

**Röntgenstrukturanalyse
mikrobieller
Dihydropyrimidinasen**

Inaugural - Dissertation

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

vorgelegt von
Jan Abendroth
aus Köln

Köln 2001

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dietmar Schomburg Prof. Dr. Reinhard Sterner
Einreichung des Gesuchs:	8. Mai 2001
Tag der mündlichen Prüfung:	2. Juli 2001

Meinen Großeltern,
meinen Eltern und
meiner Schwester

Ama sua, ama llulla, ama kella.

(alte Inkaweisheit)

Danksagung

Danksagungen, die auf Papier verewigt werden, sind leider eine heikle Angelegenheit. Wen nennt man namentlich, in welcher Reihenfolge? Dabei möchte man doch ganz einfach nur den Personen *Danke* sagen, die auf verschiedenste Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei

Prof. D. Schomburg, der mir das interessante und ergiebige Thema anvertraute und mir bei der Durchführung der Arbeit in einem hervorragend ausgestatteten Umfeld mit viel Vertrauen große Freiräume gab,

Prof. R. Sterner für die Übernahme des Coreferats,

Karsten Niefind für die ausführliche Einführung in die reale und reziproke Welt der Kristallographie und die vielen Hilfen und Diskussionen bei der Lösung und Interpretation der Strukturen,

Jörg Müller für die fortwährend exzellente Kooperation und die große Hilfe während der Messungen am Synchrotron,

Oliver May, Martin Siemann-Herzberg, Markus Pietzsch und Prof. C. Syldatk vom Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart für die gute, unkomplizierte und interessierte Kooperation,

Karsten Niefind und Oliver May für den Datensatz der L-Hydantoinase,

P. Rasor und W. Burtscher von RocheDiagnostics in Penzberg für die Überlassung des Plasmids der D-Hydantoinase,

den Bürokollegen Andrea Eifert und Peter Krämer für die einfach nette Arbeitsatmosphäre im GLB und die vielen Striezel-Runden,

Daniel Schlieper für viele Diskussionen über Bakterien, Kristallographie, Verfeinerungen, Strukturen, ...

allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen, die durch Kollegialität und Menschlichkeit eine angenehme und anregende Arbeitsatmosphäre schafften,

den Technischen Assistenten Sabine Lohmer für ein klasse Labor und Michael Kölleemann für einen fixen und stabilen PC50,

Shivani Chatterjee für die Hilfen bei der Expression der D-Hydantoinase,

II

den kritischen Korrekturlesern dieser Arbeit Karsten Niefind, Daniel Schlieper, Guido Sonsmann und Shivani Chatterjee für viele Tipps und Anregungen, den Läufer-Kollegen für die langen und kurzen Mittwochsrunden und die ganz langen Oktober-Runden, den *BRENDA-Girls* für manche Teerrunde, Susanne Morbach aus der Arbeitsgruppe von Prof. Krämer für die Hilfe bei der Sequenzierung der D-Hyd, Peter Reinemer für seine begeisterten Erklärungen zum Thema MAD, den Operatoren der EMBL-Outstation am DESY Alexander Popov, Woitek Rypniewski, Ehmke Pohl, Anna Gonzalez und Paul Tucker für die vielen Hilfen während der Messungen und die unkomplizierte Bereitstellung der Messzeit für die MAD-Messung, den aktiven Teilnehmern des *CCP4-bulletin boards*, insbesondere Eleanor Dodson, Garib Murshudov, Kewin Cowtan, David Borhani und Zbyszek Otwinowski für etliche Tipps und Tricks, Tom Terwilliger für seinen überzeugenden Optimismus, das SOLVE das MAD-Problem bei der D-Hydantoinase lösen könne, Tassos Perrakis, der auf meinen Wunsch ARP so veränderte, dass es auch die Struktur der D-Hydantoinase automatisch modellieren konnte, allen Autoren der unzähligen kristallographischen Programme, deren Durchblick ich nur bewundern kann, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung meiner Arbeit, meinen Eltern, Großeltern und meiner Schwester, die mich während des gesamten Studiums unterstützt haben und allen Freunden und Bekannten, die die Zeit außerhalb des *Mikrokosmos Labor* zu einer schönen Zeit werden ließen.

Allen noch einmal ein herzliches Dankeschön!

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie – abgesehen von unten (Kap. [A.6](#)) 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.

(Jan Abendroth)

Inhaltsverzeichnis

Vorspann	I
Danksagung	I
Erklärung	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Hydantoinasen	1
1.1.1 Allgemeine Einteilung und Historie	1
1.1.2 Physiologische Bedeutung	2
1.1.3 Biotechnologische Bedeutung	3
1.1.4 Homologe Proteine	5
1.1.5 Kristallisation	6
1.1.6 Die D-Hyantoinase aus <i>Thermus sp.</i>	7
1.1.7 Die L-Hyantoinase aus <i>Arthrobacter aurescens</i>	7
1.2 Spezielle kristallographische Kapitel	9
1.2.1 Strukturlösung und Phasierung	9
1.2.2 MAD-Phasierung	11
1.2.3 Automatischer Modellbau	14
1.3 Zielsetzung	17
2 Experimenteller Teil	19
2.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und EDV-Systeme	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Materialien, Geräte und EDV-Systeme	19
2.2 Molekularbiologie, Sequenzierung und Proteinexpression	23
2.2.1 Mikroorganismen und Medien	23
2.2.2 Plasmid	24
2.2.3 Herstellung kompetenter Zellen	24

2.2.4	Glycerin-Dauerkulturen	24
2.2.5	Hitzeschock-Transformation	24
2.2.6	Plasmidpräparation	25
2.2.7	DNA-Sequenzierung	25
2.2.8	Expression der nativen D-Hyd	26
2.2.9	Expression der Se-Met-D-Hyd	27
2.2.10	Zellaufschluss	27
2.3	Chromatographie	27
2.3.1	Probenvorbereitung	27
2.3.2	Chromatographie mit STREAMLINE Phenyl im Fließ- und Festbett	28
2.3.2.1	Hydrophobe Interaktionschromatographie	28
2.3.2.2	Entsalzung	29
2.3.2.3	Anionentausch-Chromatographie	29
2.3.2.4	Gelpermeationschromatographie	30
2.3.3	Chromatographie mit Zentrifugation	30
2.3.3.1	Zentrifugation	30
2.3.3.2	Anionentausch-Chromatographie	30
2.3.3.3	Hydrophobe Interaktionschromatographie	30
2.3.3.4	Anionentausch-Chromatographie	31
2.3.3.5	Gelpermeationschromatographie	31
2.4	Proteinanalytik	31
2.4.1	Proteinkonzentration	31
2.4.2	Aktivitätstest	31
2.4.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
2.4.4	Massenspektrometrie	32
2.4.4.1	ESI-Massenspektrometrie	32
2.4.4.2	MALDI-Massenspektrometrie	33
2.4.5	Dynamische Lichtstreuung	33
2.5	Proteinkristallisation	33
2.5.1	Allgemein	33
2.5.2	Impfkristallisation	34
2.5.3	Suche nach Schwermetallderivaten	35

2.6	Röntgendiffraktometrie	35
2.6.1	Kristallmontage	35
2.6.2	Diffractionsexperimente	36
2.6.2.1	Allgemein	36
2.6.2.2	Se-Met-D-Hyd	36
2.6.2.3	native D-Hyd, $C222_1$	37
2.6.2.4	native D-Hyd, $P2_12_12_1$	38
2.7	Datenreduktion	38
2.8	Strukturlösung und Modellbau der D-Hyd	39
2.8.1	Detektion von Derivaten	39
2.8.2	Selen-Substruktur	39
2.8.3	Dichtemodifikation	40
2.8.4	Modellbau und Verfeinerung	41
2.9	Strukturlösung der D-Hyd, $P2_12_12_1$	42
2.10	Strukturlösung der L-Hyd	43
2.10.1	Homology Modelling	43
2.10.2	Molekularer Ersatz	43
2.10.3	Modellbau und Verfeinerung	45
2.11	Validierung der Modelle	45
2.12	Substratmodellierung	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Sequenzierung	47
3.2	Aufreinigung	48
3.3	Proteinanalytik	51
3.3.1	SDS-Gelelektrophorese	51
3.3.2	Dynamische Lichtstreuung	52
3.3.3	MALDI-MS	52
3.3.4	ESI-MS	53
3.4	Kristallisation	54
3.5	Diffractionsmessungen	57
3.6	Rechnungen mit den nativen Datensätzen	61
3.6.1	Bestimmung der Raumgruppen	61

3.6.2	D-Hyd, $C222_1$	61
3.6.2.1	Kristallpackung	61
3.6.2.2	Selbstrotationsfunktion	62
3.6.3	D-Hyd, $P2_12_12_1$	64
3.6.4	L-Hyd	65
3.7	Strukturlösungen	66
3.7.1	D-Hyd, $C222_1$	66
3.7.1.1	Suche nach Derivaten	66
3.7.1.2	Se-Substruktur	66
3.7.1.3	Dichtemodifikation	66
3.7.1.4	automatischer Modellbau mit ARP/wARP	70
3.7.2	D-Hyd, $P2_12_12_1$	74
3.7.3	L-Hyd	74
3.8	Verfeinerungen	77
3.9	Qualität der Modelle	87
3.9.1	D-Hyd, $C222_1$	87
3.9.2	D-Hyd $P2_12_12_1$	88
3.9.3	L-Hyd, $P2_1$	89
4	Diskussion I — die Experimente	91
4.1	Sequenzierung und Homologien	91
4.2	Expression, Aufreinigung und Kristallisation	93
4.3	MAD	94
4.4	Strukturlösung und Modellbau	96
4.4.1	D-Hyd	96
4.4.1.1	Modellbau	96
4.4.1.2	Verfeinerung	96
4.4.1.3	Strahlungsschädigung	97
4.4.2	L-Hyd	99
5	Diskussion II — die Strukturen	101
5.1	Tertiärstruktur	101
5.1.1	D-Hyd	101

5.1.2	Vergleich der Monomere der D-Hyd	104
5.1.3	L-Hyd	106
5.1.4	Homologe Strukturen	108
5.2	Kristallkontakte	113
5.3	Quartärstruktur	114
5.3.1	D-Hyd	114
5.3.2	L-Hyd	117
5.3.3	Vergleiche mit homologen Strukturen	119
5.4	Aktives Zentrum	121
5.4.1	D-Hyd	121
5.4.2	L-Hyd	124
5.4.3	Das aktive Zentrum bei homologen Strukturen	125
5.4.4	Carboxylierung des Lysins im aktiven Zentrum	126
5.4.5	Das binukleare Metallzentrum	129
5.4.6	Weitere binukleare Zinkzentren	131
5.5	Substratbindung und Katalyse	134
5.5.1	Vergleich zur Urease	134
5.5.2	Substratbindung D-Hyd	136
5.5.3	Substratbindung L-Hyd	139
5.5.4	Vergleich der Hydantoinasen und deren natürliche Substrate	144
5.5.5	Katalytischer Mechanismus bei den Hydantoinasen	146
6	Zusammenfassung	149
7	Ausblick	153
A	Anhang	155
A.1	Sequenzierung der D-Hyd	155
A.2	Kristallisationsveröffentlichung	156
A.3	Kurzzusammenfassung	160
A.4	Abstract	161
A.5	Lebenslauf	162
A.6	Vorabveröffentlichungen	163
A.7	Vorträge	163

A.8 Posterbeiträge	164
A.9 Abbildungsverzeichnis	165
A.10 Tabellenverzeichnis	167
A.11 Literaturverzeichnis	169

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

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

Sonstige Abkürzungen

a, b, c	Gittervektoren im realen Raum
a.i.	absolute Intensität
Amp.	Ampicillin
Amp/LB	LB-Medium mit Ampicillin versetzt
AS	Aminosäure
ASU	asymmetrische Einheit der Elementarzelle eines Kristalls
au	<i>atomic units</i> in der Massenspektrometrie
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
Cu	Kupfer
CSD	Cambridge Structural Database
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
D-Hyd	D-Hydantoinase aus <i>Thermus sp.</i>
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>enzyme catalogue</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-di-Natriumsalz
EPE	PDB-Kürzel für HEPES
ESI	Elektrospray-Ionisation
F_c, F_{calc}	berechnete Strukturfaktoramplituden
F_o, F_{obs}	gemessene Strukturfaktoramplituden
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
I	Intensität
$\sigma(I)$	Standardabweichung der Intensität („Rauschen“)
IPTG	β -D-Thio-galakto-pyranosid
l	Liter
λ	Wellenlänge [nm] oder [Å]
LB	Luria broth (Nährmedium)

L-Hyd	L-Hydantoinase aus <i>Arthobacter aurescens</i> DSM 3745
m	Meter
M	molar
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption and ionization</i>
MD	Moleküldynamik
MIM	<i>mendelian inheritance in man</i>
min	Minute
mol	Teilchenzahl (1 mol $\hat{=}$ 6.023 · 10 ²³ Teilchen)
METH	Methyl-thioethyl-5'-hydantoin
NCS	<i>non crystallographic symmetry</i>
p.a.	<i>pro analysii</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTE	Phosphotriesterase
R_{free}	freier R-Wert
R_{work}	R-Wert des Arbeitsdatensatzes
R_{meas}	linearer R-Wert beim zusammenfassen von Röntgendatensätzen, der zusätzlich zum R_{merge} Redundanzen berücksichtigt
R_{merge}	linearer R-Wert beim zusammenfassen von Röntgendatensätzen
RMS	Standardabweichung (<i>root mean square</i>)
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UV	ultraviolettes Licht
V_M	Matthews-Koeffizient
v/v	Volumenprozent
w/v	Massenprozent

1 Einleitung

1.1 Hydantoinasen

1.1.1 Allgemeine Einteilung und Historie

Hydantoinasen gehören nach der EC-Nomenklatur zur Gruppe der zyklischen Amidasen (EC 3.5.2) und werden dort als Synonym für Dihydropyrimidinasen (EC 3.5.2.2) angesehen. Im allgemeinen Gebrauch ist die Nomenklatur häufig abhängig von der Herkunft des jeweiligen Enzyms (pro- oder eukaryotisch) oder vom Kontext, in dem das Enzym untersucht wird (biotechnologisch oder biochemisch/medizinisch). In der Literatur gibt es keinen eindeutigen Gebrauch des Begriffs *Hydantoinase* (Syldatk *et al.*, 1999) da es eine Reihe an Hydantoinderivaten gibt (s. Abbildung 1.1). Diese werden von Enzymen hydrolysiert, die teilweise den Dihydropyrimidinasen ähnlich (Allantoinasen EC 3.5.2.5, Dihydroorotasen EC 3.5.2.3, Ureasen EC 3.5.1.5) teilweise aber auch sehr unähnlich sind (Carboxymethylhydantoinase EC 3.5.2.4, Creatininase EC 3.5.2.10, ATP-abhängige N-Methylhydantoinase, Imidase, noch ohne EC-Nummer).

Im Folgenden werden unter dem Begriff *Hydantoinase* nach der traditionellen Nomenklatur ausschließlich Dihydropyrimidinase-ähnliche Enzyme verstanden.

Dihydropyrimidinasen katalysieren, wie in Abbildung 1.2 dargestellt, die reversible Hydrolyse von sechs- oder fünfgliedrigen zyklischen Diamiden wie Dihydropyrimidine oder Hydantoine zu den entsprechenden 3-Ureidosäuren oder Carbamoylaminosäuren.

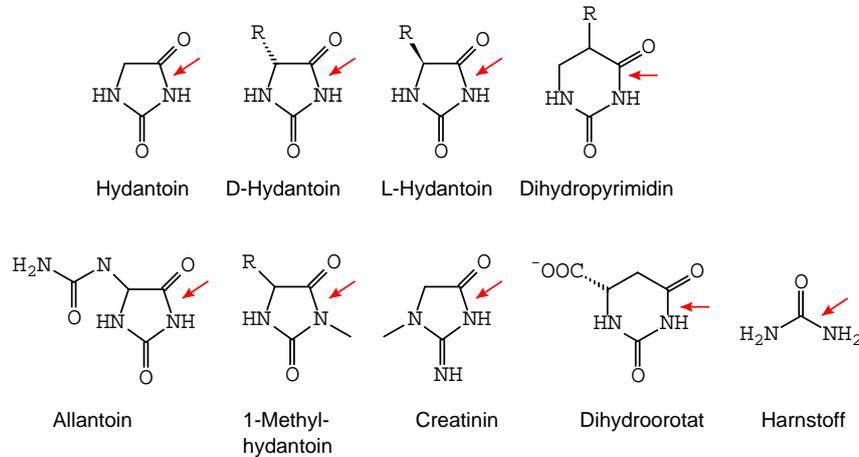


Abbildung 1.1: Hydantoin, Hydantoinderivate und Dihydropyrimidine als Substrate der verschiedenen Hydantoin-Hydrolasen. Der Pfeil markiert die Bindung, die durch die entsprechenden Enzyme hydrolysiert wird.

1.1.2 Physiologische Bedeutung

Die enzymatische Hydrolyse von Hydantoinen ist schon lange bekannt. Die ersten Hinweise gab es bereits in 20er Jahren (Gaebler & Keltch, 1926). Eine erste Charakterisierung des dafür verantwortlichen Enzyms in Gewebeschnitten (Bernheim & Bernheim, 1946) und in partiell gereinigter Form (Eadie *et al.*, 1949) stammt aus den 40er Jahren. Auch damals gab es verschiedene Nomenklaturen. In den ersten Berichten ist von *Hydantoinasen* die Rede, später wurden sie *Hydantoin-Peptidasen* genannt (Bernheim, 1952). Die Ähnlichkeit zu den *Hydropyrimidin-Hydrolasen* wurde erstmals von Wallach & Grisola (1957) vermutet.

Den Dihydropyrimidinasen wird als physiologische Funktion die Hydrolyse von Dihydropyrimidinen als zweiten Schritt im reduktiven Katabolismus von Pyrimidinen zugeordnet (s. Abb. 1.2, Vogels & Van der Drift, 1976). Die Produkte dieses Abbaus (z. B. β -Alanin als Abbauprodukt von Uracil oder β -Amino-isobutyrat als Abbauprodukt von Thymin) sind Neurotransmitter. Beeinflussungen in diesem Katabolismus durch schlecht exprimierte oder wenig

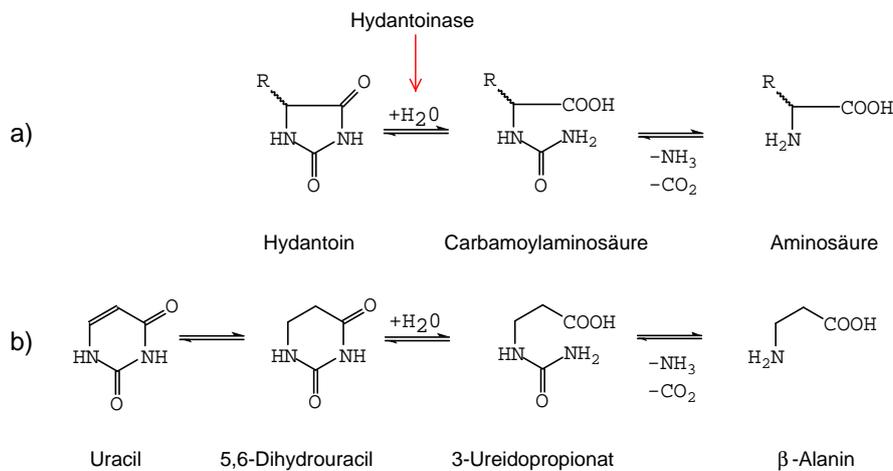


Abbildung 1.2: Reaktionen, die von Hydantoinasen katalysiert werden:

a) Hydrolyse von Hydantoinen im Hydantoinaseprozess,

b) Hydrolyse von Dihydropyrimidinen beim Metabolismus von Pyrimidinen.

aktive beteiligte Enzyme führen zu Störungen in den Konzentrationen dieser Neurotransmitter. Als Folge werden neurologische Schäden bei betroffenen Patienten beobachtet, wie z. B. bei der Dihydropyrimidinuria (MIM 222748, [van Gennip *et al.*, 1997](#); [Hamajima *et al.*, 1998](#); [Sumi *et al.*, 1998](#)). In festen Tumoren wurde darüberhinaus eine erhöhte Dihydropyrimidinaseaktivität festgestellt ([Naguib *et al.*, 1985](#)).

1.1.3 Biotechnologische Bedeutung

Weitaus größere Bedeutung als in der biochemisch/medizinischen Forschung haben die Dihydropyrimidinasen in der Biotechnologie. Da die Dihydropyrimidinasen auch 5'-substituierte Hydantoine hydrolysieren, werden sie im Hydantoinaseprozess zusammen mit N-Carbamoylasen eingesetzt zur Herstellung enantiomerenreiner auch nicht-proteinogener Aminosäuren ([Syldatk & Pietzsch, 1995](#), s. [Abbildung 1.3](#)). Bei Verwendung von zwei Enzymen (Hydantoinase und Carbamolyase) wird eine hohe Enantio- und Stereospezifität erreicht. Durch die

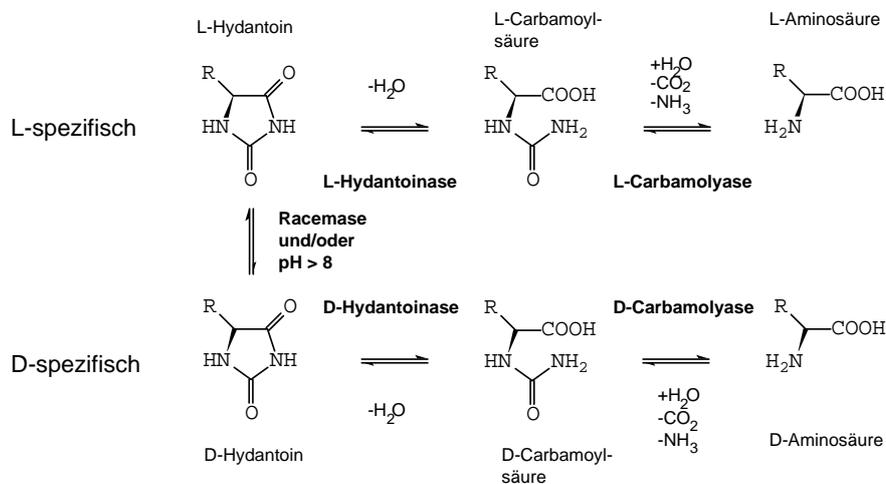


Abbildung 1.3: Der Hydantoinaseprozess zur enantiospezifischen Produktion von D- oder L-Aminosäuren. Die dabei verwendeten Enzyme sind fett gedruckt.

spontane oder enzymatisch katalysierte Racemisierung des Edukts (Racemase) kann ein racemisches Edukt vollständig in ein enantiomerenreines Produkt umgesetzt werden.

Hydantoinase, Carbamolyase und Racemase wurden zum Beispiel bei *Arthrobacter aurescens* innerhalb eines Genclusters gefunden (Wiese *et al.*, 2000), was auf eine gemeinsame natürliche Funktion hinweisen könnte.

Enantiomerenreine D-Aminosäuren sind wertvolle chirale Synthone bei der Synthese von Antibiotika (D-*p*-Hydroxyphenyl-glycin), Pharmazeutika (D-Naphthylphenyl-glycin), Pestiziden (D-Valin), Süßstoffen (D-Alanin) und biologisch aktiven Peptiden (Durham & Weber, 1996). Insbesondere D-*p*-Hydroxyphenyl-glycin ist von wirtschaftlicher Bedeutung, von dem mehr als 1000 t pro Jahr über den Hydantoinaseprozess hergestellt werden.

Beim Screening nach Enzymen, die für die technische Nutzung sinnvoll sind, stand neben der Substrat- und Enantiospezifität auch eine hohe Thermostabilität im Vordergrund. Die meisten Hydantoinasen sind vorwiegend D-spezifisch.

Die Enantiospezifität ist jedoch abhängig vom Substrat. Aufgrund der Enantiospezifität der wichtigsten Substrate werden die Hydantoinasen traditionell in D- und L-Hydantoinasen eingeteilt. Wegen der Substratabhängigkeit der Enantiospezifität und der hohen Homologie innerhalb der Hydantoinasen wird diese Klassifizierung jedoch immer mehr in Frage gestellt.

Bei der biochemischen Charakterisierung der Dihydropyrimidinasen (Review: [Syldatk et al., 1999](#)) standen vor allem biotechnologisch relevante Aspekte im Vordergrund wie zum Beispiel Substrat- und Enantiospezifitäten oder Optimierungen von Umsatzraten und Fermentationen.

Die meisten Dihydropyrimidinasen werden in der Literatur als Homotetramere beschrieben mit Untereinheiten von je 50–60 kDa. Eine der wenigen Ausnahmen ist die Dihydropyrimidinase aus *Bacillus stearothermophilus* ([Lee et al., 1995](#)), die als Dimer beschrieben wird.

Die Dihydropyrimidinasen sind metallabhängige Enzyme. Das am häufigsten beschriebene Metall ist Zink, jedoch wurden auch Aktivitäten mit Mangan, Cobalt, Magnesium und Nickel beobachtet. Über die Anzahl der Metalle pro Untereinheit schwanken die Angaben zwischen 1–2.5 Metallionen/Untereinheit. Das Metall lässt sich im Allgemeinen mit EDTA nur schwer entfernen, häufig wird dafür 8-Hydroxy-chinolin-sulfonsäure verwendet. Die metallfreien Enzyme können häufig durch Inkubation mit Metallen reaktiviert werden. Vorzugsweise funktioniert dies mit Cobalt und Mangan, weniger gut mit Zink.

1.1.4 Homologe Proteine

Dihydropyrimidinasen haben untereinander Sequenzidentitäten von meistens über 30%. Die Sequenzidentität zu anderen zyklischen Amidasen ist ebenfalls hoch: 30% zu Allantoinasen, > 25% zu Dihydroorotasen und 20% zu Ureasen. Eine von der Proteinfunktion gesehen unerwartet hohe Sequenzidentität von über 30% besteht zum *collapsin response mediator*-Protein (CRMP) und dem

turned on after division-Protein (TOAD, Hamajima *et al.*, 1996), die beide bei der Entwicklung des Nervensystems beteiligt sind und keine katalytische Aktivität besitzen.

Die Röntgenstrukturen der Ureasen aus *Klebsiella aerogenes* (Jabri *et al.*, 1995) *Bacillus pasteurii* (Benini *et al.*, 1998, 1999) sind unter den bislang gelösten Strukturen am nächsten mit den Hydantoinasen verwandt. Die Strukturen bestehen aus einem zentralen elliptisch verzerrten $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel und einer β -Faltblatt-Domäne. Eine genauere Beschreibung des aktiven Zentrums der Ureasen befindet sich in Kap. 5.4.3 beim Vergleich der aktiven Zentren.

Basierend auf der Struktur der Urease aus *Klebsiella aerogenes* und Sequenzvergleichen schlugen Holm und Sander (Holm & Sander, 1997) eine große Proteingruppe vor, zu der neben Dihydroorotasen, Allantoinasen und Hydantoinasen auch AMP-, Adenin- und Cytosin-Deaminasen, Imidazolonepropionasen, Aryldialkylphosphatasen, Chlorohydrolasen, Formylmethanofuran-Dehydrogenasen und die angesprochenen CRMP und TOAD gehören. Diese Proteine stammen aus Archeons, Eubakterien und Eukaryonten und haben teilweise ähnliche, aber auch vollkommen verschiedene Funktionen. Bei den katalytisch nicht aktiven Mitgliedern dieser Gruppe sind die ansonsten hoch konservierten metallbindenden Histidine (s. Kap. 5.4.3) nur teilweise vorhanden. Aus Struktur- und Sequenzvergleichen (Holm & Sander, 1997) und phylogenetischen Studien (May *et al.*, 1998a) wurde gefolgert, dass all diese Proteine von einem gemeinsamen Ur-Protein abstammen und das Ergebnis einer divergenten Evolution sind.

1.1.5 Kristallisation

Die ersten Berichte über kristalline Dihydropyrimidinasen sind aus den 70er Jahren bekannt (Takahashi *et al.*, 1978; Takahashi, 1983; Elard *et al.*, 1987). Trotz eines gemessenen nativen Datensatzes (May *et al.*, 1996) und der Ankündigung einer Strukturlösung (Kim & Kim, 1998) war bis zu Beginn dieser Arbeit keine

Struktur einer Dihydropyrimidinase bekannt.

1.1.6 Die D-Hydantoinase aus *Thermus sp.*

Die D-Hydantoinase aus *Thermus sp.* (D-Hyd) stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Das Enzym wurde von der BASF AG (Ludwigshafen) bei Suche nach thermostabilen hydantoin-spaltenden Enzymen isoliert (Elard *et al.*, 1987). Es wird zur Zeit von Roche Diagnostics (Penzberg) unter dem Produktnamen Hydantoinase 2 vertrieben. Das Enzym ist mit Ausnahme der Substrat- und Enantiospezifität (Keil *et al.*, 1995) nur wenig charakterisiert. Es bevorzugt phenylisch substituierte Hydantoine wie D-5'-Phenyl- und D-5'-Thienyl-Hydantoin mit einer hohen D-Enantiospezifität. Die Enantiospezifität bei mit kleinen aliphatischen Seitenketten substituierten Hydantoinen (5'-Methyl-Hydantoin) ist deutlich geringer. CD-Untersuchungen zeigen, dass die D-Hyd einen deutlichen α -helicalen Anteil hat (Abendroth, 1998).

1.1.7 Die L-Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens*

Die L-Hydantoinase (L-Hyd) wurde von May *et al.* aus dem Bodenbakterium *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 isoliert und aufgereinigt (May *et al.*, 1998b). Die Expression wurde durch Zugabe von N-3-Indolyl-methyl-hydantoin induziert. Die L-Hydantoinase bevorzugt unter den untersuchten Substraten benzylisch substituierte Hydantoine wie 5'-L-Indolyl-methyl-hydantoin mit einer hohen L-Spezifität. Die Enantiospezifität ist substratabhängig. So wird von Methyl-thioethyl-hydantoin das D-Enantiomer leicht bevorzugt umgesetzt. Mögliche natürliche Substrate wie Dihydrothymin, Dihydrouracil, Dihydrorotat, Allantoin oder Harnstoff werden kaum oder gar nicht hydrolysiert (May *et al.*, 1998b). Wegen der teilweisen L-Spezifität wird das Enzym traditionell in die Gruppe der L-Hydantoinasen eingestuft. Phylogenetische Studien (May *et al.*, 1998a) zeigten zwar eine enge Verwandtschaft zwischen der L-Hyd und den Dihydropyrimidinasen. Die L-Hyd hat sich demnach jedoch sehr früh in der

Evolution von den übrigen untersuchen Dihydropyrimidinasen getrennt und bildet eine eigene Gruppe.

Die bei der Beschreibung des Hydantoinase-Prozesses angesprochenen Racemase und L-N-Carbamoylase befinden sich bei *Arthrobacter aurescens* zusammen mit der L-Hyd in einem Gencluster (Wiese *et al.*, 2000). Die Racemase liegt *upstream*, die L-N-Carbamoylase *downstream*. Dies weist auf eine mögliche gemeinsame natürliche Funktion hin.

Die L-Hyd besteht aus 458 Residuen pro Monomer und bildet in der nativen Form ein Tetramer (May *et al.*, 1998b). Es ist ein zinkabhängiges Enzym. Pro Tetramer wurden 10 Zinkatome mittels Atomabsorptionsspektroskopie gemessen (May *et al.*, 1998d). Durch chemische Modifikation der zugänglichen Histidine wird die L-Hyd irreversibel, durch Entfernung des Zinks mit Komplexbildnern reversibel inaktiviert. Metallfreie L-Hyd kann durch Inkubation mit Mangan und Cobalt reaktiviert werden. Da Deaktivierung des Enzyms durch Entfernung des Metalls mit einem Zerfall des Tetramers in Monomere einhergeht, wurden dem Zink sowohl eine katalytische als auch eine strukturelle Funktion zugewiesen (May *et al.*, 1998c).

Die L-Hyd konnte kristallisiert und von den Kristallen ein Diffraktionsdatensatz mit Daten bis 2.6 Å Auflösung gemessen werden (May *et al.*, 1996). Wegen der beschränkten Sequenzidentität zur Urease aus *Klebsiella aerogenes* (20%) waren die Suchen zum Molekularen Ersatz trotz der vorhergesagten strukturellen Homologie nicht erfolgreich.

1.2 Spezielle kristallographische Kapitel

Die theoretischen und methodischen Grundlagen der Proteinkristallographie sind in etlichen Standardwerken (zum Beispiel [Blundell & Johnson, 1976](#); [Shnureli, 1996](#); [Ducruix & Giege, 1999](#)) bereits umfassend beschrieben und diskutiert worden. Deshalb möchte ich an dieser Stelle mit der MAD-Phasierung und dem automatischen Modellbau nur zwei Aspekte anreißen, die mit dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe erstmals angewendet wurden.

1.2.1 Strukturlösung und Phasierung

Die Elektronendichte ist für den Kristallographen der entscheidende Leitfaden im direkten Raum zur Modellierung von Strukturen. Das Diffraktionsmuster und die Elektronendichte stehen durch die Fouriertransformation (s. Abbildung 1.4) im folgenden Zusammenhang:

$$\underbrace{\rho(xyz)}_{\text{Elektronendichte}} = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l=-\infty}^{\infty} \underbrace{F_{hkl}}_{\text{Amplitude}} \cdot \underbrace{e^{i\alpha_{hkl}}}_{\text{Phase}} \cdot \underbrace{e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}}_{\text{Basisfunktion}} \quad (1.1)$$

Die Strukturfaktoramplituden F_{hkl} lassen sich direkt aus den Diffraktionsmessungen bestimmen und den Gitterpunkten hkl zuordnen, während sich die Phaseninformation α_{hkl} nicht detektieren lässt. Dies stellt das kristallographische Phasenproblem dar. Folgende Verfahren zur experimentellen und rechnerischen Ermittlung der Phasen stehen generell zur Verfügung, wobei sich die einzelnen Verfahren gegenseitig ergänzen können:

Beim *multiplen isomorphen Ersatz* (MIR), dem traditionell am häufigsten verwendeten Verfahren, werden neben nativen Kristallen isomorphe Kristalle gemessen, die mit schweren Atomen (Schwermetalle, Halogenide, Edelgase) derivatisiert worden sind. Aus den isomorphen Differenzen zwischen den Strukturfaktoramplituden des nativen und eines Derivatdatensatzes lassen sich über Pattersonfunktionen die Lagen der Schweratome bestimmen. Aus diesen Positionen können dann die ersten Phasen berechnet werden. Da bei der Verwendung von isomorphen Differenzen von *einem* Derivat für jeden Reflex

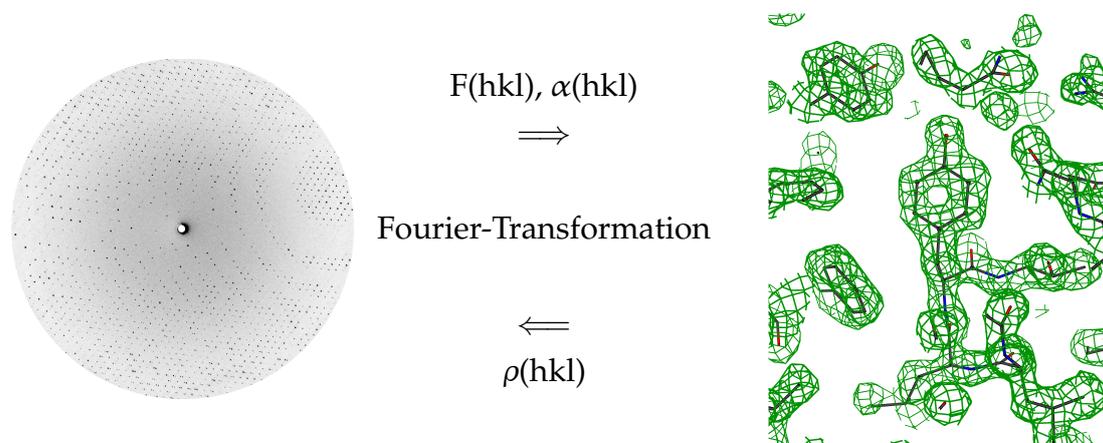


Abbildung 1.4: Schematischer Zusammenhang zwischen Röntgenbeugung und Elektronendichte über die Fourier-Transformation. Für die Berechnung der Elektronendichte sind sowohl die Strukturfaktoramplituden $F(hkl)$ als auch die Phasen $\alpha(hkl)$ nötig (Phasenproblem).

zwei Phasenwinkel möglich sind, die sich zunächst einmal nicht trennen lassen (Phasenambiguität), sind mindestens Derivate oder die Messung von anomalen Differenzen notwendig.

Beim *molekularen Ersatz* werden die ersten Phaseninformationen aus einem strukturell ähnlichen Protein gewonnen. Durch Patterson-Suchrechnungen muss das Modell so in der Einheitszelle orientiert werden wie das Protein in der zu lösenden Kristallstruktur. Wegen der Größe des Suchraums werden meistens die Translations- und Rotationsrechnungen separiert. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass bei einer Sequenzidentität von ca. 30% eine vergleichbare Faltung vorliegt und sich das Modell verwenden lassen sollte. Als Obergrenze für mittlere Abweichungen von äquivalenten $C\alpha$ -Atomen zwischen Modell und zu lösender Struktur wird 1-1.5Å angenommen.

Bei den in der Kleinmolekülkristallographie üblichen *direkten Methoden* werden strukturinvariante Phasenbeziehungen verwendet, um aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden die Phasen direkt berechnen zu können. Dafür ist eine hohe Überbestimmung der gemessenen Daten im Vergleich zu den zu bestimm-

menden Parametern notwendig, die erst bei atomaren Auflösungen erreicht wird. Auf Grund der begrenzten Streufähigkeit von Proteinkristallen ist dies in den meisten Fällen nicht gegeben. Deshalb lassen sich die direkten Methoden nur bei kleinen Proteinen anwenden (Uson & Sheldrick, 1999). Als ein Grenzfall des derzeit möglichen ist die Strukturlösung von triklinem Lysozym (1001 nicht-Wasserstoff-Atome und ca. 200 gebundene Wasser) bei 0.85 Å Auflösung (Deacon *et al.*, 1998) mit dem Programm SnB (Weeks & Miller, 1999) anzusehen. Wenn schwere Atome im Protein vorhanden sind, können auch noch größere Strukturen mit den direkten Methoden berechnet werden. Beispiele dafür sind die Lösung der Strukturen von Cytochrom c_3 bei 1.2Å Auflösung (2024 nicht-Wasserstoff-Atome, 8 Eisen, Frazao *et al.*, 1999) oder von OppA bei 1.2Å Auflösung (4189 nicht-Wasserstoff-Atome, 1 Uran, Tame, 2000).

1.2.2 MAD-Phasierung

Anomale Streuung tritt bei Kristallen im Röntgenstrahl dann auf, wenn die Energie der Röntgenstrahlung in der Nähe der Absorptionskanten der im Kristall vorhandenen *anormalen Streuer* liegt. Die atomaren streuwinkelabhängigen Streufaktoren ($f^0(\theta)$) der betreffenden Atome werden in solchen Fällen durch wellenlängenabhängige Terme modifiziert:

$$f = f^0(\theta) + \Delta f'(\lambda) + i\Delta f''(\lambda) \quad (1.2)$$

Die anomalen Beiträge $i\Delta f''(\lambda)$ führen zu den Bijvoet-Differenzen, so dass die Friedel-Paare nicht mehr die selben Strukturfaktoramplituden haben ($F_{hkl} \neq F_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}$). Die dispersiven Beiträge $\Delta f'(\lambda)$ führen zu Unterschieden zwischen Datensätzen, die bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen wurden.

Die verwendbare Röntgenstrahlung von durchstimmbaren Synchrotrons liegt im Bereich zwischen ca. 0.6–2Å. Eine Absorptionskante einer Vielzahl von Metallen liegt in diesem Bereich. Weiterin können Nichtmetalle wie Selen oder Brom in MAD-Experimenten verwendet werden (Hendrickson & Ogata, 1997; Pappa *et al.*, 1996). In Einzelfällen konnten sogar die schwachen anomalen Beiträge

von Schwefel (K-Kante: 5.016 Å) bei Cu-K_α-Strahlung (1.54178Å) erfolgreich zur Strukturlösung kleinerer Proteine wie Cambrin (5 kDa, [Hendrickson & Teeter, 1981](#)) oder Lysozym (14 kDa, [Dauter et al., 1999](#)) verwendet werden.

Selen ist trotz relativ kleiner anomaler und dispersiver Streubeiträge ($\Delta f'_{max.}=7.5e^-$ und $\Delta f''=6.0e^-$, K-Kante bei 0.979 Å) der beliebteste anomale Streuer ([Ogata, 1998](#); [Walsh et al., 1999](#)) Durch Proteinexpression in methionin-auxotrophen Organismen oder durch Inhibition des Methionin-Anabolismus unter Zugabe von Seleno-Methionin lassen sich gezielt Seleno-Methionin-Derivate produzieren ([Hendrickson et al., 1990](#); [Doublié, 1997](#)).

Für die Phasierung mit MAD-Daten gibt es zwei generelle Wege: Nach dem klassischen algebraischen Formalismus von Hendrickson ([Hendrickson & Ogata, 1997](#)) werden wellenlängen-abhängige Terme von wellenlängen-unabhängigen Termen separiert. Dieses Verfahren ist im Programm MADSYS ([Hendrickson et al., 1988](#)) realisiert. Eine andere Vorgehensweise ([Phillips & Hodgson, 1980](#); [Ramakrishnan & Biou, 1997](#)) ist die Behandlung der MAD-Daten als Sonderfall der MIR-Phasierung mit anomalen Beiträgen. Diese Vorgehensweise wird in fast allen anderen gebräuchlichen Phasierungsprogrammen angewendet und ist derzeit das übliche Verfahren.

Prinzipiell reichen die Phaseninformationen von zwei Wellenlängen zur eindeutigen Phasierung aus. Es werden jedoch häufig mehrere Wellenlängen gemessen, da durch eine Überbestimmung der Gleichungssysteme die Qualität der erhaltenen Phasen steigt. Die verwendeten Wellenlängen werden so ausgewählt, dass die anomalen und dispersiven Differenzen maximal werden. Diese lassen sich durch Röntgen-Fluoreszenzspektren ermitteln. Im klassischen MAD-Experiment werden mehrere Datensätze gemessen: Zwei Datensätze bei Wellenlängen in der Nähe der Absorptionskante, die *peak*-Wellenlänge mit maximalem $\Delta f''$ und die *inflection*-Wellenlänge mit minimalem $\Delta f'$, und ein oder mehrere Datensätze bei Wellenlängen entfernt von der Absorptionskante (*remote* Wellenlänge).

Aktuelle Arbeiten im Bereich der MAD-Phasierung beschäftigen sich damit, ob auch mit MAD-Datensätzen bei einer oder zwei Wellenlängen ähnlich gute Phasen ermittelt werden können als bei drei Wellenlängen. [Gonzalez et al. \(1999\)](#) zeigten, dass die Qualität der Phasen bei der Verwendung von nur zwei Wellenlängen vergleichbar ist mit den Phasen, die aus drei oder vier Wellenlängen berechnet wurden. Dies war insbesondere dann der Fall, wenn durch Wahl der Wellenlängen die dispersiven Differenzen maximiert wurden. In einigen Fällen ([Rice et al., 2000](#)) hat sich auch die Verwendung von nur einer Wellenlänge (SAD) als für die Strukturlösung ausreichend erwiesen. Die dabei auftretende Phasenambiguität kann durch Anwendung von statistischen Methoden gelöst werden ([Yu-dong et al., 1999](#); [Gu et al., 2001](#)). Die sehr effektiven Techniken der Dichtemodifikation unterstützen dies ([Kleywegt & Read, 1997](#)).

Da die anomalen und dispersiven Differenzen bei MAD-Messungen deutlich geringer sind als die isomorphen Differenzen beim multiplen isomorphen Ersatz, sind spezielle experimentelle Techniken wie Tieftemperatur-Messungen an *einem* Kristall ([Garman & Schneider, 1997](#)) und die zeitlich nahe Messung von Friedel-Paaren (*inverse beam*-Messung) nötig oder sinnvoll.

Wie beim isomorphen Ersatz lassen sich die Positionen der anomalen Streuer durch Auswertung von anomalen und dispersiven Patterson-Maps bestimmen. Bei der Strukturlösung großer Proteine oder von Proteinen mit mehreren Protomeren in der asymmetrischen Einheit steigt die Anzahl der anomalen Streuer. Die Anzahl der Peaks in den Patterson-Maps steigt mit $n^2 - n$. Bei größeren Substrukturen lassen sich die Patterson-Maps nicht mehr einfach manuell auswerten. In den letzten Jahren sind jedoch mit Hilfe von speziellen Programmen Selen-Substrukturen von bis zu 70 Positionen ([Deacon et al., 2000](#); [Deacon & Ealick, 1999](#)) gelöst werden. Generell werden bei diesen Programmen zwei verschiedene Strategien angewendet: Die Suchen bei SOLVE ([Terwilliger & Berendzen, 1999](#)) und CNS ([Grosse-Kunstleve & Brunger, 1999](#)) beruhen auf erweitereten Patterson-Suchen, während SnB ([Weeks & Miller, 1999](#)) und SHELXD ([Uson & Sheldrick, 1999](#)) auf direkten Methoden unter Verwendung des *Shake-and-bake* Algorithmus beruhen.

1.2.3 Automatischer Modellbau

Während der Strukturlösung von Proteinen gibt es eine Reihe von entscheidenden Schritten, die den Fortschritt in einem Projekt beeinflussen. Dazu gehören neben den biochemischen Schlüsselschritten wie Klonierung, Expression und homogene Aufarbeitung, der Kristallisation, der Datensammlung und der Phasierung schließlich auch der Bau und die Verfeinerung des Modells. In Zeiten der *post genome*-Ära und der *structural genomics*, die einen hohen Durchsatz von Projekten erfordern, gibt es vielfältige Bestrebungen zur weitgehenden Automatisierung möglichst vieler dieser Schritte.

Es gibt eine Vielzahl an Beispielen in dieser Arbeit, bei denen zu unterschiedlichen Ausmaßen automatisierte Vorgehensweisen Anwendung fanden. Dazu zählen im Labor computergesteuerte Chromatographie-, Elektrophorese-, PCR-Geräte und Röntgenmessplätze. Bei der Auswertung der Röntgendaten wurden automatisierte Verfahren angewendet, zum Beispiel bei der Suche von anomalen Streuern bei der MAD-Phasierung (SOLVE) oder bei der Bestimmung von biologisch und kristallographisch sinnvoll gebundenem Wasser in Proteinstrukturen (CNS, ARP).

Da auch der Bau und die Verfeinerung des Strukturmodells insbesondere bei *de novo*-Strukturen sehr zeitaufwendig sind, gibt es auch hier seit etlichen Jahren Bestrebungen für eine Automatisierung (Wang, 2000). Erste Ansätze war die auch in dieser Arbeit verwendete Skeletonisierung (Greer, 1974), bei der der Pfad der höchsten Elektronendichte gesucht wird. Die *warpNtrace*-Routine des Programmpakets ARP (automated refinement procedure) ist eine weiterführende Bestrebung, Modellbau und Verfeinerung miteinander zu kombinieren (Perrakis *et al.*, 1999).

Die generelle Vorgehensweise eines *warpNtrace*-Laufs ist in Abbildung 1.5 dargestellt: Aus den experimentellen Phasen, die gegebenenfalls durch Dichtemodifikationstechniken verbessert worden sind (Kleywegt & Read, 1997; Perrakis *et al.*, 1997), und den Diffraktionsdaten wird eine Elektronendichte

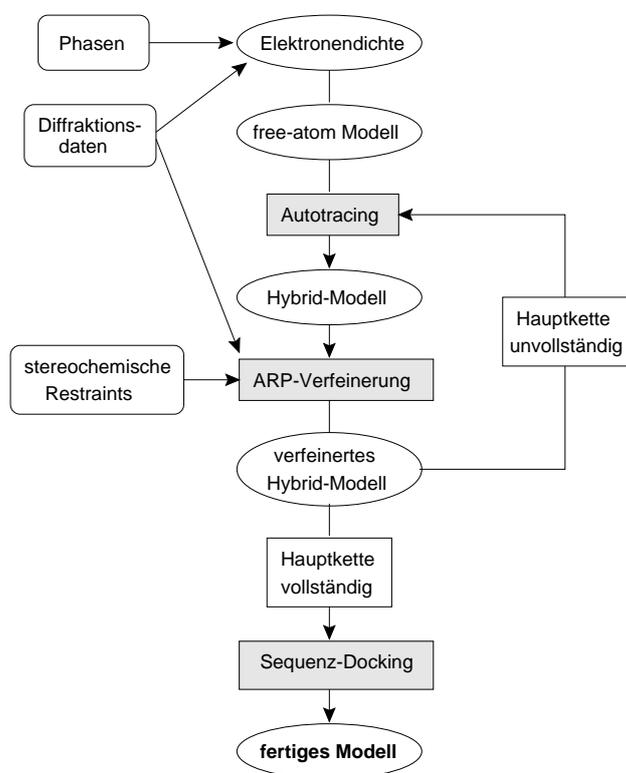


Abbildung 1.5: Fließschema zur automatischen Modellbau- und Verfeinerungsprozedur nach dem *warpNtrace*-Verfahren. Die Schlüsselschritte von ARP sind grau unterlegt. Diagramm nach Perrakis *et al.* (1999).

berechnet. Diese wird zunächst mit einem Modell interpretiert, das aus freien voneinander unabhängigen Atomen besteht. Im *autotracing*-Schritt werden nun peptidähnliche Konnektivitäten zwischen den freien Atomen gesucht und somit Kettenstücke erstellt. Das nun entstandene Hybrid-Modell, das aus freien Atomen und einem partiellen Proteinmodell besteht, wird unter Beachtung stereochemischer Zwänge verfeinert. Die Verwendung des Hybrid-Modells hat den Vorteil, dass in die Verfeinerung sowohl schon interpretierte Modellbereiche als auch noch uninterpretierte Bereiche mit prominenter Elektronendichte einbezogen werden. Dadurch wird die Elektronendichte deutlich besser beschrieben als nur durch die bereits interpretierten Bereiche. Die Modellbau- und Verfeinerungsschritte mit dem Hybrid-Modell werden in

mehreren Zyklen gerechnet. Beim Hybrid-Modell werden nur wenige Typen von Aminosäuren verwendet (Gly: klein, Ala: mittelgroß, Ser: größer und unverzweigt und Val: größer und verzweigt), die dann beim *Sequenz-Docking* der vorgegebenen Sequenz zugeordnet werden. In der aktuellen Version von ARP (5.1) kann dieser Schritt auch schon parallel in den Modellbausritten erfolgen. Ein Beispiel für den Fortschritt einer automatischen Proteinmodellierung ist in Kapitel [3.7.1.4](#) für die D-Hyd gegeben.

Generell wird derzeit davon ausgegangen ([Perrakis et al., 1999](#)), dass für dieses Verfahren bei *de novo* Strukturen die zu verfeinernden Atome sechsfach durch Röntgenreflexe überbestimmt sein müssen, was etwa einer Auflösung von 2.3Å entspricht. Bislang konnten somit Strukturen bis zu über 1500 Residuen automatisch modelliert werden.

1.3 Zielsetzung

Die Aufgabenstellung der Arbeit war die röntgenkristallographische Untersuchung von bakteriellen Hydantoinasen. Auf Grund der vielen Nadelöre und geschwindigkeitsbestimmenden Schritte während einer Strukturaufklärung ließ sich das genaue Ziel zu Beginn der Arbeit nur schwer definieren.

Von der **D-Hydantoinase aus *Thermus sp.*** war ein erstes Aufreinigungsschema bekannt. Zu Beginn der Arbeit stand eine große Menge der kommerziell erhältlichen Enzyms (D-Hydantoinase 2, Roche Diagnostics, Penzberg) zu Verfügung, im Laufe der Arbeit wurde uns auch das Plasmid überlassen. Eine erste Kristallisationsbedingung war aus meiner Diplomarbeit bekannt ([Abendroth, 1998](#)).

Von der **L-Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens*** gab es zu Beginn der Arbeit ein publiziertes Aufreinigungsprotokoll ([May et al., 1998b](#)) und eine publizierte Kristallisationsbedingung. Von diesen Kristallen war ein Diffraktionsdatensatz mit Daten bis 2.6Å Auflösung gemessen worden ([May et al., 1996](#)). Protein wurde in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Sylđatk am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart fermentiert und aufgearbeitet. Mit dem vorhandenen Datensatz waren Rechnungen zum Molekularen Erstatz unter Verwendung der α -Untereinheit der Urease aus *Klebsiella aerogenes* bis dahin nicht erfolgreich.

Während der Arbeit sollten nun eine oder beide Strukturen gelöst werden. Da kein hinreichend homologes Modell vorhanden war, musste die erste Struktur *de novo* gelöst werden. Von der zweiten Struktur konnte man erwarten, dass sie mittels Molekularen Ersatzes unter Verwendung der ersten Struktur als Modell lösbar wäre.

Da bislang noch keine Röntgenstruktur der Dihydropyrimidinasen bekannt war, sollte die Struktur zunächst einmal Informationen über die generelle Faltung dieser Enzyme und den Aufbau des aktiven Zentrums liefern.

Darüberhinaus konnte man erhoffen, dass sich aus den Strukturen Hinweise für eine Begründung der unterschiedlichen Substrat- und Enantiospezifität der beiden Enzyme ergeben könnten.

2 Experimenteller Teil

2.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und EDV-Systeme

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten *p.a.*-Qualität und wurden von den Herstellern Biomol, Fluka, Merck und Sigma bezogen. Das Wasser wurde in einer Reinstwasseranlage aufbereitet und hatte eine Leitfähigkeit von $\Omega^{-1} \leq 50 \mu\text{m} \cdot \text{cm}^{-1}$. Sämtliche Lösungen wurden durch eine $0.2 \mu\text{m}$ -Membran filtriert.

2.1.2 Materialien, Geräte und EDV-Systeme

Die wichtigsten Materialien und Geräte sind in den Tabellen [2.1](#), [2.3](#) und zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Chromatographiesysteme	
Äkta Explorer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
FPLC-System	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Cryostream Cooler	Oxford Cryosystems, Oxford, England
DNA-Sequenzierung	
ABIPRISM 310	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Drehanoden (Cu)	
FR 591	Nonius, Delft, Niederlande
Rotaflex RU-200 B	Rigaku, Düsseldorf

Dynamische Lichtstreuung	
DynaPro-801	Protein Solutions, Charlottesville VA, USA
EDV-Systeme	
Indigo2 mit Irix 6.5	Silicon Graphics, München
Octane mit Irix 6.5	Silicon Graphics, München
O2 mit Irix 6.5	Silicon Graphics, München
PC mit RedHat Linux 6.2	SL Datentechnik, Köln
Flächenzähler	
DIP-2030H	MAC Science, Yokohama, Japan
MAR 300 und 345	MAR Research, Norderstedt
French Press Aminco mit FA-030	SLM-Instruments, Rochester, USA
Massenspektrometrie	
ESI-MS LCQ (T)	Finnigan MAT, Bremen
MALDI-MS Biflex III (TOF)	Bruker, Bremen
Mikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Monochromatoren	
MAC-XOS Doppelspiegel	MAC Science, Yokohama, Japan
PCR Mastercycler 5330	Eppendorf, Hamburg
Nucleobond	Macherey und Nagel, Düren
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Phast Elektrophoresesystem	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Reinstwasseranlage	Serlapur
Spektralphotometer Ultrospec 2000	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Spiegelreflexkamera EOS 500N	Canon, Tokyo, Japan
Waagen	
Analysenwaage FA-210-4	Faust, Köln
Laborwaage SBA 52	Scaltec, Heiligenstadt
Zentrifugen	
RC 3B Plus und RC 5B Plus	Sorvall, Newtown CT, USA
5417 C und 5810 R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 2.3: Sonstige Materialien.

Bezeichnung	Hersteller
BCA Proteinassay	Pierce, Rockford IL, USA
Bradford Proteinassay	BioRad, München
capillary wachs	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
Celluloseacetatfilter 0.2 μm	Sartorius, Göttingen
Celluloseacetatfilter 0.02 μm	Whatman, Maidstone, England
Chromatographie-Säulen und -materialien	
STREAMLINE Phenyl	Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden
STREAMLINE Q-XL	Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden
MonoQ HR 5/5 und 10/10	Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden
Phenyl Sepharose CL-4B	Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden
Superdex 200 HR 10/60	Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden
Nucleobond AX100-Säulen	Macherey-Nagel, Düren
Cryoloops	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
sonstige Cryowerkzeuge	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
Gelelektrophorese	
PhastGel Gradient 8-25%	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Goniometerköpfe	Stoe, Darmstadt
Knetgummi	Polo, Köln
Linbro-Schalen	Hampton Research, Laguna Niguel, USA und ICN, Eschwege
Markröhrchen (0.1–1 mm \varnothing)	Hilgenfeld, Malsfeld
Ultrafiltration	
Centricon-10 und -30	Millipore, Eschborn
Centriprep-10, -30 und -50	Millipore, Eschborn

Tabelle 2.4: Computerprogramme

Programm (-Paket)	Referenz
Kristallographie	
CCP4-suite	CCP4 (1994)
CHOOCH	Evans & Pettifer (2001)
CNS-suite	Brunger <i>et al.</i> (1998)
HKL-suite	Otwinowski & Minor (1997)
REPLACE	Tong & Rossmann (1997)
SOLVE	Terwilliger & Berendzen (1999)
Grapikprogramme	
O	Jones <i>et al.</i> (1991)
BRAGI	Schomburg & Reichelt (1988)
Auswertung von Röntgenstrukturen	
CCP4-suite	CCP4 (1994)
DSSP	Kabsch & Sander (1983)
ProFit	McLachlan (1982)
TOPS	Westhead <i>et al.</i> (1999)
Darstellung von Proteinstrukturen und Elektronendichten	
BOBSRIPT	Esnouf (1997)
MOLSCRIPT	Kraulis (1991)
RASTER3D	Merritt & Cacon (1997)
Bild-, Tabellen- und Textbearbeitung	
GNUPLOT	Williams & Kelley (1996)
XFIG	Sutanthavibul (1985)
L ^A T _E X	Lamport (1985)

2.2 Molekularbiologie, Sequenzierung und Proteinexpression

2.2.1 Mikroorganismen und Medien

Mikroorganismen

<i>E. coli</i> DH5 α	Invitrogen, Carlsbad, USA <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
<i>E. coli</i> BL21	Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i>
<i>E. coli</i> B834	Novagen, Madison, USA F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm met</i>

Medien und Puffer

LB	1 l: 10 g Casaminoacids, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7.5
M9	1.44 g KH ₂ PO ₄ , 6 g Na ₂ HPO ₄ (entspricht 50 mM Phosphat pH 7.4), 0.5 g NaCl, 1 g NH ₄ Cl, autoklavieren, dann + 2 mL 1 M MgSO ₄ , 0.1 mL CaCl ₂ , 10 ml 20% (w/v) Glukose
TB	10 mM HEPES, 55 mM MnCl ₂ , 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl; alles bis auf MnCl ₂ lösen, mit KOH pH auf 6.7 einstellen, MnCl ₂ lösen, durch 0.45 μ l Filter filtrieren und bei 4°C aufbewahren
Spurenelemente	1 l, 100x: 15 g NaOH, 60 g EDTA, 20g MgSO ₄ · 7 H ₂ O, 5 g CaCl ₂ · 6 H ₂ O, 2 g ZnSO ₄ · 4 H ₂ O, 2 g MnSO ₄ · 4 H ₂ O, 0.5 g CuSO ₄ · 5 H ₂ O, 95 mg CoCl ₂ · 6 H ₂ O, 10 g FeSO ₄ · 7 H ₂ O, 31 mg H ₃ BO ₃ , 2 mg Na ₂ MoO ₄ , 74,5 g KCl, autoklavieren
Puffer A	20 mM Tris-HCl, pH 8.0
Puffer B	1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0
Puffer C	500 mM NH ₄ SO ₄ , 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
Puffer D	150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0
Puffer E	1 M NH ₄ SO ₄ , 50 mM Tris-HCl, pH 8.0

2.2.2 Plasmid

Das Plasmid p6a mit dem Gen der D-Hyd wurde uns von der Firma Roche Diagnostics zur Verfügung gestellt. Die Transkription des Gens wird durch den IPTG induzierbaren modifizierten *lac*/T5 Promotor und den Terminator *rrnB* kontrolliert. Das Plasmid trägt das β -Lactamase-Gen, das Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin verleiht. Es verfügt über den aus der pUC-Plasmidgruppe stammenden *origin of replication* der ColE1-Kompatibilitätsgruppe.

2.2.3 Herstellung kompetenter Zellen

E. coli Zellen wurden nach dem folgenden Verfahren kompetent gemacht (Inoue *et al.*, 1990): Bakterienzellen aus einer Stocklösung wurden auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Eine 20 mL LB-Vorkultur wurde mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 30°C 12 Stunden lang inkubiert. Eine 250 mL LB-Hauptkultur wurde mit dem resuspendierten Pellet von 1 mL der Vorkultur angeimpft, bei 30°C bis $OD_{600}=0.8$ angezogen, 10 min auf Eis gekühlt und bei $2500\times g$ und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml kaltem TB-Buffer aufgenommen, 10 min auf Eis gekühlt und erneut bei $2500\times g$ und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml kaltem TB-Buffer aufgenommen, mit 1.4 ml DMSO versetzt (Endkonzentration 7%), 10 min auf Eis inkubiert, in 500 μ l Fraktionen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.4 Glycerin-Dauerkulturen

Für eine Glycerin-Dauerkultur wurden 700 μ l LB-Medium/Glycerin (1:1 v/v) mit 300 μ l Zellen in Medium versetzt und bei -20°C oder -70°C eingefroren.

2.2.5 Hitzeschock-Transformation

100 μ l einer Dauerkultur kompetenter Zellen wurden 10 Minuten auf Eis aufgetaut und mit ca. 100 ng Plasmid 25 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Minute bei 42°C wurde der Ansatz drei Minuten auf Eis gekühlt, mit 400 μ l LB-Medium versetzt und eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf

einer LB-Platte mit 150 μg Ampicillin pro ml Medium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.6 Plasmidpräparation

E. coli DH5 α Zellen wurden mit dem D-Hyd Plasmid transformiert. Von der Amp/LB-Platte wurde ein Klon über Nacht bei 37°C in einer 3 ml Amp/LB Vorkultur angezogen. Eine 200 ml Amp/LB Hauptkultur wurde mit 1 mL der Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Hauptkultur wurde bei 4°C und 5000 \times g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde gemäß dem Protokoll der alkalischen Lyse aufgeschlossen. Herstellerangaben: Macherey-Nagel; Nucleobond AX100-Säulenkit. Die Aufreinigung des Plasmids erfolgte über Nucleobond AX100-Säulen. Das getrocknete Plasmid wurde in Wasser (LiChrosolv, Merck) aufgenommen.

2.2.7 DNA-Sequenzierung

In PCR-Reaktionsgefäßen wurden 4 μg Plasmid DNA mit Wasser (LiChrosolv, Merck) auf 10 μl verdünnt und mit 1 μl Sequenzierprimer (10 pmol/ μl) und 4 μl Big Dye-Mix (Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) versetzt. Die PCR-Reaktion wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt:

zunächst	4 min 95°C	(Denaturierung),
30 Zyklen:	15 sek 95°C	(Denaturierung),
	15 sek 55°C	(Annealing) und
	4 min 60°C	(Reaktion);
anschließend	Kühlung bei 8°C	

Die PCR-Ansätze wurden durch Ethanol-fällung für die folgende Sequenzierung aufgereinigt: Die Ansätze wurden mit 80 μl Wasser (LiChrosolv, Merck), mit 10 μl 3 M Natriumacetat pH 4.6 und 250 μl Ethanol versetzt und bei Raumtemperatur 30 Minuten bei 23000 \times g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 300 μl 70% (v/v) Ethanol versetzt und erneut 5 Minuten bei 23000 \times g zentri-

fugiert. Der Überstrand wurde entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und in 20-25 μ l Wasser/TSR-Puffer aufgenommen und in Sequenziergefäße überführt. Die Sequenzieransätze wurden vor der Sequenzierung eine Minute bei 95°C denaturiert und über Kapillargelelektrophorese analysiert. Aus dem erhaltenen Chromatogramm wurde die Basensequenz abgeleitet.

Die Sequenzierung des Hydantoinase-Gens wurde von beiden Seiten des Gens ausgehend von bekannten Sequenzstücken und in beiden Richtungen vollständig und überlappend durchgeführt. Für die Sequenzierung der D-Hyd wurden die folgenden Primer (MWG-Biotech, Ebersberg) verwendet:

DHydPri1	CGCATATGCTTCACCTCG
DHydPri2	CAGCTACTGCGATTACACC
DHydPri3	AGCTGCTGGGCAAGGAGG
DHydPri4	GCCGTCTCCAAGTTCGACG
DHydRev1	GCGCTACTGCCGCCAGGC
DHydRev2	CAGTCCAAACAGCTTGGC
DHydRev3	CGTTCTCACAGTGGGCGG

2.2.8 Expression der nativen D-Hyd

Die nativen D-Hyd wurde sowohl in *E. coli* BL21 (Pharmacia) als auch in *E. coli* B834 Zellen (Novagen) exprimiert. Das LB-Medium wurde mit 150 mg/ml Amp und 0.1 mM $MnCl_2$ versetzt. 20 ml Amp/LB Vorkultur wurden aus einer Glycerin-Dauerkultur angeimpft und bei 37°C im 100 ml Erlenmeyerkolben über Nacht angezogen. Die Hauptkultur von 4 \times 300 ml Amp/LB in 3 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurde mit je 3 ml Vorkultur angeimpft und bei 37°C kultiviert. Bei einer $OD_{600}=0.8$ wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Nach vier Stunden wurden die Zellen auf Eis gekühlt, für 20 Minuten bei 5900 \times g und 4°C zentrifugiert, in 15 ml Puffer A aufgenommen und für weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.2.9 Expression der Se-Met-D-Hyd

Die Se-Met-D-Hyd wurde in Methionin auxotrophen *E. coli* B834 Zellen exprimiert. 20 ml Amp/LB Vorkultur wurden aus einer Glycerin-Dauerkultur angeimpft und bei 37°C im 100 ml Erlenmeyerkolben über Nacht angezogen. Die Vorkultur wurde dann drei Mal 5 Minuten bei 3000×g und 4°C zentrifugiert und in je 20 ml kaltem M9 Minimalmedium resuspendiert. Die Hauptkultur von 4×300 ml M9 Minimalmedium wurde mit 50 mg/ml Seleno-L-Methionin (Fluka, ≥ 98%) und je 50 mg/ml der restlichen Aminosäuren, Spurenelementlösung und 1 mM MnCl₂ versetzt. Die Hauptkulturen wurden mit je 3 ml in M9 Minimalmedium gewaschener Vorkultur angeimpft und bei 37°C kultiviert. Die Proteinexpression wurde bei OD₆₀₀=0.8 mit 1 mM IPTG induziert. Nach vier Stunden wurden die Zellen auf Eis gekühlt, für 20 Minuten bei 5900×g und 4°C zentrifugiert, in 15 ml Puffer A + 20 mM Dithiothreitol aufgenommen und für weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.2.10 Zellaufschluss

Die gefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail bestehend aus 35 µg/ml PMSF, 0.7 µg/ml Pepstatin A und 0.5 µg/ml Leupeptin versetzt. Die Zellen wurden in drei Durchgängen in der French Press bei einem inneren Druck von 170 MPa lysiert.

2.3 Chromatographie

2.3.1 Probenvorbereitung

Der erste Schritt der Aufreinigung von Proteinen nach der Zellyse ist die Entfernung von Zelldebris. Dies geschieht im Labormaßstab normalerweise durch Zentrifugation. Da dies zum Beispiel bei größeren Probemengen Probleme bereiten kann, wird im technischen Maßstab die STEAMLIN-Technologie eingesetzt. Die STEAMLIN-Säulen werden zunächst mit ungeklärtem Zellysats im Fließbett beladen. Nach Kompression des Säulenbettes kann wie in der normalen Chromatographie verfahren werden. Für die D-Hyd wurden zwei

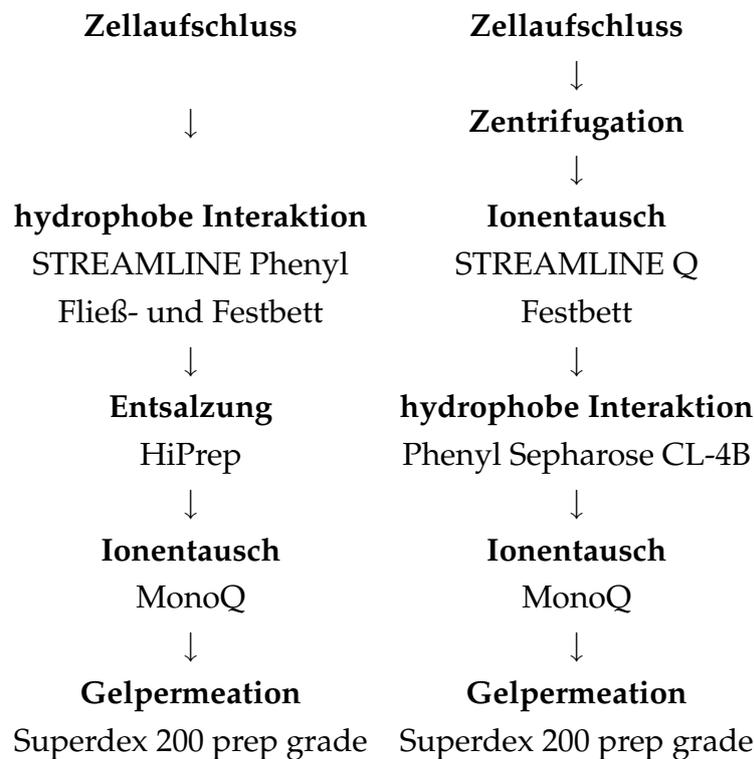


Abbildung 2.1: Die zwei unterschiedlichen Chromatographiewege zur Aufreinigung von D-Hyd.

unterschiedliche Aufreinigungsprotokolle entwickelt, deren generelle Abläufe in [Abbildung 2.1](#) schematisch dargestellt sind. Das erste Protokoll ist eine Studie über die Verwendung von STREAMLINE-Säulen im Labormaßstab. Im zweite Protokoll wird das Zellysate durch Zentrifugation geklärt.

2.3.2 Chromatographie mit STREAMLINE Phenyl im Fließ- und Festbett

2.3.2.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde mit 45 ml STREAMLINE Phenyl Säulenmaterial in einer C 16/40 Säule mit einem variablen Adapter

am oberen Ende durchgeführt. Da die werksmäßig eingebauten Filter der C-Säulen für Zellaufschluss zu fein sind, wurden sie durch Großmutter's Nylonstrumpf ersetzt. Das Lysat wurde mit dem selben Volumen Puffer E + 0.1 mM MnCl_2 gemischt und über eine Schlauchpumpe in aufwärtiger Flussrichtung bei 3.5 ml/min (1.7 cm/min) auf die Säule im expandierten Modus aufgetragen. Die Säule wurde im expandierten Modus bei gleicher Flussrate und Flussrichtung mit Puffer C + 0.1 mM MnCl_2 gewaschen bis die Absorbanz bei 280 nm wieder gesunken war. Die Flussrichtung wurde umgekehrt und der variable Adapter von Hand auf die Höhe des komprimierten Säulenmaterials angeglichen. Bei Flussrichtung nach unten wurde zum Waschen und zur Elution ein Stufengradient mit sinkenden NH_4SO_4 Konzentrationen (500, 250 und 0 mM) angelegt. Aktive Fraktionen (s. Kap. 2.4.2) wurden vereinigt (45 ml) und im folgenden Schritt entsalzt.

2.3.2.2 Entsalzung

Die vereinigten aktiven Fraktionen aus dem vorherigen Chromatographieschritt wurden für die folgende Anionentausch-Chromatographie in Puffer A + 0.1 mM MnCl_2 entsalzt. Dies geschah in drei Fraktionen von je 15 ml mit Hilfe einer HiPrep 26/10 Entsalzungssäule bei Flussraten von 5 ml/min (1 cm/min).

2.3.2.3 Anionentausch-Chromatographie

Die entsalzten Fraktionen wurden mit 2 ml/min (2.5 cm/min) auf eine MonoQ HR 10/10-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer A + 0.1 mM MnCl_2 gewaschen und bei gleicher Flussrate in einem segmentierten Gradienten mit steigendem NaCl Gehalt eluiert. Der folgende Gradient wurde angewendet: 85 ml bei 0 mM NaCl, dann Stufe auf 125 mM NaCl, flacher linearer Gradient von 125–160 mM NaCl innerhalb von 20 ml, dann Stufe auf 190 mM NaCl, steile Gradienten auf 250 bzw. 500 mM NaCl innerhalb von je 10 ml. Danach wurde bei 500 mM NaCl gewaschen. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration mit Centriplus 50 auf 1 ml aufkonzentriert.

2.3.2.4 Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie wurde mit Superdex 200 prep grade Säulenmaterial in einer XK 70/16-Säule durchgeführt. Die Säule wurde mit Puffer D + 0.1 mM MnCl₂ äquilibriert, die konzentrierten aktiven Fraktionen aus dem vorherigen Schritt wurden bei einer Flussrate von 0.5 ml/min (0.25 cm/min) chromatographiert.

2.3.3 Chromatographie mit Zentrifugation

2.3.3.1 Zentrifugation

Zur Entfernung von Zelldebris wurde das Lysat für 30 Minuten bei 10000×g und 4°C zentrifugiert.

2.3.3.2 Anionentausch-Chromatographie

Für die Anionentausch-Chromatographie wurden 25 ml STREAMLINE Q XL Säulenmaterial in einer C 16/20 Säule mit Puffer A äquilibriert. Der Überstand der Zentrifugation wurde mit 4 ml/min auf die Säule aufgetragen und bei gleicher Flussrate in einem segmentierten Gradienten mit steigender Salzkonzentration eluiert: 0–500 mM NaCl innerhalb 125 ml, 500-1000 mM NaCl innerhalb 50 ml. Die aktiven Fraktionen (55 ml) wurden vereinigt.

2.3.3.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die aktiven Fraktionen aus dem vorherigen Schritt wurden mit dem gleichen Volumen Puffer E versetzt. 25 ml Phenyl Sepharose CL-4B Säulenmaterial in einer XK 16/60 Säule wurden mit Puffer C äquilibriert und bei einer Flussrate von 3 ml/min mit Probe beladen. Die Elution fand in einem linearen Gradienten auf Puffer A innerhalb von 125 ml statt. Die aktiven Fraktionen (35 ml) wurden vereinigt.

2.3.3.4 Anionenausch-Chromatographie

Eine MonoQ HR 10/10 Säule wurde mit Puffer A äquilibriert. Die aktiven Fraktionen aus dem vorherigen Schritt wurden bei einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen und in einem segmentierten Gradienten auf Puffer B eluiert: 0-500 mM NaCl innerhalb 80 ml, 500-1000 mM NaCl innerhalb 40 ml. Die aktiven Fraktionen (8 ml) wurden vereinigt.

2.3.3.5 Gelpermeationschromatographie

200 ml Superdex 200 prep grade Säulenmaterial in einer XK 70/16-Säule wurden mit Puffer D äquilibriert. Die vereinigten Fraktionen aus dem vorherigen Schritt wurden bei einer Flussrate von 1.0 ml/min chromatographiert.

2.4 Proteinanalytik

2.4.1 Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden nach zwei verschiedenen Verfahren bestimmt. In allen Fällen war BSA Standardsubstanz. Generell wurde das Verfahren nach Bradford mit dem Kit von BioRad (München) angewendet. Lediglich zur Auswertung der Chromatographie und der Bestimmung der spezifischen Aktivitäten wurde nach der BCA (Bicinchinoic acid) Methode verfahren und dabei das Kit von Pierce (Rockford, USA) verwendet.

2.4.2 Aktivitätstest

Die quantitative Aktivität der Hydantoinase wurde nach der Methode bestimmt wie von [Abendroth et al. \(2000\)](#) beschrieben. Dies ist eine Abwandlung der Methode nach [Sharma & Vohra \(1997\)](#): 200 μ l 40 mM D/L-Methyl-thioethylhydantoin in Puffer A wurden mit 50 μ l Enzymlösung versetzt und für 10 min bei 37° inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 62.5 μ l 12% (w/v) Trichloressigsäure gestoppt. 62.5 μ l Ehrlich's Reagenz (10% (w/v) *p*-Dimethylamino-Benzaldehyd in 12% (w/v) Salzsäure) und 375 μ l Wasser

wurden zugegeben. Das denaturierte Protein wurde durch Zentrifugation bei $15000\times g$ über 2 min pelletiert. Die Konzentration von derivatisiertem N-Carbamoyl-Methionin wurde bei 435 nm bestimmt.

Qualitative Aktivitätstests bei der Ermittlung der aktiven Fraktionen wurden auf einer Mikrotiterplatte nach der folgenden Methode durchgeführt: $50\mu\text{l}$ 40 mM D/L-Methyl-thioethyl-hydantoin in Puffer A wurden bei Raumtemperatur mit $20\mu\text{l}$ Enzymlösung inkubiert. Nach 5-20 Minuten je nach erwarteter Enzymkonzentration wurde $30\mu\text{l}$ Ehrlich's Reagenz zugesetzt. Aktive Fraktionen zeigen eine kräftige Gelbfärbung.

2.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden das Phast System und vorgefertigte Gradientengele (8-25% Acrylamid) verwendet. Die Proteinlösungen wurden mit Wasser auf eine Konzentration von etwa 0.2 mg/ml verdünnt, mit dem Auftragspuffer (4 \times : 8 ml 60 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 g SDS, 4 mg Bromphenolblau, 2 ml β -Mercaptoethanol) gemischt, 5 min bei 95°C inkubiert, kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Trennung wurde nach dem Pharmacia *Separation Technique File No. 110* durchgeführt. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht (Pharmacia *Development Technique File No. 210*). Als Größenmarker wurde das Marker-Kit combithek (Boehringer Mannheim, Mannheim) verwendet: 170 kDa α -Macroglobulin, 116 kDa β -Galactosidase, 85.2 kDa Fructose-6-Phosphat-Kinase, 55.5 kDa Glutamat-Dehydrogenase, 39.2 kDa Aldolase, 26.6 kDa Triosephosphat-Isomerase, 20.1 kDa Trypsin-Inhibitor, 14.3 kDa Lysozym.

2.4.4 Massenspektrometrie

2.4.4.1 ESI-Massenspektrometrie

Zur ESI-Massenspektrometrie wurden die Proteinproben gegen ein Methanol-Wasser-Gemisch 1:1 (v/v) mit 0.1% Essigsäure dialysiert. Es wurden ca. $100\mu\text{l}$ mit einer Konzentration von 10 pmol/ μl benötigt.

2.4.4.2 MALDI-Massenspektrometrie

Die ca. 100 μl Proteinprobe mit 10-100 pmol/ μl wurden gegen 0.1% TFA dialysiert. 5 μl davon wurden gemischt mit 15 μl 0.1% TFA und 30 μl einer mit Sinapinsäure gesättigten Acetonitril-Wasser-Lösung 1:1 (v/v). Die Spots auf dem Target wurden mit einer Ethanol-Dünnschicht (0.5 μl in Ethanol gesättigte Sinapinsäure) benetzt und nach dem Trocknen mit 0.5 μl Probe versehen. Nach dem Trocknen wurde die Probe direkt vermessen. Als Standard für die externe Kalibrierung wurde BSA verwendet.

2.4.5 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung wurde mit dem Gerät DynaPro-801 durchgeführt. Die Proteinprobe mit einer Konzentration von 0.2-10 mg/ml wurde vor der Messung durch einen 0.2 μm Filter filtriert. Es wurden jeweils 20–35 Einzelmessungen aufgenommen. Die Auswertung erfolgte monomodal mit globulären Proteinen als Standard für die Berechnung der Molmasse aus dem hydrodynamischen Radius mit der Software des Gerätes.

2.5 Proteinkristallisation

2.5.1 Allgemein

Für die Kristallisation wurde das aufgereinigte Protein durch Ultrafiltration aufkonzentriert und umgepuffert. Die Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode mit sitzenden oder hängenden Tropfen durchgeführt. Es wurden Linbro-Platten und Polystyrol- und Polypropylen-Brücken verwendet. Die Tropfen wurden aus Proteinlösung, Reservoirlösung und gegebenenfalls Additiven gemischt. Die Ergebnisse wurden in regelmäßigen Abständen unter einem Stereomikroskop untersucht und protokolliert. Die Reservoirs wurden von Hand gemischt. Der pH der Puffer wurde in den ersten Screens nach Puffertabellen aus 0.5 oder 1 M Pufferlösungen, bei den verfeinerten Kristallisationsbedingungen per pH-Meter in einer 1 M Lösung eingestellt. Effekte weiterer Komponenten des Reservoirs wie Salze wurden vernachlässigt. Bei der Beschreibung

der Kristallisationsbedingung handelt es sich grundsätzlich um die Beschreibung des Reservoirs. Erste Kristallisationsbedingungen wurden nach dem Schema der unvollständigen faktoriellen Suche (Jancarik & Kim, 1991, sparse matrix screen) durchgeführt. Ausgehend von diesen ersten Bedingungen wurden die Bedingungen durch systematische Variation von einem oder zwei Parametern optimiert.

2.5.2 Impfkristallisation

Für die Impfkristallisation (*micro seeding*) wurde nach der von Scheffzek *et al.* (1997) beschriebenen Methode verfahren: Zur Herstellung der Impflösung mit den Kristallisationskeimen wurden Kristalle im Tropfen mit einer Pipettenspitze mechanisch zerkleinert. Die so behandelten Tropfen wurden in 200 μl einer Stabilisierungslösung gegeben, die dem Reservoir des Ansatzes entsprach, der angeimpft werden sollte. Die Kristallsplitter in der Stabilisierungslösung wurden sequenziell jeweils um den Faktor 2–4 auf bis zu 12.8 ml verdünnt. Über die Verdünnung ließ sich die Anzahl der Kristallkeime im Kristallisationsansatz steuern.

Für die Kristallisationsansätze wurde eine niedrigere Fällungsmittelkonzentration verwendet, als für eine spontane Kristallisation notwendig wäre. Nach 8–12 Stunden Äquilibrierung wurden die Kristallisationsansätze mit 0.5 μl frisch hergestellter Impflösung angeimpft.

Bei der Kristallisation der Se-Met-D-Hyd wurde nach einem modifizierten Protokoll verfahren: Da sich während der ersten 24 Stunden im Tropfen ein diffuses Präzipitat bildete, wurde für die Kristallisation der Kristalle, die für die MAD-Messung verwendet werden sollten, eine komplette Platte mit 24 identischen Bedingungen vorbereitet. Nach 24 Stunden wurden alle Tropfen vereinigt und der Niederschlag abzentrifugiert. Die nun wieder klaren Topfen wurden dann auf frische Brücken gegeben, zwei Stunden lang äquilibriert und dann angeimpft. Es wurden auch hier Kristallsplitter der nativen D-Hyd verwendet.

2.5.3 Suche nach Schwermetallderivaten

Beim anfänglichen Versuch der Strukturlösung der D-Hyd durch multiplen isomorphen Ersatz wurden die Kristallisationsansätze zunächst mit 20 μl einer Stabilisierungslösung versetzt (2 M Li_2SO_4 , 100 mM HEPES/NaOH pH 7.5, 5% (v/v) PEG 400). Nach fünf Minuten wurden die Kristalle dann vom Untergrund gelöst, indem mit einer Nadel in der Nähe des Kristalls in die Brücke gestochen wurde. Die freien Kristalle wurden aus dem Kristallisationsansatz entfernt und in 200 μl der Stabilisierungslösung in einem Lymphschälchen gegeben. Die Kristalle wurden dann in 10 μl Stabilisierungslösung auf eine neue Brücke gegeben. Das Reservoir dieses Ansatzes bestand ebenfalls aus der Stabilisierungslösung. Zum Tropfen wurde dann 1 μl Schwermetalllösung in Wasser gegeben.

2.6 Röntgendiffraktometrie

2.6.1 Kristallmontage

Für Tieftemperaturmessungen wurden die Kristalle der zentriert orthorhombischen Kristallform im Tropfen mit 25 μl Cryolösung (2 M Li_2SO_4 , 100 mM HEPES/NaOH pH 7.5, 5% (v/v) PEG 400) versetzt, nach 5 min durch Einstechen in die Brücke in der Nähe vom Kristall vom Untergrund gelöst und mit einer Pipette in 1 ml Cryolösung in einem Lymphschälchen gegeben. Der Kristall wurde mit einem möglichst kleinem Nylonloop aus der Stabilisierungslösung aufgenommen und nach der Montage auf dem Goniometerkopf möglichst schnell in einem Stickstoffstrom auf 100 K gekühlt.

Für Raumtemperaturmessungen wurden die Kristalle mit 10 μl Reservoirlösung versetzt, durch Einstechen in die Brücke in der Nähe vom Kristall vom Untergrund gelöst und mit einer Pipette in 1 ml Reservoirlösung in einem Lymphschälchen gegeben. Die Kristalle wurden in ein der Größe der Kristalle angepasstes Markröhrchen (0.5–1.0 mm \varnothing) gesogen. Mit einem dünneren

Markröhrchen (0.1 mm \varnothing) wurde die Mutterlauge um den Kristall entfernt. Zur Beibehaltung einer feuchten Atmosphäre wurde etwas Flüssigkeit in kurzem Abstand zum Kristall gelassen. Die Kapillare wurde an beiden Enden mit einem niedragschmelzenden Wachs (capillary wachs) versiegelt und mit Knetgummi auf dem Goniometerkopf montiert.

2.6.2 Diffraktionsexperimente

2.6.2.1 Allgemein

Sämtliche Kristalle wurden an der institutseigenen Drehanode mit Cu-K α -Strahlung charakterisiert. Mit dieser Anlage wurde auch der Datensatz der D-Hyd in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ gemessen. Die MAD-Datensätze und die beiden hochaufgelösten Datensätze wurden bei 100 K am DORIS Speicherring des DESY in Hamburg an Messplätzen der EMBL-Outstation unter Verwendung von Synchrotronstrahlung gemessen.

2.6.2.2 Se-Met-D-Hyd

Die drei MAD-Datensätze wurden an der *bending-magnet beamline* X31 auf einer MAR300 Bildspeicherplatte (150 μm Pixelgröße) gemessen. Die Röntgenfluoreszenzspektren zur Bestimmung der Wellenlängen für den *peak*- (0.9794 Å) und den *inflection*- Datensatz (0.9797 Å) wurden mit dem Programm CHOOCH (Evans & Pettifer, 2001) ausgewertet. Die Wellenlänge des *remote* Datensatzes (0.9184 Å) lag auf der höherenergetischen Seite der Absorptionskante. Alle drei Datensätze wurden an einem Kristall *en bloc* mit Belichtungszeiten von ca. 10 Minuten pro Bild gemessen. Die weiteren Messparameter sind in der folgenden Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.5: Messparameter für die MAD-Datensätze

Datensatz	remote	peak	inflection
Wellenlänge [Å]	0.9184	0.9794	0.9797
höchste Auflösung [Å]	2.45	2.45	2.45
Kristall-Detektor [mm]	375	375	375
Rotation pro Bild [°]	0.5	0.5	0.5
Bilder	186	219	202
Gesamtrotation [°]	93	109.5	101

2.6.2.3 native D-Hyd, C222₁

Die hochauflösenden Datensätze der nativen D-Hyd der Raumgruppe C222₁ wurden an der *multipol wiggler beamline* BW7B auf einer MAR345 Bildspeicherplatte gemessen. Der 1.3Å-Datensatz wurde zur Vermeidung von gesättigten Reflexen in den Bereichen niedriger Auflösung in drei Runden mit unterschiedlicher Auflösung aufgenommen. Die Messparameter sind in den folgenden Tabelle 2.6 aufgelistet.

Tabelle 2.6: Messparameter für die nativen Datensätze

Datensatz	1.70 Å	1.30 Å		
		hoch	mittel	niedrig
Wellenlänge [Å]	0.8439	0.8420	0.8420	0.8420
höchste Auflösung [Å]	1.68	1.29	2.45	4.00
Kristall-Detektor [mm]	310	220	480	700
Rotation pro Bild [°]	0.3	0.2	0.75	1.50
Bilder	300	460	150	75
Gesamtrotation [°]	90	92	112.5	112.5
Dosis [counts]	10 sec	7500	500	150
Bildspeicherplatte [mm]	345	345	345	300
Pixelgröße [µm]	100	100	150	150

2.6.2.4 native D-Hyd, $P2_12_12_1$

Der Kristall der Raumgruppe $P2_12_12_1$ wurde mit CuK_α -Strahlung einer haus-eigenen Drehanode gemessen. Die Drehanode wurde bei einer Hochspannung von 45 kV und einem Stromfluss von 100 mA betrieben. Der Strahl wurde mit einem Graphitkristall monochromatisiert. Das Diffraktionsmuster wurde auf einer DIP2030H-Bildspeicherplatte aufgezeichnet. Der Kristall wurde in einem Markröhrchen montiert und bei 8°C vermessen. Jedes der 201 Bilder wurde pro 10 minütiger Belichtung um 0.7° gedreht.

2.7 Datenreduktion

Die Diffraktionsbilder wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK aus dem HKL-Programmpaket (Otwinowski & Minor, 1997) indiziert, integriert und skaliert.

Bei den MAD-Datensätzen wurden die Daten mit SCALEPACK mit der Option *no merge original index* skaliert. Symmetrieverwandte Reflexe wurden mit SOLVE (Terwilliger & Berendzen, 1999) zusammengefasst (*mergen*), das einen lokalen Skalierungsalgorithmus beinhaltet.

Bei den hochaufgelösten Daten des 1.3 Å-Datensatzes ließen sich die Reflexe mit DENZO nicht mehr räumlich trennen. Für diesen Datensatz wurden die Diffraktionsbilder mit DENZO integriert (Optionen: *overlap none, reject fraction 0.2, overload value 500000, reject slope 5000*). Für die Dekonvolution der räumlich überlappenden Reflexe und die Integration wurde das Programm PrOW (Bourgeois, 1999) verwendet. Nach Umkonvertierung der Daten in HKL-Format wurden die Daten mit SCALEPACK skaliert und zusammengefasst.

Die statistische Auswertung der Datensätze wurde mit dem Programm NOVEL_R (Diederichs & Karplus, 1997) durchgeführt. Die Strukturfaktor-amplituden wurden bei allen Datensätzen mit TRUNCATE (CCP4, 1994) aus

den Intensitäten berechnet. Die freien Reflexe für die Kreuzvalidierung bei der Strukturverfeinerung wurden mit UNIQUEIFY (CCP4, 1994) bestimmt, die Packungsdichte mit MATTHEWS_COEFF (CCP4, 1994) und die Selbstrotationsfunktion mit GLRF (Tong & Rossmann, 1997) berechnet.

2.8 Strukturlösung und Modellbau der D-Hyd

2.8.1 Detektion von Derivaten

Die Datensätze der möglichen Derivate wurden mit SCALEIT (CCP4, 1994) gegen einen nativen Datensatz skaliert. Die folgenden Kriterien zur Detektion eines Derivates wurden betrachtet: R_{iso} -Werte (aus SCALEIT), χ^2 -Werte bei der Skalierung von Röntgenbildern des möglichen Derivats gegen den nativen Datensatz (aus DENZO), Normalwahrscheinlichkeiten (aus SCALEIT, Howell, 1992) und isomorphe Pattersonmaps (mit FFT berechnet, CCP4, 1994).

2.8.2 Selen-Substruktur

Die Selen-Substruktur der Se-Met-D-Hyd wurde mit den automatischen Suchroutinen des Programms SOLVE gelöst (Terwilliger & Berendzen, 1999). Dafür wurden die symmetrieverwandten Reflexe der MAD-Datensätze mit dem lokalen Skalierungsalgorithmus zusammengefasst. Die drei Datensätze wurden gegeneinander skaliert und die anomalen (f'') und dispersiven (f') Streubeiträge verfeinert. Für die Suche und die Verfeinerung der Selen-Positionen wurde die obere Auflösungsgrenze auf 3.0Å gesetzt. Aus den verfeinerten Selen-Positionen wurden die ersten experimentellen Phasen berechnet.

2.8.3 Dichtemodifikation

Alle Rechnungen zur Dichtemodifikation wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit dem Programm DM (CCP4, 1994) durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde eine einfache Dichtemodifikation (Solvensglättung und Histogramm Anpassung) berechnet. Durch die so erhaltene Dichte wurde mit MAPMAN (Kleywegt & Jones, 1996) ein Skelett (*bones*) gelegt. Dieses Skelett wurde mit BONES2PDB (CCP4, 1994) in eine PDB-Datei überführt. In O (Jones *et al.*, 1991) wurden dann manuell die Bereiche herausgesucht, die ein Monomer umfassen. Aus diesen Koordinaten wurde anschließend mit NCSMASK (CCP4, 1994) die NCS-Maske erstellt, die für die folgenden Mittelungsrechnungen verwendet wurde. Mit dem Programm FINDNCS (CCP4, 1994) wurden aus den Positionen der Selen-Substrukturen die Symmetrieoperationen zwischen den Monomeren ermittelt. Da für die Rechnungen zur nicht-kristallographischen Mittelung die Symmetrieoperationen von *einem* Monomer auf alle anderen Monomere verwendet wurden und teilweise aber andere Kombinationen von Symmetrieoperationen bekannt waren, mussten diese durch Matrizenmultiplikation ineinander überführt werden. Die Symmetrieoperatoren wurden als Rotationsmatrix \underline{M} und Translationsvektor \underline{t} berechnet (s. Gleichung 2.1). Zur Matrizenmultiplikation wurden diese in *augmentierte* Matrizen (s. Gleichung 2.2) überführt. Mit dieser augmentierten Matrix lassen sich dann gewöhnliche Multiplikationen von 4x4 Matrizen durchführen.

$$\underline{r}' = \underline{M} \underline{r} + \underline{t} = \begin{pmatrix} r'_1 \\ r'_2 \\ r'_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} m_{11} & m_{12} & m_{13} \\ m_{21} & m_{22} & m_{23} \\ m_{31} & m_{32} & m_{33} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} t_1 \\ t_2 \\ t_3 \end{pmatrix} \quad (2.1)$$

$$\begin{pmatrix} r'_1 \\ r'_2 \\ r'_3 \\ 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} m_{11} & m_{12} & m_{13} & t_1 \\ m_{21} & m_{22} & m_{23} & t_2 \\ m_{31} & m_{32} & m_{33} & t_3 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (2.2)$$

Die Symmetrieoperationen wurden mit DM verfeinert. Zur Phasenextension wurden die Strukturfaktoramplituden des 1.7Å-Datensatzes mit den Phasen bis 3.0Å aus SOLVE kombiniert. Die Phasen wurden in 600 Zyklen unter Verwendung von nicht-kristallographischer Mittelung über alle sechs Monomere in kleinen Schritten von 3.2Å auf 1.7Å Auflösung erweitert. Während der Phasenerweiterung wurden die Proteinmaske und die nicht-kristallographischen Symmetrieoperationen verfeinert.

2.8.4 Modellbau und Verfeinerung

Ein erstes Modell wurde mit dem Programm ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1999) erstellt. Dafür wurden die modifizierten Strukturfaktoramplituden und Phasen nach der Phasenerweiterung auf 1.7Å Auflösung verwendet. Im ersten Schritt wurde mit dem *warpNtrace*-Modus von ARP nach dem *fast protocol* ein Hybrid-Proteinmodell erstellt. Mit dem *sidedock*-Modus wurde dann die Sequenz in das Hybrid-Modell gelegt (*side chain docking*).

Im Folgenden wurde in abwechselnden Zyklen von manuellem Modellbau in O (Jones *et al.*, 1991) und Verfeinerungsrunden mit CNS (Brunger *et al.*, 1998) das Modell unter Verwendung des 1.7 Å Datensatzes verfeinert. Zunächst wurde die nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) durch Verfeinerung **eines** Monomers und festen NCS-Operationen berücksichtigt (NCS *constraints*). Später wurde dann mit **allen** Monomeren gerechnet, wobei die Abweichungen der weiteren Monomere vom Referenzmonomer mit im Laufe der Verfeinerung sinkenden Energietermen belegt wurden (NCS *restraints*).

In ersten Verfeinerungsrunden, bei denen größere manuelle Modifikationen im Modell vorgenommen worden waren, wurde vor der *conjugate gradient* Minimierung ein *stimulated annealing* mit Moleküldynamik berechnet. Für den automatischen Wassereinbau wurden neben stereochemischen Gegebenheiten Peaks über 3σ in sigmaA-gewichteten F_oF_c -Elektronendichten Peaks vorausgesetzt. Wassermoleküle mit B-Faktoren über 50Å^2 wurden verworfen.

Für die Verfeinerung des 1.3Å-Datensatzes wurde das fertige 1.7Å-Modell ohne Wasser verwendet. Nach einer ersten Starre-Körper-Verfeinerung bei 2.0Å Auflösung und einer Verfeinerung bei 1.3Å Auflösung wurde automatisch mit ARP/wARP verfeinert und Wasser eingebaut. Während der folgenden Verfeinerungsrunden mit REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997) wurden die NCS-restraints vermindert und am Ende ganz aufgelöst, die Gewichtung der Röntgendaten im Vergleich zu stereochemischen Zwängen erhöht, Beiträge von Wasserstoffatomen berücksichtigt (*riding hydrogens*) und die B-Faktoren anisotrop verfeinert. Wassermoleküle mit isotropen B-Faktoren über 50 Å² wurden verworfen.

2.9 Strukturlösung der D-Hyd, $P2_12_12_1$

Die Selbstrotationsfunktionen wurden mit GLRF aus dem REPLACE-Paket (Tong & Rossmann, 1997), die Rechnungen für den Molekularen Ersatz und die Verfeinerung mit CNS (Brunger *et al.*, 1998) durchgeführt. Als Suchmodell für den Molekularen Ersatz bei der D-Hyd in Raumgruppe $P2_12_12_1$ wurde ein Monomer der D-Hyd ohne Wasser der Raumgruppe $C222_1$ verwendet. Die Rotationssuche wurde mit Daten von 10–4Å Auflösung gerechnet. Vor der Translationssuche mit Daten von 15–4Å Auflösung und Strukturfaktoramplituden wurde in jedem Fall noch eine Patterson-Korrelationsverfeinerung berechnet. An die Translationssuchen schloss sich eine Starre-Körper-Verfeinerung gegen normalisierte Strukturfaktoramplituden an.

Um mögliche Effekte der Kristallpackung oder Kristallisationsbedingung auf der Quartärstruktur zu berücksichtigen, wurde in der Kreuzrotations- und der ersten Translationssuche mit einem Monomer gerechnet. Dieses wurde in der zweiten Translationssuche festgehalten, um das zweite Monomer zu finden. Entsprechend wurde mit drei und vier Monomeren verfahren.

Das Modell wurde mit Daten bis zu 2.6Å Auflösung verfeinert. Die nicht-kristallographische Symmetrie wurde erst mit NCS-*constraints*, dann mit NCS-*restraints* berücksichtigt. Wasser wurde automatisch eingefügt und bei B-Faktoren über 50 Å² verworfen.

2.10 Strukturlösung der L-Hyd

2.10.1 Homology Modelling

Nach der Technik des Homologie-Modellings wurde ein Modell für die L-Hyd erstellt. Dafür wurde zunächst mit CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) ein multiples Sequenzalignment von L-Hyd, D-Hyd und Urease aus *Klebsiella aerogenes* erstellt. Für das halbautomatische Homologie-Modelling mit dem Programm MODELLER (Version 4, Sali & Blundell, 1993) wurde jedoch wegen der deutlich höheren Homologie nur die Strukturinformation der D-Hyd verwendet. Das dabei verwendete Sequenzalignment ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

2.10.2 Molekularer Ersatz

Die Selbstrotationsfunktionen wurden mit GLRF aus dem REPLACE-Paket (Tong & Rossmann, 1997) berechnet. Für den Molekularen Ersatz wurden verschiedene Suchmodelle verwendet:

- D-Hyd Monomer
- D-Hyd Dimer
- poly-Ala-D-Hyd Monomer
- poly-Ala-D-Hyd Dimer
- verkürztes poly-Ala-D-Hyd Monomer
- verkürztes poly-Ala-D-Hyd Dimer
- Homologie-Modell

Abbildung 2.2: Multiples Alignment von L-Hyd und D-Hyd, in das die Sequenzinformation der Urease aus *Klebsiella aerogenes* eingeflossen ist, als Basis für das halbautomatische Homologie Modelling der L-Hyd. Die Striche stellen Loopregionen der Urease dar.

```

L-Hyd ---MFDVIVKNCRVSSDGITEADILVKDGKVAASAD-----TSDVEASRTID
D-Hyd -----PLLIKNGEIIITADSRVKADLYAEGETITRIGQN-----LEAPPGTEVID

L-Hyd AGGKFMVMPGVVDEHVHIIDMDLKNRYG-RFELDSESAAVGGITTIIEMPITFPPTTTLDA
D-Hyd ATGKYVFPGFIDPHVHIYLPFMATFAKDTHTGSKAALMGGTTTYIEMCCPSRNDDALEG

L-Hyd FLEKKKQAGQRLKVDFALYGGGVPGNLPETRMKMDAGAVGFKSMMAASVP----GMFDAV
D-Hyd YQLWKSKEGNSYCDYTFHMAVSKFDEQTEGQLREIVADGISSFKIFLSY----KNFFGV

L-Hyd SDGELFEIFQEIAACGSVIVVHAENETIIQALQKQIKAAGGKDMAAYEASQPVFQE----
D-Hyd DDGEMYQTLRLAKELGVIVTAHCENAELVGRLLQKLLSEGKTGPEWHEPSRPEAVE----

L-Hyd ---NEAIQRALLLQKEAGCRLIVLHVSNPDGVELIHQAQSEG-----QDVHCESGPQYLN
D-Hyd ---AEGTARFATFLETTGATGYVVHLSCKPALDAAMAARG-----VPIYIESVIPHFL

L-Hyd ITTDDAER---IGPYMKVAPPVRS AEMNIRLWEQLENG-----LIDTLGSDHGGHP
D-Hyd LDKTYAERGGVEAMKYIMSPPLRDKRNQKVLWDALAQG-----FIDTVGTDHCPFD

L-Hyd VEDKEPGWKDVWKAGNGALGLETSLPMLTNGVNGRSLERLVEVMCEKPAKLFGIYPQ
D-Hyd TEQKLLGKEAFTAIPNGIPAIEDRVNLLYTYGVSRLGRLDIHRFVDAASTKAAKLFGLFPR

L-Hyd KG-----TLQVGSADLLILDLDIDTKVDASQFRSLHKYS PFDGMPVTGAPVLT
D-Hyd KG-----TIAVGSADLVVYDPQYRGTISVKTQHV NNDYNGFEGFEIDGRPSVV

L-Hyd MVRGTVVAEKGEVLVEQGFQGFVTRRNYEA
D-Hyd TVRGKVAVRDGGQFVGEKGGWGLLRREPMYF

```

Bei den poly-Ala-Modellen wurden Glycine konserviert. Bei den verkürzten Modellen wurden weniger gut konservierte Sequenzbereiche aus der Struktur der D-Hyd entfernt.

Die Suchen mit der D-Hyd und den entsprechenden poly-Ala-Modellen wurden mit den Programmen REPLACE (Tong & Rossmann, 1997), AMORE (CCP4, 1994) und CNS (Brunger *et al.*, 1998) teilweise unter Berücksichtigung der bekannten nicht-kristallographischen Symmetrie durchgeführt (*locked rotation* und *translation function*). Erfolgreich waren jedoch lediglich die Rechnungen mit CNS unter Verwendung des Homologie-Modells (Monomer) als Suchmodell. Diese Rechnungen liefen analog wie bei der D-Hyd der Raumgruppe $P2_12_12_1$ ab (s. Kap. 2.9).

2.10.3 Modellbau und Verfeinerung

Die Verfeinerung wurde mit CNS mit Daten bis zu 2.6Å Auflösung durchgeführt. Da das Homologiemodell bereits die Sequenz der L-Hydantoinase hatte, wurde von Anfang an mit diesem Modell und nicht mit einem Poly-Ala-Modell gearbeitet. Schlecht definierte Residuen wurden entfernt und in *simulated annealing omit*-Dichten erst als Alanine und dann als richtige Aminosäure neu modelliert. Nach größeren Veränderungen im Modell wurde vor der *conjugate gradient* Minimierung ein *simulated annealing* mit Moleküldynamik berechnet. Nach Vervollständigung des Protein-Modells wurde Wasser eingebaut. Die nicht-kristallographische Symmetrie wurde durchgängig durch feste NCS-Operatoren (*constraints*) berücksichtigt.

2.11 Validierung der Modelle

Während des Modellbaus und der Verfeinerung wurden die Modelle ständig mit PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und den Validierungsroutinen der verwendeten Verfeinerungsprogramme auf ihre stereochemische Validität überprüft. Die Sekundärstrukturen wurden mit DSSP (Kabsch & Sander, 1983) bestimmt.

2.12 Substratmodellierung

Für tetraedrischen Übergangszustände der Substrate wurden die Carbonylgruppen der Amid-Gruppen, die bei der Reaktion hydrolysiert werden, in geminale Diolen überführt. Die Strukturen dieser geminalen Diolen wurden mit CORINA (Gasteiger *et al.*, 1996) berechnet. Für das manuelle Modellierung wurde das Programm O (Jones *et al.*, 1991) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung der D-Hyd führte zu der Protein-Sequenz, die in Abbildung 3.1 dargestellt ist. Die DNA-Sequenz befindet sich im Anhang (Abb. A.1). Es zeigte sich dabei, dass entgegen der ursprünglichen Annahmen (Elard *et al.*, 1987) sich der C-Terminus der D-Hyd nicht unmittelbar vor der *HindIII*-Schnittstelle, sondern ca. 80 bp weiter am 3'-Ende befindet. Aus den Elektronendichten war später sichtbar, dass das N-terminale Methionin posttranslational entfernt und das Lysin des aktiven Zentrums (Lys150) carbamyliert worden war (s. Kapitel 5.4.3). Außer dem N-terminalen Methionin befinden sich im D-Hyd Monomer noch neun weitere Methionine, deren Selentome in den Se-Met-Kristallen für die MAD-Phasierung genutzt wurden.

1	<u>M</u> PLLIKNGEI	ITADSR Y KAD	IYA E GETITR	IGQNLEAPPG	TEVIDATGKY	50
51	VFP G FIDPHV	HIYLP F MATF	AKD T HETGSK	AAL M GGTTY	I E MCCPSRND	100
101	DALE G YQLWK	SKA E GN S YCD	YTF H MAVSKF	DEK T EGQLRE	IVAD G ISSFK	150
151	IFLS Y KNFFG	VDD G EM Y QTL	RLAK E LGVIV	TAHC E NAELV	GRL Q QKLLSE	200
201	GKT G PEWHEP	SR P EAVEAEG	TAR F ATFLET	TGAT G YVVHL	SCK P ALDAAM	250
251	AAK A RGVPIY	IES V IP H FLL	DK T YA E RG G V	E A M K Y I M S P P	LRD K R N Q K V L	300
301	WDAL A QGFID	TV G TD H CPFD	TE Q KLLGKEA	FT A IP N GIPA	IED R V N LL Y T	350
351	Y G VS R GR L DI	HR F V D A A STK	AA K LF G LFPR	KG T IA V GSDA	DL V V Y DP Q YR	400
401	GT I SV K T Q HV	NN D Y N GF E GF	E I D G R P SV V T	VR G K V AV R DG	Q F V G E K G W G K	450
451	LLR R EP M YF					

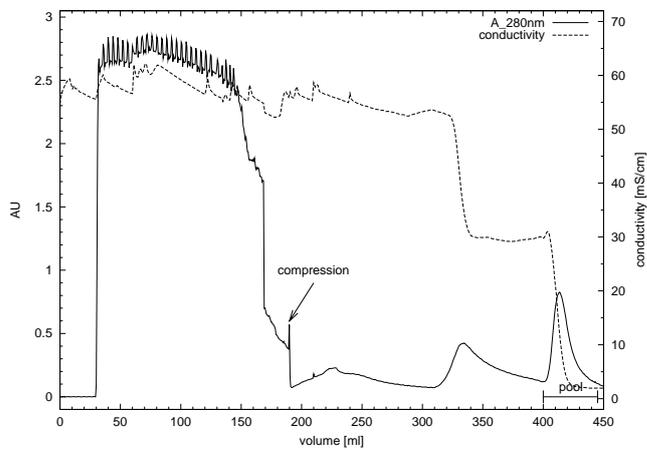
Abbildung 3.1: Sequenz der D-Hyd. Die Methionine sind unterstrichen. Met1 wird posttranslational prozessiert, Lys150 carboxyliert.

3.2 Aufreinigung

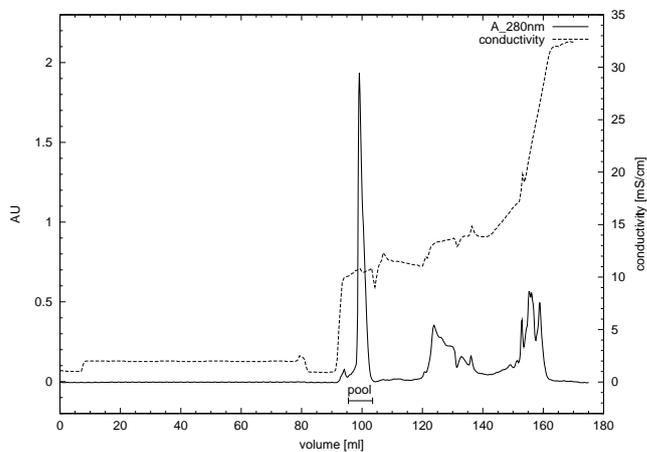
Die Aufreinigung der D-Hyd nach dem Protokoll 1 lieferte 10–15 mg homogenes Protein pro 1.2 l-Kultur. Nach Protokoll 2 wurden ebenfalls aus 1.2 l-Kultur 10–15 mg homogenes Protein erhalten. Für die Aufreinigung nach Protokoll 1 sind die Chromatogramme in Abbildung 3.2 dargestellt und die Ergebnisse der Aufreinigung in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Die Chromatogramme befinden für Protokoll 2 sind in Abbildung 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Ausbeuten und Aktivitäten der einzelnen chromatographischen Schritte für die Aufreinigung nach Protokoll 1

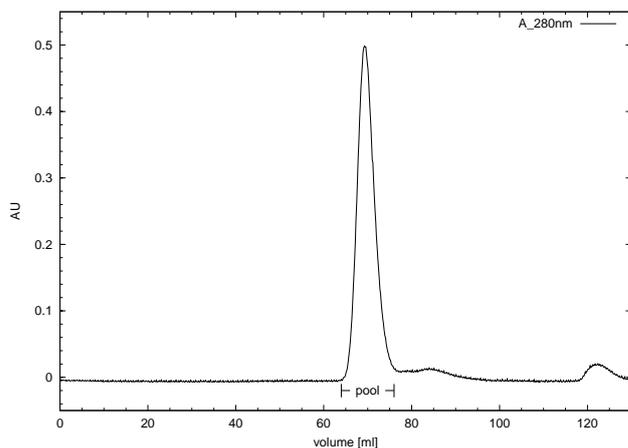
Schritt	Aktivität [nkat]	Ausbeute [%]	Protein [mg]	spez. Aktivität [nkat/mg]	Anreicherungs- faktor
Zelllysat	75500	100	250	300	1.0
STREAMLINE	65500	86	41	1600	5.3
Entsalzung	62000	82	38	1630	5.4
Anionentausch	41000	54	15	2730	9.1
Gelpermeation	28800	38	10	2880	9.6



a)
Hydrophobe Interaktionschromatographie mit STREAMLINE PHENYL.
Die Kompression des Säulenbettes ist markiert.

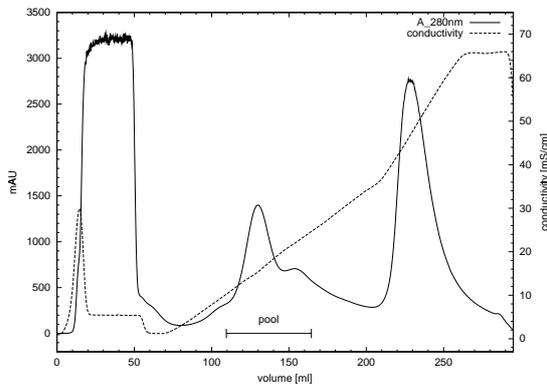


b)
Anionenausch Chromatographie mit MonoQ.

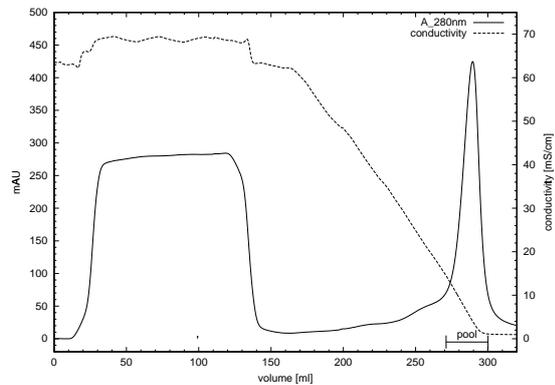


c)
Gelpermeationschromatographie mit Superdex 200.

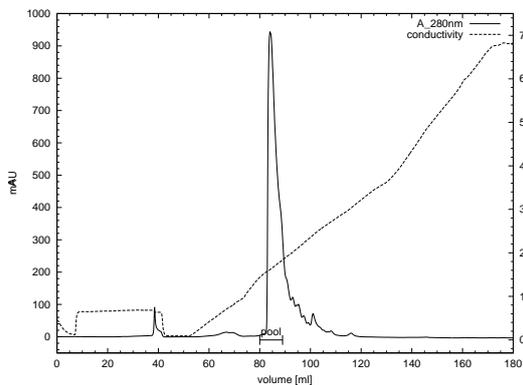
Abbildung 3.2: Chromatogramme der D-Hyd nach Protokoll 1, in denen die Absorbanz bei 280 nm und die Leitfähigkeit gegen das Elutionsvolumen aufgetragen sind. Die aktiven Fraktionen, die für die weiteren Schritte vereinigt wurden, sind markiert.



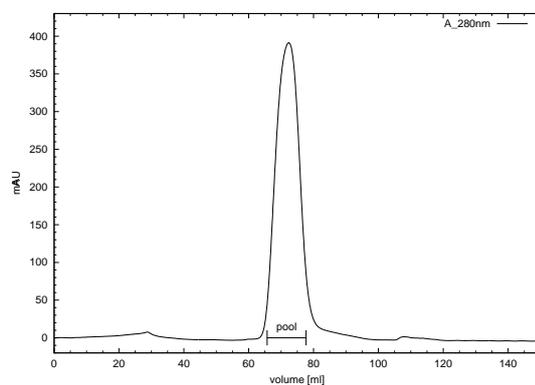
a) Ionentausch Chromatographie mit STREAMLINE Q im Festbett-Modus.



b) Hydrophobe Interaktionschromatographie mit Phenylsepharose CL-4B.



c) Ionentausch Chromatographie mit MonoQ.



d) Gelpermeationschromatographie mit Superdex 200.

Abbildung 3.3: Chromatogramme der D-Hyd nach Protokoll 2, in denen die Absorbanz bei 280 nm und die Leitfähigkeit gegen das Elutionsvolumen aufgetragen sind. Die aktiven Fraktionen, die für die weiteren Schritte vereinigt wurden, sind markiert.

3.3 Proteinanalytik

3.3.1 SDS-Gelelektrophorese

Die verschiedenen Schritte der Chromatographie wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. In Abbildung 3.4 ist ein SDS-Gel abgebildet, das die Aufreinigung nach Protokoll 1 zusammenfasst. Es zeigt eine nach Größe homogene Proteinfraktion.

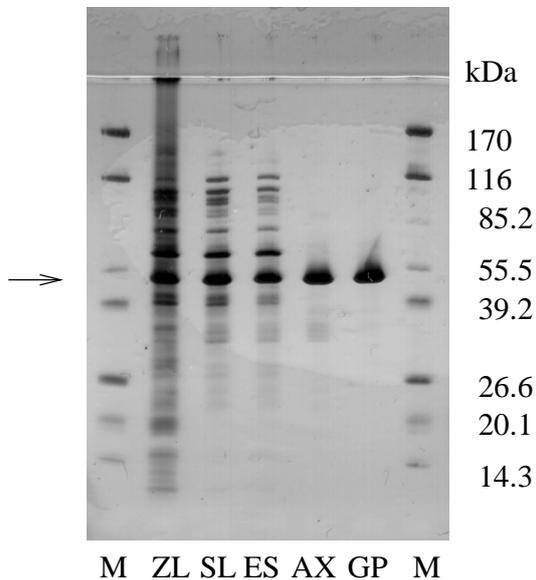


Abbildung 3.4:

SDS-Gel der chromatographischen Schritte, native D-Hyd, Protokoll 1.

M: Marker,

ZL: Zellysat,

SL: nach Streamline,

ES: nach Entsalzung,

AX: nach Ionentausch,

GP: nach Gelpermeation.

Der Pfeil markiert die D-Hyd.

Die Größen der Markerproteine sind in kDa angegeben.

3.3.2 Dynamische Lichtstreuung

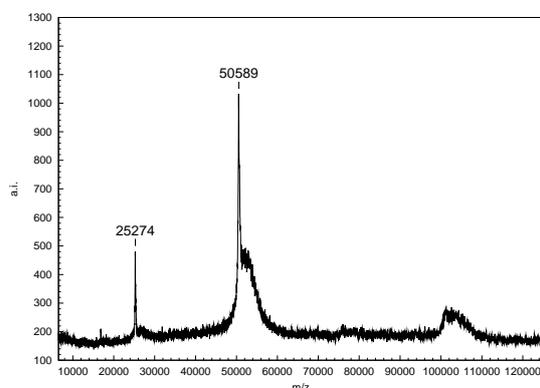
Mit der dynamischen Lichtstreuung wurde der hydrodynamische Radius gemessen und daraus das Aggregationsverhalten und das Molvolumen bestimmt. Die Werte für native D-Hyd und Se-Met-D-Hyd sind in der folgenden Tabelle 3.2 zusammengefasst. Auch in der dynamischen Lichtstreuung erwies sich die aufgereinigte D-Hyd als homogene Probe. Die Polydispersität liegt mit 11% deutlich unter den allgemein für kristallisierbare Proteine angenommenen Schwellenwert von 30% (Ferre-D'Amare & Burley, 1997). Das nach dem Modell für globuläre Proteine aus dem hydrodynamischen Radius berechnete Molgewicht entspricht einem Dimer. Die Strukturlösung lieferte jedoch eindeutige Hinweise auf ein Tetramer.

Tabelle 3.2: Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung von nativer und Se-Met-D-Hyd bei monomodaler Auswertung.

	native D-Hyd	Se-Met-D-Hyd
<i>Scans</i>	35	15
hydrodynamischer Radius [nm]	4.5	4.6
Polydispersität [%]	11	11
berechnetes Molgewicht [kDa]	113	119
<i>Baseline</i>	1.000	1.001
<i>SOS-Error</i>	1.146	0.437

3.3.3 MALDI-MS

Als weiteres Reinheitskriterium wurden von den D-Hyd MALDI-Massenspektren angefertigt (s. Abb. 3.5). Neben den Peaks der einfach und zweifach geladenen Molekülonen ($[MH_2]^{2+}$ und $[MH]^+$) und dem Dimer-Peak ($[M_2H]^+$) sind keine weiteren Peaks zu erkennen. Auch hierbei erweist sich die aufgereinigte D-Hyd als homogene Proteinfraction.

**Abbildung 3.5:**

MALDI-Massenspektrum von nativer D-Hyd. Die Massen von $[MH_2]^{2+}$ und $[MH]^+$ sind annotiert, $[M_2H]^+$ ist wegen der Breite des Peaks nicht annotiert. Der Buckel am $[MH]^+$ -Peak ist auf eine Fehljustierung des MALDI-Lasers zurückzuführen.

3.3.4 ESI-MS

Mittels ESI-Massenspektrometrie wurden die Molmassen der nativen D-Hyd und Se-Met-D-Hyd ermittelt und der Einbau von Selen kontrolliert. In der folgenden Tabelle 3.3 sind die gemessenen und die aus der Sequenz berechneten Massen gegenübergestellt. Innerhalb der Fehlergrenzen des ESI-Massenspektrometers in diesem Massenbereich ($\pm 0.1\%$) entspricht die gemessene Masse der erwarteten. Der Massenshift durch den vollständigen Einbau von Selen ist deutlich belegbar. Der Massenshift durch die Carboxylierung des Lysins liegt innerhalb der Fehlergrenze und ist somit nicht belegbar.

Tabelle 3.3: Ergebnisse der ESI-Massenspektrometrie im Vergleich mit den aus der Sequenz berechneten Massen. Das Met1 wurde nicht einbezogen, Lys150 wurde als Lysin (Lys) oder als carbamyliertes Lysin (Kcx) berechnet.

	native D-Hyd	Se-Met-D-Hyd
ESI-Masse	50.648 Da	51.098 Da
berechnet (Lys)	50.675 Da	51.097 Da
berechnet (Kcx)	50.719 Da	51.141 Da

3.4 Kristallisation

Für alle Kristallisationen der Kristalle der Raumgruppe $C222_1$ erwies sich *Mikro seeding* als die Technik der Wahl, um zuverlässig große Einkristalle zu erhalten. Die Qualität der Kristalle konnte durch mehrere *Mikro seeding*-Zyklen erhöht werden (s. Abb. 3.6a und b). Spontane Kristallisation bei höheren Fällungsmittelkonzentrationen war deutlich schlechter reproduzierbar und führte häufig zu verwachsenen Kristallen.

Bei der Kristallisation der Se-Met-D-Hyd wurde ein sich schnell bildender Niederschlag durch Zentrifugation entfernt. Beim Animpfen führte nur die Verwendung von Kristallsplittern nativer D-Hyd zum Erfolg, während mit Kristallsplittern der Se-Met-D-Hyd kein Effekt auf die Kristallisation zu bemerken war.

Die Kristallisation Kristallform der Raumgruppe $P2_12_12_1$ lieferte reproduzierbar nur Nadeln (s. Abb. 3.6c) Eine kompakte Kristallform (s. Abb. 3.6d) konnte nur in wenigen Fällen erhalten werden.

Zentriert orthorhombische Kristalle der nativen D-Hyd wuchsen innerhalb von wenigen Tagen bis zu 0.5 mm in jede Richtung (siehe Abbildung 3.6). Die entsprechenden Kristalle der Se-Met-D-Hyd wuchsen bis ca. 0.3 mm. Der große Kristall der Kristallform in Raumgruppe $P2_12_12_1$ (s. Abb. 3.6d) wuchs ohne Seeding nach mehreren Wochen und hatte Kantenlängen von $0.7 \times 0.7 \times 0.1$ mm. Verschiedene Seedingansätze ergaben nur nadelförmige Kristalle.

Die optimierten Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

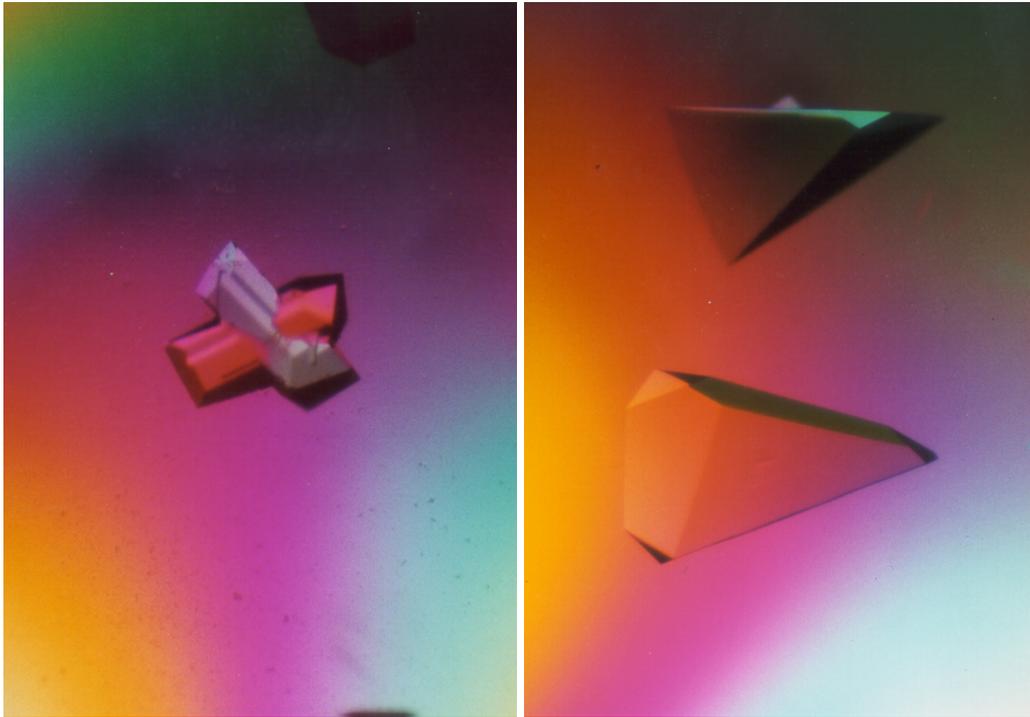
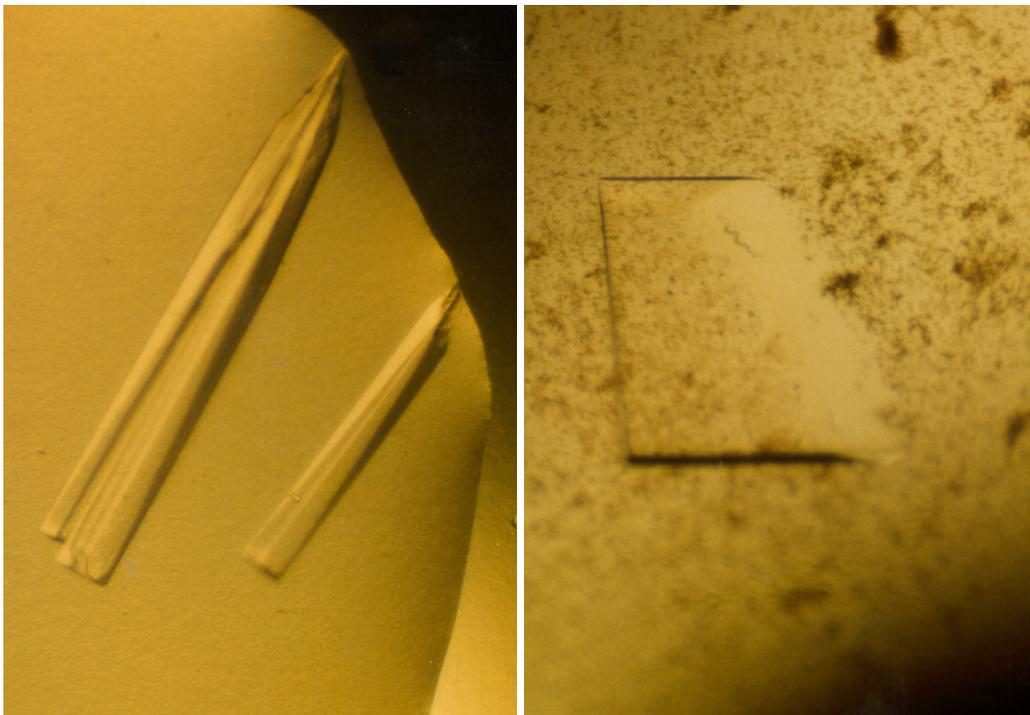
a) verwachsener $C222_1$ -Kristallb) $C222_1$ -Einkristallec) Nadeln der $P2_12_12_1$ -Kristallformd) Einkristall der $P2_12_12_1$ -Kristallform**Abbildung 3.6:** Verschiedene Kristalle der D-Hyd.

Tabelle 3.4: optimierte Kristallisationsbedingungen.

native D-Hyd, C222₁	
Temperatur	20°C
Proteinkonzentration	5.5 mg/ml
Proteinpuffer	20 mM Tris-HCl 8.0
Reservoir	1.65 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 mM HEPES/NaOH pH 7.5, 5% (v/v) PEG 400
Tropfen	4.5 µl Protein + 3.0 µl Reservoir + 0.5 µl Impflösung
Methode	sitzender Tropfen
Se-Met-D-Hyd, C222₁	
Temperatur	20°C
Proteinkonzentration	10 mg/ml
Proteinpuffer	20 mM Tris-HCl 8.0, 20 mM DTT
Reservoir	1.65 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 mM HEPES/NaOH pH 7.5, 5% (v/v) PEG 400, 20 mM DTT
Tropfen	3.0 µl Protein + 3.0 µl Reservoir + 0.5 µl Impflösung mit nativer D-Hyd
Methode	sitzender Tropfen
native D-Hyd, P2₁2₁2₁	
Temperatur	20°C
Proteinkonzentration	11.5 mg/ml
Proteinpuffer	100 mM Tris-HCl 8.0, 200 mM NaCl, 0.02% (w/v) NaN ₃
Reservoir	30% (w/v) PEG 6000, 100 mM Cacodylat-HCl pH 6.5, 200 mM Natriumacetat
Tropfen	3.0 µl Protein + 3.0 µl Reservoir
Methode	hängender Tropfen

3.5 Diffraktionsmessungen

In der Tabelle 3.5 sind die Statistiken der folgenden Röntgendatensätze zusammengestellt:

- drei MAD-Datensätze bei *remote*, *peak* und *inflection* Wellenlänge
August 1999
C222₁
Einheitszelle: a=125.10 Å, b=215.18 Å, c=207.65 Å
- native D-Hyd bis 1.7 Å Auflösung
September 1999
C222₁
Einheitszelle: a=125.86 Å, b=215.83 Å, c=207.50 Å
- native D-Hyd bis 1.3 Å Auflösung
August 2000
C222₁
Einheitszelle: a=126.24 Å, b=215.93 Å, c=207.91 Å
- native D-Hyd in P2₁2₁2₁
November 1997
P2₁2₁2₁
Einheitszelle: a=83.15 Å, b=161.54 Å, c=168.51 Å

In Abbildung 3.7 sind das Fluoreszenzspektrum und die mit CHOOCH (Evans & Pettifer, 2001) nach der Kramers-Kronig-Beziehung berechneten Wellenlängenabhängigkeiten der anomalen und dispersiven Streubeiträge dargestellt. Aus diesen Spektren wurden die Wellenlängen für den *peak* und den *inflection*-Datensatz ermittelt.

Die drei MAD-Datensätze wurden für die erste Phasierung verwendet, der native Datensatz für den Modellbau und die erste Verfeinerung. Obwohl die nativen Kristalle der Raumgruppe C222₁ deutlich weiter als bis 1.7 Å Auflösung streuten (s. Abb. 3.8a) musste aus Zeitgründen bei der ersten Messung die Auflösung

auf 1.7\AA beschränkt werden. Erst bei dem zweiten nativen Datensatz konnte die volle Streuleistung der Kristalle bis 1.3\AA Auflösung (s. Abbildung 3.8b und c) ausgenutzt werden.

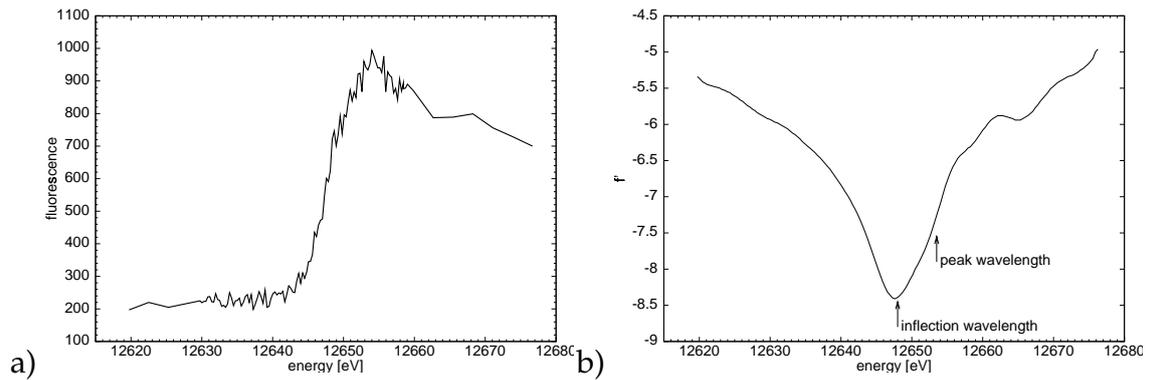


Abbildung 3.7:

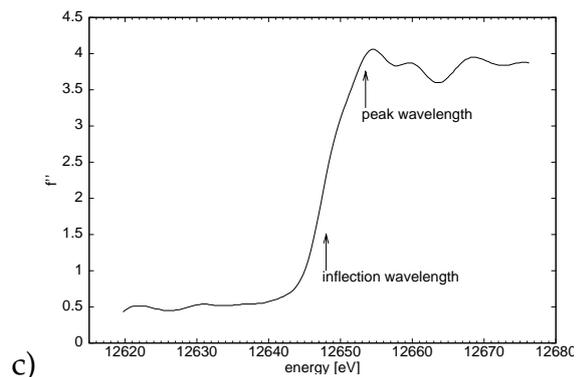
Se-MAD-Diffraktionsexperiment

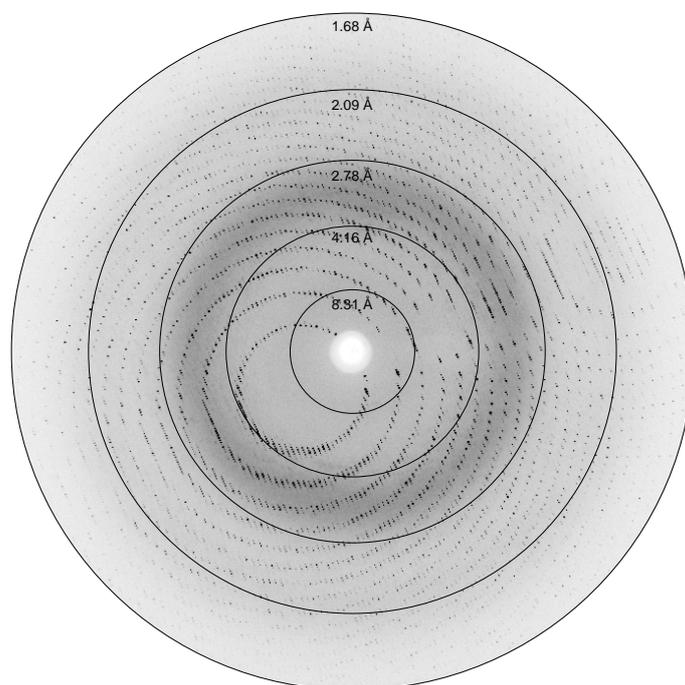
a) Röntgen-Fluoreszenzspektrum

b) dispersive Streubeiträge

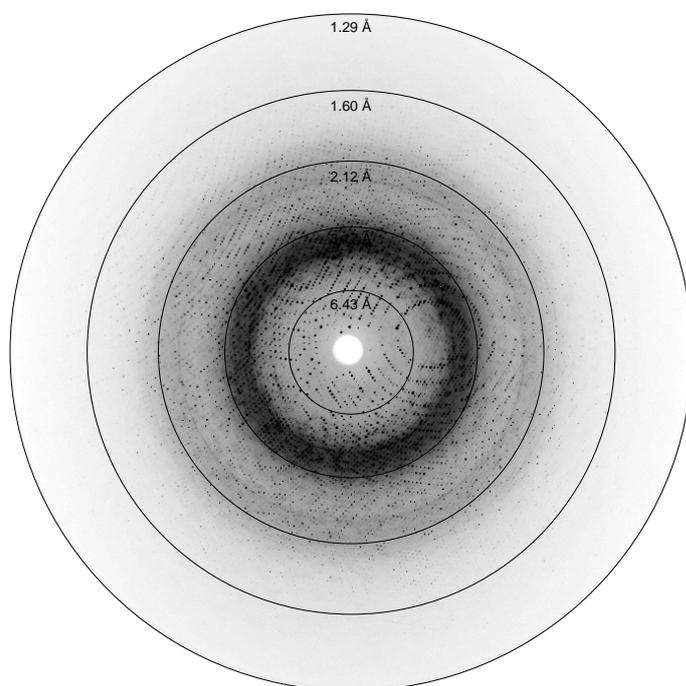
c) anomale Streubeiträge

Die verwendeten Wellenlängen für den *peak* und den *inflection*-Datensatz sind markiert.

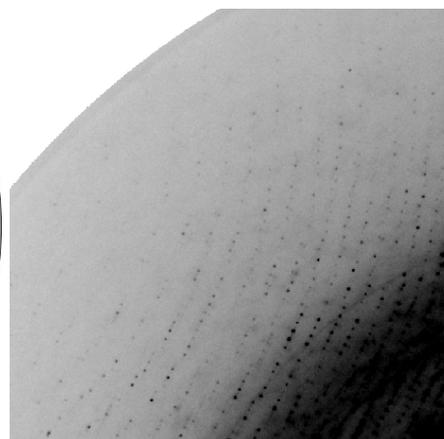




a) aus Datensatz bis 1.7Å Auflösung



b) aus Datensatz bis 1.7Å Auflösung



c) Ausschnitt aus b) zwischen 1.29Å und 1.60Å

Abbildung 3.8:

Diffraktionsbilder der nativen D-Hyd Kristalle der Raumgruppe $C222_1$:

a) vom Datensatz bis 1.7Å Auflösung

b) vom Datensatz bis 1.3Å Auflösung

c) Ausschnitt aus b) zwischen 1.29Å bis 1.60Å Auflösung

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der Röntgen Datensätze der Se-Met-D-Hyd und der nativen D-Hyd in den Raumgruppe $C222_1$ und $P2_12_12_1$. Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die höchsten Auflösungsstufen. Die statistischen Werte wurden mit den Programmen NOVEL_R (Diederichs & Karplus, 1997) and TRUNCATE (CCP4, 1994) berechnet. Bei der Berechnung der Multiplizitäten wurden auch bei den MAD-Datensätzen die Friedelpaare zusammengefasst. Die Werte für f' und f'' sind die verfeinerten Werte aus SOLVE (Terwilliger & Berendzen, 1999).

Datensatz	Se-Met-D-Hyd, MAD			native D-Hyd		$P2_12_12_1$
	remote	peak	inflection	hoch	sehr hoch	
Wellenlänge[Å]	0.9184	0.9794	0.9797	0.8439	0.8420	1.5417
Auflösung [Å]	25–2.50	25–2.50	25–2.50	20–1.70	50–1.295	25–2.60
höchste Auflösungsschale	2.56–2.50	2.56–2.50	2.56–2.50	1.74–1.70	1.33–1.295	2.69–2.60
$hkl_{gemessen}^1$	347 719	429 085	393 631	1 159 228	2 976 914	416 020
hkl_{unique}^2	96 388	96 531	96 523	294 581	693 388	70 394
Vollständigkeit [%]	99.8 (99.1)	100.0 (99.9)	100.0 (99.8)	96.7 (95.5)	99.7 (98.0)	99.9 (99.9)
Redundanz	3.6 (3.2)	4.4 (4.1)	4.1 (3.7)	3.9 (3.9)	4.3 (3.7)	5.9 (5.7)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	12.3 (6.2)	13.0 (6.0)	14.1 (6.8)	15.8 (11.2)	17.7 (2.4)	12.0 (4.9)
R_{merge}^3 [%]	6.9 (18.2)	7.4 (17.8)	6.2 (15.8)	7.2 (10.9)	3.1 (42.5)	11.7 (36.3)
R_{meas}^4 [%]	8.1 (21.8)	8.4 (20.4)	7.2 (18.4)	8.3 (12.7)	3.4 (49.6)	12.8 (39.9)
Wilson B-Factor	33.9	32.6	32.6	14.5	16.6	38.8
f' [e ⁻]	-3.14	-10.64	-13.73			
f'' [e ⁻]	4.80	10.13	4.21			

¹⁾ Anzahl der gemessenen Reflexe vor dem Zusammenfassen.

²⁾ Anzahl der unitären Reflexe vor dem Zusammenfassen.

³⁾ $R_{sym} = \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl) - \langle I_i(hkl) \rangle / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$

⁴⁾ $R_{meas} = \sum_{hkl} \sqrt{n(hkl)} / (n(hkl) - 1) \sum_i I_i(hkl) - \langle I_i(hkl) \rangle / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$

3.6 Rechnungen mit den nativen Datensätzen

3.6.1 Bestimmung der Raumgruppen

Die Symmetrie der Röntgenreflexe der aus Ammoniumsulfat kristallisierten Kristallform wies auf eine orthorhombische Laue-Symmetrie hin. Eine hexagonale Laue-Symmetrie schien zunächst mit Daten von niedriger Auflösung ebenfalls möglich. Bei Verwendung von Daten mit höherer Auflösung konnte während Indizierung, Integration und Skalierung eine hexagonale Laue- bzw. Raumgruppe ausgeschlossen werden. Aus den systematischen Auslöschungen nach der Skalierung und in den einzelnen Röntgenbildern konnte dann eindeutig die Raumgruppe $C222_1$ bestimmt werden. Analog wurde $P2_12_12_1$ als Raumgruppe der anderen Kristallform bestimmt.

3.6.2 D-Hyd, $C222_1$

3.6.2.1 Kristallpackung

Bei Verwendung der Daten des nativen Datensatzes, eines Molgewichtes von 50.7 kDa und einer Proteindichte von 1.22 mg/ml (Andersson & Hovmoller, 2000) die folgenden Packungsdichten berechnet (s. Tab. 3.6, Matthews, 1968).

Tabelle 3.6: Packungsdichte

Monomere	$V_M [\frac{\text{\AA}^3}{\text{Da}}]$	Lösungsmittelanteil
4	3.49	61%
6	2.33	41%

Beide Lösungen sind im Bereich der bei Proteinkristallen üblichen Werte. Deshalb konnte an dieser Stelle noch keine eindeutige darüber Aussage getroffen werden, ob sich vier oder sechs Monomere in der asymmetrischen Einheit befinden. Wegen der bei Hydantoinasen üblichen tetrameren Quartärstruktur wurden

zunächst vier Monomere favorisiert. Erst nach Lösen der Se-Substruktur konnten sechs Monomere in der asymmetrischen Einheit bestätigt werden. Die hohe Packungsdichte ist im Einklang mit der hohen Streukraft der Kristalle.

3.6.2.2 Selbstrotationsfunktion

Die Selbstrotationsfunktionen für Rotationswinkel von $\kappa=180^\circ$, $\kappa=120^\circ$ und $\kappa=60^\circ$ unter Verwendung von Daten von 20–3.5 Å sind in Abbildung 3.9 dargestellt. Bei der $\kappa=180^\circ$ -Suche gibt es mehrere Gruppen von Peaks mit unterschiedlichen Peakhöhen (s. Tab. 3.7).

Tabelle 3.7: Peaks der Selbstrotationsfunktion

$I/\sigma(I)$	Ψ	Φ	Ursprung
16.7	0	0	kristallographisch
16.7	90	0, 90	kristallographisch und NCS
5.7	90	30, 60, 90, 120	NCS

Die Selbstrotationsfunktion ist konsistent mit den folgenden Anordnungen von sechs Monomeren:

Drei Dimere, deren interne zweizählige Achsen in der *ab*-Ebene liegen und bei denen die drei- und sechszähligen Achsen durch Symmetrieoperationen zwischen den Dimeren entstehen.

Zwei Trimere mit internen drei- und sechszähligen Achsen. Die zweizähligen Achsen entstehen durch NCS zwischen den Trimeren.

Drei halbe Tetramere mit interner 222-Symmetrie. In diesem Fall gibt es eine Überlagerung der kristallographischen und NCS-Peaks. Die drei- und sechszähligen Achsen entstehen durch NCS zwischen den einzelnen Tetrameren. Diese Anordnung erwies sich nach Lösen der Struktur als die richtige Interpretation.

Bei vier Monomeren in der asymmetrischen Einheit mit einer internen 222-Symmetrie lässt sich direkt neben den kristallographischen Peaks nur ein 222-System bei den zweizähligen Achsen erklären, nicht jedoch ein weiteres. Ebenso wären die drei und sechszähligen Achsen nicht direkt erklärbar.

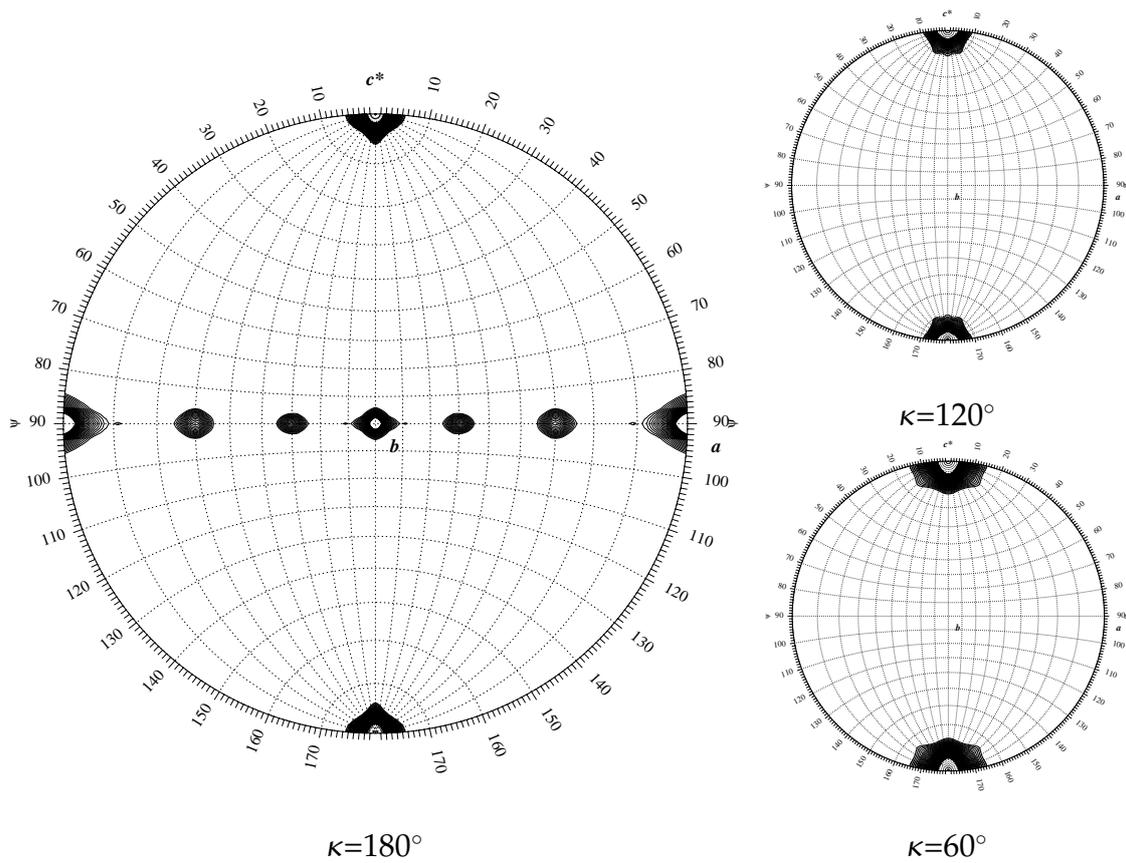


Abbildung 3.9:

Selbstrotationsfunktionen D-Hyd der Raumgruppe $C222_1$ bei verschiedenen κ -Winkeln. Die Konturierung beginnt bei 2.5σ und ist in 0.2σ -Schritte unterteilt.

3.6.3 D-Hyd, $P2_12_12_1$

Die Packungsdichte der D-Hyd der Raumgruppe $P2_12_12_1$ beträgt bei vier Monomeren in der asymmetrischen Einheit $V_M=2.79 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, was bei einer angenommenen Proteindichte von 1.22 mg/ml einem Lösungsmittelanteil von 61 % entspricht. Die Selbstrotationsfunktion (s. Abbildung 3.10) ist ebenfalls mit einem Tetramer mit einer internen 222-Symmetrie vereinbar.

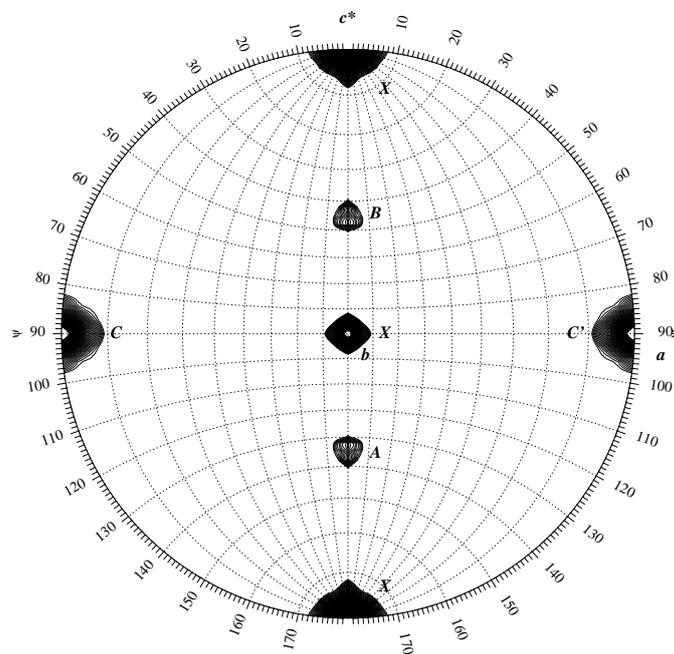


Abbildung 3.10:

Selbstrotationsfunktion der D-Hyd der Raumgruppe $P2_12_12_1$ bei $\kappa=180^\circ$ und einer Konturierung ab 2σ in 0.2σ -Schritten. Die Peaks ABC, bzw. ABC' bilden ein 222-System, die Peaks X sind rein kristallographische Peaks.

3.6.4 L-Hyd

Die Packungsdichte der monoklinen L-Hyd beträgt bei 4 Monomeren in der asymmetrischen Einheit $V_M=2.88 \text{ \AA}^3/\text{Da}$. Dies entspricht bei einer angenommenen Proteindichte von 1.22 mg/ml einem Lösungsmittelanteil von 63%. Die Selbstrotationsfunktion (s. Abbildung 3.11 und [May et al., 1996](#)) ist mit einem Tetramer mit einer internen 222-Symmetrie vereinbar. Die beiden 222-Systeme, die aus den Peaks ABC und A'B'C' bestehen, sind über die zweizählige Schraubenachse miteinander verbunden. Die Peaks A und A' fallen aufeinander, weil sie senkrecht zur kristallographischen zweizähligen Schraubenachse liegen. Diese ist auch der Grund für die Entstehung des Klug-Peaks D aus C und C'.

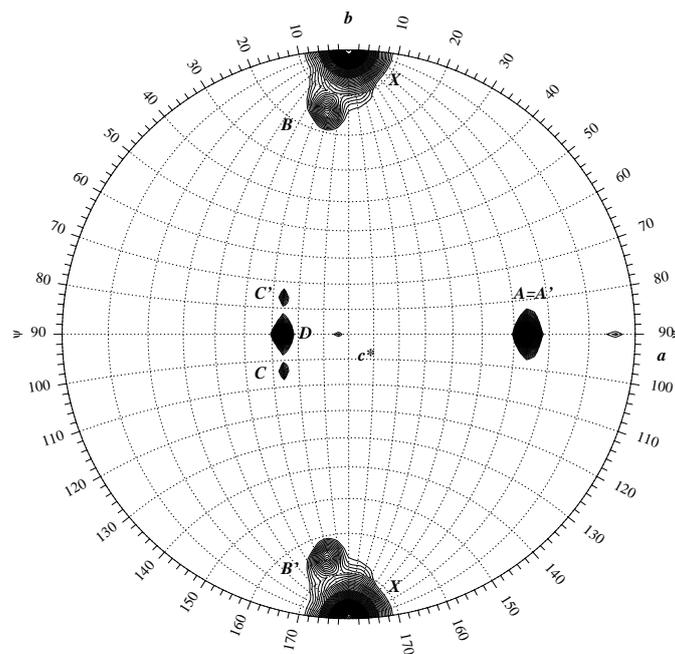


Abbildung 3.11:

Selbstrotationsfunktion der monoklinen L-Hyd bei $\kappa=180^\circ$ und einer Konturierung ab 2σ in 0.1σ -Schritten. Die Peaks ABC, bzw. A'B'C' bilden ein 222-System, die Peaks X sind rein kristallographische Peaks, der Peak D ist der Klug-Peak von C und C'.

3.7 Strukturlösungen

3.7.1 D-Hyd, C222₁

3.7.1.1 Suche nach Derivaten

Bei der Suche nach Schwermetallderivaten der D-Hyd konnte nur in einem Fall ein schwaches Derivat gefunden werden. Generell zeigten die Kristalle in quecksilberchloridhaltigen Lösungen schnell Risse. Bei dem schwachen Derivat waren die Kristalle mit 0.01 mM HgCl₂ inkubiert worden. Nach der Strukturlösung ließen sich mit diesem Datensatz in jedem Monomer ein an ein Cystein gebundenes Quecksilber nachweisen. Für eine Strukturlösung war dieses Derivat jedoch nicht gut genug.

3.7.1.2 Se-Substruktur

Für die Bestimmung und Verfeinerung der 54 Positionen der der Se-Substruktur der D-Hyd wurde das Programm SOLVE (Terwilliger & Berendzen, 1999) verwendet. Dabei erwies es sich als notwendig, dass die Daten von allen drei Datensätzen verwendet wurden, dass die Daten mit dem lokalen Skalierungsalgorithmus von SOLVE zusammengefasst und gegeneinander skaliert wurden und dass die obere Auflösung auf 3.0 Å erniedrigt wurde. Mit SOLVE wurden aus den verfeinerten Selen-Positionen die ersten Phasen mit einer *figure of merit* von FOM(20-3Å)=0.69 und FOM(3.1-3.0Å)=0.58 berechnet.

Das Programm SnB (Weeks & Miller, 1999, Version 2.0), das bei der Lösung der meisten anderen großen Substrukturen erfolgreich verwendet worden war (Deacon & Ealick, 1999), fand bei keiner Wellenlänge eine Lösung.

3.7.1.3 Dichtemodifikation

Die aus SOLVE erhaltene Elektronendichte hatte bereits eine hohe Qualität. Die Konnektivität des Proteinmodells war in weiten Bereichen deutlich sichtbar.

Durch verschiedene Dichtemodifikationstechniken wurde die Qualität der Elektronendichten signifikant verbessert.

Aus der Dichte nach einfacher Solvensglättung war die Ausdehnung eines Dimers und der Monomere deutlich erkennbar (s. Abb. 3.12). Es ließ sich ein Rückgrat (*bones*) durch die Elektronendichte legen, so dass eine Monomermaske erstellt werden konnte. Die nicht-kristallographischen Symmetrieeoperatoren ließen sich aus den Selen-Positionen mit Hilfe des Programms FINDNCS bestimmen. Diese konnten dann mit Hilfe des Programms DM verfeinert werden. Nach der Phasenextension auf 1.7Å Auflösung unter nicht-kristallographischer Mittelung war die (experimentelle!) Elektronendichte sehr detailliert, so dass in den aromatischen Ringen bereits Löcher zu erkennen waren (s. Abb. 3.13).

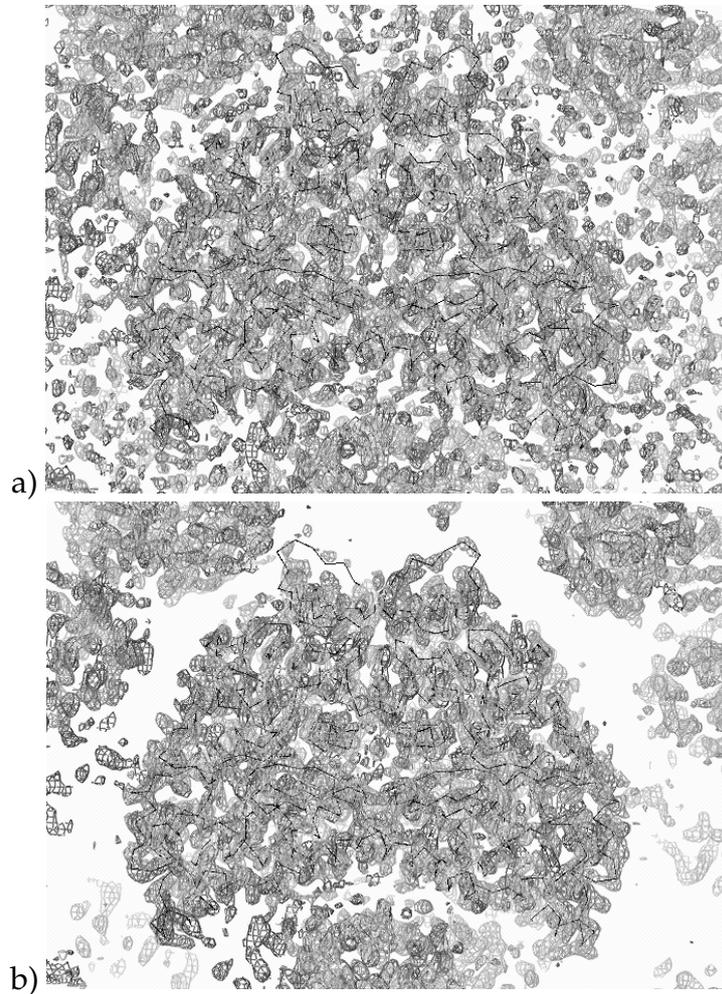


Abbildung 3.12:

Verbesserung der Qualität der Phasen durch einfache Dichtemodifikation:

a) Dichte (1σ) mit ersten MAD-Phasen aus SOLVE,

b) Dichte (1σ) nach einfacher Dichtemodifikation überlagert mit einem Dimer der D-Hyd.

Die Abbildungen zeigen, dass nach einfacher Dichtemodifikation die Ausdehnung des Dimers deutlich erkennbar wird.

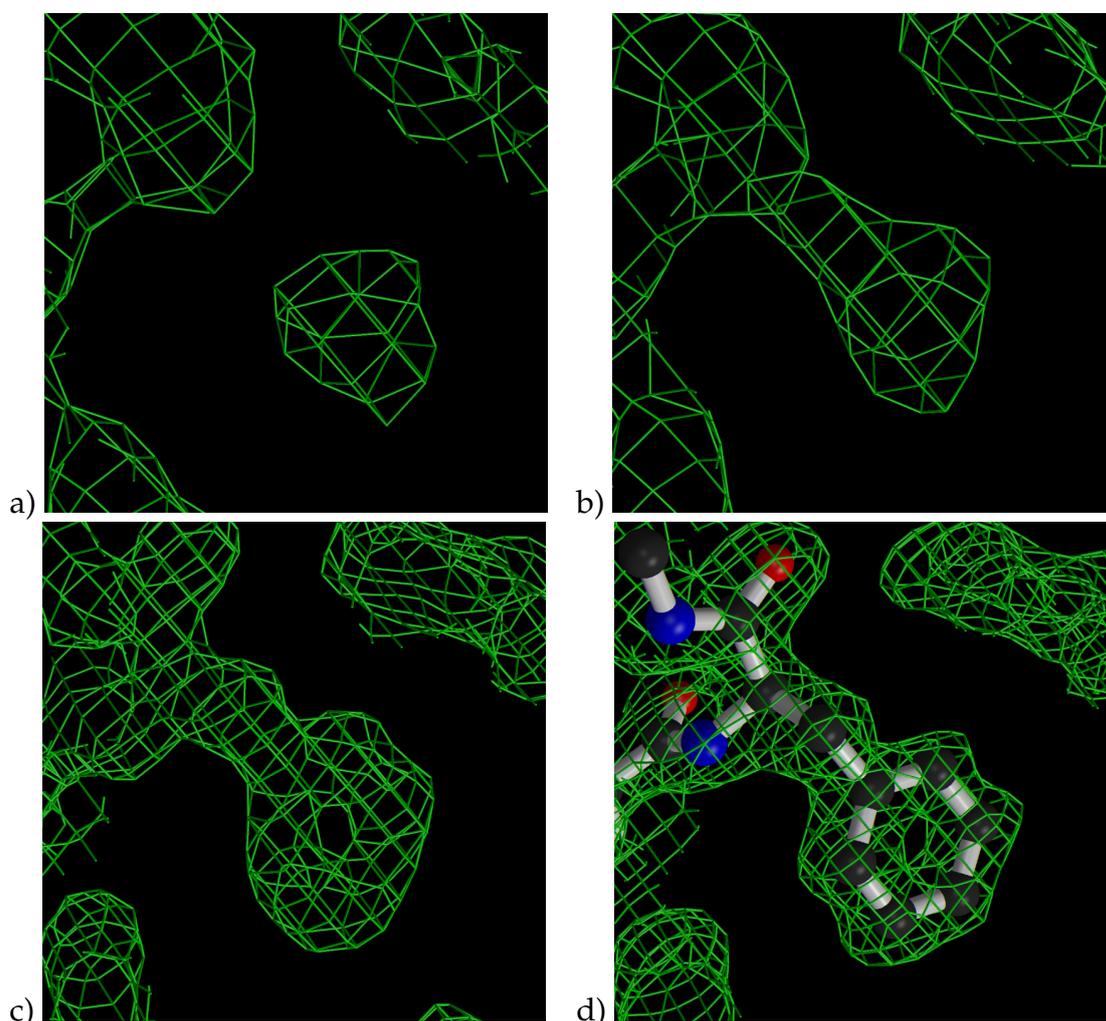


Abbildung 3.13:

Verbesserung der Detailgenauigkeit in den experimentellen Elektronendichten durch Dichtemodifikationstechniken:

a) erste Dichte aus SOLVE bei 3 Å,

b) Dichte nach Solvensglättung, Histogrammanpassung und sechsfacher nicht-kristallographischer Mittelung bei 3 Å,

c) Dichte nach zusätzlicher Phasenerweiterung auf 1.7Å,

d) zum Vergleich dazu die sigmaa-gewichtete $2F_0F_c$ -Dichte mit dem verfeinerten Modell bei 1.3Å Auflösung.

3.7.1.4 automatischer Modellbau mit ARP/wARP

Wegen der hohen Qualität der phasenerweiterten und nicht-kristallographisch gemittelten experimentellen Elektronendichte bei 1.7Å Auflösung ließ sich die Struktur der D-Hyd mit der automatischen Modellierungsroutine *warpNtrace* des Programms ARP/wARP modellieren. Der Fortschritt des Modellbaus ist in der Tabelle 3.8 und in Abbildung 3.14 zusammengefasst.

Tabelle 3.8: Fortschritt beim automatischen Bau des Hybrid-Modells der D-Hyd mit ARP/wARP. Ein Zyklus besteht je 10 Verfeinerungsrunden und einem anschließenden Modellbau.

Zyklus	Ketten	Residuen	Konnektivität
1	114	2262	0.89
2	59	2548	0.95
3	45	2613	0.96
4	40	2631	0.97
5	37	2643	0.97

Bereits nach dem ersten (großen) Zyklus konnten viele Residuen mit einer hohen Konnektivität gefunden werden. Nach fünf Zyklen konvergierte der Modellbau des Hybrid-Modells. Da die Lagen der Monomere bereits aus vorbereitenden Betrachtungen bekannt war, konnten nun für das *side chain docking*, das heißt die Überführung des Hybrid-Modells in ein Protein-Modell, fünf Proteinketten mit einer Länge von 32–155 Residuen (Ketten CJLST, s. Tab. 3.9) für ein Monomer ausgesucht werden.

In der Tabelle 3.9 ist das Ergebnis des *side chain docking* für das erste Monomer dargestellt. Für 441 der 458 Residuen (= 96%) des Monomers A konnte ARP aus den fünf angegebenen Ketten ein Modell bauen. Für 337 der 458 Residuen (= 74%) fand ARP in der internen Rotamer-Bibliothek auch ein sinnvolles Rotamer. Die nicht interpretierten Bereiche, zum Beispiel zwischen den Residuen 35–41, sind auch die flexibelsten Bereiche der Struktur. Die automatisch modellierte

Struktur hat zur endgültigen Struktur von Monomer A RMS-Abweichungen von $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha} = 0.14 \text{ \AA}$ und $\text{RMSD}_{\text{alleAtome}} = 0.49 \text{ \AA}$.

Die restlichen fünf Monomere der asymmetrischen Einheit wurden dann aus dem ersten Monomer durch Anwendung der bekannten NCS-Operationen erstellt.

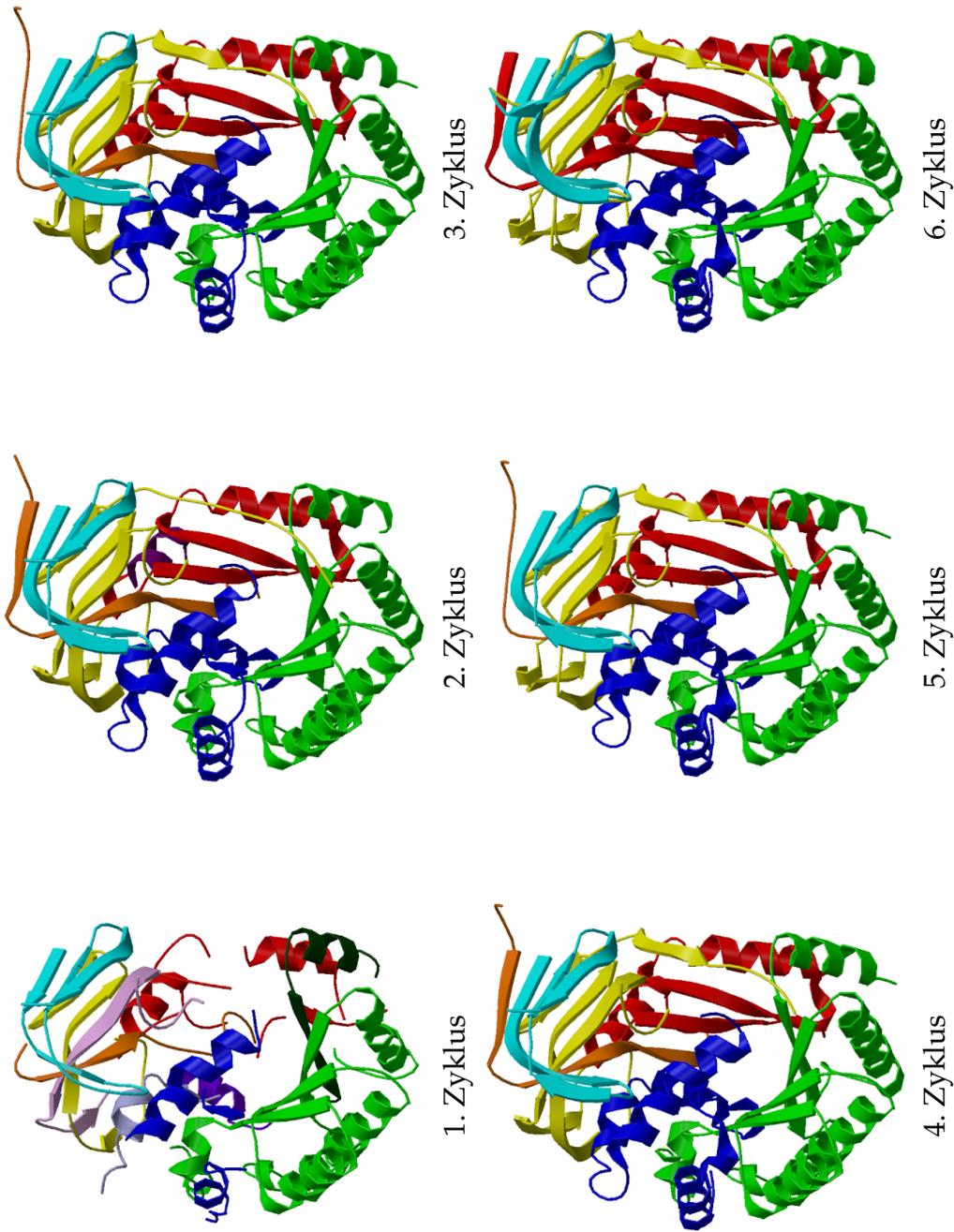


Abbildung 3.14: Fortschritt beim automatischen Bau des Hybrid-Modells der D-Hyd mit ARP/wARP. Gezeigt sind die Proteinanteile des Hybridmodells in den einzelnen Zyklen (vgl. Tabelle 3.8).

3.7.2 D-Hyd, $P2_12_12_1$

Bei der Strukturlösung der D-Hyd der Raumgruppe $P2_12_12_1$ wurde ein Monomer der bei 1.7Å Auflösung verfeinerten D-Hyd der Raumgruppe $C222_1$ verwendet. Es wurde mit nur einem Monomer gerechnet, um mögliche Effekte der Kristallpackung auf die Quartärstruktur zu berücksichtigen. Bereits bei der Kreuzrotationssuche hoben sich die vier Lösungen für die einzelnen Monomere deutlich von den übrigen Lösungen ab. In der folgenden Tabelle 3.10 sind die Rotationswinkel und Translationsvektoren für das Monomer A der D-Hyd der Raumgruppe $C222_1$ nach der Starre-Körper-Verfeinerung zusammengefasst.

Das entstandene Tetramer hat eine interne 222-Symmetrie und in der anschließenden Starre-Körper-Verfeinerung R-Werte von $R_{work}=29.0\%$ und $R_{free}=30.3\%$.

Tabelle 3.10: Ergebnisse der Kreuzrotations- und Translationsfunktion nach Starrer-Körper-Verfeinerung.

Monomer	θ_1	θ_2	θ_3	trans x	trans y	trans z
1	46.1°	84.3°	280.0°	8.9Å	76.4Å	12.6Å
2	225.3°	74.8°	106.2°	27.3Å	-67.4Å	108.2Å
3	131.2°	83.5°	81.0°	34.3Å	-8.3Å	148.6Å
4	312.9°	76.3°	251.7°	-8.7Å	18.1Å	32.1Å

3.7.3 L-Hyd

Die Rechnungen für den molekularen Ersatz waren zunächst mit Monomeren und Dimeren nativer D-Hyd, poly-Ala-D-Hyd und in wenig konservierten Bereichen verkürzter poly-Ala-D-Hyd mit den Programmen REPLACE, AMORE und CNS durchgeführt worden.

Da mit einem Monomer nach einem Tetramer gesucht wurde, konnte man keine hohen Korrelationswerte erwarten. Um die Korrelationen und damit

die Signifikanz richtiger Lösungen zu erhöhen, wurde einerseits mit einem Dimer gerechnet. Im Nachhinein erklärt die leicht unterschiedliche Anordnung der Monomere in den Tetrameren der D- und L-Hyd (s. Abbl. 5.11) den Misserfolg dieses Ansatzes. Andererseits wurde die aus der Selbstrotationsuche bekannte nicht-kristallographische Symmetrie in der *locked cross rotation function* und der *locked translation function* berücksichtigt. Auch dies führte zu keiner Verbesserung.

Desweiteren war im Nachhinein zu beobachten, dass bei den Kreuzrotationsfunktionen die richtigen Lösungen durchaus unter den 20 oberen Lösungen zu finden waren. Diese ließen sich jedoch durch Pattersonkorrelationsverfeinerung und Translationsfunktion nicht signifikant von den anderen Lösungen hervorheben.

Mit einem Homology Modelling konnte unter Verwendung der Strukturen der D-Hyd und der Urease aus *Klebsiella aerogenes* ein Modell der L-Hyd erstellt werden. Dieses Modell hat im Vergleich zur verfeinerten Struktur eine RMS-Abweichung von $\text{RMSD}_{C\alpha} = 3.0 \text{ \AA}$ über alle Residuen und von $\text{RMSD}_{C\alpha} = 1.0 \text{ \AA}$ über die 333 Residuen, die sich bei einer oberen Zuordnungsgrenze anpassen ließen.

In der Kreuzrotationsrechnung mit dem Homologiemodell hoben sich mehrere Lösungen leicht von den übrigen ab. In Tabelle 3.11 sind die besten 10 Lösungen der Kreuzrotationssuche mit den Score-Werten aufgelistet. Die richtigen Lösungen sind markiert.

Diese Lösungen waren auch die besten Lösungen nach der Pattersonkorrelationsverfeinerung und Translationsfunktion. In Tabelle 3.12 sind die Rotationswinkel und Translationsvektoren für die vier Monomere zusammengefasst.

Die vier Lösungen ließen sich durch Anwendung kristallographischer Symmetrie zu einem Tetramer zusammensetzen und ergaben in der ersten Starre-Körper-Verfeinerung R-Werte von $R_{\text{work}}=51.7\%$ und $R_{\text{free}}=52.6\%$.

Tabelle 3.11: Ergebnisse der Kreuzrotationssuche. Die richtigen Lösungen sind mit einem * markiert.

Rang	θ_1	θ_1	θ_1	score	
1	81.5°	34.9°	91.9°	0.0479	*
2	269.3°	16.8°	79.9°	0.0465	*
3	314.8°	34.9°	26.8°	0.0421	*
4	213.9°	19.1°	143.6°	0.0400	
5	209.1°	34.9°	147.4°	0.0392	
6	44.3°	48.4°	132.5°	0.0384	*
7	37.7°	55.3°	131.1°	0.0375	
8	66.2°	79.9°	118.7°	0.0357	
9	98.4°	28.0°	72.7°	0.0356	
10	65.9°	43.9°	110.9°	0.0355	

Tabelle 3.12: Ergebnisse der Translationssuche und Starre-Körper-Verfeinerung.

Monomer	θ_1	θ_2	θ_3	trans x	trans y	trans z
1	77.2°	34.3°	95.7°	33.5Å	6.2Å	4.2Å
2	265.2°	17.9°	82.9°	3.7Å	26.1Å	52.6Å
3	316.8°	34.5°	24.7°	-10.5Å	53.2Å	38.9Å
6	44.3°	48.4°	132.6°	23.2Å	45.8Å	-10.7Å

3.8 Verfeinerungen

Der Verlauf der Verfeinerungen für

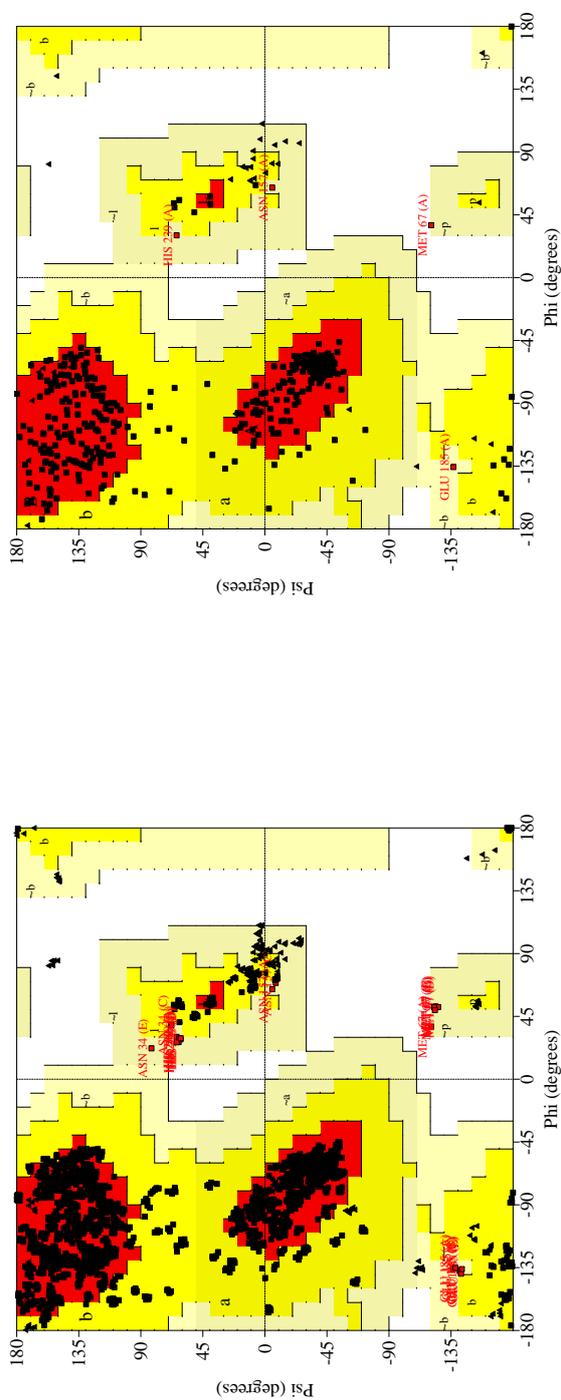
- die D-Hyd der Raumgruppe $C222_1$ bei 1.7Å Auflösung (Tab. 3.13),
- die D-Hyd der Raumgruppe $C222_1$ bei 1.3Å Auflösung (Tab. 3.14),
- die D-Hyd der Raumgruppe $P2_12_12_1$ bei 2.6Å Auflösung (Tab. 3.15) und
- die L-Hyd der Raumgruppe $P2_1$ bei 2.6Å Auflösung (Tab. 3.16)

ist in den angegebenen Tabellen zusammengefasst.

In der Tabelle 3.17 sind die Statistiken der aller verfeinerten Modelle zusammengefasst.

Tabelle 3.13: Zusammenfassung der wichtigsten Schritte der Verfeinerung der D-Hyd der Raumgruppe C222₁ bei 1.70Å Auflösung mit CNS. In der Spalte NCS ist angegeben, ob die NCS als *constraint* (const.) oder als *restraint* (r, mit der jeweiligen Stärke) berücksichtigt wurde. Kcx bezeichnet ein carboxyliertes Lysin.

Schritt	Auflösung [Å]	NCS	R _{work} [%]	R _{free} [%]	Wasser	Modell
0	20-2.00	const.	35.5	35.4	—	Monomer aus ARP (452 Residuen)
1	20-2.00	const.	31.4	32.1	—	Monomer aus ARP (452 Residuen)
2	20-2.00	const.	30.5	31.0	—	vollständiges Monomer
3	20-2.00	const.	28.6	29.4	6-239	erste Wassersuche
4	20-2.00	r, 300	22.7	24.2	6-239	starke NCS-Restraints
5	20-1.70	r, 300	22.5	23.8	1831	erneute Wassersuche bei 1.7Å
6	20-1.70	r, 20	20.8	22.7	1831	Abschwächung der NCS-restraints
7	20-1.70	r, 20	19.5	21.3	1831	leichte Modifikationen in Modell und Verfeinerung
8	20-1.70	r, 20	17.6	20.3	2785	erneute Wassersuche
9	20-1.70	r, 20	17.6	20.2	2733	Einführung von Kcx, Sulfat ⇒ endgültiges Modell



a)

b)

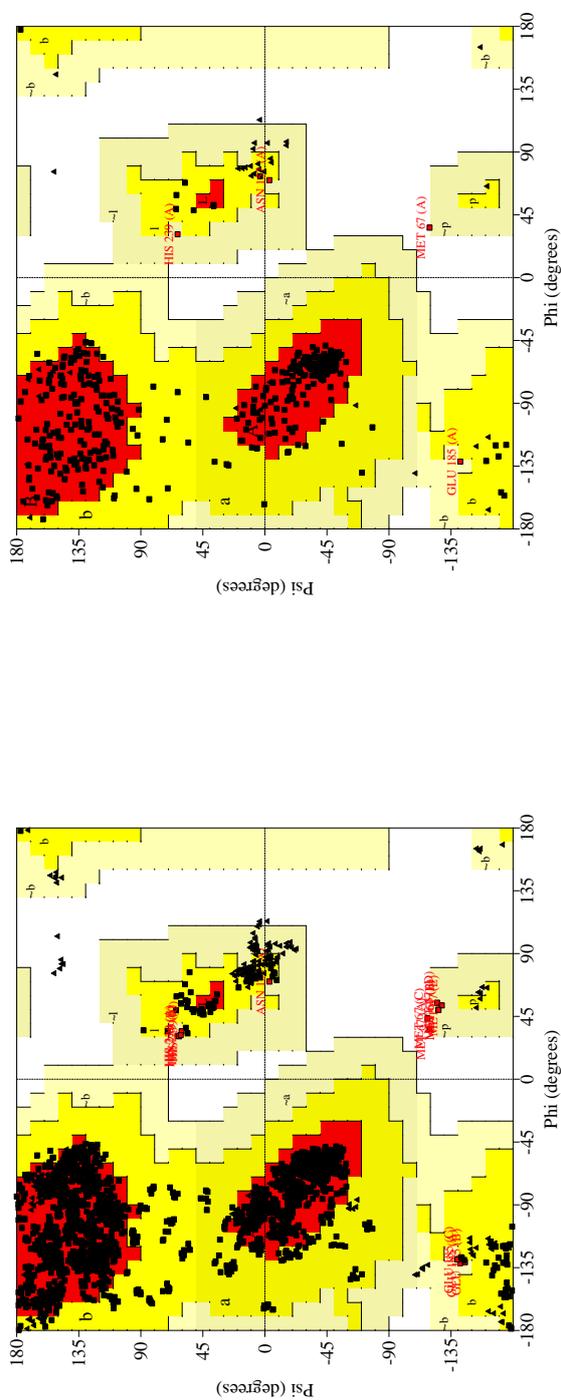
Abbildung 3.15: Ramachandran-Plot der D-Hyd der Raumgruppe C222₁ bei 1.7Å Auflösung. A,B,L (rot): *most favoured regions*, a,b,l (gelb): *additionally allowed regions*, ~a, ~b, ~l (dunkelgelb): *generously allowed regions*.

a) Ramachandran-Plot für alle Ketten,

b) Ramachandran-Plot nur für Kette A zur besseren Übersicht.

Tabelle 3.14: Zusammenfassung der wichtigsten Schritte der Verfeinerung der D-Hyd der Raumgruppe C222₁ bei 1.30Å Auflösung mit REFMAC5. In der Spalte Verfeinerung sind die Besonderheiten der jeweiligen Verfeinerungsrunde angegeben. Kcx bezeichnet ein carboxyliertes Lysin.

Schritt	Auflösung [Å]	R _{work} [%]	R _{free} [%]	Wasser	Verfeinerung
1	15-2.0	25.6	26.8	—	Starre-Körper Verfeinerung mit Modell aus 1.7Å-Verfeinerung
2	50-1.3	25.7	28.3	—	erste Verfeinerung bei Hochauflösung
3	20-1.3	21.1	24.5	3885	Wassersuche mit ARP
4a	50-1.3	20.0	23.4	3885	isotrope B-Faktoren, REFMAC5
4b	50-1.3	17.6	21.0	3885	anisotrope B-Faktoren, REFMAC5
4c	50-1.3	16.9	20.3	3885	anisotrope B-Faktoren, Wasserstoff-Beiträge, REFMAC5
5	50-1.3	15.3	18.4	3716	kleinere Modifikationen, Wasser mit B _≥ 50Å ² entfernt, Sulfat, Kcx, HEPES eingebaut ⇒ endgültiges Modell



a)

b)

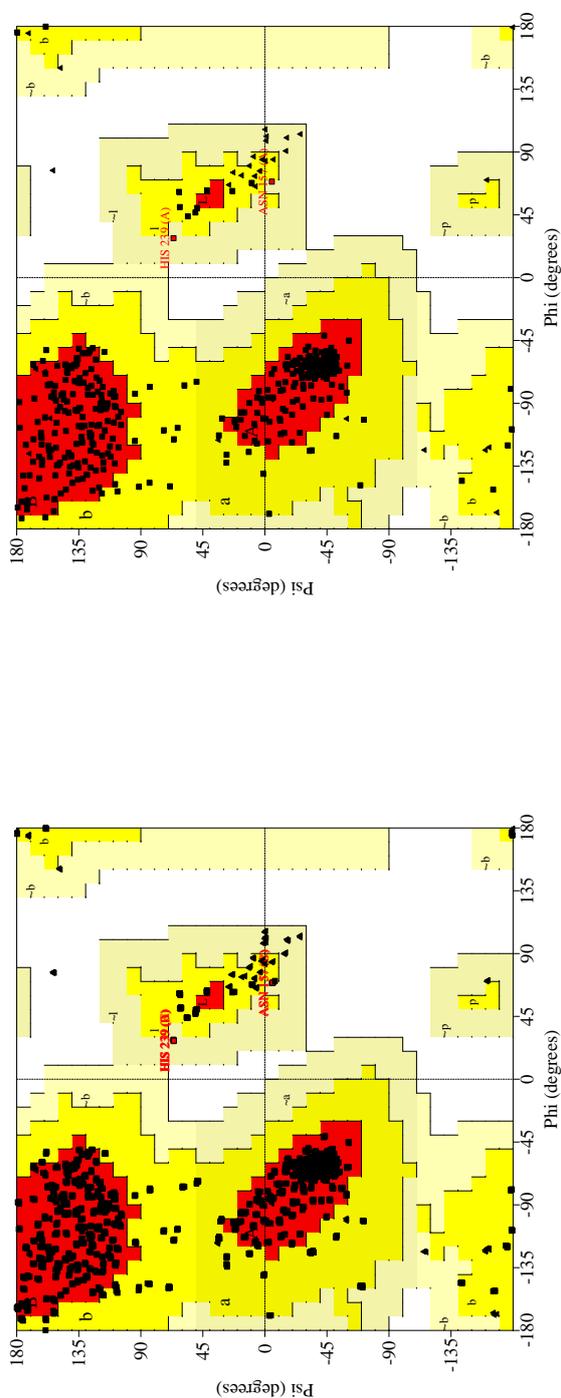
Abbildung 3.16: Ramachandran-Plot der D-Hyd der Raumgruppe C222₁ bei 1.3Å Auflösung. A,B,L (rot): *most favoured regions*, a,b,l (gelb): *additionally allowed regions*, ~a, ~b, ~l (dunkelgelb): *generously allowed regions*.

a) Ramachandran-Plot für alle Ketten,

b) Ramachandran-Plot nur für Kette A zur besseren Übersicht.

Tabelle 3.15: Zusammenfassung der wichtigsten Schritte der Verfeinerung der D-Hyd der Raumgruppe $P2_12_12_1$ bei 2.60 Å Auflösung.

Schritt	Auflösung [Å]	NCS	R_{work} [%]	R_{free} [%]	Wasser	Verfeinerung
0	15-3.00	—	29.9	30.3	—	Lösung aus molekularem Ersatz
1	15-3.00	constraint	26.0	26.1	—	Starre-Körper-Verfeinerung
2	25-2.60	constraint	22.4	23.7	—	<i>annealing</i> und Minimierung
3	25-2.60	restraint	20.8	22.5	—	Minimierung mit <i>restraints</i>
4	25-2.60	restraint	18.8	21.1	489	Wassersuche
5	25-2.60	restraint	18.8	21.1	489	kleinere Modifikationen ⇒ endgültiges Modell



a)

b)

Abbildung 3.17: Ramachandran-Plot der D-Hyd der Raumgruppe $P2_12_12_1$ bei 2.6\AA Auflösung. A,B,L (rot): *most favoured regions*, a,b,l (gelb): *additionally allowed regions*, $\sim a, \sim b, \sim l$ (dunkelgelb): *generously allowed regions*.

a) Ramachandran-Plot für alle Ketten,

b) Ramachandran-Plot nur für Kette A zur besseren Übersicht.

Tabelle 3.16: Zusammenfassung der wichtigsten Schritte der Verfeinerung der L-Hyd der Raumgruppe $P2_1$ bei 2.60Å Auflösung mit CNS. Während der Verfeinerung wurde die NCS als *constraint* berücksichtigt. In der Spalte V ist die Art der Verfeinerung angegeben: S: Starre-Körper-Verfeinerung A: *simulated annealing* M: *conjugate gradient*-Minimierung

Nr	Auflösung [Å]	R_{work} [%]	R_{free} [%]	Wasser	V	Modell
0	15-4.0	51.6	52.3	—	S	Tetramer aus molekularem Ersatz
1	30-2.6	36.9	39.7	—	AM	Monomer aus Starre-Körper-Verfeinerung
2	30-2.6	34.3	37.1	—	AM	schlecht definierte Residuen entfernt, Modell mit 392/458 Residuen
3	30-2.6	32.3	34.5	—	AM	Modell mit 424/458 Residuen, davon 15 als Ala
4	30-2.6	27.8	29.3	—	AM	Modell mit 458/458 Residuen, davon 11 als Ala
5	30-2.6	25.8	27.2	—	AM	Zink eingefügt, komplettes Modell
6	30-2.6	23.9	25.5	91	M	Wassersuche
7	30-2.6	22.5	24.4	127	M	kleinere Modifikationen, erneute Wassersuche
8	30-2.6	22.4	24.4	127	M	Einbau von Kcx, kleinere Modifikationen ⇒ endgültiges Modell

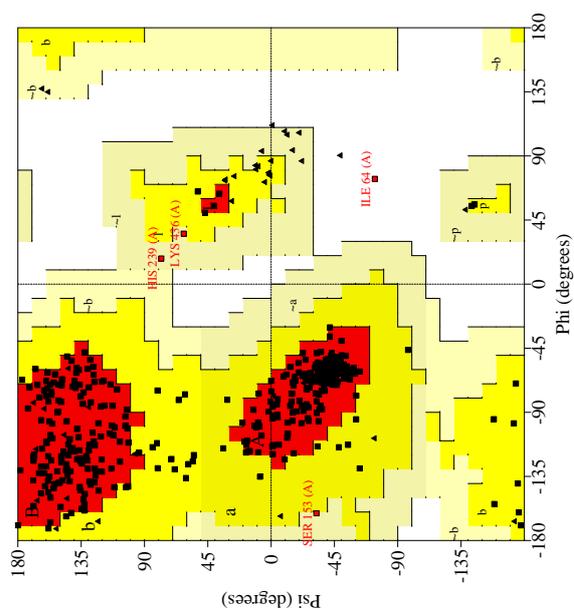


Abbildung 3.18: Ramachandran-Plot der L-Hyd der Raumgruppe $P2_1$ bei 2.6 Å Auflösung. A,B,L (rot): *most favoured regions*, a,b,l (gelb): *additionally allowed regions*, ~a, ~b, ~l (dunkelgelb): *generously allowed regions*.

Tabelle 3.17: Statistik über Inhalt und Qualität der verfeinerten Modelle der D- und L-Hyd. Der DPI (Koordinatenfehler nach [Cruickshank \(1999\)](#)) und die RMS-Abweichungen wurden für alle Modelle mit REFMAC5 berechnet.

Enzym Modell	D-Hyd			L-Hyd
	C222 ₁ 1.3Å	C222 ₁ 1.7Å	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ 2.6Å	P2 ₁ 2.6Å
Inhalt der Modelle (Residuen und nicht-Wasserstoff-Atome)				
Protein (Residuen/ Atome)	2748/21456	2748/21456	1832/14304	451/3416
Zink	12	12	8	2
Sulfat	9	6	—	—
HEPES	2	—	—	—
Wasser	3716	2733	489	127
Verfeinerung				
Auflösung [Å]	50-1.30	20-1.70	25-2.60	30-2.60
R _{work} [%]	15.3	17.6	18.8	22.4
R _{free} [%]	18.4	20.2	21.1	24.4
RMS-Abweichung von Idealwerten				
DPI [Å]	0.047	0.111	0.690	1.79
Bindungslängen [Å]	0.022	0.011	0.006	0.009
Bindungswinkel [°]	2.00	1.82	1.54	1.82
chirale Volumen [Å ³]	0.132	0.128	0.106	0.144
Torsionswinkel Periode 1 [°]	5.79	2.64	1.42	1.59
Torsionswinkel Periode 3 [°]	15.6	16.1	15.9	22.1
planare Gruppen [Å]	0.01	0.01	0.69	0.009
B Faktoren				
alle Proteinatome [Å ²]	18.6	14.0	28.2	22.6
Hauptkettenatome [Å ²]	17.5	12.8	27.2	21.1
Seitenkettenatome [Å ²]	19.9	15.3	29.3	24.5
Zink [Å ²]	18.5	13.9	33.5	17.4
andere Heteroatome [Å ²]	28.9	28.5	—	—
Wasser [Å ²]	31.9	27.7	31.0	30.2
gesamt [Å ²]	20.6	15.6	28.3	22.9

3.9 Qualität der Modelle

3.9.1 D-Hyd, C222₁

Die endgültigen Modelle der D-Hyd der Raumgruppe C222₁ bei 1.3Å und 1.7Å Auflösung bestehen aus sechs vollständigen Monomeren. Die posttranslationale Prozessierung des N-terminalen Methionins, die bereits aus den Ergebnissen der ESI-Massenspektrometrie vorgeschlagen wurde, war aus der Elektronendichte offensichtlich. Diese posttranslationale Modifizierung ist üblich bei in *E. coli* exprimierten Proteinen, bei denen Prolin die folgende Aminosäure ist (Hirel *et al.*, 1989). Wie in Abbildung 3.19a dargestellt haben der lange Loop zwischen den Residuen 30-37 und der kurze Loop zwischen den Residuen 66-69 zwischen den beiden kurzen Faltblättern die höchsten Temperaturfaktoren und sind damit die flexibelsten Teile der Struktur. Jedoch konnten auch diese Loops eindeutig modelliert werden.

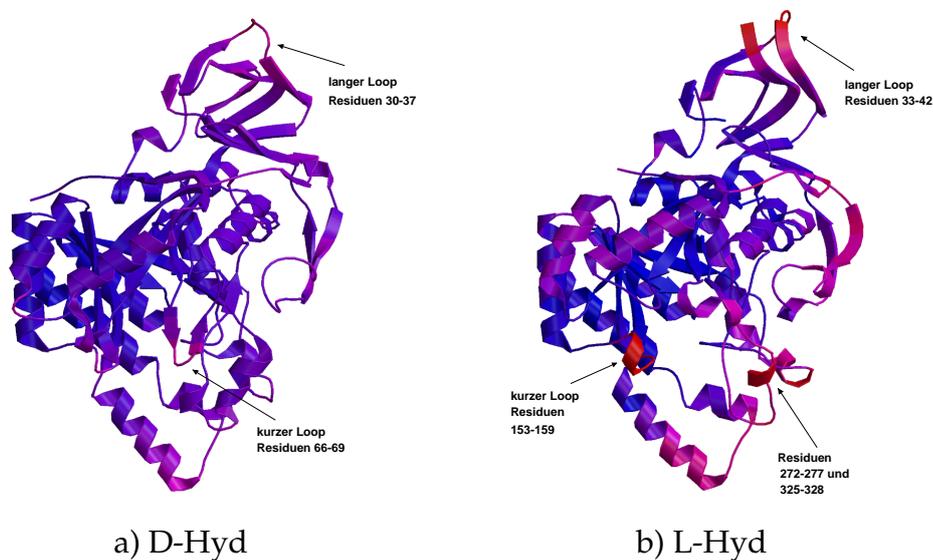


Abbildung 3.19: Bandstrukturen der Monomere von a) D-Hyd (1.3Å-Struktur) und b) L-Hyd gefärbt von blau nach rot nach Temperaturfaktoren (D-Hyd 10-40 Å², L-Hyd 10-50 Å²). Wegen der deutlich unterschiedlichen Auflösungen sind die Niveaus der B-Faktoren generell unterschiedlich.

Die endgültigen Modelle beinhalten (s. Tabelle 3.17) neben dem Protein zwölf Zinkionen, 3716 gebundene Wasser (2733 bei 1.7Å), neun Sulfationen (sechs), und zwei HEPES-Moleküle (keins). Die Verfeinerung konvergierte bei R-Werten von $R_{work}=15.3\%$ und $R_{free}=18.4\%$ ($R_{work}=17.6\%$, $R_{free}=20.2\%$). In Hinblick auf die gemessene Auflösung und die Größe des Datensatzes (Krebs, 2000) sind diese R-Werte zufriedenstellend. Da der 1.7Å-Datensatz ein bei mittleren Auflösungen abgeschnittener Datensatz ist, ist der Unterschied der R-Werte zum 1.3Å-Datensatz nur relativ gering.

Die Stereochemie der Modelle ist im Vergleich mit den Idealwerten nach Engh & Huber (1991) gut. Die größeren Abweichungen beim höher aufgelösten Datensatz sind durch eine stärkere Gewichtung der Röntgenterme im Vergleich zu den stereochemischen Zwängen und die Verwendung verschiedener Verfeinerungsprogramme zu erklären. Im Ramachandran-Plot liegen 89.1% der Residuen liegen in den am stärksten favorisierten Bereichen (*most favoured*), 10.3% in den zusätzlich erlaubten Bereichen (*additionally allowed*). Die restlichen 14 Residuen (0.6%) im 1.3Å-Modell haben alle eine gut definierte Elektronendichte. Im 1.7Å-Modell gibt es noch zusätzlich Residuen aus dem langen flexiblen Loop, die sich in den großzügig erlaubten Bereichen des Ramachandran-Plots befinden.

Bei der hochaufgelösten Struktur bei 1.3Å Auflösung wurden die B-Faktoren anisotrop verfeinert. Die Anisotropie ist als Quotient aus kürzester und längster Achse der thermischen Ellipsoide definiert (Merritt, 1999). Vollkommen isotrop geformte thermische Ellipsoide haben eine Anisotropie von 1. Prolate oder oblate Ellipsoide haben eine geringere Anisotropie. Die Anisotropie beträgt für die Proteinatome $A_{Protein}=0.65\pm 0.11$, die der Wasseratome $A_{Solvens}=0.56\pm 0.13$. Somit liegt in der Struktur eine deutliche Anisotropie vor.

3.9.2 D-Hyd $P2_12_12_1$

Das endgültige Modell der D-Hyd der Raumgruppe $P2_12_12_1$ bei 2.6Å Auflösung besteht aus vier vollständigen Monomeren. Sowohl Tertiär- als auch Quar-

tärstruktur entsprechen der Struktur der Raumgruppe $C222_1$. Das endgültige Modell beinhaltet zwei Zinkionen und 489 gebundene Wasser. Die Verfeinerung konvergierte bei R-Werten von $R_{work}=18.8\%$ und $R_{free}=21.1\%$. Da das Modell für den molekularen Ersatz die selbe Struktur in einer anderen Orientierung ist und diese bereits bei deutlich höherer Auflösung verfeinert worden war, sind die R-Werte für die Auflösung der Röntgendaten vergleichsweise niedrig. Demzufolge ist auch die Stereochemie sehr gut. Im Ramachandran-Plot sind lediglich jeweils Residuen pro Monomer an der Grenze zwischen *additionally allowed* zu *generously allowed*. Dieses Modell wurde in der folgenden Strukturauswertung lediglich beim Vergleich der Kristallpackung oder der Quartärstruktur verwendet.

3.9.3 L-Hyd, $P2_1$

Im Kristall beinhaltet die asymmetrische Einheit ein ganzes Tetramer. Die Struktur wurde jedoch mit *NCS-constraints* berechnet, so dass das Modell aus einem Monomer besteht. Die Verwendung von *NCS-restraints* brachte weder im freien R-Wert noch in den Elektronendichten eine Verbesserung und wurde deshalb zu Gunsten eines verbesserten Daten-Parameter-Verhältnisses verworfen. Die Residuen 1-451 ließen sich modellieren. Für die restlichen sieben C-terminalen Residuen war keine Elektronendichte vorhanden. Neben dem langen Loop (Residuen 33-42), der auch in der D-Hyd der flexibelste Teil der Struktur ist, gibt es noch kleinere Loopbereiche (s. Abbildung 3.19b) mit erhöhter Flexibilität.

Das endgültige Modell umfasst (s. Tabelle 3.17) desweiteren zwei Zinkionen und 127 gebundene Wasser. Die Verfeinerung konvergierte bei $R_{work}=22.4\%$ und $R_{free}=24.4\%$. Die Stereochemie ist für die gemessene Auflösung gut. Im Ramachandran-Plot befinden sich 89.1% in den am meisten favorisierten Bereichen (*most favoured*), 10.2% in den zusätzlich erlaubten (*additinally favoured*). Ile64 ist das einzige Residuum in nicht-erlaubten Bereichen im Ramachandran-Plot, hat aber eine gut definierte Elektronendichte und liegt in der Nähe des aktiven Zentrums. Zwei Residuen befinden sich in großzügig erlaubten

Bereichen (*generously allowed*): Lys436 liegt in einem engen Loop, His239 ist das einzige Histidin, das Zink mit dem weniger bevorzugten N ϵ bindet.

4 Diskussion I — die Experimente

4.1 Sequenzierung und Homologien

Da die Sequenz der D-Hyd nur unvollständig bekannt war (Elard *et al.*, 1987), wurde sie vor der Strukturlösung durch DNA-Sequenzierung ermittelt. Die Sequenz ist in Abbildung 3.1 dargestellt. In Abbildung 4.1 ist ein Sequenzalignment von D- und L-Hyd abgebildet. Die Sequenzidentität beträgt 29.4%. Die Homologie erstreckt sich über die gesamte Sequenz. Dies macht eine gemeinsame Faltung wahrscheinlich, was sich nach der Strukturlösung auch bestätigte.

Eine Suche nach sequenzhomologen Proteinen zur D- und L-Hyd in der Swiss-Prot-Datenbank zeigt, dass innerhalb der Gruppe der Hydantoinasen Sequenzidentitäten von über 30% bestehen. Zur D-Hyd hat die D-Hydantoinase aus *Bacillus stearothermophilus* mit 45% die höchste Sequenzidentität. Weitere zyklische Amidasen haben ebenfalls hohe Sequenzidentitäten: Allantoinasen ($\geq 30\%$), Dihydroorotasen ($\geq 25\%$). Die Ureasen aus *Bacillus pasteurii* (2UBP, 21% Sequenzidentität, Benini *et al.*, 1999) und *Klebsiella aerogenes* (2KAU, 23%, Jabri *et al.*, 1995) sind die Proteine mit der größten Sequenzhomologie, deren Struktur bekannt ist. Bei der L-Hyd sind die Homologien zu anderen Proteinen ähnlich. Die Sequenzidentitäten zu den strukturell aufgeklärten Ureasen sind mit 23–24% geringfügig höher als bei der D-Hyd.

Auf Grund von Sequenzanalysen im Vergleich mit der bekannten Struktur der Urease aus *Klebsiella aerogenes* schlugen Holm & Sander (1997) eine Proteinfamilie vor, zu der unter anderem auch Dihydroorotasen, Allantoinasen und Hydantoinasen gehören. Neben einer ähnlichen dreidimensionalen Faltung mit einem zentralen $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel wurde auch eine ähnliche Architektur des aktiven Zentrums vorhergesagt. Nach Aufklärung der Strukturen ließ sich beides für D- und L-Hyd bestätigen.

```

>D-Hydantoinase                               459 aa vs.
>L-Hydantoinase                               458 aa
scoring matrix: , gap penalties: -12/-2
29.4% identity;                               Global alignment score: 656

      10      20      30      40      50
D-Hyd M-PLLIKNGEIIADSRKADIYAEGETITRIGQNLEAPPGTEVIDATGKYVFPGFIDPH
      : ..... : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
L-Hyd MFDVIVKNCRLVSSDGITEADILVKDGKVA AISAD TSDVEASRTIDAGGKFVMPGVVDEH
      10      20      30      40      50      60

      60      70      80      90      100     110
D-Hyd VHIY-LPFMATFAKDTHETGSKAALMGTTTTIEMCCPSRNDDALEGYQLWKSKAEGNSY
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
L-Hyd VHIIDMDLKNRYGR--FELDSESAAVGGITTIEMPITFPPTTLDADF-LEKKKQAGQ--
      70      80      90      100     110

      120     130     140     150     160     170
D-Hyd CDYTFHMAVSKFDEKTEGQLREI--VAD-GISSFKIFL--SYKNFF-GVDDGEMYQTLRL
      . . . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
L-Hyd ---RLKVDFALYGGVPGNLPEIRKMDAGAVGFKSMMMAASVPGMFDVSDGELFEIFQE
      120     130     140     150     160     170

      180     190     200     210     220     230
D-Hyd AKELGVIVTAHCENAELVGRLLQKLLSEGKTGPEWHEPSRPEAVEAEGTARFATFLETTG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
L-Hyd IAACGSVIVVHAENETIIQALQKQIKAAGGKDMAAYEASQPVFQNEAIQRALLLQKEAG
      180     190     200     210     220     230

      240     250     260     270     280     290
D-Hyd ATGYVVHLSCKPALDAAMAARKGVPIYIESVIPHFL-LDKTYAERGGVEAMKYIMSPPL
      : : : : . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
L-Hyd CRLIVLHVSNDPGVELIHQAQSEGQDVHCESG-PQYLNITDDAERIG-PYMK--VAPPV
      240     250     260     270     280

      300     310     320     330     340     350
D-Hyd RDKRNQKVLWDALAQGFIDTVGTDHCPFDTEQKLLGKEAFTAIPNGIPAIEDRVNLLYTY
      : : . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
L-Hyd RSAEMNIRLWEQLEGLIDTLGSDHGGHPVEDKEPGWKDVWKAGNGALGLETSLPMLTN
      290     300     310     320     330     340

      360     370     380     390     400     410
D-Hyd GVSRRGLDIHRFVDAASTKAAKLFLPRKGTIAVGSADLVVYDQYRGTISVKTQHVN
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
L-Hyd GVNKGRSLERLVEVMCEKPAKLFGIYPQKGTLVQVGSADLLILDLDIDTKVDASQFRSL
      350     360     370     380     390     400

      420     430     440     450
D-Hyd NDYNGFEGFEIDGRPSVTVRGKVAVRDQGFVGEKGGKLLRREPMYF--
      . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
L-Hyd HKYSFPDGMPTGAPVLTMVRGTVVAEKGEVLVEQFGGFVTRRN YEASK
      410     420     430     440     450

```

Abbildung 4.1: Sequenzalignment von D- und L-Hydantoinase mit FASTA nach dem Smith-Waterman Algorithmus (Smith & Waterman, 1981). Doppelpunkte bedeuten identische Aminosäuren, einfache Punkte ähnliche Aminosäuren.

4.2 Expression, Aufreinigung und Kristallisation

Die native D-Hydantoinase wurde anfänglich in *E. coli* BL21 Zellen exprimiert, die Se-Met-D-Hydantoinase in Methioin-auxothrophen *E. coli* B834 Zellen. Die Expression war in beiden Stämmen sehr gut (s. Abb. 3.4). Deshalb wurde später auch die native D-Hydantoinase in *E. coli* B834 Zellen exprimiert.

Zwei Aufreinigungsprotokolle für die D-Hyd sind verfügbar, mit denen man homogenes kristallisationsfähiges Protein erhält. Beide folgen dem CiPP-Konzept von Pharmacia, nach dem eine Aufreinigung generell aus den Schritten *Capture*, *intermediate Purification* und *Polishing* besteht. Das Protokoll 1, bei dem die STREAMLINE-Säule im Fließ- und Festbett verwendet wurde, ist als Technikstudie für die Verwendbarkeit von STREAMLINE Säulen im Labormaßstab anzusehen. Das Protokoll 2, das mit einer Zentrifugation beginnt, ist von der Handhabung her deutlich einfacher. Da das verwendete Ionenauschermaterial des ersten Schrittes eine sehr hohe Ladungskapazität hat, kann im Protokoll 2 mit geringeren Säulenvolumina gearbeitet werden. In den beiden letzten Schritten nach Protokoll 2 (zweiter Anionenausch-Chromatographie und Gelpermeations-Chromatographie) werden nur wenige Verunreinigungen abgetrennt, so dass einer davon gegebenenfalls ausgelassen werden könnte.

Die Kristallisation der D-Hyd in der Raumgruppe $C222_1$ erwies sich als sehr zuverlässig, wenn sie durch Impfkristalle initiiert wurde (*microseeding*). Diese Kristalle hatten eine im Verhältnis zur Größe der Einheitszelle für Proteinkristalle ungewöhnlich gute Beugungseigenschaften. Im Gegensatz dazu war die Kristallisation der D-Hyd in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ weniger gut reproduzierbar. Häufig bildeten sich kleine und nadelförmige Kristalle. Aus diesen Gründen wurde trotz größerer Einheitszelle und einer damit verbundenen größeren Se-Substruktur die Kristallform der Raumgruppe $C222_1$ für die Strukturlösung verwendet.

Die Verwendung von Lithiumsulfat als Cryopuffer stammte ursprünglich

aus der Suche nach Schwermetallderivaten für die MIR-Phasierung. Das Fällungsmittel Ammoniumsulfat ist bei der Derivatsuche ungünstig, da das im Gleichgewicht vorliegende Ammoniak mit den Aminogruppen des Proteins bei der Metallbindung in Konkurrenz treten kann. Deshalb wurden die Kristalle direkt in 2 M Lithiumsulfatlösung überführt. Dieser Puffer erwies sich auch als Hochsalz-Crypuffer. Wie kürzlich erstmals systematisch beschrieben (Rubinson *et al.*, 2000), eignen sich auch gut lösliche Salze in hoher Konzentration als Schutz gegen Eisbildung ebenso wie sonst üblichen Alkohole und Zucker (Garman & Schneider, 1997).

4.3 MAD

Für die Lösung der Struktur und Berechnung der ersten Phasen für die D-Hyd wurde die Technik der MAD-Phasierung angewendet. Wegen der nur begrenzt zur Verfügung stehenden Messzeit am Synchrotron muss bei jeder Messung bei gegebener Belichtungsdauer und gegebenem Rotationswinkel pro Bild ein Kompromiss aus Redundanz der Daten und Anzahl der gemessenen Wellenlängen gemacht werden. Der Einfluss dieser beiden Parameter auf die Suche nach den anomalen Streuern und auf die Phasierung ist nachfolgend beschrieben. Während der Datensammlung wurde nach der klassischen Messstrategie verfahren (s. Kap. 1.2.2). Der Kristall wurde bei drei Wellenlängen gemessen: *peak*, *inflection* und *remote*. Da Messzeit für knapp 300° Rotation vorhanden war, wurde der Kristall bei jeder Wellenlänge um ca. 95° gedreht. Für die Messung von drei Wellenlängen mit *inverted beam*-Geometrie war nicht genügend Messzeit vorhanden.

Für die MAD-Phasierung musste zunächst die Se-Substruktur gelöst werden. Da sich in der asymmetrischen Einheit der D-Hyd in der Raumgruppe C222₁ sechs Monomere befinden, von denen jedes neun Methionine enthält, mussten 54 Se-Positionen gefunden und verfeinert werden. Damit handelt es sich um eine der größten bislang gelösten Se-Substrukturen (Deacon & Ealick, 1999; Ealick,

2000). Dies gelang mit den erweiterten Patterson-Suchroutinen des Programms SOLVE. Dafür war es unter anderem von entscheidender Bedeutung, dass alle drei Wellenlängen einbezogen wurden (s. Kap. 3.7.1.2).

Der überwiegende Anteil der bislang gelösten großen Se-Substrukturen wurde mit Programmen gelöst, die direkte Methoden verwenden (SnB, SHELXD). Dabei wird nur mit einer Wellenlänge gerechnet, vorzugsweise der *peak*-Wellenlänge. Bei einer Beschränkung auf eine Wellenlänge können bei gegebener Messzeit die Daten mit einer weitaus höheren Redundanz und damit deutlich höheren Qualität aufgenommen werden. Mit den vorhandenen Datensätzen ließ sich die Se-Substruktur der D-Hyd mit direkten Methoden nicht lösen. Wenn allerdings bei der Datensammlung nur eine Wellenlänge mit einer deutlich höheren Redundanz gemessen worden wäre, wäre die Wahrscheinlichkeit für den Erfolg der direkten Methoden hoch gewesen.

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben ist die Qualität der Phasen, die aus MAD-Messungen erhalten werden, höher als die der SAD-Messungen erhaltenen Phasen. Diese Unterschiede werden jedoch zu einem großen Teil durch anschließende Rechnungen zur Dichtemodifikation zu einem großen Teil ausgeglichen.

Im Falle der D-Hyd sich die *klassische* drei-Wellenlängen-Methode als erfolgreich erwiesen hat. Dennoch würde ich bei zukünftigen Projekten mit ähnlichen Problemstellungen den Kristall bei weniger Wellenlängen mit einer höheren Redundanz vermessen. Aus meiner Sicht scheint die Wahrscheinlichkeit eines Erfolges bei der Aufklärung einer großen Se-Substruktur dann höher als bei der von mir angewendeten Messstrategie. Die Nachteile von etwas schlechteren Phasen scheinen mir dahingegen weniger gravierend zu sein.

4.4 Strukturlösung und Modellbau

4.4.1 D-Hyd

4.4.1.1 Modellbau

Die Struktur der D-Hyd konnte überwiegend automatisch modelliert werden. Für Proteinstrukturen ist dieses Verfahren wegen der dafür ungenügenden Auflösung der Daten häufig noch nicht anwendbar. Der Schlüssel zum Erfolg waren hierbei verschiedene Techniken der Dichtemodifikation: Nach Kenntnis der Lage eines Monomer und der nicht-kristallographischen Symmetrie zwischen den Monomeren konnte unter sechsfacher Mittelung die Phaseninformation in kleinen Schritten von 3\AA auf 1.7\AA Auflösung erweitert werden. Der Effekt der Phasenextension schien hierbei deutlich größer als der der Mittelung, die Elektronendichte nach Phasenextension auf 1.7\AA auch ohne Mittelung ähnlich gut war wie mit Mittelung. Aufgrund der für Proteinkristalle ungewöhnlich guten Beugungseigenschaften der Kristalle der Raumgruppe $C222_1$ war es möglich, den überwiegenden Anteil der ca. 300 kDa der asymmetrischen Einheit automatisch zu modellieren. Nach Auskunft von A. Perrakis, einem der Autoren von ARP, ist die D-Hyd damit die größte bislang von ARP automatisch modellierte Struktur.

4.4.1.2 Verfeinerung

Bei der Verfeinerung der Struktur gegen den hochaufgelösten Datensatz führten die Einführung von anisotropen B-Faktoren (Merritt, 1999) und die Berücksichtigung von Streubeiträgen der Wasserstoffatome (*riding hydrogens*) jeweils zu einer signifikanten Erniedrigung der R-Werte (s. Tabelle 3.14), so dass diese weiterhin in die Verfeinerungsrechnungen eingeschlossen wurden. Eine Analyse der anisotropen B-Faktoren unterstreicht die deutliche Anisotropie. Multiple Konformationen wurden nicht berücksichtigt, da in allen Fällen die Beschreibung der Unordnung durch die anisotropen B-Faktoren ausreichend war (siehe Abbildung 4.2) und sich in den Elektronendichten keine deutlichen

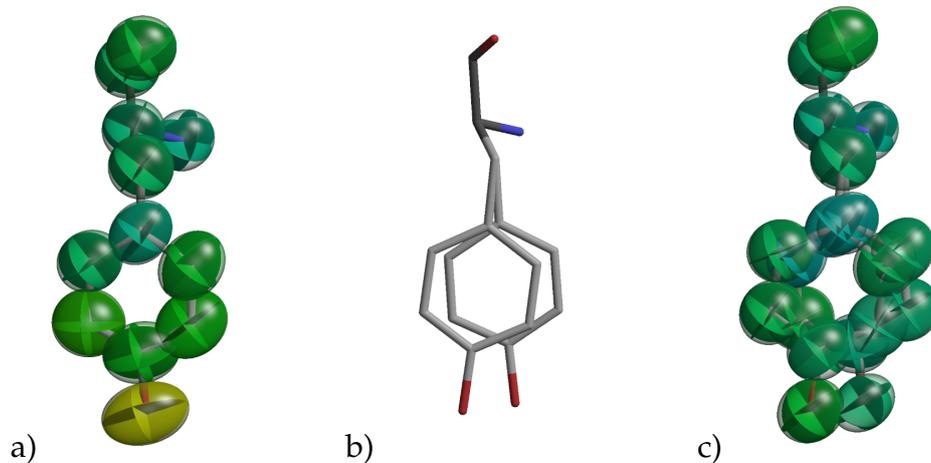


Abbildung 4.2: Beschreibung von Unordnung durch anisotrope B-Faktoren und multiple Konformationen am Beispiel von Tyr⁴⁵⁸ der D-Hyd. Die anisotropen B-Faktoren sind durch ihre Ellipsoide dargestellt, die nach isotropen B-Faktoren gefärbt sind. Die Unordnung dieses Residuums lässt sich durch höhere B-Faktoren und prolatare Ellipsoide vergleichbar gut beschreiben wie durch mehrere Konformationen, weniger prolatare Ellipsoide und niedrigere B-Faktoren.

- a) Ellipsoide der anisotropen B-Faktoren bei Verwendung von einer Konformation,
- b) verfeinerte Lage von zwei Konformationen,
- c) Ellipsoide der anisotropen B-Faktoren bei Verwendung von zwei Konformationen.

alternativen Konformationen abzeichneten.

4.4.1.3 Strahlungsschädigung

Proteinkristalle werden auf verschiedene Weise durch die verwendete Röntgenstrahlung geschädigt: Die primären Schädigungen entstehen durch Absorption von Röntgenstrahlung. Durch photoelektrische, Auger- und Compton-Effekte werden energiereiche Elektronen von den betreffenden Atomen entfernt. Dies kann zu Bindungsbrüchen führen. Besonders anfällig sind dabei Disulfidbrücken, Cystein, Methionin, Aspartat, Glutamat und

Tyrosin (Burmeister, 2000). Die durch die primären Effekte entstandenen freien Elektronen können freie Radikale generieren. Freie Radikale können auch durch direkte Interaktion von Röntgenstrahlung mit Solvens entstehen. Diese diffundieren durch den Kristall und können Sekundärschäden verursachen. Die Sekundärschädigungen werden durch die geringe Mobilität von Teilchen im Kristall bei Tieftemperaturkühlung verringert. Trotz Tieftemperaturkühlung wurden bei Proteinkristallen, die hohen Strahlendosen bei Messungen an Synchrotrons der dritten Generation ausgesetzt waren, deutliche und spezifische Strahlenschäden beobachtet (Weik *et al.*, 2000; Burmeister, 2000).

Die Kristalle der L-Hyd und der primitiv orthorhombischen D-Hyd wurden bei 4-8° an der hauseigenen Drehanode vermessen, so dass man hier primäre und sekundäre Strahlenschädigung erwarten kann. Die Kristalle der Se-Met-D-Hyd und der nativen D-Hyd (1.7 Å) wurden bei Tieftemperaturkühlung gemessen. Da es sich beim PETRA-Speicherring am DESY um ein Synchrotron der 2. Generation handelt, ist die Strahlendosis für die meisten Messungen bei Cryobedingungen nicht hoch genug, um deutliche Strahlungsschäden zu verursachen.

Wegen der Kristallgeometrie und der erwünschten Auflösung wurde der Kristall der nativen D-Hyd bei höchster Auflösung lange (36 Stunden) dem Synchrotronstrahl und damit erhöhten Strahlendosen ausgesetzt. Um die Effekte möglicher Strahlenschäden zu vermindern, wurde der Kristall nach der ersten Hälfte des hochauflösenden Scans und vor den Scans bei mittlerer und niedriger Auflösung entlang der Rotationsachse ein wenig translatiert, so dass verschiedene Regionen des großen Kristalls belichtet wurden. Eine leichte Strahlungsschädigung machte sich vor allem bei den bei Raumtemperatur gemessenen Kristallen durch einen Anstieg der B-Faktoren und ein Sinken der Skalierungsfaktoren für die einzelnen Röntgenaufnahmen bei der Skalierung mit SCALEPACK bemerkbar.

Eine Berücksichtigung von Strahlungsschädigung, z.B. der allmählichen Entfernung einer Carboxylgruppe, kann durch die Verfeinerung der Besetzungs-

zahlen erfolgen, da die Struktur ein räumliches (Ausdehnung der belichteten Fläche) und zeitliches Mittel (Dauer der Messung) darstellt. Wegen der hohen Korrelation von Temperaturfaktoren und Besetzungszahlen auch bei atomaren Auflösungen (CCP4-BB-Diskussion, Februar 2000) wird dies im allgemeinen jedoch nicht getan. Deshalb wurde dies auch bei der hoch aufgelösten D-Hyd nicht in die Verfeinerung einbezogen.

4.4.2 L-Hyd

Trotz der hohen Homologie der Strukturen von D- und L-Hyd s. Kap. 5.1.4 waren die Rechnungen für den molekularen Ersatz bei der Strukturlösung der L-Hyd nicht einfach. Dies hatte die folgenden Gründe:

Auf der einen Seite musste mit *einem* Monomer die Orientierung von vier Monomeren gesucht werden. Dadurch waren die Korrelationskoeffizienten *per se* gering. Die Verwendung von Di- oder Tetrameren brachte aufgrund der leicht unterschiedlichen Anordnung der Monomere innerhalb des Tetramers (s. Kap. 5.3.3) keinerlei Gewinn.

Desweiteren lassen sich zwar bei den Strukturen der D- und L-Hyd bei einer oberen Zuordnungsgrenze von 1.8\AA mehr als 45% der $C\alpha$ -Atome mit einer RMS-Abweichung von $\text{RMS}_{C\alpha}=1.0\text{\AA}$ zuordnen. Jedoch bestehen für die weiteren Sequenzbereiche deutliche Differenzen. Dies kommt auch darin zum Ausdruck, dass das Modell der L-Hyd, das durch Homology Modelling aus der Struktur der D-Hyd erstellt worden war, RMS-Abweichungen von $\text{RMS}_{C\alpha}=3.0\text{\AA}$ und $\text{RMS}_{\text{alleAtome}}=3.7\text{\AA}$ im Vergleich zur verfeinerten Struktur aufweist. Dies liegt deutlich über dem allgemein als Grenze für die Verwendbarkeit von Modellen für den Molekularen Ersatz von $\text{RMS}_{C\alpha} = 1-1.5\text{\AA}$. Die Abbildung 4.3, in der die Abweichungen der $C\alpha$ -Atome zwischen Modell und verfeinerter Struktur über die Sequenz dargestellt sind, veranschaulicht Bereiche hoher und niedriger struktureller Homologie. Eine Begründung dafür, warum dieses an sich relativ grobe Modell besser für die Rechnungen des Molekularen Ersatzes eignete als

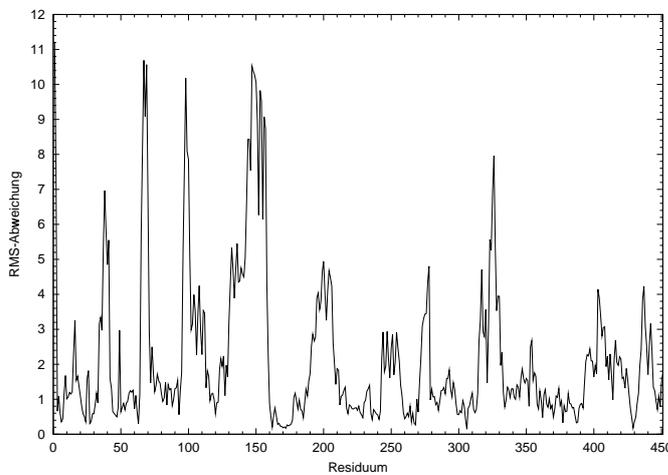


Abbildung 4.3: Die Darstellung der RMS-Abweichungen zwischen dem Homologie-Modell der L-Hyd und der verfeinerten Struktur über die Sequenz verdeutlicht die Bereiche hoher und niedriger struktureller Homologie.

die verschiedene Modelle der D-Hyd (s. Kap. 2.10.2), mag darin liegen, dass dieses Modell durch die korrekten Seitenketten in besser modellierten Bereichen insgesamt eine höhere Homologie hat. Dies führte dazu, dass sich die richtigen Lösungen nach der Patterson-Korrelationsverfeinerung und Translationssuche von den restlichen abheben ließen.

5 Diskussion II — die Strukturen

5.1 Tertiärstruktur

5.1.1 D-Hyd

Die D-Hyd kristallisiert in Kristallform der Raumgruppe $C222_1$ mit drei Hälften von Tetrameren in der asymmetrischen Einheit. In der Kristallform der Raumgruppe $P2_12_12_1$ befindet sich ein komplettes Tetramer in der asymmetrischen Einheit. Im Folgenden wird wegen der deutlich höheren Auflösung, wenn nicht ausdrücklich erwähnt, die Struktur der Raumgruppe $C222_1$ diskutiert. Die generelle Faltung eines Monomers ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Das Monomer hat eine räumliche Ausdehnung von $70\text{\AA} \times 50\text{\AA} \times 50\text{\AA}$, das Tetramer von $120\text{\AA} \times 80\text{\AA} \times 80\text{\AA}$.

Das Monomer besteht aus zwei Domänen, einem zentralen $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel (rot und gelb in Abbildung 5.1), das von mehreren zusätzlichen Helices (grau) flankiert ist, und einer β -Faltblatt-Domäne (blau und grün), die aus N- und C-Terminus gebildet ist.

Das zentrale $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel ist elliptisch verzerrt und nicht ganz geschlossen. Es besteht aus den Helices $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 7, \alpha 8, \alpha 12, \alpha 15$ und den β -Strängen $\beta 8, \beta 11, \beta 12, \beta 13, \beta 14, \beta 15, \beta 16, \beta 17$ (s. Abb. 5.5a) und erstreckt sich innerhalb der Residuen 55-344. Die Länge der β -Stränge innerhalb des Barrels sinkt zum C-Terminus hin von 8 ($\beta 11$) zu 3 Residuen ($\beta 17$). Die Helices des Barrels sind mit 9 ($\alpha 16$) bis 18 Residuen ($\alpha 7$) lang. Das $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel wird flankiert von vier zusätzlichen α -Helices, drei kurzen 3_{10} -Helices und einem kleinen zweisträngigen β -Faltblatt.

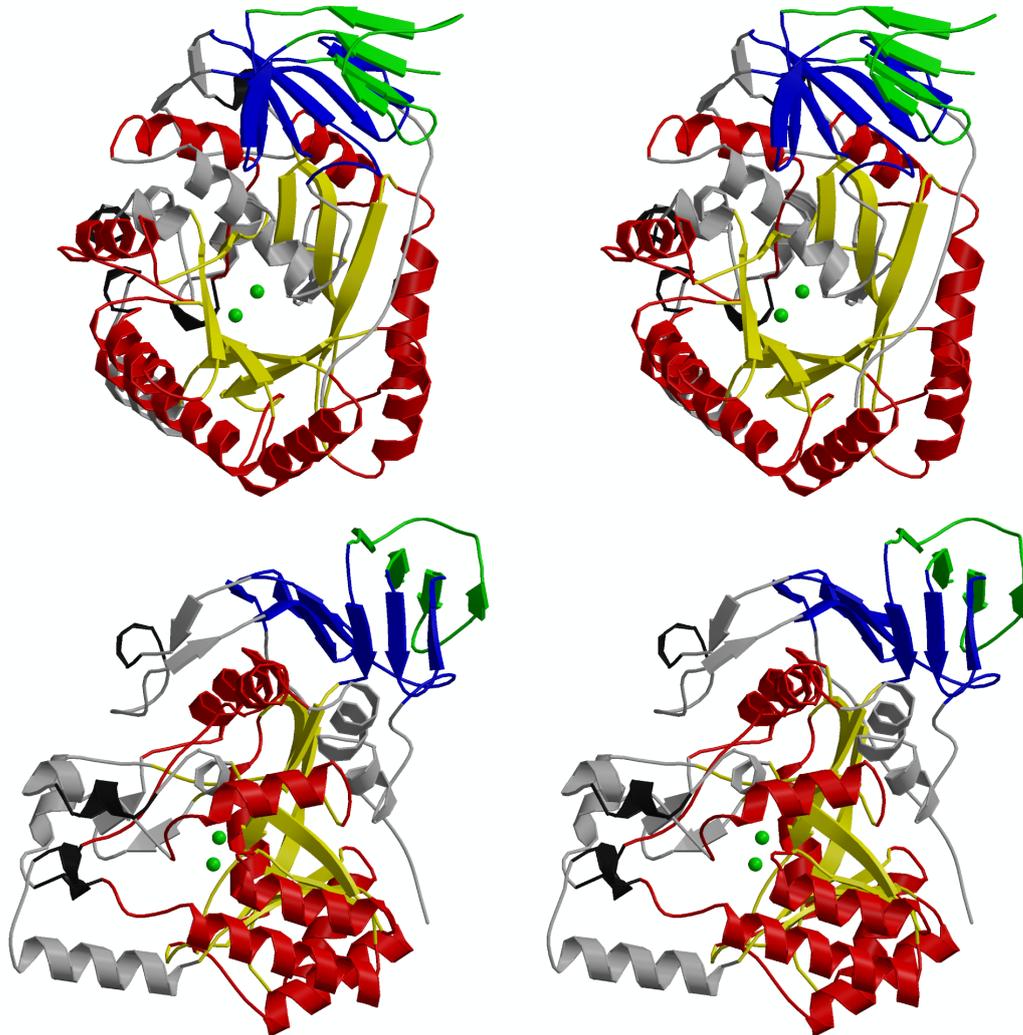


Abbildung 5.1: Die Faltung der D-Hyd in Stereodarstellung .

Die Banddiagramme zeigen die Faltung der D-Hyd aus zwei unterschiedlichen Blickwinkeln (45 Grad Rotation um die vertikale Achse) in Stereodarstellungen. Die Sekundärstrukturelemente der einzelnen Domänen sind farblich hervorgehoben: das zentrale $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel in rot und gelb, die β -Faltblatt-Domäne in blau und grün und die Zinkionen im aktiven Zentrum als grüne Punkte. Die zusätzlichen Sekundärstrukturelemente sind grau, 3_{10} -Helices dunkelgrau gefärbt.

Die obere Abbildung gibt eine Aufsicht auf das Barrel und zeigt das elliptisch verzerrte oben links leicht geöffnete Barrel.

Die untere Abbildung zeigt das Barrel von der Seite und hebt die Anordnung der Domänen und des aktiven Zentrums hervor.

Die β -Faltblatt-Domäne besteht aus zwei β -Faltblättern. Das größere β -Faltblatt besteht aus sieben Strängen ($\beta_3, \beta_2, \beta_7, \beta_{18}, \beta_{21}, \beta_{22}$ und β_{23}) in einer antiparallelen Anordnung. Die ersten drei Stränge gehören zum N-Terminus, die anderen vier Stränge zum C-Terminus. Das kleinere Faltblatt besteht aus vier Strängen vom N-Terminus ($\beta_5, \beta_4, \beta_1, \beta_6$) in einer gemischt parallelen/antiparallelen Anordnung. Im Tetramer wird dieses Faltblatt im benachbarten Monomer fortgesetzt. Aus der skizzierten Darstellung der Topologie (s. Abb. 5.5a) ist ersichtlich, dass die Sequenz am N-Terminus zwischen den beiden Faltblättern der β -Faltblatt-Domäne hin- und herwechselt. Die beiden Faltblätter sind annähernd parallelen zueinander angeordnet, so dass sich zwei Schichten von Faltblättern ausbilden (s. Abb. 5.2).



Abbildung 5.2: β -Faltblatt-Domäne der D-Hyd: Die beiden Faltblätter sind annähernd parallel angeordnet und bilden dadurch eine Schichtstruktur. Das Farbschema ist wie in Abbildung 5.1

Der C-Terminus windet sich nach dem Faltblatt β_{23} in einem weiten Bogen um einen Teil der Struktur. Die letzten 15 Residuen lassen sich keiner Sekundärstruktur zuordnen (s. Abb. 5.1).

5.1.2 Vergleich der Monomere der D-Hyd

Zwischen den sechs Monomeren der D-Hyd gibt es kleine, aber deutliche strukturelle Unterschiede. Während der Verfeinerung der D-Hyd mit 1.7Å-Daten wurde dies offenlichtlich, als bei dem Übergang von einer festen nicht-kristallographischen Symmetrie (*constraints*) zu einer flexiblen nicht-kristallographischen Symmetrie (*restraints*) die R-Werte um 5% sanken (vgl. Tabelle 3.13). Die letzten Verfeinerungen der D-Hyd bei höchster Auflösung wurden vollkommen ohne Beschränkungen hinsichtlich der nicht-kristallographischen Symmetrie durchgeführt.

Die einzelnen Monomere können mit RMS-Abweichungen von $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}=0.19\text{--}0.37\text{\AA}$ und $\text{RMSD}_{\text{alleAtome}}=0.31\text{--}0.49\text{\AA}$ aufeinander gepasst werden. Die RMS-Abweichungen zu den Monomeren der D-Hyd in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ sind mit $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}=0.40\text{--}0.55\text{\AA}$ und $\text{RMSD}_{\text{alleAtome}}=0.64\text{--}0.72\text{\AA}$ etwas höher. Generell sind die Unterschiede zwischen den Monomeren gering. Größere Unterschiede zwischen den Ketten befinden sich in den Loopbereichen entfernt vom aktiven Zentrum (s. Abb. 5.3a) und spiegeln eine höhere Flexibilität der betreffenden Bereiche wieder. Dies drückt sich in erhöhten B-Faktoren aus (s. Abb. 5.3a).

In manchen Bereichen der Struktur bilden sich Cluster von zwei oder drei Strukturen, z.B. im Bereich des flexiblen Loops zwischen den β -Strängen β_5 und β_6 (s. Abb. 5.3b). Allerdings sind diese Cluster nicht konsistent im gesamten Monomer, so dass man die Monomere nicht generell in verschiedene Gruppen einteilen kann. Deshalb werden diese Unterschiede eher als ein Ausdruck der statischen und dynamischen Unordnung der Moleküle im Kristall angesehen und ihnen keine biologische Funktion beigemessen.

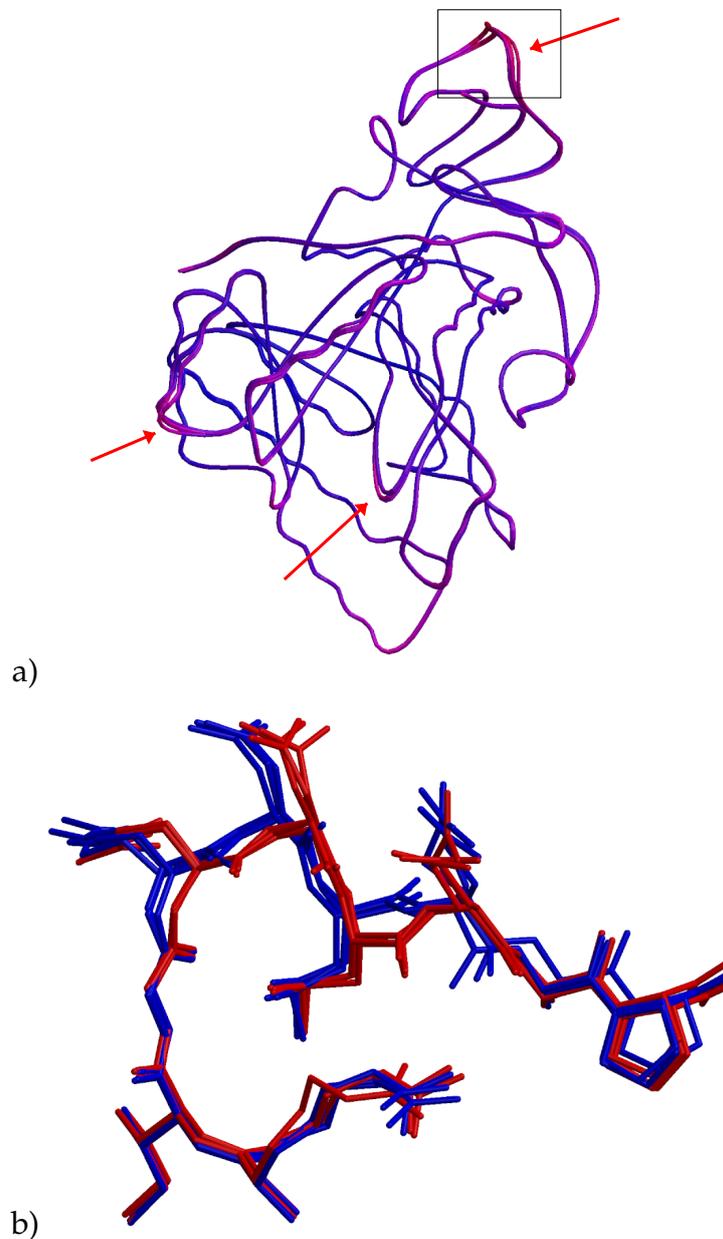


Abbildung 5.3: Unterschiede zwischen den sechs Monomeren der D-Hyd:
a) Abhängigkeit der Unterschiede von den B-Faktoren: Die $C\alpha$ -Ketten aller sechs Monomere sind übereinandergepasst und nach B-Faktoren von blau nach rot gefärbt. Die Pfeile markieren die Bereiche mit den höchsten B-Faktoren und Abweichungen der NCS. Der Rahmen markiert den in b) vergrößerten Bereich.
b) Die Vergrößerte Darstellung des flexiblen Loops zwischen $\beta 5$ und $\beta 6$ zeigt eine Clusterbildung in zwei Gruppen. Ketten A, C und F sind rot, Ketten B, D und E sind blau gefärbt.

5.1.3 L-Hyd

Die Topologie und die generelle Faltung eines Monomers sind in Abbildung 5.4 dargestellt. Das Monomer hat eine räumliche Ausdehnung von $70\text{\AA} \times 50\text{\AA} \times 50\text{\AA}$, das Tetramer von $120\text{\AA} \times 80\text{\AA} \times 80\text{\AA}$.

Das Monomer besteht aus zwei Domänen, einem zentralen $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel, das von mehreren zusätzlichen Helices flankiert ist, und einer β -Faltblatt-Domäne, die aus N- und C-Terminus gebildet ist. Die große Ähnlichkeit zur D-Hyd wird im folgenden Kapitel 5.1.4 genauer beschrieben.

Das zentrale $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel ist elliptisch verzerrt. Es besteht aus den Helices $\alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \alpha_5, \alpha_8, \alpha_9, \alpha_{14}, \alpha_{18}$ und den β -Strängen $\beta_8, \beta_9, \beta_{10}, \beta_{11}, \beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{15}$ (s. Abb. 5.5b) und erstreckt sich innerhalb der Residuen 56-348. Das $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel wird flankiert von vier zusätzlichen α -Helices, sechs kurzen 3_{10} -Helices und einem kleinen β -Strang.

Die β -Faltblatt-Domäne besteht aus zwei β -Faltblättern. Das größere β -Faltblatt besteht aus sieben Strängen ($\beta_3, \beta_2, \beta_7, \beta_{17}, \beta_{20}, \beta_{21}$ und β_{22}) in einer antiparallelen Anordnung. Die ersten drei Stränge gehören zum N-Terminus, die anderen vier Stränge zum C-Terminus. Das kleinere Falblatt besteht aus vier Strängen vom N-Terminus ($\beta_5, \beta_4, \beta_1, \beta_6$) in einer gemischt parallelen/antiparallelen Anordnung.

Der C-Terminus windet sich hinter dem Falblatt β_{22} in einem weiten Bogen um einen Teil der Struktur. Die letzten 15 Residuen lassen sich keiner Sekundärstruktur zuordnen (s. Abb. 5.4).

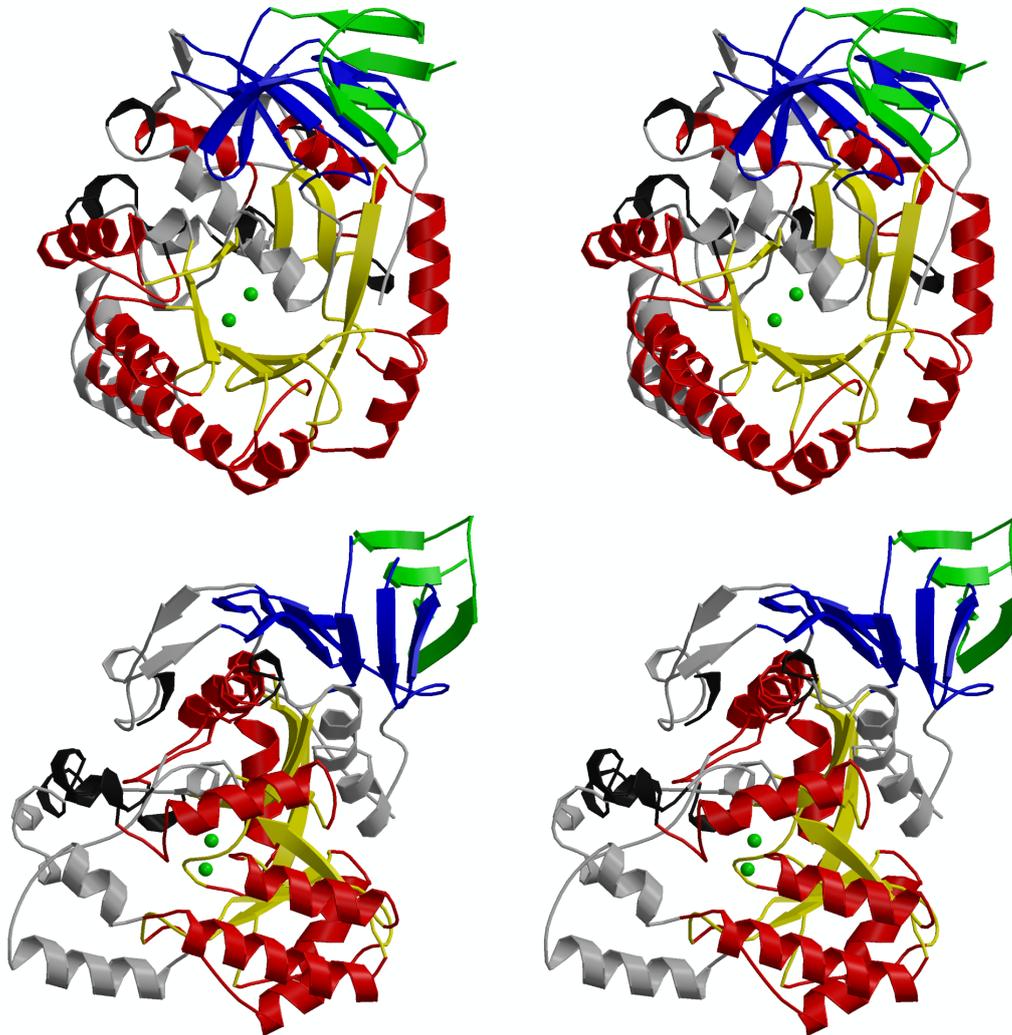


Abbildung 5.4: Die Faltung der L-Hyd in Stereodarstellung .

Die Banddiagramme zeigen die Faltung der L-Hyd aus zwei unterschiedlichen Blickwinkeln (45 Grad Rotation um die vertikale Achse) in Stereodarstellungen. Die obere Abbildung gibt eine Aufsicht auf das Barrel und zeigt das elliptisch verzerrte oben links leicht geöffnete Barrel.

Die untere Abbildung zeigt das Barrel von der Seite und hebt die Anordnung der Domänen und des aktiven Zentrums hervor. Die Farbgebung ist wie in [Abbildung 5.1](#)

5.1.4 Homologe Strukturen

Der Vergleich der Topologien der D-Hyd und L-Hyd (s. Abb 5.5) zeigt die hohe Homologie zwischen den beiden Enzymen. Die war bereits durch die signifikante Sequenzidentität von 29% vermutet worden. Unterschiede in den kleinen Sekundärstrukturelementen sind vor allem Effekte der Sekundärstrukturzuordnung durch DSSP zurückzuführen. Diese Bereiche unterscheiden sich bei Betrachtung der Struktur deutlich weniger als es die Darstellung der Sekundärstrukturelemente suggeriert. Wenn bei einem strukturellem Alignment für strukturell äquivalente $C\alpha$ -Atome eine obere Zuordnungsgrenze von 1.8\AA gesetzt wird, lassen sich als 45% der $C\alpha$ -Atome der beiden Enzyme mit einer RMS-Abweichung von $\text{RMS}_{C\alpha}=1.0\text{\AA}$ zuordnen. Trotz der Homologien gibt es jedoch signifikante Unterschiede im Detail (s. Abb. 5.6).

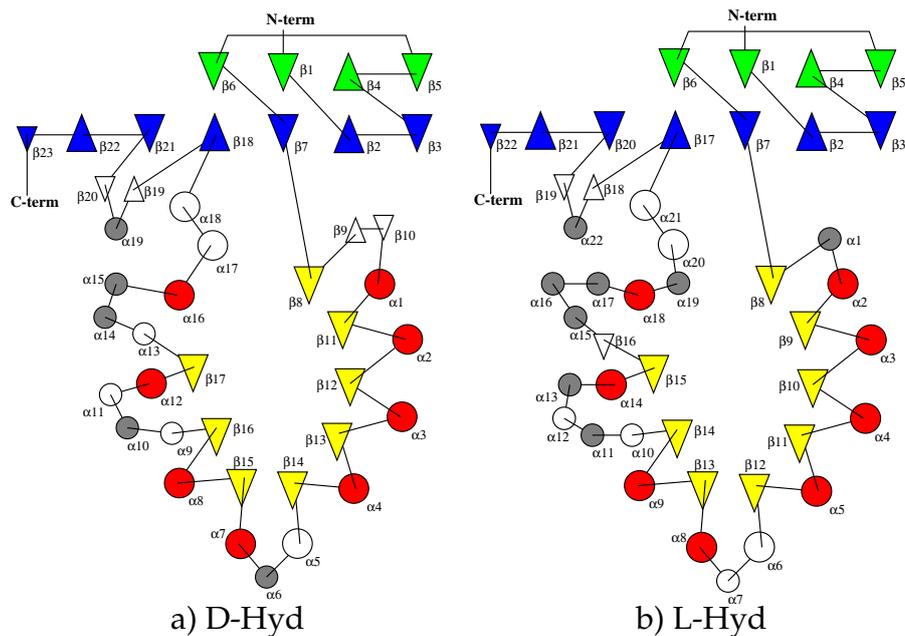


Abbildung 5.5: Die Skizzierung der Topologie der Monomere von D- und L-Hyd zeigt die hohe Homologie. Faltblätter sind durch Dreiecke, Helices durch Kreise dargestellt. Deren Größe spiegelt die Größe der jeweiligen Sekundärstrukturelemente wieder. Das Farbschema und die räumliche Orientierung entsprechen den Banddiagrammen in Abb. 5.1 und Abb. 5.4.

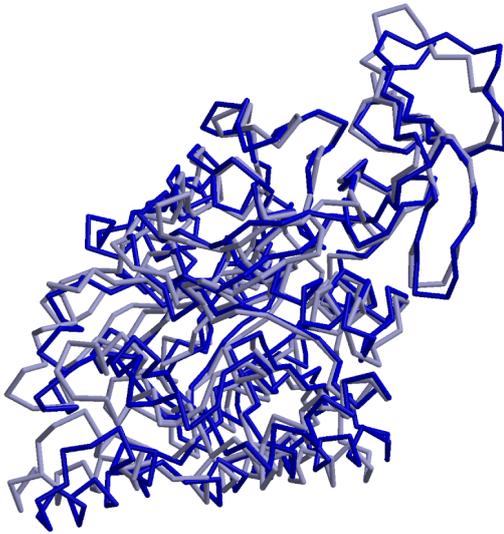


Abbildung 5.6: Der Vergleich der $C\alpha$ -Ketten D-Hyd (hellblau) und L-Hyd (dunkelblau) nach einem Strukturalignment verdeutlicht die gleiche Faltung, aber auch die strukturellen Unterschiede.

Bereits bei der Analyse der Sequenzen der D-Hyd (s. Kap. 4.1) und der L-Hyd (May *et al.*, 1998a) wurde die Homologie zwischen den Hydantoinasen und anderen Amidohydrolasen wie den Ureasen deutlich. Bei einer Suche nach homologen Strukturen zum D-Hyd-Monomer in der gesamten PDB traten vor allem die γ -Untereinheiten der Ureasen aus *Bacillus pasteurii* (2UBP, Benini *et al.*, 1999) und aus *Klebsiella aerogenes* (2KAU, Jabri *et al.*, 1995) hervor. Wenn bei einem strukturellen Alignment für strukturell äquivalente $C\alpha$ -Atome eine obere Zuordnungsgrenze von 1.8\AA gesetzt wird lassen sich mehr als 45% der $C\alpha$ -Atome von D-Hyd mit den entsprechenden $C\alpha$ -Atomen der Ureasen bei RMS-Abweichungen von $\text{RMSD}_{C\alpha}=1.2\text{\AA}$ anpassen. Damit liegen die Ureasen nur unwesentlich über den RMS-Abweichungen zwischen D-Hyd und L-Hyd. Die Ureasen haben eine sehr ähnliche Faltung: Sie bestehen ebenfalls aus einem zentralen $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel, das auch elliptisch verzerrt ist, und einer β -Faltblatt-Domäne, die umfangreicher ist als bei den Hydantoinasen. Die Strukturhomologie wird sowohl im Strukturalignment (s. Abb. 5.7) als auch im strukturbasierten Sequenzalignment deutlich (s. Abb. 5.8). Neben mehreren kleineren Insertionen und Deletionen im Vergleich zu den Hydantoinasen haben die Ureasen deutlich längere Sequenzbereiche im C- und N-terminalen Bereich. Dadurch ist bei den Ureasen die β -Faltblatt-Domäne deutlich größer.

Die nächste Gruppe der strukturhomologen Proteine sind die Phosphotriesterasen, zum Beispiel die Phosphotriesterase aus *Pseudomonas diminuta* (1HZY, Benning *et al.*, 2001). 31% der C α -Atome der D-Hyd lassen sich zu äquivalenten C α -Atome der Phosphotriesterase mit einer RMS-Abweichung von $RMSD_{C\alpha}=1.2\text{\AA}$ zuordnen. Die Phosphotriesterasen bestehen ausschließlich aus der (α/β)₈-Barrel. Ihnen fehlen im Vergleich zu den Hydantoinasen und Ureasen die β -Faltblatt-Domäne.

Holm & Sander (1997) schlugen eine Proteinfamilie von ureaseähnlichen Proteinen vor, zu der neben Amidohyrolasen wie Dihydroorotasen, Allantoinasen, AMP-, Adenin- und Cytosin-Deaminasen auch funktionell weiter entfernte Enzyme wie Imidazolonepropionasen, Aryldialkylphosphatasen, Chlorohydrolasen und Formylmethanofuran-Dehydrogenasen gehören. Diese Proteinfamilie zeichnet sich durch eine ähnliche Faltung und eine ähnliche Architektur des aktiven Zentrums aus. Die Hydantoinasen passen zwanglos in diese Gruppe. Diese breite Verteilung von strukturell ähnlichen Enzymen ist ein Ausdruck für die versatile Verwendung des stabilen (α/β)₈-Barrel bei Proteinfaltungen.

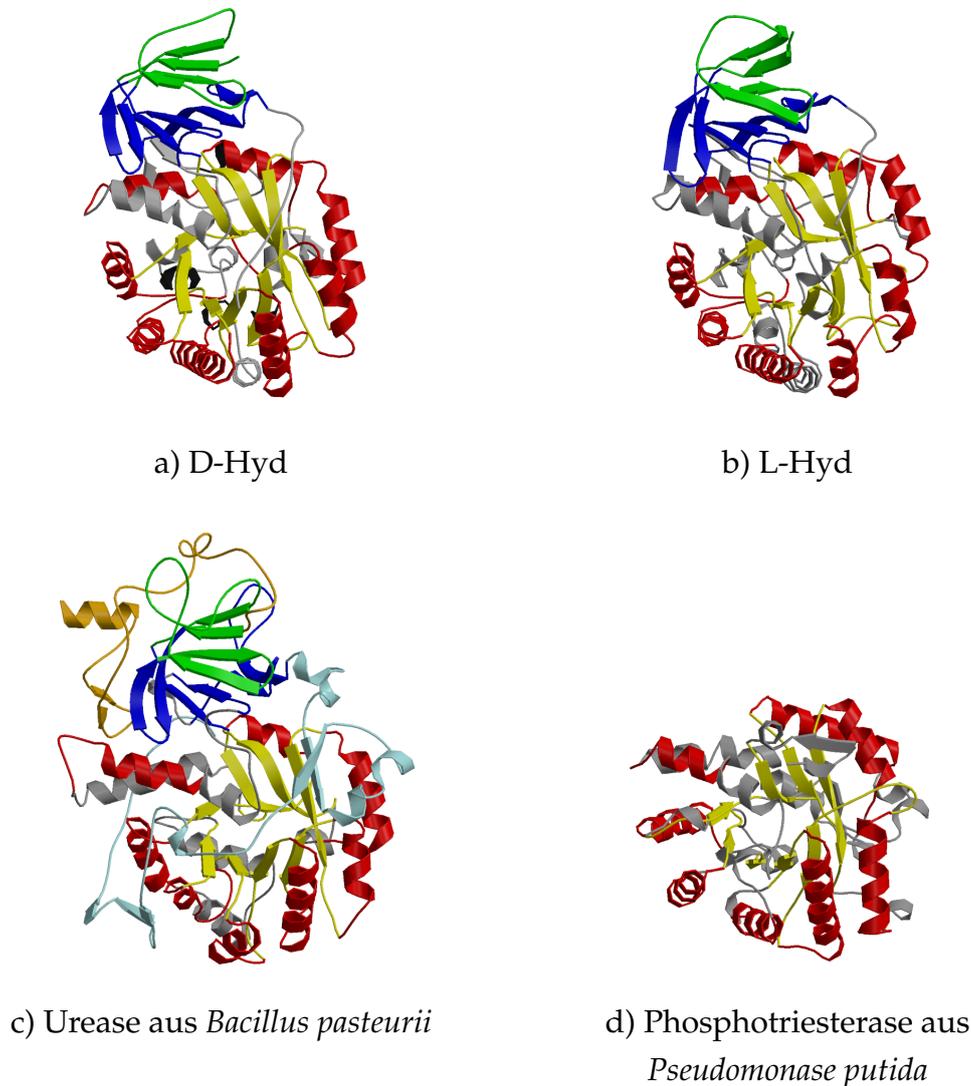


Abbildung 5.7: Strukturalignment von D-Hyd (a), L-Hyd (b), Urease aus *Bacillus pasteurii* und Phosphotriesterase aus *Pseudomonase putida*. Die Färbung der korrespondierenden Sekundärstrukturelemente unterstreicht die strukturelle Ähnlichkeit der Strukturen. Das zentrale, elliptisch verzerrte $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel befindet sich in allen Strukturen. Die β -Faltblatt-Domäne ist in der Urease deutlich größer als in den beiden Hydantoinasen. In der Phosphotriesterase ist sie nicht vorhanden.

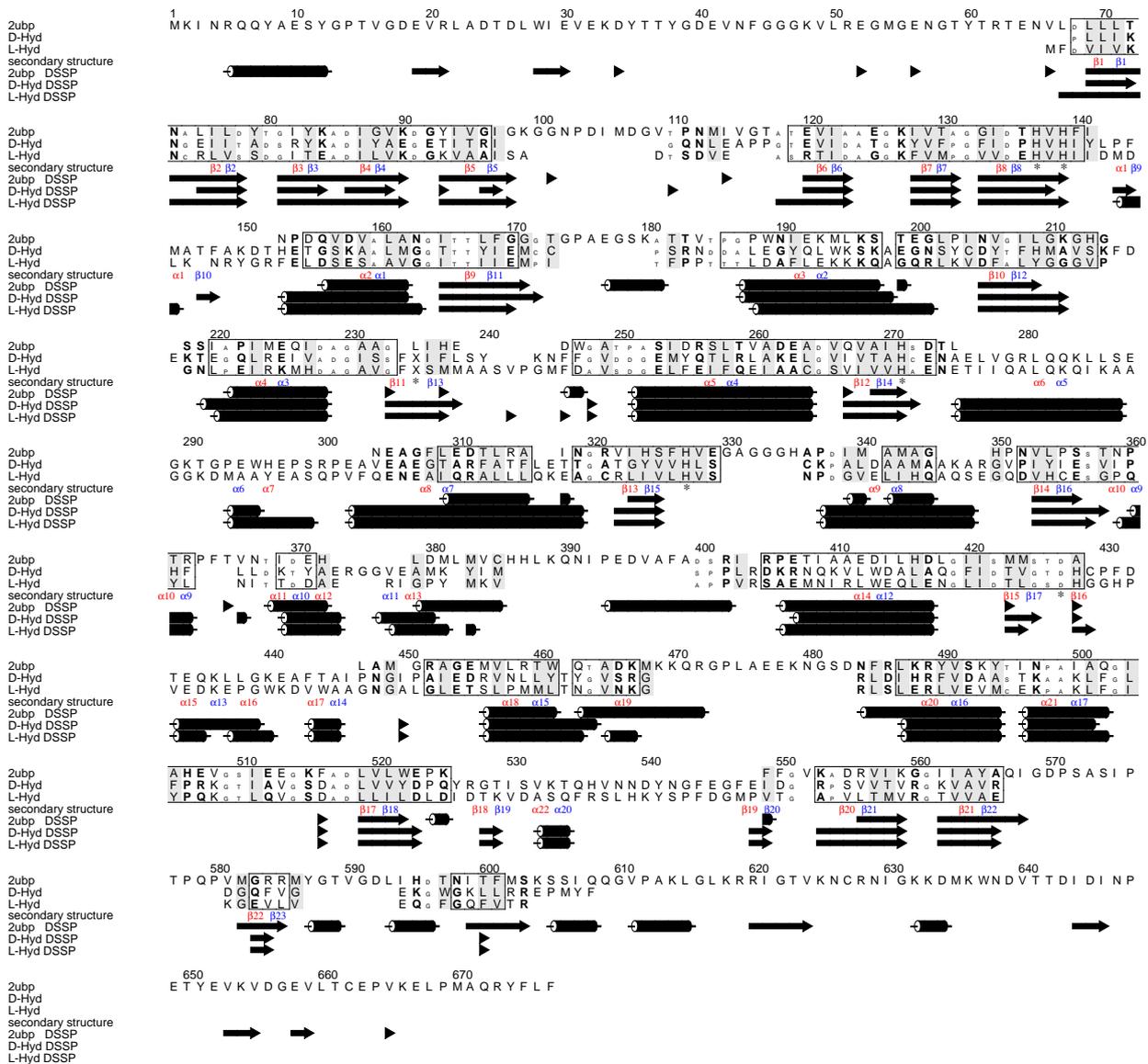


Abbildung 5.8: Das strukturbasierte Sequenzalignment von D- und L-Hyd mit der α -Untereinheit der Urease aus *Bacillus pasteurii* zeigt die hohe Homologie zwischen den Enzymen. In den jeweils ersten drei Zeilen sind die Sequenzen dargestellt, konservierte Residuen sind hervorgehoben. In der jeweils vierten Zeile ist die Benennung des Sekundärstrukturelementes eingefügt, in blau für die D-Hyd, in rot für die L-Hyd. Ein * kennzeichnet die Residuen des aktiven Zentrums. In den jeweils folgenden drei Zeilen sind die Sekundärstrukturelemente dargestellt.

5.2 Kristallkontakte

Bevor im folgenden Kapitel 5.3 die Quartärstruktur der untersuchten Hydantoinasen beschrieben und diskutiert wird, sollen hier zunächst einmal die Protein-Protein-Kontakte diskutiert werden, die nicht durch die Oligomerisierung, sondern durch die Packung im Kristall entstanden sind (Kristallkontakte). In Tabelle 5.1 sind für die beiden Kristallformen der D-Hyd und für die L-Hyd die Größen der relevanten Oberflächen aufgelistet. Diese Oberflächen wurden nach dem Verfahren von Lee & Richards (1971) berechnet und beziehen sich auf Fläche pro Protomer.

Tabelle 5.1: Kristall-, Oligomerkontakte und Packungsdichte bei den beiden Kristallformen der D-Hyd und bei der L-Hyd. Die Kontaktflächen beziehen sich auf jeweils ein Monomer.

	D-Hyd C222 ₁	D-Hyd P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	L-Hyd P2 ₁
Monomer	16400Å ²	16400Å ²	16400Å ²
Kristallkontakte			
Summe [Å ²]	830Å ²	1275Å ²	765Å ²
≡	5%	8%	5%
größter	350Å ²	640Å ²	525Å ²
Oligomerkontakte			
Summe	2050Å ²	2050Å ²	1470Å ²
≡	13%	13%	9%
A/B	1220Å ²	1195Å ²	635Å ²
A/C	830Å ²	855Å ²	835Å ²
Packungsdichte			
V _M	2.33 $\frac{\text{Å}^3}{\text{Da}}$	2.79 $\frac{\text{Å}^3}{\text{Da}}$	2.88 $\frac{\text{Å}^3}{\text{Da}}$
Solvens	42%	61%	63%

Die Kristallpackungen in den beiden polymorphen Kristallformen der D-Hyd unterscheiden sich deutlich. In der Raumgruppe C222₁ sind 5% der

Gesamtoberfläche eines Monomers an Kristallkontakten beteiligt, in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ sind es mit 8% deutlich mehr. Es erscheint zunächst widersprüchlich, dass es in den Kristallen der Raumgruppe $C222_1$ bei einer dichteren Kristallpackung kleinere Kristallkontakte gibt als in den weniger dicht gepackten Kristallen der Raumgruppe $P2_12_12_1$. Die zunächst widersprüchlich erscheinende Dies ist darauf zurückzuführen, dass es bei den Kristallen der Raumgruppe $P2_12_12_1$ weniger Kristallkontakte gibt, die aber sehr unterschiedliche Größen haben (265\AA^2 , 370\AA^2 und 640\AA^2 für Monomer A). In den Kristallen der Raumgruppe $C222_1$ gibt es mehr Kristallkontakte, die aber eine geringere Größe haben (55\AA^2 , 195\AA^2 , 230\AA^2 und 350\AA^2).

Bei der L-Hyd sind 5% der Gesamtoberfläche des Monomers an Kristallkontakten beteiligt. Auch hier gibt es wie bei den D-Hyd-Kristallen der Raumgruppe $P2_12_12_1$ deutliche Unterschiede in der Größe (30\AA^2 , 205\AA^2 und 530\AA^2 für Monomer A).

Bei allen Kristallformen sind die Gesamtflächen der Oligomerkontakte eines Monomers ungefähr doppelt so groß wie die Kristallkontakte. Wegen der einen großen Kristallkontaktfläche bei den Kristallformen $P2_12_12_1$ und $P2_1$ sind die kleinsten Oligomerkontakte nicht sehr viel größer als die größten Kristallkontakte. Aus Vergleichen der drei Kristallformen ließen sich jedoch die Quartärstrukturen eindeutig zuordnen.

5.3 Quartärstruktur

5.3.1 D-Hyd

Bis zur Lösung der Struktur war ungeklärt, ob D-Hyd als Dimer oder Tetramer vorliegt. Die analytische Gelpermeationschromatographie ergab kein eindeutiges Ergebnis. Die dynamische Lichtstreuung (s. Tab. 3.2) wies eher auf Dimere hin. Wenn bei der Präparation der SDS-Gele die Proben nicht lange genug erhitzt wurden, kam es gelegentlich zu Banden, die einem Dimer entsprechen.

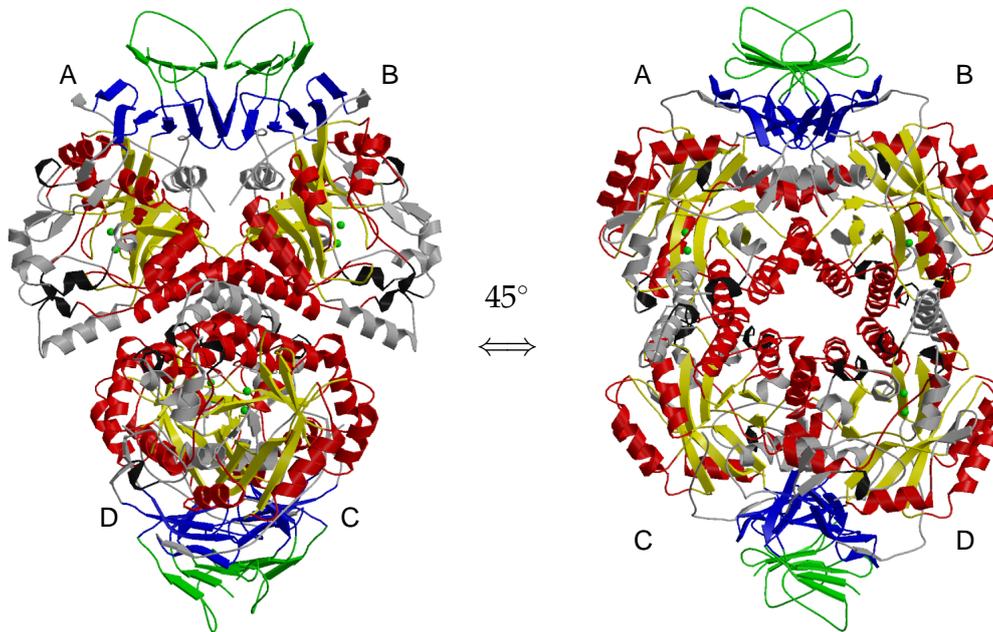


Abbildung 5.9: Tetramere D-Hyd:

Das Tetramer der D-Hyd ist in zwei verschiedenen Orientierungen dargestellt, die sich um eine 45°-Drehung um die vertikale Achse unterscheiden. Das Farbschema ist wie in Abb. 5.1.

Die Selbstrotationsfunktion war sowohl mit einer dimeren als auch mit einer tetrameren Anordnung im Kristall vereinbar.

Mit der Lösung der Struktur ließ sich die Frage der Quartärstruktur eindeutig lösen. Im Kristall liegt die D-Hyd als Tetramer mit einer internen 222-Punktgruppensymmetrie vor. Ein solches Tetramer ist in Abbildung 5.9 dargestellt.

In der asymmetrischen Einheit der Kristallform der Raumgruppe $C222_1$ liegen drei Hälften von Tetrameren. Die Tetramere setzen sich aus den Monomeren (1-6) und ihren kristallographischen Äquivalenten (1'-6') wie folgt zusammen: 121'2', 345'6', 563'4'. Diese ungewöhnliche Zusammensetzung deutet auf eine pseudo-hexagonale Raumgruppe hin (vgl. Kap. 3.6.1). Die unterschiedlichen Tetramere sind sich sehr ähnlich. Sie können ohne signifikante Verzerrungen

aufeinander gepasst werden. Das Tetramer, das sich in der asymmetrischen Einheit der Raumgruppe $P2_12_12_1$ befindet, zeigt ebenfalls keine signifikanten Abweichungen von den Tetrameren der Raumgruppe $C222_1$.

Innerhalb des Tetramers gibt es zwei unterschiedliche Kontaktflächen (s. Abb. 5.9): Die größere Kontaktfläche befindet sich zwischen den Monomeren A-B und C-D und umfasst 1220\AA^2 pro Monomer, die deutlich kleinere Kontaktfläche befindet sich zwischen den Monomeren A-C und B-D und umfasst 830\AA^2 pro Monomer. Monomere A-D und B-D berühren sich nicht. Die solvenszugängliche Oberfläche eines Monomers beträgt 16400\AA^2 . Somit sind rund 13% der solvenszugänglichen Oberfläche an Kontakten innerhalb des Tetramers beteiligt. Dies entspricht rund dem 2.5-fachen der Oberfläche der Kristallkontakte (vgl. Tab. 5.1).

Das Dimer mit der größeren Kontaktfläche erinnert an die Form einer menschlichen Lunge. An Hand dieses Bildes lassen sich Lagen der Kontaktflächen im Tetramer anschaulich beschreiben:

Die größere Kontaktfläche (A-B und C-D) befindet sich an der *Luftröhre* zwischen den beiden *Lungenflügeln*. Es gibt zwei räumlich getrennte Bereiche der Kontaktstellen. Der eine Bereich wird durch Residuen der β -Faltblatt-Domäne gebildet, die zu den β -Strängen β_2 , β_3 und β_5 gehören. Das Faltblatt β_5 aus der β -Faltblatt-Domäne wird im benachbarten Monomer antiparallel fortgesetzt. Der andere Bereich wird von Residuen des $(\alpha/\beta)_8$ -Barrels gebildet. Diese Residuen befinden sich vor allem in den Helices α_8 , α_{12} und α_{17} , dem Faltblatt β_{16} und den Loops in dieser Region gebildet werden. Im gesamten Interface gibt es neben etlichen hydrophoben Wechselwirkungen nach den Kriterien von [Baker & Hubbard \(1984\)](#) 14 Wasserstoff-Brücken. Salzbrücken gibt es dahingegen nicht. Die Residuen His361 und Arg362, die sich in α -Helix 16 befinden, binden in allen Monomeren ein Sulfat, das aus der Kristallisationslösung stammt und dem keine biologische Funktion zugeordnet wird.

Die kleinere Kontaktfläche befindet sich am *Zwerchfell* und wird ausschließlich

von Residuen aus α -Helices gebildet. Zwei dieser Helices stammen aus dem Barrel ($\alpha 4$ und $\alpha 7$), die dritte Helix ($\alpha 5$) ist eine der zusätzlichen Helices. Anders als bei der anderen Kontaktfläche sind die beteiligten Residuen in einem engen Sequenzbereich lokalisiert. Auch die Art der Wechselwirkungen unterscheidet sich deutlich von der anderen Kontaktfläche: Es überwiegen hier die hydrophoben Wechselwirkungen. In dieser Kontaktfläche gibt es nur eine Wasserstoff-Brücke, dafür vier Salzbrücken.

Dass die tetramere Anordnung auch wirklich die native Anordnung und kein Artefakt der Kristallisation ist, lässt sich aus den folgenden Beobachtungen schließen:

- Das gleiche Tetramer der D-Hyd gibt es auch in den Kristallen der Raumgruppe $P2_12_12_1$. Diese Kristallform ist unter anderen Kristallisationsbedingungen entstanden. Die Kristallkontakte in den beiden Kristallformen unterscheiden sich deutlich.
- Auch die kleinere Kontaktfläche innerhalb des Tetramers ist vor allem in der Raumgruppe $C222_1$ deutlich größer als der größte Kristallkontakt.
- Die L-Hyd liegt in einem ähnlichen Tetramer vor (s. Kap. 5.3.2).
- Desweiteren zeigt der hydrodynamische Radius in der Lichtstreuung keine Konzentrationsabhängigkeit über einen weiten Konzentrationsbereich, so dass eine konzentrationsabhängige Oligomerisierung ausgeschlossen werden kann.

5.3.2 L-Hyd

Bei der L-Hydantoinase war bereits vor der Strukturlösung eine tetramere Anordnung vermutet worden (May *et al.*, 1998b). Das Tetramer der L-Hyd ist in Abbildung 5.10 dargestellt. Ein Tetramer bildet den Inhalt einer asymmetrischen Einheit und hat eine interne 222-Punktgruppen-Symmetrie. Dies ist in Übereinstimmung mit den Peaks aus der Selbstrotationsfunktion (s. Abb. 3.11). Die Anordnung ähnelt sehr der Anordnung in der D-Hydantoinase,

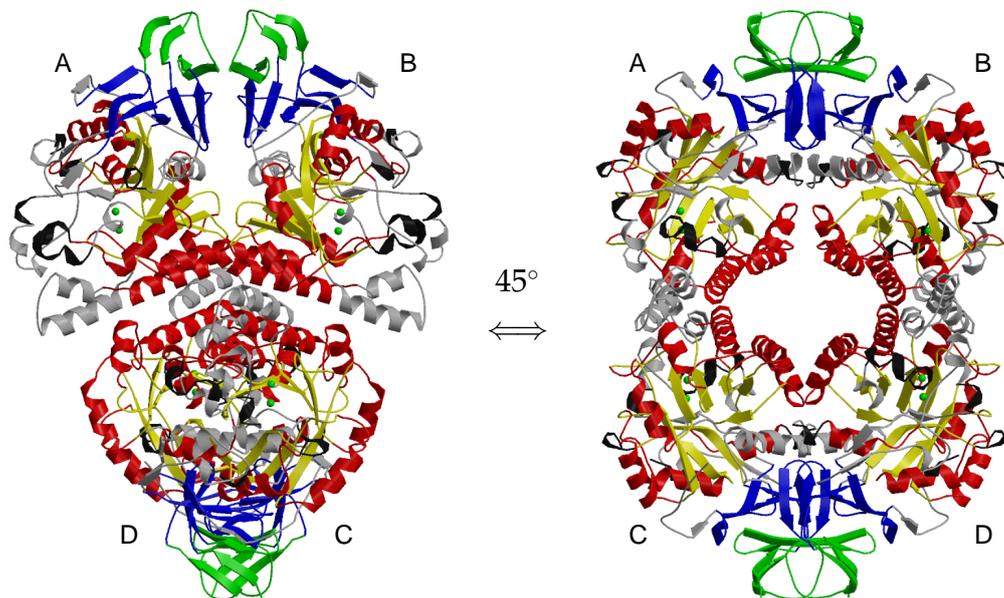


Abbildung 5.10: L-Hyd Tetramer:

Das Tetramer der L-Hyd ist in zwei verschiedenen Orientierungen dargestellt, die sich um eine 45° -Drehung um die vertikale Achse unterscheiden. Das Farbschema ist wie in Abb. 5.1.

so dass sich auch hier zur einfacheren Orientierung das Modell der Lunge anwenden lässt. Wie bei der D-Hyd kann man das Tetramer der L-Hyd mit zwei am Zwerchfell miteinander verbundenen Lungen vergleichen.

Innerhalb des Tetramers gibt es zwei unterschiedliche Kontaktflächen: Die Kontaktfläche zwischen den Untereinheiten A/B bzw. C/D befindet sich an der *Luftröhre* umfasst 635\AA^2 . Die Kontaktfläche zwischen den Untereinheiten A/C und B/D befindet sich am *Zwerchfell* und umfasst 835\AA^2 . Zwischen den Untereinheiten A/D bzw. B/C gibt es keine Kontaktflächen. Pro Monomer gibt es 16400\AA^2 solvenszugängliche Oberfläche. Somit sind 9% der Oberfläche an Tetramer-Kontakten beteiligt, nahezu doppelt so viel wie an Kristallkontakten.

Die Kontakte zwischen den Untereinheiten A/B bzw. C/D sind vor allem im

β -Stang $\beta 5$ lokalisiert. Das kleine der beiden β -Faltblätter wird im benachbarten Monomer antiparallel fortgesetzt. Aus dem unteren Bereich der Luftröhre machen nur zwei Residuen aus der α -Helix $\alpha 9$ und aus einem Loop Kontakte zum benachbarten Monomer. Neben einigen hydrophoben Kontakten gibt es nach den Kriterien von [Baker & Hubbard \(1984\)](#) fünf Wasserstoff-Brücken.

Die Residuen, die die größere der beiden Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten A/C bzw. B/D bilden, befinden sich ausschließlich in den α -Helices $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 8$. In diesem Bereich gibt es neben hydrophoben Wechselwirkungen vier Wasserstoff-Brücken.

5.3.3 Vergleiche mit homologen Strukturen

Die hohe Homologie zwischen der D- und der L-Hyd bei der Faltung setzt sich auch bei der Quartärstruktur fort. Beide bestehen aus Tetrameren mit einer internen 222-Punktgruppensymmetrie. Trotz der hohen Homologie gibt es doch deutlich Unterschiede: Während die Kontaktflächen im Bereich des *Zwerchfells* bei beiden Tetrameren nahezu identisch groß sind (1710\AA^2 bei D-Hyd, 1670\AA^2 bei L-Hyd), sind die Kontaktflächen im Bereich der *Luftröhre* bei der D-Hyd fast doppelt so groß wie bei der L-Hyd (2390\AA^2 bei D-Hyd, 1270\AA^2 bei L-Hyd). Das Dimer, das eine *Lunge* ausmacht, ist bei der L-Hyd zum unteren Ende der *Luftröhre* hin um 14° weiter geöffnet als bei der D-Hyd (DYNDOM, [CCP4, 1994](#)). Dies ist in [Abbildung 5.11](#) veranschaulicht. Die Rotationsachse dieser Öffnung befindet sich im Bereich der Kontaktfläche zwischen den β -Strängen. Dadurch bleibt diese Kontaktfläche erhalten, während die Kontaktfläche an den α -Helices am unteren Teil deutlich kleiner wird.

Die oligomere Zusammenlagerung von Proteinen kann verschiedene biologische Funktionen haben. So sind regulatorische Funktionen wie Allosterie oder Kooperativität an Oligomere geknüpft. Für Hydantoinasen ist solches allerdings nicht bekannt. Wenn aus der L-Hyd das Metall durch chelatisierende Reagenzien wie 8-Hydroxychinolinsäure entfernt wird, so erfolgt neben der reversiblen

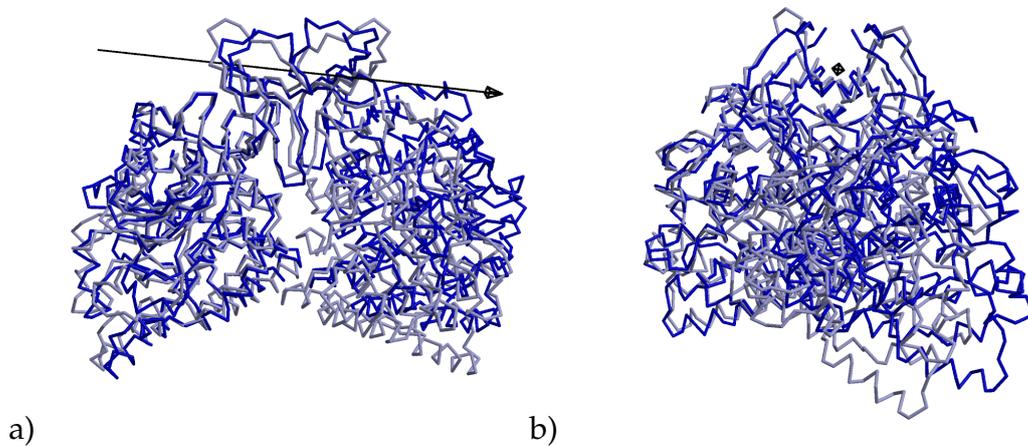


Abbildung 5.11: Beim Vergleich eines Dimers aus den Monomeren A und B von D-Hyd (blau) und L-Hyd (rot) wird die unterschiedliche Öffnung deutlich. Der Pfeil markiert die gedachte Achse, um die die L-Hyd weiter geöffnet wird. Der Blickwinkel in b) ist entlang dieser Achse.

Inaktivierung auch ein Zerfall des Tetramers in Monomere (May *et al.*, 1998d). Deshalb wurden dem Zink neben katalytischen auch strukturelle Funktionen zugeschrieben. In der Struktur der L-Hyd ließen sich jedoch außerhalb des aktiven Zentrums keine Metalle lokalisieren. Die Struktur liefert auch keinen Hinweis für eine Erklärung dieser Beobachtungen.

Andere strukturell verwandte Enzyme haben vollständig verschiedene Quartärstrukturen. Die Ureasen formen ein $(\alpha\beta\gamma)_3$ Trimer vom Heterotrimer. Die Phosphotriesterase bildet Dimere, die aber mit keinem der möglichen Hydantoinase-Dimere übereinstimmen.

5.4 Aktives Zentrum

5.4.1 D-Hyd

Das aktive Zentrum der D-Hyd befindet sich an dem Ende des Barrels, das von der β -Faltblattdomäne entfernt ist (s. Abb. 5.1), am Ende eines ca. 15Å tiefen hydrophoben Kanals (s. Abb. 5.12). Die Residuen, die das aktive Zentrum bilden, befinden sich am C-Terminus von verschiedenen β -Strängen (β_8 , β_{13} , β_{14} , β_{15} , β_{17}) des Barrels (s. Abb. 5.8). Diese topologische Lokalisation wurde bereits von [Holm & Sander \(1997\)](#) für verschiedene Amidohydrolasen vorhergesagt. Generell ist bei Enzymen mit einer $(\alpha/\beta)_8$ -Faltung das C-terminale Ende des Barrels eine bevorzugte Lokalisation des aktiven Zentrums.

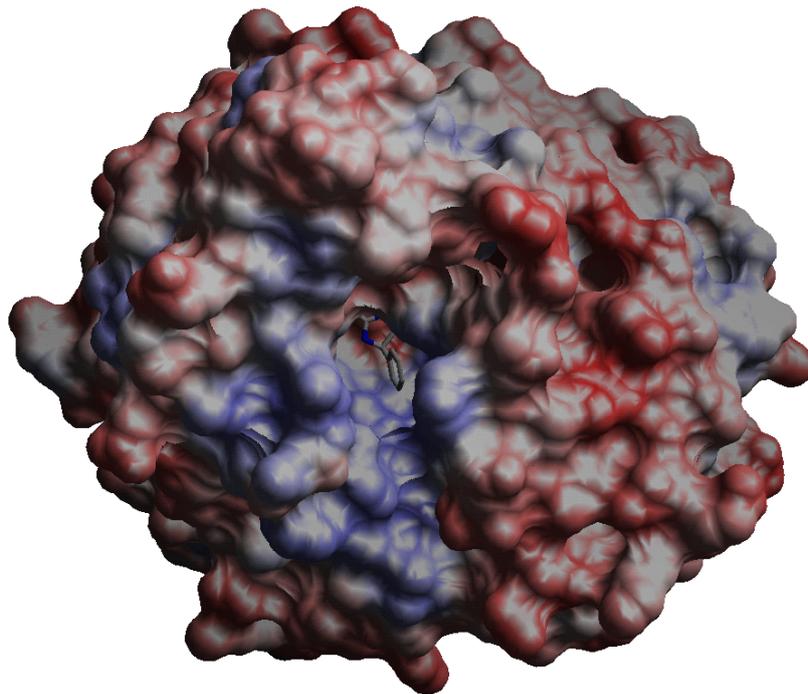


Abbildung 5.12: Die nach Hydrophobizität (von rot nach blau) gefärbte Oberfläche der D-Hyd verdeutlicht den hydrophoben Kanal, an dessen Ende das aktive Zentrum liegt. Die Lage des aktiven Zentrums wird durch ein manuell modelliertes Substrat (s. Kap. 5.5.2) angezeigt.

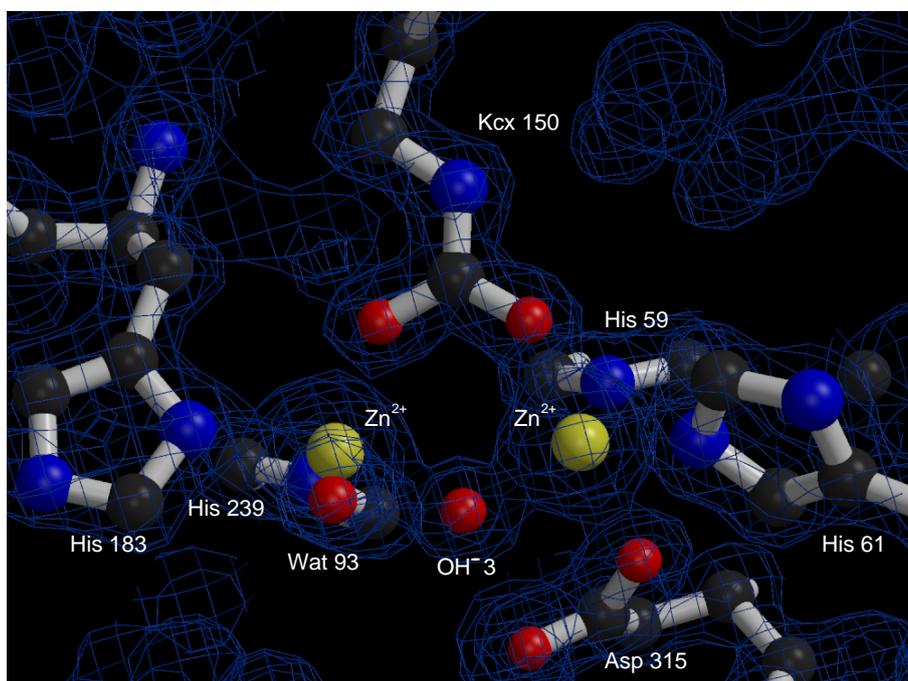


Abbildung 5.13: Aktives Zentrum der D-Hyd:

Residuen des aktiven Zentrums der D-Hyd überlagert mit der sigmaA-gewichteten $2F_oF_c$ -Elektronendichte bei 1.3\AA -Auflösung und 1.0σ . Das zentrale binukleare Zinkzentrum wird überbrückt von einem carboxylierten Lysin (Kcx150) und einem Hydroxidion (OH^-3). Die weiteren Liganden sind je zwei Histidine (His59 und His61 bzw. His183 und His239) sowie ein Aspartat (Asp315) und ein Wasser (Wat93).

Die Elektronendichte im aktiven Zentrum ist sehr gut definiert (s. Abb. 5.13), so dass der Datensatz einen sehr detaillierten Einblick in das aktive Zentrum und in die Koordination der Metalle gewährt.

Zentral im aktiven Zentrum liegen zwei Zinkionen. Diese sind mit isotropen Temperaturfaktoren von $16\text{--}21\text{ \AA}^2$ gut lokalisiert und haben einen Abstand von 3.6\AA . Beide Zinkionen sind pentakoordiniert (s. Abb. 5.14):

Zink 1 wird koordiniert von Kcx150 O δ 1 (carboxyliertes Lysin, s. Kap. 5.4.3), His183 N δ , His239 N ϵ , $^-$ OH3 O and H $_2$ O93 O. Die Geometrie der Koordination ist

nach den Kriterien von Addison ([Addison *et al.*, 1984](#)) leicht verzerrt quadratisch pyramidal. Der apikale Ligand (Spitze der Pyramide) ist dabei Kcx150 O δ 1.

Zink 2 wird koordiniert von Kcx150 O δ 2, His59 N ϵ , His61 N ϵ , $^-$ OH3 O und Asp315 O δ 1 in einer verzerrt trigonal-bipyrimidalen Geometrie, bei der die Ebene von His59 N ϵ , His61 N ϵ und $^-$ OH3 O gebildet wird. Während His59, His61 und His239 das bevorzugte N ϵ zur Bindung von Zink verwenden, ist es bei His183 das deutlich weniger bevorzugte N δ .

Die beiden Zinkionen werden überbrückt durch die beiden Sauerstoffatome O δ 1 und O δ 2 des carboxylierten Lysins und durch das Hydroxidion $^-$ OH3. Die Nähe zu den beiden Zinkionen führt dazu, dass dieses Hydroxidion vorwiegend im deprotonierten Zustand vorliegt und somit bei der Hydrolyse der Hydantoine als Nukleophil agieren kann (s. Kap. 5.5.1).

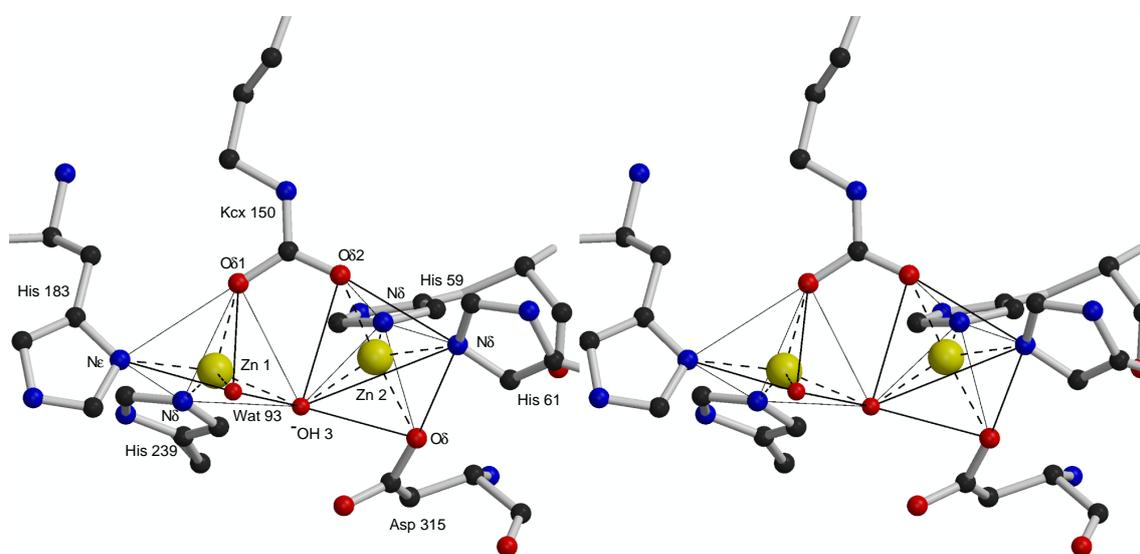


Abbildung 5.14: Koordination der Zinkionen im aktiven Zentrum der D-Hyd in Stereodarstellung. Die verzerrt quadratisch-pyramidale Koordination von Zn 1 und die verzerrt trigonal-bipyrimidale Koordination von Zn 2 sind verdeutlicht.

5.4.2 L-Hyd

Das aktive Zentrum der L-Hyd befindet sich ähnlich wie bei der D-Hyd auf der einen Seite des $(\alpha/\beta)_8$ -Barrels (s. Abb. 5.4) am Ende eines ca. 15Å tiefen Kanals. Die beteiligten Residuen gehören zu den C-terminalen Enden der β -Stränge β_8 , β_{11} , β_{12} , β_{13} , β_{15} (s. Abb. 5.8).

Die aktiven Zentren der L-Hyd und der D-Hyd sind sehr ähnlich. Auch hier sind zwei Zinkionen überbrückt von einem carboxylierten Lysin und einem Hydroxidion. Die weitere Koordination besteht aus je zwei Histidinen und einem Aspartat. Zink 1 wird koordiniert von Kcx147 O δ 1, His183 N δ , His239 N ϵ und $^-$ OH1 O, Zink 2 von Kcx147 O δ 2, His60 N ϵ , His62 N ϵ , $^-$ OH1 O and Asp312 O δ 1. Aufgrund der deutlich geringeren Auflösung der Daten (2.6Å im Vergleich mit 1.3Å bei der D-Hyd) lassen sich keine weiteren koordinierenden Wasser lokalisieren. Die hohe Homologie der aktiven Zentren von D- und L-Hyd ist in Abbildung 5.15 verdeutlicht.

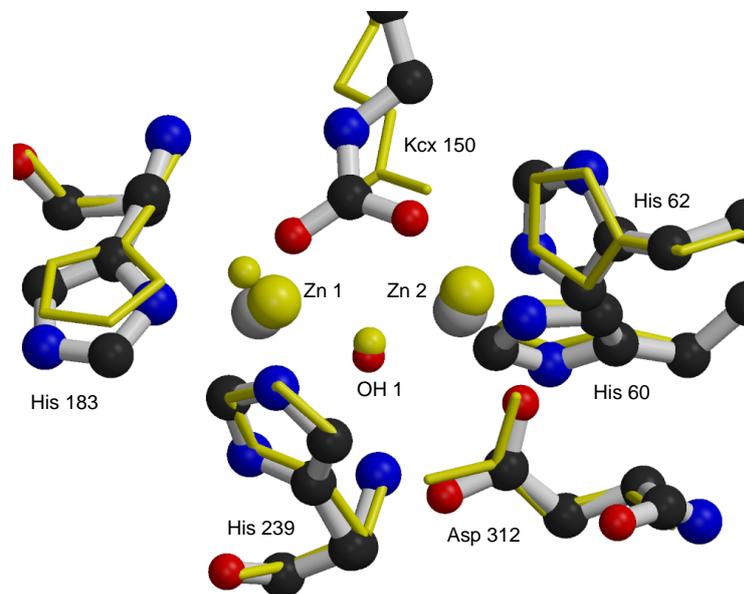


Abbildung 5.15: Aktives Zentrum der L-Hyd:

Die Überlagerung des aktiven Zentrums der L-Hyd mit dem der D-Hyd (in gelb) verdeutlicht die hohe Homologie.

5.4.3 Das aktive Zentrum bei homologen Strukturen

Wie in Abbildung 5.15 dargestellt, ähneln sich die Bereiche der Metallbindung der aktiven Zentren von D- und L-Hyd sehr stark. Diese Architektur der Metallbindung findet man ebenfalls bei den Ureasen und Phosphotriesterasen. Die erste Koordinationssphäre der Metalle wird von identischen Residuen mit gleichen Geometrien gebildet wie bei den Hydantoinasen (s. Abb. 5.16). In Tabelle 5.2 sind die relevanten Abstände im aktiven Zentrum aufgelistet und mit Durchschnittswerten aus der CSD verglichen. Auch hier zeigt sich die hohe Homologie. Die etwas abweichenden Werte bei der L-Hyd sind auf die deutlich geringere Auflösung zurückzuführen. Somit besteht nicht nur bei der Faltung, sondern auch beim aktiven Zentrum eine große Homologie zwischen diesen Enzymen (Holm & Sander, 1997).

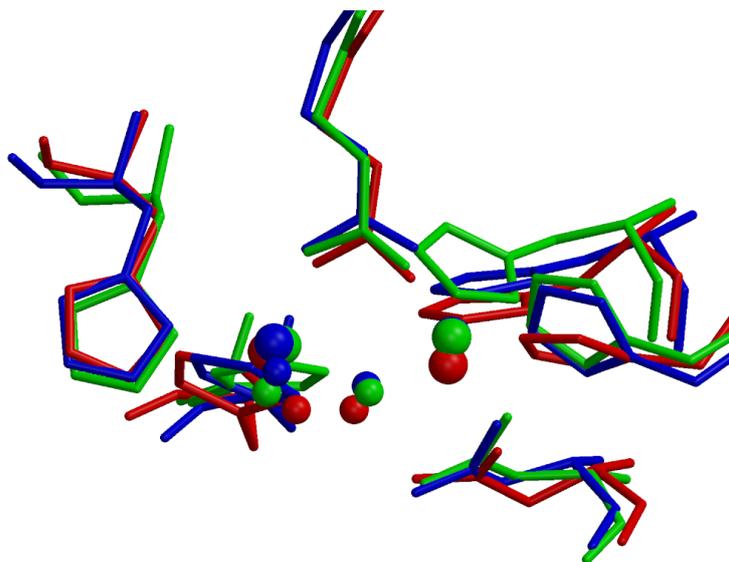


Abbildung 5.16: Vergleich der aktiven Zentren der D-Hyd (blau), Urease aus *Bacillus pasteurii* (rot, 2UBP) Phosphotriesterase aus *Pseudomonas diminuta* (grün, 1HZY). Die Orientierung ist wie in den Abbildungen 5.13 und 5.14. Neben den je zwei Zinkionen sind die Liganden His, Kcx, Asp und das Hydroxidion dargestellt.

Tabelle 5.2: Aufstellung der relevanten Abstände in den aktiven Zentren homologer Proteine in Å. Die Nummerierung der Residuen bezieht sich dabei auf die D-Hyd. Die Idealwerte sind Mittelwerte aus der CSD (Harding, 2001)

Protein	D-Hyd	L-Lyd	Urease	PTE	ideal
PDB-code			2UBP	1HZY	
Auflösung	1.3	2.6	2.0	1.3	
Me ¹ –Me ²	3.6	3.8	3.7	3.4	
Me ¹ –OH3 O	2.1	2.4	2.1	2.0	2.1
Me ¹ –Kcx150 Oδ1	2.0	1.6	2.1	2.0	2.0
Me ¹ –His183 Nδ	2.2	2.0	2.2	2.2	2.0
Me ¹ –His239 Nε	2.3	2.3	2.2	2.1	2.0
Me ¹ –H ₂ O93 O	2.2	—	2.2	2.1	2.1
Me ² –OH3 O	2.0	1.9	2.2	2.0	2.1
Me ² –Kcx150 Oδ2	2.1	2.1	2.1	2.1	2.0
Me ² –His59 Nε	2.2	2.1	2.2	1.8	2.0
Me ² –His61 Nε	2.2	2.0	2.2	2.1	2.0
Me ² –Asp315 Oδ1	2.2	2.0	2.2	2.2	2.0

5.4.4 Carboxylierung des Lysins im aktiven Zentrum

Das Lysin im aktiven Zentrum von D- und L-Hyd weist eine besondere Modifikation auf. Durch Carboxylierung entsteht Lysin-Nζ-carboxylsäure (PDB-Kürzel Kcx). Diese posttranslationale Modifikation kennt man auch bei einer Reihe anderer Enzyme. In Kristallstrukturen ist sie bislang beschrieben worden bei den Ureasen aus *Bacillus pasteurii* (Benini *et al.*, 1999) und *Klebsiella aerogenes* (Jabri *et al.*, 1995), der Phosphotriesterase aus *Pseudomonas diminuta* (Vanhoose *et al.*, 1996), der Ribulose Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RUBISCO) aus *Spinacia oleracea* (Spinatblätter Andersson, 1996), einer UDP-N-Acetylmuramoyl-L-Alanin:D-Glutamat-Ligase aus *E. coli* (Bertrand *et al.*, 1997) und einer Alanin-Racemase aus *Bacillus stearothermophilus* (Shaw *et al.*, 1997; Morollo *et al.*, 1999).

In den Hydantoinasen (Zn), den Ureasen (Ni) und der Phosphotriesterase (Zn, Cd) dient dieses carbamylierte Lysin zur Bindung von zwei Metallionen, in RUBISCO von einem Magnesium-Ion, während in den UDP-N-Acetylmuramoyl-L-Alanin:D-Glutamat-Ligasen die Metallpositionen von Wasser besetzt sind. In der Alanin-Racemase werden über die beiden Sauerstoffatome der Carbamylgruppe (O δ 1, O δ 2) von Kcx129 die Stickstoffatome N ϵ und NH1/2 von Arg¹³⁶ gebunden und somit Orientierung des substratbindenden Arginins fixiert.

Die Verwendung von carboxyliertem Lysin kann rein sterische oder auch chemische Gründe haben:

- Die Residuen des aktiven Zentrums gehören zu verschiedenen Teilen des (α/β)₈-Barrels und befinden sich somit in einer rigiden Umgebung. Da die Seitenkette vom carboxylierten Lysin im Vergleich zu Glutamat eine Bindung länger ist, könnte Glutamat für eine effektive Bindung zum Zink schlichtweg zu kurz sein.
- Mögliche Resonanzstrukturen der Carbamat-Gruppe (s. Abb. 5.17) führen zu einer stärker negativen Partialladung auf den Sauerstoffatomen O θ 1 und O θ 2, so dass die Carbamat-Gruppe Zink fester binden kann.

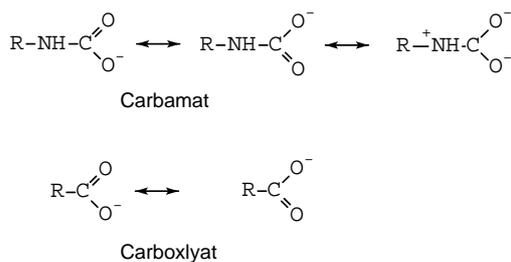


Abbildung 5.17: Der Vergleich der Resonanzformeln von Carbamat- und Carboxylat-Gruppe illustriert die unterschiedliche Partialladung der Sauerstoffe

Bei der Urease aus *Klebsiella aerogenes* (Pearson *et al.*, 1998) und der Phosphotriesterase aus *Pseudomonas diminuta* (Kuo *et al.*, 1997) wurde untersucht, welches der tatsächliche Grund für die Carboxylierung des Lysins sein kann. Dafür wurde das Lysin des aktiven Zentrums gegen Glutamat, Alanin oder Cystein ausgetauscht. In allen Fällen wurde keine Aktivität mehr beobachtet. In den

Röntgenstrukturen konnte im aktiven Zentrum kein Metall mehr beobachtet werden. Die Aktivität konnte *in vitro* durch Inkubation des metallfreien Enzyms mit kleinen organischen Säuren (z.B. Ameisen- oder Essigsäure) teilweise wiederhergestellt werden. In den Röntgenstrukturen der so reaktivierten Enzyme wurde wieder Metall lokalisiert. Die Carboxylgruppe der zugegebenen Säuren übernimmt die überbrückende Funktion der Carbamylgruppe des Lysins.

Diese wird Funktion bei manchen Enzymen mit vergleichbaren Koordinationen in binuklearen Metallzentren von einer Carboxylat-Gruppe übernommen. Beispielsweise geschieht dies bei der Aminopeptidase aus *Streptomyces griseus* (1CP7, Gilboa *et al.*, 2000) durch ein Glutamat, bei der menschlichen Glyoxalase II (1QH5, Cameron *et al.*, 1999) durch ein Aspartat.

Aus diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, dass sowohl die Carboxyl- als auch eine Carbamylgruppe die beiden Metallionen überbrücken kann. Wegen der Rigidität des $(\alpha/\beta)_8$ -Barrels, zu dem die metallkoordinierenden Residuen gehören, sind es wohl vorwiegend sterische Gründe, die die Carboxylierung des Lysins erfordern.

Über die Bildung dieser posttranslationalen Modifikation werden für die unterschiedlichen Enzyme verschiedene Wege und Mechanismen berichtet. Für die Urease aus *Klebsiella aerogenes* wird für die Modifikation des Lysins und die Bindung von Nickel ein komplexer GTP-abhängiger enzymatischer Mechanismus unter Verwendung der Hilfsproteine *UreD*, *UreF* und *UreG* vorgeschlagen (Soriano & Hausinger, 1999). *In vitro* konkurriert dieser enzymatische Mechanismus mit einer spontanen Carboxylierung von Lysin mit gelöstem Kohlendioxid (Park & Hausinger, 1996). In RUBISCO entfernt eine Aktivase inhibierende Zucker-Phosphate vom Lysin, so dass eine spontane Carboxylierung und Bindung von Magnesium möglich wird. Weder für Hydantoinasen noch für die Phosphotriesterasen ist ein enzymatischer Mechanismus beobachtet worden. In einem solchen Fall müsste dieses Enzym für die Hydantoinase in *Bacillus sp.*, *Arthrobacter aurescens* und *E. coli* vorhanden sein. Aufgrund der Lage des betreffenden Lysins am Ende eines tiefen Kanals

müsste die Modifikation während der Proteinfaltung erfolgen. Deshalb würde ich für die Hydantoinasen derzeit einen nicht-enzymatischen Weg favorisieren.

Aus ^{13}C -NMR-Untersuchungen an Insulin (Griffey *et al.*, 1988) gibt es Hinweise darauf, dass bei physiologischen Kohlendioxid-Konzentrationen in Abhängigkeit vom pH-Wert bis zu 6% der terminalen α -Aminogruppen und bis zu 2% der ϵ -Aminogruppen von Lysin carboxyliert sind. Die pH-Abhängigkeit ist ein Ausdruck der Konkurrenz zwischen der notwendigen und der mit steigendem pH-Wert steigenden Deprotonierung von Lysin und der mit sinkendem pH-Wert steigenden Löslichkeit von Kohlendioxid.

Aus den unterschiedlichen Funktionen, der zumindest teilweise spontanen Bildung und der „Entstehungsgeschichte der Entdeckung der Carboxylierung“ bei den einzelnen Proteinstrukturen mag geschlossen werden, dass diese posttranslationale Modifikation bei einer Reihe von Röntgenstrukturen mit mittlerer und niedriger Auflösung bislang noch nicht berücksichtigt worden ist und möglicherweise deutlich häufiger vorkommt, als bislang angenommen.

5.4.5 Das binukleare Metallzentrum

Eine weitere Besonderheit des aktiven Zentrums der Hydantoinasen ist das binukleare Zinkzentrum. Wie bereits in Abbildung 5.16 dargestellt, findet man ein sehr ähnliches dikukleares Metallzentrum mit einer nahezu identischen Koordination auch in den Ureasen aus *Klebsiella aerogenes* und *Bacillus pasteurii* und der Phosphotriesterase aus *Pseudomonas diminuta*. Interessanterweise findet man eine sehr ähnliche Geometrie in einem nicht-Protein-Modell für einen (μZn_2)-Komplex μ -Hydroxo-bis(tris(5-tert-butylpyrazol)zink(II)) Triperchlorat (Alsfasser & Vahrenkamp, 1993) und im *ab initio* berechneten aktiven Zentrum der Phosphotriesterase aus *Pseudomonas diminuta* (Kafafi & Krauss, 1999).

Während in den Hydantoinasen (May *et al.*, 1998d) und Phosphotriesterasen Zink das gebundene Metall ist, ist es bei den Ureasen Nickel. Das Zn^{2+} kann bei

der L-Hyd durch Co^{2+} und bei geringeren Aktivitäten durch Mn^{2+} (May *et al.*, 1998c), und bei der Phosphotriesterase ohne Aktivitätsverlust durch Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} und Mn^{2+} ersetzt werden.

Neben den oben erwähnten Mutanten sind von der Urease aus *Klebsiella aerogenes* und der Phosphotriesterase aus *Pseudomonas diminuta* auch die Strukturen von metallfreien und von metallsubstituierten Enzymen bekannt.

In der D-Hyd sind beide Zinkionen penta-koordiniert: Zn1 in einer verzerrt quadratisch-planaren, Zn2 in einer leicht verzerrt trigonal-bipyramidalen Geometrie. Da die Lokalisation von Wasser als möglicher Metallligand abhängig von der Auflösung des gemessenen Datensatzes ist, können beim Vergleich der Koordinationsgeometrien die Strukturen der D-Hyd (1.3Å Auflösung), der Urease aus *Bacillus pasteurii* (2.0Å Auflösung, Benini *et al.*, 1999) und der Phosphotriesterase aus *Pseudomonas diminuta* (1.3Å Auflösung, Benning *et al.*, 2001) verwendet werden, nicht jedoch die Struktur der L-Hyd (2.6Å Auflösung).

In der nativen Urease aus *Bacillus pasteurii* (2UBP) ist Ni1 ebenfalls verzerrt quadratisch-planar penta-koordiniert, Ni2 verzerrt oktaedrisch hexakoordiniert. In inhibierten Ureasen verändert sich die Koordinationsgeometrie. Bei der nativen Phosphotriesterase aus *Pseudomonas diminuta* ist Zn1 verzerrt-tetraedrisch tetra-koordiniert, Zn2 trigonal-bipyramidal penta-koordiniert. Auch hier wird die Koordinationsgeometrie durch gebundene Inhibitoren und Substitution des Zn^{2+} durch Cd^{2+} oder Mn^{2+} verändert.

In Urease und Phosphotriesterase konnten den beiden Metallen unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden:

In der Urease ist das penta-koordinierte Ni1 elektrophiler als das hexakoordinierte Ni2. Der Harnstoff wird deshalb über den Carbonyl-Sauerstoff an Ni1, über eine Aminogruppe an Ni2 gebunden, so dass das überbrückende Hydroxidion den Carbonyl-Kohlenstoff nukleophil angreifen kann.

Bei der Phosphotriesterase wird unterschieden zwischen der weniger solvenszugänglichen α -Position (Zn2) und der stärker solvenszugänglichen β -Position (Zn1). Eines oder beide Zink lassen sich selektiv durch Cadmium substituieren. Bei Untersuchungen mit $\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}^{2+-}$, $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+-}$ und $\text{Cd}^{2+}/\text{Cd}^{2+-}$ -Phosphotriesterase zeigte sich, dass die β -Position zuerst das Metall austauscht und dass das Metall an der α -Position einen stärkeren Einfluss auf die Katalyse hat als das Metall an der β -Position. Dies ist im Widerspruch mit bei der weiter unten diskutierten Substratbindung bei den Hydantoinasen: Zn1 (β -Position) und Zn2 (α -Position) aktivieren das zwischen ihnen liegende Wasser. Zn1 bindet das Substrat und polarisiert die Carbonyl-Gruppe, während Zn2 keine Bindung zum Substrat ausübt.

5.4.6 Weitere binukleare Zinkzentren

Binukleare Zinkzentren sind neben den zu den Hydantoinasen homologen Strukturen auch in einigen anderen Strukturen von vorwiegend hydrolytischen Enzymen beschrieben worden, die eine vollkommen andere Faltung haben als die Hydantoinasen. Diese Zentren unterscheiden sich in Struktur und Funktion zu unterschiedlichen Graden von den Hydantoinasen. Es lassen sich bei diesem Vergleich die folgenden Gruppen bilden:

Die Zinkzentren der mancher Aminopeptidasen zum Beispiel der Aminopeptidase aus *Streptomyces griseus* (1CP7, 1.58Å Auflösung, s. Abb. 5.18b, [Gilboa et al., 2000](#)) und der menschlichen Glyoxalase II (1QH5, 1.45Å Auflösung, [Cameron et al., 1999](#)) ähneln dem der Hydantoinase am meisten. Auch hier werden die beiden Zinkionen über eine Carboxyl-Gruppe und ein Wasser überbrückt. Die Zn–Zn-Abstände betragen 3.4–3.7Å. Das Wasser liegt deprotoniert vor und dient in der Katalyse als Nukleophil.

In den Zinkzentren der β -Lactamase aus *Bacteroides fragilis* (1ZNB, 1.85Å Auflösung, s. Abb. 5.18c, [Concha et al., 1996](#)) und der Leucin-Aminopeptidase aus *Bos taurus* (1LAM, 1.60Å Auflösung, s. Abb. 5.18d, [Strater & Lipscomb, 1995](#)) werden

die beiden Zinkionen nur von einzelnen Atomen überbrückt. In der β -Lactamase ist dies ein deprotoniertes Wasser, in der Leucin Aminopeptidase überbrückt zusätzlich eine Carboxylatgruppe, allerdings nur mit *einem* Sauerstoff. Der Zn–Zn-Abstand beträgt bei der β -Lactamase 3.5Å, bei der Leucin Aminopeptidase ist er mit 3.0Å deutlich kürzer.

Bei der Klasse-II-Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase aus *E. coli* (1ZEN, 2.5Å Auflösung, s. Abb. 5.18e, Cooper *et al.*, 1996) überbrücken die beiden Stickstoffatome eines Histidins das Zinkzentrum. Der Zn–Zn-Abstand ist dadurch mit 6.2Å deutlich größer. Jedes Zinkion wird zusätzlich unter anderem von einer Carboxylat-Gruppe zweizählig koordiniert.

Eine völlig andere Struktur hat das binukleare Zinkzentrum des DNA-bindenden PUT3-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* (1ZME, 2.5Å Auflösung, s. Abb. 5.18f, Swaminathan *et al.*, 1997). Hier gibt es im DNA-bindenden Bereich einen binuklearen Zn_2Cys_6 -Cluster.

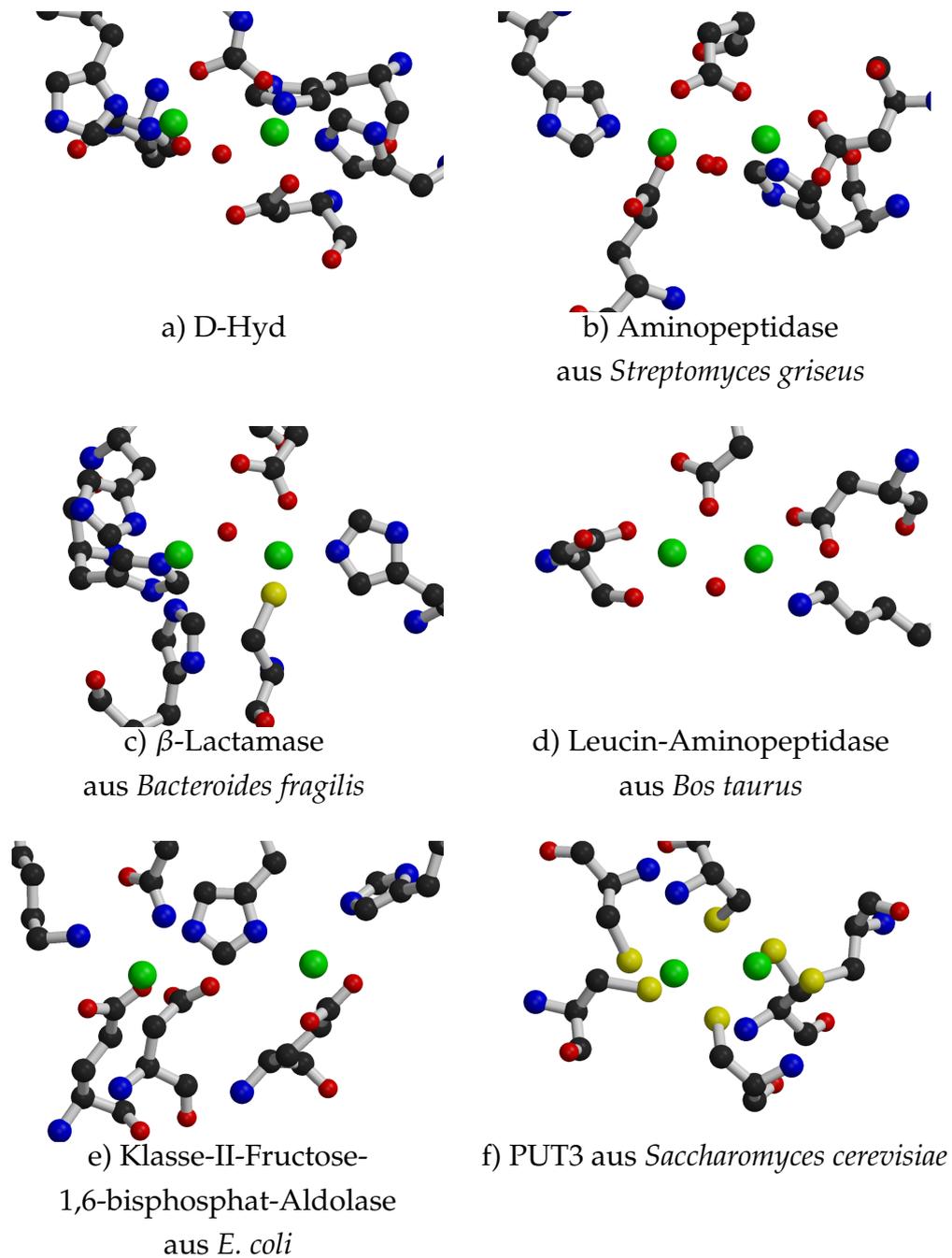


Abbildung 5.18: Der Vergleich unterschiedlicher binuklearer Zinkzentren. Die beiden Zinkionen, jeweils als grüne Punkte dargestellt, sind in (a) und (b) über eine Carboxylatfunktion überbrückt, in (c) und (d) über einzelne Atome, in (e) über ein Histidin. Das Zinkzentrum in (e) hat eine völlig andere Struktur.

5.5 Substratbindung und Katalyse

5.5.1 Vergleich zur Urease

Nachdem die Strukturen der nativen D- und L-Hyd bekannt waren, sollte bei der Interpretation der Strukturen versucht werden, Hinweise für eine Erklärung der unterschiedlichen Substrat- und Enantiospezifität zu finden. Der experimentelle Ansatz, um Informationen über die Substratbindung zu erhalten, ist das *soaking* von Kristallen mit Liganden oder die Co-Kristallisation von Protein und Ligand. Als Liganden kommen Inhibitoren oder Übergangszustandsanaloga in Frage. Da für die Hydantoinasen solche Liganden nicht bekannt sind, konnte der Übergangszustand nur *in silico* modelliert werden.

Das aktive Zentrum der Urease aus *Bacillus pasteurii* ist sehr gut charakterisiert. Die Urease aus *Bacillus pasteurii* wurde sowohl in nativer Form (2UBP) als auch mit einem gebundenen Inhibitor (3UBP) kristallisiert (Benini *et al.*, 1999; Ciurli *et al.*, 1999). Der *in situ* gebildete Inhibitor Diamidophosphonat ist ein Analogon für den tetragonalen Übergangszustand des Harnstoffs bei der Katalyse (s. Abb. 5.19). Analog dazu wurden als Modell für den tetragonalen Übergangszustand bei der Hydrolyse der Hydantoine die entsprechenden geminalen Dirole verwendet (s. Abb. 5.19). Wie bereits in Kapitel 5.4.3 diskutiert, ähneln die aktiven Zentren der Hydantoinasen sehr stark denen der strukturell verwandten Enzyme Urease und Phosphotriesterase.

Auf Grund der Strukturen der nativen und der inhibierten Urease konnte kürzlich ein neuer Reaktionsmechanismus aufgestellt werden (Benini *et al.*, 1999), der im Gegensatz zum bis dahin akzeptierten Mechanismus (Karplus *et al.*, 1997) nicht mehr mit einigen experimentellen Befunden im Konflikt ist. Nach diesem neuen Reaktionsmechanismus wird Harnstoff in einer zweizähligen Geometrie mit dem Sauerstoff an das elektrophilere penta-koordinierte Ni1 und mit dem proximalen Stickstoff an das hexa-koordinierte Ni2 gebunden. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Enzyms, bei der sich der flexible Loop in der Nähe des aktiven Zentrums zum Substrat hin bewegt, wodurch weitere

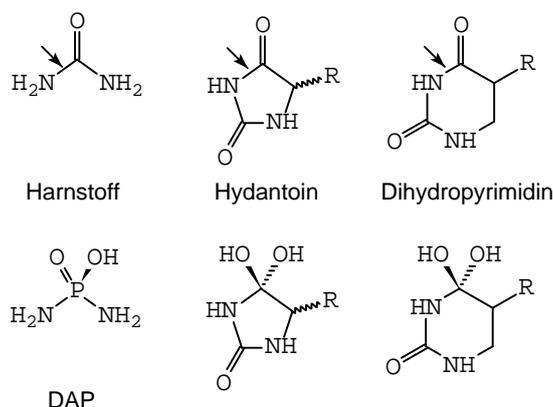


Abbildung 5.19: Substrate und Übergangszustandsanaloga für Urease und Hydantoinase: Der tetragonale Übergangszustand des Harnstoffs bei der Hydrolyse wird durch Diamidophosphat (DAP) simuliert. Analog dazu werden die tetragonalen Übergangszustände von Hydantoin und Dihydropyrimidinen durch die entsprechenden geminalen Dirole modelliert. In den Substraten sind die hydrolysierbaren Bindungen durch Pfeile markiert.

Wasserstoffbrücken gebildet werden können. Durch die Nähe zum Nickel wird die C-O-Bindung polarisiert. Das nukleophile Hydroxidion, das die beiden Nickelatome überbrückt, greift nun den polarisierten Carbonyl-Kohlenstoff an. Es entsteht ein tetraedrischer Übergangszustand, der durch Wasserstoffbrücken zu His222 und His323 stabilisiert wird. Die C-N-Bindung zum distalen Stickstoff wird nun gespalten. Das deprotonierte Carbamat wird durch elektrostatische Abstoßung zu Asp363 O δ 2 aus dem aktiven Zentrum dirigiert.

Die Positionen der Sauerstoffatome des Übergangszustandsanalogons DAP werden in der nativen Urease durch Wasser besetzt. In der D-Hyd befinden sich an äquivalenten Positionen ebenfalls gut definierte Wasser ($^{-}\text{HO3}$ und Wat93, s. Abb. 5.16). Diese wurden nun als Ankerpunkte verwendet, um manuell die Modelle für den tetragonalen Übergangszustand in das aktive Zentrum der D- und L-Hyd zu modellieren. An diese Ankerpunkte wurden die beiden Sauerstoffatome des geminalen Diols gehängt. Das Hydantoin besitzt im Gegensatz zum Harnstoff keine Symmetrie. Somit ist die Lage der zu spaltenden

Bindung aus den Reaktionsprodukten bekannt ist. Deshalb sollten sich aus der modellierten Substratbindung Aussagen machen, die über das Modell hinausgehen.

5.5.2 Substratbindung D-Hyd

Bei der D-Hyd wurden die Positionen der strukturell konservierten Wasser $^{-}\text{OH}_3$ und WAT93 als Ankerpunkte für die Orientierung der Modelle für die Übergangszustände verwendet. Zur Vereinfachung wurde zunächst 5'-Phenyl-hydantoin genommen, da es ein bevorzugtes Substrat bei einer hohen D-Enantiospezifität ist und die Modellierung durch eine geringe Anzahl an möglichen Torsionswinkeln vereinfacht. Es kamen bei der Verwendung von zwei Ankerpunkten generell zwei Orientierungen in Frage, von denen die eine schnell durch sterische Konflikte und wenig produktive Interaktionen verworfen werden konnte. Darauf wurde das Modell um die beiden Ankerpunkte gedreht und die möglichen Torsionswinkel in der Seitenkette angepasst. Die somit erhaltene mögliche Orientierung von D/L-5'-Phenyl-hydantoin ist in [Abbildung 5.20](#) dargestellt.

In dieser Orientierung kann man zwischen zwei Bereichen der Bindung des Substrats im aktiven Zentrum unterscheiden: die Bindung des Hydantoinrings und die Bindungstasche der Seitenkette.

Der Hydantoin-Ring wird durch ein Netz von Wasserstoff-Brückenbindungen im aktiven Zentrum gebunden. Ser288 bildet Wasserstoff-Brücken vom N zum 2O (2.3Å) bzw. vom O zum 3N des Hydantoin-Rings (2.6Å). Asn336 bildet eine lange Wasserstoff-Brücke vom O zum 1N des Hydantoin-Rings (3.9Å). Die beiden Sauerstoffe am 4C sind über kurze Bindungen (2.0-2.2Å) an die beiden Zinkionen gebunden. Im Gegensatz zu den Ureasen, in denen Ni2 die proximale Aminogruppe bindet, gibt es keine weitere Interaktion zwischen Zn2 und dem Substrat. Der tetragonale Übergangszustand kann noch durch die Hydroxyl-Gruppe von Tyr155 stabilisiert werden (2.8Å). Die Wasserstoff-

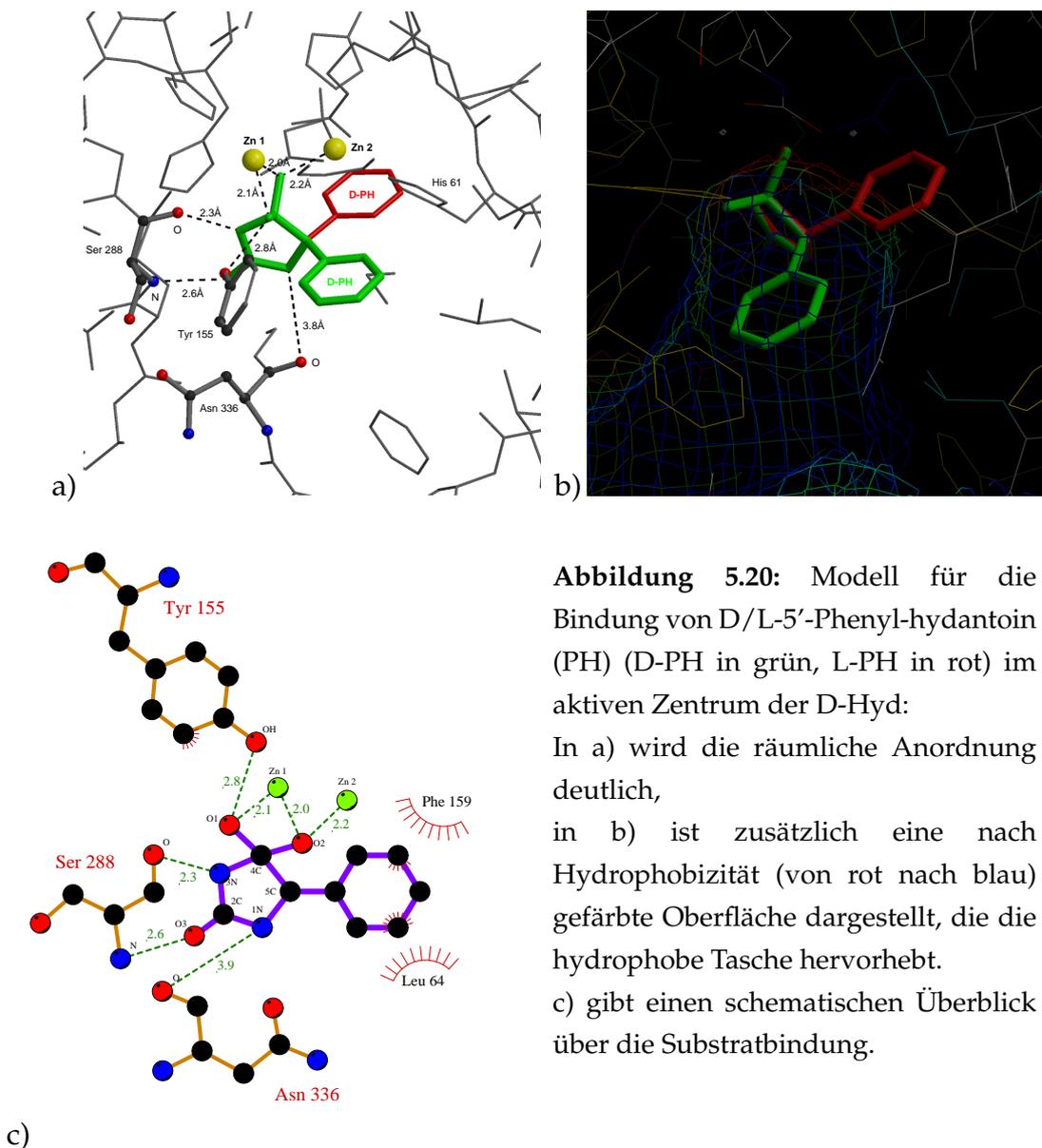


Abbildung 5.20: Modell für die Bindung von D/L-5'-Phenyl-hydantoin (PH) (D-PH in grün, L-PH in rot) im aktiven Zentrum der D-Hyd:

In a) wird die räumliche Anordnung deutlich, in b) ist zusätzlich eine nach Hydrophobizität (von rot nach blau) gefärbte Oberfläche dargestellt, die die hydrophobe Tasche hervorhebt. c) gibt einen schematischen Überblick über die Substratbindung.

Brückenbindung zu Asn336 ist sehr lang (3.9\AA). Bei der L-Hyd, bei der die Umgebung des gebundenen Hydantoin-Rings sehr ähnlich ist, konnte gezeigt werden (s. Kapitel 5.5.3), dass dieser Stickstoff essenziell für die Hydrolyse ist.

In der vorgeschlagenen Orientierung ragt die Seitenkette der 5'-substituierten D-Hydantoinen in eine hydrophobe Tasche, die von Leu64, Cys95, Phe152, Tyr155

und Phe159 gebildet wird. Die hydrophobe Tasche ist in Abbildung 5.20b anhand einer nach Hydrophobizität gefärbten Oberfläche verdeutlicht. Tyr155 hat bei der Substratbindung eine interessante Funktion: die Hydroxylgruppe stabilisiert den polaren Übergangszustand, der Aromat ist Teil der hydrophoben Tasche.

Mit dieser Orientierung lässt sich die hohe Enantiospezifität der D-Hyd für D-5'-Phenyl-hydantoin gut erklären: Bei L-5'-Phenyl-hydantoin würde der Benzolring wie in Abbildung 5.20 dargestellt mit His61 in sterischen Konflikt kommen oder anders argumentiert: Wenn der Benzolring in der hydrophoben Tasche bindet, kann es nicht zu einer produktiven Orientierung der zu spaltenden Amidgruppe zum nukleopilen Hydroxidion kommen.

Die hydrophobe Tasche scheint zu einem großen Teil die Substrat- und Enantiospezifität der D-Hyd (Keil *et al.*, 1995) bei 5'-substituierten Hydantoinen zu dirigieren. Phenylisch substituierte Hydantoine werden bevorzugt umgesetzt. Wenn der Benzolring einen polaren Rest trägt (*p*-Hydroxyphenyl-hydantoin) ist die Hydrolyse deutlich langsamer. Benzylisch substituierte Hydantoine (Benzyl-hydantoin) werden nur schlecht hydrolysiert, da es zu keiner produktiven Bindung kommen kann. Schwefel in hydrophoben Seitenketten (2-Thienyl- und Methyl-thioethyl-hydantoin (MTEH)) scheint ebenfalls bevorzugt zu sein; so wird z.B. MTEH mit einer dreifach höheren spezifischen Aktivität und einem höheren enantionmeren Überschuss (99% ee im Vergleich zu 83% ee) hydrolysiert als vergleichbares *n*-Butyl-hydantoin. Möglicherweise ist hier die Nähe zu Cys95 von Bedeutung.

5-Methyl-hydantoin ist ebenfalls ein gutes Substrat. Wegen der kurzen Seitenkette ist die Enantiospezifität nur gering (34% ee). Die natürlichen Substrate (Dihydropyrimidine) passen ebenfalls zwanglos in der vorgeschlagenen Orientierung in das aktive Zentrum. Bei diesen Sechsringen wird die lange Wasserstoffbrücke zu Asn336 etwas kürzer.

Bei all diesen Betrachtungen ist zu beachten, dass es sich bei den Literaturwerten

zum Umsatz der verschiedenen Hydantoine um Angaben der spezifischen Aktivität und des Enantiomerenüberschusses handelt und dass Angaben zu k_{kat} und K_M nicht verfügbar sind.

Obwohl das vorgeschlagene Modell zur Bindung des Substrats im Einklang mit den experimentellen Befunden ist, bleibt es bis zum experimentellen Beleg durch die Strukturaufklärung der D-Hyd mit einem gebundenen Substrat- oder Übergangszustandsanalogon ein hypothetisches Modell.

5.5.3 Substratbindung L-Hyd

Auch für die L-Hyd ist kein stark bindendener Inhibitor bekannt. Deshalb sollte nun das Modell der Substratbindung von der D-Hyd auf die L-Hyd übertragen werden.

Die L-Hyd ist deutlich umfassender charakterisiert als die D-Hyd. Dadurch und wegen der unterschiedlichen Substrat- und Enantiospezifität konnte die Übertragung der Substratbindung auf die L-Hyd und die Erklärung der unterschiedlichen Spezifitäten auch zur Evaluierung des vorgeschlagenen Modells dienen. Wegen der vergleichsweise geringen Auflösung des verwendeten Datensatzes konnte in der Struktur der L-Hyd nur das Hydroxyd-Ion, nicht aber das andere Wasser verfeinert werden. Deshalb wurden nach einem strukturellen Alignment der aktiven Zentren der D- und L-Hyd die Substrate der L-Hyd analog wie in der D-Hyd orientiert. Dabei wurden zunächst möglichst gute und rigide Substrate wie z. B. D/L-5'-Indolyl-methyl-hydantoin verwendet. In [Abbildung 5.21](#) ist die mögliche Orientierung dieses Substrats im aktiven Zentrum illustriert. Im Folgenden werden die Interaktionen des Hydantionrings und der Seitenkette mit der L-Hyd getrennt diskutiert.

Der Einfluss von Variationen im Hydantoinring auf die Hydrolyse von D/L-5'-Benzyl-hydantoin-Derivaten wurde von [Waniek, 2000](#) untersucht ([Waniek, 2000](#)). Hydantoinderivate, bei denen der Stickstoff (3N) der Amidgruppe,

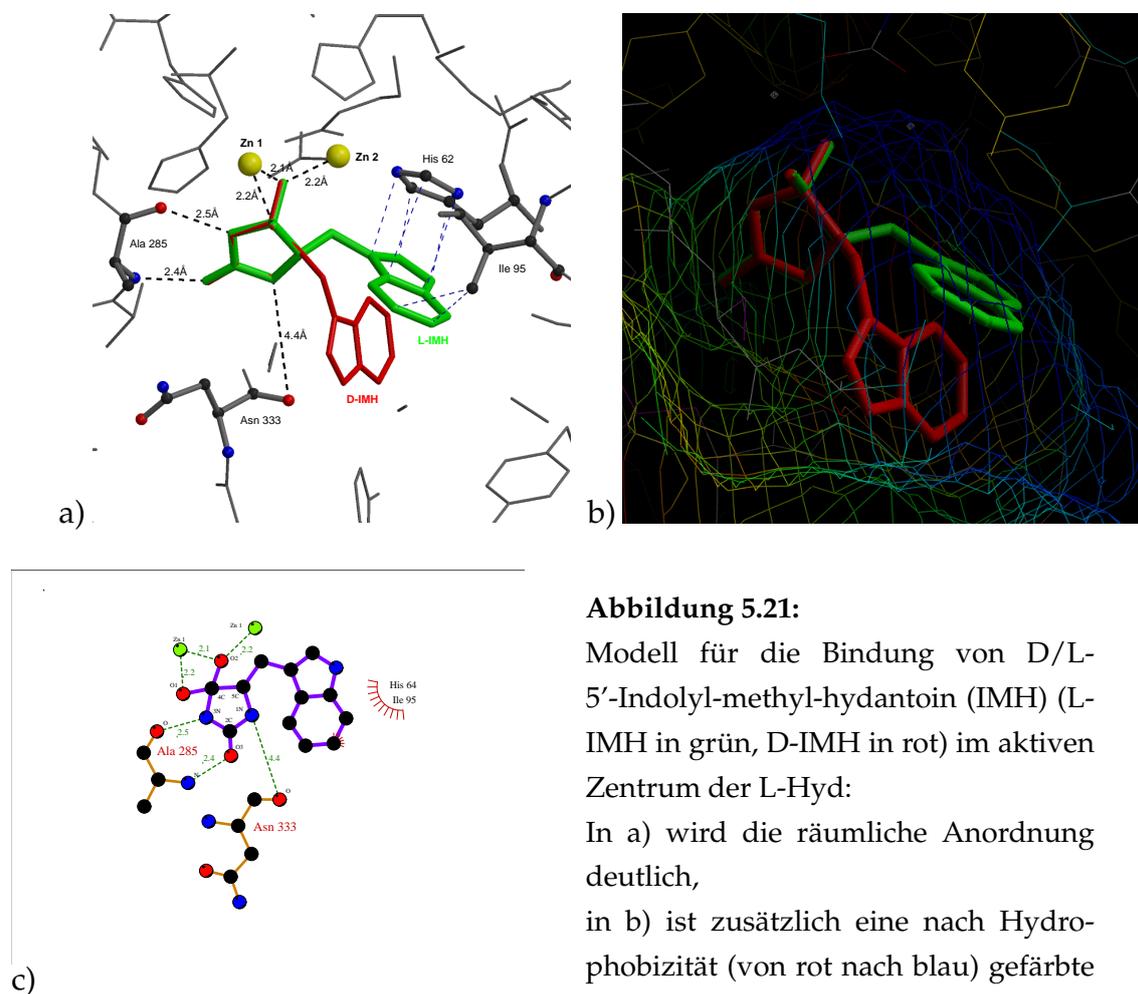


Abbildung 5.21:

Modell für die Bindung von D/L-5'-Indolyl-methyl-hydantoin (IMH) (L-IMH in grün, D-IMH in rot) im aktiven Zentrum der L-Hyd:

In a) wird die räumliche Anordnung deutlich,

in b) ist zusätzlich eine nach Hydrophobizität (von rot nach blau) gefärbte Oberfläche dargestellt, die den hydrophoben Bindungsbereich hervorhebt,

c) gibt einen schematischen Überblick über die Substratbindung von L-IMH.

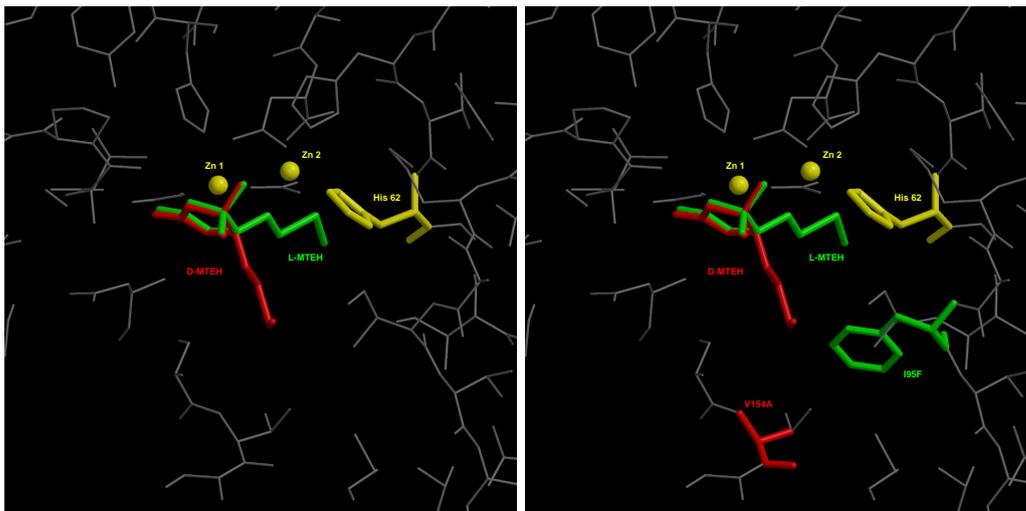
die hydrolysiert wird, durch eine Methylengruppe ersetzt ist, werden nicht hydrolysiert. Hydantoinderivate, bei denen der andere Stickstoff (1N) methyliert (5-Benzyl-1-N-methyl-hydantoin), oder durch eine Methylengruppe (Benzylsuccinimid), Sauerstoff (5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion) oder Schwefel (5-Benzyl-1,3-thiazolidin-2,4-dion) ersetzt sind, werden nicht oder nur schlecht hydrolysiert.

Die beiden Stickstoffatome, deren Bedeutung für die Bindung des Hydantoin-Rings im aktiven Zentrum der L-Hyd gezeigt werden konnte, sind Teil des Netzwerks an Wasserstoff-Brückenbindungen. Dieses ist bei D- und L-Hyd nahezu identisch: Die beiden Sauerstoffatome des tetragonalen Übergangszustands werden in beiden Enzymen durch die Zinkionen koordiniert, die zusätzliche Wasserstoffbrücke zur Hydroxyl-Gruppe von Tyr155 besteht nur in D-Hyd. Die Wasserstoffbrückenbindungen zu der Hauptkettenatomen von Ser288 (O und N) und Asn336 (O) haben ihre Entsprechung in Bindungen zu Ala285 (O und N) und Asn333 (O). Trotz der Länge der Bindung zu Asn333 (O) ist diese Bindung von entscheidender Bedeutung für die Hydrolyse.

Der Einfluss der Seitenkette des 5'-substituierten Hydantoin auf die Hydrolyse wurde von [May et al. \(1998b\)](#) beschrieben. Die L-Hyd bevorzugt benzyliche Seitenketten mit einer hohen L-Enantiospezifität. Hydantoin mit phenylischen Seitenketten sind enantiomerunabhängig schlechte Substrate. Unsubstituiertes Hydantoin oder andere mögliche natürliche Substrate wie Harnstoff, Dihydropyrimidine, Dihydroorotat oder Allantoin werden kaum oder gar nicht hydrolysiert. 5'-Methyl-thioethyl-hydantoin (MTEH) mit einer langen flexiblen Seitenkette ist ein gutes Substrat. Bei diesem Substrat wird das D-Enantiomer leicht bevorzugt umgesetzt. Mutationen an einzelnen Residuen, die durch gerichtete Evolution erhalten wurden ([May et al., 2000](#)), führten zu einer modifizierten Enantiospezifität. Die V154A-L-Hyd hat eine höhere Spezifität für D-MTEH, die V180A-L-Hyd hat eine höhere spezifische Aktivität bei unveränderter Enantiospezifität; eine zusätzliche I95F-Mutation ändert die Enantiospezifität von D nach L hin. Bei den Varianten handelt es sich allerdings eher um phänomenologische Untersuchungen, da keine Kinetiken gemessen und keine kinetische Konstanten wie k_{kat} oder K_M bestimmt wurden.

Der Teil des aktiven Zentrums, der die Seitenkette der Substrate bindet, unterscheidet sich deutlich zwischen D- und L-Hyd. Die hydrophobe Tasche, die in D-Hyd die Substrat- und Enantiospezifität dirigiert, existiert in dieser Form nicht in L-Hyd. Der gesamte Bereich ist hier wesentlich offener. Dies

hat den folgenden Einfluss auf die Spezifitäten der L-Hyd: Die Seitenketten der benzylisch substituierten Hydantoine wie 5'-Indolyl-methyl-L-hydantoin können hydrophobe Wechselwirkungen mit His62 und Ile95 eingehen, während die Seitenketten der 5'-phenylisch substituierten L-Hydantoine mit His62 in sterischen Konflikt treten. Dies war auch bei der D-Hyd die Erklärung für die starke Bevorzugung von D-PH. Im Gegensatz zur D-Hyd können die entsprechenden D-Enantiomere in der vorgeschlagenen Orientierung bei der L-Hyd keine hydrophoben Wechselwirkungen eingehen, bzw. sind bei einer Bindung im aktiven Zentrum in einer für die Katalyse ungünstigen Orientierung. Im Gegensatz zur D-Hyd sind die Unterschiede in der möglichen Bindung der beiden Enantiomere bei der L-Hyd deutlich geringer, so dass die Erklärung für die Enantiospezifität weniger eindeutig ist als bei der D-Hyd.



a) native L-Hyd mit D/L-MTEH b) L-Hyd-Varianten mit D/L-MTEH

Abbildung 5.22:

Modell für die Bindung von D/L-MTEH (L-MTEH in grün, D-MTEH in rot) im aktiven Zentrum der L-Hyd:

- a) native L-Hyd, die D-MTEH leicht bevorzugt,
- b) verschiedene Mutationen: V154A hat eine höhere Spezifität für D-MTEH. F95I hat eine höhere Spezifität für L-MTEH.

Die modulierbare Enantiospezifität bei der L-Hyd in Bezug auf das Substrat MTEH soll im folgenden diskutiert werden: Wegen der langen und flexiblen Seitenkette ist das manuelle Modellieren dieses Substrats (s. Abb. 5.22a) deutlich schwieriger als bei den vorher diskutierten rigiden Substraten. Die lange flexible Seitenkette mag auch der Grund für die geringe Enantioselektivität der L-Hyd für dieses Substrat sein. Der Einfluss der V180A-Mutation ist schwierig zu erklären, da dieses Residuum 15Å vom aktiven Zentrum entfernt liegt. Die V145A-Variante (s. Abb. 5.22b) bietet der Seitenkette von D-MTEH mehr Platz, wodurch die höhere D-Spezifität erklärt werden könnte. Bei der I95F-Variante (s. Abb. 5.22b) wird durch den Phenylring die Hydrophobizität in der Region erhöht, in der die Seitenkette von L-MTEH liegt. Durch diese relativ kleinen Änderungen kann die Spezifität der L-Hyd moduliert werden. Dies unterstreicht, dass die Substratbindung bei der L-Hyd erheblich weniger deutlich ist als bei der D-Hyd.

5.5.4 Vergleich der Hydantoinasen und deren natürliche Substrate

Bei D- und L-Hyd konnten mögliche Substrate im angenommenen Übergangszustand in einer sehr ähnlichen Weise orientiert werden. Das Netzwerk an Wasserstoffbrücken zum Hydantoinring ist bei beiden Enzymen nahezu identisch. Große Unterschiede bestehen jedoch in der Region, in der die Seitenkette gebunden wird.

Bei der D-Hydantoinase gibt es eine klar definierte hydrophobe Tasche, die durch Leu64, Cys95, Phe152, Tyr155 und Phe159 gebildet wird und die Substrat- und Enantiospezifität zu steuern scheint. Das D-5'-Phenyl-hydantoin passt genau in diese Tasche, so dass es den Anschein hat, als ob die D-Hyd auf dieses unnatürliche Substrat optimiert ist. Es stellt sich die Frage nach der Funktion dieser ausgeprägten hydrophoben Tasche, da die Dihydropyrimidine als natürliche Substrate der D-Hyd keine große hydrophobe Seitenkette haben und diese Tasche bei anderen D-Hydantoinasen ebenfalls in ähnlicher Form vorhanden zu sein scheint.

Bei der L-Hydantoinase ist dieser Bereich deutlich weiter. Es gibt hier keine ausgeprägte hydrophobe Tasche. Dadurch scheinen feinere strukturelle Unterschiede in den Bindungen zum Substrat die Spezifitäten auszumachen, die sich möglicherweise durch einzelne Mutationen modulieren lassen (s. MTEH).

Die Orientierungen der Loops, die für die unterschiedlichen Spezifitäten verantwortlich sind, sind in [Abbildung 5.23](#) verdeutlicht. Diese globalbe Betrachtung veranschaulicht schön die unterschiedliche Enantiospezifität.

Strukturell passt die L-Hyd genauso zu den Dihydropyrimidinasen wie die D-Hyd, weshalb sie auch als Dihydropyrimidinase eingeordnet werden sollte. Allerdings werden Dihydropyrimidine durch die L-Hyd nicht hydrolysiert. Das natürliche Substrat der L-Hyd ist bislang noch unbekannt. Aus der angenommenen Substratbindung kann man folgern, dass das natürliche Substrat

der L-Hyd sich deutlich von den untersuchten Substraten unterscheiden wird. Ein Fragment des Substrats wird sicherlich dem Hydantoin- oder Dihydropyrimidinring ähnlich sein, denn das Wasserstoffbrückennetzwerk passt sehr gut. Über den Rest des Substrats kann man wegen der Weite der substratbindenden Tasche kaum Aussagen machen.

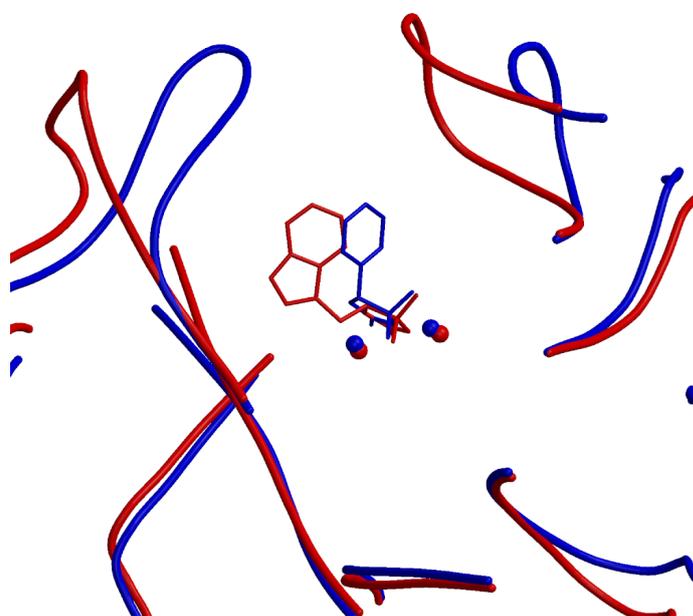


Abbildung 5.23: Die Loops am aktiven Zentrum der D-Hyd (mit D-PH in blau) und L-Hyd (mit L-IMH in rot) geben einen globalen Hinweis auf die unterschiedlichen Enantiospezifitäten. Der Loop auf der rechten Seite trägt die Residuen der D-Hyd, die die hydrophobe Tasche bilden.

5.5.5 Katalytischer Mechanismus bei den Hydantoinasen

Durch die Homologie zu den Ureasen kann nun der für die Ureasen vorgeschlagene Reaktionsmechanismus (Benini *et al.*, 1999) auf die Hydantoinasen übertragen werden. In Abbildung 5.24 ist dieser Mechanismus schematisch für die D-Hyd aufgestellt.

Das Substrat wird durch den hydrophoben Kanal in das aktive Zentrum der Hydantoinase geleitet. Dort wird der Hydantoinring durch ein Netz von Wasserstoffbrücken, die Seitenkette durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden. Der Sauerstoff der Carbonylgruppe an 4C nimmt die Position des am Zink gebundenen Wassers (Wat93 in D-Hyd) ein. Durch die Nähe zum Zink wird nun diese Carbonylgruppe polarisiert. Dies ermöglicht den nukleophilen Angriff vom Hydroxidion, das durch die Nähe zu den beiden Zinkionen in der deprotonierten Form vorliegt. Es bildet sich ein tetragonaler Übergangszustand, der zusätzlich zu den vorhandenen Bindungen in D-Hyd durch die Hydroxyl-Gruppe von Tyr155 stabilisiert wird. Die Amidbindung wird nun gespalten. Die entstandene Carboxyl-Gruppe wird deprotoniert, die entstandene Amino-Gruppe protoniert. Die elektrostatische Abstoßung der Carboxylate von der entstandenen Carbamoyl-Aminosäure und von Asp315 führt zur Entfernung des Reaktionsprodukts aus dem aktiven Zentrum.

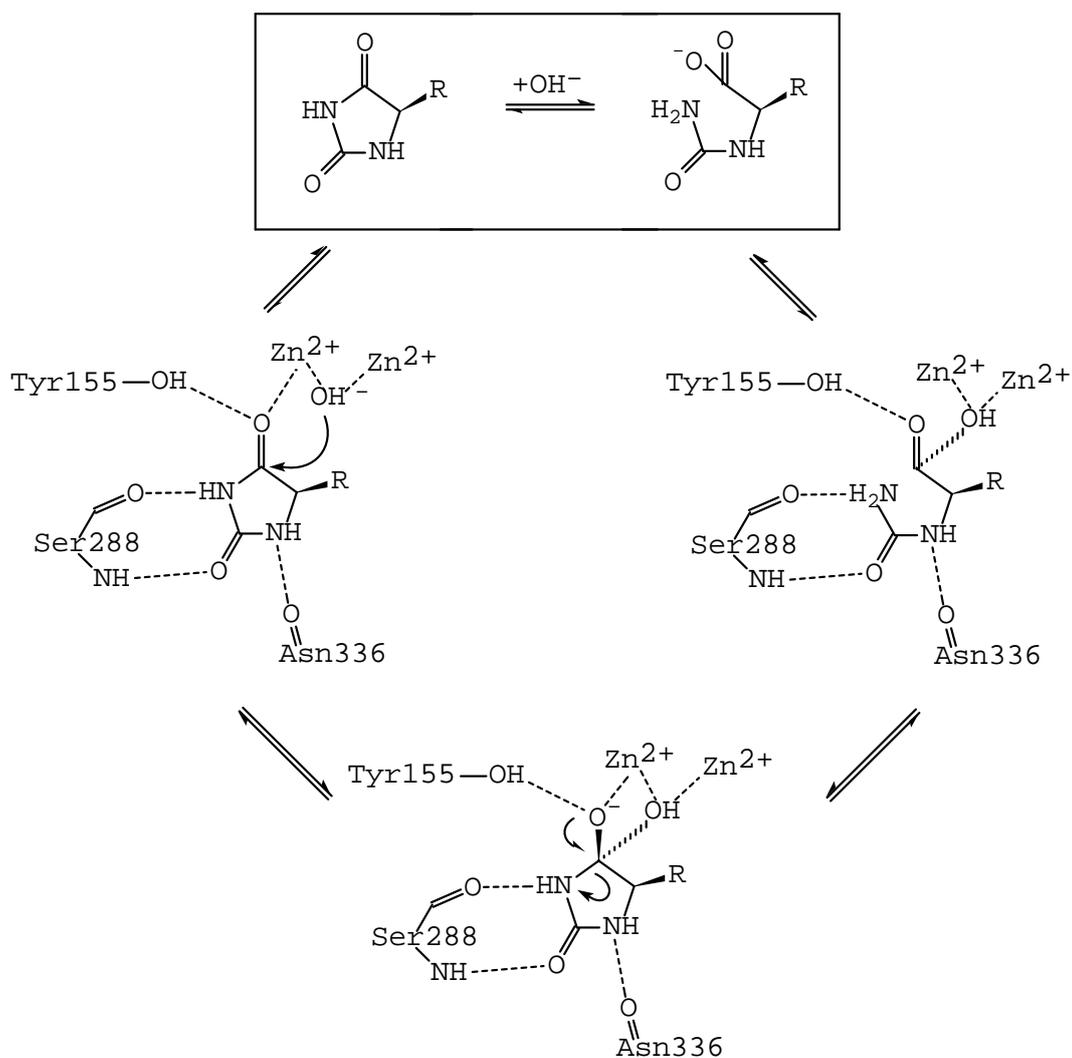


Abbildung 5.24: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der Hydantoinasen, der durch Analogie zu den Ureasen erstellt wurde.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die röntgenkristallographische Strukturlösung von zwei Dihydropyrimidinasen beschrieben und deren dreidimensionale Struktur interpretiert. Bei beiden Enzymen handelt es sich um Homo-Tetramere mit je ca. 50 kDa pro Protomer, die überwiegend von biotechnologischem Interesse sind.

Die **D-Hydantoinase aus *Thermus sp.*** (D-Hyd) wurde als natives Protein und Se-Methionin-Derivat in *E. coli*-Zellen exprimiert und anschließend zur Homogenität aufgereinigt. Beide Enzymformen konnten in einer zentriert orthorhombischen Kristallform ($C222_1$) kristallisiert werden. Diese Kristalle haben für Proteine außergewöhnlich gute Beugungseigenschaften. Da keine Struktur mit einer ausreichend hohen Homologie bekannt war, wurde die Struktur *de novo* mittels Se-Met-MAD-Phasierung gelöst. Dafür wurden bei drei Wellenlängen MAD-Datensätze bis 2.5Å Auflösung gemessen. Da sich sechs Monomere in der asymmetrischen Einheit befinden, von denen jedes neun Methionine enthält, musste eine große Substruktur von 54 Selen-Positionen bestimmt werden. Die dabei daraus erhaltenen Phasen wurden mittels Techniken der Dichtemodifikation auf einen nativen Datensatz übertragen und unter nicht-kristallographischer Mittelung auf 1.7Å Auflösung erweitert. Wegen der hohen Qualität somit erhaltenen Phasen konnten die sechs Monomere der asymmetrischen Einheit überwiegend automatisch modelliert werden. Mit den ca. 300 kDa handelt es sich um die bis dahin größte automatisch gebaute Struktur. Es konnte ein weiterer Datensatz bis auf annähernd atomare Auflösung (1.3Å) gemessen werden, der mit fast 700.000 unabhängigen Reflexen einer der größten gemessenen Röntgen-Datensätze ist. Die Struktur wurde mit diesen Daten auf kristallographische R-Werte von $R_{work}=15.3\%$ und $R_{free}=18.4\%$ verfeinert.

Die Struktur der D-Hyd in einer weiteren Kristallform (Raumgruppe $P2_12_12_1$) wurde mittels Molekularen Ersatzes gelöst und mit Diffraktionsdaten bis 2.6Å

Auflösung auf kristallographische R-Werte von $R_{work}=18.1\%$ und $R_{free}=21.1\%$ verfeinert.

Die Struktur der D-Hyd besteht aus einem zentralen $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel, das von einigen zusätzlichen Helices und Faltblättern flankiert wird, und einer zusätzlichen β -Faltblatt-Domäne. Diese β -Faltblatt-Domäne setzt sich aus zwei parallelen Faltblättern zusammen, die von den N- und den C-terminalen Residuen gebildet werden. Das aktive Zentrum liegt am Ende eines langen hydrophoben Kanals, am C-Terminus verschiedener Stränge des Barrels. Wegen der hohen Auflösung der Daten konnte ein sehr detaillierter Einblick ins aktive Zentrum erhalten werden. Dort befinden sich zwei Zinkionen, die von Histidinen, einem Aspartat und einem carboxylierten Lysin koordiniert werden. Zwischen den beiden Zinkionen befindet sich ein Wasser, das durch die Nähe als Hydroxid vorliegt und das entscheidenden Nukleophil bei der Hydrolyse der Amid-Bindung ist.

Von der **L-Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens*** (L-Hyd) war ein Datensatz mit Daten bis 2.6Å Auflösung vorhanden. Wegen der hohen Homologie zwischen D- und L-Hydantoinase wurden die D-Hyd als Modell für den Molekularen Ersatz verwendet. Da die Standardtechniken des Molekularen Ersatzes jedoch keine Lösungen lieferten, wurde mittels Homologie-Modelling ein Modell der L-Hyd erstellt, mit der der Molekulare Ersatz dann erfolgreich war. Die Struktur wurde bei einer Auflösung von 2.6Å auf kristallographische R-Werte von $R_{work}=22.4\%$ und $R_{free}=24.4\%$ verfeinert.

Die Strukturen der **D- und L-Hyd** sind sich sehr ähnlich. Sie passen sehr gut in eine große Proteinklasse der ureaseverwandten Proteine. Aus dieser Klasse sind neben den Ureasen auch die Struktur der Phosphotriesterase bekannt, die eine hohe Homologie zum $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel aufweist. Neben der Homologie in der Faltung besteht eine noch höhere Homologie in der Architektur des aktiven Zentrums. Diese Homologie und strukturell konservierte Wasser wurden ausgenutzt, um die Substratbindung von der Urease auf die Hydantoinasen zu übertragen. Mit der manuellen Orientierung eines putativen tetragonalen

Übergangszustands von Substraten der D- und L-Hyd wurde erkannt, dass der Hydantoinring in beiden Enzymen in einer vergleichbaren Weise gebunden werden kann. Die Substrat- und Enantiospezifität der D-Hyd wird von einer ausgeprägten hydrophoben Tasche dirigiert. Bei der L-Hyd, deren Substrat- und Enantiospezifität sich von der D-Hyd unterscheidet, ist dieser Bereich des aktiven Zentrums deutlich verschieden. Es gibt hier kein vorherrschendes Strukturelement, das die Substrat- und Enantiospezifität so deutlich beeinflusst wie bei der D-Hyd. Dies drückt sich auch in der substratabhängigen Enantiospezifität der L-Hyd aus. Mit dem manuellen Substrat-Docking konnte somit insbesondere für die D-Hyd eine befriedigende Erklärung für die unterschiedlichen Substrat- und Enantiospezifitäten gegeben und ein Reaktionsmechanismus aufgestellt werden.

7 Ausblick

Während dieser Arbeit wurden die *nativen* Strukturen der D- und L-Hyd gelöst und verfeinert. Neben den vielen Fragen, die bislang mit diesen Strukturen gelöst werden konnten, ergaben sich während der Strukturaufklärung eine Anzahl an weiteren Fragen, die Ausgangspunkt für weiterführende Arbeiten sein können.

- Die Erklärung der Substrat- und Enantiospezifität der D- und L-Hyd beruht auf einem manuellen Substrat-Docking, das die Homologie zu den Ureasen ausnutzt. Obwohl das vorgeschlagene Modell soweit in sich schlüssig ist und mit den experimentellen Kenntnissen über die beiden Enzyme in Einklang ist, steht ein direkter experimenteller Beweis noch aus. Dafür wäre eine Kristallstruktur mit einem gebundenen Inhibitor oder Substrat im Übergangszustand nötig. Ein möglicher Ansatz wäre wie bei Urease eine Co-Kristallisation mit einem nicht hydrolysierbaren Übergangszustandsanalogon. Zum Beispiel könnte man versuchen, den tetragonalen Übergangszustand durch ein Hydantoinderivat zu imitieren, bei dem die Carbonylgruppe der zu spaltenden Amidgruppe durch eine Phosphongruppe ausgetauscht ist.
- Solange noch kein entsprechendes kleines Molekül zur Verfügung steht, könnte das vorgeschlagene Modell mittels Kraftfeldrechnungen überprüft werden. Dies wäre insbesondere bei Substraten mit langen und flexiblen Seitenketten sinnvoll.
- Bei der Interpretation der Spezifitäten konnte vor allem bei der D-Hyd nur auf ein geringes Datenmaterial zur Charakterisierung der Substrate zurückgegriffen werden. Dabei wäre eine Kenntnis der kinetischen Parameter zur weiteren Auswertung hilfreich. Dies gilt insbesondere auch für die detaillierte Interpretation der substratabhängigen und modulierbaren Enantiospezifität der L-Hyd.
- Trotz der vorhandenen Struktur konnte die Frage nach dem natürlichen Substrat der L-Hyd nicht geklärt werden. Verschiedene Ansätze könnten

hier zusammen mit der Struktur angewendet werden.

In vivo könnte bei *Arthrobacter aurescens* das Gen für die Hydantoinase oder das gesamte Gencluster durch *knockout* ausgeschaltet werden. Über eine Analyse des Proteoms oder des Metabolismus dieser Mutanten könnte man Hinweise auf die physiologische Bedeutung der L-Hyd bekommen.

In silico könnte man durch ein automatisches Substratdocking eine große Datenbank an kleinen Molekülen austesten, ob sie im aktiven Zentrum der L-Hyd produktiv binden können.

- Mit der Struktur der D- und L-Hyd stehen für weitere kristallographische Arbeiten Modelle zur Verfügung, mit denen sich die Strukturen anderer Hydantoinasen oder verwandter Enzyme lösen oder modellieren lassen. Interessant wird dabei neben weiteren Erklärungen für Spezifitäten auch die Struktur der nicht katalytisch aktiven Proteine wie dem *collapsin mediator response*-Protein (CRMP) sein.

A Anhang

A.1 Sequenzierung der D-Hyd

	nnmntttatt	tgctttgtga	gcgataaca	attataatag	attcaattgt	
	gagcggataa	caatttcaca	cagaatagat	taaagaggag	aaagaattc	t
1	<u>atgcctttac</u>	tgatcaagaa	cggcgaatc	atcaccgcgg	acagccggta	50
51	caaggccgac	atctacgccg	aggcgagac	catcacccgc	atcgggcaga	100
101	acctcgaggc	cccgccggc	accgaggtga	tagatgccac	cggcaagtac	150
151	gtgtttcccg	gcttcataga	ccccacgtg	cacatctacc	tgcccttcat	200
201	ggccaccttc	gccaaggaca	cccacgagac	cggctccaag	gcggccttga	250
251	tggggggcac	caccacctac	atcgagatgt	gctgccccag	cgcgaacgac	300
301	gatgccctcg	agggtacca	gctctggaag	agcaaggccg	agggcaacag	350
351	ctactgcgat	tacaccttcc	acatggccgt	ctccaagttc	gacgaaaaaa	400
401	ccgaggggca	gctccgggag	attgtggccg	acggcattag	ctccttcaaa	450
451	atthttctct	cctacaaaa	cttctttggc	gtggacgacg	gggagatgta	500
501	ccagaccctg	cgctggcca	aggagctggg	ggtgatcgtg	accgccact	550
551	gtgagaacgc	cgagctggtg	ggcggttgc	agcagaagct	actgtccgag	600
601	ggcaagaccg	gccccgagtg	gcacgagccc	agccgccccg	aggcggtgga	650
651	ggccgaaggc	accgcgcggt	ttgccacctt	cctcgagacc	accggggcca	700
701	ccggctacgt	ggtgcacctc	tcctgcaaac	cggccctgga	tgccggccatg	750
751	gccgctaaag	cgaggggctg	gccccatctat	atcgaatcgg	tcacccccca	800
801	cttctgctc	gataaaacct	acgccgagcg	ggcggggtg	gaggccatga	850
851	agtacatcat	gtcgcgcccg	ttgcgcgata	agcgcaacca	gaaagtctctg	900
901	tgggatgccc	tgcccaggg	cttcatcgac	accgtgggca	ccgaccactg	950
951	ccccttcgac	accgagcaga	agctgctggg	caaggaggcc	ttaccgcta	1000
1001	ttccaacgg	catcccggcc	atcgaagacc	gggtcaacct	gctctacacc	1050
1051	tacggggtga	gccgcggccg	cctcgatatt	caccgctttg	tggaacgggc	1100
1101	cagcaccaag	gccgccaagc	tgtttgact	gttccccgc	aagggcacca	1150
1151	tcgcgtggg	cagcgacgcc	gacctggtgg	tctacgacc	ccagtaccgg	1200
1201	ggcaccatct	cggtaagac	ccagcacgtc	aacaacgact	acaacggctt	1250
1251	cgaggcctt	gagattgacg	gccggcccag	cgtggtgacg	gtgcggggta	1300
1301	aggtggcgg	gcgggacggg	cagtttggg	gcgagaagg	gtggggtaag	1350
1351	ctcctgcggc	gcgagcccat	gtacttct <u>aa</u>	atgaagccga	gatgggtttt	
	gaatttgctg	ggtgggatct	gcctgtggat	agcgggtggtg	ctggtgctgg	
	ggggtagaag	cttggctggt	ttggcggatg	agagaagatt	ttcagcctga	
	tacagattaa	atcagaacgc	agaacggctc	tgat		

Abbildung A.1: DNA-Sequenz des Gens der D-Hyd. Start und Stopp-Codon sind doppelt, die *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstellen sind einfach unterstrichen.

A.2 Kristallisationsveröffentlichung

crystallization papers

Acta Crystallographica Section D
Biological
Crystallography
ISSN 0907-4449

Jan Abendroth, Karsten Niefind,
Shivani Chatterjee and Dietmar
Schomburg*

Institut für Biochemie, Universität zu Köln,
Zùlpicher Strasse 47, 50674 Köln, Germany

Correspondence e-mail:
d.schomburg@uni-koeln.de

Crystallization, preliminary X-ray analysis of a native and selenomethionine D-hydantoinase from *Thermus* sp.

A D-hydantoinase from *Thermus* sp. was expressed in *Escherichia coli*, purified to homogeneity and crystallized both as native and Se-Met labelled protein. The crystals belong to the orthorhombic space group $C222_1$, with unit-cell parameters $a = 125.9$, $b = 215.8$, $c = 207.5$ Å. A three-wavelength MAD data set was collected to 2.5 Å resolution and a native data set was collected to 1.7 Å resolution. Crystal packing and self-rotation calculations led to the assumption of six protomers per asymmetric unit, corresponding to a V_M value of 2.28 Å³ Da⁻¹ and a solvent content of 46%. As each protomer contains nine Se-Met residues, 54 selenium sites per asymmetric unit were present and could be unambiguously located in the course of the MAD experiment. This selenium substructure is one of the largest selenium substructures that have been solved to date. The resulting phases obtained at a high-resolution limit of 3.0 Å could be extended to 1.7 Å and refined by application of density-modification techniques, especially non-crystallographic symmetry.

Received 20 February 2000
Accepted 4 May 2000

1. Introduction

Hydantoinases are cyclic amidases (E.C. 3.5.2; Webb, 1992). They catalyze the reversible hydrolytic ring-opening of five- or six-membered cyclic diamides such as 5'-mono-substituted hydantoins and dihydropyrimidines to the corresponding carbamoyl amino acids and 3-ureidoacids, respectively (Fig. 1). According to their stereoselectivity, hydantoinases have been classified as L- (Yamashiro *et al.*, 1988), non- or D-enantiomer selective (Möller *et al.*, 1988; Yokozeki & Kubota, 1987).

D-Hydantoinases are considered to be the bacterial counterpart of dihydropyrimidinases, which are directly involved in the catabolism of pyrimidines (Vogels & van der Drift, 1976). The natural functions of both L- and non-specific hydantoinases still remain unclear. Hydantoinases are used as biocatalysts for the stereospecific production of non-proteinogenic amino acids (Syldatk & Pietzsch, 1995).

The biochemical properties and substrate specificities of numerous hydantoinases are well characterized in the literature (reviewed by Syldatk *et al.*, 1999), but to date no structural information at the atomic resolution level has been published.

In this study, we used a thermostable D-hydantoinase from *Thermus* sp. (Elard *et al.*, 1987). As no directly homologous structure is known to date, Se-Met MAD phasing techniques were applied.

2. Materials and methods

2.1. Expression and purification

The D-hydantoinase from *Thermus* sp. (D-Hyd) was expressed in methionine auxotroph *E. coli* B834 cells (Novagene). The transcription of the gene for D-Hyd was under control of the IPTG-inducible T5 promoter and was performed by the endogenous *E. coli* RNA polymerase. Each medium contained 150 mg l⁻¹ ampicillin and 0.1 mM MnCl₂. The cultivation of the native D-Hyd was performed in LB medium. For the production of Se-Met-D-Hyd, a 20 ml pre-culture was grown overnight in LB medium, centrifuged at 3000g for 5 min and resuspended in cold M9 minimal medium in three cycles. The washed cells were used to inoculate the main culture in 1.2 l M9 medium supplemented with 50 mg ml⁻¹ selenomethionine and all other amino acids. The main cultures were grown at 310 K in three 3 l Erlenmeyer flasks to an OD₆₀₀ of 0.8. Expression was then induced with 1 mM IPTG for 4 h. The cells were then cooled on ice, harvested by centrifugation for 20 min at 5900g, resuspended in 15 ml 20 mM Tris pH 8.0 and kept at 253 K for further use.

After addition of a protease-inhibitor cocktail, the thawed cells were lysed by passing them three times through an ice-cold French press. Cell debris was removed by centrifugation at 10 000g for 30 min.

crystallization papers

All buffers for the purification were supplemented with 0.1 mM MnCl₂ and, for the Se-Met-*D*-Hyd, additionally with 20 mM DTT; all purification steps were performed at 277 K. Purification was performed in three steps following a modified version of a previously published protocol (Abendroth *et al.*, 2000). The purification steps consisted of fixed-bed Streamline anion-exchange, hydrophobic interaction and anion-exchange chromatography. On average, 15 mg of homogenous protein could be obtained from 1.2 l cultures. Homogeneity was tested with standard SDS-PAGE, native PAGE, isoelectric focusing, dynamic light scattering, MALDI and ESI mass spectrometry.

The purified enzyme was rebuffered in 20 mM Tris pH 8 (plus 20 mM DTT for Se-Met) and concentrated to 5.5 (native) or 9.5 mg ml⁻¹ (Se-Met) by ultrafiltration.

2.2. Crystallization

All crystallization experiments were performed at 293 K using the sitting-drop variant of the vapour-diffusion method. Initial crystallization conditions were screened using the sparse-matrix approach (Jancarik & Kim, 1991).

Microseeding appeared to be crucial for obtaining good crystals. Initial crystals of native *D*-Hyd were crushed with a needle and diluted in different amounts of 1.6 M ammonium sulfate, 2% PEG 400, 100 mM HEPES/NaOH pH 7.5; these served as seeding stocks. 0.5 µl of the different seeding stocks were added to a drop which consisted of 3 µl protein solution and 4.5 µl reservoir (Se-Met-*D*-Hyd: 3 µl plus 3 µl) and which had been equilibrated overnight.

As in the case of Se-Met-*D*-Hyd, some protein precipitated during the first 12 h; the 24 drops were then collected and centrifuged at 10 000g. The clear supernatant was distributed again on clean micro-bridges and

equilibrated for 1 h prior to seeding. The optimized reservoir consisted of 1.65 M ammonium sulfate, 5% PEG 400 and 100 mM HEPES-NaOH pH 7.5 (Se-Met-*D*-Hyd: 1.65 M ammonium sulfate, 5% PEG 400, 20 mM DTT and 100 mM HEPES-NaOH pH 7.5). As the quality and the size of the crystals depended on the quality of the seed crystals, several cycles of seeding were performed.

Crystals grew to dimensions of 0.5 mm in each direction (Se-Met-*D*-Hyd: 0.3 mm) within several days. For Se-Met-*D*-Hyd, only native crystals could be used as seeds. Whilst initial crystallization led to non-regular crystals, several cycles of seeding led to good crystals of prismatic shape (Fig. 2).

2.3. Diffraction experiments

For X-ray diffraction experiments at cryogenic temperatures, the crystals were transferred directly into a cryoprotectant buffer which consisted of 2 M Li₂SO₄, 5% PEG 400 and 100 mM HEPES/NaOH pH 7.5. The crystals were mounted in a nylon loop and flash-frozen in a nitrogen stream at 100 K (Oxford Cryosystems Cryostream). Both data sets were measured at the EMBL Outstation at DESY, Hamburg. The native data set was measured on beamline BW7B at 0.8439 Å using a MAR 345 detector. The diffraction limit was beyond 1.3 Å resolution; a complete data set was measured to 1.7 Å resolution. The MAD data set was measured on beamline X31 using a MAR 300 detector. The peak and inflection point were determined using EXAFS spectra. The native and the three MAD data sets were measured *en bloc* over approximately 95°.

All data were processed and scaled with *DENZO* and *SCALEPACK* from the *HKL* suite (Otwinowski & Minor, 1997). The MAD data were not merged with *SCALEPACK* but with *SOLVE* (Terwilliger & Berendzen, 1999).

2.4. Solving the selenium substructure

The MAD data were merged with the local scaling routine of *SOLVE* (Terwilliger & Berendzen, 1999). The 54 Se-Met sites could be located using the automated protocol of *SOLVE* when the high-resolution limit was lowered to 3.0 Å. Initial phasing was also performed with *SOLVE*.

2.5. Subsequent calculations

Subsequent calculations were performed with programs from the *CCP4* suite (Collaborative Computational Project, Number 4,

1994); for the calculation of the self-rotation function, the program *GLRF* (Tong & Rossman, 1990) was used.

Local symmetry operators were determined using the Se-Met positions with the *CCP4* program *FINDNC*. The initial phases from the MAD data set were combined with the structure-factor amplitudes of the native data set. Density modification was performed with the *CCP4* program *DM*.

3. Results and discussion

Native and Se-Met-*D*-Hyd could be expressed in methionine auxotrophic *E. coli* cells. Because of the high expression level, these bacteria were also used for the native Cryostream enzyme. Both enzymes could be purified to homogeneity using a similar protocol. Approximately 15 mg of protein could be purified from a 1.2 l culture. ESI mass spectra of both native and Se-Met-*D*-Hyd were in accordance with the calculated molecular mass, indicating a complete substitution of Met by Se-Met. In both cases the N-terminal Met was post-translationally excised, which is common in *E. coli* when proline is the following residue (Hirel *et al.*, 1989).

The crystallization conditions were very similar for both variants as stated above. Several cycles of microseeding using seeds of native *D*-Hyd were crucial for the growth of well ordered and large crystals (Fig. 2). The crystals grew to their final size within a few days.

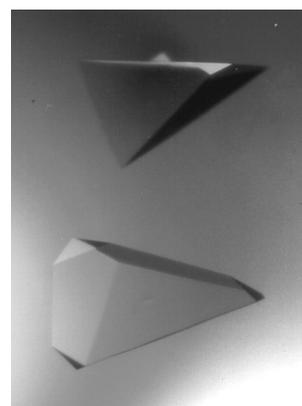


Figure 2
Orthorhombic crystals of native *D*-hydantoinase.

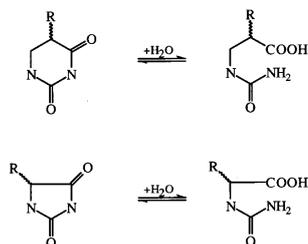


Figure 1
The reaction catalyzed by hydantoinases

crystallization papers

Table 1
Statistics of X-ray data sets of native and Se-Met-d-Hyd.

Values in parentheses refer to the highest resolution shell.

Data set	Wavelength λ (Å)	Resolution (Å)	Total No. of reflections	No. of unique reflections	$I/\sigma(I)$	Completeness (%)	Multiplicity (%)	R_{sym}^{\dagger}
Native	0.8439	20–1.7	1006898	293229	25.6 (9.5)	95.3 (89.9)	3.4	7.1 (10.2)
MAD remote	0.9184	25–2.5	350556	97226	16.4 (8.0)	99.8 (99.1)	3.6	5.9 (17.7)
MAD peak	0.9794	25–2.5	431701	97152	17.7 (9.2)	100.0 (99.9)	4.4	7.7 (16.9)
MAD inflection	0.9797	25–2.5	394476	96723	19.3 (9.0)	100.0 (99.8)	4.1	7.6 (14.8)

$$\dagger R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_{h'k'l'} |I(hkl) - I(h'k'l')|}{\sum_{hkl} \sum_{h'k'l'} I(hkl)}$$

Native crystals of d-Hyd diffracted to better than 1.3 Å resolution at beamline BW7B at DESY, Hamburg. Because of the size of the unit cell and the available beam time, the high-resolution limit was set to 1.7 Å in order to obtain a complete data set. A three-wavelength MAD data set was measured to 2.5 Å at beamline X31 at DESY, Hamburg.

X-ray intensity data showed orthorhombic Laue symmetry and systematic absences indicated the space group to be C22₂. The unit-cell parameters for the native enzyme are $a = 125.9$, $b = 215.8$,

$c = 207.5$ Å and for Se-Met-d-Hyd, $a = 125.1$, $b = 215.2$, $c = 207.6$ Å. The data could be scaled to a symmetry R value of 7.1% for the native data set and 5.9–7.6% for the different MAD data sets. Statistics for all four data sets are summarized in Table 1.

Assuming six monomers in the asymmetric unit, the crystal packing parameter V_M (Matthews, 1968) is $2.28 \text{ Å}^3 \text{ Da}^{-1}$, corresponding to a solvent content of 46%. During further analysis this value was corrected to 38%.

Most of the hydantoinsases are described in the literature as forming tetramers and a few as forming dimers. Results of both gel-permeation chromatography and dynamic light scattering could be interpreted as either dimers, trimers or tetramers. The self-rotation function

showed peaks at κ angles of 60, 120 and 180° (Fig. 3). Whereas the strongest peaks at $\kappa = 180^\circ$ results from crystallographic symmetry, all others have non-crystallographic origin. Owing to the different possible quaternary structures of d-Hyd, the following interpretations were consistent with the self-rotation function: three dimers with their internal dyads lying in the ab plane, where the threefold and sixfold axes stem from mappings between these dimers in combination with the crystallographic symmetry; two trimers with the corresponding threefold axes and with twofold axes which map these trimers to each other; three tetramers with 222 symmetry on special positions.

One bottleneck in solving large structures of Se-Met-labelled proteins is the detection of the selenium sites. With the advent of new programs, a number of large selenium substructures have recently been solved (Deacon & Ealick, 1999). For solving this selenium substructure, the program SOLVE (Terwilliger & Berendzen) was used. SOLVE found all 54 sites without using information about local symmetry. For this purpose, the high-resolution limit had to be lowered from 2.5 to 3.0 Å where the data sets were complete, even if only data with $I/\sigma(I) \geq 3$ were considered. The substructure

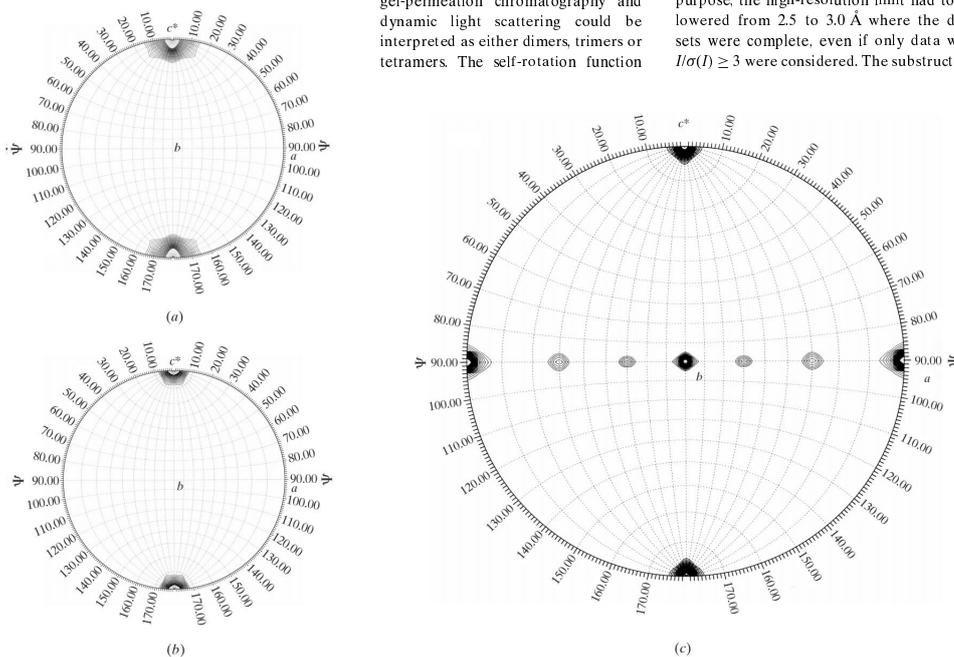


Figure 3
Self-rotation functions of d-Hyd with (a) $\kappa = 60^\circ$, (b) $\kappa = 120^\circ$ and (c) $\kappa = 180^\circ$.

crystallization papers

solved here is one of the largest selenium substructures known in the literature to date (Deacon & Ealick, 1999). Initial maps after density modification seem to be traceable.

The research of JA was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (55503032). We thank Roche Diagnostics Penzberg for providing us with the plasmid. O. May, M. Siemann, M. Pietzsch and C. Syldatk (Universität Stuttgart) for providing us with initial fractions of protein and A. Popov, W. Rpniewski, P. Tucker, E. Pohl and A. Gonzales (EMBL Outstation Hamburg) for excellent support during measurements.

References

- Abendroth, J., Chatterjee, S. & Schomburg, D. (2000). *J. Chromatogr. B*, **737**, 187–194.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1984). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.
- Deacon, A. M. & Ealick, S. E. (1999). *Structure*, **7**, R161–R166.
- Elard, J., Henco, K., Marciniowski, S. & Schenk, G. (1987). Offenlegungsschrift DE 3535987 A1.
- Hirel, P.-H., Schmitter, J.-M., Dessen, P., Fayat, G. & Blanquet, S. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8247–8251.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–411.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–411.
- Möller, A., Syldatk, C., Schulze, M. & Wagner, F. (1988). *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 618–625.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Syldatk, C., May, O., Altenbuchner, J., Mattes, R. & Siemann, M. (1999). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 293–309.
- Syldatk, C. & Pietzsch, M. (1995). *Enzyme Catalysis in Organic Chemistry*, edited by K. Drautz & H. Waldmann, pp. 409–431. Weinheim: Verlag Chemie.
- Terwilliger, T. C. & Berendzen, J. (1999). *Acta Cryst.* **D55**, 849–861.
- Tong, L. & Rossmann, M. G. (1990). *Acta Cryst.* **A46**, 783–792.
- Vogels, G. D. & van der Drift, C. (1976). *Bacteriol. Rev.* **40**, 403–468.
- Webbs, E. C. (1992). *Enzyme Nomenclature*. San Diego: Academic Press.
- Yamashiro, A., Yokozeki, K., Kano, H. & Kubota, K. (1988). *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2851–2856.
- Yokozeki, K. & Kubota, K. (1987). *Agric. Biol. Chem.* **51**, 721–728.

A.3 Kurzzusammenfassung

Dieser Arbeit beschreibt und diskutiert die Röntgenstrukturaufklärung und die dreidimensionale Struktur von zwei verschiedenen Dihydropyrimidinasen, der D-Hydantoinase aus *Thermus sp.* und der L-Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens*.

Die D-Hydantoinase wurde als natives Enzym und Se-Met-Derivat exprimiert, aufgereinigt und kristallisiert. Die Struktur der wurde *de novo* mittels MAD-Phasierungstechniken aufgeklärt und mit Diffraktionsdaten bis 1.3Å Auflösung zu R-Werten von $R_{work}=15.3\%$ und $R_{work}=18.4\%$ verfeinert. Die Struktur der D-Hydantoinase diente als Modell zur Strukturaufklärung der L-Hydantoinase mittels Molekularen Ersatzes. Die Struktur der L-Hydantoinase wurde mit Diffraktionsdaten bis 2.6Å Auflösung zu R-Werten von $R_{work}=22.4\%$ und $R_{work}=24.4\%$ verfeinert wurde.

Beide Strukturen sind sich sehr ähnlich und bestehen aus einem zentralen $(\alpha/\beta)_8$ -Barrel und einer β -Faltblatt-Domäne. Im aktiven Zentrum befinden sich zwei Zinkionen, die von einem carboxylierten Lysin überbrückt werden und ein Wasser zum Nukleophil aktivieren. Die hohe Homologie zu den Ureasen in der globalen Faltung und der Architektur des aktiven Zentrums erlaubte eine Überführung des Modells für die Substratbindung von den Ureasen auf die Hydantoinasen. Mit diesem Modell lassen sich die unterschiedlichen Spezifitäten der beiden Hydantoinasen erklären.

A.4 Abstract

This thesis describes and discusses the X-ray structure determination and the three dimensional structure of two different dihydropyrimidinases: D-hydantoinase from *Thermus sp.* and L-hydantoinase from *Arthrobacter aurescens*.

D-hydantoinase was expressed, purified, and crystallized both as native enzyme and as Se-Met derivative. The structure was solved *de novo* using MAD-phasing techniques and refined using diffraction data up to 1.3Å resolution to R-values of $R_{work}=15.3\%$ and $R_{work}=18.4\%$. The structure of D-hydantoinase served as a model in the determination of the structure of L-hydantoinase using molecular replacement techniques. The model of the L-hydantoinase was refined using diffraction data up to 2.6Å resolution to R-values of $R_{work}=22.4\%$ and $R_{work}=24.4\%$.

Both structures have a very high similarity. They consist of a central $(\alpha/\beta)_8$ -barrel and a β -sheet domain. Two zinc ions are located in the active site. They are bridged by a carbamylated lysine and activate a water for nucleophilic attack. The high homology to ureases both in global fold and architecture of the active site allowed an extrapolation of the substrate binding model from the ureases to the hydantoinases. This model provides an explanation for the different specificities of both hydantoinases.

A.5 Lebenslauf

10. August 1971	geboren in Köln-Longerich Staatsangehörigkeit deutsch
1978 – 1979	Grundschule in Köln-Widdersdorf
1978 – 1982	Grundschule in Bergheim-Glessen
1982 – 1991	Abtei-Gymnasium in Pulheim-Brauweiler
Juni 1991	Abitur
Juni 1991 – August 1992	Zivildienst Erftverband in Bergheim
Oktober 1992	Beginn des Chemiestudiums an der Universität zu Köln
Oktober 1994	Vordiplomprüfung
Januar – Juli 1996	Auslandssemester an der Norges Teknisk og Naturvitenskapelige Universitet (NTNU) in Trondheim/Norwegen
April 1997	Diplomprüfung
Mai 1997 – Februar 1998	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. D. Schomburg, Insitut für Biochemie, Universität zu Köln „Kristallisation und Charakterisierung bakterieller Hydantoinasen“
seit April 1998	Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. D. Schomburg, Insitut für Biochemie, Universität zu Köln „Röntgenstrukturanalyse mikrobieller Dihydropyrimidinasen“

A.6 Vorabveröffentlichungen

- Abendroth, J., Chatterjee, S., Schomburg, D. (2000)
Purification of a D-hydantoinase using a laboratory-scale streamline phenyl column as the initial step.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl. **737**, 187–194.
- Abendroth, J., Niefind, K., Chatterjee, S., Schomburg, D. (2000)
Crystallization, preliminary X-ray analysis of a native and selenomethionine D-hydantoinase from *Thermus sp.*
Acta Cryst. **D56**, 1166–1169.
- Abendroth, J., Niefind, K., Schomburg, D.
Structure of D-Hydantoinase from *Thermus sp.* at 1.3 Å resolution.
submitted an Structure with Folding and Design
- Abendroth, J., Niefind, K., Schomburg, D.
L-Hydantoinase from *Arthrobacter aurescens* – further insights into specificities.
in Vorbereitung

A.7 Vorträge

- Abendroth, J., Schomburg, D. (1999)
Aufreinigung einer D-Hydantoinase aus *Thermus sp.* zur Kristallisation und Strukturbestimmung, Amersham-Pharmacia: ÄKTA-user club, Hohenroda.
- Abendroth, J., Niefind, K., Schomburg, D. (2001)
D- and L-Hydantoinase – explaining selectivities.
DGK-Jahrestagung 2001, Bayreuth.
- Abendroth, J., Niefind, K., Schomburg, D. (2001)
D-Hydantoinase - just an enzyme?
Really MAD, large and high resolution.

6th International School on Crystallography of Biological Macromolecules,
Como.

A.8 Posterbeiträge

- Abendroth, J., Niefind, K., Chatterjee, S., Schomburg, D. (1999)
Purification, crystallization and preliminary x-ray analysis of a D-hydantoinase from *Thermus sp.*
5th European Workshop on Crystallography of Biological Macromolecules,
Como.
- Abendroth, J., Chatterjee, S., Schomburg, D. (1999)
Purification of a D-hydantoinase from *Thermus sp.* using a lab scale stream-
line phenyl column as the capture step.
European workshop on protein purification, Paris.
- Abendroth, J., Niefind, K., Chatterjee, S., Schomburg, D. (2000)
MAD-Phasing — how automation can help in difficult cases.
DGK-Jahrestagung 2000, Aachen.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Hydantoine	2
1.2	Reaktion der Hydantoinasen	3
1.3	Der Hydantoinase-Prozess	4
1.4	Diffraction- und Elektronendichte	10
1.5	warpNtrace	15
2.1	Chromatographie	28
2.2	multiples Alignment	44
3.1	Sequenz D-Hyd	47
3.2	Chromatographie D-Hyd, Protokoll 1	49
3.3	Chromatographie D-Hyd Protokoll 2	50
3.4	SDS-PAGE, D-Hyd Protokoll 1	51
3.5	MALDI-MS D-Hyd	53
3.6	C222 ₁ -Kristalle D-Hyd	55
3.7	MAD	58
3.8	Diffractionsbilder	59
3.9	Selbstrotationsfunktionen, D-Hyd, C222 ₁	63
3.10	Selbstrotationsfunktionen, D-Hyd, C ₂ 1 ₂ 1 ₂ 1	64
3.11	Selbstrotationsfunktionen, L-Hyd	65
3.12	einfache Dichtemodifikation	68
3.13	Dichtemodifikation	69
3.14	automatischer Modellbau mit warpNtrace	72
3.15	Ramachandran-Plot C222 ₁ D-Hyd bei 1.7Å	79
3.16	Ramachandran-Plot C222 ₁ D-Hyd bei 1.3Å	81
3.17	Ramachandran-Plot P ₂ 1 ₂ 1 ₂ 1 D-Hyd bei 2.6Å	83
3.18	Ramachandran-Plot P ₂ 1 L-Hyd bei 2.6Å	85
3.19	B-Faktoren	87
4.1	Sequenzalignment D- und L-Hyd	92
4.2	anisotrope B-Faktoren und multiple Konformationen	97
4.3	Homologie Modell der L-Hyd	100

5.1	Faltung D-Hyd	102
5.2	β -Faltblattdomäne der D-Hyd	103
5.3	Unterschiede zwischen den Monomeren	105
5.4	Faltung L-Hyd	107
5.5	Topologie D- und L-Hyd	108
5.6	Strukturalignment D-Hyd und L-Hyd	109
5.7	Strukturalignment	111
5.8	strukturbasiertes Sequenzalignment	112
5.9	D-Hyd Tetramer	115
5.10	L-Hyd Tetramer	118
5.11	Vergleich der Quartärstruktur D- und L-Hyd	120
5.12	hydrophobe Oberfläche	121
5.13	aktives Zentrum D-Hyd	122
5.14	Zn-Koordination im aktiven Zentrum der D-Hyd	123
5.15	aktiven Zentrum der L-Hyd	124
5.16	aktive Zentren	125
5.17	Vergleich Carbamat und Carboxylat	127
5.18	Vergleich weiterer binuklearer Zinkzentren	133
5.19	Substrate und Übergangszustandsanaloga	135
5.20	Substratbindung D-Hyd mit 5'-Phenyl-Hydantoin	137
5.21	Substratbindung L-Hyd mit 5'-Indoloyl-methyl-hydantoin	140
5.22	Varianten von L-Hyd mit D/L-MTEH	142
5.23	Loops am aktiven Zentrum der D- und L-Hyd	145
5.24	Reaktionsmechanismus der Hydantoinasen	147
A.1	DNA-Sequenz D-Hyd	155

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Geräte	19
2.3	Sonstige Materialien	21
2.4	Programme	22
2.5	Messparameter MAD-Datensätze	37
2.6	Messparameter native Datensätze D-Hyd	37
3.1	Chromatographie D-Hyd, Protokoll 1	48
3.2	Dynamische Lichtstreuung, D-Hyd	52
3.3	ESI-MS, D-Hyd	53
3.4	Kristallisationsbedingungen	56
3.5	Diffractionsmessungen	60
3.6	Packungsdichte, D-Hyd C222 ₁	61
3.7	Peaks der Selbstrotationsfunktion, D-Hyd, C222 ₁	62
3.8	automatischer Modellbau D-Hyd, Hybrid-Modell	70
3.9	automatischer Modellbau D-Hyd, <i>side chain docking</i>	73
3.10	Molekularer Ersatz D-Hyd, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	74
3.11	Molekularer Ersatz L-Hyd, Kreuzrotationssuche	76
3.12	Molekularer Ersatz L-Hyd, Translationssuche	76
3.13	Verfeinerung D-Hyd bei 1.70Å Auflösung	78
3.14	Verfeinerung D-Hyd bei 1.30Å Auflösung	80
3.15	Verfeinerung D-Hyd bei 2.60Å Auflösung	82
3.16	Verfeinerung L-Hyd bei 2.60Å Auflösung	84
3.17	Modelle: Inhalt und Qualität	86
5.1	Kristall-, Oligomerkontakte und Packungsdichte	113
5.2	Abstrände im aktiven Zentrum	126

Literaturverzeichnis

- Abendroth, J. (1998) Kristallisation und Charakterisierung bakterieller Hydantoinasen. *Diplomarbeit Universität Köln* .
- Abendroth, J., Chatterjee, S. & Schomburg, D. (2000) Purification of a D-hydantoinase using a laboratory-scale streamline phenyl column as the initial step. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **737**, 187–94.
- Addison, A. W., Rao, T. N., Reedijk, J., Rijn, J. & Verschoor, G. C. (1984) Synthesis, structure and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen-sulphur donor ligands; the crystal and molecular structure of aqua[1,7-bis(N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) perchlorate. *J Chem Soc Dalton* 1349–56.
- Alsfasser, R. & Vahrenkamp, H. (1993) Synthesewege zu (μ -HO)Zn₂-Komplexen. *Chem Ber* **126**, 695–702.
- Andersson, I. (1996) Large structures at high resolution: the 1.6 Å crystal structure of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase complexed with 2-carboxyarabinitol bisphosphate. *J Mol Biol* **259**, 160–74.
- Andersson, K. M. & Hovmöller, S. (2000) The protein content in crystals and packing coefficients in different space groups. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56 (Pt 7)**, 789–90.
- Baker, E. N. & Hubbard, R. E. (1984) Hydrogen bonding in globular proteins. *Prog Biophys Molec Biol* **44**, 98–179.
- Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Ciurli, S. & Mangani, S. (1998) The complex of *Bacillus pasteurii* urease with β -mercaptoethanol from X-ray data 1.65-Å resolution. *J Biol Inorg Chem* **3**, 268–73.
- Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Miletti, S., Ciurli, S. & Mangani, S. (1999) A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of

- the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure Fold Des* **7**, 205–16.
- Benning, M. M., Shim, H., Raushel, F. M. & Holden, H. M. (2001) High resolution X-ray structures of different metal-substituted forms of phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry* **40**, 2712–22.
- Bernheim, F. (1952) Enzymes in detoxification. In: J. B. Sumner and K. Myrbäck (eds) *The Enzymes, Chemistry and mechanism of action*. **2**, 862.
- Bernheim, F. & Bernheim, M. L. (1946) The of hydantoins by various tissues. *J Biol Chem* **163**, 683–5.
- Bertrand, J. A., Auger, G., Fanchon, E., Martin, L., Blanot, D., van Heijenoort, J. & Dideberg, O. (1997) Crystal structure of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate ligase from *Escherichia coli*. *EMBO J* **16**, 3416–25.
- Blundell, T. L. & Johnson, L. N. (1976) *Protein Crystallography*. Academic Press, New York.
- Bourgeois, D. (1999) New processing tools for weak and/or spatially overlapped macromolecular diffraction patterns. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55 (Pt 10)**, 1733–41.
- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54 (Pt 5)**, 905–21.
- Burmeister, W. P. (2000) Structural changes in a cryo-cooled protein crystal owing to radiation damage. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **D56**, 328–41.
- Cameron, A. D., Ridderstrom, M., Olin, B. & Mannervik, B. (1999) Crystal structure of human glyoxalase II and its complex with a glutathione thiolester substrate analogue. *Structure Fold Des* **7**, 1067–78.

- CCP4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50 (Pt 5)**, 760–63.
- Ciurli, S., Benini, S., W. R. Rypniewski, K. W., Miletto, S. & Mangani, S. (1999) Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms. *Coord Chem Rev* **190-192**, 331–55.
- Concha, N. O., Rasmussen, B. A., Bush, K. & Herzberg, O. (1996) Crystal structure of the wide-spectrum binuclear zinc beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Structure* **4**, 823–36.
- Cooper, S. J., Leonard, G. A., McSweeney, S. M., Thompson, A. W., Naismith, J. H., Qamar, S., Plater, A., Berry, A. & Hunter, W. N. (1996) The crystal structure of a class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase shows a novel binuclear metal-binding active site embedded in a familiar fold. *Structure* **4**, 1303–15.
- Cruickshank, D. W. (1999) Remarks about protein structure precision [published erratum appears in *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1999 May;55(5):1108]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55 (Pt 3)**, 583–601.
- Dauter, Z., Dauter, M., de La Fortelle, E., Bricogne, G. & Sheldrick, G. M. (1999) Can an anomalous signal of sulfur become a tool for solving protein crystal structures? *J Mol Biol* **289**, 83–92.
- Deacon, A. M. & Ealick, S. E. (1999) Selenium-based MAD phasing: setting the sites on larger structures. *Structure Fold Des* **7**, R161–6.
- Deacon, A. M., Weeks, C. M., Miller, R. & Ealick, S. E. (1998) The Shake-and-Bake structure determination of triclinic lysozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9284–9.
- Deacon, A. M., Ni, Y. S., & Ealick, S. E. (2000) The crystal structure of ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase: catalysis with a twist. *Structure Fold Des* **8**, 453–62.
- Diederichs, K. & Karplus, P. A. (1997) Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography [published erratum appears in *Nat Struct Biol* 1997 Jul;4(7):592]. *Nat Struct Biol* **4**, 269–75.

- Doublie, S. (1997) Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Meth Enzymol* **276**, 523–29.
- Ducruix, A. & Giege, R. (1999) Crystallization of nucleic acids and proteins, a practical approach. *Oxford University Press, Oxford* .
- Durham, D. R. & Weber, J. E. (1996) Stereospecific preparation of an excitatory amino acid antagonist with D-hydantoinase from *Agrobacterium tumefaciens* as a biocatalyst. *Appl Environm Microbiol* **62**, 739–42.
- Eadie, G. S., Bernheim, F. & Bernheim, M. L. (1949) The partial purification and properties of animal and plant hydantoinases. *J Biol Chem* **181**, 449–58.
- Ealick, S. E. (2000) Advances in multiple wavelength anomalous diffraction crystallography. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 495–9.
- Elard, J., Henco, K., Marcinowski, S. & Schenk, G. (1987) Verfahren zur Herstellung von mesophilen Mikroorganismen, die eine bei höherer Temperatur aktive D-Hydantoinase enthalten. *Offenlegungsschrift DE 3535987 A1*.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallogr A Found Crystallogr* **47**, 392–400.
- Esnouf, R. M. (1997) An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J Mol Graph Model* **15**, 132–4, 112–3.
- Evans, G. & Pettifer, R. (2001) CHOOCH: a program for deriving anomalous-scattering factors from X-ray fluorescence spectra. *J. Appl. Cryst.* **34**, 82–6.
- Ferre-D'Amare, A. R. & Burley, S. K. (1997) Dynamic light scattering in evaluating crystallizability of macromolecules. *Meth Enzymol* **276**, 157–66.
- Frazao, C., Sieker, L., Sheldrick, G., Lamzin, V., LeGall, J. & Carrondo, M. A. (1999) Ab initio structure solution of a dimeric cytochrome c3 from *Desulfovibrio gigas* containing disulfide bridges. *J Biol Inorg Chem* **4**, 162–5.
- Gaebler, O. H. & Keltch, A. K. (1926) On the metabolism of hydantoins and hydantoic acid. *J Biol Chem* **70**, 763–77.

- Garman, E. F. & Schneider, T. R. (1997) Macromolecular Cryocrystallography. *J Appl Cryst* **30**, 211–37.
- Gasteiger, J., Sadowski, J., Schuur, J., Selzer, P., Steinhauer, L. & Steinhauer, V. (1996) Chemical Information in 3D-Space. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **36**, 1030–7.
- Gilboa, R., Greenblatt, H. M., Perach, M., Spungin-Bialik, A., Lessel, U., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Blumberg, S. & Shoham, G. (2000) Interactions of *Streptomyces griseus* aminopeptidase with a methionine product analogue: a structural study at 1.53 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56 (Pt 5)**, 551–8.
- Gonzalez, A., Pedelacq, J., Sola, M., Gomis-Ruth, F. X., Coll, M., Samama, J. & Benini, S. (1999) Two-wavelength MAD phasing: in search of the optimal choice of wavelengths. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55 (Pt 8)**, 1449–58.
- Greer, J. (1974) Three-dimensional pattern recognition: an approach to automated interpretation of electron density maps of proteins. *J Mol Biol* **82**, 279–301.
- Griffey, R. H., Scavini, M. & Eaton, R. P. (1988) Characterization of the carbamino adducts of insulin. *Biophys J* **54**, 295–300.
- Grosse-Kunstleve, R. W. & Brunger, A. T. (1999) A highly automated heavy-atom search procedure for macromolecular structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55 (Pt 9)**, 1568–77.
- Gu, X. Y., Liu, Y. D., Hao, Q., Ealick, S. E. & Fan, H. F. (2001) Direct-Method-Aided Phasing of MAD Data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 250–3.
- Hamajima, N., Matsuda, K., Sakata, S., Tamaki, N., Sasaki, M. & Nonaka, M. (1996) A novel gene family defined by human dihydropyrimidinase and three related proteins with differential tissue distribution. *Gene* **180**, 157–63.
- Hamajima, N., Kouwaki, M., Vreken, P., Matsuda, K., Sumi, S., Imaeda, M., Ohba, S., Kidouchi, K., Nonaka, M., Sasaki, M., Tamaki, N., Endo, Y., De Abreu, R., Rotteveel, J., van Kuilenburg, A., van Gennip, A., Togari, H. & Wada, Y. (1998) Dihydropyrimidinase deficiency: structural organization, chromosomal

- localization, and mutation analysis of the human dihydropyrimidinase gene. *Am J Hum Genet* **63**, 717–26.
- Harding, M. M. (2001) Geometry of metal-ligand interactions in proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 401–11.
- Hendrickson, W. A. & Ogata, C. M. (1997) Phase determination from multiwavelength anomalous diffraction measurements. *Meth Enzymol* **276**, 494–523.
- Hendrickson, W. A. & Teeter, M. M. (1981) Structure of the hydrophobic protein crambin determined directly from the anomalous scattering of sulphur. *Nature* **290**, 107–13.
- Hendrickson, W. A., Smith, J. L., Phizackerley, R. P. & Merritt, E. A. (1988) Crystallographic structure analysis of lamprey hemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation. *Proteins* **4**, 77–88.
- Hendrickson, W. A., Horton, J. R. & LeMaster, D. M. (1990) Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J* **9**, 1665–72.
- Hirel, P. H., Schmitter, M. J., Dessen, P., Fayat, G. & Blanquet, S. (1989) Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8247–51.
- Holm, L. & Sander, C. (1997) An evolutionary treasure: unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. *Proteins* **28**, 72–82.
- Howell, P. L. (1992) Identification on heavy-atom derivatives by normal probability analysis. *J Appl Cryst* **26**, 81–6.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23–8.
- Jabri, E., Carr, M. B., Hausinger, R. P. & Karplus, P. A. (1995) The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes* [see comments]. *Science* **268**, 998–1004.

- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–11.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A* **47 (Pt 2)**, 110–9.
- Kabsch, W. & Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577–637.
- Kafafi, S. A. & Krauss, M. (1999) Ab initio determination of the structure of the active site of a metalloenzyme: Metal substitution in phosphotriesterase using density functional methods. *Int J Quantum Chem* **75**, 289–99.
- Karplus, P. A., Pearson, M. A. & Hausinger, R. P. (1997) 70 years of crystalline urease: what have we learned? *Acc Chem Res* **30**, 330–7.
- Keil, O., Schneider, M. P. & Rasor, J. P. (1995) New hydantoinases from thermophilic microorganisms - synthesis of enantiomerically pure D-amino acids. *Tetrahedron: Asymmetry* **6**, 1257–60.
- Kim, G. J. & Kim, H. S. (1998) Identification of the structural similarity in the functionally related amidohydrolases acting on the cyclic amide ring. *Biochem J* **330 (Pt 2)**, 295–302.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1996) xdlMAPMAN and xdlDATAMAN - Programs for Reformatting, Analysis and Manipulation of Biomacromolecular Electron-Density Maps and Reflection Data Sets. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **52**, 826–8.
- Kleywegt, G. J. & Read, R. J. (1997) Not your average density. *Structure* **5**, 1557–69.
- Kraulis, P. J. (1991) MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **24**, 946–50.
- Krebs, F. C. (2000) How the R factor changes as molecules become larger. *J Appl Cryst* **33**, 392–3.

- Kuo, J. M., Chae, M. Y. & Raushel, F. M. (1997) Perturbations to the active site of phosphotriesterase. *Biochemistry* **36**, 1982–8.
- Lamport, L. (1985) LaTeX - A Document Preparation System. Addison Wesley Co., Inc., Reading MA, USA .
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283–91.
- Lee, B. & Richards, F. M. (1971) The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J Mol Biol* **55**, 379–400.
- Lee, S.-G., Lee, D.-C., Hong, S.-P., Sung, M.-H. & Kim, H.-S. (1995) Thermostable D-hydantoinase from thermophilic *Bacillus stearothermophilus* SD-1: characteristics of purified enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**, 270–6.
- Matthews, B. W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* **33**, 491–7.
- May, O., Siemann, M., Sylдатк, C., Niefind, K. & Schomburg, D. (1996) Crystallization and preliminary X-ray analysis of a hydantoinase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3745. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **52**, 1209–10.
- May, O., Habenicht, A., Mattes, R., Sylдатк, C. & Siemann, M. (1998a) Molecular evolution of hydantoinases. *Biol Chem* **379**, 743–7.
- May, O., Siemann, M., Pietzsch, M., Kiess, M., Mattes, R. & Sylдатк, C. (1998b) Substrate-dependent enantioselectivity of a novel hydantoinase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3745: purification and characterization as new member of cyclic amidases. *J Biotechnol* **61**, 1–13.
- May, O., Siemann, M., Siemann, M. G. & Sylдатк, C. (1998c) Catalytic and structural function of zinc for the hydantoinase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3745. *Journ. Molec. Catal. B: Enzymatic* **4**, 211–18.
- May, O., Siemann, M., Siemann, M. G. & Sylдатк, C. (1998d) The hydantoin amidohydrolase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 is a zinc metalloenzyme. *Journ. Molec. Catal. B: Enzymatic* **5**, 376–70.

- May, O., Nguyen, P. T. & Arnold, F. H. (2000) Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat Biotechnol* **18**, 317–20.
- McLachlan, A. D. (1982) Rapid comparison of protein structures. *Acta Crystallogr A Found Crystallogr* **38**, 871–3.
- Merritt, E. A. (1999) Expanding the model: anisotropic displacement parameters in protein structure refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55 (Pt 6)**, 1109–17.
- Merritt, E. A. & Bacon, D. J. (1997) Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Meth. Enzymol.* **277**, 505–24.
- Morollo, A. A., Petsko, G. A. & Ringe, D. (1999) Structure of a Michaelis complex analogue: propionate binds in the substrate carboxylate site of alanine racemase. *Biochemistry* **38**, 3293–301.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997) Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240–55.
- Naguib, F. N., el Kouni, M. H. & Cha, S. (1985) Enzymes of uracil catabolism in normal and neoplastic human tissues. *Cancer Res* **45**, 5405–12.
- Ogata, C. M. (1998) MAD phasing grows up. *Nat Struct Biol* **5 Suppl**, 638–40.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) Processing of X-Ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Meth Enzymol* **276**, 407–26.
- Pappa, H. S., Stewart, A. E. & McDonald, N. Q. (1996) Incorporating anomalous scattering centres into macromolecules. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 611–6.
- Park, I. S. & Hausinger, R. P. (1996) Metal ion interaction with urease and UreD-urease apoproteins. *Biochemistry* **35**, 5345–52.
- Pearson, M. A., Schaller, R. A., Michel, L. O., Karplus, P. A. & Hausinger, R. P. (1998) Chemical rescue of *Klebsiella aerogenes* urease variants lacking the carbamylated-lysine nickel ligand. *Biochemistry* **37**, 6214–20.

- Perrakis, A., Sixma, T. K., Wilson, K. S. & Lamzin, V. S. (1997) wARP: Improvement and Extension of Crystallographic Phases by Weighted Averaging of Multiple-Refined Dummy Atomic Models. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 448–55.
- Perrakis, A., Morris, R. & Lamzin, V. S. (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat Struct Biol* **6**, 458–63.
- Phillips, J. C. & Hodgson, K. O. (1980) The use of anomalous scattering effects to phase diffraction patterns from macromolecules. *Acta Crystallogr A Found Crystallogr* **36**, 856–64.
- Ramakrishnan, V. & Biou, V. (1997) Treatment of multiwavelength anomalous diffraction data as a special case of multiple isomorphous replacement. *Meth Enzymol* **276**, 538–57.
- Rice, L. M., Earnest, T. N. & Brunger, A. T. (2000) Single-wavelength anomalous diffraction phasing revisited. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56 (Pt 11)**, 1413–20.
- Rubinson, K. A., Ladner, J. E., Tordova, M. & Gilliland, G. L. (2000) Cryosalts: suppression of ice formation in macromolecular crystallography [In Process Citation]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56 (Pt 8)**, 996–1001.
- Sali, A. & Blundell, T. L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**, 779–815.
- Scheffzek, K., Lautwein, A., Scherer, A., Franken, S. & Wittinghofer, A. (1997) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of the Ras- GTPase-activating domain of human p120GAP. *Proteins* **27**, 315–8.
- Schomburg, D. & Reichelt, J. (1988) BRAGI: A Comprehensive Protein Modeling Program System. *J Mol Graphics* **6**, 161–165.
- Sharma, R. & Vohra, R. M. (1997) A thermostable D-hydantoinase isolated from a mesophilic *Bacillus* sp.AR9. *Biochem Biophys Res Commun* **234**, 485–8.

- Shaw, J. P., Petsko, G. A. & Ringe, D. (1997) Determination of the structure of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* **36**, 1329–42.
- Shnueli, U. (1996) International tables for crystallography, vol. B reciprocal space. *Kluwer Academic Press, Dordrecht* .
- Smith, T. F. & Waterman, M. S. (1981) Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* **147**, 195–7.
- Soriano, A. & Hausinger, R. P. (1999) GTP-dependent activation of urease apoprotein in complex with the UreD, UreF, and UreG accessory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11140–4.
- Strater, N. & Lipscomb, W. N. (1995) Two-metal ion mechanism of bovine lens leucine aminopeptidase: active site solvent structure and binding mode of L-leucinal, a gem-diolate transition state analogue, by X-ray crystallography. *Biochemistry* **34**, 14792–800.
- Sumi, S., Imaeda, M., Kidouchi, K., Ohba, S., Hamajima, N., Kodama, K., Togari, H. & Wada, Y. (1998) Population and family studies of dihydropyrimidinuria: prevalence, inheritance mode, and risk of fluorouracil toxicity. *Am J Med Genet* **78**, 336–40.
- Sutanthavibul, S. (1985) X-FIG version 3.2. *The Manual* .
- Swaminathan, K., Flynn, P., Reece, R. J. & Marmorstein, R. (1997) Crystal structure of a PUT3-DNA complex reveals a novel mechanism for DNA recognition by a protein containing a Zn₂Cys₆ binuclear cluster. *Nat Struct Biol* **4**, 751–9.
- Syldatk, C. & Pietzsch, M. (1995) Hydrolysis and formation of hydantoins. In: K. Drauz, H. Waldmann (eds) *Enzym catalysis in organic synthesis*. Verlag Chemie, Weinheim 409–31.
- Syldatk, C., May, O., Altenbuchner, J., Mattes, R. & Siemann, M. (1999) Microbial hydantoinases—industrial enzymes from the origin of life? *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 293–309.

- Takahashi, S. (1983) Microbial synthesis of D-amino acids from DL-5-substituted hydantoins. *Hakkokogaku* **61**, 139–51.
- Takahashi, S., Kii, Y., Kumagai, H. & Yamada, H. (1978) Purification, crystallization and properties of hydantoinase from *Pseudomonas striata*. *J Ferment Technol* **56**, 492–8.
- Tame, J. R. H. (2000) *Ab initio* phasing of a 4189-atom protein structure at 1.2Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**, 1554–9.
- Terwilliger, T. C. & Berendzen, J. (1999) Evaluation of macromolecular electron-density map quality using the correlation of local r.m.s. density. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**, 1872–7.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–80.
- Tong, L. & Rossmann, M. (1997) Rotation Function Calculations with GLRF Program. *Meth Enzymol* **276**, 594–611.
- Uson, I. & Sheldrick, G. M. (1999) Advances in direct methods for protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 643–8.
- van Gennip, A. H., Abeling, N. G., Vreken, P. & van Kuilenburg, A. B. (1997) Inborn errors of pyrimidine degradation: clinical, biochemical and molecular aspects. *J Inherit Metab Dis* **20**, 203–13.
- Vanhooke, J. L., Benning, M. M., Raushel, F. M. & Holden, H. M. (1996) Three-dimensional structure of the zinc-containing phosphotriesterase with the bound substrate analog diethyl 4-methylbenzylphosphonate. *Biochemistry* **35**, 6020–5.
- Vogels, G. D. & Van der Drift, C. (1976) Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriol Rev* **40**, 403–68.

- Wallach, D. P. & Grisola, S. (1957) The purification and properties of hydroxypyrimidin hydrolase. *J Biol Chem* **226**, 277–88.
- Walsh, M. A., Evans, G., Sanishvili, R., Dementieva, I. & Joachimiak, A. (1999) MAD data collection - current trends. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55 (Pt 10)**, 1726–32.
- Wang, C. E. (2000) ConfMatch: automating electron-density map interpretation by matching conformations. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56 Pt 12**, 1591–611.
- Waniek, T. (2000) Untersuchungen zur Substratspezifität und Enantioselektivität mikrobieller Hydantoinasen. *Dissertation Universität Stuttgart* .
- Weeks, C. M. & Miller, R. (1999) Optimizing Shake-and-Bake for proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55 (Pt 2)**, 492–500.
- Weik, M., Ravelli, R. B., Kryger, G., McSweeney, S., Raves, M. L., Harel, M., Gros, P., Silman, I., Kroon, J. & Sussman, J. L. (2000) Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 623–8.
- Westhead, D. R., Slidel, T. W., Flores, T. P. & Thornton, J. M. (1999) Protein structural topology: Automated analysis and diagrammatic representation. *Protein Sci* **8**, 897–904.
- Wiese, A., Pietzsch, M., Syltatk, C., Mattes, R. & Altenbuchner, J. (2000) Hydantoin racemase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747: heterologous expression, purification and characterization. *J Biotechnol* **80**, 217–30.
- Williams, T. & Kelley, C. (1996) Gnuplot: An Interactive Plotting Program. *The Manual Version 3.6a*.
- Yu-dong, L., Harvey, I., Yuan-xin, G., Chao-de, Z., Yi-zong, H., Hai-fu, F., Hasnain, S. S. & Hao, Q. (1999) Is single-wavelength anomalous scattering sufficient for solving phases? A comparison of different methods for a 2.1 Å structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55 (Pt 9)**, 1620–2.