 2-Oxocaproat, 2-Oxoisocaproat, Phenylglyoxylat und Oxamat) wurden Röntgendiffraktionsdaten gemessen, deren Auflösung 1.99–2.35 Å betrug. Die Strukturen wurden mit molekularem Ersatz gelöst, wobei die binäre L-HicDH–NAD⁺-Struktur 1HYH (Niefind *et al.*, 1995) verwendet wurde. Die verfeinerten Modelle waren weitgehend vollständig und enthielten 252–365 Kristallwassermoleküle und je Untereinheit ein NAD⁺-Molekül. Zwei Untereinheiten lagen in einer geschlossenen und zwei in einer offenen Konformation vor. Die verwendeten Substrate bzw. der Inhibitor fanden sich ausschließlich in den aktiven Zentren der geschlossenen Untereinheiten wieder. Die Substrate waren in den Elektronendichten klar definiert. Nur die jeweils endständigen Atome lagen außerhalb der Elektronendichten. An Stelle der Substrate befand sich in den offenen Untereinheiten Sulfat bzw. Wasser im aktiven Zentrum.

Die wichtigsten Qualitätskriterien der Strukturverfeinerungen sind in Tabelle 3.22 zusammengefasst.

Die *B*-Faktoren beschreiben die thermische Bewegung und die Fehlordnung der Atome und sind daher ein Kriterium für die Positionsgenauigkeit (siehe Abschnitt A.3.2 auf Seite 211). Alle Atome der fünf Strukturen haben einen durchschnittlichen *B*-Faktor von $38 \pm 13 \text{ \AA}^2$. Die *B*-Faktoren der Substrate und des Oxamats sind um 1.5σ höher: Sie sind durchschnittlich $57 \pm 10 \text{ \AA}^2$. Damit sind diese Moleküle etwas undeutlicher bestimmt. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, daß bei ihrer Verfeinerung keine Beschränkungen (*restraints*) verwendet werden konnten. Außerdem war ihre Besetzung möglicherweise nicht vollständig.

Der durchschnittliche *B*-Faktor der NAD⁺-Moleküle ist $49 \pm 17 \text{ \AA}^2$. Die NAD⁺-Moleküle der geschlossenen Untereinheiten haben *B*-Faktoren von durchschnittlich $35 \pm 6 \text{ \AA}^2$. Die Genauigkeit dieser Atomlagen ist daher vergleichbar mit der Genauigkeit der gesamten Struktur. Ihre Besetzung ist vermutlich (fast) vollständig. Dagegen

sind die B -Faktoren der NAD^+ -Moleküle in den offenen Untereinheiten $62 \pm 14 \text{ \AA}^2$, also um 1.8σ höher als der Mittelwert aller Atome. Dies weist auf eine höhere thermische Bewegung bzw. Fehlordnung und auf eine unvollständige Besetzung hin.

Neben den statistischen Kenngrößen wie freier R -Wert, Standard-Unsicherheit oder freier σ_A -Wert ist es besonders aussagekräftig, wenn Strukturen aus unabhängigen Datensätzen miteinander verglichen werden. Dies ist abgesehen von der Annahme, daß durch die Bindung der verschiedenen Substrate und durch die zum Teil verschiedenen Kristallumgebungen keine strukturellen Unterschiede induziert werden, ohne Prämissen möglich und führt zu absoluten Werten der Positionsgenauigkeit. In der Tat werden andere Kenngrößen wie der (freie) Luzzati-Wert und der (freie) σ_A -Wert nur verwendet, weil unabhängig verfeinerte Strukturen nur selten zur Verfügung stehen und deshalb ein Vergleich nur in wenigen Fällen möglich ist (siehe dazu Abschnitt A.3.2 auf Seite 211).

Mit dem Programm TOP3D (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) wurden die fünf Strukturen jeweils paarweise miteinander verglichen (Tabelle 3.20). Dies führte zu einer durchschnittlichen Abweichung (RMSD) von 0.41 \AA (1 200 $C\alpha$ -Atome). Wird der L-HicDH-2-Oxocaproat Komplex, der aus einer anderen Kristallform (Form 6) entstanden ist, nicht berücksichtigt, sondern nur die Kristalle der Form 1 miteinander verglichen, liegt die durchschnittliche Abweichung bei 0.37 \AA (1 213 $C\alpha$ -Atome). Dieser Wert kann als durchschnittliche Positionsungenauigkeit der Kohlenstoffatome der Hauptkette angesehen werden. Wie in den oben gezeigten Plots der Standard-Unsicherheiten gegen die B -Faktoren ersichtlich (besonders Abbildung 3.62 auf Seite 113), lassen sich die Stickstoff- und Sauerstoffatome wegen ihrer größeren Masse genauer positionieren (siehe dazu auch Cruickshank, 1999a,b).

Die durchschnittliche Abweichung des L-HicDH-2-Oxocaproat Modells von den anderen Strukturen ist mit 0.47 um 0.1 \AA höher. In Anbetracht des relativ niedrigen freien R -Wertes von 20% ist es wahrscheinlich, daß dieser (wenn auch geringe) Unterschied aus der Packung in der anderen Kristallform resultiert.

Die verfeinerten Modelle haben die höchsten B -Faktoren und die größte Positionsunsicherheit in den Coenzym-Loops und zwar besonders in den jeweiligen Loops der geschlossenen Untereinheit A. Daher können die Positionsunterschiede der Atome dieses Loops die maximale Positionsungenauigkeit der Modelle angeben. Um dies deutlich zu machen, wurden die Aminosäuren 90–122 der Untereinheiten A mit der Struktur des L-HicDH-Phenylglyoxylat Komplexes verglichen. Dabei wurden mit

Tabelle 3.20: Abweichung der Strukturen (RMSD in Å/Anzahl der C α).

Komplex	nativ	2-Oxocaproat	2-Oxoisocaproat	Phenylglyoxylat
2-Oxocaproat	0.46/1 177			
2-Oxoisocaproat	0.40/1 208	0.43/1 186		
Phenylglyoxylat	0.40/1 214	0.51/1 181	0.43/1 212	
Oxamat	0.35/1 213	0.48/1 181	0.36/1 211	0.30/1 218

Durchschnitt

— alle Strukturen (Form 1 und Form 6): $0.41 \pm 0.06/1\ 200 \pm 16$

— ohne 2-Oxocaproat (nur Form 1): $0.37 \pm 0.04/1\ 213 \pm 3$

— Form 6 (2-Oxocaproat) gegen Form 1: $0.47 \pm 0.03/1\ 181 \pm 3$

SHELXPRO alle Atome und nicht, wie bei vielen anderen Programmen üblich, nur die C α -Atome in dem *least square refinement* verwendet. Die mittlere RMSD beträgt höchstens 1 Å (235 Atome, siehe Tabelle 3.21). Das stimmt mit den B-Faktoren in diesem Bereich überein: Die Atome der Reste 90–122 (A) aller 5 Modelle haben B-Faktoren von durchschnittlich $46 \pm 21 \text{ \AA}^2$ und maximal 112 \AA^2 . Dies entspricht einer Auslenkung von 0.8 Å bzw. 1.2 Å. Dabei ist zu beachten, daß die Struktur mit 2-Oxocaproat keine signifikant erhöhten Temperaturfaktoren im Coenzym-Loop der Untereinheit A hat (siehe Abschnitt 3.8.2).

Die Abbildungen 3.68 und 3.69 zeigen die übereinandergelagerten Coenzym-Loops der jeweiligen Untereinheiten A. Die stärksten Unterschiede treten in den Resten 106–108 auf. Trotz dieser Unterschiede ist zu erkennen, daß sich die Loops in ihrem Verlauf und die Aminosäuren in ihren Konformationen weitgehend gleichen.

Tabelle 3.21: Abweichung der Aminosäuren 90–122 (A) von der L-HicDH-Phenylglyoxylat Struktur.

Komplex	RMSD	Anzahl der Atome
nativ	0.94	224
2-Oxocaproat	0.89	240
2-Oxoisocaproat	0.99	235
Oxamat	0.62	237
Durchschnitt	0.86 ± 0.15	234 ± 6

Tabelle 3.22: Ergebnis der verschiedenen Strukturlösungen.

Komplex	Nativ	2-Oxocaproat	2-Oxoisocaproat	Phenylglyoxylat	Oxamat
Raumgruppe	$P3_221$	$P3_121$	$P3_221$	$P3_221$	$P3_221$
Zellgröße $a = b, c$ [Å]	134.7, 201.5	134.0, 178.6	135.8, 205.4	134.7, 201.4	134.9, 201.7
Verfeinerungsprogramm	SHELXL	CNS	CNS	SHELXL	SHELXL
Anzahl der freien/gesamten Reflexe	6725/128494	1419/77420	1272/84024	5913/115890	7459/143598
Atome des Modells (davon Wasser)	9458 (252)	9549 (301)	9591 (314)	9644 (350)	9629 (365)
Zwillingsanteil α^* [%]	6.4	50**	—	14.1	6.0
maximale Auflösung [Å]	2.07	2.35	2.35	2.14	1.99
R -Wert/freier R -Wert*** [%]	23.7/28.0	17.2/19.8	18.6/20.1	25.0/30.2	22.8/26.7
berechneter SHELXL R -Wert*** [%]		20.5	21.9		
Ramachandran****	90.9/8.7/0.3/0.2	91.9/7.9/0.2/—	92.3/7.3/0.2/0.2	89.1/10.3/0.6/—	92.0/7.2/0.4/0.4
Durchschnittlicher B -Faktor [Å ²]	39	41	40	38	32

* verfeinert, Zwillingsregel ($-h-kl$)

** festgelegt

*** $F_o > 4\sigma F_o$ bei SHELXL

**** bevorzugt/erlaubt/toleriert/verboten [%]

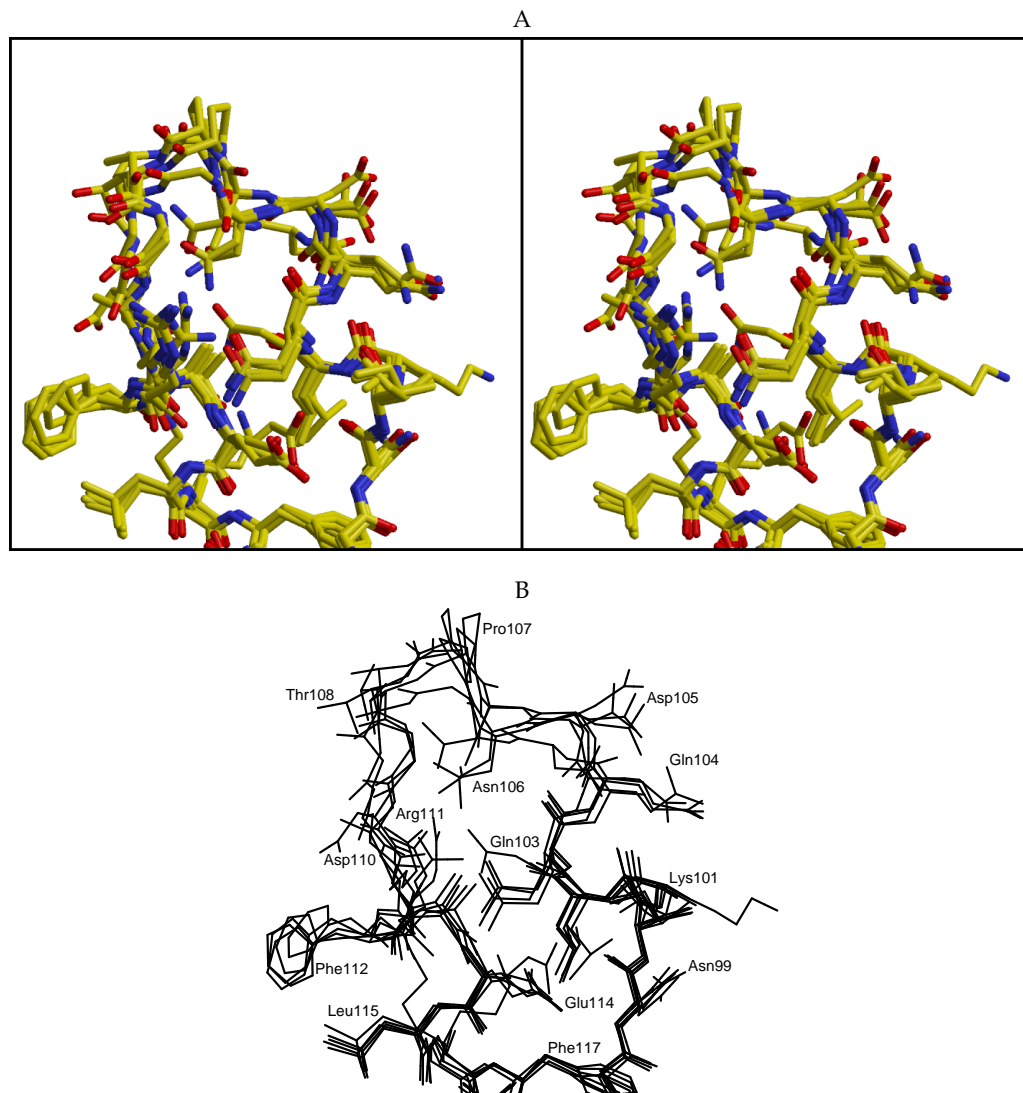


Abbildung 3.68: Vergleich der Coenzym-Loops der geschlossenen Untereinheit A der nativen L-HicDH-Struktur und der Komplexe mit 2-Oxocaproat, 2-Oxoisocaproat, Phenylglyoxylat und Oxamat. A: Stereoabbildung, B: Zuordnung einiger wichtiger Residuen. Ansicht von der Innenseite der „Vakuole“, der Verlauf der Loops ist gegen den Uhrzeigersinn. Die Arg111-Seitenketten ragen aus der Bildebene heraus. Die größten Abweichungen befinden sich um Pro107.

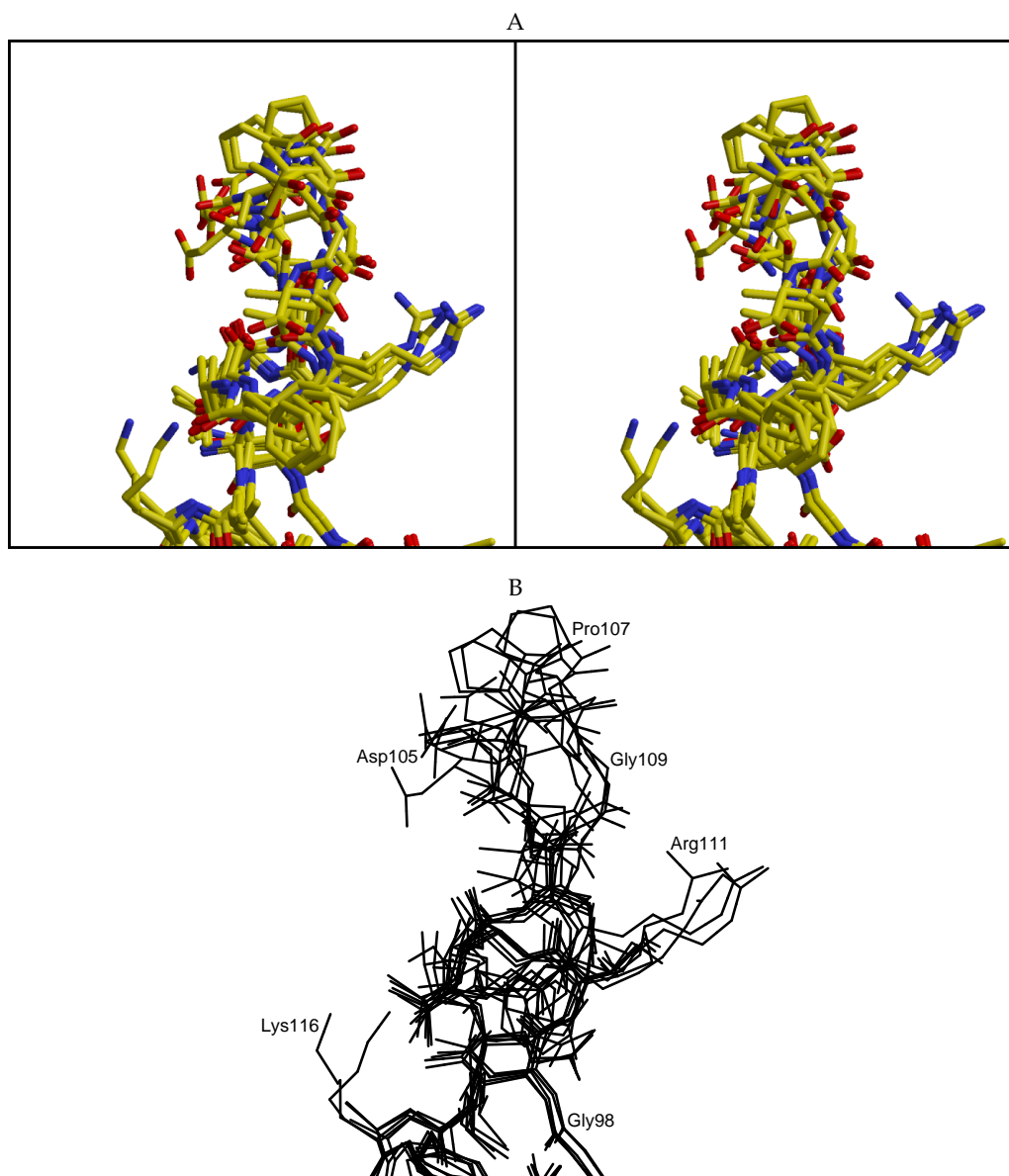


Abbildung 3.69: Die Coenzym-Loops der Untereinheit A der fünf vorgestellten Strukturen. Diese Abbildung ist um 90° gegenüber Abbildung 3.68 gedreht, so daß die Loops von der Seite zu sehen sind. Auch hier ist zu erkennen, daß sich die größten Abweichungen im Bereich 106–108 befinden.

3.10 Einordnung der Ergebnisse

Es reicht nicht, die Qualität der verfeinerten Strukturen isoliert zu betrachten, sondern es ist auch nötig, sie innerhalb der derzeit anerkannten guten wissenschaftlichen Praxis einzuordnen. Dann wird ersichtlich, ob die Genauigkeit erreicht wurde, die bei den gegebenen Daten möglich war. Als Kriterien dazu bieten sich besonders der R -Wert, der freie R -Wert und die Ramachandran-Verteilung an.

Früher wurde eine Struktur dann als richtig angesehen, wenn ihr R -Wert unter etwa 25 % lag (Brändén & Jones, 1990). Mittlerweile wird der freie R -Wert als wichtiger angesehen, weil dieser Wert stark mit der Richtigkeit des Modells korreliert (siehe Kleywegt & Jones, 1995). Ein freier R -Wert unter 25 % wird weithin als gut angesehen, während ein freier R -Wert unter 30 % akzeptiert wird. Brünger (1997) schlägt eine Grenze von 40 % vor.

Die Größe der R -Werte ist jedoch auch abhängig von der Größe der Struktur (Krebs, 2000) und der Auflösung (Kleywegt & Jones, 2002), weshalb sie nicht als fixe Kenngrößen angesehen werden sollten. Der Unterschied zwischen R -Wert und freiem R -Wert entsteht teilweise aus einer Überverfeinerung. Verkleinern bestimmte Aspekte des Modells den R -Wert, nicht aber den freien R -Wert, verfeinern sie das Rauschen und nicht das Signal. Daher ist der Abstand zwischen dem freien R -Wert und dem R -Wert ein wichtiges Kriterium für die Qualität der Struktur. Eine sorgfältig verfeinerte Struktur hat einen geringen Unterschied zwischen dem freien R -Wert und dem R -Wert (Übersicht in Kleywegt, 2000). Die lineare Regression der Daten in der PDB ergab $R_{\text{frei}} = 1.065R + 0.036$ (Kleywegt & Jones, 2002).

Werden diese Maßstäbe an die hier vorgestellten (freien) R -Werte angelegt (siehe Tabelle 3.22), wird ersichtlich, daß es sich hier um sorgfältig erstellte Modelle handelt, die nicht überverfeinert sind. Das Verhältnis vom freien R -Wert zum R -Wert liegt zwischen 1.1 und 1.2. Verglichen mit den neueren Strukturen in der PDB ist dies durchschnittlich oder überdurchschnittlich gut. Die Struktur mit Phenylglyoxylat liegt mit $R = 0.25$ und $R_{\text{frei}} = 0.302 = 1.065R + 0.036$ genau auf der Regressionsgeraden von Kleywegt & Jones (2002), die restlichen Strukturen haben bessere freie R -Werte.

Mit einer Auflösung von 2.0–2.4 haben die Strukturen R -Werte von 17–25 % und freie R -Werte zwischen 20 und 30 %. Dies liegt im Rahmen der veröffentlichten Strukturen (Kleywegt & Jones, 2002). SHELXL führt generell zu höheren (freien) R -Werten als die häufiger verwendeten Programme X-PLOR/CNS und REFMAC (Sheldrick,

1997). Die Gründe dafür sind vielfältig. Erstens berechnet SHELXL nicht den gewichteten R -Wert, sondern den ungewichteten (siehe Seite 212). Zweitens erfolgte die Auswahl der freien Reflexe in vollständigen Schalen (*thin shells*), weil nur dadurch die freien R -Werte bei NCS und Verzwilligung aussagekräftig waren. Daher fehlten ganze Gitterebenen bei der Verfeinerung, was zu qualitativ etwas schlechteren Modellen führte (dies gilt auch für die L-HicDH–2-Oxocaproat Struktur). Drittens ist das Wassermmodell (*bulk solvens model*) von SHELXL einfacher als das von X-PLOR/CNS und REFMAC. Dies wird deutlich, wenn SHELXL R -Werte von mit CNS verfeinerten Strukturen berechnet: sie sind dann um 3.3 Prozentpunkte höher (siehe Tabelle 3.22). Ein gutes Wassermmodell wirkt sich bei den L-HicDH Strukturen besonders auf die R -Werte aus, weil die Atome der Modelle einschließlich der verfeinerten Wassermoleküle nur 32–37 % des Raumes der Elementarzelle besetzen. Viertens wurden, um die für SHELXL relativ niedrige Datenanzahl auszugleichen, starke NCS-Zwänge (*restraints*) verwendet, die einer Überverfeinerung vorbeugten, allerdings auch zu etwas höheren R -Werten führten. Fünftens verkomplizierte die Verzwilligung die Verfeinerung. Die Dekonvolution der Intensitäten war bei Zwillingsanteilen zwischen 10 und 45 % besonders schwierig, was sich in den R -Werten der L-HicDH–Phenylglyoxylat Struktur widerspiegelt: Mit einer Verzwilligung von 14 % liegt der freie R -Wert bei 30 %.

Besonders aussagekräftig sind Ramachandran-Plots. Sie können deutlich auf mögliche Fehler hinweisen, weil ihre Kriterien (die ϕ/ψ -Kombinationen) nicht in die Verfeinerung einfließen. Die Ramachandran-Verteilungen zeugen von Modellen guter Qualität. Es wird geschätzt, daß gute Modelle über 90 % der Aminosäuren in bevorzugten Bereichen haben (Laskowski *et al.*, 1993). Dieses Kriterium wird von allen Strukturen bis auf die L-HicDH–Phenylglyoxylat Struktur erfüllt. Auf der anderen Seite haben höchstens 0.4 % der Residuen eine verbotene Konformation. Die Strukturen mit Phenylglyoxylat und 2-Oxocaproat haben gar keine Residuen außerhalb des Ramachandran-Bereichs.

Kleywegt & Jones (1996) schlagen eine vereinfachte Betrachtungsweise der Ramachandran-Verteilung vor. Sie unterscheiden nur zwischen gewöhnlichen und ungewöhnlichen Konformationen (*core* bzw. *non-core*, *outliers*, Außenseiter). Nach dieser Definition haben die neueren Strukturen der PDB durchschnittlich 3.7 % Außenseiter, und die Strukturen mit einer Auflösung besser als 2 Å haben 0–5 % Außenseiter (Kleywegt & Jones, 2002). Im Vergleich dazu sind die L-HicDH-Modelle überdurchschnittlich gut. Mit MOLEMAN2 (Kleywegt & Jones, 1996) wurde der Anteil der Ramachandran-Außenseiter bestimmt. Der binäre Komplex hat 3.3 % Außenseiter,

und die ternären Komplexe haben 2.2 % (mit 2-Oxoisocaproat), 2.6 % (mit 2-Oxocaproat), 3.4 % (mit Phenylglyoxylat) und 2.3 % (mit Oxamat). Die verbleibenden Außenseiter sind möglicherweise Bestandteil der Struktur.

Fazit: Die hier vorgestellten Strukturen sind nicht überverfeinert, sondern beschreiben die Daten bestmöglich. Die Modelle sind chemisch plausibel. Die (freien) *R*-Werte sind nicht ungewöhnlich hoch, noch weisen sie oder die Ramachandran-Verteilungen auf Fehler hin.

4 Diskussion

Die L-HicDH aus *W. confusa* ist strukturell und funktionell eng verwandt mit der L-Lactat Dehydrogenase (Lerch *et al.*, 1989; Dunn *et al.*, 1991; Feil, 1992; Feil *et al.*, 1994; Niefind *et al.*, 1995; Mizuguchi *et al.*, 1998; Apweiler *et al.*, 2001). Die Besonderheit der L-HicDH ist, daß sie das einzige bekannte natürliche Enzym ist, das 2-Oxoisocaproat umsetzen kann, und sie akzeptiert auch ein breites Spektrum anderer 2-Oxocarbonsäuren, die einen hydrophoben Rest an C3 haben (Schütte *et al.*, 1984; Feil *et al.*, 1994). Die artifizielle L-LDH Variante von Dunn *et al.* (1991), die 2-Oxoisocaproat zu 2-Hydroxyisocaproat reduzieren kann, hat eine deutlich geringere Aktivität (Dunn *et al.*, 1991; Feil *et al.*, 1997).

Diese besondere Eigenschaft macht das Enzym biotechnologisch interessant (Hummel & Kula, 1989). Aus einer Struktur der L-HicDH im Komplex mit Substrat lassen sich möglicherweise Varianten ableiten, die neue Eigenschaften besitzen und biotechnologisch eingesetzt werden können. So könnte z. B. eine L-HicDH-Variante, die Keto-tertiär-Leucin (siehe Abbildung 1.11 auf Seite 16) zu L-Hydroxytertiär-Leucin effizient umsetzen kann, in einem Membranreaktor Verwendung finden (Wichmann *et al.*, 1981; Feil *et al.*, 1997).

Darüber hinaus kann ein tieferes Verständnis der Substratbindung und -spezifität der L-HicDH zu Regeln führen, die sich auf die Substratbindung anderer Enzyme übertragen lassen. Möglicherweise lassen sich diese Regeln auch in Programmen zum Protein-Inhibitor-Docking einsetzen, die zum *virtual screening* verwendet werden, z. B. auf der Suche nach neuen Antibiotika.

In der PDB (Berman *et al.*, 2000) gibt es nur eine einzige L-LDH, die Substrat im aktiven Zentrum gebunden hat: 3LDH. Diese Struktur von White *et al.* stammt von 1976 und ist von ungenügender Qualität. Sie stammt von Daten mit 3 Å Auflösung und hat einen ungewichteten *R*-Wert von 52 % (White *et al.*, 1976). In der Ramachandran-Statistik haben 63 % der betreffenden Reste eine bevorzugte Konformation, während 11 % eine tolerierte oder verbotene Konformation einnehmen. Strukturen guter Qualität haben mindestens 90 % der relevanten Aminosäuren in bevorzugten Konformationen (Laskowski *et al.*, 1993) und möglichst wenige in tolerierter oder verbotener Konformation. Nicht nur das Protein hat in diesem Modell eine problematische Kon-

formation, auch die Lage des Substrats im aktiven Zentrum ist chemisch nicht plausibel. Das Pyruvat geht vier Kontakte zum Protein ein, die kürzer als 2 Å sind. Die Aussagekraft dieses Modells ist gering.

Weiterhin gibt es eine L-LDH, die *S-lac*-NAD⁺ im aktiven Zentrum gebunden hat: 5LDH aus Schweineherz (Grau *et al.*, 1981). *S-lac*-NAD⁺ ((3*S*)-5-(3-Carboxy-3-hydroxypropyl)-NAD⁺) ist ein kombiniertes Coenzym-Substrat Analogon, das aus einem Lactat besteht, welches über zwei aliphatische Kohlenstoffatome kovalent an NAD⁺ gebunden ist. Es läßt sich von L-LDH reversibel zu pyr-NADH, dem Analogon von Pyruvat und NADH, umwandeln (nach Grau *et al.*, 1981). 5LDH hat eine Auflösung von 2.7 Å und einen *R*-Wert von 19.6 %. Die Ramachandran-Statistik zeigt allerdings, daß diese Struktur stark überverfeinert ist und deshalb auch nur eine begrenzte Aussagekraft hat. 19 % der betreffenden Aminosäuren sind in einer tolerierten oder verbotenen Konformation, während nur 56 % in einer bevorzugten Konformation sind.

Grau *et al.* (1981) diskutieren die Unterschiede zwischen beiden Strukturen auf atomarer Ebene und kommen zu dem Schluß, daß 3LDH mit NAD⁺ und Pyruvat als „Abbruchkomplex“ (*“abortive” ternary complex*) sich deutlich von 5LDH mit *S-lac*-NAD⁺ unterscheiden läßt, welches den „aktiven Komplex“ (*“active” ternary complex*) darstellt. Ob hochaufgelöste Strukturen diese Ergebnisse bestätigen würden, ist offen. Allerdings haben diese klassischen Arbeiten andere Erkenntnisse gebracht, die von großer Relevanz sind, wie z. B. die Entdeckung des Coenzym-Loops (White *et al.*, 1976).

Neuere Strukturen von ternären L-LDH Komplexen sind 9LDT aus Wildschwein-Muskel von Dunn *et al.* (1991) sowie 1I0Z aus dem menschlichen Herz und 1I10 aus dem menschlichen Muskel von Read *et al.* (2001). Hier handelt es sich um Strukturen von Daten mit 2.0 bis 2.3 Å Auflösung, die mit modernen Methoden verfeinert wurden und von hoher Aussagekraft sind. Bei diesen Strukturen handelt es sich durchgehend um Enzym-NAD⁺-Oxamat Komplexe.

Die einzige moderne Struktur eines Proteines der Familie der Lactat/Malat-Dehydrogenase im ternären Komplex mit Substrat und NAD (-Analogon) ist die zytoplasmatische Malat-Dehydrogenase aus Schwein im Komplex mit dem alternativen Substrat 2-Oxomalonat und dem NADH-Analogon 1,4,5,6-Tetrahydro-Nicotinamid (Chapman *et al.*, 1999, PDB-Kürzel 5MDH). Außerdem gibt es Strukturen der zur L-HicDH nicht homologen D-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase im Komplex mit

NAD⁺ und 2-Oxoisocaproat, Phenylpyruvat und 2-Oxocaproat (Dengler *et al.*, 1997; Eifert, 2001).

In dieser Arbeit werden die Strukturen der ternären L-HicDH-NAD⁺-Substrat Komplexe mit den Substraten 2-Oxocaproat, 2-Oxoisocaproat und Phenylglyoxylat sowie dem Inhibitor Oxamat (siehe Abbildung 1.11 auf Seite 16) vorgestellt. Zum Vergleich wurde die Struktur des binären L-HicDH-NAD⁺ Komplexes (Niefind *et al.*, 1995, PDB-Kürzel 1HYH) erneut ermittelt. Dabei ließen sich in den Strukturen auch Bereiche erkennen, die in 1HYH ungeklärt geblieben sind. Dazu gehört vor allem der Verlauf des für die Reaktion wichtigen Coenzym-Loops.

4.1 Von der Expression bis zur Struktur

Um die besonderen Eigenschaften der L-HicDH strukturell zu erfassen, wurde das Protein in *E. coli* heterolog exprimiert, gereinigt und im Komplex mit NAD⁺ und den Substraten 2-Oxocaproat, 2-Oxoisocaproat, Phenylglyoxylat sowie dem Inhibitor Oxamat kristallisiert. Zusätzlich wurde aus dem binären L-HicDH-NAD⁺ Komplex ein „nativer“ Kristall erhalten.

4.1.1 Proteinexpression und -reinigung

L-HicDH wurde in zwei verschiedenen Systemen exprimiert: zum einen im „Plasmidsystem“ (Lerch, 1989; Lerch *et al.*, 1989) und zum anderem in dem „Phasmidsystem“ (Feil, 1992). Aktives Protein ließ sich aus beiden Systemen zur 98%igen Homogenität reinigen. Allerdings war die Ausbeute vom Plasmidsystem siebenmal höher als vom Phasmidsystem. Daraus folgend war auch die Reinigung und die allgemeine Handhabung leichter.

Die Reinigung wurde gegenüber der tradierten Methode (Schütte *et al.*, 1984; Lerch, 1989; Feil, 1992; Niefind, 1993; Feil *et al.*, 1994) in einigen Punkten verändert, um sie schonender für das Protein und gleichzeitig effizienter zu machen: Erstens wurden die Bakterien mit einer French Press aufgebrochen. Zweitens wurde die Dialyse vor der hydrophoben Interaktionschromatographie umgangen. Drittens wurde zur hydrophoben Interaktionschromatographie eine Phenylsepharosesäule statt einer Sepharose 4B-Säule verwendet. Das Protein wurde mit Wasser von der Säule eluiert. Viertens wurde nach dem Aufbrechen der Bakterien das Protein nie wieder eingefro-

ren. Fünftens wurde das Protein aus dem Phasmidsystem nicht durch Ultrafiltration umgepuffert, sondern mittels Stoßelution von einer Anionenaustauschchromatographiesäule aufkonzentriert, durch Gelfiltration umgepuffert und schließlich durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Die Reinigung war in beiden Fällen zufriedenstellend und gab ausreichend viel aktives Protein. Mit der Zeit war ein Aktivitätsverlust zu beobachten, allerdings ließ sich die L-HicDH auch nach monatelanger Lagerung bei 0–4 °C gut kristallisieren.

4.1.2 Kristallisation

Niefind (1993) hatte fünf verschiedene Kristallformen der L-HicDH gefunden. Eine neue Suche nach völlig neuen Kristallformen blieb erfolglos, brachte aber neue Wachstumsbedingungen der Form 5. Diese Kristalle wurden ohne Zusatz von NAD^+ und Substraten gewonnen und bestanden daher aus Apoenzym. Trotz einer Reihe von Optimierungsversuchen, die zu kompakten Einkristallen führten, ließen sich keine Kristalle mit ausreichend guter Streufähigkeit gewinnen, so daß keine Strukturinformation gewonnen werden konnte.

Kristalle der Form 1 (Raumgruppe $P3_221$) ließen sich reproduzieren und ergaben die „native“ Kristallstruktur des binären L-HicDH– NAD^+ Komplexes. Zur leichteren Züchtung ausreichend großer Kristalle wurden Macroseeding-Bedingungen entwickelt. Es war möglich, diese Wachstumsbedingung soweit zu modifizieren, daß sich ternäre Enzym– NAD^+ –Substrat Komplexe kristallisieren und vermessen ließen. Neben einer ganzen Reihe von Substraten (2-Oxoisocaproat, Phenylglyoxylat, 3-Phenylpyruvat und Pyruvat) wurde auch das Substratanalogon Oxamat in solchen ternären Komplexen kristallisiert.

Kristallisationsexperimente mit ternären Komplexen aus L-HicDH, NAD^+ und 2-Oxocaproat ergaben zunächst nur Nadeln. Durch Zufall stellte sich heraus, daß offene Kristallisationsansätze, die langsam austrockneten, kompakte Kristalle ergaben. Dieses Ergebnis ließ sich in *drying drops* zu einer reproduzierbaren Kristallisationsbedingung übertragen, die zu einer neuen Kristallform (Form 6, $P3_121$) führten. Diese Kristalle hatten ein gutes Diffraktionsvermögen.

4.1.3 Röntgendiffraktionsmessung

Ein nativer Kristall und Kristalle mit 2-Oxocaproat, 2-Oxoisocaproat, Phenylglyoxylat und Oxamat wurden unter Verwendung von Synchrotronstrahlung vermessen. Bis auf den Komplex mit 2-Oxoisocaproat wurden alle Kristalle unter Cryobedingungen (100 K) vermessen. Das Vermessen bei Tieftemperaturen ermöglicht es, kleine Kristalle größeren Strahlendosen auszusetzen. Zusätzlich sind die Atome bei einer niedrigeren thermischen Bewegung geordneter und haben eine größere Streufähigkeit. Daher erreichen Cryomessungen meist eine höhere Auflösung als Messungen bei Raumtemperatur.

Für die Messungen bei Tieftemperaturen wurden zwei Cryopuffer entwickelt. Der erste basierte auf Glycerin (Garman & Mitchell, 1996), der zweite hatte Lithiumsulfat als Cryomittel (Rubinson *et al.*, 2000).

Die Substrate wurden so ausgewählt, daß sie repräsentativ für das Substratspektrum der L-HicDH sind. 2-Oxocaproat ist unverzweigt, 2-Oxoisocaproat ist an C4 verzweigt und Phenylglyoxylat ist an C3 verzweigt. Zusätzlich ließen sie interessante Unterschiede in den Strukturen vermuten. 2-Oxocaproat ist das beste bekannte Substrat des Enzyms. Dagegen ist Phenylglyoxylat mit der aromatischen Gruppe an C3 das Substrat, das von 2-Oxocaproat strukturell besonders verschieden ist. Es wird vom Enzym deutlich schlechter umgesetzt (siehe Abbildung 1.11 und Tabelle 1.1 auf Seite 16).

Während sich 2-Oxocaproat und 2-Oxoisocaproat als Isomere nur in der Position einer Methylgruppe unterscheiden, bildeten die Enzymkomplexe mit ihnen zwei völlig verschiedene Kristallformen aus. Dies warf die Frage auf, auf welche Unterschiede in der Substratbindung dies zurückzuführen ist.

Der Kristall mit Oxamat wurde ausgewählt, weil er besonders gute Diffraktionseigenschaften aufwies, so daß es möglich war, eine Struktur mit 2 Å Auflösung zu erhalten. Schließlich wurde der binäre Komplex vermessen, um eine Vergleichsstruktur ohne Substrat zu gewinnen, die mit der gleichen methodischen Vorgehensweise gewonnen wurde. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß Unterschiede in der Struktur aus unterschiedlichen Techniken resultierten. Seit der Veröffentlichung der binären L-HicDH–NAD⁺-Struktur sind neue Techniken (z. B. Diffraktionsmessungen unter Cryobedingungen, Garman & Schneider, 1997), Verfeinerungsprogramme (z. B. SHELX97, Sheldrick & Schneider, 1997) und neue Postulate entwickelt worden (z.

B. solche, die die nichtkristallographische Symmetrie (NCS) betreffen, Kleywegt & Jones, 1995). So war der binäre Komplex bisher nicht unter Cryobedingungen vermessen worden, und es bestand die Möglichkeit, daß bei den Tieftemperaturen der Coenzym-Loop geordneter ist, weil die thermischen Bewegungen der Atome niedriger sind.

Die Auflösung der Daten betrug 1.99–2.35 Å. Wird als Grenze für die mögliche Auflösung ein I/σ_I -Wert von 2 in der letzten Schale der Skalierung angenommen, sind die Datensätze des binären Komplexes sowie des Komplexes mit 2-Oxoisocaproat ausgereizt, nicht aber die Daten der Komplexe mit 2-Oxocaproat (I/σ_I letzte Schale = 3.7), Phenylglyoxylat (I/σ_I letzte Schale = 3.2) und Oxamat (I/σ_I letzte Schale = 6.3). Während für eine höher auflösende Messung der Kristalle mit Phenylglyoxylat oder Oxamat die Synchrotronmeßzeit fehlte, führte bei dem Kristall mit 2-Oxocaproat eine suboptimale Meßstrategie zu vielen überlappenden Reflexen. Erst der Einsatz von PrOW (Bourgeois, 1999) erlaubte eine Dekonvolution dieser Reflexe und ergab einen Datensatz mit 2.35 Å Auflösung.

4.1.4 Strukturlösung und Verfeinerung

Weil die Struktur des binären L-HicDH–NAD⁺ Komplexes schon bekannt war (Niefind *et al.*, 1995), konnten die Strukturen der ternären Komplexe mit molekularem Ersatz gelöst werden. Bei der Verfeinerung brachte die Kristallverzwillingung von vier der fünf vermessenen Komplexe eine besondere Schwierigkeit. Während drei der Kristalle der Form 1 (nativ, Phenylglyoxylat und Oxamat) ungleich meroedrische Zwillinge waren, handelte es sich bei dem 2-Oxocaproat-Kristall der Form 6 um einen perfekten meroedrischen Zwilling, der weitaus schwieriger zu erkennen war.

Die verschiedenen Zwillingsgrade erforderten unterschiedliche Verfeinerungsprogramme. Der unverzwilligte Datensatz mit 2-Oxoisocaproat mit 2.35 Å Auflösung erlaubte eine *maximum likelihood* Verfeinerung unter der Verwendung der Amplituden. Dies ist der Algorithmus, der bei der gegebenen Auflösung zu den besten Ergebnissen führt und deshalb standardmäßig verwendet wird (Brünger *et al.*, 1998). Das verwendete Programm war CNS.

Mit der gleichen Auflösung und einer perfekten Verzwillingung war der Datensatz mit 2-Oxocaproat nur unwesentlich schwerer zu handhaben. Auch diese Struktur ließ sich mit CNS verfeinern, wobei eine Verfeinerung nach den kleinsten Fehlerqua-

draten für die hemiedrische Verzwilligung angewendet wurde.

Die restlichen Datensätze (nativ, Phenylglyoxylat und Oxamat mit Auflösungen von 1.99–2.14 Å) stammten von Kristallen, die partiell verzwilligt waren. Ihre Struktur wurde mit SHELXL verfeinert, da nur dieses Programm den Zwillingsanteil als eigenen Parameter mitverfeinern konnte. Der verwendete Algorithmus war CGLS (*conjugate-gradient least squares*). SHELXL stammt allerdings aus der Kristallographie der niedermolekularen Verbindungen und ist nicht ohne weiteres für Datensätze mit einer Auflösung über 1.5 Å einsetzbar. Die Gründe dafür liegen unter anderem in einem verhältnismäßig einfachen Wassermodell zur *bulk solvens* Korrektur und in dem Fehlen einer Moleküldynamik.

Um einer Überverfeinerung vorzubeugen, wurden in allen Verfeinerungen starke Einschränkungen (*restraints*) vorgegeben. Insbesondere wurden die Untereinheiten durch NCS *restraints* miteinander verbunden. Dabei wurde darauf geachtet, daß möglichst viele Reste in der Gruppe der vierfachen NCS waren, so daß diese Reste in allen vier Untereinheiten in einer ähnlichen Struktur verfeinert wurden. Nur in Bereichen, wo die Elektronendichten signifikant andere Aminosäurekonformationen erforderten, wurden diese vierfachen NCS *restraints* aufgegeben und, wenn möglich, durch eine zweifache NCS *restraints* ersetzt. In diesem Fall wurden die Reste der Untereinheiten A und B ähnlich verfeinert, desgleichen die Reste der Untereinheiten C und D. Nur an wenigen Stellen wurde gar keine NCS beachtet. Hier handelte es sich meist um einzelne Aminosäuren an der Oberfläche. Als Resultat sind die Strukturen nicht überverfeinert (siehe Abschnitt 3.10).

CNS und SHELXL haben zwei verschiedene Implementierungen von NCS: Während CNS die Atompositionen in der Elementarzelle, also auf einen globalen Bezugspunkt, einschränkt, berechnet SHELXL die Atompositionen lokal, also relativ zu den Nachbaratomen. Das erlaubt die Verwendung von NCS in Loops, die an Scharnieren (*hinges*) auf- und zuklappen. Der Vorteil der strengen Beachtung der NCS liegt darin, daß die Unterschiede zwischen den Untereinheiten wirklich signifikant sind. Dies erleichtert das Verständnis der Proteinbewegungen im Enzym.

Insgesamt sind die Strukturen sorgfältig gelöst und nicht überverfeinert. Sie weisen zwar in dem Coenzym-Loop der Untereinheit A hohe Temperaturfaktoren auf, sind aber auch dort in Konformationen, die einander ähnlich sind. Zu beachten ist, daß die L-HicDH Struktur im Komplex mit 2-Oxocaproat einen besonders stabilen Coenzym-Loop der Untereinheit A mit einer eindeutigen Konformation hat, denn

dieser Loop wird durch einen Kristallkontakt stabilisiert. Auch dieser Loop ist in einer ähnlichen Konformation wie die restlichen. Nicht nur das — das ganze Protein ist in einer ähnlichen Konformation, obwohl es in einer anderen Raumgruppe kristallisiert ist.

4.2 Überblick über die Struktur

Die Struktur der L-HicDH ist in zwei Kristallformen gelöst: Form 1 ($P3_221$, Niefind *et al.*, 1995, und diese Arbeit) und Form 6 ($P3_121$, diese Arbeit). Trotz der unterschiedlichen Kristallumgebung sind die Strukturen weitgehend gleich. Die Struktur mit 2-Oxocaproat (Form 6) läßt sich mit einer Abweichung (RMSD) von $0.47 \pm 0.03 \text{ \AA}$ (bezogen auf durchschnittlich 1 181 $C\alpha$ -Atome) auf die Strukturen der Form 1 überlagern.

Die Kristallstrukturen weisen ein einheitliches Bild auf: Es handelt sich um Tetramere, die 252–365 Kristallwasser gebunden haben. Zwei der Untereinheiten (A und B) haben Substrat bzw. Inhibitor im aktiven Zentrum gebunden, und die beiden anderen Untereinheiten (C und D) Sulfat bzw. Wasser. Die native Struktur hat im aktiven Zentrum der Untereinheit C ein Sulfation gebunden, die anderen Untereinheiten haben die entsprechenden Stellen mit Wasser besetzt. In der Peripherie befinden sich zusätzliche Sulfationen: sie sind in den Spalten zwischen den Untereinheiten A und B (in der Struktur mit Oxamat) sowie C und D (Strukturen mit Oxamat und Phenylglyoxylat) gebunden. Dort verbinden sie die Untereinheiten über Wasserstoffbrücken.

Aus dem bei der Proteinreinigung verwendeten Proteaseinhibitor-Cocktail ließ sich in den Strukturen mit 2-Oxoisocaproat und Phenylglyoxylat Benzamidin (PDB-Kürzel BDN) wiederfinden, das sich in der Spalte zwischen der Untereinheit C und der Untereinheit D eines symmetrieäquivalenten Tetramers befindet und diesen Kristallkontakt verstärkt.

Die Monomere lassen sich in zwei Domänen gliedern (Niefind *et al.*, 1995): Die erste ist die NAD-bindende Domäne und besteht aus dem N-terminalen Teil des Proteins. Sie bildet eine Rossmann-Faltung aus: Zwei verbundene β - α - β - α - β -Einheiten haben ein zentrales, paralleles β -Faltblatt. Die andere Domäne ist die katalytische Domäne und besteht in ihrem Kern aus zwei verdrehten, antiparallelen β -Faltblättern.

4.3 Sekundärstruktur und Topologie

Aus der DSSP-Analyse der Kristallstrukturen (siehe Anhang B, Seite 214) ließ sich ein gemeinsames Topologiemodell ableiten (Abbildung 4.1). Es wiederholt größtenteils das Ergebnis von Niefind *et al.* (1995, siehe Abbildung 1.5 auf Seite 6), ist aber vollständig, weil es die Konformation aller Residuen beschreibt. Außerdem ist das Modell bewertbar, d. h. die Varianz der 20 verschiedenen Untereinheiten gibt einen Hinweis auf die Flexibilität der Residuen und auf die Deutlichkeit des Ergebnisses. So läßt sich beispielsweise ablesen, daß die Konformation des geschlossenen Coenzym-Loops nur auf der Struktur der Untereinheit C des ternären L-HicDH-NAD⁺-Phenylglyoxylat Komplexes beruht. Hier sind die Seitenketten der Residuen 102–105 nicht gelöst und die Residuen 100, 101 und 108 wurden als Alanin verfeinert (siehe Abbildung 3.48 auf Seite 98). Asn106 und Pro107 haben ϕ/ψ Winkel, die im Ramachandran-Plot lediglich toleriert werden. Dieser Loop ließ sich in keiner anderen Kristallstruktur in voller Länge erkennen. Allerdings hat der Coenzym-Loop der Untereinheit C der Struktur mit Oxamat, bei dem die Aminosäuren 105 und 106 fehlen, den gleichen Verlauf der Hauptkette. Das Modell ist also im Bereich 100-108 der geschlossenen Konformation mit der nötigen Vorsicht zu betrachten: Die Positionen der Seitenkettenatome sind nicht so sicher definiert wie der Verlauf der Hauptkette. Es ist möglich, aus dem Verlauf der Hauptkette Schlüsse über die Konformation des offenen Coenzym-Loops zu ziehen. Dabei muss bewußt sein, daß diese Region stark fehlgeordnet ist und viele Moleküle im Kristall dort leicht unterschiedliche Konformationen haben.

Das Modell wurde verwendet, um die Topologie zu vervollständigen (vergleiche Abbildung 1.4 auf Seite 5 und Abbildung 4.2). Das zweidimensionale Schema der Topologie (Niefind *et al.*, 1995, Abbildung 1.4 auf Seite 5, l) wird der Tertiärstruktur nicht völlig gerecht, weil sich die Helices $\alpha 1G$ und $\alpha 2G$ in unmittelbarer Nähe zum Coenzym-Loop befinden. Außerdem ist der Turn in βM (Arg292) Bestandteil der NAD(H)-bindenden Domäne. Mit der neuen Darstellungsweise in Abbildung 4.2 wurde versucht, diesen Interaktionen Rechnung zu tragen.

L-LDH von Vertebraten hat einen N-terminalen Arm, der die Quartärstruktur stabilisiert (Abad-Zapatero *et al.*, 1987). Dieser Arm (und damit die Helix αA) fehlt in L-HicDH und bakterieller L-LDH (Niefind *et al.*, 1995). Die Stränge $\beta A-F$ bilden das zentrale, parallele β -Faltblatt der NAD(H)-bindenden Rossmann-Faltung zusammen mit den Helices αB , αC und $\alpha 3G$ auf der einen und $\alpha C/D$ und $\alpha 1F$ auf der anderen Seite. Die katalytische Domäne besteht aus zwei stark verdrehten antiparallelen

Position	30	40	50	60	70		
Sequenz	ARKIGIIGLGNVGA AVAHGLIAQGVADDYVFIDANEAKVKADQIDFQDAMANLEA						
A/B	EEEE	SHHHHHHHHHHHHTT	SEEEEE	S	HHHHHHHHHHHHHGGGSSS		
C/D	EEEE	SHHHHHHHHHHHHTT	SEEEEE	S	HHHHHHHHHHHHHGGGSSS		
	- β A--	----- α B-----	- β B--	----- α C-----			
Position	80	90	100	110	120	130	
Sequenz	HGNIVINDWAALADADVISTLGNIKLQQDNPTGDRFAELKFTSSMVQSVGTNLK						
A/B	EEEE	GGGGTT	SEEEE	S	GGGGSS	TT	GGGGHHHHHHHHHHHHHHHH
C/D	EEEE	GGGGGG	SEEEE	B	SS	SHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	
	- β C-		- β D-			----- α D/E-----
	(outer) active site loop						
Position	140	150	160	170	180		
Sequenz	ESGFHGLVVISNPVDVITALFQHVTFPAHKVIGTGTLTLDARMQRAVGEAFDL						
A/B	HHT	SEEEE	SSSHHHHHHHHHHH	GGGEEE	TTHHHHHHHHHHHHHHTT		
C/D	HHT	SEEEE	BTHHHHHHHHHHH	GGGEEE	TTHHHHHHHHHHHHHHTT		
	..	- β E-	----- α 1F----	β F-	----- α 2F-----		
	i. a. s. l.						
Position	190	200	210	220	230	240	
Sequenz	DPRSVSGYNLGEHGNSQFVAWSTVRVMGQPIVTLADAGDIDLAAIEEEARKGGFT						
A/B	GGG	EEB	TTTT	EE	GGG	EETTEEHHHHHHHHS	HHHHHHHHHHHHHH
C/D	GGG	EEB	TTTT	EE	GGG	EETTEEHHHHHHHTTS	HHHHHHHHHHHHHH
		β G	β H1	β H2	β J	--- α 3F..	--- α 1G---- ---
Position	250	260	270	280	290		
Sequenz	VLNGKGYTSYGVATS AIRIAKAVMADAHAE LVVSNRRDDMGMYLSYP AIIGRDGV						
A/B	HHHHSS	HHHHHHHHHHHHHHHTT	EEEEEEEE	TTTS	SEEEEEEEEEETTEE		
C/D	HHHHSS	HHHHHHHHHHHHHHHTT	EEEEEEEE	TTTS	SEEEEEEEEEETTEE		
	- α 2G-	----- α 3G-----	--- β K---	---	β M----		
Position	300	310	320				
Sequenz	LAETTLDLTTDEQEKLQSRDYIQRDFEIVDTL						
A/B	EEE	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHTT					
C/D	EEE	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHTT					
	β M-	----- α H-----					

Abbildung 4.1: Die Sekundärstruktur des gemeinsamen Modells, das aus den fünf L-Hic-DH Strukturen abgeleitet wurde (siehe auch Anhang B ab Seite 214). Die Untereinheiten A/B sind geschlossen, C/D offen; (outer) active site loop: Coenzym-Loop; i. a. s. l.: inner active site loop. Der flexible Oberflächenloop ist zwischen Ala222 und Asp226. DSSP-Bezeichnungen der Sekundärstrukturen (Kabsch & Sander, 1983): H = α -Helix, B = β -Brücke, E = β -Strang, G = 3_{10} -Helix, I = π -Helix, T = wasserstoffgebundener Turn, S = Krümmung $> 70^\circ$.

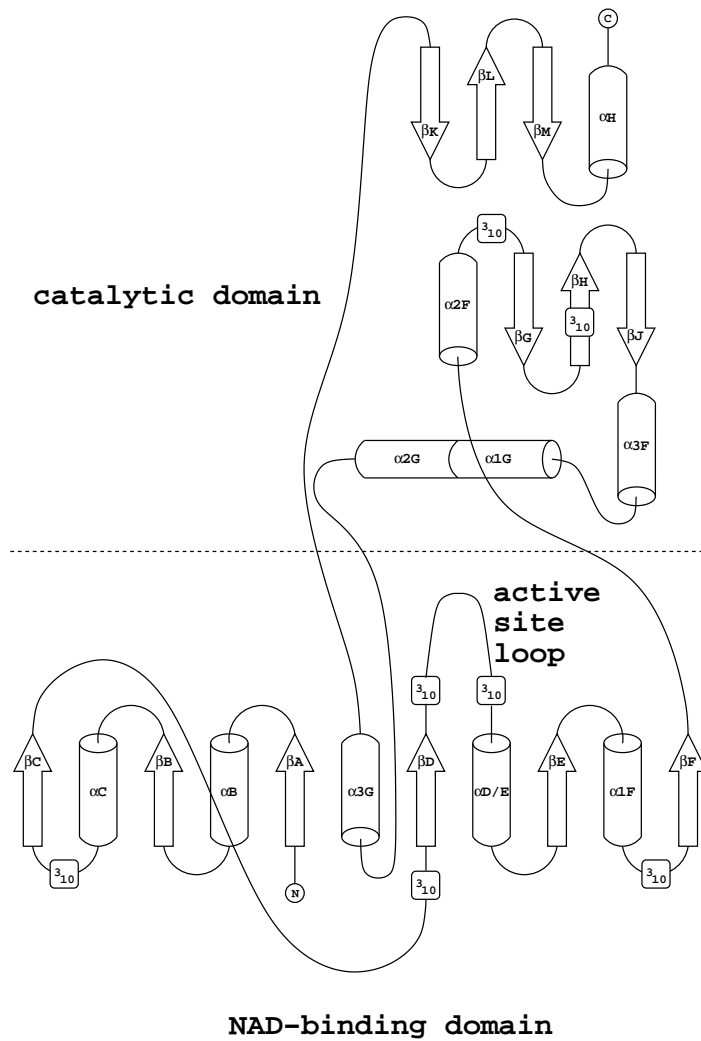


Abbildung 4.2: Die Topologie der L-HicDH lässt sich in eine NAD(H)-bindende Domäne und eine katalytische Domäne unterteilen. Gezeigt ist die geschlossene Konformation. Die offene Konformation hat nur eine 3_{10} -Helix im Coenzym-Loop (*active site loop*). Die Unterschiede zur Topologie von 1HYH werden im Text erläutert. Neu ist unter anderem die α -Helix $\alpha 3F$.

β -Faltblättern. Eines wird aus den Strängen βG , $\beta H1$, $\beta H2$ und βJ gebildet und das andere aus den Strängen βK , βL und βM . Diese β -Faltblätter sind von den Helices $\alpha 2F$, $\alpha 3F$, $\alpha 1G$, $\alpha 2G$ und αH umgeben.

Zusätzlich lassen sich 3_{10} -Helices ausmachen: zwischen αC und βC , βC und βD , βD und $\alpha D/E$, $\alpha 1F$ und βF und zwischen $\alpha 2F$ und βG . Im Unterschied zu den Strukturen von Abad-Zapatero *et al.* (1987) und Niefind *et al.* (1995) ist in allen 20 Untereinheiten der Strang βH von einer 3_{10} -Helix unterbrochen, so daß von den Strängen $\beta H1$ und $\beta H2$ gesprochen werden muß.

Im Coenzym-Loop der geschlossenen Untereinheiten, also zwischen βD und $\alpha D/E$ von A und B, befinden sich zwei 3_{10} -Helices. Die Residuen, die die zweite 3_{10} -Helix bilden, sind in den offenen Untereinheiten Bestandteil der Helix $\alpha D/E$. Dies ist in Abbildung 4.1 ersichtlich. Die Stellen, wo sich die Stränge und α -Helices der offenen Untereinheiten von denen der geschlossenen Untereinheiten unterscheiden, sind durch Punkte markiert.

Auch die Struktur des flexiblen Oberflächen-Loops (Residuen 216–226) ist im Modell definiert. Anders als bei Niefind *et al.* (1995) ist hier eine α -Helix zu erkennen, die $\alpha 3F$ genannt wurde. Auch hier sind Unterschiede zwischen der offenen und der geschlossenen Konformation auszumachen: $\alpha 3F$ umfasst in der offenen Struktur die Aminosäuren 216–223. In der geschlossenen Struktur ist die Helix zwei Residuen kürzer (216–221).

Abgesehen von den α -Helices und β -Faltblättern unterscheiden sich die offenen von den geschlossenen Untereinheiten in den Positionen von Krümmungen und Turns, vor allem im Coenzym-Loop (*outer active site loop*) und im *inner active site loop* (Abbildung 4.1).

4.4 Tertiärstruktur

In der Tertiärstruktur läßt sich die Faltung des Proteins erkennen. Sie ist im Großteil von Niefind *et al.* (1995) beschrieben. Auf die Besonderheiten wird im folgenden eingegangen.

4.4.1 Die geschlossene Untereinheit

Abbildung 4.3 zeigt die Untereinheit A des Kristalls mit 2-Oxocaproat. Dies ist die Struktur mit der niedrigsten Standard-Unsicherheit der Atompositionen des Coenzym-Loops (siehe Abschnitt 3.8.2). Zur Übersicht für die folgenden Abbildungen sind neben dem Substrat und dem NAD⁺ noch drei wichtige Residuen markiert: Pro107 und Arg111 aus dem Coenzym-Loop und Phe239 der Helix $\alpha 2G$. Außerdem sind die Helices $\alpha 3F$, $\alpha 1G$, $\alpha 2G$ und $\alpha D/E$ bezeichnet.

Die Teilung der Untereinheit in zwei Domänen läßt sich in der Abbildung 4.3 erkennen: rechts und unten ist die NAD(H)-bindende Domäne, wobei das zentrale β -Faltblatt der Rossmann-Faltung nur von der flachen Seite zu sehen ist. Links und oben ist die katalytische Domäne (unter anderem mit den Helices $\alpha 3F$, $\alpha 1G$ und $\alpha 2G$ sowie der C-terminalen Helix αH). Die Trennung zwischen den Domänen ist etwa längs der gedachten Verbindungslinie von 6 nach C in Abbildung 4.3.

Die in dieser Arbeit erstmals beschriebene Helix $\alpha 3F$ ist als solche deutlich zu erkennen. Zwischen den Helices $\alpha 1G$ und $\alpha 2G$ ist ein Knick, ebenso in der Helix $\alpha D/E$. Der Coenzym-Loop um Pro107 verläuft über dem aktiven Zentrum mit dem Substrat (2-Oxocaproat). Wie in Abschnitt 3.8.2 gezeigt, ist die Seitenkette von Arg111 in direkter Nähe zum Substrat (siehe vor allem Abbildung 3.34 auf Seite 82). Die Helix αH im C-Terminus ist in Ser314 geknickt, so daß sich der C-terminale Teil der Helix oberhalb des Coenzym-Loops befindet und diesen stabilisiert. Die Interaktionen zwischen der Helix und dem Loop sind hydrophobe Interaktionen (Leu115 \leftrightarrow Ile325 und Phe112 \leftrightarrow Arg321 C γ) und die Wasserstoffbrücke Asp110 \leftrightarrow Arg321.

4.4.2 Die Unterschiede zwischen der offenen und der geschlossenen Untereinheit

Die Struktur der offenen Untereinheit C vom L-HicDH-NAD⁺-Phenylglyoxylat Komplex ist in Abbildung 4.4 analog zur Abbildung 4.3 dargestellt. Sie gleicht im

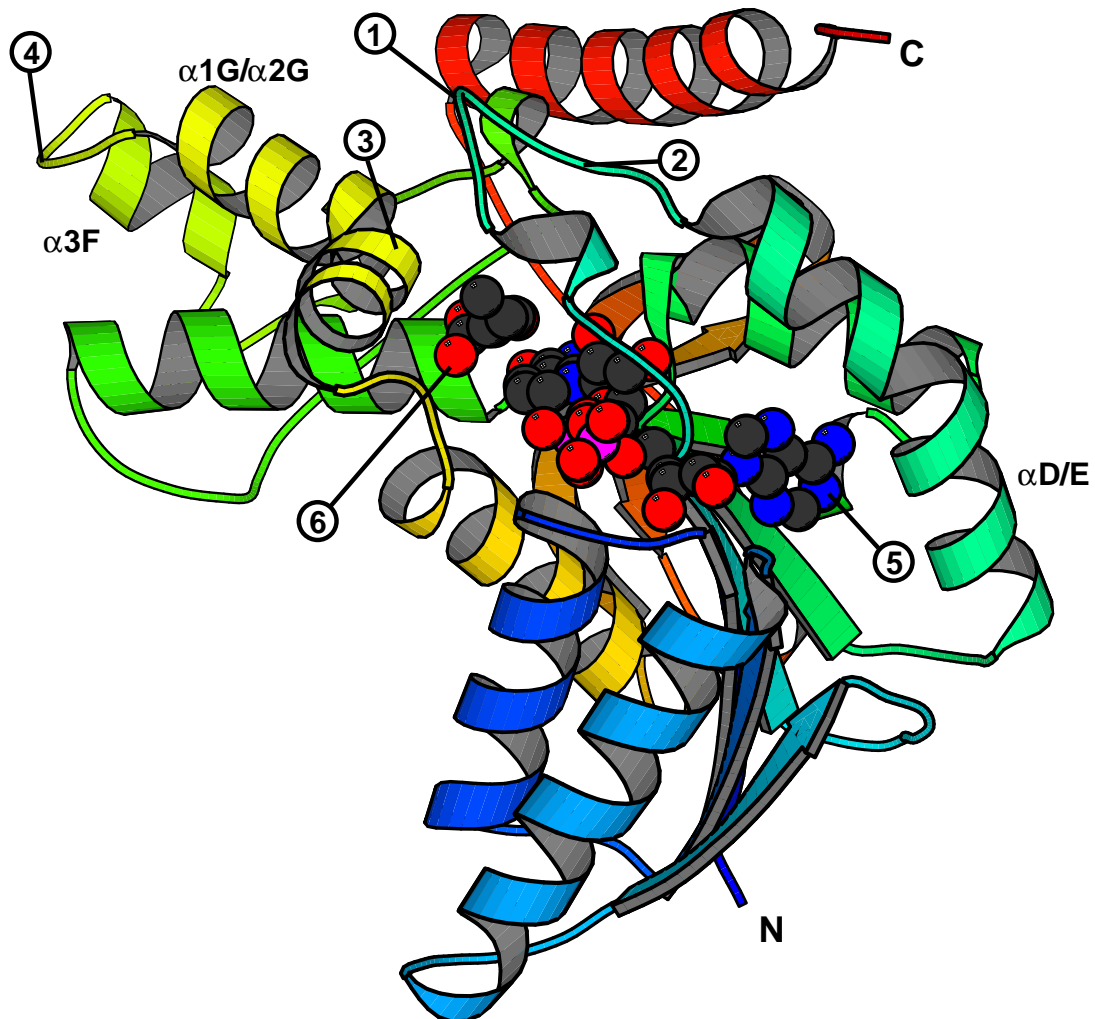


Abbildung 4.3: Die geschlossene Untereinheit A von L-HicDH mit 2-Oxocaproat (im Banddiagramm). Die Proteinkette ist vom N- zum C-Terminus von blau über grün und gelb nach rot gefärbt. Die Sekundärstrukturen wurden mit MOLAUTO (Kraulis, 1991) bestimmt. Markiert sind N- und C-Terminus, sowie die Positionen der Aminosäuren Pro107 (1), Arg111 (2) und Phe239 (3). Außerdem ist der flexible Oberflächen-Loop bezeichnet (4). Die Atome des Coenzym (5, PDB-Kürzel NAD) und des Substrats 2-Oxocaproat (6, PDB-Name OCA) sind mit einem 1 Å Radius dargestellt.

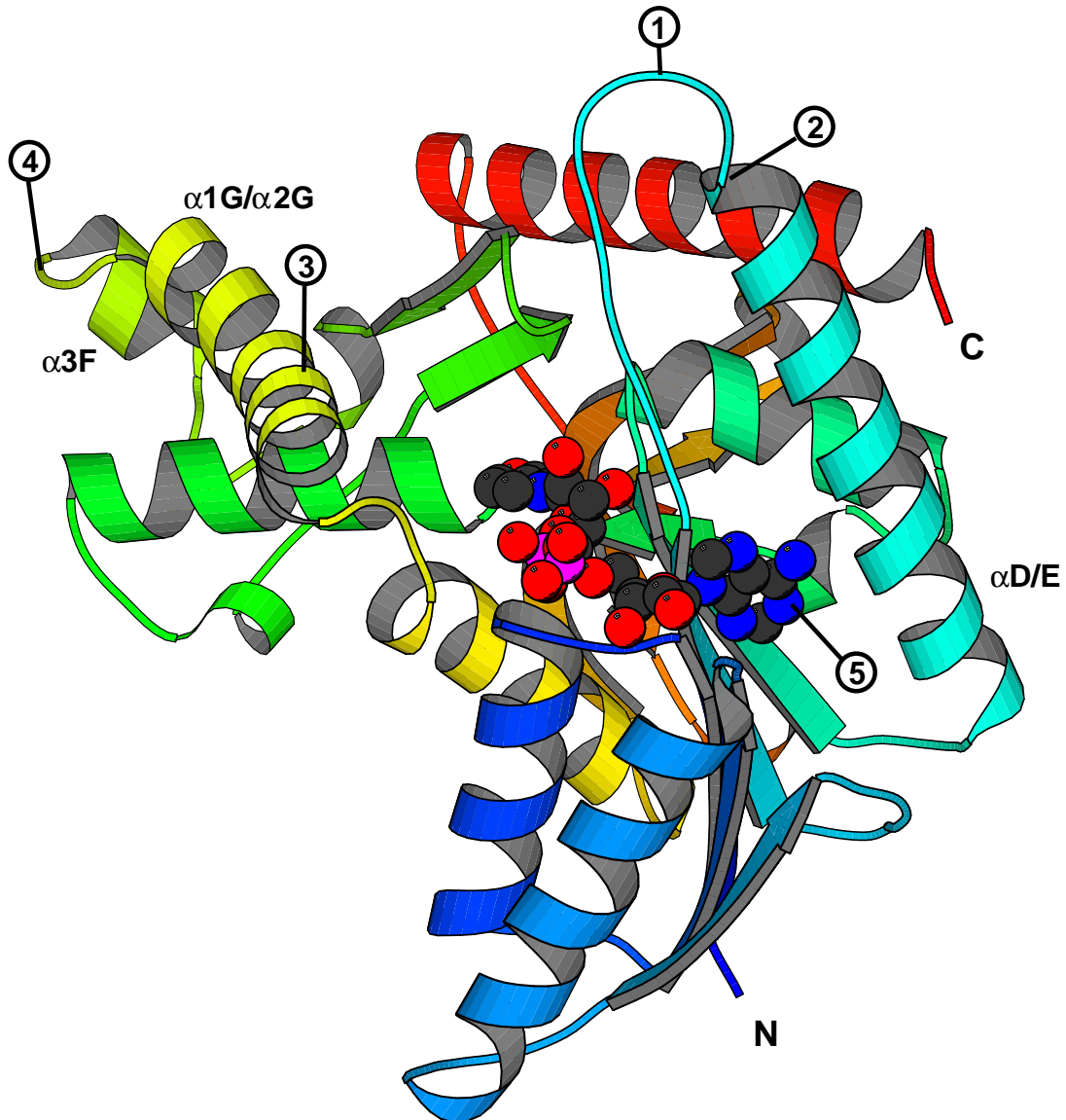


Abbildung 4.4: Die offene Untereinheit C von L-HicDH mit Phenylglyoxylat (im Bandendiagramm). Die Proteinkette ist von blau (N-Terminus) über gelb und grün nach rot (C-Terminus) gefärbt. Die Sekundärstrukturen wurden mit MOLAUTO (Kraulis, 1991) bestimmt. Analog zur Abbildung 4.3 sind N- und C-Terminus, die Aminosäuren Pro107 (1), Arg111 (2) und Phe239 (3) und der flexible Oberflächen-Loop (4) markiert. Die Atome des Coenzym (5, NAD) sind mit einem 1 Å Radius dargestellt.

wesentlichen der Struktur der geschlossenen Untereinheit. Die Besonderheiten sind:

- Der Verlauf des Coenzym-Loops ist anders. Der Loop ist offen und gestreckt. Die Helix $\alpha D/E$ ist länger. Dies ist schon aus der DSSP-Analyse ersichtlich (Abbildung 4.1). Die zweite 3_{10} -Helix fehlt. Damit gleicht der Loop dem offenen Coenzym-Loop des L-LDH Holoenzym (Gerstein & Chothia, 1991). Diese Parallele spricht für die Konformation des offenen Loops.
- In der offenen Konformation sind die Helices $\alpha 1G$ und $\alpha 2G$ in einer Linie und folgen einer leicht gebogenen Kurve. Sie sind bei weitem nicht so stark geknickt wie in der geschlossenen Konformation. Dunn *et al.* (1991) betonen die Bedeutung dieser Bewegung und benutzen das Bild von einem Gebiß, wobei der Coenzym-Loop den Oberkiefer (*upper jaw*) darstellt und die Helix $\alpha 2G$ den Unterkiefer (*lower jaw*).
- Die C-terminale Helix αH ist gestreckt. Damit ist sie in Kontakt mit dem gestreckten Coenzym-Loop. Die Interaktionen zwischen der Helix und dem Loop sind andere als in der geschlossenen Untereinheit. Besonders auffällig ist Arg111, das in einer völlig anderen Konformation vorliegt. Während es in der geschlossenen Untereinheit an der Substratbindung beteiligt ist, bindet es in der offenen Untereinheit an Arg321 und Glu324 (siehe Abbildung 3.57 auf Seite 106). Dabei gleicht die negative Ladung von Glu324 die positiven Ladungen der Arginine teilweise aus. Zusätzliche Interaktionen sind die Wasserstoffbrücken Ser119 \leftrightarrow Thr328 und der hydrophobe Kontakt Leu115 \leftrightarrow Ile325.

Abbildung 4.5 vergleicht die offene mit der geschlossenen Untereinheit. Dazu wurden die $C\alpha$ Atome der Residuen 21–80 mit XTALVIEW überlagert (Option LSQ Fit in XFIT, McRee, 1999). Dieses einfache Strukturalignment stellte sicher, daß Unterschiede in den restlichen Bereichen sich nicht auf die Positionierung des „Rahmens“ der Proteinkette auswirken kann. In der Abbildung 4.5 sind die drei angesprochenen Bereiche gelb hervorgehoben.

Aber sind das die einzigen Unterschiede? Um das zu ermitteln, wurde das Alignment verwendet, um die Abstände aller $C\alpha$ -Atome zu berechnen. Diese Werte sind in Abbildung 4.6 aufgetragen. Es läßt sich erkennen, daß die oben aufgeführten Bereiche die einzigen größeren Regionen sind, an denen sich die $C\alpha$ -Positionen unterscheiden: $\alpha D/E$ und Coenzym-Loop um Gly109, $\alpha 1G$ und $\alpha 2G$ mit Gly237 und Gly238 in der Mitte und αH von Ser314 bis zum C-Terminus. Ansonsten gibt es nur noch drei kurze

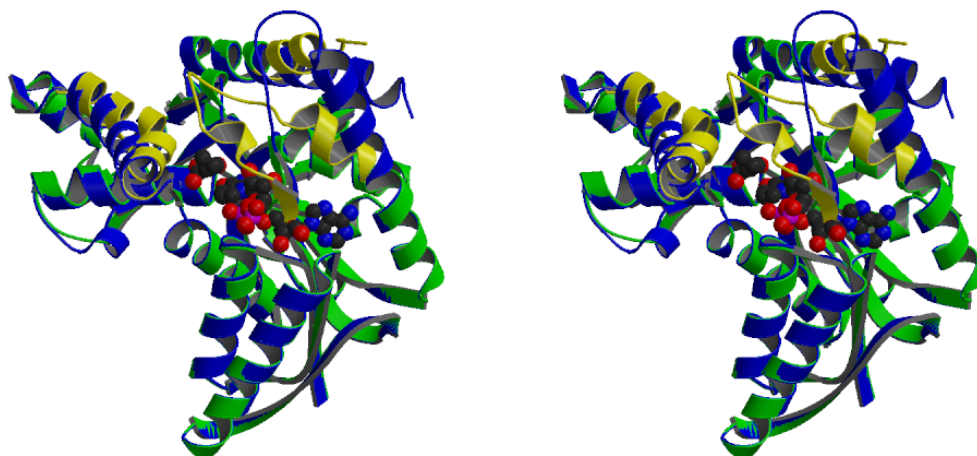


Abbildung 4.5: Überlagerung einer geschlossenen und einer offenen Untereinheit (Stereoabbildung). Gezeigt sind die Banddiagramme der offenen Untereinheit C des L-HicDH-NAD⁺-Phenylglyoxylat Komplexes (blau) und der geschlossenen Untereinheit A des L-HicDH-NAD⁺-2-Oxocaproat Komplexes (grün und gelb, mit dem Substrat 2-Oxocaproat und dem Coenzym NAD⁺ als Atommodell mit 1 Å Radien). Die Bereiche, in denen die geschlossene Konformation von der offenen signifikant abweicht, sind in gelb dargestellt (Thr96–Met121, Asp226–Gly246 und Ser314–C Terminus).

Bereiche in Loops, die sich in den beiden Strukturen unterscheiden: Ser142/Asn143 im *inner active site loop*, Gly199–Asn201 sowie Gly223 im flexiblen Oberflächenloop.

Die restlichen C α -Atome passen mit einer Genauigkeit von weniger als 0.8 Å aufeinander. Dies muß deshalb besonders betont werden, weil die Strukturen nicht nur von verschiedenen Untereinheiten stammen, sondern auch aus völlig verschiedenen Experimenten: die Strukturen von verschiedenen Komplexen in Kristallen mit verschiedenen Raumgruppen wurden mit verschiedenen Verfeinerungsprogrammen gelöst. Trotzdem sind die C α -Atomlagen weitgehend gleich. Bei dem Übergang von der offenen zur geschlossenen Konformation beschränken sich die Veränderungen auf bestimmte Aminosäuren. Eine Domänenbewegung oder innere Umordnung findet nicht statt.

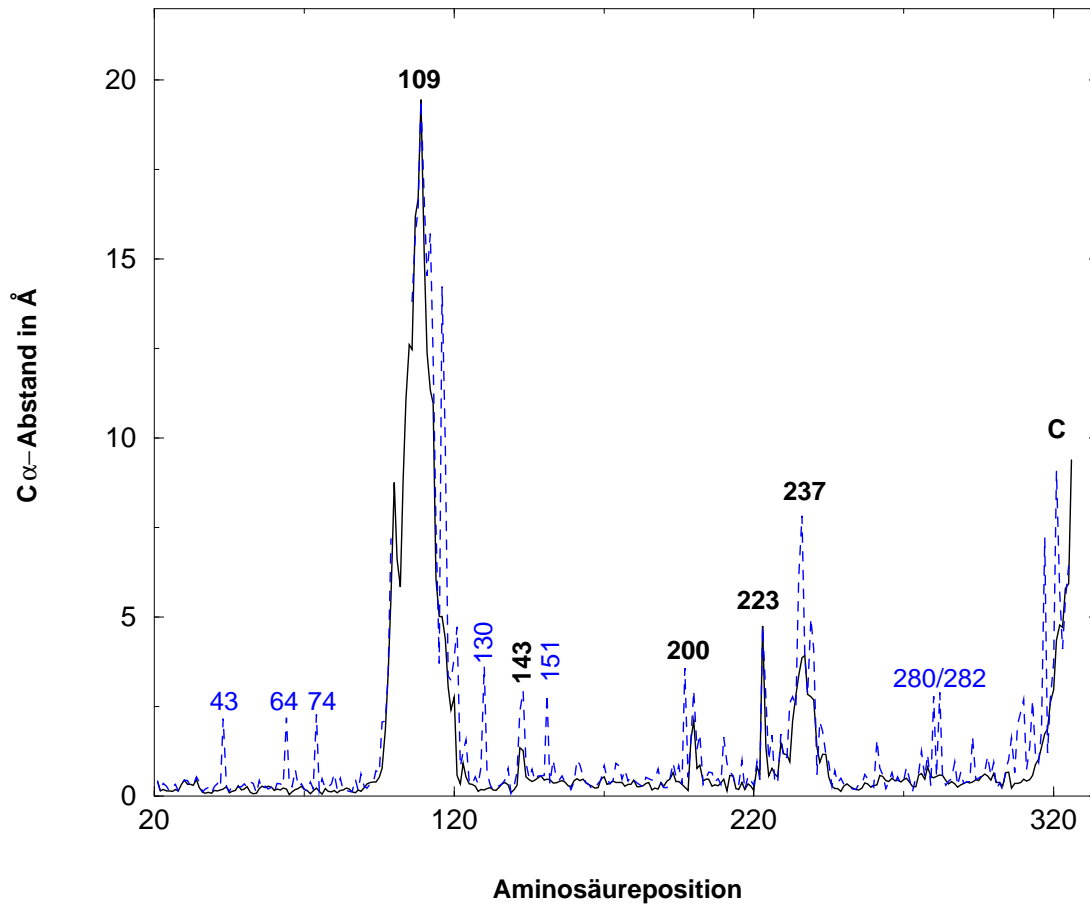


Abbildung 4.6: Die Unterschiede zwischen der geschlossenen Untereinheit A des Komplexes mit 2-Oxocaproat und der offenen Untereinheit C des Komplexes mit Phenylglyoxylat. Schwarz und durchgehend: Vergleich der $C\alpha$ -Positionen. Blau und gestrichelt: Vergleich der endständigen Atome der Seitenketten. Verwendet wurde die Überlagerung der Abbildung 4.5. Neben den dort gezeigten Unterschieden (Thr96–Met121, Asp226–Gly246 und Ser314–C Terminus) gibt es noch drei kurze Bereiche, an denen die $C\alpha$ -Atome der beiden Untereinheiten voneinander abweichen: Ser142/Asn143, Gly199–Asn201 sowie Gly223 im flexiblen Oberflächenloop. Außerdem gibt es einzelne Aminosäuren, deren Seitenketten sich unterscheiden, nicht aber die $C\alpha$ -Positionen (Bezeichnungen in blau).

4.4.3 Die Dynamik der Substratbindung

Während der Substratbindung lagern sich bestimmte Bereiche des Enzyms um. Die Umlagerung ist besonders interessant, weil sie der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion sein kann. Aus dem Vergleich der beiden Konformationen läßt sich die Dynamik dieser Bewegung ableiten. Bei der L-LDH ist die Schließbewegung des Coenzym-Loops der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Dunn *et al.*, 1991). Allerdings ist die L-LDH um fast drei Größenordnungen langsamer als L-HicDH. Die höchsten k_{cat} -Werte sind 450 s^{-1} für L-LDH mit Pyruvat und 3.6×10^5 für L-HicDH mit 2-Oxocaproat (nach Read *et al.*, 2001; Feil *et al.*, 1997). Bei der L-LDH handelt es sich um reine Scharnierbewegungen (Gerstein & Chothia, 1991).

Wie aber sieht die Dynamik der L-HicDH aus? Die Aminosäuren, an denen die Peaks in Abbildung 4.6 beginnen bzw. enden, also Thr96, Met121, Asp226, Gly246 und Ser314, sind Scharniere (*hinges*), analog zu den Ergebnissen von Gerstein & Chothia (1991) an L-LDH. Die größten Unterschiede weisen Gly109 und Gly238/Gly239 auf. Auch diese flexiblen Aminosäuren dienen als Scharniere. In den Abbildungen 4.3–4.5 ist ersichtlich, daß die Helices $\alpha 1\text{G}$ und $\alpha 2\text{G}$ selbst starr sind und zwischen den Scharnieren Asp226 und Gly238 bzw. Gly239 und Gly246 flexibel aufgehängt sind.

Gilt ähnliches für den Coenzym-Loop? Nein. Abbildung 4.7 zeigt den betreffenden Bereich der Überlagerung von Abbildung 4.5 in einer etwas anderen Perspektive. Es ist zu erkennen, daß der Übergang von der offenen zur geschlossenen Konformation nicht nur eine Klappbewegung mit wenigen Scharnieren ist, sondern zusätzlich eine Umfaltung darstellt. Vor allem der Bereich ab Arg111 hat in beiden Loopkonformationen einen sehr unterschiedlichen Verlauf.

4.4.4 Die Rolle von Arg111

Arg111 selbst hat eine Schlüsselrolle in der Umlagerung, da es im offenen Loop an der Interaktion zur Helix αH beteiligt ist, während es im geschlossenen Loop das Substrat bindet. Arg111 fungiert als Sicherungshaken und Sensor zugleich: durch die Bindung zu Glu324 und Arg321 in einer ternären Brücke (Abbildung 3.57 auf Seite 106) stabilisiert Arg111 den offenen Loop. Wenn das aktive Zentrum mit einem Substrat besetzt ist, kann Arg111 an das Substrat binden und begünstigt den geschlossenen Loop. Dabei polarisiert es die Carbonylbindung des Substrats.

Wird in L-LDH das äquivalente Arg109 gegen Gln ausgetauscht, wird die *transi-*

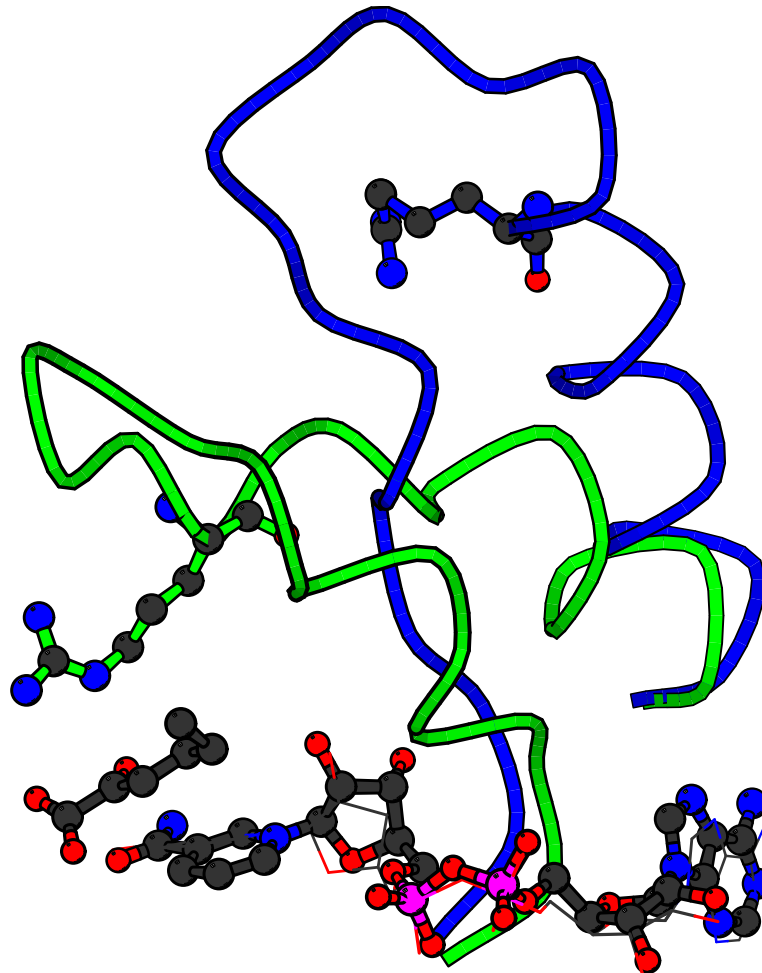


Abbildung 4.7: Vergleich des Coenzym-Loops in der offenen und in der geschlossenen Konformation. Gezeigt sind die Aminosäuren Thr96–Met121 der Untereinheit A des Komplexes mit 2-Oxocaproat (grün) und der Untereinheit C des Komplexes mit Phenylglyoxylat (blau). Neben den Coil-Diagrammen sind die Strukturen von Arg111 als Ball & Stab-Modell dargestellt. Die Farbe ihrer Atombindungen entspricht der Farbe der jeweiligen Coil-Darstellung. Außerdem ist das NAD^+ der offenen Konformation (dünne Linien) und der geschlossenen Konformation dargestellt, zusammen mit dem Substrat 2-Oxocaproat (Ball & Stab-Modell mit 1 \AA Atomradii). Es ist ersichtlich, daß sich die Konformation der Loops stark unterscheidet. Dies bedeutet eine Loopbewegung durch Umfaltung — und nicht nur eine reine Klappbewegung.

tion state Barriere um 6 Kcal/mol erhöht. Dadurch wird die Wasserstoffübertragung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und nicht mehr die Schließbewegung des Coenzym-Loops (Clarke *et al.*, 1986; Clarke & Dafforn, 1998). Analog stabilisiert auch Arg111 von L-HicDH den Übergangzustand. Die Struktur unterstützt dies: In der Untereinheit A ist das Ne 2.86 Å vom Carbonylsauerstoff des 2-Oxocaproats entfernt, und in der Untereinheit B beträgt dieser Abstand 2.82 Å.

Gleichzeitig unterstützen die Abstände von Ne des Arg111 zu Ne2 des His198 das *charge repulsion* Modell nach Grau *et al.* (1981). Sie betragen in der Untereinheit A der Struktur mit 2-Oxocaproat 3.41 Å und in der Untereinheit B 3.38 Å. Ohne Substrat würde das protonierte und damit positiv geladene His198 die gleichfalls positiv geladene Guanidinogruppe von Arg111 abstoßen.

4.4.5 Raumfüllende Modelle

Raumfüllende Modelle können verwirrend sein, weil die Sekundärstrukturen nur noch schwer auszumachen sind. Deshalb sollen sie erst jetzt gezeigt werden, nachdem die wichtigsten Punkte der unterschiedlichen Konformationen angesprochen worden sind.

In Abbildung 4.8 ist gezeigt, wie die offene Untereinheit eine Spalte (*cleft*) hat, in die das NAD⁺ gebunden ist. Diese Spalte wird aus der NAD(H)-bindenden und der katalytischen Domäne gebildet. Das aktive Zentrum, in dem in der gezeigten Struktur ein Sulfation gebunden ist (Untereinheit C des Kristalls mit Phenylglyoxylat), ist dem Lösungsmittel frei zugänglich.

Dagegen ist das aktive Zentrum in der geschlossenen Untereinheit nach außen vollständig abgeschirmt. Nur die Adeninribosegruppe ist dem Lösungsmittel ausgesetzt (Abbildung 4.9).

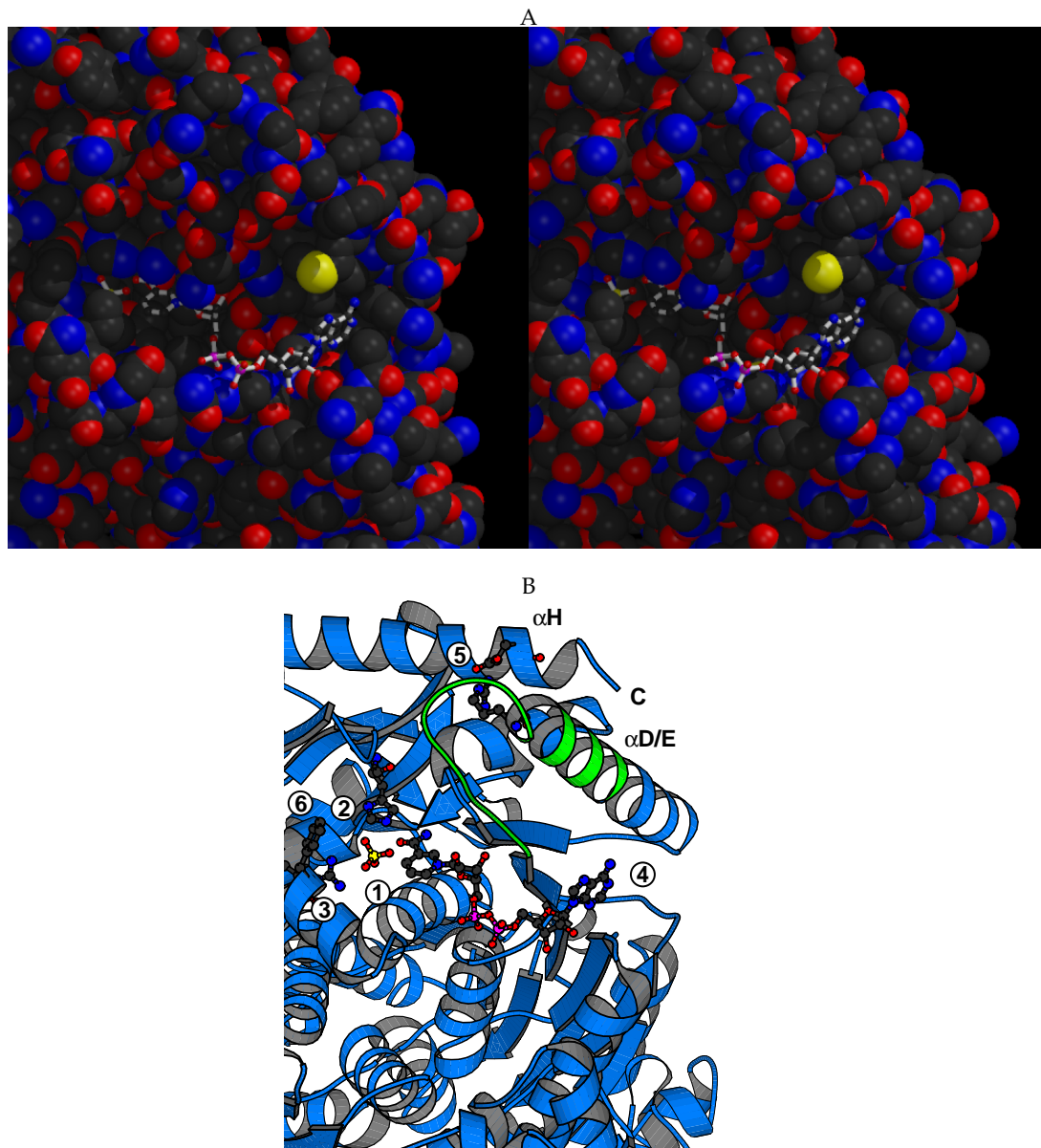


Abbildung 4.8: Die offene Untereinheit hat eine NAD(H)-bindende Spalte und das aktive Zentrum ist dem Lösungsmittel frei zugänglich. Gezeigt ist die Untereinheit C der Struktur mit Phenylglyoxylat. **A:** Stereoabbildung des raumfüllenden Modells. Besonders auffällig ist das gelbe Schwefelatom von Met121. NAD⁺ und das Sulfation sind als Ball & Stab-Modelle dargestellt **B:** Tertiärstruktur, wichtige Aminosäuren und Moleküle in der gleichen Orientierung wie in A. Die Sekundärstrukturen wurden mit MOLAUTO (Kraulis, 1991) bestimmt. Der Coenzym-Loop (96–121) ist grün hervorgehoben. Neben dem C-Terminus sind die Helices $\alpha D/E$ und αH markiert. **1:** Aktives Zentrum. In diesem Fall ist hier ein Sulfation gebunden. **2:** His198. **3:** Arg174. **4:** NAD⁺. **5:** Die Brücke zwischen Arg111 und Glu324. **6:** Phe239.

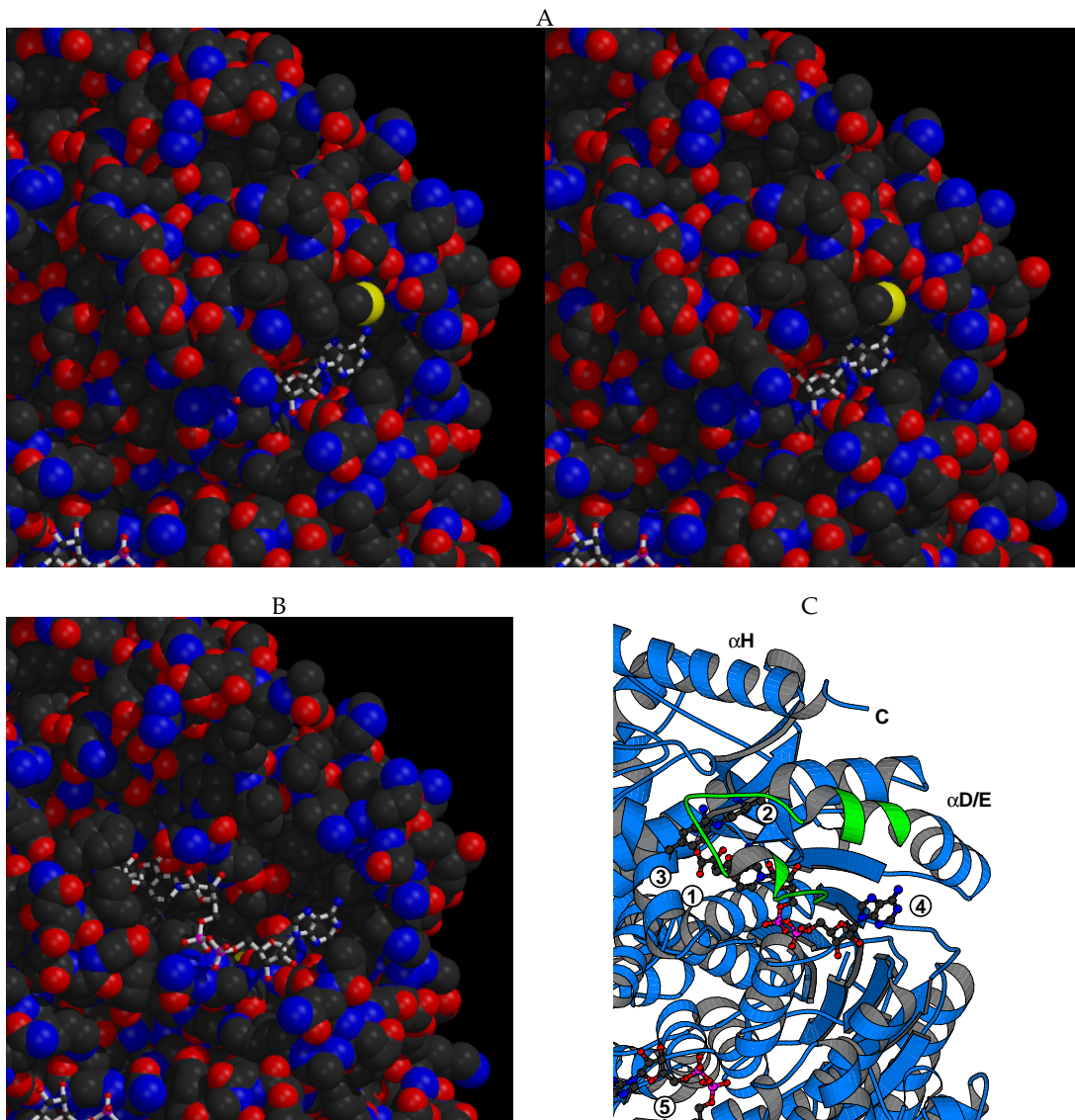


Abbildung 4.9: Der geschlossene Coenzym-Loop schirmt das aktive Zentrum von dem Lösungsmittel ab (gezeigt ist die Untereinheit A der Struktur mit 2-Oxocaproat). **A:** Stereoabbildung des raumfüllenden Modells, **B:** Das Modell ohne Coenzym-Loop. Die Aminosäuren 96–121 sind nicht gezeigt. Sichtbar ist eine Spalte, wie sie in Abbildung 4.8 gezeigt ist. Als Ball & Stab-Modell sind NAD^+ und 2-Oxocaproat dargestellt. **C:** Tertiärstruktur in der gleichen Orientierung. 1: 2-Oxocaproat. 2: Arg111. Es bindet an das Substrat. 3: Nicht nur der Coenzym-Loop, sondern auch Phe239 schirmt das aktive Zentrum vom Lösungsmittel ab. 4: NAD^+ . Es ist ersichtlich, daß der Coenzym-Loop über die Phosphate des NAD^+ geklappt ist und die Nicotinamid-Gruppe und das 2-Oxocaproat abdeckt. Links unten: NAD^+ der Untereinheit C (5).

4.5 Quartärstruktur

Die Monomere sind eng miteinander verzahnt und stabilisieren sich gegenseitig. Dabei befinden sich auch einige Aminosäuren in unmittelbarer Nähe der aktiven Zentren anderer Untereinheiten. Dies ist in Abbildung 4.10 gezeigt. Die (gelbe) Helix αC der Untereinheit C in der ungefähren Bildmitte befindet sich in Nähe zum Substrat der (roten) Untereinheit A.

Auch Abbildung 3.55 auf Seite 105 zeigt die Nähe der Helix αC der Untereinheit C zu dem aktiven Zentrum der Untereinheit A. O δ 1 von Asp65 (C) ist 7.7 Å von C4 des NAD⁺ (A) entfernt und ist über Kristallwasser an dem Wasserstoffbrücken-Netz des aktiven Zentrums beteiligt. Außerdem bindet die Säuregruppe von Asp65 (C) direkt an Ser249 und Gly251 (A). Noch deutlicher ist der Einfluß von Asp68 (C) auf das aktive Zentrum von A (Abbildung 4.11): Asp68 (C) bindet an Arg177 (A) und das für die Enzymreaktion besonders wichtige Arg174 (A). Dabei werden die Seitenketten der Arginine positioniert und ihre Ladung teilweise neutralisiert (Niefind *et al.*, 1995; diese Arbeit).

Diese Beispiele zeigen, wie die aktiven Zentren durch die anderen Untereinheiten stabilisiert und beeinflusst werden. Die Monomere sind mit 309 Aminosäuren zu klein, als daß sie eigenständig die nötigen Strukturen aufbauen könnten, die zur NAD(H)-Bindung und Ausbildung der „Vakuole“ nötig sind. Ein großer Teil ihrer Oberfläche (26–27 %) geht Interaktionen mit anderen Untereinheiten ein.

Allgemein ist die Stabilisierung der offensichtlichste Vorteil, den eine Evolution von monomeren Proteinen zu multimeren Komplexen bietet. Ein weiterer Vorteil ist die mögliche allosterische Regulation. Im Einklang mit L-LDH aus Säugetieren, aber im Unterschied zu L-LDH aus *G. stearothermophilus*, zeigt L-HicDH kein kooperatives Verhalten und hat keinen allosterischen Effektor (Lerch *et al.*, 1989). Bei der allosterisch regulierten L-LDH bindet 1,6-Diphosphofruktose an His191. Das topologische Äquivalent in L-HicDH ist Ser191. In dessen Nähe findet sich in den Elektronendichten kein Hinweis auf eine Bindung eines Effektormoleküls (Niefind *et al.*, 1995, und diese Arbeit).

Im Rahmen der Genauigkeit der Atompositionierung läßt sich auch überprüfen, ob L-HicDH eine Halbseitenreaktivität (*half-of-the-sites reactivity*) aufweist oder nicht. Diese Spezialform der enzymatischen Regulation ist z. B. in der Tyrosyl-tRNA-Synthetase zu beobachten. Dieses Enzym ist ein Homodimer, bei dem immer nur eine

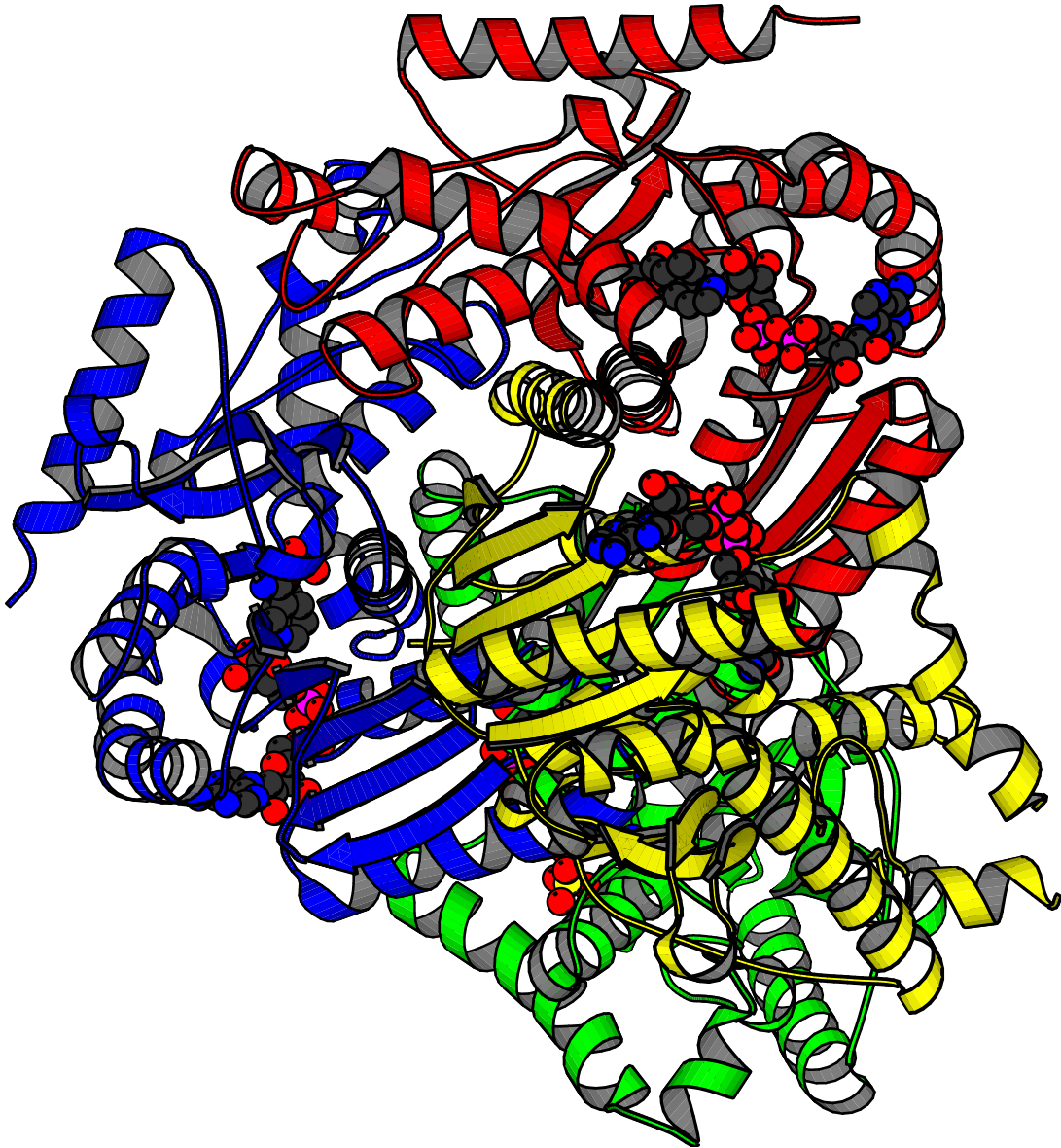


Abbildung 4.10: Das Tetramer besteht aus eng miteinander verzahnten Monomeren. Gezeigt ist der L-HicDH–NAD⁺–2-Oxocaproat Komplex. Die Untereinheiten sind nach dem Farbcode von Rossmann *et al.* (1973) coloriert: Die Untereinheit A ist rot, B ist blau, C ist gelb und D ist grün. Die Substrat- und NAD⁺-Moleküle sind mit 1 Å Atomradius dargestellt.

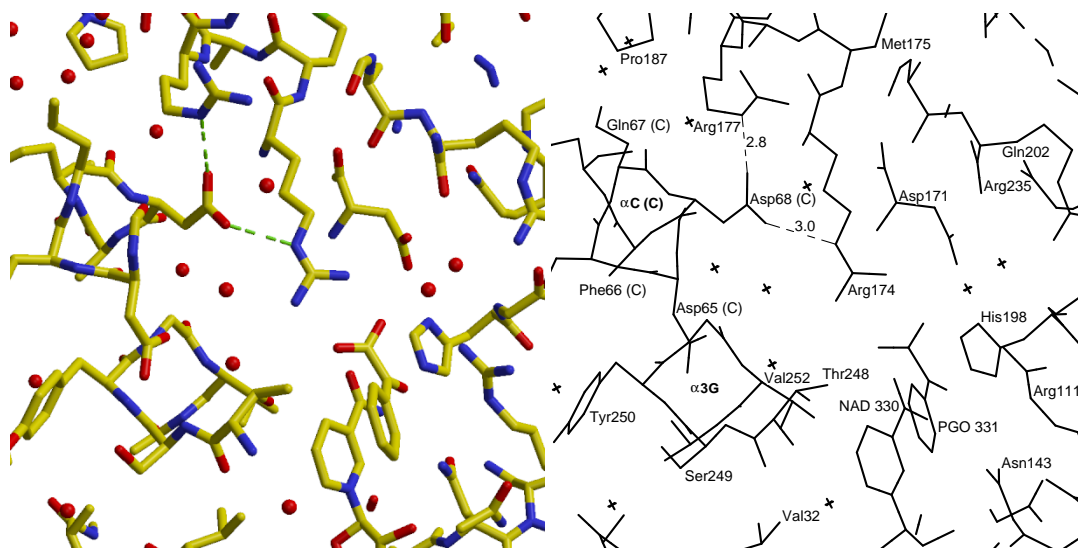


Abbildung 4.11: Die Aminosäure Asp68 der Untereinheit C ist integraler Bestandteil des aktiven Zentrums von der Untereinheit A. Es bindet an Arg174 (A) und Arg177 (A). Links das Modell der Struktur mit Phenylglyoxylat, rechts die Legende. Kristallwasser sind als rote Kugeln dargestellt. Wenn nicht besonders bezeichnet, gehören alle Aminosäuren zur Untereinheit A. Der Blick geht in die α -Helices α 3G (A) und α C (C). Die Abstände sind in Å angegeben.

Untereinheit aktiv ist.

Für die L-LDH gab es Hinweise auf Halbseitenreaktivität, die später als Artefakte betrachtet wurden (Übersicht in Fersht, 1998). In der Kristallstruktur des binären L-HicDH-NAD⁺ Komplexes 1HYH ist eine starke Asymmetrie zu beobachten (Niefind *et al.*, 1995), die auf eine Halbseitenreaktivität hinweist: Zwei Untereinheiten sind offen und zwei sind geschlossen. Die gleiche Kristallform entstand bei der Cokristallisation der L-HicDH mit NAD⁺ und Substraten zu ternären Komplexen. Zusätzlich wurde mit dem L-HicDH-NAD⁺-2-Oxocaproat Komplex eine weitere Kristallform gefunden, die auch zur Hälfte aus geschlossenen und offenen Untereinheiten bestand. Die Struktur 1HYH wurde ohne nichtkristallographische Symmetrie (NCS) verfeinert (Niefind *et al.*, 1995), so daß kleinere Unterschiede zwischen den Untereinheiten nicht unbedingt signifikant sind.

In dieser Arbeit wurden die NCS Einschränkungen (*restraints*) zwischen den Untereinheiten nur dann aufgegeben, wenn die Elektronendichten oder die Umgebung der Aminosäuren das erforderten. Als Resultat unterscheiden sich die Untereinheiten

nur dort, wo tatsächlich Konformationsveränderungen auftreten — und zwar in dem Coenzym-Loop und in den anderen Bereichen, die bei der Vakuolenbildung beteiligt sind. In den Kontaktbereichen zwischen den Untereinheiten dagegen sind keine Unterschiede auszumachen (siehe Abbildung 4.6). Es finden sich keine Hinweise auf ein mechanistisches Modell einer Halbseitenreaktivität: Es gibt keine Sekundärstrukturen oder auch nur Aminosäuren, die zu einer geschlossenen Untereinheit gehören und die offene Konformation einer anderen Untereinheit begünstigen. Genausowenig lassen sich Residuen ausmachen, die eine „Vakuole aufstoßen“, wenn sich eine benachbarte „Vakuole“ bildet (nicht untersucht wurde, ob es Hinweise auf eine elektrostatische Halbseitenreaktivität gibt).

Eine mögliche Hypothese wäre, daß es sich um Kristallisationskräfte handelt, die die asymmetrischen Kristalle begünstigen. Das wiederum würde den Schluß zulassen, daß sich die „Vakuolen“ sehr häufig und schnell öffnen und schließen — anderenfalls würden die Kristalle viel langsamer oder gar nicht wachsen. Die Kinetiken der L-HicDH mit 2-Oxocaproat und 3-Phenylpyruvat zeigen, daß das Enzym für diese Substrate diffusionskontrolliert, also sehr schnell, ist. Der k_{cat} -Wert als direkter Maßstab für die Geschwindigkeit des Öffnens und Schließens der „Vakuole“ ist entsprechend hoch (Feil *et al.*, 1997), viel höher als der k_{cat} -Wert von L-LDH mit Pyruvat. Diese hohen Geschwindigkeiten weisen möglicherweise darauf hin, daß sich die offenen Untereinheiten in dem Bereich des Coenzym-Loops teilweise in ungefaltetem Zustand befinden und bei der Bindung von Substrat falten. In diesem Fall würde der offene Coenzym-Loop (C) des Komplexes mit Phenylglyoxylat den Mittelwert des teilweise ungefalteten Zustands darstellen. Eine Rolle des stabilen Teils des Proteins könnte in diesem Fall sein, einen Rahmen für den Coenzym-Loop zu bilden und so eine völlige Entfaltung des Loops zu verhindern. Die Rolle von Pro107 könnte dabei sein, daß es die möglichen Konformationen des Loops beschränkt, so daß die Faltung beschleunigt wird. Dieses Erklärungsmodell ist im Einklang mit den hohen B -Faktoren des Coenzym-Loops, die sich unter Cryobedingungen nicht signifikant verringert haben. Das läßt auf Fehlordnung statt auf thermische Schwingung schließen.

4.6 Kristallisationskräfte

Die Struktur der L-HicDH wurde in zwei enantiomorphen Raumgruppen gelöst. Die erste ist $P3_221$ in dem binären Komplex (siehe auch Niefind *et al.*, 1995) und den ternären Komplexen mit 2-Oxoisocaproat, Phenylglyoxylat und Oxamat. Die zweite ist $P3_121$ im ternären Komplex mit 2-Oxocaproat. Die Kristallkontakte sind in $P3_121$ (Form 6) etwas größer als in der $P3_221$ (Form 1): Die Größe der Kontaktflächen liegt zwischen 6 und 7 % der Oberfläche in der Form 1 und 8 % der Oberfläche in der Form 6. Wichtiger als dieser geringe quantitative Unterschied ist der qualitative Unterschied. Während die Untereinheit B in der Form 1 fast überhaupt keine Kristallkontakte eingeht, ist sie in der Form 6 fest eingebunden. Dabei sind die Coenzym-Loops der beiden geschlossenen Untereinheiten zentrale Bereiche der Interaktionen (Abbildung 4.12).

Trotz der Unterschiede in den Kristallkontakten sind die Strukturen in den verschiedenen Kristallformen weitgehend gleich. Daraus folgt, daß es sich bei der asymmetrischen Konformation der L-HicDH mit zwei offenen und zwei geschlossenen Untereinheiten um eine bevorzugte Konformation handelt. Da es keine Hinweise auf eine Kopplung zwischen den offenen und den geschlossenen Untereinheiten gibt (Halbseitenreaktivität), muß davon ausgegangen werden, daß die Untereinheiten voneinander unabhängig sind.

Das beste Substrat der L-HicDH ist 2-Oxocaproat mit einem k_{cat} -Wert von $3.6 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ (siehe Tabelle 1.1 auf Seite 16). Der k_{cat} -Wert ist ein Maß für die Schließgeschwindigkeit des Coenzym-Loops (Dunn *et al.*, 1991). Eine hohe Schließgeschwindigkeit weist auf eine energetisch günstige geschlossene Konformation hin. Vermutlich wird durch das gebundene 2-Oxocaproat der Coenzym-Loop stärker stabilisiert als in den anderen Komplexen, so daß eine zusätzliche Kristallisationsoberfläche zur Verfügung steht. Dagegen ist möglicherweise eine gewisse Flexibilität des geschlossenen Coenzym-Loops für die Kristallisation in der Form 1 nötig.

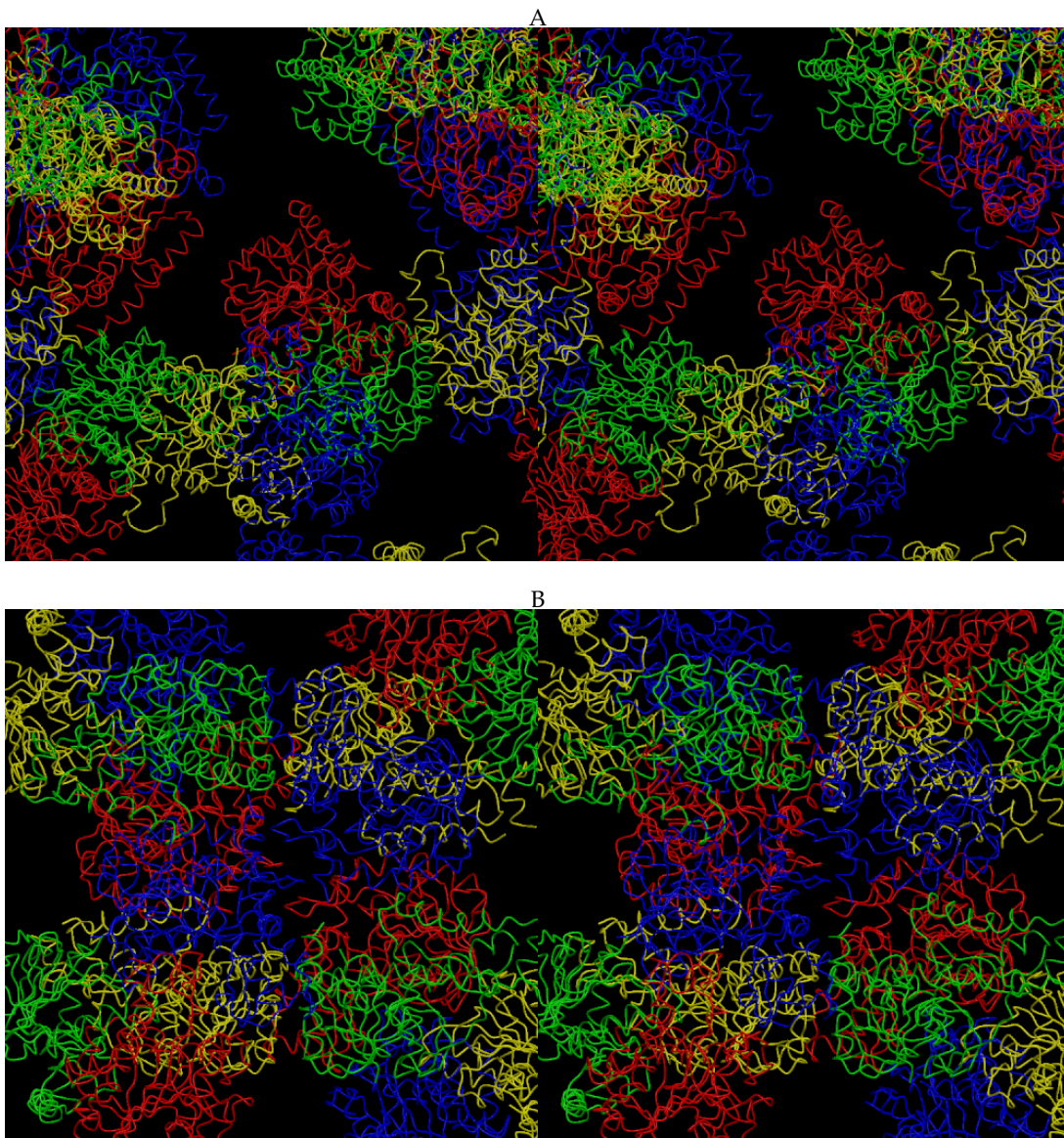


Abbildung 4.12: Die Kristallgitter der verschiedenen Kristallformen sind unterschiedlich. Die Stereoabbildungen zeigen die Kontakte im Kristallverband der Form 1 (A, $P3_221$, nativer und fast alle anderen Komplexe) und Form 6 (B, $P3_121$, Komplex mit 2-Oxocaproat). Die Untereinheit A ist rot, B ist blau, C ist gelb und D ist grün (nach Rossmann *et al.*, 1973). Es ist ersichtlich, daß die Untereinheit B in der Form 1 (fast) keine Kristallkontakte eingeht, während sie in der Form 6 eng im Kristallverband eingebunden ist. Im Zentrum der Stereoabbildung B sind die Coenzym-Loop–Coenzym-Loop Interaktionen der Kristallform 6 zu erkennen: A–A im Vordergrund (blau) und B–B im Hintergrund (rot).

4.7 Elektrostatik

Mit einem berechneten pI von 4.5 ist L-HicDH ein saures Protein. Die Nettoladung des Monomers bei pH 7 beträgt -17 . Die Oberflächenladung ist eine wichtige Eigenschaft der L-HicDH, die einen direkten Einfluß auf die Enzymkinetik hat. Die Unterschiede in der Kinetik der menschlichen Isoformen der L-LDH (aus Muskel und Herz) lassen sich allein auf die Unterschiede ihrer Oberflächenladungen zurückführen und nicht auf Unterschiede in der Struktur. Dabei haben auch solche Aminosäuren einen deutlichen Einfluß auf die Enzymkinetik, die einen großen Abstand zum aktiven Zentrum haben (Read *et al.*, 2001).

Mit GRASP (Nicholls *et al.*, 1991) können einfache Elektrostatikuntersuchungen durchgeführt werden. Dabei werden auch Ladungseffekte berücksichtigt, die über weite Entfernungen reichen. Abbildung 4.13 zeigt die Oberflächenladung der L-HicDH (C oben, A unten). Durch die Nettoladung von $4 \times (-17)$ ist das Tetramer in den meisten Bereichen negativ geladen und erscheint in der Abbildung überwiegend rot.

Die NAD^+ -Moleküle sind als Stabmodelle dargestellt. Sie liegen in den NAD(H) -bindenden Spalten mit ihrem Nicotinamidring im aktiven Zentrum (links in C, rechts in A, vom Coenzym-Loop verdeckt). (1) Der offene Coenzym-Loop (C) ragt aus der Abbildungsebene heraus. (2) Die Helices $\alpha\text{G1}/\alpha\text{G2}$ sind gestreckt und offen. Das aktive Zentrum (teilweise verdeckt) hat ungeladene Bereiche (weiß). (3) Der geschlossene Coenzym-Loop (A) verdeckt den Nicotinamidring des NAD^+ . Rechts neben der Markierung ragt Asp105 aus der Bildebene heraus. (4) In der geschlossenen Untereinheit (A) ist die Adenylatribose-Gruppe von Met121 fixiert.

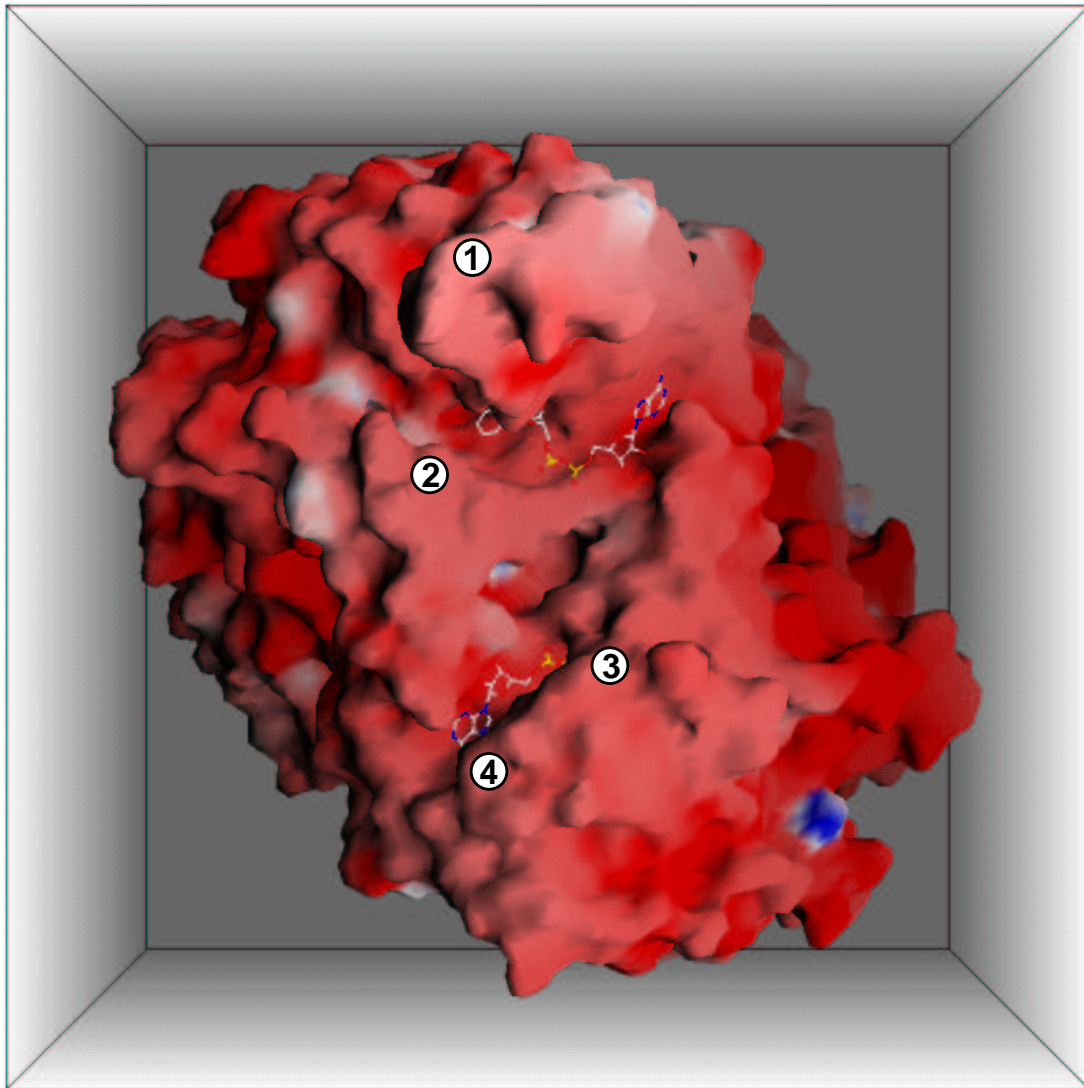


Abbildung 4.13: Elektrostatik der Oberfläche des L-HicDH–NAD⁺–Phenylglyoxylat Komplexes. Bei der Berechnung mit GRASP wurden alle nicht-Protein Atome vernachlässigt. Die Skalierung des Oberflächenpotentials ist von -20 kT/e (rot) über weiß (un geladen) nach $+20 \text{ kT/e}$ (blau). Gezeigt ist die Aufsicht auf die Untereinheiten C (oben) und A (unten). Nach der Berechnung der Oberflächenladung wurden die NAD⁺-Moleküle als Stabmodelle eingefügt. Weitere Erklärungen im Text.

4.8 Die „Vakuole“

Die „Vakuole“ ist der interne wäßrige Hohlraum, der bei der Reaktion um das aktive Zentrum gebildet wird. Hier liegt das Wasser stark lokalisiert als Quasi-Eis vor, so daß eine schnelle Hydridübertragung möglich ist. Der geschlossene Hohlraum definiert die Substratspezifität über die akzeptierte Größe und Ladung, so daß zwischen Substraten mit wenigen funktionellen Gruppen unterschieden werden kann (Dunn *et al.*, 1991).

Die L-HicDH Strukturen lassen erkennen, wie sich die „Vakuole“ bildet und was ihre wichtigsten Aminosäuren sind. Die offene Konformation bildet eine Spalte aus, die das NAD(H) bindet. Das aktive Zentrum ist dem Lösungsmittel (und dem Substrat) frei zugänglich und hat einen ungeladenen Bereich, der den hydrophoben Teil des Substrats binden kann (Abbildung 4.14).

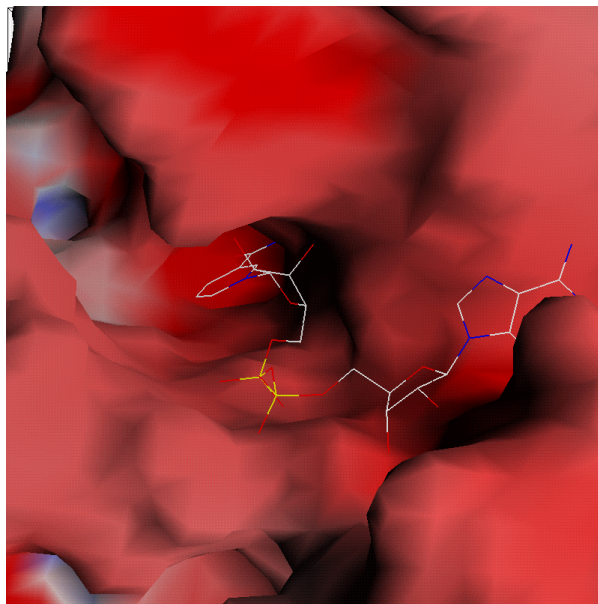


Abbildung 4.14: Die elektrostatische Oberflächenladung des L-HicDH-NAD⁺-Phenylglyoxylat Komplexes. Sie wurde aus dem heteroatomfreien Protein mit GRASP berechnet. Die Skalierung geht von -20 kT/e (rot) über ungeladen (weiß) nach $+20$ kT/e (blau). Das NAD⁺-Molekül ist als Stabmodell dargestellt. Es ist in der NAD(H)-bindenden Spalte gebunden. Das aktive Zentrum mit der Nicotinamid-Gruppe liegt links. Es ist dem Lösungsmittel frei zugänglich und hat einen ungeladenen Bereich (hellrot/weiß).

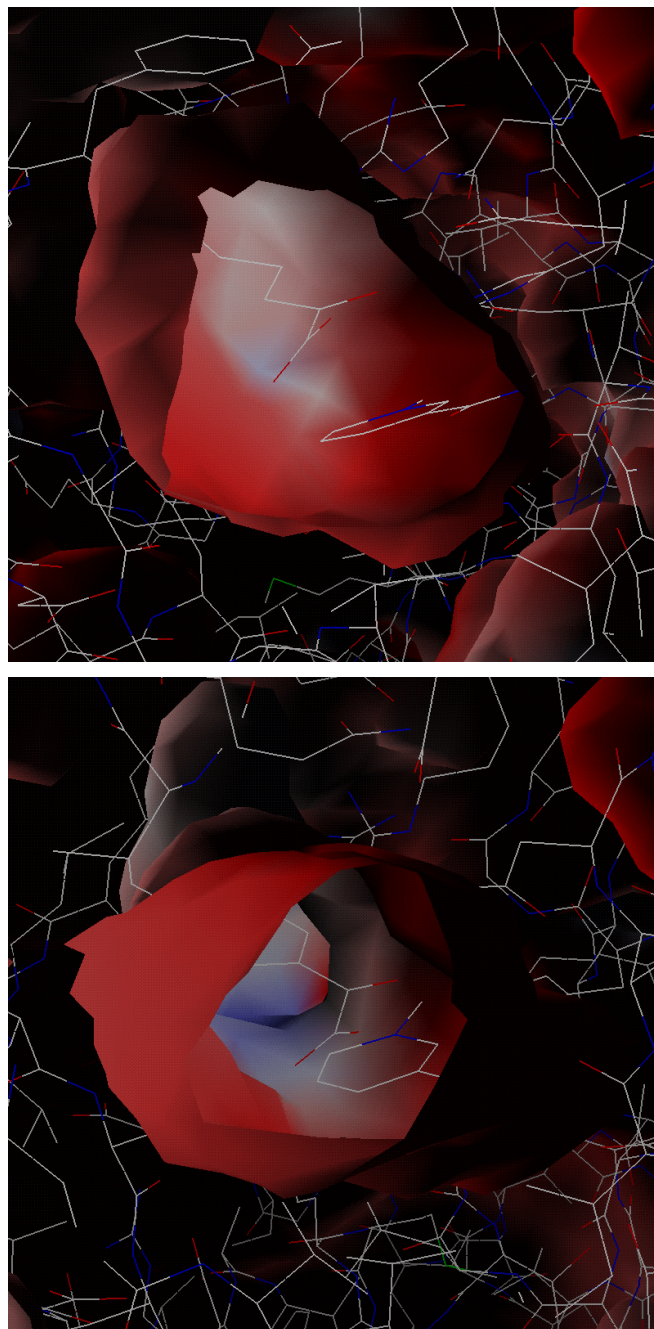


Abbildung 4.15: Das Innere der „Vakuole“ mit 2-Oxocaproat (oben) bzw. Phenylglyoxylat (unten). Die Proteinoberfläche und ihre Ladung (ohne Heteroatome) wurde mit GRASP berechnet. Die Skalierung ist von -20 kT/e (rot) über ungeladen (weiß) nach $+20$ kT/e (blau). Die Nicotinamid-Gruppe des NAD^+ und die Substrate sind im aktiven Zentrum dargestellt. Die aliphatische Kette des 2-Oxocaproats bzw. der aromatische Ring des Phenylglyoxylats ist im relativ ungeladenen Bereich gebunden (hellrot/hellblau).

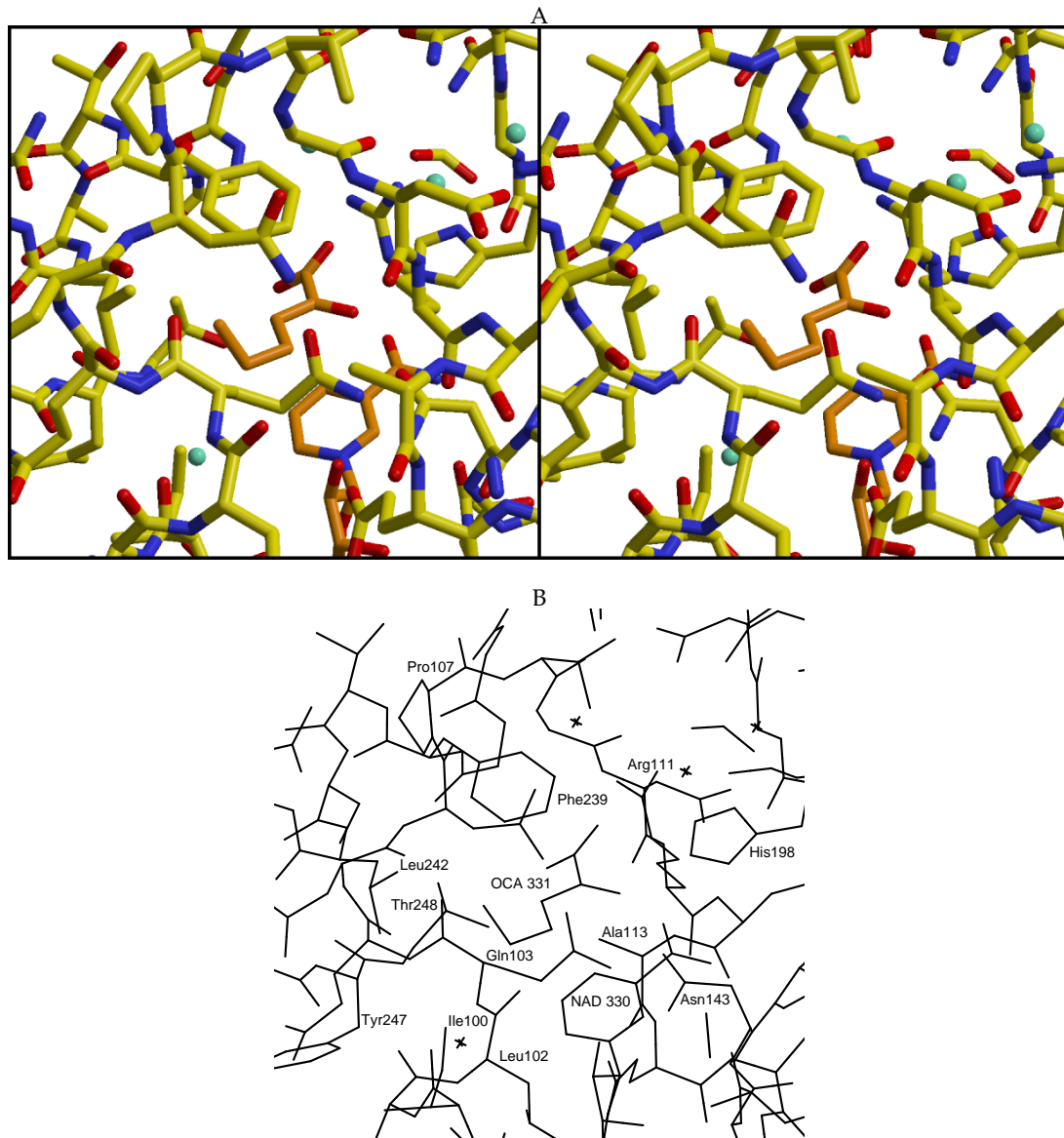


Abbildung 4.16: Die Vakuole I. A Stereoabbildung, B Bezeichnungen. Der Deckel (L-Hic-DH mit 2-Oxocaproat) wird aus dem Coenzym-Loop und der Helix $\alpha 2G$ (Phe239) gebildet. Der Coenzym-Loop ist von der Außenseite und im Uhrzeigersinn dargestellt. Unter dem Loop und Phe239 ist das Substrat 2-Oxocaproat (OCA) und darunter das NAD⁺ zu erkennen. Sie sind farblich hervorgehoben. Wassermoleküle sind in türkis dargestellt.

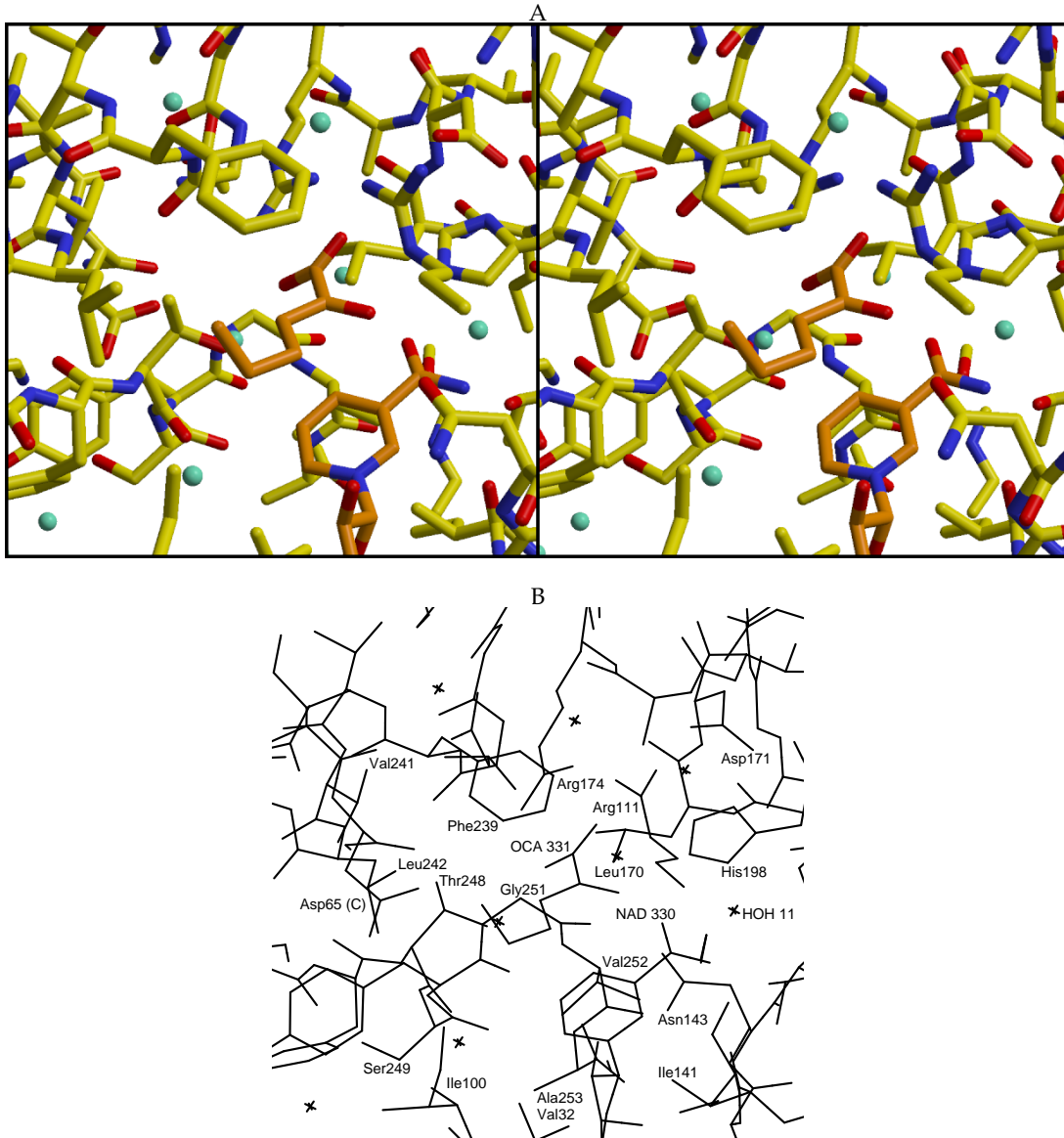


Abbildung 4.17: Die Vakuole II. A Stereoabbildung, B Bezeichnungen. Die untere Schicht der Vakuole. Die Bildebene ist unter der Bildebene der Abbildung 4.16, ansonsten sind die Orientierungen gleich. 2-Oxocaproat und NAD⁺ sind farblich hervorgehoben, und die Wassermoleküle sind türkis dargestellt.

Bindet auch das Substrat, dann schließt sich die Vakuole und schirmt das aktive Zentrum von dem Solvens ab. Es ist auch weitgehend undurchlässig für Protonen, so daß auch eine Protonenübertragung gegen einen Überschuß im Lösungsmittel stattfinden kann (Übersicht in Dunn *et al.*, 1991). Abbildung 4.15 zeigt exemplarisch das Innere der Vakuolen der Komplexe mit 2-Oxocaproat und Phenylglyoxylat. GRASP wurde dazu verwendet, die Moleküloberfläche und ihre Ladung darzustellen. Die Vakuole hat drei Bereiche: Der erste ist die NAD(H)-bindende Region, der zweite ist das eigentliche aktive Zentrum mit der katalytischen Triade aus His198, Asp171 und Arg174. Der dritte Bereich ist die ungeladene Region, die die Tasche für die unpolare aliphatische oder aromatische Gruppe des Substrats bildet.

Mit Stereoabbildungen läßt sich der Aufbau der Vakuole darstellen. Die Abbildungen 4.16 und 4.17 zeigen die verschiedenen Schichten des aktiven Zentrums am Beispiel des Komplexes mit 2-Oxocaproat. Der Deckel ist der Coenzym-Loop, der im Bereich um Pro107 auf Phe239 von der Helix α 2G aufliegt.

Der in diesen Abbildungen oberste Bereich der Vakuole ist die ungeladene substratbindende Region. Vom Coenzym-Loop ist Gln103 in direkter Nachbarschaft zur aliphatischen Kette des 2-Oxocaproats. Der Abstand ist 4 Å. Von der Helix α 2G bilden Phe239 mit 4 Å und Leu242 mit 3.4 Å Abstand den oberen Abschluß der Vakuole. Die seitlichen Begrenzungen sind Thr248 (4 Å) und Ile100 (3.6 Å).

Das aktive Zentrum im engeren Sinn bindet die 2-Oxocarbonsäuregruppe des Substrats. Es besteht vor allem aus Arg174 (2.5 Å), Gly238 (3.7 Å), Thr248 (2.7 Å) und Leu170 (3.3 Å). Bei der Reaktion wird vom protonierten His198, das von Asp171 stabilisiert wird, ein Proton auf den Carbonylsauerstoff übertragen. His198 ist dementsprechend nah an dem Carbonylsauerstoff (2.8 Å). Außerdem ist Arg111 des Coenzym-Loops mit 2.9 Å Abstand an der Reaktion beteiligt: es polarisiert den Carbonylsauerstoff. Die Vakuole wird in diesem Bereich außerdem von Asn143 vom *inner active site loop* (3.3 Å) begrenzt. Nach unten (im Sinne der Orientierung der Abbildungen 4.16 und 4.17) ist das Substrat von NAD⁺ gebunden. Der Abstand zwischen C2 von 2-Oxocaproat und C4N von NAD⁺ ist 3.3 Å.

Die Nicotinamid-Gruppe des NAD⁺ wird von Val32 (3.6 Å), Ile141 (3.4 Å), Leu170 (3.3 Å) und Val252 (4 Å) fixiert. Diese Aminosäuren bilden den hydrophoben „Boden“ der „Vakuole“. Das zu Val252 homologe Ile250 von L-LDH stabilisiert die Bindung des neutralen NADH und bewirkt so eine selektive Bevorzugung von NADH gegenüber NAD⁺. Während das NAD⁺/NADH-Verhältnis im Cytosol ungefähr 1000

beträgt, ist das Verhältnis in dem Enzym etwa 1 (Übersicht in Dunn *et al.*, 1991).

Das fixierte Wasser HOH 11 ist 3.7 Å zum reaktiven Ne2 von His198 entfernt. In dem L-HicDH-NAD⁺-2-Oxocaproat Modell hat es einen vergleichsweise niedrigen B-Faktor von 19 Å². Dies entspricht einem Oszillationsradius von 0.5 Å. Das Wasser ist als Quasi-Eis fixiert und ist integraler Bestandteil des aktiven Zentrums.

Diese Ergebnisse bestätigen die Arbeit von Feil (1992). Aus der L-LDH-Struktur 4LDH wurde ein theoretisches Modell erstellt. Anhand dieses Modells wurden die Aminosäuren identifiziert, die die Schlüsselrolle bei der Substratbindung in der hydrophoben Tasche der Vakuole spielen: Ile100, Phe239, Leu242 und Thr248. L-HicDH-Varianten, bei denen diese Aminosäuren deletiert oder verändert wurden, zeigten neue Substratspezifitäten (Feil, 1992; Feil *et al.*, 1994, 1997).

4.9 Das aktive Zentrum

Abbildung 4.18 zeigt die Aminosäuren, die das aktive Zentrum ausmachen, zusammen mit dem Coenzym NAD(H) und dem Substrat. Es ist eine Zusammenfassung der Analyse von Abschnitt 4.8. Während der Reaktion existiert ein von NAD(H) N1N bis Asp171 Oδ2 delokalisiertes Elektronensystem, das 17 Å lang ist.

Die wichtigsten Aminosäuren sind Asp171, Arg174 und His168. Arg174 fixiert das Substrat an der Säuregruppe. Das protonierte His198, das von Asp168 stabilisiert wird, kann das Proton auf den partiell negativ geladenen Carbonylsauerstoff der 2-Oxocarbonsäure übertragen. Vom NADH wird ein Proton und ein Elektronenpaar an das C2 des Substrats abgegeben.

Der Carbonylsauerstoff des Substrats ist in L-LDH zu 40 % negativ geladen und hat in diesem Anteil eine Einzelbindung zum C2 (Übersicht in Dunn *et al.*, 1991). Es wird von Arg111 stabilisiert. Damit ist Arg111 für die Katalyse der Reaktion genauso wichtig wie Arg174. Varianten der in L-LDH homologen Residuen Arg109 und Arg171 zu Gln109 bzw. Lys171 zeigen die gleiche Erhöhung der Gibbsschen freien Aktivierungsenergie von etwa 5 kcal/mol (Übersicht in Dunn *et al.*, 1991). Weiterhin sind Asn143 vom *inner active site loop*, Thr248 von der Helix α2G (*lower jaw*) und ein Wassermolekül an dem Netz aus Wasserstoffbrücken beteiligt, das den Übergangszustand stabilisiert. Asn143 wird die Interaktion sterisch erleichtert, weil es mit Pro144 eine *cis*-Peptid-Bindung eingeht.

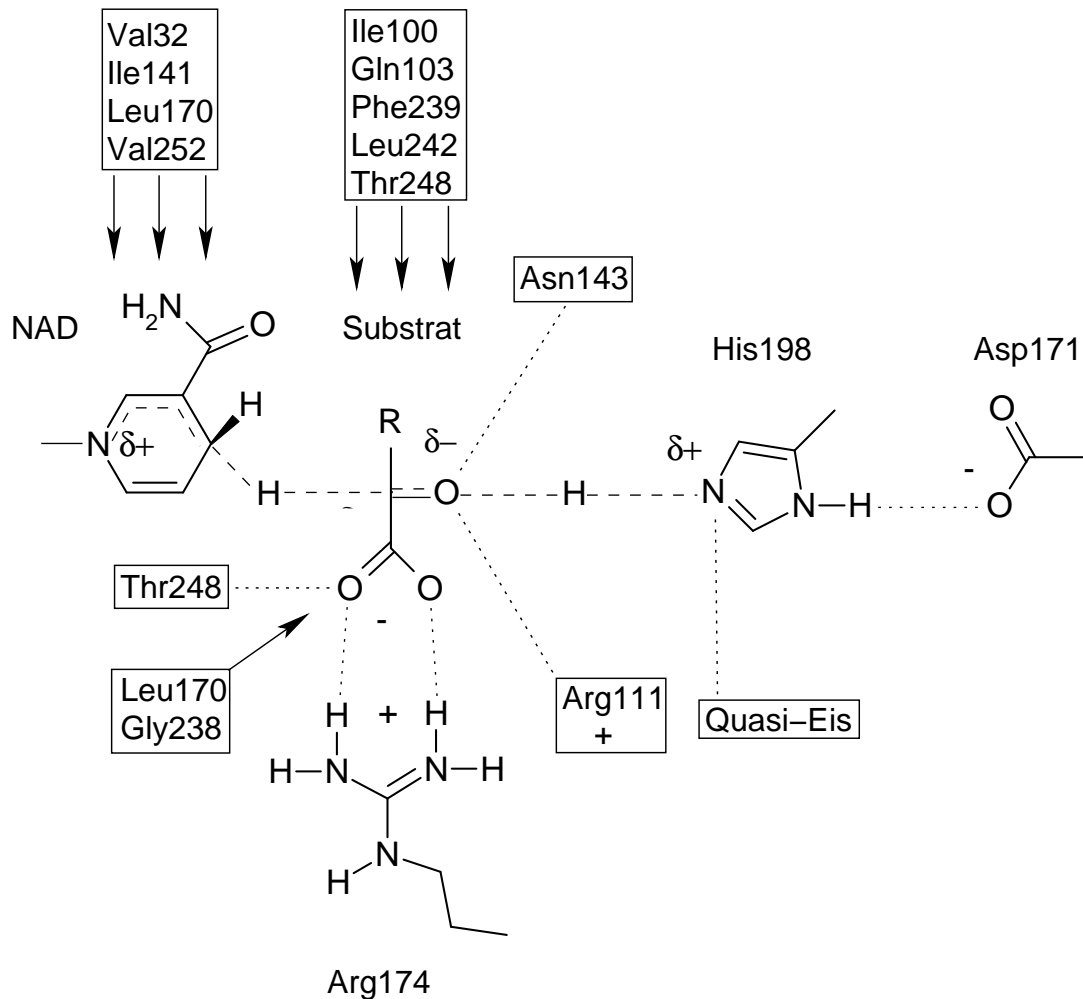


Abbildung 4.18: Der Reaktionsmechanismus und das aktive Zentrum der L-HicDH. Ein System aus delokalisierten Elektronen erstreckt sich über 17 Å von NAD(H) N1N zu Asp171 O δ 2. Ein Schema von Dunn *et al.* (1991) wurde übernommen und auf die Struktur vom L-HicDH-NAD⁺-2-Oxocaproat Komplex (Untereinheit A) angepasst. Die Reste R des Substrats sind in Abschnitt 1.2.7 auf Seite 15 beschrieben. Die Pfeile stellen hydrophobe Interaktionen dar.

Die Residuen, die die hydrophobe innere Oberfläche der „Vakuole“ bilden, befinden sich im NAD(H)-bindenden Bereich Val32, Ile141, Leu170 und Val252. Sie stabilisieren bevorzugt NADH. Leu170 ist zusammen mit Gly238 auch Bestandteil der hydrophoben „Vakuolen“-Oberfläche in dem Bereich, in der die 2-Oxocarbonsäuregruppe bindet. Der hydrophobe Rest des Substrats liegt in dem hinteren Teil der Vakuole, der von Ile100 und Gln103 des Coenzym-Loops und von Phe239, Leu242 und Thr248 der Helix α G2 gebildet wird.

Die Reaktion selbst lässt sich vermutlich am besten durch eine Kombination aus *transition state theory* und thermisch erleichtertem Tunneln beschreiben. Die Elektronenübertragung ist mit 17 Å innerhalb der für Tunnelung berechneten Reichweite von 25 Å (Sutcliffe & Scrutton, 2000). Die Geschwindigkeit der Protonenübertragung ist bei L-LDH über 1000 s^{-1} (Dunn *et al.*, 1991) und entspricht der Wechselzahl von L-HicDH für die Substrate 2-Oxocaproat, 2-Oxoisocaproat, Phenylglyoxylat und 3-Phenylpyruvat (Feil *et al.*, 1997).

Für die Bindung der Adeninribosegruppe ist Asp53 besonders wichtig. Es bewirkt die Spezifität für NAD(H). NADP(H) mit der negativ geladenen Phosphatgruppe an C2A wird von Asp53 elektrostatisch abgestoßen und sterisch behindert.

4.10 Substratspezifität

Die Untereinheiten A der ternären Komplexe mit 2-Oxocaproat, 2-Oxoisocaproat und Phenylglyoxylat wurden mit XTALVIEW (Option LSQ Fit in XFIT, McRee, 1999) überlagert, wobei nur die $C\alpha$ Atome der Residuen 21–80 in Betracht gezogen wurden. Dieses einfache Strukturalignment bezieht sich nur auf den unflexiblen „Rahmen“ der Proteine. Die überlagerten aktiven Zentren sind in Abbildung 4.19 gezeigt. Die Substrate, die NAD^+ -Moleküle und der Großteil der Proteinketten kommen bemerkenswert genau aufeinander zu liegen.

Trotz unterschiedlicher Strukturformel nehmen die Substrate weitestmöglich den gleichen Raum ein. In den Modellen kommen die endständigen aliphatischen bzw. aromatischen Atome $C6$ der Substrate innerhalb von 0.6 Å aufeinander zu liegen. Die aliphatische Kette von 2-Oxocaproat folgt dem aromatischen Ring von Phenylglyoxylat.

Die hydrophobe Bindungstasche für die aliphatische bzw. aromatische Gruppe

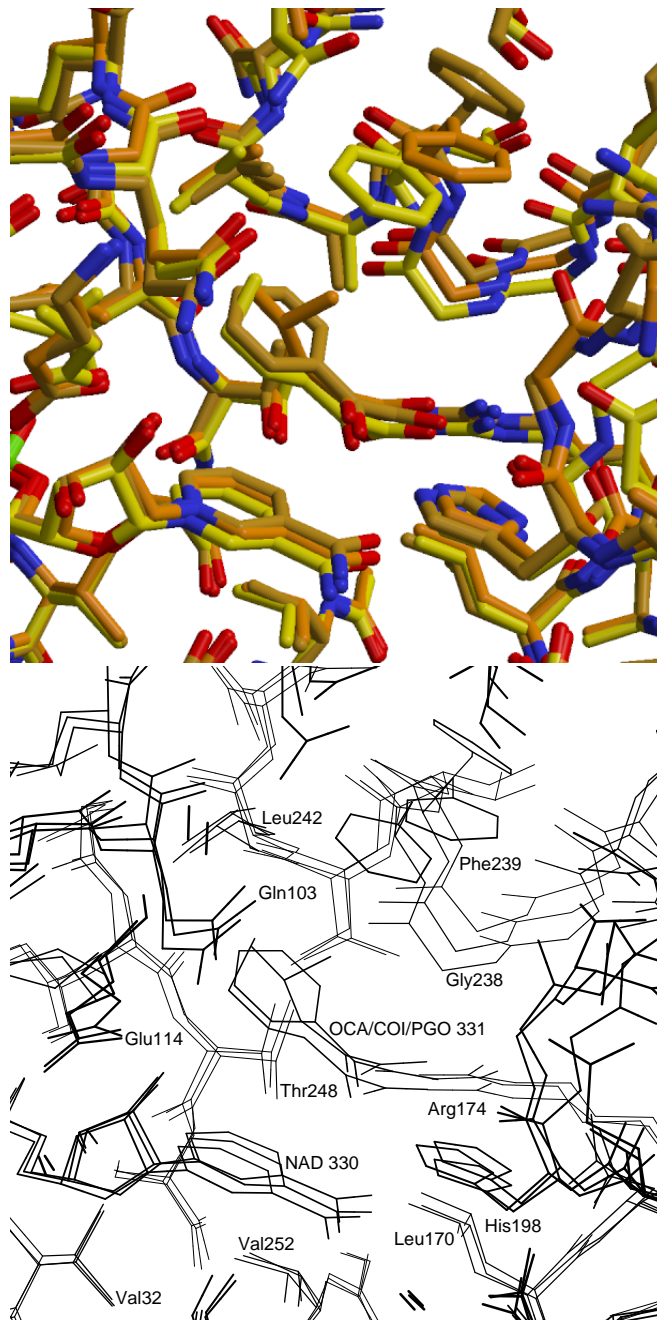


Abbildung 4.19: Die Substrate 2-Oxocaproat (OCA), 2-Oxoisocaproat (COI) und Phenylglyoxylat (PGO) in den aktiven Zentren der jeweiligen Komplexe (Untereinheit A). Oben: Die Kohlenstoffatome der Strukturen sind unterschiedlich gefärbt: Mit 2-Oxocaproat sind sie gelb, mit 2-Oxoisocaproat rötlich braun und mit Phenylglyoxylat graubraun. Die verschiedene Strichstärke der unteren Legende gibt die räumliche Tiefe wieder.

ist für alle Substrate weitgehend gleich. Unterschiede finden sich nur im Bereich um Phe239, nämlich Arg235, Lys236, Gly237, Gly238, Phe239 und Thr240. Ala234 und Val241 bilden Scharniere. Eine besondere Eigenschaft hat die Struktur mit 2-Oxocaproat. Hier ist die vollständige Helix α G1, also ab Asp226 im flexiblen Oberflächenloop, um 1.5–1.7 Å verschoben (wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben, verlagert sich der Bereich zwischen Asp226 und Gly246 bei dem Öffnen und Schließen der Untereinheiten).

Durch die Unterschiede sind die Seitenketten von Phe239 unterschiedlich nah am Substrat. Der Abstand zwischen den C ζ -Atomen ist maximal 4.5 Å. Dementsprechend variiert der Abstand zwischen Phe239 C ζ und dem C6 des Substrats zwischen 4 Å (2-Oxocaproat) und 8.4 Å (Phenylglyoxylat).

Das Phenylglyoxylat hat zwei Kohlenstoffatome mehr als 2-Oxocaproat und 2-Oxoisocaproat. Anhand der Elektronendichten (Abbildung 3.53 auf Seite 103) ist zu vermuten, daß sich der aromatische Ring des Phenylglyoxylates um die C2–C3 Bindung dreht. Zumindest ist die Elektronendichte um den aromatischen Ring schlechter definiert als um die 2-Oxocarbonsäuregruppe. Das zeugt von einer Fehlordnung des aromatischen Rings. Mit der Verzweigung an C4 ist 2-Oxoisocaproat weniger flexibel als 2-Oxocaproat und kann sich daher schlechter an die Umgebung anpassen. Das macht 2-Oxoisocaproat raumfüllender (*bulkier*) als 2-Oxocaproat. Die Positionen von Phe239 spiegeln den Raumbedarf der Substrate wieder: Mit Phenylglyoxylat ist es am weitesten vom Substrat entfernt, mit 2-Oxoisocaproat ist es in einer mittleren Position und es ist sehr nah an 2-Oxocaproat.

Gly237 und Gly238 fallen als flexibler Linker auf. Zusammen mit dem flexiblen Oberflächenloop (und damit der möglichen Verlagerung der Helix α G1) bilden sie eine besondere Art der Variabilität, die die spezifische Erkennung unterschiedlicher Substrate ermöglicht — eine Eigenschaft der L-HicDH, die paradox klingt, aber nicht ist.

Damit ist der flexible Oberflächenloop möglicherweise funktionell wichtig für die Substratspezifität. Eine L-HicDH Variante Gly223Ile könnte den Loop versteifen, was die Hypothese bestätigen würde. Die Variante könnte 2-Oxocaproat schlechter als der Wildtyp akzeptieren (d. h. K_M würde schlechter), würde aber keine Unterschiede in den restlichen Substraten zeigen.

Gly238 ist nicht nur Gelenk, sondern auch direkt an der Substratbindung beteiligt (Abbildung 4.19). Die Variante Gly237Val/Gly238Asp, die L-HicDH der L-LDH

ähnlicher macht, verringert die spezifische Konstante k_{cat}/K_M von allen getesteten Substraten bis auf 2-Oxocaproat und Pyruvat (Feil, 1992; Feil *et al.*, 1997). Der Grund ist vermutlich die sterische Hinderung und die negative Ladung der zusätzlichen Seitenkette von Gly238Asp.

Die für die Substratbindung wichtigen Aminosäuren Leu100, Leu242 und Thr248 (Feil, 1992; Feil *et al.*, 1997) sowie Gln103 sind für alle drei Substrate weitgehend gleich, genauso wie die Position der Substrate selbst. Das zeigt, daß die Größe der „Vakuole“ und die Ladung des Proteins entscheidend zur Substraterkennung beitragen. Aber das Enzym kann auch zwischen den Substraten unterscheiden — vermutlich erst nach der Bildung der „Vakuole“. So verändert der Austausch Leu242Met die Substratspezifität: Nicht mehr 2-Oxocaproat sondern 2-Oxoisocaproat wird das beste Substrat. Mit dem unverzweigten Met ist der Raum innerhalb der „Vakuole“ offensichtlich günstiger für das an C4 verzweigte 2-Oxoisocaproat (Feil, 1992; Feil *et al.*, 1997).

Der Übersichtlichkeit halber wurden in Abbildung 4.19 die Strukturen des nativen Komplexes und des Komplexes mit Oxamat nicht gezeigt. Die Atome der NAD^+ -Moleküle und der Proteine liegen in der Nähe der entsprechenden Atome der Strukturen mit 2-Oxoisocaproat und Phenylglyoxylat. In vielen Fällen sind sie dazwischen, wie z. B. bei Phe239.

4.11 Manuelles Docking von Keto-tertiär-Leucin

Eine Anwendung von Enzymen ist die Herstellung chiraler Synthons in reiner enantiomerer Form. Sie eignen sich besonders zur Synthese von Medikamenten. Pharmaka, die als reine Enantiomere eingesetzt werden, werden als sicherer angesehen, weil sie frei von Stereoisomeren sind, die unerwünschte Wirkungen haben könnten (de Camp, 1989).

L-2-Hydroxytertiärleucin ist solch ein Synthon. Es läßt sich mit der L-HicDH aus Keto-tertiär-Leucin herstellen (vergleiche Abbildung 1.11, Seite 16). Allerdings hat L-HicDH mit Keto-tertiär-Leucin einen niedrigen k_{cat} -Wert von 52 s^{-1} und ist damit fast vier Größenordnungen langsamer als mit 2-Oxocaproat (Tabelle 1.1 auf Seite 16).

Keto-tertiär-Leucin ist in C3 verzweigt und hat eine voluminöse Tertiärbutylgruppe. Proteinstrukturmodellierung und Enzymkinetiken von der L-HicDH Varian-

te Thr248Ala haben gezeigt, daß die Seitenkette von Thr248 eine Methylgruppe von Keto-tertiär-Leucin sterisch behindert (Feil, 1992; Feil *et al.*, 1997).

Was läßt sich aus den ternären Komplexen von L-HicDH über die Bindung von Keto-tertiär-Leucin im aktiven Zentrum ableiten? Welche L-HicDH Varianten könnten eine bessere Enzymaktivität haben? Eine erste Antwort auf diese Fragen soll ein Modell geben, das durch ein manuelles Docking gewonnen wurde. Die Struktur von Keto-tertiär-Leucin wurde mit HYPERCHEM (Hypercube, Gainesville, FL, USA) berechnet. Sie wurde mit XTALVIEW (McRee, 1999) in das aktive Zentrum von L-HicDH orientiert. Dabei wurden die Torsionen der Bindungen C1–C2 und C2–C3 den Kristallstrukturen von 2-Oxocaproat, 2-Oxoisocaproat und Phenylglyoxylat angepasst, so daß eine größtmögliche Übereinstimmung zwischen Keto-tertiär-Leucin und den anderen Substraten bestand. Die Carbonylbindung C2–O3 zur Methylbindung C3–C4 beträgt etwa 30°.

Das Resultat ist in Abbildung 4.20 gezeigt. Um der Flexibilität der L-HicDH im Bereich um Phe239 Genüge zu tun, wurde für das Docking das Strukturalignment der Komplexe mit 2-Oxocaproat und Phenylglyoxylat von Abbildung 4.19 verwendet. Vermutlich stellt Abbildung 4.20 die Extreme der möglichen Konformationen einer geschlossenen Vakuole dar. Es ist ersichtlich, daß Gly238/Phe239 ausreichend Raum gibt für die Tertiärbutylgruppe von Keto-tertiär-Leucin. Auch in der räumlich engsten Konformation (in der Struktur mit 2-Oxocaproat) sind die Abstände zwischen dem aromatischen Ring der Phenylalanin-Seitenkette und den Methylgruppen des Keto-tertiär-Leucins ausreichend groß (3.6 Å). Auch die Abstände zum Nicotinamid-Ring des Coenzym sind chemisch plausibel. Die kürzesten Abstände zwischen dem Methylkohlenstoffatom C3 von Keto-tertiär-Leucin und NAD⁺ C5N beträgt 3.4 Å.

Das Modell zeigt eine sterische Behinderung einer Methylgruppe durch die Methylgruppe von Thr238. Das passt zu den Kinetikdaten der Variante Thr238Ala (Feil, 1992; Feil *et al.*, 1997). Die Hydroxylgruppe von Thr238 ist wichtig für den Reaktionsmechanismus, denn sie bildet eine Wasserstoffbrücke zur Säuregruppe des Substrats (Abbildung 4.18). Dementsprechend sind die k_{cat} - und K_{M} -Werte von L-HicDH Thr248Ala mit Keto-tertiär-Leucin schlechter als der Wildtyp. Eine Verbesserung der Kinetik könnte die Variante Thr248Ser aufweisen. Der Unterschied zum Wildtyp ist das Fehlen der Methylgruppe, die Keto-tertiär-Leucin sterisch behindert. Die Hydroxylgruppe, die für die Bindung der Säuregruppe des Substrats benötigt wird, bleibt erhalten.

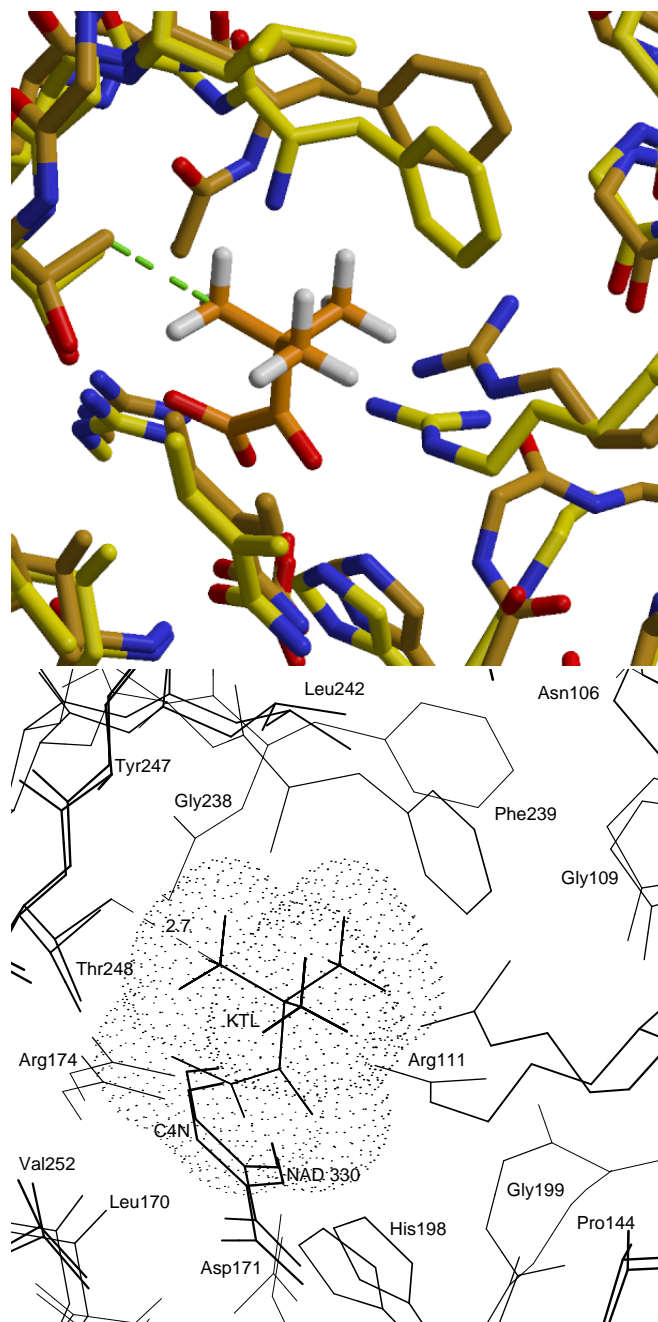


Abbildung 4.20: Manuelles Docking von Keto-tertiär-Leucin in das Strukturalignment von 2-Oxocaproat und Phenylglyoxylat (vergl. Abbildung 4.19). Oben: Die Kohlenstoffe des Komplexes mit 2-Oxocaproat sind gelb, die des Komplexes mit Phenylglyoxylat graubraun und die von Keto-tertiär-Leucin rötlich-braun. Unten: Die Van der Waals-Oberfläche von Keto-tertiär-Leucin ist als Punktwolke dargestellt. Zu beachten ist, daß auch die Wasserstoffatome der Methylgruppen gezeigt sind. Der Abstand von Thr238 C γ 1 zum nächsten Methylkohlenstoffatom von Keto-tertiär-Leucin ist 2.7 Å.

5 Ausblick

In dieser Arbeit sind die Strukturen des binären L-HicDH–NAD⁺ Komplexes und der ternären Komplexe mit 2-Oxocaproat, α KIC, Phenylglyoxylat und Oxamat gelöst und verfeinert. Damit konnten einige Fragen zur Substratbindung beantwortet werden, die sich bei der Untersuchung der L-HicDH (Feil *et al.*, 1994, 1997; Niefind *et al.*, 1995) stellten. Einige neue Fragen könnten sich durch weiterführende Arbeiten lösen lassen. Im folgenden werden einige Experimente vorgeschlagen.

5.1 L-HicDH im Komplex mit NAD⁺ und weiteren Substraten

Die geschlossenen "Vakuolen" der Strukturen mit den Substraten 2-Oxocaproat, 2-Oxoisocaproat und Phenylglyoxylat zeigen große Unterschiede in dem Volumen. Dies resultiert aus der Öffnung von Phe239 und den unterschiedlichen Konformationen der Helices α G1/ α G2. Es wäre interessant zu sehen, ob andere Substrate noch andere Konformationen induzieren. Daher könnten weitere ternäre L-HicDH–NAD⁺–Substrat Komplexe kristallographisch untersucht werden. Besonders 3-Phenylpyruvat bietet sich als weiteres Substrat an. Es wird von L-HicDH gut umgesetzt, ist in C4 verzweigt und noch größer als Phenylglyoxylat (siehe Abbildung 1.11 und Tabelle 1.1 auf Seite 16). L-HicDH–NAD⁺–3-Phenylpyruvat Cokristalle sind einfach zu gewinnen (siehe Abschnitt 3.4). Möglicherweise läßt sich aus einer solchen Struktur eine L-HicDH Variante ableiten, die für 3-Phenylpyruvat hochspezifisch ist. Sie könnte in der Medizindiagnostik eingesetzt werden, um enzymatisch die Phenylpyruvatkonzentration im Urin von Patienten mit Phenylketonurie zu bestimmen (Fersht, 1998).

Als weiteres Substrat könnte Keto-tertiär-Leucin verwendet werden, um das theoretische Modell von Abschnitt 4.11 zu überprüfen. Vor allem die Konformation von Phe239 und die Lage der Methylgruppen des Substrats könnten präzisiert werden.

5.2 Die Variante Thr248Ser

Die Variante Thr248Ser ist vielversprechend, da sie Raum für Keto-tertiär-Leucin bietet, ohne die wichtige Wasserstoffbrücke zum Substrat zu verlieren. Deshalb könnte diese Variante kloniert und gereinigt werden. Dann könnte die Enzymkinetik bestimmt werden und, wenn sich die Vorhersage bestätigen läßt, L-HicDH-NAD⁺-Keto-tertiär-Leucin Cokristalle gezüchtet und röntgenkristallographisch untersucht werden.

5.3 Mikrokolorimetrie

Mikrokolorimetrie, vor allem isothermale Titrationskolorimetrie, kann verwendet werden, um die Thermodynamik von Enzymreaktionen zu charakterisieren (Übersicht in Doyle, 1997). Mit ihrer Hilfe könnte überprüft werden, ob sich die geschlossene „Vakuole“ teilweise durch eine Faltung des Coenzym-Loops bildet (siehe Abschnitt 4.5). In diesem Fall könnte die Faltungsenthalpie möglicherweise messbar sein. Eine andere Methode, die sich einsetzen lassen könnte, ist die *Differential Scanning* Mikrokolorimetrie. Mit ihr läßt sich die Wärmekapazität eines Proteins bestimmen. Wenn der Coenzym-Loop in der offenen Konformation teilweise entfaltet vorliegt, aber gefaltet in der geschlossenen Konformation, dann macht das vielleicht einen meßbaren Unterschied in der Thermostabilität aus. Dazu könnte der Schmelzpunkt von L-HicDH in Abhängigkeit von der 2-Oxocaproat Konzentration bestimmt werden. NAD⁺ sollte im Überschuß vorliegen.

L-LDH hat einen überwiegend starren Loop, der sich an wenigen Scharnier-Aminosäuren bewegt (Gerstein & Chothia, 1991). Sollte L-HicDH die Vakuole über Faltung ändern, wäre sie in der Familie der Lactat/Malat-Dehydrogenase einzigartig — oder das Modell der auf Scharniere begrenzten Bewegung müsste auch für die L-LDH erweitert werden. Für letzteres spricht, daß die meisten offenen Coenzym-Loops in L-LDH Kristallstrukturen stark fehlgeordnet sind (Read *et al.*, 2001).

5.4 Variation des Coenzym

Die Kristallisationsbedingungen hatten pH-Werte von 6.3 bis 6.9. Das ist näher an der Reduktion, die ein pH-Optimum von 7 hat, als an der Oxidation mit einem pH von 8–

8.5 (Schütte *et al.*, 1984). His198 ist bei diesen Bedingungen sicherlich protoniert. Bis auf das NAD^+ geben die Kristallstrukturen die Situation der Reduktion wieder. Es liegt daher nahe, Kristallisationsexperimente mit NADH durchzuführen. Mit L-LDH und L-Alkoholdehydrogenase ist dies technisch kein Problem (Dunn *et al.*, 1991; Meijers *et al.*, 2001). Ternäre Komplexe könnten mit Oxamat bzw. den L-2-Hydroxysäuren gewonnen werden. Eine stärkere Bindung des Coenzym führt voraussichtlich zu einer geringeren thermischen Bewegung/Fehlordnung und schafft ein klareres Bild des aktiven Zentrums. Alternativ könnten mit den 2-Oxocarbonsäuren und dem NADH-Analogen 1,4,5,6-Tetrahydro-Nicotinamid (Chapman *et al.*, 1999) neue Kristallstrukturen gewonnen werden.

Zu einer höheren Besetzung und einer niedrigeren Fehlordnung/thermischen Bewegung des Substrats könnte der Einsatz von *S-lac*- NAD^+ ((3*S*)-5-(3-Carboxy-3-hydroxypropyl)- NAD^+) führen, einem kombinierten Coenzym-Substrat Analogon, das aus einem Lactat besteht, welches über zwei aliphatische Kohlenstoffatome kovalent an NAD^+ gebunden ist. Eine hochaufgelöste Struktur von L-HicDH mit solch einem Analogon eines aktiven Komplexes kann klären, ob sich die Abbruchkomplexe von L-HicDH mit NAD^+ und 2-Oxocarbonsäuren fundamental vom aktiven Komplex unterscheiden, wie von Grau *et al.* (1981) postuliert, oder nicht.

5.5 Apoenzym-Kristalle und binäre Komplexe

Mit Ammoniumsulfid als Fällungsmittel lassen sich Kristalle des L-HicDH Apoenzyms züchten (Niefind, 1993). Ihre röntgenkristallographische Untersuchung könnte im Vergleich zum binären L-HicDH- NAD^+ Komplex (Niefind *et al.*, 1995; diese Arbeit) sowie zum L-HicDH-NADH Komplex (siehe Abschnitt 5.4) Aufschluß über die NAD(H) Bindung geben.

5.6 Die Variante Gly223Ile

Der flexible Oberflächenloop könnte die Substratspezifität über die Dynamik der „Vakuole“ beeinflussen (Abschnitt 4.10). Das würde erklären, warum 2-Oxocaproat das weitaus beste Substrat ist. Gly223 in dem flexiblen Oberflächenloop trägt besonders zur seiner Beweglichkeit bei. Wird durch das Einfügen einer Seitenkette die Hauptkette an dieser Position versteift, könnte das die Flexibilität des Loops verringern.

Dies würde durch das Einfügen eines $C\beta$ -Atoms (Gly223Ala) erreicht. Noch drastischer wären die Varianten Gly223Ile, Gly223Thr und Gly223Val, weil ihre in $C\beta$ verzweigten Seitenketten die Hauptkette besonders versteifen. Die Vorhersage ist eine verglichen zum Wildtyp-Protein schlechtere Bindung von 2-Oxocaproat.

5.7 Der offene Coenzym-Loop

Die Konformation des *geschlossenen* Coenzym-Loops erlaubt die Bestimmung der Enzym-Substrat Interaktionen und damit das Verständnis von Substratspezifität und Reaktionsmechanismus. Mit der Struktur des *offenen* Coenzym-Loops läßt sich dagegen der Einfluß von entfernten Seitenketten auf die Ladung des His198 bestimmen. So haben Read *et al.* (2001) die Oberflächenladung auf ihren Modellen von menschlicher L-LDH (aus Muskel und Herz) verändert und mit DelPhi (Accelrys, Cambridge, UK und Department of Biochemistry, Columbia University, New York, NY, USA) die elektrostatischen Effekte auf den pK_a von His195 im aktiven Zentrum berechnet. Dieses His muß protoniert sein, bevor das Substrat bindet. Weil während der Reaktion ein Proton vom His195 auf den Carbonylsauerstoff des Pyruvats übertragen wird, korreliert der pK_a des *binären* und damit offenen Enzym-NADH Komplexes mit dem K_M der Reduktion des Pyruvats.

Um den Einfluß von Aminosäuren, die sich weit entfernt vom aktiven Zentrum auf der Oberfläche befinden, auf den pK_a des His der katalytischen Triade zu berechnen, haben Read *et al.* (2001) die Oberflächenladung der offenen L-LDH Konformation simuliert. Dabei fehlte ihnen die Struktur des offenen Coenzym-Loops, so daß sie diesen durch Deletion bzw. Moleküldynamik modellieren mussten. Als Resultat waren die Abschätzungen nicht so genau, wie sie mit bekanntem offenen Coenzym-Loop hätten sein können. Trotzdem konnten sie zeigen, daß die Unterschiede der Enzymkinetik der menschlichen L-LDH Isoformen nicht aus verschiedenen Konformationen der Isoformen resultieren, sondern aus einer unterschiedlichen Oberflächenladung.

Der offene Coenzym-Loop der L-LDH hat keine eindeutig bestimmte Konformation, sondern ist fehlgeordnet (Read *et al.*, 2001). Das gilt auch für die L-HicDH (Niefind *et al.*, 1995; diese Arbeit) Die hier vorgestellten Strukturen beinhalten das Rückgrat eines offenen Coenzym-Loops, der den Mittelwert der verschiedenen Strukturen im Kristall darstellt. Im Bereich der Residuen 100-108 ist nur der Verlauf der Hauptkette erkennbar. Dieser Bereich läßt sich als Startpunkt für ein theoretisches Modell ver-

wenden, bei dem hauptsächlich die fehlenden Seitenketten, nicht aber der Verlauf der Hauptkette erstellt werden müßten.

Außerdem kann eine höhere Auflösung zu deutlicheren Elektronendichten und sicherer bestimmten Atompositionen führen. Das geht meistens mit einer höheren Anzahl an zugeordneten Kristallwassern einher, und der Raum, der mit einem *bulk solvens* Modell beschrieben werden muß, wird kleiner. Das kann dazu führen, daß der offene Coenzym-Loop vollständig bestimmt werden kann.

Einerseits können wahrscheinlich Kristalle gezüchtet werden, die eine höhere Auflösung bei der Diffraktionsmessung erzielen. Neben einer Verfeinerung des Kristallwachstums durch *seeding* ist es wahrscheinlich, daß eine Optimierung der Cryobedingungen zu höheren Auflösungen führen kann. Ein Hinweis darauf sind der I/σ_I -Wert des Datensatzes mit Oxamat, der bei 2 Å Auflösung noch über 6 liegt und die hohe Mosaizität der meisten Datensätze, die sich durch optimierte Cryobedingungen eventuell erniedrigen ließen.

Möglicherweise sind in anderen Kristallformen, z. B. in Form 2 oder Form 3 (Niefind, 1993),¹ die offenen Coenzym-Loops durch Kristallkontakte fixiert oder lassen sich aus anderen Gründen genau bestimmen.

Mit einem Modell des binären, offenen L-HicDH–NAD(H) Komplexes, das aus dem Coenzym-Loop der Untereinheit C des Kristalls mit Phenylglyoxylat erstellt werden kann, oder aus anderen Strukturen (höhere Auflösung oder andere Kristallformen) werden elektrostatische Simulationen mit DelPhi vermutlich sehr aufschlußreich sein, weil sie eine bisher wenig beachtete Betrachtungsweise der L-HicDH-Substratbindung darstellt. Es wird unter anderem abschließend klären können, ob die L-HicDH Halbseitenreaktivität zeigt oder nicht. Mit den Simulationen lassen sich vermutlich auch Enzymvarianten vorhersagen, die aufgrund ihrer veränderten Elektrostatik neue kinetische Eigenschaften besitzen, beispielsweise kleinere K_M -Werte für Keto-tertiär-Leucin haben.

¹Form 2: 10 µL L-HicDH (8.7 mg/mL in Proteinpuffer: 50 mM Imidazol/HCl, 5 mM NaN₃, 1 mM DTT, pH 7.0), 10 µL Reservoirlösung (1.9 M Ammoniumsulfid, pH 8.4, kein Puffer), 10 µL 0.8 % (w/w) Octylglycosid, optional 10 µL 30 mM LiNAD. Form 3: 5 µL L-HicDH (38.1 mg/mL in Proteinpuffer), 5 µL Reservoirlösung (1.9 M Ammoniumsulfid, pH 8.4), 5 µL 30 mM LiNAD, optional: MPD, Glycerin oder PEG1500.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (L-HicDH, E.C. 1.1.1.27, Synonym L-2-Hydroxy-4-methylpentanoat-dehydrogenase) aus dem grampositiven Bakterium *Weissella confusa* (DSM 20196, Basonym *Lactobacillus confusus*) röntgenkristallographisch untersucht. Die L-HicDH gehört zur Familie der Lactat/Malat-Dehydrogenase und ist besonders eng verwandt mit der L-Lactat-Dehydrogenase. Die Struktur der L-HicDH im Komplex mit NAD^+ wurde von Niefind *et al.* (1995) gelöst (PDB Kürzel 1HYH).

Die L-HicDH ist NAD(H)-abhängig und katalysiert stereospezifisch und reversibel die Reduktion von verzweigten und unverzweigten aliphatischen 2-Oxocarbonsäuren zu ihren L-2-Hydroxycarbonsäuren. Der aliphatische Rest kann 3–4 Kohlenstoffatome lang sein. Außerdem wird ein aromatischer Rest an C3 oder C4 von dem Enzym akzeptiert. Kleinere 2-Oxocarbonsäuren werden schlechter und größere gar nicht umgesetzt.

L-HicDH wurde in *Escherichia coli* heterolog überexprimiert und gereinigt. Zusammen mit NAD^+ wurde das Protein als binärer Komplex kristallisiert. Um den Mechanismus der Substratspezifität zu untersuchen, wurden die Substrate 2-Oxocaproat, 2-Oxoisocaproat, Phenylglyoxylat, Pyruvat und 3-Phenylpyruvat sowie der Inhibitor Oxamat verwendet, um ternäre L-HicDH- NAD^+ -Substrat/Inhibitor Komplexe zu kristallisieren. Der Komplex mit 2-Oxocaproat kristallisierte in der Raumgruppe $P3_121$ und damit in einer neuen Kristallform. Die anderen Komplexe kristallisierten wie 1HYH in der Raumgruppe $P3_221$.

Von fünf Kristallen (nativ bzw. mit 2-Oxocaproat, 2-Oxoisocaproat, Phenylglyoxylat und Oxamat) wurden Röntgendiffraktionsdaten gemessen, deren Auflösung 1.99–2.35 Å betrug. Es zeigte sich, daß die meisten der vermessenen Kristalle teilweise oder vollständig meroedrisch verzwilligt waren. Die Strukturen wurden mit molekularem Ersatz gelöst. Bei den Verfeinerungsrechnungen wurde sorgfältig darauf geachtet, eine mögliche Überverfeinerung zu vermeiden. Dies wurde vor allem durch entsprechende *restraints* in der nichtkristallographischen Symmetrie erreicht. Die Strukturen haben *B*-Faktoren von 32–41 Å², *R*-Werte von 17–25 %, freie *R*-Werte zwischen 20 und 30 % und 2–3 % Ramachandran-Außenseiter. Die durchschnittliche

Genauigkeit der Atompositionen liegt im Bereich von 0.4 Å. Eine detaillierte Fehleranalyse erlaubte eine Einschätzung der Zuverlässigkeit der Strukturen.

Trotz zum Teil unterschiedlicher Kristallformen waren die Strukturen der fünf Komplexe im wesentlichen gleich. Sie zeigen die L-HicDH als Homotetramer. Jeweils zwei Untereinheiten des Homotetramers hatten eine geschlossene Konformation und die beiden anderen eine offene Konformation.

Die Monomere lassen sich in zwei Domänen gliedern. Die erste ist die NAD-bindende Domäne und besteht aus dem N-terminalen Teil des Proteins. Sie bildet eine Rossmann-Faltung aus: Zwei verbundene β - α - β - α - β -Einheiten haben ein zentrales paralleles β -Faltblatt. Die andere Domäne ist die katalytische Domäne und besteht in ihrem Kern aus zwei verdrehten, antiparallelen β -Faltblättern.

Die Modelle beschreiben den Großteil der Aminosäuren und 252–365 Kristallwasser. In den geschlossenen Untereinheiten ist das aktive Zentrum mit NAD⁺ und Substrat besetzt. Der sogenannte Coenzym-Loop ist wie ein Deckel über das aktive Zentrum gelegt. Dadurch bildet sich ein interner wäßriger Hohlraum, der als „Vakuole“ bezeichnet wird. Die offenen Untereinheiten haben nur NAD⁺, aber kein Substrat gebunden. Bei ihnen ist der Coenzym-Loop offen und meist fehlgeordnet. Es gelang, bei einer Untereinheit den Verlauf der Proteinkette des offenen Coenzym-Loops zu bestimmen.

Die Unterschiede zwischen offenem und geschlossenem Coenzym-Loop lassen sich nicht dadurch beschreiben, daß ein weitgehend starrer Loop eine Klappbewegung an Scharnieren ausführt. Statt dessen findet zusätzlich eine Umfaltung statt. Dies ist im Einklang mit den hohen k_{cat} -Werten der L-HicDH. Aber nicht nur der Coenzym-Loop, sondern auch die Helices α G1 und α G2 sind in der offenen und geschlossenen Konformation unterschiedlich. Hier handelt es sich um eine Schließbewegung an Aminosäuren, die als flexible Scharniere fungieren.

Aus den Strukturen der geschlossenen Untereinheit im Abbruchkomplex mit NAD⁺ und Substrat ließen sich die Aminosäuren bestimmen, die für den Reaktionsmechanismus wichtig sind. Von ihnen hat Arg111 eine Doppelrolle. Es ist im offenen Loop an der Interaktion zur Helix α H beteiligt, während es im geschlossenen Loop das Substrat bindet und dessen Carbonylbindung polarisiert. Bei der Reaktion existiert ein von NAD(H) N1N bis Asp171 O δ 2 delokalisiertes Elektronensystem, das 17 Å lang ist.

Die aktiven Zentren der verschiedenen L-HicDH-NAD⁺-Substrat Komplexe

wurden miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, daß das Volumen der „Vakuole“ abhängig von dem Volumen des Substrats ist. Die Substratspezifität hat zwei Ebenen. Als erstes bestimmt die „Vakuole“ die akzeptierte Größe und Ladung, so daß zwischen Substraten mit wenigen funktionellen Gruppen unterschieden werden kann. Als zweites sind es einzelne Aminosäure-Substrat Kontakte, die dem Enzym eine Unterscheidung zwischen den Substraten ermöglicht. Hier handelt es sich um Leu100, Gln103, Leu242 und Thr248.

Die erhaltenen Strukturen ermöglichten ein manuelles Docking des künstlichen Substrats Keto-tertiär-Leucin in das aktive Zentrum der L-HicDH. Anhand dieses Modells wird vorhergesagt, daß die Variante Thr248Ser Keto-tertiär-Leucin besser umsetzt als das Wildtyp Enzym.

Literaturverzeichnis

- Abad-Zapatero, C., Griffith, J. P., Sussman, J. L. & Rossmann, M. G. (1987) Refined crystal structure of dogfish M4 apo-lactate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **198**, 445–467.
- Abendroth, J. (2001) *Röntgenstrukturanalyse mikrobieller Dihydropyrimidinasen*. Doktorarbeit, Universität zu Köln, Köln.
- Adams, M. J., Buehner, M., Chandrasekhar, K., Ford, G. C., Hackert, M. L., Liljas, A., Rossmann, M. G., Smiley, I. E., Allison, W. S., Everse, J., Kaplan, N. O. & Taylor, S. S. (1973) Structure-function relationships in lactate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 1968–1972.
- Addlagatta, A., Krzywda, S., Czapinska, H., Otlewski, J. & Jaskolski, M. (2001) Ultrahigh-resolution structure of a BPTI mutant. *Acta Crystallogr.* **D57**, 649–663.
- Allen, F. H. & Kennard, O. (1993) 3D search and research using the Cambridge Structural Database. *Chemical Design Automation News* **8**, 31–37.
- Amersham (1998) *Protein purification handbook*. Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden.
- Andersson, K. M. & Hovmöller, S. (2000) The protein content in crystals and packing coefficients in different space groups. *Acta Crystallogr.* **D56**, 789–790.
- Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Birney, E., Biswas, M., Bucher, P., Cerutti, L., Corpet, F., Croning, M. D. R., Durbin, R., Falquet, L., Fleischmann, W., Gouzy, J., Hermjakob, H., Hulo, N., Jonassen, I., Kahn, D., Kanapin, A., Karavidopoulou, Y., Lopez, R., Marx, B., Mulder, N. J., Oinn, T. M., Pagni, M., Servant, F., Sigrist, C. J. A. & Zdobnov, E. M. (2001) The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucl. Acids Res.* **29**, 37–40.
- Basran, J., Sutcliffe, M. J. & Scrutton, N. S. (1999) Enzymatic H-transfer requires vibration-driven extreme tunneling. *Biochemistry* **38**, 3218–3222.
- Bergfors, T. M., Herausgeber (1999) *Protein crystallization: techniques, strategies, and tips. A laboratory manual*. International University Line, La Jolla, CA, USA.

- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Base. *Nucl. Acids Res.* **28**, 235–242.
- Birktoft, J. J. & Banaszak, L. J. (1983) The presence of a histidine-aspartic acid pair in the active site of 2-hydroxyacid dehydrogenases. X-ray refinement of cytoplasmic malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **258**, 472–482.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D. & Edelstein, S. J. (1996) *Protein Methods*. Wiley-Liss, New York, NY, USA, 2. Aufl.
- Bourgeois, D. (1999) New processing tools for weak and/or spatially overlapped macromolecular diffraction patterns. *Acta Crystallogr.* **D55**, 1733–1741.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Brändén, C.-I. & Jones, T. A. (1990) Between objectivity and subjectivity. *Nature* **343**, 687–689.
- Brünger, A. T. (1992) Free *R* value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472–475.
- Brünger, A. T. (1997) Free *R* value: cross-validation in crystallography. *Methods Enzymol.* **277**, 366–396.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998) Crystallography & NMR System: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr.* **D54**, 905–921.
- Brunhuber, N. M., Banerjee, A., Jacobs, W. R. & Blanchard, J. S. (1994) Cloning, sequencing and expression of *Rhodococcus* L-phenylalanine dehydrogenase. Sequence comparisons to amino-acid dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **269**, 16203–16211.
- Bückmann, A. F., Kula, M.-R., Wichmann, R. & Wandrey, C. (1981) An efficient synthesis of high-molecular-weight NAD(H) derivatives suitable for continuous operation with coenzyme-dependent enzyme systems. *J. Appl. Biochem.* **3**, 301–315.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376–378.

- Carter, P., Beduelle, H. & Winter, G. (1985) Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucl. Acids Res.* **13**, 4431–4443.
- Center, R. J., Kobe, B., Wilson, K. A., Teh, T., Howlett, G. J., Kemp, B. E. & Pournourios, P. (1998) Crystallization of a trimeric human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain fragment as a chimera with maltose-binding protein. *Protein Sci.* **7**, 1612–1619.
- Chandra, N., Acharya, K. R. & Moody, P. C. E. (1999) Analysis and characterization of data from twinned crystals. *Acta Crystallogr.* **D55**, 1750–1758.
- Chapman, A. D. M., Cortés, A., Dafforn, T. R., Clarke, A. R. & Brady, R. L. (1999) Structural basis of substrate specificity in malate dehydrogenases: crystal structure of a ternary complex of porcine cytoplasmic malate dehydrogenase, α -ketomalonate and tetrahydroNAD. *J. Mol. Biol.* **285**, 703–712.
- Chothia, C. & Lesk, A. M. (1986) The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* **5**, 823–826.
- Clarke, A. R. & Dafforn, T. R. (1998) Nicotinamide cofactor-dependent enzymes. In Sinnott, M., Herausgeber, *Comprehensive biological catalysis: a mechanistic reference*, Bd. III, 1–76. Academic Press, New York, NY, USA.
- Clarke, A. R., Wigley, D. B., Chia, W. N., Barstow, D., Atkinson, T. & Holbrook, J. J. (1986) Site-directed mutagenesis reveals the role of a mobile arginine residue in lactate dehydrogenase catalysis. *Nature* **324**, 699–702.
- Collaborative Computational Project Number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **D50**, 760–763.
- Collins, M. D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. & Wallbanks, S. (1993) Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 595–603.
- Creighton, T. E. (1993) *Proteins: structure and molecular properties*. W. H. Freeman, New York, NY, USA, 2. Aufl.
- Cruickshank, D. W. J. (1999a) Remarks about protein structure precision. *Acta Crystallogr.* **D55**, 583–601.

- Cruickshank, D. W. J. (1999b) Remarks about protein structure precision. Erratum. *Acta Crystallogr.* **D55**, 1108.
- Cudney, R., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y. & McPherson, A. (1994) Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta Crystallogr.* **D50**, 414–423.
- de Camp, W. H. (1989) The Food and Drug Administration's perspective on the development of stereoisomers. *Chirality* **1**, 2–6.
- Dengler, U., Niefind, K., Kieß, M. & Schomburg, D. (1997) Crystal structure of a ternary complex of D-2-Hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*, NAD⁺ and 2-oxoisocaproate at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **267**, 640–660.
- Doyle, M. L. (1997) Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 31–35.
- Drenth, J. (1994) *Principles of protein X-ray crystallography*. Springer Verlag, New York, NY, USA.
- Ducruix, A. & Giegé, R., Herausgeber (1999) *Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, England, 2. Aufl.
- Dunn, C. R., Wilks, H. M., Halsall, D. J., Atkinson, T., Clarke, A. R., Muirhead, H. & Holbrook, J. J. (1991) Design and synthesis of new enzymes based on the lactate dehydrogenase framework. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **332**, 177–184.
- Eifert, A. (2001) *Substratspezifität und Thermostabilität der D-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase aus Lactobacillus casei sowie strukturelle Untersuchungen von Phytochrom A aus Hafer*. Doktorarbeit, Universität zu Köln, Köln.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallogr.* **A47**, 392–400.
- EU 3-D Validation Network (1998) Who checks the checkers? Four validation tools applied to eight atomic resolution structures. *J. Mol. Biol.* **276**, 417–436.
- Feil, I. (1992) *Computergestützte Proteinmodellierung sowie Herstellung und Charakterisierung gentechnologisch veränderter Varianten der L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase aus Lactobacillus confusus*. Doktorarbeit, Technische Universität Carolus-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig.

- Feil, I. K., Lerch, H.-P. & Schomburg, D. (1994) Deletion variants of L-hydroxyisocaproate dehydrogenase. Probing substrate specificity. *Eur. J. Biochem.* **223**, 857–863.
- Feil, I. K., Hendle, J. & Schomburg, D. (1997) Modified substrate specificity of L-hydroxyisocaproate dehydrogenase derived from structure-based protein engineering. *Protein Eng.* **10**, 255–262.
- Fersht, A. (1998) *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. W. H. Freeman, New York, NY, USA.
- Flocco, M. M. & Mowbray, S. L. (1995) Strange bedfellows: interactions between acidic side-chains in proteins. *J. Mol. Biol.* **254**, 96–105.
- French, S. & Wilson, K. (1978) On the treatment of negative intensity observations. *Acta Crystallogr.* **A34**, 517–525.
- Garman, E. F. & Mitchell, E. P. (1996) Glycerol concentration required for cryoprotection of 50 typical protein crystallization conditions. *J. Appl. Crystallogr.* **29**, 584.
- Garman, E. F. & Schneider, T. R. (1997) Macromolecular cryocrystallography. *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 211–237.
- Gerstein, M. & Chothia, C. (1991) Analysis of protein loop closure: two types of hinges produce one motion in lactate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **220**, 133–149.
- Giacovazzo, C., Herausgeber (1992) *Fundamentals of Crystallography*. Oxford University Press, Oxford, England.
- Grau, U. M., Trommer, W. E. & Rossmann, M. G. (1981) Structure of the active ternary complex of pig heart lactate dehydrogenase with S-lac-NAD at 2.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **151**, 289–307.
- Hahn, T., Herausgeber (1995) *International tables for crystallography*, Bd. A. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, 4. Aufl.
- Hoffmann-La Roche & Urban & Schwarzenberg, Herausgeber (1993) *Roche Lexikon Medizin*. Urban & Schwarzenberg, München, 3. Aufl.
- Holbrook, J. J., Liljas, A., Steindel, S. J. & Rossmann, M. G. (1975) Lactate dehydrogenase. *The Enzymes* **XI**, 191–292.

- Hummel, W. & Kula, M.-R. (1989) Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur. J. Biochem.* **184**, 1–13.
- Hummel, W., Weiss, N. & Kula, M.-R. (1984) Isolation and characterization of a bacterium possessing L-phenylalanine dehydrogenase activity. *Arch. Microbiol.* **137**, 47–52.
- Hummel, W., Schütte, H. & Kula, M.-R. (1985) D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. A new enzyme suitable for stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 7–15.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23–28.
- Jack, A. & Levitt, M. (1978) Refinement of large structures by simultaneous minimization of energy and R factor. *Acta Crystallogr.* **A34**, 931–935.
- Jaenicke, L. (1984) *Einführung in die Praxis des Biochemikers*. Institut für Biochemie, Universität zu Köln, Köln.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 409–411.
- Jaskólski, M., Kozak, M., Lubkowski, J., Palm, G. & Wlodawer, A. (2001) Structures of two highly homologous bacterial L-asparaginases: a case of enantiomorphic space groups. *Acta Crystallogr.* **D56**, 369–377.
- Jones, C., Mulloy, B. & Sanderson, M. R. (1996) *Crystallographic methods and protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Jones, S. & Thornton, J. M. (1996) Principles of protein–protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13–20.
- Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr.* **A47**, 110–119.
- Kabsch, W. & Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577–2637.

- Kleywegt, G. J. (1996) Use of non-crystallographic symmetry in protein refinement. *Acta Crystallogr.* **D52**, 842–857.
- Kleywegt, G. J. (2000) Validation of protein crystal structures. *Acta Crystallogr.* **D56**, 249–265.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1995) Where freedom is given, liberties are taken. *Structure* **3**, 535–540.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1996) Phi/Psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure* **4**, 1395–1400.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1998) Databases in protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **D54**, 1119–1131.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (2002) Homo crystallographicus — quo vadis? *Structure* **10**, 465–472.
- Kohen, A., Cannio, R., Bartolucci, S. & Klinman, J. P. (1999) Enzyme dynamics and hydrogen tunneling in a thermophilic alcohol dehydrogenase. *Nature* **399**, 496–499.
- Kostrewa, D. & Winkler, F. K. (1995) Mg²⁺ binding to the active site of the EcoRV endonuclease: a crystallographic study of complexes with substrate and product DNA at 2 Å resolution. *Biochemistry* **34**, 683–696.
- Kraulis, P. J. (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946–950.
- Krebs, F. C. (2000) How the R factor changes as molecules become larger. *J. Appl. Cryst.* **33**, 392–393.
- Kula, M.-R. & Wandrey, C. (1987) Continuous enzymatic transformation in an enzyme-membrane reactor with simultaneous NADH regeneration. *Methods Enzymol.* **136**, 9–21.
- Lamzin, V. S., Dauter, Z. & Wilson, K. S. (1994) Dehydrogenation through the looking-glass. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 281–282.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283–291.

- Lerch, H.-P. (1989) *Klonierung, Sequenzierung und Expression in Escherichia coli des Gens der D-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase aus Lactobacillus casei und des Gens der L-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase aus Lactobacillus confusus*. Doktorarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen.
- Lerch, H.-P., Frank, R. & Collins, J. (1989) Cloning, sequencing and expression of the L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase-encoding gene of *Lactobacillus confusus* in *Escherichia coli*. *Gene* **83**, 263–270.
- Longenecker, K. L., Garrard, S. M., Sheffield, P. J. & Derewenda, Z. S. (2001) Protein crystallization by rational mutagenesis of surface residues: Lys to Ala mutations promote crystallization of RhoGDI. *Acta Crystallogr.* **D57**, 679–688.
- Luzzati, V. (1952) Traitement statistique des erreurs dans la détermination des structures cristallines. *Acta Crystallogr.* **5**, 802–810.
- Massa, W. (1996) *Kristallstrukturbestimmung*. B. G. Teubner, Stuttgart, 2. Aufl.
- Matthews, B. W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- McPherson, A. (1999) *Crystallisation of Biological Macromolecules*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- McPherson, A., Malkin, A. J., Kuznetsov, Y. G. & Plomp, M. (2001) Atomic force microscopy applications in macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr.* **D57**, 1053–1060.
- McRee, D. E. (1993) *Practical protein crystallography*. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- McRee, D. E. (1999) *Practical protein crystallography*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 2. Aufl.
- Meijers, R., Morris, R. J., Adolph, H. W., Merli, A., Lamzin, V. S. & Cedergren-Zeppezauer, E. S. (2001) On the enzymatic activation of NADH. *J. Biol. Chem.* **276**, 9316–9321.
- Merritt, E. A. & Bacon, D. J. (1997) Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods in Enzymol.* **277**, 505–525.

- Merritt, E. A., Kuhn, P., Sarfaty, S., Erbe, J. L., Holmes, R. K. & Hol, W. G. J. (1998) The 1.25 Å resolution refinement of the cholera toxin B-pentamer: evidence of peptide backbone strain in the receptor-binding site. *J. Mol. Biol.* **282**, 1043–1059.
- Messing, J., Crea, R. & Seeburg, P. H. (1981) A system for shotgun DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* **9**, 309.
- Michal, G., Herausgeber (1999) *Biochemical pathways. Biochemie-Atlas*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Miller, J. H. (1992) *A short course in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Mizuguchi, K., Deane, C. M., Blundell, T. L. & Overington, J. P. (1998) HOMSTRAD: a database of protein structure alignments for homologous families. *Protein Sci.* **7**, 2469–2471.
- Morales, R., Kachalova, G., Vellieux, F., Charon, M.-H. & Frey, M. (2000) Crystallographic studies of the interaction between the ferredoxin-NADP⁺ reductase and ferredoxin from the cyanobacterium *Anabaena*: looking for the elusive ferredoxin molecule. *Acta Crystallogr.* **D56**, 1408–1412.
- Navaza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr.* **A50**, 157–163.
- NEB (2000) *New England Biolabs catalog & technical reference*. New England Biolabs, Frankfurt am Main.
- Nicholls, A., Sharp, K. & Honig, B. (1991) Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **11**, 281–296.
- Niefind, K. (1993) *Röntgenkristallographische Untersuchungen an drei mikrobiellen Enzymen: D-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase aus Lactobacillus casei, L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase aus Lactobacillus confusus, Alkalische Phosphatase aus Bacillus alcalophilus/Variante Q59R*. Doktorarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig.
- Niefind, K., Hecht, H.-J. & Schomburg, D. (1995) Crystal structure of L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus confusus* at 2.2 Å resolution. An example of strong asymmetry between subunits. *J. Mol. Biol.* **251**, 256–281.

- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Otwinowski, Z., Schevitz, R. W., Zhang, R. G., Lawson, C. L., Joachimiak, A., Marmorstein, R. Q., Luisi, B. F. & Sigler, P. B. (1988) Crystal structure of Trp repressor/operator complex at atomic resolution. *Nature* **335**, 321–329.
- Pace, H. C., Lu, P. & Lewis, M. (1990) *lac* repressor: crystallization of intact tetramer and its complexes with inducer and operator DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1870–1873.
- Pauling, L. (1946) Molecular architecture and biological reactions. *Chem. Eng. News* **24**, 1375–1377.
- Pauling, L., Corey, R. B. & Branson, H. R. (1951) The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **37**, 205–211.
- Ponstingl, H., Henrick, K. & Thornton, J. M. (2000) Discriminating between homodimeric and monomeric proteins in crystalline state. *Proteins* **41**, 47–57.
- Read, J. A., Winter, V. J., Eszens, C. M., Sessions, R. B. & Brady, R. L. (2001) Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. *Proteins* **43**, 175–185.
- Read, R. J. (1986) Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Crystallogr.* **A42**, 140–149.
- Read, R. J. (1990) Structure-factor probabilities for related structures. *Acta Crystallogr.* **A46**, 900–912.
- Rhodes, G. (1993) *Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models*. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Rossmann, M. G., Adams, M. J., Buehner, M., Ford, G. C., Hackert, M. L., Liljas, A., Rao, S. T., Banazak, L. J., Hill, E., Tsernoglou, D. & Webb, L. (1973) Molecular symmetry axes and subunit interfaces in certain dehydrogenases. *J. Mol. Biol.* **76**, 533–537.
- Rossmann, M. G., Liljas, A., Brändén, C.-I. & Banaszak, L. J. (1975) Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases. *The Enzymes* **XI**, 61–102.

- Rubinson, K. A., Ladner, J. E., Tordova, M. & Gilliland, G. L. (2000) Cryosalts: suppression of ice formation in macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr.* **D56**, 996–1001.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2. Aufl.
- Schomburg, D. & Reichelt, J. (1988) BRAGI: a comprehensive protein modeling program system. *J. Mol. Graphics* **6**, 161–165.
- Schomburg, D. & Stephan, D., Herausgeber (1998) *Enzyme Handbook*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Schulz, G. E. & Schirmer, R. H. (1979) *Principles of protein structure*. Springer Verlag, New York, NY, USA.
- Schütte, H., Hummel, W. & Kula, M.-R. (1984) L-2-hydroxyisocaproat dehydrogenase – A new enzyme from *Lactobacillus confusus* for the stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. *All. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 167–176.
- Sheldrick, G. M. (1990) Phase annealing in SHELX-90: direct methods for larger structures. *Acta Crystallogr.* **A46**, 467–473.
- Sheldrick, G. M. (1997) *The SHELX-97 Manual*. Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.
- Sheldrick, G. M. & Schneider, T. R. (1997) SHELXL: High-resolution refinement. *Methods Enzymol.* **277**, 319–343.
- Staake, D., Walter, B., Kisters-Woike, B., von Wilcken-Bergmann, B. & Müller-Hill, B. (1990) How Trp repressor binds to its operator. *EMBO J.* **9**, 1963–1967.
- Stryer, L. (1995) *Biochemistry*. W. H. Freeman, New York, NY, USA, 5. Aufl.
- Sutcliffe, M. J. & Scrutton, N. S. (2000) Enzyme catalysis: over-the-barrier or through-the-barrier? *Trends Biochem. Sci.* **25**, 405–408.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Tanabe, T., Yoshimoto, T., Tsuru, D. & Mitsui, Y. (1996) Crystal structures of the binary and ternary complex of 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **35**, 7715–7730.

- Trapp, W. (1992) *Kleines Handbuch der Maße, Zahlen, Gewichte und der Zeitrechnung*. Philipp Reclam jun., Stuttgart.
- Usón, I., Pohl, E., Schneider, T. R., Dauter, Z., Schmidt, A., Fritz, H.-J. & Sheldrick, G. M. (1999) 1.7 Å structure of the stabilized REI_v mutant T39K. Application of local NCS restraints. *Acta Crystallogr.* **D55**, 1158–1167.
- Vriend, G. (1990) WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* **8**, 52–56.
- Wandrey, C., Fiolitakis, E., Wichmann, U. & Kula, M.-R. (1984) L-Aminoacids from a racemic mixture of α-hydroxy acids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **434**, 91–94.
- White, J. L., Hackert, M. L., Buehner, M., Adams, M. J., Ford, G. C., Lentz Jr, P. J., Smiley, I. E., Steindel, S. J. & Rossmann, M. G. (1976) A comparison of the structures of apo dogfish M4 lactate dehydrogenase and its ternary complexes. *J. Mol. Biol.* **102**, 759–779.
- Wichmann, R., Wandrey, C., Brückmann, A. F. & Kula, M.-R. (1981) Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 2789–2802.
- Wierenga, R. K., Terpstra, P. & Hol, W. G. J. (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding βαβ-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* **187**, 101–107.
- Wilks, H. M., Hart, K. W., Feeney, R., Dunn, C. R., Muirhead, H., Chia, W. N., Barstow, D. A., Atkinson, T., Clarke, A. R. & Holbrook, J. J. (1988) A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework. *Science* **242**, 1541–1544.
- Wilson, A. J. C., Herausgeber (1995) *International Tables for Crystallography*, Bd. C. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, 2. Aufl.
- Yanisch-Perron, C., Viera, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC9 vectors. *Gene* **33**, 103.
- Yeates, T. O. (1997) Detecting and overcoming crystal twinning. *Methods Enzymol.* **276**, 344–358.

Anhang A

A.1 Kristallsymmetrie

In der hier vorgestellten Arbeit sind Besonderheiten der Kristallsymmetrie wie z. B. Verzwillingung wichtig. Es gibt genügend Lehrbücher, die das Thema ausführlich behandeln (z. B. Giacovazzo, 1992; Massa, 1996). Hier soll nur das Nötigste erwähnt werden. Außerdem sollen einige neuere Überlegungen referiert werden, die bisher noch keinen Eingang in die Standardliteratur gefunden haben.

A.1.1 Kristalle

Kristalle sind Packungen mit einer *Fernordnung*. In der Regel sind Kristalle aus Atomen oder Molekülen aufgebaut. Massa (1996) definiert daher Kristalle so: „Von Kristallen spricht man, wenn die atomaren Bausteine eines festen Stoffes eine Fernordnung in allen drei Raumrichtungen aufweisen.“¹ Daraus ergibt sich, daß alle Atome eines Kristalls durch eine Elementarzelle (Einheitszelle) und ein Kristallgitter, in dem sich die Elementarzelle wiederholt, beschreibbar sind. Die Elementarzelle wiederum wird aus *asymmetrischen Einheiten* aufgebaut. Diese sind durch Symmetrioperationen (wie z. B. Drehachsen) miteinander verknüpft, so daß sie auf sich selbst abgebildet werden.

Die dazu in Frage kommenden Symmetrioperationen sind Translation, Rotation (nämlich 2-, 3-, 4- oder 6-zählige Drehachsen), Spiegelung an einer Ebene und Inversion an einem Zentrum. Diese einfachen Symmetrioperationen lassen sich miteinander koppeln zur Rototranslation (Schraubung), Drehinversion, Drehspiegelung und Gleitspiegelung. Proteinkristalle können wegen der Chiralität der Aminosäuren keine Spiegelung oder Inversion aufweisen.

Die Einheitszelle wird so beschrieben, daß sie zwar möglichst klein ist, aber eine größtmögliche Symmetrie aufweist. Wenn die zweite Bedingung eine kleinstmögliche Einheitszelle verhindert, dann hat diese zusätzliche Translationspunkte in ihrem In-

¹Diese Definition ist insofern unvollständig, als daß es auch ein- und zweidimensionale Kristalle gibt, entsprechend mit ein- oder zweidimensionaler Fernordnung. Sie spielen in dieser Arbeit jedoch keine Rolle.

neren. Insgesamt gibt es 14 verschiedene Kristallgittertypen, die sogenannten *Bravais-Gitter*. Sie stellen die Symmetrie der Gitter dar.

Die einfachen und gekoppelten Symmetrieelemente einschließlich der Translation lassen sich zu den 230 sogenannten *Raumgruppen* kombinieren. Sie beschreiben die Art und die Lage der Symmetrieelemente, die in einem Kristall möglich sind.

Für die äußere Gestalt eines Kristalls, wie die Winkel der Flächennormalen, ist die Translation unerheblich. Zur Beschreibung von Aussehen und anderen makroskopischen Eigenschaften wurden von den 230 Raumgruppen 32 sogenannte *Punktgruppen* oder *Kristallklassen* abgeleitet, indem alle translationshaltigen Symmetrieelemente entfernt wurden. So werden z. B. Schraubenachsen als Drehachsen angesehen.

Bei der Symmetrie des Röntgenbeugungsbilds eines Kristalls kommt noch eine Besonderheit hinzu. Der Beugungsvorgang ist nämlich inversionssymmetrisch und es gibt für Röntgenaufnahmen nur die 11 Punktgruppen, die ein Inversionszentrum haben: die sogenannten *Lauegruppen*. Sie beschreiben die Symmetrie der Intensitätsfunktionen. Jede röntgenkristallographische Auswertung beginnt mit der Bestimmung des Bravais-Gitters und anschließend der Lauegruppe.

A.1.2 Nichtkristallographische Symmetrie (NCS)

Es kann lokale Symmetrien geben, die nur innerhalb der asymmetrischen Einheiten, nicht aber im gesamten Kristall gelten. Dann liegt eine *nichtkristallographische Symmetrie* (*non-crystallographic symmetry*, NCS) vor. So hat beispielsweise eine regelmäßige Anordnung aus Sternen mit fünfzähliger Drehachse keinesfalls eine fünfzählige globale Symmetrie (Abbildung A.1). Die einzelnen Arme der Sterne unterscheiden sich durch diese unterschiedliche Umgebung im Kristall. Bei Proteinen ist dann zu erwarten, daß deshalb einzelne Kristallwasser, Seitenketten oder gar ganze Loopkonformationen unterschiedlich positioniert sind.

In der Proteinkristallographie wird von NCS gesprochen, wenn sich mehrere Exemplare eines Moleküls in der asymmetrischen Einheit befinden (Redundanz). Es wird geschätzt, daß dies für die Hälfte aller veröffentlichten Proteinstrukturen zutrifft (Kleywegt & Jones, 1995).

In erster Annäherung haben Proteine gleicher Sequenz auch die gleiche Struktur (Chothia & Lesk, 1986). Das gilt zwar für den Proteinkern (*core*), aber nicht unbedingt für flexible Bereiche (z. B. *loops*). Die NCS ist keine Symmetrie im strengen mathema-

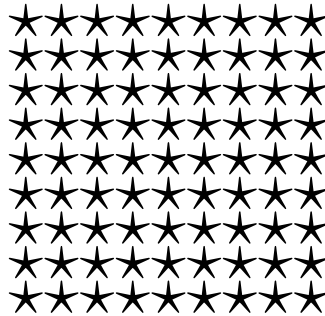


Abbildung A.1: Eine Packung aus fünfstrahligen Sternen. Obwohl die Arme der einzelnen Sterne durch eine fünffachen Symmetrie verbunden sind, erstreckt sich diese nicht auf die gesamte Packung.

tischen Sinn und wird in manchen Lehrbüchern der Kristallographie nicht berücksichtigt (Massa, 1996) oder nur am Rande erwähnt (Giacovazzo, 1992). Oft sind die strukturellen Unterschiede der durch NCS-verwandten Untereinheiten sehr gering und betreffen nur die Struktur weniger Seitenketten.

Abweichungen von der NCS können durch Vergleich der Sekundärstrukturen deutlich gemacht werden. Hierzu eignen sich $\Delta\phi/\Delta\psi$ -Plots, bei denen die Unterschiede der ϕ und ψ -Winkel für jede Aminosäure aufgetragen werden (Kleywegt & Jones, 1995). Bei mehr als zweifacher NCS werden Plots verwendet, die die jeweilige Standardabweichung auftragen ($\sigma\phi/\sigma\psi$ -Plots; Kleywegt, 1996). Zu erwarten sind klare Peaks über einem niedrigen Grundrauschen, weil die meisten Aminosäuren sehr ähnlich sind (dies ergibt das Grundrauschen) und sich oft nur in Loops oder Gelenken unterscheiden (dies führt zu den Peaks).

Außerdem läßt sich der Ramachandran-Plot erweitern, indem die NCS-äquivalenten Aminosäuren durch Linien miteinander verbunden werden, die die jeweiligen Unterschiede verdeutlichen (*multiple-model Ramachandran plot* oder Kleywegt-Plot; Kleywegt, 1996). Die Vorteile dieser Darstellungsweise gegenüber einem $\Delta\phi/\Delta\psi$ -Plot liegen zum einen in der Möglichkeit, mehr als zwei Strukturen miteinander zu vergleichen, und zum anderen darin, daß Abweichungen von der Ramachandran-Geometrie und von der NCS gleichzeitig dargestellt werden. Eine eventuelle Überverfeinerung läßt sich in einem Kleywegt-Plot mit einem Blick erkennen: größere Abweichungen von der Ramachandran-Geometrie sowie signifikante Konformationsunterschiede fallen sofort auf (letztere durch lange Verbindungslinien).

A.1.3 Kristallzwillinge

Kristallverzwillingung ist ein Phänomen, das sich sowohl im direkten als auch im reziproken Raum betrachten läßt. Daher sind die beiden folgenden Definitionen äquivalent:

1. Im reziproken Raum: Ein Zwillingskristall ist ein Kristall mit einer Anomalie, bei der Domänen des Kristalls zueinander so orientiert sind, daß ihre Beugungsgitter teilweise oder ganz überlappen (Chandra *et al.*, 1999).²
2. Im direkten Raum: „Unter Verzwillingung versteht man die *gesetzmäßige Verwachsung* verschieden orientierter Domänen ein und derselben Struktur zu einem Zwillingskristall.“ (Massa, 1996).

Das Symmetrieelement (meist eine Drehung), das einen Zwillingssteil (eine Domäne) in den anderen überführt, ist die *Zwillingsregel*.

Es gibt verschiedene Zwillinge, die in Abschnitt A.1.5 klassifiziert werden. Die Verzwillingung, die in dieser Arbeit wichtig ist, ist die sogenannte *Meroedrie*. Bei solchen Kristallen sind zwei oder mehrere verschiedene Domänen so miteinander verwachsen, daß ihre Beugungsgitter vollständig überlappen. Die Domänen liegen so, daß sie sich durch reine Drehungen ineinander überführen lassen. Diese Drehung ist die *Zwillingsregel*.

Ein Beispiel eines meroedrischen Zwillings ist in Abbildung A.2 dargestellt. Hier werden die Vektoren \vec{a} und \vec{b} in $-\vec{a}$ bzw. $-\vec{b}$ überführt, also lautet die *Zwillingsregel* in der Matrixschreibweise $(-a -b)$. Die Gesamtsymmetrie der Kristallsymmetrie und der *Zwillingsregel* ist die *Holoedrie* (siehe auch Wilson, 1995).

A.1.4 Zwillingsdomänen

Die Domänen sind in anorganischen Kristallen typischerweise sehr groß: sie sind von der gleichen Größenordnung wie die Kristalle selbst. Ein Beispiel ist Staurolith. Dieses Mineral kommt häufig kreuzförmig vor (griech. staurós = Kreuz, Abbildungen A.3 und A.4).

²“Twinning can be described as a crystal-growth anomaly whereby the orientations of individual crystalline domains within the crystal specimen differ in such a way that their diffraction lattices overlap, either completely or partially.”

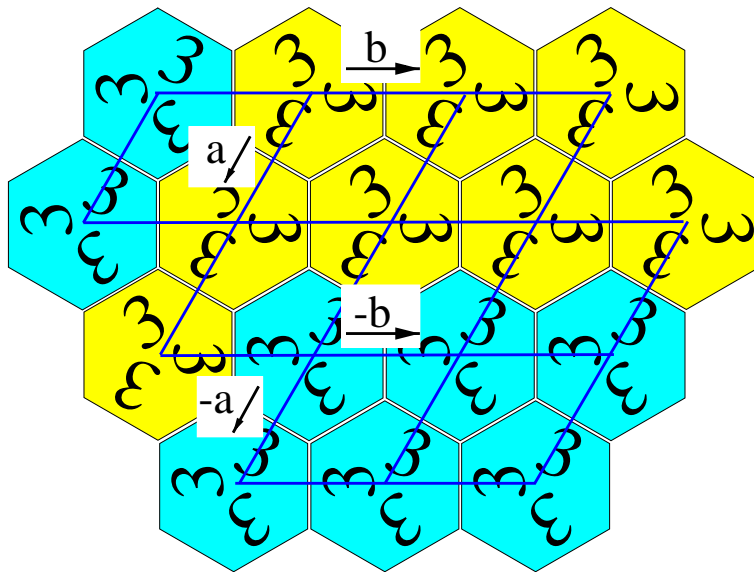


Abbildung A.2: Zwei verschiedene Domänen eines meroedrischen Zwillings (blau und gelb). Die Zwillingsregel lautet $(-a -b)$.

Die Kreuzstruktur des Staurolith läßt den Eindruck entstehen, daß die eine Domäne durch die andere hindurch wächst. Daher sind manche Zwillinge daran zu erkennen, daß sie konkave Winkel, also Einschnitte oder Ecken im Sinne von Zimmerecken, als Ergebnis der Kreuzung aufweisen. In der Abbildung A.5 sind einige Beispiele gezeigt.

Es gibt aber auch Kristalle, die weniger offensichtlich Zwillinge sind, da sie keine konkaven Flächen (Einschnitte) aufweisen, wie z. B. der *Brasilianer-Quarz* (Abbildung A.6). Auch in diesem Fall sind die Zwillingsdomänen groß: sie machen jeweils die Hälfte des Kristalls aus. Die typische Domänengröße in Proteinkristallen ist unbekannt. Das liegt unter anderem daran, daß nach Möglichkeit Einkristalle röntgenkristallographisch untersucht werden. Nur Zwillinge, die als solche nicht zu erkennen sind, werden überhaupt erst vermessen. Meist wird die Auswertung von Datensätzen aus Zwillingskristallen vermieden, weil die Reflexe überlappen und so ihre Intensitätswerte verfälscht werden. Möglicherweise sind die Domänen bei Proteinkristallzwillingen wie bei den anorganischen Kristallen groß. Vielleicht sind sie aber auch viel kleiner. Morales *et al.* (2000) haben den kleinstmöglichen Fall beschrieben, bei dem die Domänengröße der asymmetrischen Einheit entspricht. Dies wird allerdings klassischerweise als *Fehlordnung* angesehen.



Abbildung A.3: Ein Beispiel für ein Zwillingskristall: Staurolit in Glimmerschiefer von der Halbinsel Kola/Rußland (Mineralogisches Museum der Universität zu Köln).

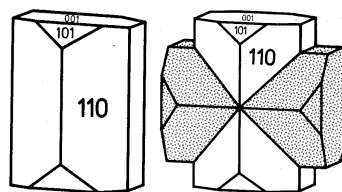


Abbildung A.4: Staurolith als Einkristall (links) und als Zwilling (rechts, die Zwillingsdomänen sind weiß und grau). Die Zahlen benennen die Flächen. Mit freundlicher Genehmigung aus dem „Lexikon der Minerale“ (G. Strübel und S. H. Zimmer, 2. Aufl. 1991, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart).

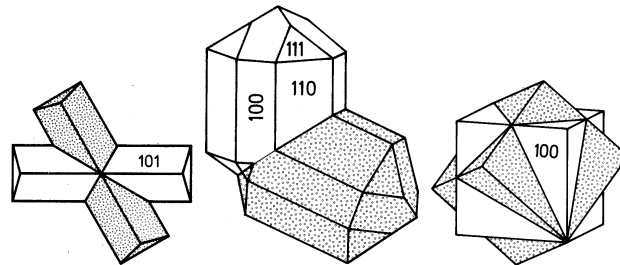


Abbildung A.5: Beispiele für Zwillinge aus der Mineralogie. Die Zwillingdomänen sind weiß und grau. Von links nach rechts: Arsenopyrit, Cassiterit und Fluorit. Mit freundlicher Genehmigung aus dem „Lexikon der Minerale“ (G. Strübel und S. H. Zimmer, 2. Aufl. 1991, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart).

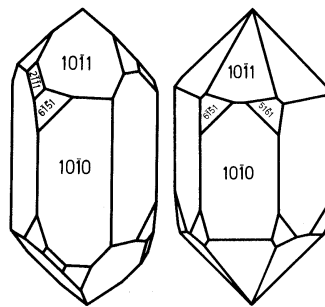


Abbildung A.6: Im Vergleich zum Einkristall (Linksform, links) wird die Verzwilligung des Brasilianer-Quarz (rechts) deutlich: Der rechte Kristall hat eine zusätzliche Symmetrie in der Längsachse. Die Zahlen bezeichnen die Flächen. Mit freundlicher Genehmigung aus dem „Lexikon der Minerale“ (G. Strübel und S. H. Zimmer, 2. Aufl. 1991, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart).

A.1.5 Klassifizierung

Die gebräuchliche Klassifizierung von Kristallzwillingen wird anhand der Überlappung der Beugungsgitter vorgenommen (Giacovazzo, 1992; Chandra *et al.*, 1999):

1. **TLQS:** *twin-lattice quasi-symmetry*. Epitaxiale Zwillinge, auch nicht-meroedrische Zwillinge. Dies sind Zwillinge ohne Koinzidenz der reziproken Gitter, also ohne gegenseitige *vollständige* Überlagerung der Reflexe. Diese Zwillinge entstehen beispielsweise durch Deformation eines Einkristalls. Wenn die Überlappung *fast* perfekt ist, wird auch von pseudomeroedrischer Verzwilligung gesprochen.
2. **TLS:** *twin-lattice symmetry*. Meroedrische Zwillinge. Sie entstehen aus einem Kristallisationskeim durch eine Wachstumsanomalie und haben vollständige Überlappung der Beugungsgitter. Je nach *Anzahl* der verschieden orientierten Domänen sind sie hemiedrisch, tetratoedrisch, ogdoedrisch mit 2, 4 bzw. 8 Domänen. Je nach Anteil der Domänen gibt es zwei Klassen:
 - (a) **TLS Klasse I:** Ungleich meroedrische Zwillinge. Die Volumen der Domänen sind ungleich. Als Resultat stimmen die scheinbare und die wirkliche Lauegruppe überein.
 - (b) **TLS Klasse II:** Perfekt meroedrische Zwillinge (kurz: „perfekte Zwillinge“). Die Volumen der Domänen sind gleich. Daher hat die scheinbare Lauegruppe eine höhere Symmetrie als die wirkliche (zusätzliche Rotation).

Meroedrische Kristalle können nur entstehen, wenn eine höhere Symmetrie durch Rotation erreicht werden kann. Das ist bei den Punktgruppen 3, 4, 6, 321, 312 und 23 erfüllt. Perfekte Meroedrie kann zusätzlich zu den scheinbaren Punktgruppen 422, 432 und 622 führen. Eine ausführliche Tabelle ist von Chandra *et al.* (1999) veröffentlicht.

A.1.6 Warnzeichen

Während epitaxiale Zwillinge bei der Indizierung und Prozessierung der Beugungsdaten leicht erkennbar sind, wird meroedrische Verzwilligung leicht übersehen. Zwillingskristalle werden dann als Einkristall behandelt, und die Strukturlösung ist unmöglich oder weist einen hohen restlichen Fehler (*R*-Wert, siehe Abschnitt A.3.3)

auf. Es kann sein, daß ein großer Anteil der in der *Protein Data Bank* (PDB; Berman *et al.*, 2000) veröffentlichten Kristalle, bei denen die Raumgruppe eine meroedrische Verzwilligung erlaubt, auch zu einem geringen Prozentsatz verzwilligt sind. Dies ist jedoch nur anhand der Rohdaten überprüfbar. Eine statistische Untersuchung der Ähnlichkeiten zwischen Reflexen, die durch die Zwillingsregel verbunden sind, erlaubt die Abschätzung vom Zwillingsanteil α , also dem Anteil einer Domäne an dem gesamten Kristall (Yeates, 1997).

Aber auch perfekte meroedrische Verzwilligung kann leicht übersehen werden. Zum einen gibt es keinen so klaren Test wie der auf partielle Verzwilligung, sondern nur eine Reihe von Warnzeichen. Zum anderen ist es in bestimmten Fällen auch möglich, eine Struktur zu lösen, ohne die Verzwilligung erkannt zu haben: Die Zwillingsachse ist meist parallel zur nichtkristallographischen Symmetrie. Wenn die NCS dann besonders ähnliche Untereinheiten ineinander überführt oder die Qualität der Daten eine strukturelle Unterscheidung zwischen diesen Untereinheiten nicht erlaubt, wird die Verzwilligung übersehen. Dann wird die Struktur in der scheinbaren, hochsymmetrischen Raumgruppe gelöst. Auch in diesem Fall ist der (freie) R -Wert höher als bei erkannter und berücksichtigter NCS und Verzwilligung.

Es lohnt sich daher, Kristalle und ihre Röntgendaten auf Verzwilligung zu überprüfen. Abgesehen von den R -Werten der Strukturlösung gibt es bei perfekten meroedrischen Zwillingen keinen Beweis, sondern nur Warnhinweise, die nicht unbedingt zutreffen. Diese sind von Sheldrick (1997), Yeates (1997) und Chandra *et al.* (1999) aufgelistet. Unter anderem sind das:

- Der Kristall hat eine der Punktgruppen, die für Zwillinge in Frage kommen: 3, 4, 6, 321, 312, 23, 422, 432 und 622.
- Der Kristall hat konkave Flächen.
- Die Packungsdichte ist zu hoch.
- Der R_{sym} -Wert bei einer Indizierung in einer höher symmetrischen Lauegruppe ist nur unwesentlich höher als bei der niedrigeren.
- Die Indizierung läßt sich nicht durchführen.
- Die Reflexe zeigen unmögliche oder ungewöhnliche Auslöschungen.
- Die Statistiken bei der Datenprozessierung weisen darauf hin, daß es viel weniger schwache Reflexe gibt als erwartet, denn die wirklich schwachen Reflexe

werden durch etwas stärkere überlagert. Es gibt eine ganze Reihe von statistischen Tests, die dies überprüfen, z. B.:

- Der Test, den Yeates (1997) vorgeschlagen hat und auf den Intensitäten I der Reflexe beruht: Der Wert für $\frac{\langle I^2 \rangle}{\langle I \rangle^2}$ ist theoretisch 2.0 für unverzwilligte Kristalle und 1.5 für Zwillinge.
- Die kumulative Verteilung der Intensitäten von azentrischen und zentrischen Reflexen im Vergleich zu den theoretischen Vorhersagen (French & Wilson, 1978). Dies leistet der sogenannte $N(Z)$ -Plot des CCP4-Programms TRUNCATE (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).

Andersson & Hovmöller (2000) haben eine Verteilung der Raumgruppen in der PDB erstellt (Tabelle A.1). Demnach gibt es eine Präferenz für niedrigsymmetrische Raumgruppen, und das scheinbare Vorliegen einer hochsymmetrischen und seltenen Raumgruppe kann als Warnzeichen dienen.

Tabelle A.1: Die Häufigkeit der Raumgruppen in der PDB (aus Andersson & Hovmöller, 2000)

Raumgruppe	Häufigkeit [%]
$P2_12_12_1$	22.87
$P2_1$	13.64
$C2$	8.94
$P3_22_1$	6.65
$P2_12_12$	6.15
$P4_32_12$	5.39
$C222_1$	4.39
$P3_12_1$	3.70
$P1$	2.74
$P4_12_12$	2.73
$I222$	2.45
$P6_122$	1.83
$R3$	1.41
alle anderen	17.11

A.1.7 Umgang mit meroedriscen Zwillingen

Überwiegt eine Domäne in einem meroedriscen Zwilling, läßt sich in manchen Fällen die Verzwilligung bei der Phasierung vernachlässigen. Die ersichtliche Raumgruppe entspricht der wahren, und die Qualitätsverschlechterung der Beugungsdaten ist möglicherweise gering. Wenn nicht, lassen sich die Reflexintensitäten anhand des geschätzten Zwillingsgrades dekonvolvieren (mit Programmen wie DETWIN, Collaborative Computational Project Number 4, 1994). Dies führt nicht in allen Fällen zu befriedigenden Ergebnissen. Besonders bei perfekten meroedriscen Zwillingen mit einem Domänenanteil von 0.45–0.5 ist eine Dekonvolution nicht möglich.

Bei perfekten meroedriscen Zwillingen ist die scheinbare Raumgruppe symmetrischer als die tatsächliche. Die Daten werden erst einmal in einer niedrigen Raumgruppe integriert und in allen in Frage kommenden Raumgruppen skaliert. Dabei wird der R_{sym} -Wert beobachtet. Durch eine Translationsrechnung wird die apparente Raumgruppe bestimmt und dann die möglichen wahren Raumgruppen eingegrenzt. Es gilt nun, die richtige Raumgruppe zu finden. Dazu wird der Zwillingstest (Yeates, 1997) mit allen möglichen Raumgruppen durchgeführt bis eine Zwillingsregel und ein Zwillingsanteil gefunden wird. Die Daten werden in dieser Raumgruppe integriert und skaliert. Die Strukturlösung erfolgt mit CNS (Brünger *et al.*, 1998, dabei wird der Zwillingsanteil auf einen vorher geschätzten Wert festgesetzt) oder SHELXL (Sheldrick & Schneider, 1997). SHELXL hat gegenüber CNS zwei Vorteile: Es kann den Zwillingsanteil verfeinern, und es kann mit allen Arten von Zwillingen umgehen (TLQS und TLS mit 2–8 Domänen, siehe Abschnitt A.1.5). Von Nachteil ist, daß SHELXL bessere Daten, also eine höhere Auflösung, erfordert als CNS. Die Strukturlösung eines perfekten meroedriscen Zwillings ist derzeit nur durch *molekularen Ersatz* möglich.

A.1.8 Vermeidung von Zwillingen

Meroedrische Zwillinge lassen sich in manchen Fällen vermeiden. Es kann helfen, die Kristalle langsamer wachsen zu lassen. Kleine Änderungen in dem Kristallisationsansatz reichen manchmal schon aus, um Einkristalle zu erhalten. Außerdem variiert der Zwillingsanteil verschiedener Kristalle im selben Ansatz, und es kann sich lohnen, mehrere Kristalle zu vermessen, um einen Einkristall zu finden.

Sheldrick schlägt vor, die Temperatur der Kristallisationsbedingungen zu erhöhen

(auf 45°C oder gar 60°C, pers. Mitteilung). Dadurch diffundieren falsch angelagerte Moleküle leichter wieder ab, und die Wahrscheinlichkeit einer Anomalie sinkt. Außerdem ist es natürlich immer möglich, eine völlig andere Kristallisationsbedingung zu suchen, die im Idealfall zu Einkristallen führt.

A.2 Die Aussagekraft von Kristallstrukturen

Proteinkristallstrukturen werden aus homogenen und räumlich hochgradig geordneten Proteinen erhalten. Es stellt sich wie bei jedem Ergebnis von *in vitro*-Experimenten die Frage nach der physiologischen Relevanz dieser Strukturen. Natürlich werden Strukturen von wissenschaftlichem Interesse von unabhängigen Arbeitsgruppen überprüft. So werden Vorhersagen abgeleitet, die dann in molekularbiologischen Experimenten getestet werden. Zum Beispiel haben Staake *et al.* (1990) die Trp-Repressor–DNA-Struktur mit atomarer Auflösung von Otwinowski *et al.* (1988) falsifiziert: Sie konnten nachweisen, daß dieser Protein–DNA Komplex nicht in Gelretardierungsexperimenten vorkommt, sondern daß er ein Kristallisationsartefakt darstellt. In der überwältigenden Mehrheit allerdings werden die Ergebnisse der Proteinkristallographie von anderen Wissenschaftszweigen bestätigt.

Welche Schlüsse können aus den Proteinkristallstrukturen gezogen werden? Läßt sich aus ihnen ableiten, wie die Proteine in der natürlichen Umgebung, beispielsweise im Zytosol, vorliegen? Lassen sich mit den Strukturen biologische Phänomene erklären? Im folgenden soll anhand von Beispielen kurz dargelegt werden, wie Proteinkristalle aufgebaut sind und was die damit gewonnenen Strukturen aussagen können. Außerdem sollen die in dieser Arbeit verwendeten Kriterien erklärt werden, die eine Evaluierung der vorgestellten Kristallstrukturen ermöglichen.

A.2.1 Kristallkontakte

Die Kräfte, denen ein Protein im Kristall, aber nicht in der Zelle unterworfen sind, resultieren aus den *Kristallkontakten*. Das sind die Protein–Protein Kontakte, die nicht durch Oligomerisierung, sondern durch die Packung im Kristall entstehen. Allerdings ist das Verhältnis von der Fläche der Kristallkontakte zur gesamten Proteinoberfläche klein. Bei den mechanisch relativ stabilen Kristallen der D-Hydantoinase tragen gerade einmal 5 % der Oberfläche zu den Kristallkontakten bei (Abendroth,

2001).

Daher wird die Struktur des Proteins im wesentlichen durch die Wechselwirkungen innerhalb einer Untereinheit und durch die Dimerisierungs- und Multimerisierungskontakte bestimmt. Während Dimerisierungsregionen durchschnittlich $1\,700\text{ \AA}^2$ groß sind, sind die Kristallkontakte meist kleiner als 860 \AA^2 . Dieser Größenunterschied ist meistens so deutlich, daß sich anhand der Flächenausdehnung Kristallkontakte von Dimerisierungsregionen unterscheiden lassen (Jones & Thornton, 1996; Ponstingl *et al.*, 2000). Abbildung A.7 veranschaulicht, daß nur ein kleiner Teil der Proteinoberfläche an den Kristallkontakten beteiligt ist. Dieser Fall kann als typisch angesehen werden, da der Lösungsmittelgehalt des Proteinkristalls mit 48 % genau dem Durchschnittswert entspricht (Jaskólski *et al.*, 2001; Matthews, 1968; McPherson, 1999).

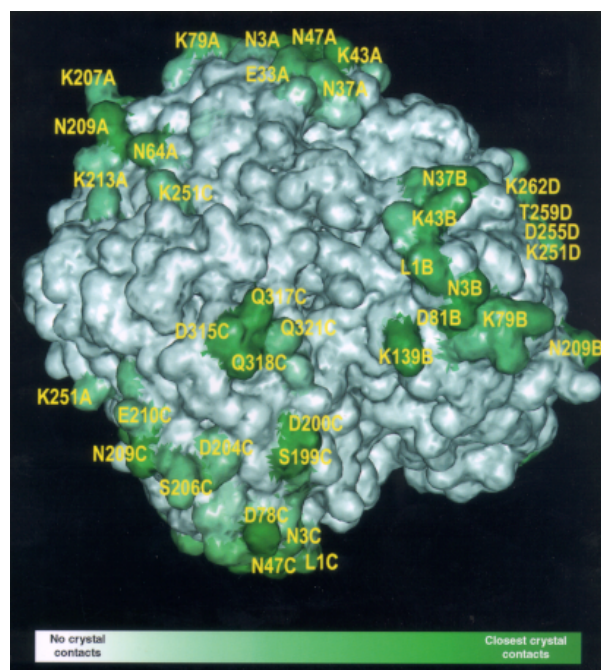


Abbildung A.7: Nur ein Bruchteil der Proteinoberfläche der *E. coli* L-Asparaginase EcA bildet Kristallkontakte (grün, aus Jaskólski *et al.*, 2001, Titelseite der März Ausgabe von *Acta Crystallogr. D*56).

Da die Kristallkontakte so klein sind, können sie chemisch oder physikalisch leicht verändert werden. Viele Proteine kristallisieren in mehreren Formen, d. h. ihre Kristalle sind *polymorph*. Diese Kristallformen sind einander energetisch so ähnlich, daß

geringe Änderungen der Mutterlauge, der Temperatur oder eine Punktmutation zu einer anderen Kristallform führen kann (McPherson, 1999). Es ist auch normal, daß in ein und demselben Kristallisationstropfen mehrere verschiedene Kristallformen entstehen (z. B. McPherson, 1999; Niefind, 1993; Eifert, 2001). Die Kristallisationskräfte sind so gering, daß eine einzige Aminosäure an einer ungünstigen Stelle eine erfolgreiche Kristallisation verhindern kann, während das Protein mit einer entsprechenden Mutation (z. B. Lys zu Ala) kristallisiert (Longenecker *et al.*, 2001).

A.2.2 Lösungsmittelkanäle

Kristallisierte Proteine befinden sich trotz ihrer hochgradig geordneten Packung in einer wässrigen Umgebung, und es gibt Proteine, die in dieser Umgebung voll funktionsfähig sind. Anders als anorganische Kristalle haben Proteinkristalle einen hohen Mutterlaugenanteil. Matthews hat 1968 in einer statistischen Untersuchung herausgefunden, daß der Lösungsmittelgehalt in Proteinkristallen zwischen 27 und 65 % liegt. Seitdem sind Proteinstrukturen von Kristallen ermittelt worden, die noch größere Lösungsmittelanteile aufweisen (bis zu 90 %; McPherson, 1999).

Die Packung in einem Proteinkristall ist nicht raumsparend. Dadurch entstehen die Lösungsmittelkanäle, deren Durchmesser oft mit dem der Proteine vergleichbar sind. Das Lösungsmittel in diesen Kanälen ist weitgehend ungeordnet. Als Resultat sind Proteinkristalle weich. Dies ist so charakteristisch, daß als erster Test, ob es sich bei einem Kristall um einen Protein- oder Salzkristall handelt, empfohlen wird, ihn mit einer Nadel zu berühren. Zerfällt er, ist es ein Proteinkristall (Ducruix & Giegé, 1999).

McPherson (1999) vergleicht die Proteine im Lösungsmittel mit Inseln, die voneinander isoliert in einem See aus Wasser liegen und nur durch ein Netzwerk aus filigranen Kontakten miteinander in Verbindung stehen.³ Elektronenmikroskopische Aufnahmen, in denen Proteinkristalle Merkmale eines geordneten Gels zeigen, untermauern dieses Bild (McPherson, 1999). Aus dem hohen Lösungsmittelgehalt und den schwachen Protein-Protein Kristallkontakten folgen Eigenschaften der Proteinkristalle, die wesentliche Schlüsse auf die Anwendbarkeit der Strukturinformation zulassen.

³“Thus, macromolecules in a crystal are somewhat like islands, isolated from one another in a sea of water, but all interconnected by a network of delicate contacts.”

Erstens ist die Proteinkonzentration im Kristall nur fünfmal höher als in einer Bakterienzelle und nur doppelt so hoch wie die Hämoglobinkonzentration in humanen Erythrozyten.⁴ Damit sind, zumindest was die Proteinkonzentration angeht, die Umgebungen in einem Kristall und in einer Zelle nicht grundlegend verschieden.

Zweitens können kleine Moleküle durch den Kristall diffundieren. Oft sind die aktiven Zentren oder andere Ligandbindungsstellen für solche kleinen Moleküle frei zugänglich (McPherson, 1999). So sind Enzyme bekannt, die auch in der Kristallpackung in der Lage sind, ihre Substrate umzusetzen. Die L-Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber (Meijers *et al.*, 2001) und die 7 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *E. coli* (Tanaka *et al.*, 1996) sind Beispiele hierfür.

A.2.3 Gleiche Strukturen trotz unterschiedlicher Umgebungen

Es drängt sich folgendes Bild auf: die Proteine diffundieren in der Mutterlauge und lagern sich an den Kristall an, wenn ihre Konformation der Kristallstruktur entspricht. Die Kristallkontakte fixieren eine mögliche Proteinstruktur, verzerren sie aber nicht.

Der Kristallisationsprozess wird thermodynamisch begünstigt, wenn die Flexibilität des Proteins niedrig ist (Longenecker *et al.*, 2001). So konnte ein Maltosebindungsprotein-Fusionsprotein erst kristallisiert werden, nachdem der flexible Linker in der Chimäre deletiert und ein starres Protein geschaffen wurde (Center *et al.*, 1998). Als weiteres Argument für die unverzerrte Kristallstruktur gilt die Tatsache, daß Proteine, die aus unterschiedlichen Bedingungen Kristalle bilden, die gleiche Struktur aufweisen. So kristallisiert D-Hydantoinase trotz unterschiedlicher Kristallisationsbedingungen (salzarm: 30 % Polyethylenglycol PEG 6000 und salzreich: 1.6 M Ammoniumsulfat) und unterschiedlicher Raumgruppen ($P2_12_12_1$ und $C222_1$) in der gleichen Struktur: Die Atome beider Strukturen lassen sich mit einer Abweichung (RMSD) von 0.66 Å zur Deckung bringen (Abendroth, 2001).

Eine andere wichtige Methode, Proteinstrukturen aufzuklären, ist die NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Spektroskopie, bei der die Proteine in Lösung vermessen werden. Die Strukturen von Proteinen, die sowohl mit NMR als auch durch Röntgenkristallographie gelöst wurden, sind einander sehr ähnlich oder gar gleich (Rhodes,

⁴Die Proteinkonzentration beträgt im Kristall durchschnittlich 700 mg/mL ($V_M = 2.37 \text{ \AA}^3/\text{Dalton}$; Matthews, 1968), in der *E. coli*-Zelle 135 mg/mL (nach NEB, 2000), und der Hämoglobin-Normalwert (Laborrichtwert) in Erythrozyten ist 299–357 mg/mL (nach Hoffmann-La Roche & Urban & Schwarzenberg, 1993).

1993).

Werden Proteinkonformationen im Kristallverband drastisch verändert, zerfällt der Kristall. Zum Beispiel zerbrechen *lac* Repressor–Operator-DNA Kristalle, wenn sie in einen Stabilisierungspuffer mit dem Induktor Isopropyl- β -D-galactosid (IPTG) gegeben werden. Dies zeigt die Konformationsänderung von *lac* Repressor bei der Aufnahme des Induktors (Pace *et al.*, 1990). Die Kräfte in der Kristallpackung sind nicht stark genug, diese Konformationsänderung zu verhindern. Auch dies spricht dafür, daß die Proteine im Kristall unverzerrt sind.

A.2.4 Wiederholbarkeit der Kristallstrukturen

Obwohl in der Proteinkristallisation die Experimente grundsätzlich wiederholbar sind, werden sie in der Praxis nicht notwendigerweise reproduziert. So wird in den Strukturveröffentlichungen selten darauf eingegangen, ob die Kristallisation wiederholt werden konnte oder nicht — es reicht, wenn ein einziger Kristall erhalten und vermessen wurde (siehe z. B. Kostrewa & Winkler, 1995). Allerdings sind für fast alle Strukturlösungen mehrere Kristalle nötig, und es gibt bestimmte Proteine wie z. B. Lysozym, deren Struktur einige hundertmal gelöst und veröffentlicht wurde.

A.3 Qualitätskriterien

Wesentlich wichtiger als die Reproduktion der Proteinkristallographie ist die Validierung der Ergebnisse durch *interne* Kontrollen sowie Qualitätskriterien, die in diesem Abschnitt vorgestellt werden sollen.

A.3.1 Auflösung und Daten/Parameter-Verhältnis

Jede Aussage zu der Qualität einer Röntgenstruktur muß immer im Hinblick auf die Qualität der Rohdaten gemacht werden. Als Kenngrößen hierfür dienen das Verhältnis der Intensitäten zu ihren Standardabweichungen I/σ_I (d. i. das Signal/Rausch-Verhältnis), die Anzahl, Vollständigkeit und Multiplizität der Beobachtungen (Reflexe), die statistische Übereinstimmung symmetrieverwandter Reflexe (R_{sym}) und besonders die Auflösung.

Letztere ist zwar nicht ausreichend, um die Güte eines Datensatzes zu beschrei-

ben, ist aber ein leicht vorstellbarer und daher eingängiger Wert. In der physikalischen Bedeutung ist die (optische) Auflösung der Abstand von zwei gerade noch voneinander unterscheidbaren Punkten.

Eine Auflösung von 2–2.5 Å wird für Proteinkristalle als normal betrachtet (Kleywegt & Jones, 1995). Der Abstand zwischen zwei C-Atomen in der Peptidkette ist mit 1.53 Å kleiner (Pauling *et al.*, 1951). Trotzdem lassen sich die Atompositionen in einer Röntgenstruktur wesentlich genauer bestimmen, weil zusätzliche Information eingebunden wird. Insbesondere wird die Form der Atomorbitale vorgegeben.

Als weitere Zusatzinformation wurde die Geometrie der Atombindungen eingeführt (Jack & Levitt, 1978; Engh & Huber, 1991). Sie wurden aus Strukturen der Cambridge Structure Databank (CSD, mit kleinen Molekülen) gewonnen und werden bei der Strukturverfeinerung entsprechend der Qualität der Röntgendaten gewichtet. Nur bei Daten mit „atomarer Auflösung“, also besser als 1.2 Å (Sheldrick, 1990), kann auf diese geometrischen Vorgaben verzichtet werden.

Bei diesen Strukturen mit sehr hoher Auflösung wird deutlich, daß die Kristallwirklichkeit von den strengen geometrischen Vorgaben von Engh & Huber (1991) durchaus abweichen kann. Beispielsweise wird allgemein angenommen, daß die ω -Winkel der Peptidbindung (C'-N) planar sind. Addlagatta *et al.* (2001) sehen dagegen in ihrer 0.86 Å Struktur des Proteins BPTI (*bovine pancreatic trypsin inhibitor*) eine deutliche Variation des ω -Winkels. Er hat eine Standardabweichung von 9.1° um die planaren 180°. Die Autoren schlagen vor, eine Abweichung von $\pm 20^\circ$ zuzulassen.

Allerdings sind bei den normal aufgelösten Daten die geometrischen Einschränkungen weiterhin nötig, da sie als Zusatzinformation das Verhältnis zwischen den Daten und den zu berechnenden Parametern deutlich verbessern. Es ist wichtig zu sehen, daß es sich bei den Proteinstrukturlösungen immer um Modelle handelt, die nur eine Annäherung an die Kristallwirklichkeit darstellen. Je nach Datenqualität sind diese Modelle unterschiedlich detailliert. Aber alle können viele biologische und biochemische Fragen beantworten.

Die Bestimmung der Atome im Modell erfordert die Berechnung einer Anzahl von Parametern. Je höher die Detailgenauigkeit des Modells, desto mehr Parameter müssen berechnet werden und desto mehr Daten (Anzahl der Reflexe) müssen bestimmt worden sein. Die Detailgenauigkeit muß also den zur Verfügung stehenden Daten angepasst werden, um eine Unterbestimmung (Überverfeinerung) zu verhindern.

Strukturen mit sehr hoher, atomarer Auflösung (wie z. B. die oben erwähnte BPTI-

Struktur, Addlagatta *et al.*, 2001) zeigen Modelle in einer großen Detailfülle, von der anzunehmen ist, daß sie eine gute Annäherung an die Wirklichkeit ist. Danach ist davon auszugehen, daß in einem typischen Proteinkristall ca. 20 % der Aminosäuren in alternativen Konformationen vorkommen. Die Atome sind in den einzelnen Molekülen nicht exakt positioniert, sondern sind fehlgeordnet und in thermischer Bewegung. Dies wird als Schwingung der Atome in Ellipsoiden durch die sogenannten anisotropen *B*-Faktoren (oder „Debye-Waller-Faktoren“) ausgedrückt. Bei einer idealen Strukturlösung ohne Begrenzung in der Datenqualität werden dazu noch weitere Details wie z. B. alle Wasserstoffatome und Lösungsmittelmoleküle bestimmt. Bei einer niedrigeren Auflösung ist die Anzahl der gemessenen Reflexe, also der Daten, niedriger. Daher ist eine solche Detailgenauigkeit des Modells nicht gerechtfertigt. Die Parameteranzahl läßt sich verringern, indem einige Vereinfachungen des Modells vorgenommen werden:

- Die mögliche Geometrie der Bindungen wird vorgegeben.
- Die Wasserstoffatome werden ignoriert.
- Es können nicht alle Lösungsmittelmoleküle bestimmt werden.
- Nur eine von alternativen Aminosäurekonformationen wird beachtet.
- Nicht alle Atome des Proteins werden berücksichtigt. Die, die einer starken Unordnung unterliegen, werden ignoriert.
- Die thermische Bewegung der Atome wird nicht mehr anisotrop (als Ellipsoid) angegeben, sondern isotrop (als Kugel) oder gar auf einen bestimmten Betrag festgesetzt. Die Anzahl der Parameter pro Atom verringert sich dann von 6 (anisotrope *B*-Faktoren zur Beschreibung des Ellipsoids) auf 1 (isotroper *B*-Faktor, als Kugeldurchmesser) oder 0 (Fixbetrag).
- Die thermischen Bewegungen benachbarter Atome werden einander angeglichen.
- Die Atomlagen einander äquivalenter Atome werden durch geometrische Beschränkungen angeglichen, die über die von Engh & Huber (1991) hinausgehen, wie z. B. die Vorgabe, daß ein aromatischer Ring planar ist.
- Die Lagen von durch NCS äquivalenten Atomen werden angeglichen.

Theoretisch genügt es, für jeden Parameter einen unabhängigen Reflex zu messen, um eine Unterbestimmung zu vermeiden. In der Praxis jedoch sind die Meßdaten mit Fehlern behaftet, und es müssen mehr Reflexe gemessen werden, als das Modell Parameter hat. Wird dies nicht beachtet, ist die Gefahr der Überverfeinerung groß. Die Daten sind nicht perfekt, und so ist auch das Modell mit Fehlern behaftet.

Eine Überverfeinerung liegt beispielsweise vor, wenn in die Differenzdichte⁵ Wasser oder andere Atome gelegt werden, obwohl dies chemisch wenig Sinn macht. Wenn die entsprechende Differenzdichte aus einem Fehler im Modell resultiert, wird dieser durch das Wasser verdeckt.

In der Praxis werden viele Strukturen, besonders solche, die eine Auflösung von 2–2.5 Å haben, überverfeinert (Kleywegt & Jones, 1995). Dies geschieht häufig, weil die NCS ignoriert wird. Technisch ist es möglich, daß so Proteine *identischer* Struktur einen artifiziellen Unterschied (RMSD) von 1.5 Å aufweisen (Kleywegt, 1996).

A.3.2 Genauigkeit der Atompositionierung

Bei der Verfeinerung der thermischen Bewegung der Atome (also der *B*-Faktoren) wird der Bewegung der Atome Rechnung getragen. Dabei kann nicht zwischen einer Schwingung der jeweiligen Atome und einer Fehlordnung von äquivalenten Atomen in verschiedenen Molekülen unterschieden werden. Ein hoher *B*-Faktor ist ein Maß für die Ungenauigkeit der Atome:

$$B = 8\pi^2 \times \langle u^2 \rangle \quad (1)$$

Dabei ist $\langle u^2 \rangle$ das mittlere Quadrat des Radius der Atomauslenkung. *B* wird normalerweise in Å² angegeben. Ein *B*-Faktor von 79 Å² entspricht einer durchschnittlichen Auslenkung von $\sqrt{79\text{Å}^2/8\pi^2} \simeq 1 \text{ Å}$.

Die Verfeinerung der thermischen Bewegung erlaubt es, die Genauigkeit der Atompositionen in dem Maße der Schwingung bzw. Fehlordnung zu gewichten. Es gibt zusätzlich die Möglichkeit, die Ungenauigkeit des Modells zu messen: im Idealfall durch voneinander unabhängige Strukturösungen. Die durchschnittliche Abweichung der äquivalenten Atome nach einer Überlagerung (RMSD) beträgt 0.2–0.3 Å bei einer Auflösung von 2.0 Å und 0.7 Å bei einer Auflösung von 2.5 Å (Cruickshank,

⁵Die Differenzdichte ist die Elektronendichte, die vom Modell nicht interpretiert wird.

1999a,b). Daß die Ungenauigkeit der Atompositionen typischerweise deutlich unter der Auflösung liegt, wird durch die Verwendung der Zusatzinformationen erreicht.

Die statistischen Analysemethoden des Luzzati-Plots (Luzzati, 1952) und des σ_A -Plots (Read, 1986, 1990) liefern ähnliche, allerdings etwas zu niedrige Ergebnisse (Read, 1990; Drenth, 1994; Sheldrick, 1997; Cruickshank, 1999a,b). Zwar gehen beide Methoden von einer für alle Atome gleichen Positionsgenauigkeit aus, sind jedoch durchaus als relative Vergleichswerte sinnvoll — besonders in ihren Varianten, die mit freien Reflexen berechnet werden (Brünger, 1997).

Zusätzlich bietet eine *full matrix least squares*-Verfeinerung wie z. B. die L.S.-Option in SHELXL die Bestimmung der *Standard-Unsicherheit*, S.U., an (Sheldrick & Schneider, 1997; Cruickshank, 1999a,b). Bei Proteinstrukturen werden die dafür zu berechnenden Matrices oft zu groß. Es ist möglich, Teile der Matrices blockweise zu berechnen. Dann werden die Positionsungenauigkeiten etwa 10 % zu niedrig eingeschätzt (Sheldrick & Schneider, 1997; Merritt *et al.*, 1998).

A.3.3 Qualität des Modells

Die Verfeinerung des Modells erfolgt bei den meisten Programmen durch die Minimierung des *R*-Wertes (Residualwert). Durch den *R*-Faktor wird der Fehler des Modells angegeben. Nach Drenth (1994) wird er allgemein definiert als

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}||}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|} \quad (2)$$

Der Strukturfaktor F ist die Fouriertransformierte der Elektronendichtefunktion in der Einheitszelle. F_{obs} sind die beobachteten (gemessenen) Strukturfaktoren und F_{calc} die aus dem Modell berechneten. k ist ein Gewichtungsfaktor.

Andere Autoren, z. B. Sheldrick (1997) und McRee (1999) verwenden einen ungewichteten *R*-Faktor. Dieser *R*-Wert ist in der Regel höher als der gewichtete.

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|} \quad (3)$$

Ein niedriger *R*-Wert gibt eine gute Übereinstimmung zwischen den gemessenen und berechneten Daten an, gibt aber keinen direkten Hinweis darauf, ob das Modell

richtig ist oder nicht. Tatsächlich ist es möglich, ein völlig falsches Modell bis zu relativ niedrigen R -Werten zu verfeinern ($R < 25\%$; Kleywegt & Jones, 1995).

Dagegen ist der sogenannte *freie* R -Wert (R_{free}) ein guter Indikator für die globale Qualität des Modells. Er wird genau wie der R -Wert berechnet, allerdings werden zur Berechnung nur F_{obs} -Werte verwendet, die von vornherein von den Minimierungsrechnungen ausgeschlossen wurden (Brünger, 1992). Damit ist der freie R -Wert eine *Vorhersage*: Das Modell wird aus dem übrigen Teil des Datensatzes gewonnen, und der freie R -Wert gibt den Fehler an, mit dem das Modell die „freien“ Daten vorher sagt. Er ermöglicht, eine Überverfeinerung zu vermeiden: Eine Erweiterung der Detailfülle (z. B. Hinzufügen von Kristallwasser) ist dann nicht gerechtfertigt, wenn bei der anschließenden Verfeinerung nur der R -Wert sinkt, nicht aber der freie R -Wert.

R und R_{free} rücken eine riesige Datenmenge jeweils in einer einzigen Zahl aus, die auch statistischen Schwankungen unterliegt. Daher dürfen diese Werte nicht überbewertet werden. Trotzdem können sie einen guten Hinweis auf eine Überverfeinerung oder andere Fehler (z. B. eine falsche Raumgruppe oder eine übersehene Verzwilligung) geben.

A.3.4 Validierung und Fehlerbestimmung

Lokale Fehler des Modells können durch eine sorgfältige Validierung gefunden werden (EU 3-D Validation Network, 1998; Kleywegt, 2000). PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) ist ein verbreitetes Programm zur Überprüfung des Modells. Es erstellt unter anderem einen Ramachandran-Plot und führt viele andere geometrische Untersuchungen durch. Mit dem sogenannten G -Faktor wird die Güte für jede Aminosäure aus verschiedenen Qualitätstests berechnet und angegeben.

Auch die Berechnung des sogenannten lokalen R -Werts ($R_{\text{real space}}$ nach Drenth, 1994) sowie die Untersuchung von Bereichen mit hohen B -Faktoren können Fehler des Modells aufzeigen.

Bei einem Vorliegen von nichtkristallographischer Symmetrie (NCS) bieten sich die Sekundärstrukturvergleiche an, die in Abschnitt A.1.2 vorgestellt wurden.

Anhang B

B.1 Sekundärstrukturanalyse

DSSP (Kabsch & Sander, 1983) wurde verwendet, um die fünf Kristallstrukturen der L-HicDH zu analysieren, nämlich der binäre, „native“ L-HicDH–NAD⁺ Komplex und die ternären Komplexe, die zusätzlich noch 2-Oxocaproat („oca“), 2-Oxoisocaproat („coi“), Phenylglyoxylat („pg“) bzw. Oxamat („ox“) enthielten. Angegeben ist jeweils das Kürzel des Komplexes mit der jeweiligen Untereinheit nach dem Unterstrich.

Zum einfacheren Vergleich sind zuerst die geschlossenen Untereinheiten A und B aufgelistet, dann die offenen Untereinheiten C und D. Für die geschlossene und die offene Konformation wurde jeweils ein gemeinsames Modell abgeleitet. Weil die Struktur jedes Bereichs der Proteinketten mindestens zweimal gelöst worden ist, ist das Modell in beiden Untereinheiten vollständig.

Die Loops sind bezeichnet mit: (Outer) active site loop, Coenzym-Loop; i. a. s. l., inner active site loop; f. s. l.: flexible surface loop.

Die DSSP-Bezeichnungen der Sekundärstrukturen sind: H = α -Helix, B = β -Brücke, E = β -Faltblatt, G = 3_{10} -Helix, I = π -Helix, T = wasserstoffgebundener Turn, S = Krümmung $> 70^\circ$. Ein Punkt zeigt an, daß DSSP der betreffenden Aminosäure keine Sekundärstruktur zugewiesen hat.

Die Zuordnung der α -Helices und β -Faltblätter folgt im wesentlichen Niefind *et al.* (1995). Die wichtigsten Änderungen sind die Aufspaltung des β -Faltblatts β H und die Einführung der α -Helix α 3F.

Position	30	40	50	60	70
Sequenz	ARKIGIIGLGNVGA AVAHGLIAQGVADDYV FIDANEAKVKADQIDFQDAMANLEA				
nativ_a	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHHTTSSS				
nativ_b	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHHTTSSS				
oca_a	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHGGGSSS				
oca_b	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHGGGSSS				
coi_a	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHGGGSSS				
coi_b	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHGGGSSS				
pg_a	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHHTT.SS				
pg_b	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHHTTSSS				
ox_a	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHHTTSSS				
ox_b	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHHTTSSS				
nativ_c	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHGGGSSS				
nativ_d	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHGGGSSS				
oca_c	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHGGGSSS				
oca_d	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHGGGSSS				
coi_c	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHHTTSSS				
coi_d	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHGGGSSS				
pg_c	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHGGG.SS				
pg_d	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHTTGGGSSS				
ox_c	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHGGGSSS				
ox_d	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHGGGSSS				
Modell A/B	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHGGGSSS				
Modell C/D	.. EEEEE.. SHHHHHHHHHHHHTT.. SEEEEE.S. HHHHHHHHHHHHHGGGSSS				
Zuordnung A/B	-βA--	-----αB-----	-βB--	-----αC-----	
Zuordnung C/D	-βA--	-----αB-----	-βB--	-----αC-----	

Position	80	90	100	110	120	130
Sequenz	HGNIVINDWAALADADVISTLGNIKLQQDNPTGDRFAELKFTSSMVQSVGTNLK					
nativ_a	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE..S.HHHHSS..S..THHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
nativ_b	..EEEEES.SGGGTT.SEEEE..S.HHHH.. ..THHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
oca_a	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE..S.GGGGSS.TT..GGGGHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
oca_b	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE..S.GGGGTT.TT..GGGGHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
coi_a	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE..S.GGGGTT.SS..GGGSHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
coi_b	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE..S.GGGG.. .GGGSHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
pg_a	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE..S.GGGGSS.SS..THSHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
pg_b	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE..S.GGGT.. ..THHHHTTTTHHHHHHHHHHH					
ox_a	..EEEEES.SGGGGG.SEEEE..S.GGGGSS.TT..THHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
ox_b	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE...HHHH.. .HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
nativ_c	..EEEEES.GGGGGG.SEEEE...B... .HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
nativ_d	..EEEEES.GGGGGG.SEEEE...B... .HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
oca_c	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE.... .HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
oca_d	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE.... .HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
coi_c	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE.... .HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
coi_d	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE.... .HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
pg_c	..EEEEES.GGGGGG.SEEEE...B....SS.SHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
pg_d	..EEEEES.GGGGGG.SEEEE...B... .HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
ox_c	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE...B...S. .SHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
ox_d	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE...B.... HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
Modell A/B	..EEEEES.GGGGTT.SEEEE..S.GGGGSS.TT..GGGGHHHHHHHHHHHHHHHH					
Modell C/D	..EEEEES.GGGGGG.SEEEE...B....SS.SHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH					
Zuordnung A/B	- β C-		- β D-		----- α D/E----	
Zuordnung C/D	- β C-		- β D-		----- α D/E----	

(outer) active site loop

Position	140	150	160	170	180
Sequenz	ESGFHGVLVVISNPVDVITALFQHVTFGPAHKVIGTGTLTARMQRAVGEAFDL				
nativ_a	HTT..SEEEE.SSSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHTS				
nativ_b	HTT..SEEEE.SSSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHTS				
oca_a	HHT..SEEEE.SSSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
oca_b	HHT..SEEEE.SSSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
coi_a	HHT..SEEEE.SSSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
coi_b	HHT..SEEEE.SSSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
pg_a	HTT..SEEEE.SSSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
pg_b	HHT..SEEEE.SSSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
ox_a	HTT..SEEEE.SSSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
ox_b	HHT..SEEEE.SSSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
nativ_c	HTT..SEEEE.SBSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
nativ_d	HTT..SEEEE..BSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
oca_c	HHT..SEEEE.SSSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
oca_d	HHT..SEEEE.SSSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
coi_c	HHT..SEEEEE.THHHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
coi_d	HHT..SEEEEE.THHHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
pg_c	HHT..SEEEE..BSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
pg_d	HHT..SEEEE..BTHHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
ox_c	HHT..SEEEE..BSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
ox_d	HHT..SEEEE..BTHHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
Modell A/B	HHT..SEEEE.SSSHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
Modell C/D	HHT..SEEEE..BTHHHHHHHHHHHHH..GGGEEE.TTHHHHHHHHHHHHHHHT.				
Zuordnung A/B	-	- β E-	----- α 1F----	β F-	----- α 2F-----
Zuordnung C/D	--	- β E-	----- α 1F----	β F-	----- α 2F-----
		i. a. s. l.			

Position	190	200	210	220	230	240
Sequenz	DPRSVSGYNLGEHGNSQFVAWSTVRVMGQPIVTLADAGDIDLAAIEEEARKGGFT					
nativ_a	.GGG...	EEEB.TTTT.	EEEGGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHHH
nativ_b	.GGG...	EEB.TTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHHS
oca_a	.GGG...	EEEB.SSTT.	EEEGGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHHTT
oca_b	.GGG...	EEEB.SSTT.	EEEGGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHHT
coi_a	.GGG.B...	EEB.TTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHTHHH
coi_b	.GGG.B...	EEB.TTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHSHHHH
pg_a	.GGG...	EEBSTTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHTSS
pg_b	.GGG...	EEB.TTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHHH
ox_a	.GGG...	EEB.TTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHHS
ox_b	.GGG...	EEB.TTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHHH
nativ_c	.GGG...	EEE.TTTTEE.	GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHTTS
nativ_d	.GGG...	EEB.TTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHTTS
oca_c	.GGG...	EEEB.TTTT.	EEEGGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHHH
oca_d	.GGG...	EEEB.TTTT.	EEEGGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHTTT
coi_c	.GGG.B...	EEB.TTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHTTS
coi_d	.GGG.B...	EEB.TTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHTTS
pg_c	.GGGB...	EEB.TTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHTT.S
pg_d	.GGG...	EEEETTTEEE.	GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHTT
ox_c	.GGG...	EEB.TTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHTTS
ox_d	.GGG...	EEB.TTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHTTS
Modell A/B	.GGG...	EEB.TTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHHS
Modell C/D	.GGG...	EEB.TTTT.	EE.GGG.	EETTEE	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHTTS
Zuordnung A/B	βG	$\beta H1$	$\beta H2$	βJ	$-\alpha 3F$	$-\alpha 1G$
Zuordnung C/D	βG	$\beta H1$	$\beta H2$	βJ	$-\alpha 3F$	$-\alpha 1G$

f.s.l.

Position	250	260	270	280	290
Sequenz	VLNGKGYTSYGVATSARIAKAVMADAHAELVVSNNRDDMGMYLSYPALIGRDGV				
nativ_a	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
nativ_b	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEEETTTTEEEEEEEEEETTEE				
oca_a	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
oca_b	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
coi_a	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
coi_b	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
pg_a	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
pg_b	HHHHHS...HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
ox_a	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
ox_b	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
nativ_c	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEEETTTTEEEEEEEEEETTEE				
nativ_d	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
oca_c	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
oca_d	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
coi_c	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
coi_d	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
pg_c	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEEETTTTEEEEEEEEEETTEE				
pg_d	HHHHHS...HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
ox_c	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
ox_d	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
Modell A/B	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
Modell C/D	HHHHHSS..HHHHHHHHHHHHHHHTT..EEEEEEEE.TTTSSEEEEEEEEEETTEE				
Zuordnung A/B	- α 2G-	----- α 3G-----	--- β K---	--- β M----	--
Zuordnung C/D	- α 2G-	----- α 3G-----	--- β K---	--- β M----	--

Position	300	310	320
Sequenz	LAETTLDLTTDEQEKLLQSRDYIQQRFDEIVDTL		
nativ_a	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHT..		
nativ_b	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHTT..		
oca_a	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHT..		
oca_b	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHTT....		
coi_a	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHTTT.		
coi_b	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH..		
pg_a	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHTT..		
pg_b	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHTT..		
ox_a	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHT..		
ox_b	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH..		
nativ_c	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHT..		
nativ_d	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHT.		
oca_c	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHTT..		
oca_d	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHTT.		
coi_c	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHT..		
coi_d	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHTT.		
pg_c	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHT..		
pg_d	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH..		
ox_c	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHT..		
ox_d	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHT..		
Modell A/B	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHT..		
Modell C/D	EEE.....HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHT..		
Zuordnung A/B	β M-	-----	$-\alpha$ H-----
Zuordnung C/D	β M-	-----	$-\alpha$ H-----

Anhang C

C.1 Abkürzungen

C.1.1 Aminosäuren

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

C.1.2 Sonstige Abkürzungen

Alle Einheiten und Vorsatzzeichen wurden so verwendet, wie sie im internationalen Einheitensystem SI festgelegt (nach Trapp, 1992) oder in den *International Tables for Crystallography* beschrieben sind (Hahn, 1995). Davon abweichende sowie nicht allgemein gebräuchliche Abkürzungen sind in Tabelle C.1 aufgeführt.

Tabelle C.1: Abkürzungen

Å	Ångström (1 Å= 0.1 nm)
α	Domänenanteil bei Kristallzwillingen
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CAS	Chemical Abstracts Service
CSD	Cambridge Structure Databank
CSDS	Cambridge Structure Databank System
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
IEX	Anionenaustauschchromatographie
KP _i	Kaliumphosphatpuffer
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation with time of flight detection</i>
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
λ	Wellenlänge
IPTG	Isopropyl- β -D-galactosid
L-HicDH	L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase
L-LDH	L-Lactat-Dehydrogenase
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
NAD ⁺	Nicotinamidadeninucleotid
NCS	nichtkristallographische Symmetrie
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernresonanzspektroskopie
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte, Extinktion bei $\lambda = 600$ nm
PEG	Polyethylenglycol (meist mit Angabe des Molekulargewichtes)
RMSD	<i>root mean square deviation</i> , z. B. durchschnittliche Abweichung der äquivalenten Atome nach einer Überlagerung
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
S.U.	Standard-Unsicherheit
TLS	<i>twin-lattice symmetry</i> , meroedrischer Zwillling
TLQS	<i>twin-lattice quasi-symmetry</i> , epitaxialer Zwillling
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	<i>unit</i> , Enzymeinheit

C.2 Teilveröffentlichungen

- Daniel Schlieper, Karsten Niefind & Dietmar Schomburg: The Substrate Specificity of L-2-Hydroxyisocaproate Dehydrogenase from *Lactobacillus confusus*. Poster präsentiert auf dem Satellit-Workshop des achten Elettra Synchrotron Triest Users' Meeting "Challenges in Crystallography of Macromolecular Assemblies", Triest, Italien, 5.–6. Dez. 2000.
- Daniel Schlieper, Karsten Niefind & Dietmar Schomburg: How L-2-Hydroxyisocaproate Dehydrogenase from *Lactobacillus confusus* binds its substrates. HASYLAB Annual Report 2000, Seite 143, Hamburg 2001.
- Daniel Schlieper, Karsten Niefind & Dietmar Schomburg: How L-2-Hydroxyisocaproate Dehydrogenase binds its substrates. In Vorbereitung.

C.3 Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig 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 den auf Seite 223 angegebenen Teilpublikationen — noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg betreut worden.

Daniel Schlieper

C.4 Lebenslauf

26. Mai 1968	geboren in Hilden, Staatsangehörigkeit deutsch
1974–1977	Gemeinschafts-Grundschule, Troisdorf-Spich
1977–1978	Kath. Grundschule, Troisdorf-Eschmar
1978–1982	Städtisches Gymnasium „Zum Altenforst“, Troisdorf
1982–1987	Städtisches Gymnasium „Thomaeum“, Kempen am Niederrhein
5/1987	Abitur
10/1987–12/1988	Wehrdienst in Emmerich am Rhein
10/1988	Beginn des Biologiestudiums an der Universität zu Köln
10/1990	Vordiplomprüfung
12/1992	Diplomprüfung
1/1993–3/1994	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Benno Müller-Hill im Institut für Genetik der Universität zu Köln Thema: Charakterisierung der DNA-Bindung des CAP Proteins von <i>E. coli</i>
4/1994–2/1997	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Herrn Prof. Dr. Benno Müller-Hill und Herrn Dr. Gerald Thiel im Institut für Genetik der Universität zu Köln
3/1997–8/2001	Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg im Institut für Biochemie der Universität zu Köln
seit 9/2001	<i>Research Associate</i> im Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK