

**Die Struktur der L-Aminosäure Oxidase  
aus *Rhodococcus opacus*  
in verschiedenen funktionellen Zuständen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Annette Faust**

aus Wermelskirchen

Köln 2004



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

(Annette Faust)



Berichterstatter: Prof. Dr. Dietmar Schomburg  
Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt  
Einreichung des Gesuchs: 20.10.2004  
Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2005



Das Ziel  
weicht ständig  
vor uns zurück.  
Genugtuung  
liegt im Einsatz,  
nicht im Erreichten.

Mahatma Ghandi



## Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei

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

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

Herrn Dr. Karsten Niefind für die Einführung in die theoretischen Hintergründe der Proteinkristallographie, die zahlreichen Erklärungen und Hilfen im Umgang mit diversen Programmen, der Betreuung der Röntgenanlagen am Institut und nicht zuletzt für die Chance, das gesammelte Wissen und die Erfahrungen auch weiterhin nutzen zu können,

Herrn Dr. Klaus Hövel und Dipl. Biologe Guido Hansen für die Kooperation bei allen praktischen Fragen zur Röntgendiffraktion und Kristallisation, und die Begleitung und Unterstützung bei den Synchrotronmessungen,

Herrn Dr. Lejon Martens für die Einführung und Kooperation in allen die Massenspektrometrie betreffenden Fragen,

den Mitarbeitern des EMBL in Hamburg, insbesondere A. Popov und M. Groves für ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der Messungen,

der DFG für die Finanzierung meiner Arbeit,

und meiner Familie für die Unterstützung.



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XV</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Evolution der Nucleotid-bindenden Proteine .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 L-Aminosäure Oxidase aus Rhodococcus opacus .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Vorkommen und Nomenklatur der L-Aminosäure Oxidasen .....	5
1.2.2 Physiologische Funktion der L-Aminosäure Oxidasen .....	6
1.2.3 Biotechnologische Bedeutung der L-Aminosäure Oxidasen .....	7
<b>1.3 Der Reaktionsmechanismus der Aminosäure Oxidasen .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Methodische Aspekte der Strukturlösung .....</b>	<b>9</b>
1.4.1 Schweratom-Inkorporation .....	9
1.4.2 Phasierungsmethoden .....	11
1.4.3 SAD-Phasierung .....	14
<b>1.5 Zielsetzung .....</b>	<b>16</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Materialien, Geräte und EDV-Systeme .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Zellaufschluss, Chromatographie und Proteinanalytik .....</b>	<b>23</b>
2.2.1 Zellaufschluss und Chromatographie .....	23
2.2.2 Aktivitätstest .....	24
<b>2.3 Proteinanalytik .....</b>	<b>24</b>
2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	24
2.3.2 Polyarylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	25
2.3.3 Massenspektrometrie .....	26
2.3.3.1 MALDI-tof-MS .....	26
2.3.3.2 ESI-MS .....	27

<b>2.4</b>	<b>Vorauswahl geeigneter Derivatisierungsreagenzien .....</b>	<b>27</b>
<b>2.5</b>	<b>Kristallisation .....</b>	<b>28</b>
2.5.1	Impfkristallisation.....	29
2.5.2	Schwermetall-Derivatisierung .....	29
2.5.3	Substrat-Enzym-Komplexe .....	30
<b>2.6</b>	<b>Röntgendiffraktometrie.....</b>	<b>30</b>
2.6.1	Kristallmontage und Diffraktionsmessungen .....	30
2.6.2	Diffraktionsexperimente mit nativen Kristallen .....	31
2.6.2.1	Nativer Datensatz der roLAAO in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ .....	31
2.6.2.2	Nativer Datensatz der LAAO in der Raumgruppe $C222_1$ .....	32
2.6.3	Diffraktionsexperimente mit derivatisierten Kristallen.....	33
2.6.3.1	Auswahl geeigneter Derivate mit Röntgendiffraktion .....	33
2.6.3.2	Datensätze des Quecksilberchlorid-Derivates .....	33
2.6.4	Datensätze der roLAAO mit Substraten und Inhibitor .....	35
<b>2.7</b>	<b>Datenreduktion.....</b>	<b>36</b>
2.7.1	Detektion isomorpher Schweratomderivate .....	37
2.7.2	Phasierung des $HgCl_2$ -Derivates (MAD) .....	37
2.7.3	SAD-Phasierung des Hg-Derivates - Detektion der Substruktur .....	38
2.7.4	Dichtemodifikation, Modellbau und Verfeinerung .....	38
2.7.5	Molekularer Ersatz zur Strukturlösung der $C222_1$ -LAAO .....	39
2.7.6	Enzym-Komplexe mit Substrat und Inhibitor .....	40
<b>2.8</b>	<b>Validierung der Modelle.....</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellaufschluss, Chromatographie und Proteinanalytik .....</b>	<b>41</b>
3.1.1	Zellaufschluss, Chromatographie.....	41
3.1.2	Proteinanalytik .....	44
3.1.2.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	44
3.1.2.2	Massenspektrometrische Charakterisierung.....	44
<b>3.2</b>	<b>Kristallisation .....</b>	<b>47</b>
3.2.1	Kristalle der Raumgruppe $P2_12_12_1$ .....	47
3.2.2	Kristalle der Raumgruppe $C222_1$ .....	48
<b>3.3</b>	<b>Derivatisierung.....</b>	<b>50</b>
3.3.1	Massenspektrometrische Methoden .....	50

3.3.2	Native Gelelektrophorese.....	51
3.3.3	Cokristallisation mit Schwermetallreagenzien .....	52
3.3.4	Kristallsoaking mit Schwermetallreagenzien .....	53
<b>3.4</b>	<b>Diffractionsmessungen und Rechnungen mit nativen Datensätzen .54</b>	
3.4.1	Bestimmung der Raumgruppen .....	54
3.4.2	Kristallpackung.....	56
3.4.3	Rechnungen zur Selbstrotationsfunktion.....	56
<b>3.5</b>	<b>Diffractionsmessungen und Rechnungen mit Derivat-Datensätzen..57</b>	
3.5.1	Screening nach potentiellen Derivaten.....	57
3.5.2	Bewertung der Derivate mit der SIR-Methode .....	58
3.5.3	MAD des Quecksilberderivates .....	59
<b>3.6</b>	<b>Strukturlösung des Quecksilberderivates als SAD-Fall .....</b>	<b>61</b>
3.6.1	Detektion der Quecksilber-Substruktur .....	61
3.6.2	Dichtemodifikation und Solvenzglättung .....	62
3.6.3	Automatischer Modellbau mit ARP/wARP.....	65
<b>3.7</b>	<b>Strukturlösung LAAO, C222<sub>1</sub> .....</b>	<b>72</b>
<b>3.8</b>	<b>Strukturlösung der Komplexe.....</b>	<b>74</b>
3.8.1	P <sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></sub> -LAAO im Komplex mit L-Alanin .....	74
3.8.2	P <sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></sub> -LAAO mit Komplex mit L-Phenylalanin .....	75
3.8.3	P <sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></sub> -LAAO im Komplex mit Anthranilat .....	76
<b>3.9</b>	<b>Verfeinerung und Qualität der Strukturen.....</b>	<b>76</b>
3.9.1	Quecksilber-Derivat, P <sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></sub> bis 2.45 Å .....	76
3.9.2	Native LAAO, P <sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub></sub> bis 1.4 Å .....	77
3.9.3	Komplexe der LAAO .....	83
<b>3.10</b>	<b>Vergleich der Struktur der roLAAO mit denen homologer Proteine..</b>	<b>87</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION I .....</b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression und Aufreinigung .....</b>	<b>89</b>
<b>4.2</b>	<b>Proteinanalytik .....</b>	<b>89</b>
4.2.1	SDS-PAGE und native Gelelektrophorese .....	90
4.2.2	Massenspektrometrische Untersuchungen .....	91

<b>4.3</b>	<b>Kristallisation .....</b>	<b>92</b>
<b>4.4</b>	<b>Derivate und erste Phasierungen .....</b>	<b>93</b>
<b>4.5</b>	<b>Optimierung der Derivatisierung .....</b>	<b>94</b>
<b>4.6</b>	<b>Strukturlösung mit SAD und Modellbau .....</b>	<b>95</b>
<b>4.7</b>	<b>Komplexstrukturen der roLAAO .....</b>	<b>96</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION II: DIE STRUKTUR DER ROLAAO.....</b>	<b>97</b>
<b>5.1</b>	<b>Tertiärstruktur und Quartärstruktur der roLAAO .....</b>	<b>97</b>
5.1.1	Die Domänenstruktur der roLAAO .....	99
5.1.2	Das funktionelle Dimer .....	103
<b>5.2</b>	<b>Strukturhomologe Proteine.....</b>	<b>104</b>
5.2.1	Strukturvergleich zwischen roLAAO und crLAAO .....	107
5.2.2	Dimerisierung und Kontaktflächen .....	109
<b>5.3</b>	<b>Das aktive Zentrum der roLAAO .....</b>	<b>113</b>
5.3.1	Die Koordination des FAD-Cofaktors .....	114
5.3.2	Die Koordination von Substraten und Inhibitor .....	117
5.3.3	Der Oxidationszustand des FADs und die gebundene Spezies in den Substratkomplexen.....	120
5.3.4	Die Substratspezifität der L-Aminosäure Oxidase aus <i>Rh. opacus</i> . 121	
<b>5.4</b>	<b>Der Vergleich mit homologen Aminosäureoxidasen .....</b>	<b>122</b>
5.4.1	Die aktiven Residuen der homologen Aminosäureoxidasen .....	122
5.4.2	Die Komplexe mit Alanin und (o-Amino-)benzoat .....	123
5.4.3	Die aktiven Residuen der Aminosäureoxidasen.....	126
<b>5.5</b>	<b>Der katalytische Mechanismus der roLAAO.....</b>	<b>127</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>133</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>135</b>
<b>A.1</b>	<b>Kurzzusammenfassung .....</b>	<b>135</b>
<b>A.2</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>137</b>

<b>A.3 Lebenslauf .....</b>	<b>139</b>
<b>A.4 Vorabveröffentlichungen .....</b>	<b>141</b>
<b>A.5 Posterbeiträge .....</b>	<b>143</b>
<b>A.6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>145</b>
<b>A.7 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>155</b>
<b>A.8 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>159</b>



## Abkürzungsverzeichnis

m	Meter
l	Liter
g	Gramm
M	molar; mol/l
mM	millimolar; mmol/l
min	Minute
s	Sekunde
Å	Ångström, 1 Å = 100 pm
$\lambda$	Wellenlänge
K	Kelvin, 0K = - 273.15 °C
Da	Dalton, 1 Da = 1g/mol
kV	kilo Volt
mA	milli Ampere
g	Erdbeschleunigung; 9.81m/s <sup>2</sup>
a, b, c	Translations - bzw. Gittervektoren
$\alpha, \beta, \gamma$	Winkel der Gittervektoren a, b und c
hkl	Miller'sche Indizes
I	Intensität der Reflexe
$\sigma(I)$	Standardabweichung der Intensität, Rauschen
MALDI	Matrix-unterstützte-LASER-Desorption/Absorptions- ionisation
ESI	Elektronenspray-Ionisation
tof	time-of-flight
MS	Massenspektrometrie
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

## Abkürzungsverzeichnis

---

### Aminosäuren:

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

### chemische Verbindungen und Elemente:

PEG	Polyethylenglycol
Hg	Quecksilber
Pt	Platin
Os	Osmium

W	Wolfram
Au	Gold
Pd	Palladium
La	Lanthan
Ir	Iridium
Pb	Blei
DTT	Dithiothreitol
HCl	Salzsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)- 1-piperazinethansulfonsäure
MPD	Methylpentandiol
NaCl	Natriumchlorid
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammoniumsulfat
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	Natriumsulfat
FAD	Flavinadenosindinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
NAD	Nicotinsäureamidadenosindinucleotid
LAAO	L-Aminosäure Oxidase
DAAO	D-Aminosäure Oxidase
roLAAO	L-Aminosäure Oxidase aus <i>Rhodococcus opacus</i>
crLAAO	L-Aminosäure Oxidase aus <i>Calloselasma rhodostoma</i>
pcDAAO	D-Aminosäure Oxidase aus Schweineniere
yDAAO	D-Aminosäure Oxidase aus Hefe
GR	Gluthation Reduktase
PAO	Polyamin Oxidase
MAO	Monoamin Oxidase

## Abkürzungsverzeichnis

---

MAD	multiple anomale Dispersion
SAD	einfache anomale Dispersion (single anomalous dispersion)
SIR	einfacher isomorpher Ersatz (single isomorphous replacement)
MIR	multipler isomorpher Ersatz (multiple isomorphous replacement)
SIRAS	einfacher isomorpher Ersatz unter Verwendung des anomalen Signals (single isomorphous replacement with anomalous dispersion )

# 1 Einleitung

## **1.1 Die Evolution der Nucleotid-bindenden Proteine**

Nucleotide spielen im zellulären Metabolismus eine zentrale Rolle bei der Energieübertragung, indem sie die im Katabolismus freigesetzte Energie an die energieverbrauchenden Prozesse weiterleiten. Dazu werden entweder hochenergetische Phosphatbindungen hydrolysiert (ATP, GTP) oder es erfolgt ein Elektronentransfer durch ein Wasserstoffatom einer Base in Oxidations-/Reduktionsreaktionen (FMN, FAD oder NAD(P)<sup>+</sup>). Der Transfer von Wasserstoff von einem Substrat auf das Nucleotid wird durch Dehydrogenasen oder Oxidoreduktasen katalysiert.

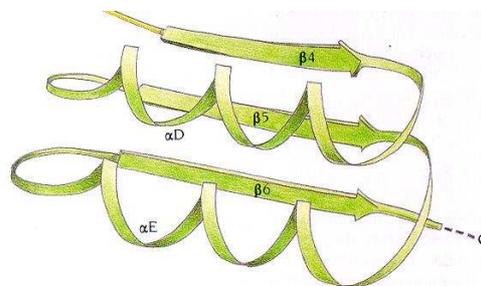
Als Nucleotide kommen hier das Nikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NAD<sup>+</sup>) bzw. die phosphorylierte Form, das NADP<sup>+</sup> vor. Flavin kommt als Base in dem redox-aktiven Flavinmononucleotid (FMN) und dem Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) vor. Im Gegensatz zum ATP werden diese Moleküle als Cofaktoren bezeichnet, was sich eher historisch begründen lässt. Aufgrund ihrer wichtigen Rolle im Zellstoffwechsel nimmt man an, dass nucleotidbindende Proteine in der Evolution lebender Organismen bereits sehr früh aufgetreten sind. Aus der Art der Bindung der Cofaktoren, den Vergleichen der Primärsequenz und nicht zuletzt der 3D-Faltung dieser Proteine lässt sich die Evolution dieser Proteine verfolgen und verstehen.

Sequenzmotive beschreiben aa-Regionen in Proteinen, in denen nur eine geringe Variabilität auftritt. Diese wird bedingt durch strukturelle Einschränkungen, die sich entweder aus der Faltung des Proteins oder durch die spezifische Bindung von Cofaktoren, Substraten oder anderen Proteinen ergeben. Eines der ersten entdeckten

## 1 Einleitung

---

Sequenzmotive war ein in verschiedenen NADH-abhängigen Proteinen vorkommendes Faltungselement, der sogenannte Rossmann-Fold (Rossman 1974). Dieses Strukturmotiv besteht aus einem sechssträngigen, parallelen  $\beta$ -Faltblatt, das auf jeder Seite von einer Helix flankiert wird. Diese Struktur hat eine zweizählige Rotationssymmetrie, wobei der erste Teil mehr an der Bindung des Adenosinanteils und der zweite an der des Nicotinamidteils beteiligt ist. In dem FMN-bindenden Protein Flavodoxin (Rao 1973) wie auch in NADPH- und FAD-bindenden Proteinen wurde eine leicht abgewandelte Form dieses Motivs gefunden (Wierenga 1983).



**Abbildung 1.1:** schematische Darstellung eines idealisierten Rossmann-Faltungsmotivs als Banddiagramm. Der Rossmann *fold* besteht aus zwei solcher Einheiten (Branden 1999).

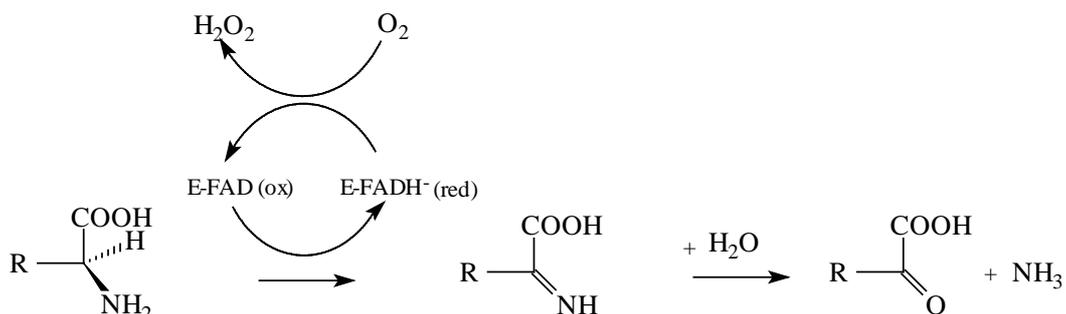
Die gefundenen Sequenzmotive und die divergente Evolution der NAD- und FAD-bindenden Proteine werden ausführlich bei Vallon beschrieben. (Vallon 2000).

Die weitere Einteilung der FAD-bindenden Proteine in Familien aufgrund zusätzlicher Gemeinsamkeiten wurde ausführlich bei Dym beschrieben. (Dym 2001) Eine der bestuntersuchtsten FAD-bindenden Proteinfamilien wird durch die Glutathion Reductase (GR) repräsentiert. Die dieser Familie zugehörigen Enzyme katalysieren verschiedene Reaktionen. In allen Strukturen dieser Familie findet sich die Rossmann-Faltung. Die Topologie der Enzyme der GR-Familie besteht aus einem zentralen fünfsträngigen, parallelen  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 7$ ,  $\beta 8$ ) umgeben von  $\alpha$ -Helices ( $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ ), parallel zu einem weiteren dreisträngigen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta 4-6$ ). Alle

Vertreter der GR-Familie besitzen zumindest im Bereich der FAD-Bindungsdomäne eine ähnliche Topologie. Dabei findet man bei den Vertretern der GR<sub>1</sub>-Familie eine ähnliche Faltung innerhalb der gesamten Domäne, wohingegen die Vertreter der GR<sub>2</sub>-Familie lediglich im N-terminalen Bereich der FAD-Bindungsdomäne strukturelle Ähnlichkeiten aufweist. (im Bereich der ersten ~30 Residuen). Innerhalb der GR<sub>2</sub>-Familie kommen terminale Insertionen wie auch Insertionen in der Faltung vor. Insertionen werden hauptsächlich innerhalb der Verbindungen zwischen  $\beta_2$  und  $\alpha_2$  und  $\alpha_2$  und  $\beta_3$  des Rossmann-*folds* beobachtet (Dym 2001).

## 1.2 L-Aminosäure Oxidase aus *Rhodococcus opacus*

Die L-Aminosäure Oxidase (LAAO) ist ein homodimeres Flavoprotein, das zuerst von Zeller beschrieben wurde (Zeller 1944). Es gehört zur GR<sub>2</sub>-Familie der FAD-gebundenen Reductasen. Das Enzym katalysiert die oxidative Desaminierung von L-Aminosäuren zu  $\alpha$ -Ketosäuren unter Bildung von Ammoniak und Wasserstoffperoxid. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt vollständig auf Seiten des Produktes. Die Reaktion ist schematisch in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 1.2:** schematische Darstellung der durch die L-AAO katalysierten Reaktion

## 1 Einleitung

---

Die L-Aminosäure Oxidase aus *Rhodococcus opacus* ist ein homodimeres Protein, wobei jedes Monomer ein nicht-kovalent gebundenes FAD in der elongierten Form enthält. Jedes Monomer besteht aus 488 Residuen, das Molekulargewicht beträgt 54.2kDa.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Protein wurde im Wildtypstamm exprimiert. Die heterologe Expression in *E.coli* war nicht erfolgreich; das Protein konnte aber in *Streptomyces lividans* heterolog expremiert werden. Dabei wurden bis zu dreimal höhere Ausbeuten an LAAO erzielt als im Wildtyp (Geueke 2002). Da für *Streptomyceten* weder Methionin-auxotrophe Stämme noch Protokolle zur Hemmung der Methionin-Synthese bekannt waren, konnten Seleno-Methionin Mutanten des Proteins nicht routinemässig hergestellt werden; die Entwicklung geeigneter Methoden war zeitlich schwierig einzuschätzen.

Das Enzym zeigt hinsichtlich des Substratspektrums eine hohe Stereoselektivität; es werden keine D-Aminosäuren umgesetzt (Geueke 2002). L-Prolin, L-Threonin und Glycin werden von der LAAO ebenfalls nicht umgesetzt. Die roLAAO erreichte unter den Testbedingungen spezifische Aktivitäten von bis zu  $10\text{Umg}^{-1}$  für die besten Substrate. Damit ist die Spezifität des Enzyms im Vergleich zu den Schlangengiftproteinen deutlich geringer. Studien, die den Einfluss der Substratseitenketten beschreiben, existieren für mehrere Schlangengift-LAAOs (Ponnudurai 1994; Tan 1992; Braun 1992). In diesem Zusammenhang wird der Einfluss des  $C_{\beta}$ -Atoms der Seitenkette auf die Enzymaktivität beschrieben. Die roLAAO zeigt eine verminderte Aktivität für Substrate, die eine Verzweigung am  $C_{\beta}$ -Atom besitzen. Bislang besitzt die roLAAO das breiteste Substratspektrum aller beschriebenen LAAOs. Es wird daher angenommen, dass die roLAAO eine sehr flexible Substratbindungsstelle besitzen muss. Bei para-substituierten, aromatischen Substraten kann der Einfluss des Substituenten auf eine Reaktion durch den  $\sigma$ -Faktor beschrieben werden. Ein positiver  $\sigma$ -Faktor steht für eine elektronenziehende Gruppe. p-Substituierte L-Phenylalaninderivate mit erhöhter

Elektronendichte im Ring haben eine höhere Affinität zur roLAAO. Dies ist hinsichtlich des postulierten Reaktionsmechanismus interessant, da die Abspaltung eines Hydrids erleichtert wird, wenn durch den Substituenten in p-Stellung die Elektronendichte am chiralen  $\alpha$ -C-Atom erhöht wird.

### 1.2.1 Vorkommen und Nomenklatur der L-Aminosäure Oxidasen

L-Aminosäureoxidasen kommen in vielen Spezies vor, die am besten untersuchtesten stammen aus Schlangengiften (Sanchez 1991; Tan 1991; Tan 1992; Ponnudurai 1994; Torii 1994; Souza 1999). Auch kommt das Enzym in Schimmelpilzen (Le 1978; Kusakabe 1980), Algen (Piedras 1992), Bakterien (Coudert 1975; Braun 1992; Brearley 1994), und Insektengiften (Ahn 2000) vor. Die meisten der aufgeführten LAAOs akzeptieren eine Vielzahl von L-Aminosäuren als Substrate. Einige der Enzyme werden aber, aufgrund ihrer eingeschränkten Substratspezifität, unter einem Namen geführt, der ihre Funktion genauer charakterisiert. Zum Beispiel bilden Streptomyces-Arten L-Glutamatoxidasen, die fast ausschließlich Glutamat als Substrat akzeptieren (Kamei 1983; Kamei 1983; Böhmer 1989). Die L-Phenylalaninoxidase aus *Pseudomonas spec.* oxidiert neben L-Phenylalanin nur noch L-Tyrosin, L-Tryptophan und L-Methionin, bei deutlich verringerter Aktivität (Koyama 1983). Eine Sonderstellung nehmen die L-Aminosäureoxidasen aus der Familie der Enterobacteriaceae ein, da diese membranständig sind und bei der Regeneration des FADs Wasser anstelle von Wasserstoffperoxid produzieren (Pantaleone 2001). Die Nomenklatur ist in der Literatur nicht immer eindeutig; oft werden diese Enzyme, die von *Proteus*-, *Providencia*- und *Morganella*-Arten (Cioaca 1974; Bouvrette 1994; Massad 1995) gebildet werden auch als L-Aminosäuredeaminasen bezeichnet.

### 1.2.2 Physiologische Funktion der L-Aminosäure Oxidasen

Die physiologische Funktion der bakteriellen L-Aminosäure Oxidasen ist noch ungeklärt. Im Schimmelpilz *Neurospora crassa* wird die LAAO bei Mangel an frei verfügbarem Stickstoff in Anwesenheit bestimmter L-Aminosäuren wie L-Arginin oder L-Phenylalanin induziert (DeBusk 1984); durch eine Kohlenstofflimitierung wird die Bildung dieser LAAO verhindert (Sikora 1982). In der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* wird eine LAAO induziert, wenn L-Aminosäuren als einzige Stickstoffquelle im Medium vorhanden sind. Der bei der Oxidation der L-Aminosäuren entstehende Ammoniak wird von den Zellen aufgenommen, die Ketoverbindungen bleiben im Überstand zurück (Munoz-Blanco 1990). Die Zugabe von Ammoniak reprimiert die Bildung des Enzyms. Daher vermutet man, dass diese induzierbaren LAAOs bei der Stickstoffversorgung der Zellen eine Rolle spielen. Da die LAAO aus *Rhodococcus opacus* die Desaminierung der meisten L-Aminosäuren katalysiert, versorgt sie wahrscheinlich die Zelle mit Stickstoff und Ketoverbindungen, die im Folgenden in Glucose umgewandelt werden oder im Citratzyklus oxidiert werden können. Aus diesen Erkenntnissen wird vermutet, dass die roLAAO eine Funktion im Aminosäure-Katabolismus der Zelle übernimmt.

Man vermutet, dass die von membrangebundenen L-Aminosäuredeaminasen produzierten Ketosäuren als Siderophore dienen (Drechsel 1993; Massad 1995). Damit könnten diese Enzyme eine Rolle in der Regulation des Eisenstoffwechsels spielen.

Um den Beitrag der LAAO zur toxischen Wirkung des Schlangengiftes zu verstehen wurde die Funktion des Proteins eingehend untersucht; die Ergebnisse aus den Untersuchungen der LAAOs vieler verschiedener Schlangengifte weisen eindeutig auf eine direkte Beteiligung an der Toxizität hin. Durch die LAAO werden u. a. Apoptose (Torii 1994; Suhr 1996; Souza 1999; Suhr 1999; Ahn 2000), Ödeme (Ahn 2000), Hämolyse (Ali 2000) und Störungen der Thrombozytenaggregation (Sakurai 2001)

ausgelöst. Unklar ist dabei aber immer, ob diese Wirkung nicht nur auf das bei der Reaktion gebildete Wasserstoffperoxid zurückzuführen ist. Darauf weisen Untersuchungsergebnisse hin, die belegen, dass die toxische Wirkung durch Zugabe von Katalase nahezu vollständig unterdrückt wird (Torii 1994; Takatsuka 2001). Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen von Suhr und Kim, wonach es zu einer Bindung der LAAO an der Zelloberfläche kommt und dadurch die lokale Wasserstoffperoxidkonzentration so stark ansteigt, dass auch der Zusatz von Katalase die Wirkung nicht vollständig unterdrücken kann (Suhr 1999).

### **1.2.3 Biotechnologische Bedeutung der L-Aminosäure Oxidasen**

Bislang haben L-Aminosäure Oxidasen in der Darstellung von D-Aminosäuren oder Ketosäuren kaum eine Rolle gespielt. Die L-Aminosäuredeaminase aus *Providencia alcalifaciens* wurde zur Synthese von Carboxy(CBZ)-L-oxolysin aus N $\epsilon$ -CBZ-L-Lysin eingesetzt (Hanson 1992). Andere L-Aminosäuredeaminasen wurden zur Racemattrennung von DL-Aminosäuren verwendet (Takahashi 1997; Pantaleone 2001). Darüber hinaus werden LAAO als Biosensoren, im Aminosäurenachweis in Lebensmitteln und zur Proteinbestimmung (Lee 1998; Liu 1999; Setford 2002) eingesetzt.

## **1.3 Der Reaktionsmechanismus der Aminosäure Oxidasen**

Die oxidative Dehydrierung, die durch diese Klasse der Flavin-abhängigen Enzyme katalysiert wird, ist eine elementare biochemische Reaktion. Die D-Aminosäure Oxidase war das erste Enzym dieser Gruppe, das beschrieben und das zweite Flavoprotein, das Mitte der dreißiger Jahre entdeckt wurde (Krebs 1935; Warburg 1938). In den siebziger

## 1 Einleitung

---

Jahren fand man heraus, dass die Schweineniere-DAAO (pcDAAO) die Elimination von Halogenwasserstoff aus  $\beta$ -halogenierten Aminosäuren katalysiert (Walsh 1971). Daraus folgerte man, dass die Reaktion durch Abstraktion des  $\alpha$ -Protons der Aminosäure über einen Carbanionen-Mechanismus verläuft. Für diesen Reaktionsmechanismus ist das Vorhandensein einer katalytischen Base erforderlich. Basierend auf Arbeiten von Hersh und Schuman-Jorns von 1975 wurde ein alternativer Mechanismus einer Hydridübertragung durch Übertragung des Wasserstoffs am  $C_{\alpha}$ -Atom der Aminogruppe auf den N(5) des Flavins vorgeschlagen (Hersh 1975). Erste Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der LAAO wurden ebenfalls in den siebziger und achtziger Jahren von Porter & Bright im Zusammenhang mit der pH-Abhängigkeit der Reduktion des Flavins durchgeführt (Porter 1980). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Spaltung der C-H-Bindung im Enzym-Substrat-Komplex (Porter 1969). Auch hier wurden beide möglichen Reaktionsmechanismen diskutiert.

Die Kristallstruktur der DAAO aus Schweineniere im Komplex mit Benzoat, Imino-Tryptophan und o-Aminobenzoat wurde von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen gelöst (Mattevi 1996; Mizutani 1996). Die mechanistische Interpretation der Strukturdaten war allerdings gegensätzlich. Aus der Simulation der Bindung von D-Leucin im aktiven Zentrum durch molekulares Modelling (Miura 1997) wurde der Reaktionsverlauf durch einen Elektronen-Protonen-Elektronen-Mechanismus beschrieben. Auch bei Mattevi et al. wurde das D-Alanin durch Modelling ins aktive Zentrum positioniert (Mattevi 1996); hier wird ein klassischer Hydridmechanismus aus den Interaktionen des Substrates mit den Resten im aktiven Zentrum favorisiert. Die zweite Hypothese wird sowohl durch die Bestimmung kinetischer Isotopeneffekte bei der DAAO aus *Trigonopsis variabilis* (Pollegioni 1997) als auch durch die Kristallstruktur der DAAO aus *Rhototorula gracilis* im Komplex mit D-Alanin, D-Trifluoralanine und L-Lactat unterstützt, bei der die Anordnung des Substrates im aktiven Zentrum eindeutig für den Hydridmechanismus spricht (Umhau 2000; Pollegioni 2002). Die Interpretation der ersten Kristallstruktur einer LAAO aus Schlangengift (Pawelek 2000) deutet ebenfalls auf einen Hydridmechanismus

hin, wobei die Autoren aber auch auf eine mögliche katalytische Base im aktiven Zentrum verweisen. Bislang existierten von der LAAO nur Komplexstrukturen mit o-Aminobenzoat und Citrat; Substratkomplexe mit L-Phenylalanin wurden ebenfalls durch molekulares Modelling erzeugt und interpretiert.

## **1.4 Methodische Aspekte der Strukturlösung**

Theoretische und methodische Grundlagen der Proteinkristallographie sind in etlichen Standardwerken (Blundell 1976; Shnueli 1996; Ducruix 1999; McPherson 1999) bereits umfassend beschrieben und diskutiert worden. Daher möchte ich hier lediglich einige Aspekte, die im Rahmen der Arbeit für die Strukturlösung der LAAO wichtig waren, ansprechen.

### **1.4.1 Schweratom-Inkorporation**

Die Inkorporation von Schweratomen in Proteinkristalle zur Phasierung wurde zuerst von Green beschrieben (Green 1954). Dabei werden die speziellen Eigenschaften der Schweratome ausgenutzt. Sowohl für die Methode des isomorphen Ersatzes (SIR, MIR) als auch die der anomalen Dispersion (SAD, MAD) ist es notwendig, dass das Schweratom an definierten Positionen im Protein mit guter Besetzung dieser Positionen eingelagert wird, um ein klares Signal zu erhalten. Die wichtigsten Techniken und theoretischen Grundlagen sind im Detail beschrieben (Blundell 1976; Drenth 1999) und sollen hier nicht näher erläutert werden.

Durch heterologe Proteinexpression in Methionin-auxotrophen Organismen oder durch Inhibition des Methionin-Anabolismus unter Zugabe von Seleno-Methionin lassen sich

## 1 Einleitung

---

gezielt Seleno-Methionin-Derivate auf molekularbiologischem Wege darstellen (Doublet 1997). Da alle Methionine des Proteins durch Seleno-Methionine ersetzt werden, sind die Selen-Positionen alle vollständig besetzt. Ist ein entsprechendes Expressionssystem nicht verfügbar, müssen die Schweratome durch Diffusion in den Proteinkristall eingebracht werden. Die Auswahl geeigneter Schweratomreagenzien ist in der Praxis ein schwieriger und zeitaufwändiger Prozess. Dabei können Informationen über die Aa-Zusammensetzung des Proteins sehr hilfreich sein. Ist zum Beispiel bekannt, dass im Protein freie Cysteine vorliegen, kann eine Derivatisierung mit Quecksilber erfolgreich sein, da diese in Disulfidbrücken interkaliert sind (Boggon 2000). Dabei ist auch die Zusammensetzung der Kristallisations Mutterlauge zu berücksichtigen, da Schwermetallverbindungen nur in bestimmten pH-Bereichen eingesetzt werden können oder mit Salzen interagieren oder konkurrieren können. Ohne die Aufnahme eines Datensatzes und die anschließende Bestimmung der Schweratompositionen ist es schwierig, die erfolgreiche Derivatisierung eines Kristalls zu beurteilen. Erste Hinweise auf eine Derivatisierung ist eine zu beobachtende Farbveränderung oder das Auftreten von Rissen im Kristall während der Behandlung mit der Schwermetall-Lösung. Eine sehr schnelle und effektive Methode stellt die Massenspektrometrie dar, mit deren Hilfe kovalent und nicht-kovalente Bindung von Schweratomen an das Protein untersucht werden können (Cohen 2000, Cohen 2001, Loo 1997). Eine alternative Methode zur Vorauswahl geeigneter Schwermetallreagenzien ist die native PAGE (Garman 2003). Dabei bedingt die Veränderung des Ladungszustandes des Proteins ein verändertes Laufverhalten im Gel und liefert so einen ersten Hinweis auf eine erfolgte Derivatisierung. Die Bindung von Schweratomen, die nicht zu einer Ladungsänderung im Protein führen, können mit dieser Methode nicht erfasst werden. Ein umfassender Überblick und weiterführende praktische Anleitungen sind bei Garman & Murray zusammengestellt (Garman 2003).

### 1.4.2 Phasierungsmethoden

Die dreidimensionale Struktur eines biologischen Makromoleküls lässt sich aus der Elektronendichte bestimmen. Diese enthält die Information über die Positionen der einzelnen Atome des Moleküls. Das Diffraktionsmuster und die Elektronendichte stehen dabei durch die Fouriertransformation in folgendem Zusammenhang:

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

Amplitude
Basisfunktion
Phase

Die Strukturfaktoramplituden lassen sich direkt aus den Diffraktionsdaten bestimmen und den Gitterpunkten  $hkl$  zuordnen. Die Phaseninformation hingegen geht verloren. Um diese Phaseninformation zu generieren, können unterschiedliche Methoden angewendet werden, die sich in beliebiger Form miteinander kombinieren lassen.

- Beim **isomorphen Ersatz** (MIR, SIR), werden zusätzlich zu den Diffraktionsdaten nativer Kristalle Datensätze von Kristallen benötigt, die mit Schweratomen derivatisiert wurden. Aus den isomorphen Differenzen zwischen den Strukturfaktoramplituden der nativen und der Derivatdaten lassen sich durch die Berechnung von Differenzpattersonfunktionen die Lagen der Schweratome bestimmen. Ausgehend von diesen Positionen können erste Phasen berechnet werden. Da für jeden Phasenwinkel zwei Lösungen möglich sind (Phasenambiguität), müssen meist zur eindeutigen Bestimmung der Phasenwinkel mehrere Derivate oder anomale Differenzen (SIRAS, MIRAS) verwendet werden. Die verwendeten Derivatkristalle müssen isomorph zu den

## 1 Einleitung

---

- nativen Kristallen sein, ansonsten kann diese Methode nicht angewendet werden.
- Beim **molekularen Ersatz** (MR) werden die ersten Phaseninformationen von strukturell ähnlichen Proteinen übernommen. Durch Patterson-Suchrechnungen muss das Modell in der Einheitszelle so orientiert werden, dass es der Lage des Moleküls mit der unbekannt Struktur entspricht. Bei einer Sequenzidentität von ~30% wird eine vergleichbare Faltung zweier Proteine angenommen; durch die Anwendung von *maximum likelihood* Algorithmen wurde die Methode in den letzten Jahren erheblich verbessert und kann auch in Fällen erfolgreich sein, in denen die Sequenzidentität noch geringer ist (~25%).
  - Mit den in der Kleinmolekülkristallographie eingesetzten **direkten Methoden** lassen sich unter Verwendung strukturinvarianter Phasenbeziehungen die Phasen direkt berechnen. Dafür ist eine hohe Überbestimmung der gemessenen Daten im Vergleich zu den zu bestimmenden Parametern notwendig, was erst bei atomaren Auflösungen erreicht wird. Aufgrund der zumeist geringeren Streufähigkeit von Proteinkristallen ist dies nur in sehr wenigen Fällen gegeben. Bislang lassen sich diese Methoden nur zur Strukturlösung sehr kleiner Proteine ( ~1000 Nicht-Wasserstoff-Atome) bei einer Auflösung unter 1Å anwenden (Mooers 2004). Sind zusätzlich Schweratome im Protein vorhanden, lassen sich mit diesen Methoden auch größere Strukturen lösen.
  - **Anomale Dispersion (SAD, MAD)** tritt bei Kristallen im Röntgenstrahl auf, wenn die Energie der Röntgenstrahlung in der Nähe der Absorptionskanten der im Protein vorhandenen anomalen Streuer liegt. Die atomaren, streuwinkelabhängigen Streufaktoren dieser Atome werden in diesen Fällen

durch den anomalen Beitrag modifiziert. Damit ergibt sich der atomare Streufaktor  $f$  als Summe aus dem wellenlängenunabhängigen, normalen Streufaktor ( $f_0$ ) und dem wellenlängenabhängigen, anomalen Streufaktor, der sich wiederum aus dem dispersiven ( $f'$ ) und dem Absorptionsanteil ( $f''$ ) zusammensetzt.

$$f = f_0 + f'(\lambda) + i f''(\lambda) \quad (2)$$

Aus den anomalen Beiträgen  $i f''(\lambda)$  resultieren die Bijvoet-Differenzen, so dass die Strukturfaktoramplituden der Friedel-Paare nicht länger identisch sind ( $F_{hkl} \neq F_{-h-k-l}$ ). Die dispersiven Differenzen führen zu Unterschieden zwischen Strukturfaktoramplituden in Datensätzen, die bei verschiedenen Wellenlängen gemessen wurden.

Das zur Verfügung stehende Spektrum der Röntgenstrahlung an durchstimmbaren Synchrotrons liegt zwischen 0.6-2Å. In diesem Wellenlängenbereich liegen die Absorptionskanten vieler Metalle. Zusätzlich können auch Nichtmetalle wie Selen oder Brom zur Detektion des anomalen Signals verwendet werden (Dauter 1999). Zur Strukturlösung kleiner Moleküle lassen sich auch die schwachen anomalen Streubeiträge des Schwefels (K-Kante: 5.016Å) unter Verwendung der Cu-K $_{\alpha}$ -Strahlung (1.54178Å) einsetzen (Yang 2001). Dabei hat sich in den letzten Jahren trotz der relativ geringen anomalen und dispersiven Streubeiträge ( $\Delta f'_{\max} = 7.5 e^-$  und  $\Delta f''_{\max} = 6.0 e^-$ , K-Kante: 0.979Å) die Verwendung von Selen durchgesetzt ( ). Der große Vorteil dieser Methode ist, dass hier keine Isomorphie zu den nativen Kristallen notwendig ist. Die Strukturlösung kann ausschließlich mit den Daten des Derivates durchgeführt werden, ohne dass Daten der nativen Kristalle vorhanden sind. Allerdings ist das anomale Signal im Vergleich zur isomorphen Differenz sehr klein und daher schwierig zu detektieren.

### 1.4.3 SAD-Phasierung

Das Potential des anomalen Signals bei einer Wellenlänge wurde bereits in den achtziger Jahren bei der Strukturlösung des Crambins erkannt (Hendrickson 1981). Darüber hinaus zeigte Wang durch Verwendung von simulierten Daten, dass das anomale Signal von zwei Schwefelatomen ausreichend für die Strukturlösung kleiner Proteine ist (Rice 2000). In den letzten Jahren wurden in mehreren Fällen Daten einer Wellenlänge dazu verwendet, Proteinstrukturen zu lösen, auch wenn das anomale Signal gering war (Rice 2000).

Unter dem Aspekt der Datensammelungsstrategie ist die SAD-Methode, bei der nur bei einer Wellenlänge Daten gemessen werden, gegenüber der MAD-Methode von Vorteil. Durch eine geringere Gesamtbelichtungszeit treten weniger Strahlenschäden im Kristall auf, die die Auswertung der Daten erschweren können, die vorhandene Messzeit kann effektiver genutzt werden, was im Hinblick auf Hochdurchsatz Messungen immer wichtiger wird und ein Messplatz mit modulierbarer Wellenlänge ist nicht unbedingt erforderlich. Es ist sogar möglich, dass anomale Signal des Schwefels an einer herkömmlichen Drehanode mit Cu-K $_{\alpha}$ -Strahlung zur Phasierung zu detektieren (Yang 2001).

Rein formal benötigt man zur eindeutigen Bestimmung der experimentellen Phase jedes Reflexes drei Messungen der Amplituden, vorausgesetzt, dass die Koordinaten des Modells, welches die Differenzen beschreibt, bestimmt werden kann. Im Falle des multiplen isomorphen Ersatzes werden die isomorphen Differenzen mehrerer Derivate, bei der MAD-Methode die Unterschiede der Strukturformfaktoren der anomalen Streuer bei verschiedenen Wellenlängen zur eindeutigen Bestimmung der experimentellen Phasen verwendet. Bei der SAD-Methode tritt weiterhin das Problem der Phasenambiguität auf.

Während im letzten Jahrzehnt der überwiegende Teil der *de novo* Strukturen mit der MAD-Technik gelöst wurde, setzt sich in den letzten Jahren immer mehr die

Verwendung der SAD-Methode durch (A. Popov, pers. Mitteilung). Das Gelingen der MAD-Phasierung ist stark von der angewendeten Datensammlungsstrategie abhängig. Untersuchungen belegen, dass ein Kristall während eines MAD-Experimentes deutliche Strahlungsschäden erkennen lässt, was an der Zunahme des Messfehlers ( $R_{\text{sym}}$ ) der einzelnen Datensätze zu erkennen ist (Rice 2000). Dieser Effekt wird durch die größere Verwendung von Röntgenstrahlung von Synchrotronen der dritten Generation noch mehr in den Vordergrund treten. Zudem ist häufig die zur Verfügung stehende Synchrotron-Messzeit begrenzt. Auch im Hinblick auf die immer populärerem high-throughput Strukturlösungen wird die Möglichkeit, interpretierbare Elektronendichtekarten aus einer geringeren Datenmenge zu erhalten, immer interessanter. Die erneute Auswertung der Messdaten bereits gelöster Strukturen (Rice 2000) hat gezeigt, dass in den meisten Fällen die Strukturlösung alleine unter Verwendung des *peak*-Datensatzes möglich war.

Formal besteht die Phasenbestimmung aus zwei unabhängigen Schritten. Zuerst müssen die Positionen der anomalen Streuer mit Hilfe von Patterson- oder direkten Suchmethoden aus den Bijvoet-Differenzen ermittelt werden. Sind diese Positionen bestimmt, muss die Substruktur verfeinert werden, um das Modell besser auf die gefundenen Differenzen anzugleichen. Gleichzeitig wird die Substruktur zur Berechnung der ersten Proteinphasen verwendet. Zusätzlich müssen die Fehler der Messung und des Modells berücksichtigt werden. Dies führt zur Verwendung von Wahrscheinlichkeitsverteilungen. Bei der SAD-Phasierung besteht zudem das bereits erwähnte Problem der Phasenambiguität. Bei einer Wellenlänge gesammelte Daten können nicht unimodale Phasen-Wahrscheinlichkeitsverteilungen liefern. Um die Phasenambiguität zu brechen, wurden zur Strukturlösung verschiedene Methoden eingesetzt. Die modernen Methoden verwenden sorgfältig gewichtete Wahrscheinlichkeiten, um die ersten Phasen und deren Genauigkeiten zu bestimmen (SHARP, MLPHARE ). Die aus SAD-Phasierungen erhaltenen Elektronendichtekarten sind qualitativ deutlich schlechter als solche aus MAD-Phasierungen. Nach Anwendung

## 1 Einleitung

---

von Dichtemodifikationen wie solvent-flipping oder Histogramm-Anpassung sind die erhaltenen Elektronendichtekarten denen aus MAD-Phasierungen vergleichbar. Die zusätzliche Verwendung von nicht-kristallographischen Symmetrien innerhalb der asymmetrischen Einheit kann darüber hinaus zur Verbesserung der Phasen beitragen (Rice 2000).

Die Entwicklungen auf dem Gebiet der Instrumente (Synchrotron Strahlung, CCD-Detektoren), der experimentellen Protokolle (Tieftemperaturmessungen, Verwendung von Se-Met-Mutanten, Derivatisierung mit Edelgasen) und im Besonderen der Weiterentwicklung der zur Verfügung stehenden Software (Lösung großer Substrukturen, maximum-likelihood Verfeinerung und Phasierung, Dichtemodifikation) tragen dazu bei, dass die SAD-Methode für eine schnelle und effektive Strukturlösung in den nächsten Jahren weiter an Bedeutung gewinnen wird ( Rice 2000).

### **1.5 Zielsetzung**

Die Aufgabenstellung der Arbeit war die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der L-Aminosäure Oxidase aus dem Bodenbakterium *Rhodococcus opacus*. Strukturell konnte bislang nur eine L-Aminosäure Oxidase aus dem Gift einer Schlange (*Calloselasma rhodostoma*) charakterisiert werden (Pawelek 2000). Aufgrund der Sequenzidentität von 23% wurde zur Strukturlösung auch die Methode des molekularen Ersatzes unter Verwendung des Schlangengiftenzym als Homologiemodell in Betracht gezogen. Die erste strukturelle Charakterisierung einer bakteriellen LAAO ist hinsichtlich der Faltung und Substratspezifität im Vergleich zu den enkaryontischen Enzymen interessant.

Zu Beginn der Arbeit waren die Expressionsbedingungen in *Rhodococcus opacus* und ein zwei- und dreistufiges Aufreinigungsschema für die L-Aminosäure Oxidase (roLAAO) bekannt (Geueke 2002). Zudem waren bereits mit Hilfe kommerzieller Screens (Jankarik

1991) Kristallisationsbedingungen gefunden und teilweise optimiert worden. Erste Diffraktionsmessungen bei Raumtemperatur zeigten allerdings nur ein unzureichendes Diffraktionsverhalten der Kristalle bis zu einer Auflösungsgrenze von  $\sim 8\text{\AA}$ .

Im Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (im Forschungszentrum Jülich) wurde die L-Aminosäureoxidase aus *Rhodococcus opacus* (DSM 43250) exprimiert (Geueke 2002). Die vom Nährmedium abgetrennten, gefrorenen Zellen wurden mir zur weiteren Verwendung zur Verfügung gestellt.

Nach erfolgreicher Strukturlösung konnten zusätzlich noch Substrat- und Inhibitor Komplexe der LAAO untersucht werden. Diese zusätzlichen Informationen tragen dazu bei, dass der für die LAAO (Pawelek 2000) wie für die DAAO (Mattevi 1996; Umhau 2000; Pollegioni 2002) postulierte Reaktionsmechanismus mit Hilfe dieser Strukturdaten abgesichert und beschrieben werden kann.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien, Geräte und EDV-Systeme

Die wichtigsten Materialien und Geräte sind in den Tabellen 2.1 bis 2.3 zusammengestellt.

**Tabelle 2.1:** Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Cryostream Cooler	Oxford Cryosystem, Oxford, England
<b>Drehanoden (Cu)</b>	
FR 591	Nonius, Delft, Niederlande
Rotaflex RU-200 B	Rigaku, Düsseldorf
<b>EDV-Systeme</b>	
Amilo D (3.1GHzPentium, 752Mb RAM) mit SUSE 9.0	Fujitsu-Siemens, München
Indigo, Octane und O2 mit Irix 6.5	Silicon Graphics, München
<b>Bildspeicherplatten</b>	
DIP-2030H	MAC Science, Yokohama, Japan
MAR 345	MAR Research, Norderstedt
FPLC-System	Pharmacia, Uppsala, Sweden
French Press Aminco mit FA-030	SLM-Instruments, Rochester, USA
<b>Massenspektrometer</b>	
ESI-MS LCQ (T)	Finnigan MAT, Bremen
MALDI-MS Biflex III (TOF)	Bruker, Bremen

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Mikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
<b>Monochromatoren</b>	
MAC-XOS Doppelspiegel	MAC Science, Yokohama, Japan
CMF12-38Cu6 double mirror	Osmic, Northwood, USA
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Phast Elektrophoresesystem	Pharmacia, Uppsala, Sweden
Spektralphotometer Ultrospec 2000	Pharmacia, Uppsala, Sweden
Spiegelreflexkamera EOS 500N	Canon, Tokyo, Japan
<b>Waagen</b>	
Analysenwaage FA-210-4	Faust, Köln
Laborwaage SBA 52	Scaltec, Heiligenstadt
<b>Zentrifugen</b>	
RC 3B Plus und RC 5B Plus	Sorvall, Newtown CT, USA
5417 C und 5810 R	Eppendorf, Hamburg

---

Tabelle 2.2: Sonstige Materialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Amicon Ultra	Millipore, Eschborn
Bradford Proteinassay	BioRad, München
capillary wax	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
Centricon-10 und -30	Millipore, Eschborn
Cryoloops und -werkzeuge	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
HighPrep 16/10 Q FF (20ml)	Amersham-Pharmacia, Uppsala, Sweden
HiPrep Phenyl FF (20ml)	Amersham-Pharmacia, Uppsala, Sweden
PhastGel Gradient 8-25%	Pharmacia, Uppsala, Sweden
Goniometerköpfe	Stoe, Darmstadt
	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
Linbroschalen	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
Quarzröhrchen	Hilgenfeld, Malsfeld
Zelluloseacetatfilter 0.2µm und 0.45µm	Sartorius, Göttingen

**Tabelle 2.3:** Computerprogramme

<b>Programm (-Paket)</b>	<b>Referenz</b>
<b>Auswertung von Röntgendaten</b>	
CCP4-suite	(Collaborative Computational Project 1994)
CNS-suite	(Bruenger 1998)
HKL-suite	(Otwinowski 1997)
SOLVE/RESOLVE	(Terwilliger 1999)
autoSHARP/SHARP	(Brigogne 2003)
ARP/wARP	(Perrakis 1997),(Perrakis 1999)
<b>Analyse von Röntgenstrukturen</b>	
CCP4/CCP4i-suite	(Collaborative Computational Project 1994)
DSSP	(Kabsch 1983)
<b>Darstellung von Proteinstrukturen und Elektronendichten</b>	
O	(Jones 1991)
BRAGI	(Schomburg 1998)
PYMOL	(DeLano Scientific LLC, San Carlos CA, USA)

---

## **2.2 Zellaufschluss, Chromatographie und Proteinanalytik**

### **2.2.1 Zellaufschluss und Chromatographie**

Für die Gewinnung der LAAO wurden *Rhodococcus opacus* Zellen von Frau Dr. Birgit Geueke (Institut für Enzymtechnologie, Universität zu Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert. Die Anzuchtbedingungen der Zellen sind bei Geueke & Hummel beschrieben (Geueke 2002).

Zur Isolierung des Proteins wurden die Zellen in 50mM TEA-Puffer, pH 7.0, unter Eiskühlung resuspendiert und in drei Durchgängen in der French Press bei 1500psi aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 14000rpm (Sorvall, SS 34 Rotor) 30 Minuten pelletiert und verworfen. Die Reinigung der LAAO erfolgte entsprechend der Literaturangaben (Geueke 2002) nach einem zweistufigen Protokoll.

Der erste Trennschritt, eine Ionenaustausch-Chromatographie, wurde an unserem Institut mit einer 20ml-Säule (*HighPrep 16/10 Q FF* (Amersham Pharmacia)) mit einer Flussrate von 5ml/min durchgeführt. Nach Equilibrieren der Säule mit Puffer A (50mM TEA pH 7.0) erfolgte die Auftrennung der Proteine durch Erhöhen des Gradienten von 0-40% Puffer B (50mM TEA pH 7.0; 1M NaCl ) innerhalb von 5 Säulenvolumina.

Als zweiter Trennschritt wurde eine hydrophobe Interaktions-Chromatographie mit einer *HiPrep Phenyl FF* (Amersham Pharmacia, 20ml) bei einer Flussrate von 5ml/min durchgeführt. Vor dem Auftragen auf die Säule wurde die Proteinlösung aus den vereinigten, aktiven Fraktionen mit einer 3M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  Lösung auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 750mM eingestellt. Ein linearer Gradient, indem die Konzentration des Puffers A (50mM TEA, 750mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7.0) durch die Zugabe

## 2 Material und Methoden

---

von Puffer B (50mM TEA pH 7.0) von 100% auf 50% innerhalb von 5 Säulenvolumina erniedrigt wurde, wurde für die Auftrennung der Proteine verwendet.

Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und die Proteinlösung mit Amicon-Ultra Filtriereinheiten mit einer Ausschlussgrenze von 30kDa in 50mM Glycin, pH 8.6, umgepuffert und konzentriert. Bis zum weiteren Gebrauch wurde die Proteinlösung aliquotiert bei 4°C gelagert.

### **2.2.2 Aktivitätstest**

Zur Detektion der aktiven Proteinfractionen wurde ein gekoppelter Enzym-Assay durchgeführt. Dazu wurden 400µl einer gesättigten o-Dianisidinlösung in 500mM TEA pH 7.6 mit 10µl Peroxidase (1000U/min), 100µl 100mM L-Alanin und 440µl Wasser versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50µl Probenlösung zugegeben. Bei Anwesenheit von LAAO in der Probenlösung erfolgte ein Farbumschlag von farblos zu orange.

## **2.3 Proteinanalytik**

### **2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Verfahren nach Bradford mit dem Kit von BioRad (München) verwendet. Dabei bilden Proteine mit dem Reagenz Coomassie Brilliant Blue einen farbigen Komplex, der bei einer Wellenlänge von 595nm absorbiert. Die Komplexbildung ist linear zur Proteinkonzentration. Die

Proteinkonzentration wird dabei aus einer mit Rinderserumalbumin bestimmten Eichgerade ermittelt.

### 2.3.2 Polyarylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für alle PAGE-Experimente wurde das Phast System von Pharmacia eingesetzt. Für SDS-PAGE wurden vorgefertigte Gradientengele mit einer Sammelgel- und einer Trenngelzone mit einem Acrylamidanteil von 8-25% verwendet. Proteinlösungen mit Konzentrationen zwischen 0.1-1mg/ml wurden mit dem Auftragspuffer (8ml Verdünnungspuffer, 1g SDS, 4mg Bromphenolblau, 2ml  $\beta$ -Mercaptoethanol ) in einem definierten Verhältnis gemischt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend scharf abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Trennung (Pharmacia Separation File No. 110) wurden die Proteinbanden durch eine sensitive Silberfärbung sichtbar gemacht (Pharmacia Development File No., 210). Der LMW-Marker (low molecular weight) der Firma Pharmacia wurde als Standard verwendet.

Bei der nativen PAGE wurden 1 $\mu$ l der Proteinlösung mit einer Konzentration von 0.1-1mg/ml auf ein Phast 8-25% Acrylamid Gradientengel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte nach dem Pharmacia Separation Technique File No. 210. Da bei der nativen PAGE das von der Größe und der Ladung abhängige Laufverhalten der Proteine sehr individuell ist, wurde hier kein Marker eingesetzt.

### 2.3.3 Massenspektrometrie

#### 2.3.3.1 MALDI-tof-MS

Eine Proteinlösung mit einer Konzentration von 100pmol/μl wurde gegen 0.1% Trifluoressigsäure dialysiert. 5μl davon wurden mit 15μl 0.1% Trifluoressigsäure und 30μl einer mit Sinapinsäure gesättigten 1:2 Acetonitril-Wasser-Lösung (v/v) gemischt. Auf den Spots des MALDI-Probenhalters wurden 0.5μl einer in Ethanol gesättigten Sinapinsäurelösung als Dünnschicht präpariert. Nach dem Trocknen der Dünnschicht wurden 0.5μl der Proteinlösung auf die Spots aufgebracht und getrocknet. Proben mit Rinderserumalbumin wurden in der gleichen Weise präpariert und als Standard verwendet. Bei der MALDI-MS (MALDI: matrix assisted LASER desorption ionization, (Karas 1988)) wird die Proteinprobe mit einem Überschuss an Matrixsubstanz (Sinapinsäure) kokristallisiert. Durch Bestrahlung der Probe mit LASER-Strahlung einer Wellenlänge im Bereich des Absorptionsmaximums der Matrixsubstanz wird die kokristallisierte Probe unter Hochvakuum in die Gasphase gerissen und anschließend in Abhängigkeit des Masse zu Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) in einem Flugzeitanalysator (TOF: time of flight) analysiert.

Um zu überprüfen, ob das Protein durch die Präparation zersetzt wird, wurde die Proteinlösung mit verschiedenen Säuren und der Matrix versetzt und die Proben anschließend mit SDS-PAGE untersucht.

- mit 0.1% TFA
- mit 0.1% Essigsäure

- mit 0.1% Ameisensäure
- mit 0.1% TFA + Sinapinsäure
- mit 0.1% Essigsäure + Sinapinsäure
- mit 0.1% Ameisensäure und Sinapinsäure

### **2.3.3.2 ESI-MS**

Für die ESI-MS ( ESI: electro spray ionization) wurde die Enzymlösung gegen ein 1:1 Methanol-Wasser-Gemisch mit 0.1% Essigsäure dialysiert. Für eine Messung werden ca. 100µl einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 10pmol/µl benötigt. Für die Untersuchung von Kristallen mit ESI-MS wurden diese mehrfach in 50% MPD, 0.1M HEPES pH 7.8 gewaschen und anschließend in 0.1% TFA gelöst.

## **2.4 Vorauswahl geeigneter Derivatisierungsreagenzien**

Zur Auswahl geeigneter Schwermetallkomponenten wurden mit Hilfe der nativen PAGE mehrere Voruntersuchungen durchgeführt. Basierend auf der beschriebenen Methode (Garman 2003) wurde die Proteinlösung mit den Schwermetall-Lösungen versetzt und 24 Stunden inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde eine zusätzliche Probe genommen. Die so erhaltenen Probelösungen wurden auf ein 8-25% Acrylamid Gradientengel aufgetragen und durch native PAGE aufgetrennt. Eine durch eine erfolgreiche Derivatisierung erfolgte Veränderung des Ladungszustandes des Proteins lässt sich durch Bandenverschiebung auf dem Gel im Vergleich zum nativen

Protein erkennen. Die gleiche Methode wurde auch mit in Wasser aufgelösten Kristallen angewendet, die vorher mit Schwermetall-Lösung inkubiert worden waren.

### **2.5 Kristallisation**

Für die Kristallisation wurde die Proteinlösung auf Konzentrationen zwischen 10-20mg/ml konzentriert und mit Amicon Ultra-Röhrchen durch Zentrifugieren filtriert. Die Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode mit sitzenden oder hängenden Tropfen in Linbro-Platten mit Polystyrol- oder Polypropylenbrücken oder siliconisierten Glasdeckgläschen durchgeführt. Die Kristallisationstropfen wurden aus Proteinlösung, Reservoirlösung und gegebenenfalls Additiven oder Detergentien gemischt. Das Volumen der Tropfen variierte zwischen 2-4 $\mu$ l. Die Platten wurden bei 12°C gelagert. Die Ergebnisse wurden regelmäßig unter einem Stereomikroskop beobachtet und dokumentiert. Bei der Definition der Kristallisationsbedingung werden grundsätzlich die Zusammensetzungen der Reservoirlösungen angegeben. Die Komponenten des Proteinpuffers werden vernachlässigt. Zur Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen wurden die kommerziell erhältlichen Screens der Firmen Hampton Research und Jena Bioscience verwendet. Diese sind nach der Strategie der unvollständigen faktoriellen Suche (sparse matrix screens) nach Jancarik und Kim (Jancarik, 1991) zusammengestellt. Die Reservoire wurden alle per Hand pipettiert und gemischt. Die gefundenen Kristallisationsbedingungen wurden durch die systematische Variation der verschiedenen Parameter wie Konzentration der Komponenten, pH-Wert, Temperatur optimiert.

### **2.5.1 Impfkristallisation**

Für die Impfkristallisation (microseeding) wurden Proteinkristalle im Tropfen mit einer Nadel zerstört und 1µl der Kristallsplitter in 200µl einer Stabilisierungslösung überführt, die der Zusammensetzung des Reservoirs entsprach. Falls notwendig, wurde diese Lösung vor der Verwendung weiter verdünnt. Für die Kristallisationsansätze wurde die Fällungsmittelkonzentration soweit erniedrigt, dass es nicht mehr zu einer spontanen Kristallisation kam. Nach einer Inkubation der Kristallisationsansätze von 3 Tagen, wurden die Tropfen mit 0.5µl der verdünnten Impflösung versetzt.

### **2.5.2 Schwermetall-Derivatisierung**

Da die Kristalle der LAAO häufig auf dem Boden der Microbrücken hafteten, musste zuerst vorsichtig mit einer Nadel in der Nähe der Kristalle in die Brücke gestochen werden, um die Kristalle von der Brücke zu lösen. Zur Derivatisierung wurden die P<sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub>-Kristalle zuerst in eine Stabilisierungslösung überführt, die 120mM HEPES pH 7.8, 12% PEG 4000 und 12% Isopropanol enthielt. Das Schwermetallreagenz wurde zunächst in Wasser gelöst und daraus eine gesättigte Lösung im Stabilisierungspuffer hergestellt, die als Ausgangslösung für eine Verdünnungsreihe diente. Der zu derivatisierende Kristall wurde mit einer Pipette in 1µl Stabilisierungspuffer in 9µl der entsprechend verdünnten Lösung des Schwermetallreagenzes überführt. Der Ansatz wurde luftdicht verschlossen und über einen bestimmten Zeitraum inkubiert.

Alternativ wurden Kokristallisationsexperimente mit verschiedenen Schwermetallreagenzien durchgeführt. Dabei setzte sich der Tropfen zu gleichen Teile aus mit Schwermetallreagenz versetzter Reservoirlösung und Proteinlösung zusammen.

### **2.5.3 Substrat-Enzym-Komplexe**

Zur Herstellung von Protein-Substrat Komplexen wurden native, primitiv orthorhombische Kristalle in gesättigte Lösungen von L-Alanin oder L-Phenylalanin in Stabilisierungspuffer überführt und bis zur vollständigen Entfärbung inkubiert und nach Überführen in die Cryolösungen, die 10mM des Substrates (L-Alanin oder L-Phenylalanin) enthielten, bei 100K eingefroren. Zusätzlich wurden native, primitiv orthorhombische Kristalle in 5-15% Cryolösung gesoakt, anschließend in eine mit L-Anthranilsäure gesättigte Cryolösung mit 20% MPD überführt und für 30 Minuten inkubiert. Diese Kristalle wurden ebenfalls bei 100K tiefgefroren.

## **2.6 Röntgendiffraktometrie**

### **2.6.1 Kristallmontage und Diffraktionsmessungen**

Für die Tieftemperaturmessungen wurden die primitiv orthorhombischen Kristalle sequenziell in Lösungen des Stabilisierungspuffers mit zunehmendem MPD-Anteil (5-20%) überführt. Die Kristalle wurden mit einem Nylonloop aus dem Tropfen gefischt, in flüssigen Stickstoff getaucht und dort bis zur Messung gelagert. Im Falle der zentriert orthorhombischen Kristalle konnten die Kristalle direkt aus dem Tropfen montiert und eingefroren werden, da die Kristallisationslösung bereits eine geeignete Cryolösung darstellt. Für die Messung wurde der Kristall in dem Nylonloop mit Hilfe einer Cryozange auf den Goniometerkopf aufgesetzt und so justiert, dass er zu jedem Zeitpunkt der Messung in der Strahlebene lag.

Die Kristalle der roLAAO wurden mit den am Institut zur Verfügung stehenden Drehanoden mit Cu-K<sub>α</sub>-Strahlung bei 100K vermessen.

Von ausgewählten Kristallen wurden Datensätze unter Verwendung von Synchrotronstrahlung an der Außenstation des EMBL in Hamburg und an den Strahlquellen der PSF (protein structure factory) am BESSY in Berlin bei 100K gemessen. Die Röntgenmessplätze am Institut und am EMBL waren mit Cryostream Cooler 600 Cryoanlagen von Oxford Cryo Systems, Oxford, England ausgerüstet. Am PSF wurde das Cryo Cool 328 System von Cryo-Industries of America, Manchester NH, USA verwendet. Weitere Details zur Ausstattung der Synchrotron Messplätze sind auf den entsprechenden Internetseiten ([www.embl-hamburg.de/px/px\\_beamlines.html](http://www.embl-hamburg.de/px/px_beamlines.html), [www.psf.bessy.de/userguide/beamlines/](http://www.psf.bessy.de/userguide/beamlines/)) zu finden.

### **2.6.2 Diffractionsexperimente mit nativen Kristallen**

#### **2.6.2.1 Nativer Datensatz der roLAAO in der Raumgruppe $P2_12_12_1$**

Der hochauflösende Datensatz der nativen roLAAO der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  wurde an der EMBL-Außenstation am DORIS-Speicherring des DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron) in Hamburg am Messplatz X13 gemessen. Der Messplatz ist mit einem MAR CCD-Detektor mit 165 mm Durchmesser ausgerüstet. Zur Vermeidung von gesättigten Reflexen in den Bereichen niedriger Auflösung wurden zwei Datensätze des Kristalls bei unterschiedlicher Auflösung aufgenommen. Die Messparameter sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 2.4:** Messparameter nativer Datensatz, P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>

höchste Auflösung [Å]	2.0	1.2
Wellenlänge [Å]	0.81	0.81
Kristall-Detektor [mm]	347.9	100
Rotation pro Bild [°]	1.04	0.5
Anzahl Bilder	100	277
Gesamtrotation	2-144.8°	2-210°

### 2.6.2.2 Nativer Datensatz der LAAO in der Raumgruppe C222<sub>1</sub>

Der hochauflösende Datensätze der nativen roLAAO der Raumgruppe C222<sub>1</sub> wurde an der EMBL-Außenstation am DORIS-Speicherring des DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron) in Hamburg an den Messplätzen X11 und X13 gemessen. Alle Teildatensätze wurden von einem Kristall aufgenommen. Die Messplätze sind mit MAR CCD-Detektoren mit 165 mm Durchmesser ausgerüstet. Die Messparameter sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 2.5:** Messparameter nativer Datensatz, C222<sub>1</sub>

Messplatz	X11	X11	X11	X13
höchste Auflösung [Å]	1.3	1.3	1.2	1.6
Wellenlänge [Å]	0.8041	0.81	0.81	0.8
Kristall-Detektor [mm]	110	110	130	150
Rotation pro Bild [°]	0.5	0.2	0.2	0.05
Anzahl Bilder	58	34	317	1500
Gesamtrotation	0-29	29-36.14	36.14-99.54	78-153

## **2.6.3 Diffraktionsexperimente mit derivatisierten Kristallen**

### **2.6.3.1 Auswahl geeigneter Derivate mit Röntgendiffraktion**

Die Derivatisierung erfolgte ausschließlich mit Kristallen der Raumgruppe  $P2_12_12_1$ . Zur Auswahl geeigneter Schwermetallderivate der LAAO wurden Diffraktionsexperimente dieser Kristalle an beiden Institutsanlagen durchgeführt. Da bei Verwendung von  $\text{Cu-K}_\alpha$ -Strahlung kein anomales Signal detektiert werden kann, muss zur Beurteilung der Qualität eines potentiellen Derivates die Methode des isomorphen Ersatzes angewandt werden (SIR). Eine Strukturaufklärung ist mit dieser Methode nur in den seltensten Fällen möglich, sie kann aber durchaus zur Auswahl geeigneter Derivate für eine spätere Messung am Synchrotron dienen, bei der durch geeignete Wahl der Wellenlängen das anomale Signal detektiert werden kann. Neben Datensätzen der potentiellen Derivate werden für die erste Beurteilung der Derivate auch Datensätze des nativen Proteins benötigt. An beiden Instituts-Messplätzen wurden daher Datensätze der nativen Kristalle der primitiv orthorhombischen Kristalle und Datensätze der potentiellen Derivatkristalle aufgenommen.

### **2.6.3.2 Datensätze des Quecksilberchlorid-Derivates**

An den Synchrotronmessplätzen wurden von einem mit Quecksilberchlorid derivatisierte Kristalle ein MAD-Datensatz an der PSF in Berlin bei drei Wellenlängen und ein SAD-Datensatz am EMBL in Hamburg aufgenommen.

## 2 Material und Methoden

---

- 3 Wellenlängen MAD-Datensatz, PSF Berlin:

Am BL2 Messplatz der PSF am BESSY (Berliner Synchrotron) wurde ein MAD-Datensatz des Quecksilberchloridderivates gemessen. An diesem Messplatz ist die Wellenlänge modulierbar und der Messplatz ist mit einem MAR 345 Bildspeicherplatten-Detektor ausgerüstet. Zu Beginn des Experiments wurde zur Bestimmung der drei geeigneten Wellenlängen ein Röntgenfluoreszenzspektrum des Hg-Derivat-Kristalls aufgenommen. Die Messwellenlängen wurden per visueller Inspektion des Spektrums festgelegt. Die drei Datensätze wurden in der Reihenfolge *high energy remote*, *peak* und *inflection*-Wellenlänge von einem Kristall gemessen. Strahlenschäden waren trotz der intensiven Synchrotronstrahlung im Verlauf der Messung, die insgesamt etwa 12 Stunden dauerte, nicht feststellbar. Die Messparameter sind in Tabelle 2.6 zusammengestellt.

**Tabelle 2.6:** Messparameter MAD-Datensatz, HgCl<sub>2</sub>-Derivat

	<b>peak</b>	<b>inflection</b>	<b>remote</b>
höchste Auflösung [Å]	2.25	2.25	2.0
Wellenlänge [Å]	1.0086	1.00952	0.9311
Kristall-Detektor [mm]	200	200	200
Rotation pro Bild [°]	1	1	1
Anzahl Bilder	360	200	195
Gesamtrotation [°]	360	200	195

- SAD-Datensatz, EMBL Hamburg:

Am X31 Messplatz der EMBL-Außenstation am DESY in Hamburg wurde ein Datensatz des Quecksilberchloridderivates gemessen. An diesem Messplatz ist die Wellenlänge modulierbar und der Messplatz ist mit einem MAR 345 Bildspeicherplatten-Detektor ausgerüstet. Zu Beginn des Experiments wurde zur

Bestimmung der geeigneten Wellenlängen ein Röntgenfluoreszenzspektrum des Hg-Derivat-Kristalls aufgenommen. Da das Spektrum kein wellenlängenabhängiges anomales Signal des Hg-Derivat-Kristalles zeigte, wurde ein Datensatz bei der theoretischen *peak*-Wellenlänge des Quecksilbers aufgenommen. Während der 18-stündigen Messung wurden keine Strahlungsschäden durch die intensive Synchrotronstrahlung festgestellt. Die beste Datensammelungsstrategie wurde mit dem Programm BEST (Popov 2003) bestimmt. Die Messparameter sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 2.7:** Messparameter SAD-Datensatz, HgCl<sub>2</sub>-Derivat

höchste Auflösung [Å]	2.45
Wellenlänge [Å]	1.008
Kristall-Detektor [mm]	380.27
Rotation pro Bild [°]	1.12
Anzahl Bilder	372
Gesamtrotation	0-360°,0-56.64°

#### 2.6.4 Datensätze der roLAAO mit Substraten und Inhibitor

Am BL2 Messplatz der PSF am BESSY (Berliner Synchrotron) wurde je ein Datensatz eines Kristalls der LAAO im Komplex mit L-Alanin, L-Phenylalanin und Anthranilsäure (o-Aminobenzoat) aufgenommen. Der Messplatz ist mit einem MAR 345 Bildspeicherplatten-Detektor ausgerüstet. Die Messparameter sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

**Tabelle 2.8:** Messparameter der Komplex-Datensätze, P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>

	LAAO-Ala	LAAO-Phe	LAAO-AB
höchste Auflösung [Å]	1.45	1.45	1.45
Wellenlänge [Å]	0.9195	0.9195	0.9195
Kristall-Detektor [mm]	250	250	250
Rotation pro Bild [°]	1	1	1
Anzahl Bilder	167	107	114
Gesamtrotation	167	107	114

### 2.7 Datenreduktion

Alle Datensätze wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK aus dem HKL-Programmpaket (Otwinowski 1997) indiziert, prozessiert und skaliert. Bei der Reduktion der anomalen Daten wurde für die weiteren Rechnungen mit SOLVE ((Terwilliger 1999), (Terwilliger 2002)), CNS (Bruenger 1998) und autoSHARP (Bricogne 2003) mit den Optionen *anomalous* und *no merge original index* skaliert. In SOLVE ist ein lokaler Skalierungsalgorithmus, der symmetrieverwandte Reflexe zusammenfasst, implementiert. In dem Programmpaket autoSHARP wird diese Skalierung mit dem Programm SCALA aus dem CCP4-Programmpaket (Collaborative Computational Project 1994) durchgeführt; CNS verfügt ebenfalls über ein entsprechendes Programm zur lokalen Skalierung der Daten.

Die Strukturfaktoramplituden wurden bei allen Datensätzen mit TRUNCATE (CCP4, (Collaborative Computational Project 1994)) aus den gemessenen Intensitäten berechnet. Zur Berechnung des freien R-Wertes wurden 5% der gemessenen Reflexe mit UNIQUE (CCP4, (Collaborative Computational Project 1994)) zufällig ausgewählt. Für beide Kristallformen wurde die Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit und die Packungsdichte im Kristall mit MATTHEWS\_COEFF (CCP4, (Collaborative

Computational Project 1994)) abgeschätzt. Die Selbstrotationsfunktion wurde mit GLRF (Tong 1997), native und Differenzpattersonfunktionen mit FFT (CCP4, (Collaborative Computational Project 1994) ) berechnet.

### 2.7.1 Detektion isomorpher Schweratomderivate

Aus jedem Datensatz eines potentiellen Schweratomderivates wurde mit den automatischen Suchroutinen in SOLVE die Schweratomsstruktur mit der SIR-Methode durch Verwendung der isomorphen Differenzen zwischen Derivat- und nativen Daten bestimmt. Die Bewertung der Güte eines Derivates erfolgt in SOLVE anhand von vier Kriterien. Es werden die Pattersonfunktion, die Kreuz-Validierungs-Fourierfunktion und die native Fourierfunktion berücksichtigt. Ebenso wird der *figure of merit*, der eine Abschätzung der Intensität des Phasierungssignals der Derivates angibt, zur Bewertung verwendet. Die Besetzung der gefundenen Schweratompositionen und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in Datensätzen mehrerer gleichbehandelter Kristalle wurden ebenfalls als Kriterium herangezogen.

### 2.7.2 Phasierung des HgCl<sub>2</sub>-Derivates (MAD)

Zur Ermittlung der Quecksilber-Substruktur und zur Phasierung wurde im Falle der MAD-Datensätze das automatische Programm SOLVE verwendet. Dabei wurden auch die Ergebnisse der SIR-Phasierung mit einbezogen. Ebenso wurde der peak-Datensatz als SAD-Fall ausgewertet. Alternativ erfolgte eine Auswertung der MAD-Datensätze mit Programmen des Programmpaketes CNS. Da diese Auswertung nicht zur Strukturlösung genutzt werden konnte, wird im Weiteren auf eine ausführlichere Beschreibung der Auswertung verzichtet.

### 2.7.3 SAD-Phasierung des Hg-Derivates - Detektion der Substruktur

Die Hg-Substruktur der mit Quecksilberchlorid derivatisierten roLAAO wurde unabhängig voneinander mit autoSHARP (Brigogne 2003), SOLVE ((Terwilliger 1999), (Terwilliger 2002)) und SHELXD (Sheldrick 1990) gelöst.

Für die weiteren Schritte der Strukturlösung wurde das Programmpaket autoSHARP (Bricogne 2003) eingesetzt.

Für die Suche und Verfeinerung der Hg-Positionen wurden Daten bis zu einer Auflösungsgrenze von 2.7Å verwendet. Aus den verfeinerten Hg-Positionen wurden die ersten experimentellen Phasen berechnet. Diese dienten als Grundlage zur Berechnung erster Elektronendichten, die automatisch bewertet wurden. Anschließend erfolgte ein zweiter Verfeinerungslauf für die Schweratompositionen und die Phasen.

### 2.7.4 Dichtemodifikation, Modellbau und Verfeinerung

Für die Strukturlösung der LAAO wurden die Rechnungen zur Dichtemodifikation mit dem Programm SOLOMON (CCP4, (Collaborative Computational Project 1994)) innerhalb des automatischen Skriptes in autoSHARP (Brigogne 2003) durchgeführt. Auf die Verwendung der nicht kristallographischen Symmetrie des Dimers zur Verbesserung der Elektronendichten wurde verzichtet. Während der Dichtemodifikation wurde eine Phasenerweiterung auf 2.45Å (Auflösungsgrenze des SAD-Datensatzes) durchgeführt. Ebenfall in autoSHARP integriert, wurde ein erster Modellbauzyklus mit ARP/wARP ((Perrakis 1999), (Lamzin 2003)) durchgeführt, bei dem mit dem *warpNtrace-Modus* ein Hybrid-Proteinmodell erzeugt wurde.

Die mit autoSHARP ermittelten Phasen wurden mit den nativen Strukturfaktoramplituden zusammengefasst. Mit dem Programm DM (CCP4, (Collaborative Computational Project 1994)) wurde eine sukzessive Phasenerweiterung auf 2.0Å durchgeführt. Das in

autoSHARP erhaltene Modell diente als Startmodell für einen weiteren Modellbauzyklus mit ARP/wARP, bei dem der *phased protocol* Modus verwendet wurde. Mit dem *sidedock*-Modus wurde dann die Sequenz in das Hybrid-Modell gelegt (side chain docking), nachdem die im Modell vorhandenen Ketten A-G durch Betrachtung in O (Jones 1991) zwei Monomeren zugeordnet worden waren.

Im Folgenden wurde in abwechselnden Zyklen von manuellem Modellbau in O (Jones 1991) und Verfeinerungsrechnungen in REFMAC5 (CCP4, (Collaborative Computational Project 1994) das Modell unter Verwendung der nativen Daten bis 2.0Å verfeinert. Das so erhaltene Modell wurde zur Verfeinerung des Datensatzes bis 1.4Å verwendet. Der automatische Wassereinbau erfolgte durch Verwendung des entsprechenden Modus in ARP/wARP. Während der nachfolgenden Verfeinerungsrunden wurden die Beiträge von Wasserstoffatomen berücksichtigt und die B-Faktoren anisotrop verfeinert.

### **2.7.5 Molekularer Ersatz zur Strukturlösung der C222<sub>1</sub>-LAAO**

Das Modell der LAAO für die primitiv orthorhombischen Kristalle wurde als Suchmodell für den molekularen Ersatz für die zentriert orthorhombischen Kristalle verwendet. Der molekulare Ersatz wurde mit dem Programm PHASER in CCP4 (Collaborative Computational Project 1994) durchgeführt; die anschließenden Verfeinerungsrechnungen wurden mit REFMAC5 aus der CCP4-Suite oder mit Programmen des CNS-Programmpaketes (Bruenger 1998) berechnet.

Die Berechnungen für eine mögliche Verzwilligung des als zentriert orthorhombischen bezeichneten Kristalls wurden in CNS (Bruenger 1998) durchgeführt.

### **2.7.6 Enzym-Komplexe mit Substrat und Inhibitor**

Zur Strukturlösung der Komplexe wurde das Strukturmodell der nativen roLAAO ohne FAD bis 1.4Å zur Verfeinerung mit REFMAC5 verwendet. Nach 25 Verfeinerungsrunden wurde das FAD in 20 weiteren Zyklen in das Strukturmodell integriert. Dabei wurden die Koordinaten für die Atome des Isoalloxozinringes für die oxidierte und reduzierte Form des Cofaktors aus der Kleinmoleküldatenbank (CDS, Allen 2002) übernommen. Die planaren Zwänge des Isoalloxozinringes wurden dann in 10 Zyklen verringert, um die Biegung des Isoalloxozinringes zu erlauben. Anschließend wurden mit der entsprechenden Routine aus wARP/ARP Wassermoleküle eingebaut und die Substrate und das Inhibitormolekül in die Elektronendichte gelegt. Die vollständigen Strukturmodell wurden anschließend noch anisotrop in 20 Zyklen verfeinert.

### **2.8 Validierung der Modelle**

Während des Modellbaus und der Verfeinerung wurden die Modelle ständig mit PROCHECK und SFCHECK (CCP4, (Collaborative Computational Project 1994) und den Validierungsroutinen der verwendeten Verfeinerungsprogramme auf ihre stereochemische Validität überprüft. Die Sekundärstrukturelemente wurden mit DSSP (Kabsch 1983) bestimmt, die B-Faktoren des Modells mit dem Programm BAVERAGE (CCP4, (Collaborative Computational Project 1994)) bewertet; Kontaktflächen des Dimers wurden in CNS berechnet. Die Abweichung des Isoalloxozinringes von der Planarität wurde mit dem Programm PRINCIP (Laskowski 1995) berechnet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zellaufschluss, Chromatographie und Proteinanalytik

#### 3.1.1 Zellaufschluss, Chromatographie

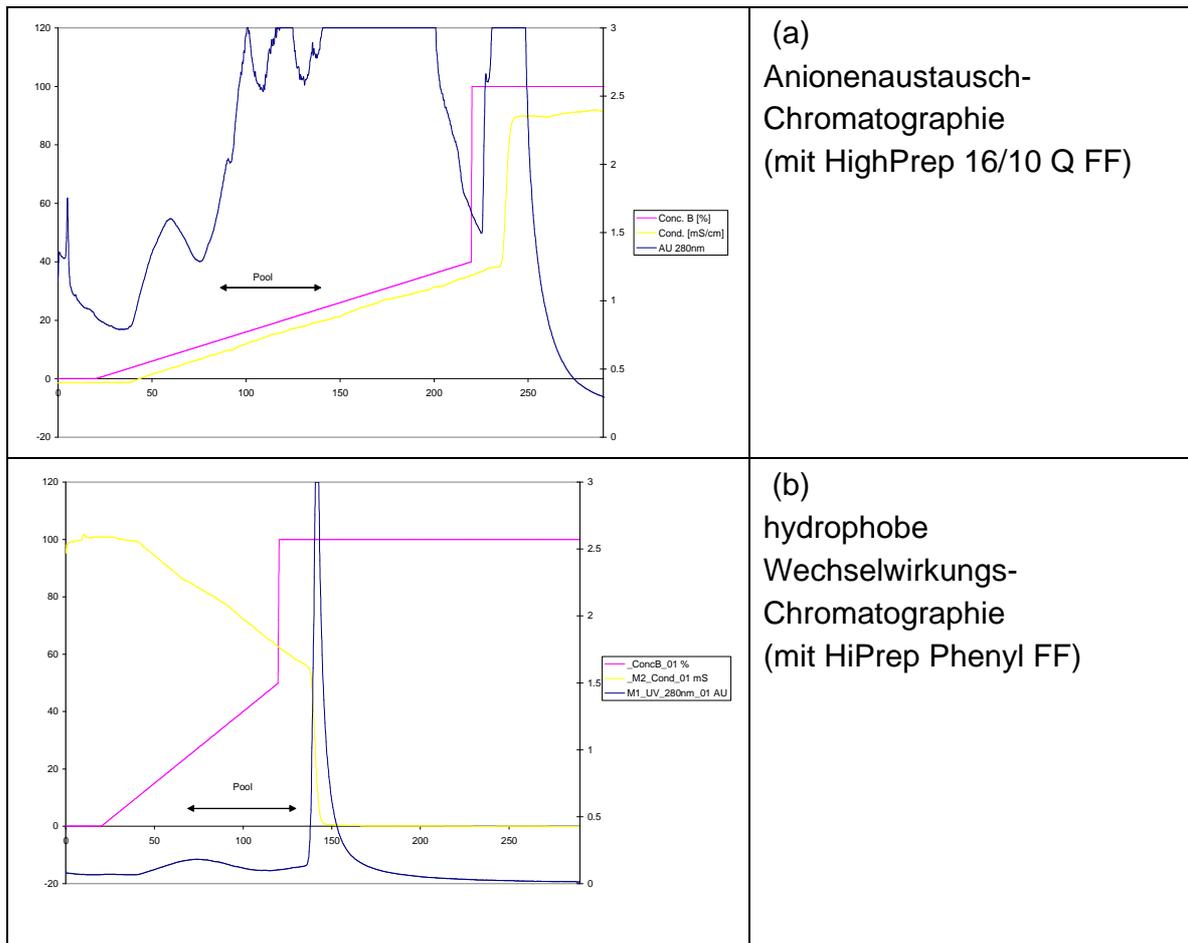
Die Ausbeute gereinigter LAAO aus 10g gefrorenem Zellmaterial ist in nachfolgender Tabelle zusammengestellt:

**Tabelle 3.1:** Ausbeute Protein nach den Chromatographieschritten. Es sind die Proteinkonzentration, das Volumen der Proteinlösungen und die Gesamtmenge Protein angegeben.

	<b>Konz.</b> <b>[mg/ml]</b>	<b>Vol.</b> <b>[ml]</b>	<b>Menge</b> <b>[mg]</b>
<b>Rohlysat</b>	1.15	200	230
<b>Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie</b>	0.387	48	18.58
<b>Fraktionen nach hydrophober Wechselwirkungschromatographie</b>	0.087	48	4.18

Die Chromatogramme der beiden Chromatographieschritte sind in Abbildung 3.1 (a) und (b) dargestellt.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.1:** Chromatogramme der LAAO, in denen die Absorbanz bei 280nm und die Leitfähigkeit gegen das Elutionsvolumen aufgetragen sind. Die aktiven Fraktionen, die für die weiteren Schritte vereinigt wurden, sind markiert.

Die LAAO-Aktivität wurde über die Wasserstoffperoxidbildung mit einem gekoppelten Enzymtest gemessen. Die durch die Peroxidase aus Meerrettich katalysierte Farbstoffbildung aus  $H_2O_2$  und o-Dianisidin lässt sich photometrisch bei 450nm und  $30^\circ C$  quantifizieren. Allerdings wird diese Reaktion durch ebenfalls im Proteingemisch enthaltene Katalase, die das entstandene Wasserstoffperoxid umsetzt, gestört. Zur Detektion der aktiven Fraktionen wurde nur der erfolgte Farbumschlag von farblos nach orange qualitativ genutzt. Nach den beiden Reinigungsschritten wurde die roLAAO in ausreichender Menge mit einer hohen Reinheit erhalten. Auf eine weitere Optimierung der Ausbeute wurde verzichtet.

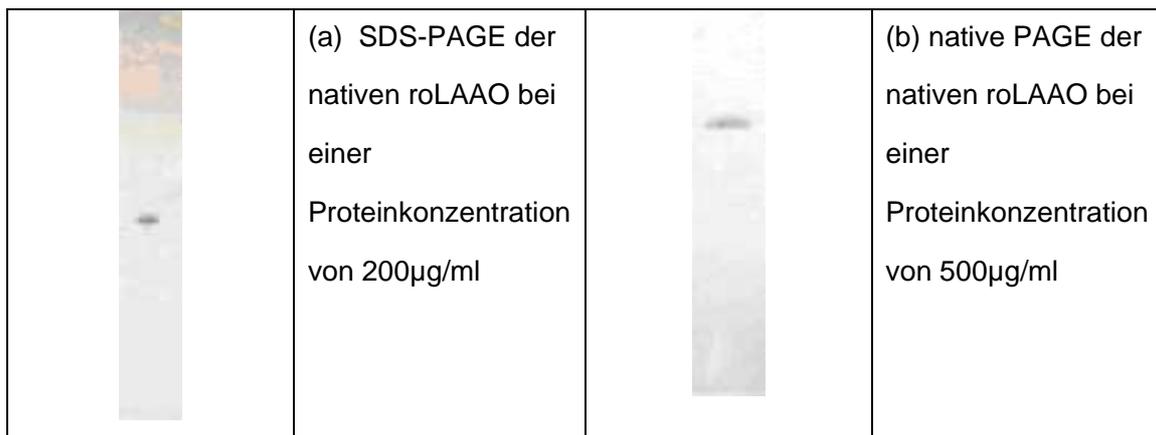
Die SDS-PAGE Gele in Abbildung 3.2 zeigen die Reinigung der LAAO während der beiden Chromatographieschritte. Die einzelnen aktiven Fraktionen der LAAO nach dem zweiten Trennschritt sowie die vereinigten Fraktionen zeigen die homogene Reinigung des Proteins.



**Abbildung 3.2:** Ergebnisse der SDS-PAGE der untersuchten Fraktionen nach beiden Säulenläufen

### 3.1.2 Proteinanalytik

#### 3.1.2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese



**Abbildung 3.3:** Ergebnis der SDS-PAGE (a) und der nativen PAGE (b) der gereinigten LAAO nach zwei Chromatographieschritten.

Wie aus Abbildung 3.3 zu erkennen, liegt die roLAAO nach zwei Chromatographieschritten ohne Verunreinigungen durch Fremdproteine vor.

#### 3.1.2.2 Massenspektrometrische Charakterisierung

Das MALDI-tof-MS Spektrum der LAAO zeigt neben einem sehr kleinen Peak bei der Monomermasse hauptsächlich Fragmentpeaks in einem Massenbereich zwischen 5-10 kDa. Mehrere Messungen führten zum gleichen Ergebnis.

Daher wurde mit Hilfe der SDS-PAGE überprüft, ob die Zugabe von Säuren oder Matrix das Protein zerstört. Wie Abbildung 3.4 zeigt, ist bei allen untersuchten Bedingungen

das Protein intakt und wird wahrscheinlich durch den Ionisationsprozess zerstört. Daher konnte diese Methode zur Untersuchung der roLAAO nicht verwendet werden.

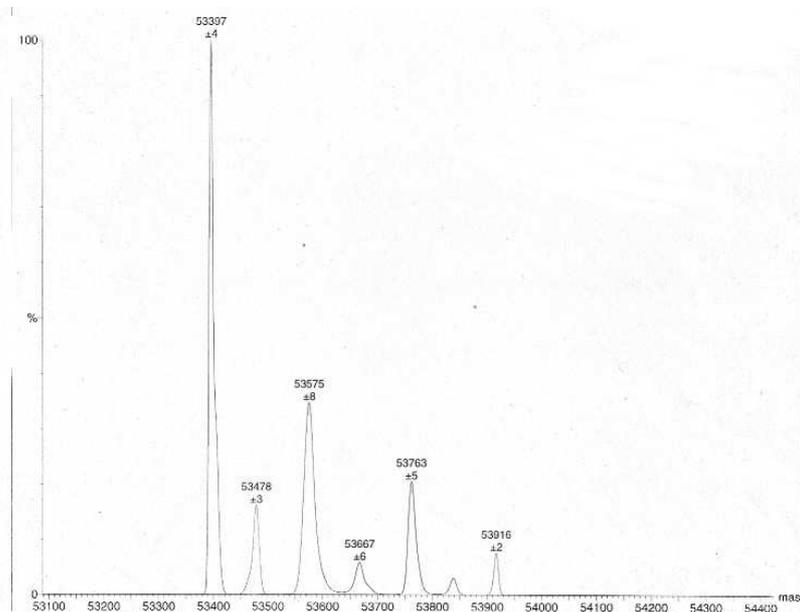


**Abbildung 3.4:** SDS-PAGE der für die MALDI-tof-MS vorbereiteten Proben

Mit ESI-Massenspektroskopie war es möglich, das Protein zu detektieren, wie die Spektren der nachfolgenden Abbildung belegen. Zur Aufnahme des Spektrums wurde die gleiche Proteinprobe (100pm/μl; mit/ohne 0.1% TFA) wie für die Untersuchung mit MALDI-tof-MS verwendet.

### 3 Ergebnisse

---



**Abbildung 3.5:** dekonvolviertes ESI-MS-Spektrum der gereinigten LAAO im Masse/Ladungsbereich von 53.1-54.4kDa

Nach Dekonvolvierung der Spektren ergab sich die berechnete molekulare Masse (ohne den nicht-kovalent gebundenen FAD-Cofaktor) der LAAO in Lösung von 53397Da und in aufgelösten Kristallen von 53378 Da. Die theoretisch anhand der Aminosäuresequenz berechnete Masse beträgt 53348 Da. Das beim *peptide mass mapping* erhaltene Profil zeigte wie das ESI-MS-Spektrum die hohe Mikroheterogenität der LAAO, sodass eine sinnvolle Zuweisung der Fragmente zur Aminosäuresequenz mit Standardmethoden nicht durchgeführt werden konnte. Daher konnte diese Methode im Weiteren nicht zur Untersuchung von Derivaten benutzt werden.

## 3.2 Kristallisation

Zu Beginn der Arbeit war bereits eine erste Suche nach Kristallisationsbedingungen mit den kommerziell erhältlichen *sparse matrix screens* (Crystal screen I und II, Hampton Research) erfolgreich durchgeführt worden. Es wurden bei verschiedenen Bedingungen Kristalle erhalten. Einige dieser ersten Kristallisationsbedingungen wurden bereits hinsichtlich des pH-Wertes des Puffers und der Fällungsmittelkonzentrationen optimiert. Diese Kristallisationsbedingungen konnten im Rahmen dieser Arbeit reproduziert und weiter optimiert werden. Eine Kristallisationsbedingung wurde für die weiteren Arbeitsschritte ausgewählt.

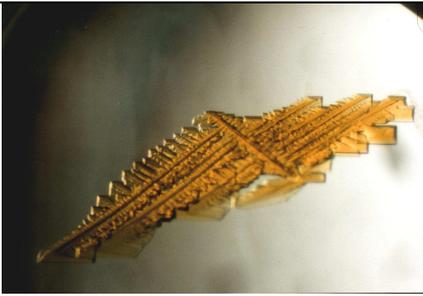
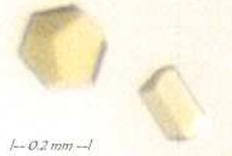
### 3.2.1 Kristalle der Raumgruppe $P2_12_12_1$

Die ursprüngliche Fällungsmittellösung bestand aus 100mM HEPES pH 7.5, 10% Isopropanol und 20% (w/w) PEG 4000. Damit wurden große, flächige Cluster aus vielen, zusammengewachsenen Einkristallen erhalten (Abb. 3.6 (a)). Zur Verbesserung der Kristallisationsbedingungen wurde die Zugabe von Detergentien getestet. Mit dem Detergenz Cymal-5® konnten Einkristalle erhalten werden. Die nur schwach gelb gefärbten Kristalle waren mechanisch sehr instabil, was aufgrund der Farbe auf einen hohen Lösungsmittelanteil zurückgeführt werden konnte. Die Kristalle lösten sich in den Tropfen nach mehreren Tagen auf und waren für die Diffraktionsmessungen nicht zu verwenden (Abb. 3.6 (c)). Für alle Kristallisationsbedingungen der primitiv orthorhombischen Kristallform war die Methode der Impfkristallisation am erfolgreichsten. Die optimierte Fällungsmittellösung bestand aus 100mM HEPES pH 7.8, 10% Isopropanol und 10% (w/w) PEG 4000. Bei dieser Fällungsmittelkonzentration kam es nicht mehr zu einer spontanen Kristallisation. Die Kristallisationsansätze wurden 3

### 3 Ergebnisse

---

Tage equilibriert, bevor je 0.5µl einer frisch hergestellten Impflösung zu den Tropfen pipettiert wurde. Unter dem Mikroskop erkennbare Kristalle bildeten sich im Zeitraum von wenigen Stunden. Diese wuchsen innerhalb von zwei bis drei Wochen auf ihre endgültige Größe (150 x 200 x 800 µm, Abb.3.6 (b)).

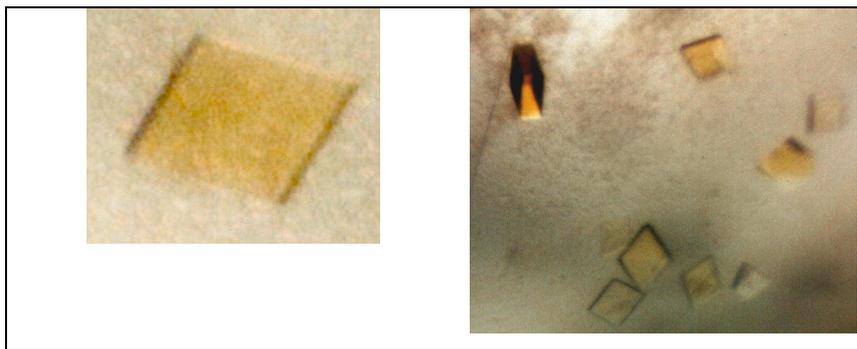
	(a) flächiger Cluster
	(b) Einkristall (100 x 200 x 1000µm <sup>3</sup> ) nach <i>Microseeding</i>
	(c) Einkristalle (200 x 200 x 150µm <sup>3</sup> ) nach Kristallisation mit Cymal-5 <sup>®</sup>

**Abbildung 3.6:** Kristalle der Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>

#### 3.2.2 Kristalle der Raumgruppe C222<sub>1</sub>

Die Handhabung von Kristallen, die aus einer Fällungsmittellösung mit leicht flüchtigen Komponenten kristallisieren, ist meistens mit Schwierigkeiten verbunden, da durch das Entweichen der flüchtigen Substanzen das im Tropfen vorherrschende Gleichgewicht empfindlich gestört wird und zur Zerstörung der Kristalle führen kann. Mit Hilfe des Alkohol-Screens der Firma Jena Bioscience wurde, ausgehend von der bekannten Kristallisationsbedingung, nach alternativen Kristallisationsbedingungen für die roLAAO

gesucht. Dabei wurde eine neue Kristallform gefunden. Die optimierte Kristallisationslösung bestand aus 100mM HEPES pH 7.8 und 40-50% MPD. In den Kristallisationstropfen bildete sich schnell ein Niederschlag, was aber die Kristallisation nicht beeinflusste. Einkristalle bildeten sich nach mehreren Tagen. Das Wachstum der Kristalle bei dieser Kristallisationsbedingung war sehr langsam. Für Röntgendiffraktionsexperimente verwertbare Kristalle ( $200 \times 200 \times 50 \mu\text{m}$ ) wuchsen über einen Zeitraum von drei Monaten. Auch in diesem Fall führte die Impfkristallisation zu gut reproduzierbaren Ergebnissen. Dazu wurden die Tropfen nach einem Tag Inkubationszeit mit  $0.5 \mu\text{l}$  einer  $P2_12_12_1$ -Kristallsplittersuspension angeimpft. Das Animpfen mit Kristallsplitter der gleichen Raumgruppe führte nicht zur Bildung guter Einkristalle. Die Wachstumsphase der Kristalle konnte nicht beeinflusst werden.



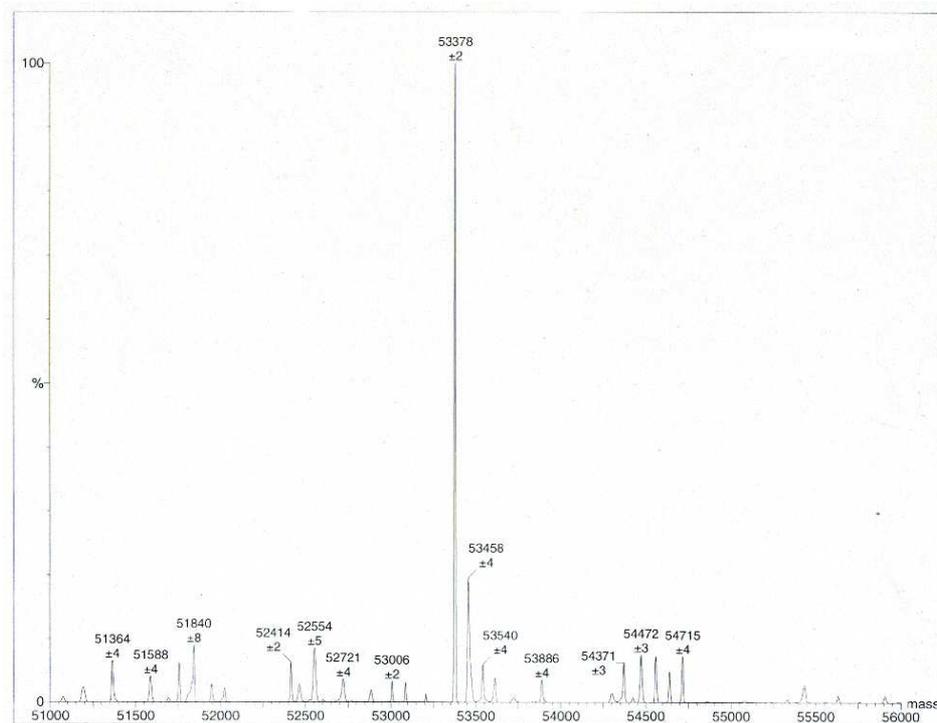
**Abbildung 3.7:** Kristalle der zentriert orthorhombischen Raumgruppe

### **3.3 Derivatisierung**

#### **3.3.1 Massenspektrometrische Methoden**

In Wasser gelöste Kristalle wurden ebenfalls mit ESI-MS charakterisiert. Die folgende Abbildung zeigt ESI-MS-Spektren der gereinigten LAAO und der kristallisierten LAAO. Bei der Untersuchung der Proteinkristalle ergab sich bei der ESI-MS das Problem, dass das zur Kristallisation verwendete PEG 4000 die Qualität der Spektren deutlich verschlechtert. Dieses Problem konnte durch das Verwendung der PEG freien Kristallisationsbedingung behoben werden.

Da diese Methode generell nicht für die schnelle Analyse des derivatisierten Proteins (aufgrund der hohen Microheterogenität des Proteins) eingesetzt werden konnte, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Im Massenspektrum der Kristalle des nativen Proteins zeigt sich deutlich der bei der Kristallisation erfolgte Reinigungsschritt; die Microheterogenität ist deutlich verringert. Im Kristall reichert sich das nicht modifizierte Protein an. Für die Detektion von Schweratomderivaten der roLAAO ist aber auch hier die Auflösung der Spektren zu gering, sodass diese Methode nicht für Voruntersuchungen zur Derivatisierung eingesetzt werden konnte.



**Abbildung 3.8:** Dekonvolviertes ESI-MS-Spektrum der gereinigten LAO im Masse/Ladungsbereich von 53.1-54.4kDa

### 3.3.2 Native Gelelektrophorese

Wird durch die Inkorporation von Schweratom der Ladungszustand des Proteins verändert, ändert sich auch das Laufverhalten der Probe in der nativen PAGE. Derivatisierung, die nicht zu einer Veränderung der Ladungsverhältnisse des Proteins führt, kann mit dieser Methode nicht detektiert werden. Die Methode kann auch zur Untersuchung derivatisierter Kristalle, die in Wasser aufgelöst werden, verwendet werden. In der nachfolgenden Tabelle sind die Konzentrationen und Inkubationszeiten der Schweratomverbindungen, die das Laufverhalten des Proteins veränderten, zusammengestellt. Insgesamt wurden 40 verschiedene Verbindungen getestet.

### 3 Ergebnisse

---

**Tabelle 3.2:** Übersicht über Verbindungen, die das Laufverhalten der LAAO im nativen PAGE beeinflussten, mit den dazu erforderlichen Mindestkonzentrationen und Inkubationszeiten.

<b>Schwermetallverbindung</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Inkubationszeit</b>
Pb-Acetat	10mM	24h
Triethyl-Pb-Acetat	10mM	24h
AuI <sub>3</sub>	10mM	24h
KAuCl <sub>4</sub>	10mM	1h
N-Iodsuccinimid	10mM	1h
KIrCl <sub>6</sub>	10mM	1h
KOsCl <sub>6</sub>	1mM	24h
K <sub>4</sub> PdCl <sub>6</sub>	1mM	24h
K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub>	1mM	24h
K <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub>	10mM	24h
K <sub>2</sub> Pt(CN) <sub>4</sub>	10mM	24h
K <sub>2</sub> Pt(NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	10mM	1h
HgCl <sub>2</sub>	1mM	1h
Ethyl-HgCl	10mM	24h
Methyl-HgCl	10mM	24h
Hg-Dibromofluorescein (Merbromin)	10mM	1h
Uranylnitrat	10mM	1h
Natriumwolframat	10mM	1h

#### 3.3.3 Cokristallisation mit Schwermetallreagenzien

Geeignete Derivate zeichnen sich dadurch aus, dass Schweratome an definierte Positionen im Protein eingebaut werden. Je mehr dieser Positionen in einem Kristall besetzt sind, je höher also der Besetzungsgrad der Schweratomposition ist, umso stärker ist das detektierte Signal. Eine Derivatisierung des Proteins mit Schweratomen und anschließender Kristallisation hat den Vorteil, dass eine durch die Bindung des Schweratoms erfolgende Konformationsänderung des Proteins, die beim Soaking von Kristallen oft zu deren Zerstörung führt, bereits in Lösung auftritt. Allerdings kann diese Konformationsänderung zu einer nicht-isomorphen Kristallform führen. Ausgehend von

den Ergebnissen der nativen Elektrophorese Experimenten wurden Kokristallisationen mit Kaliumtetrachloro-platinat(II), Quecksilber(II)-chlorid, Kaliumhexachloro-osmat(IV) und Kaliumhexachloro-palladat(II) durchgeführt.

**Tabelle 3.3:** Übersicht über die für die Kokristallisation eingesetzten Reagenzien mit den entsprechenden verwendeten Konzentrationen

<b>Schwermetallverbindung</b>	<b>Konzentration</b>
Kaliumtetrachloro-platinat(II)	0.2-10mM
Quecksilber(II)-chlorid	1-10mM
Kaliumhexachloro-osmat (IV)	0.1-10mM
Kaliumhexachloro-palladat(II)	1-10mM
Merbromin	1-50mM

Bei 5mM Kaliumtetrachloro-platinat(II), 0.1 bzw. 1mM Kaliumhexachloro-osmat (IV) und Merbrominkonzentrationen von 1-30mM wurden nach Microseeding Kristalle erhalten.

### 3.3.4 Kristallsoaking mit Schwermetallreagenzien

Beim Soaking mit Derivatisierungsreagenzien wurden die Kristalle nach Überführung in den Derivatisierungspuffer bereits in den ersten Minuten so stark beschädigt, dass sie ihre Diffraktionseigenschaften verloren. In diesem Fall wurde die Konzentration des Reagenzes verringert. Das Aussehen der Kristalle wurde nach 30 Minuten, dann nach einigen Stunden und schließlich über einen Zeitraum bis zu 40 Stunden beobachtet. Die Kristalle, die keine sichtbaren Schäden aufwiesen, wurden wieder in Stabilisierungspuffer überführt und für eine halbe Stunde inkubiert. Wurde dieser *back soak* nicht durchgeführt, entstand bei den anschließenden Diffraktionsaufnahmen eine

### 3 Ergebnisse

---

sehr hohe Hintergrundstreuung. Zur Derivatisierung wurden Bleiacetat, Trimethylbleiacetat, Triethylbleiacetat, Gold(III)iodid, N-Iodsuccinimid, Kaliumhexachloroiridat, Lanthan(III)acetat, Kaliumhexachloro-osmat(IV), Kaliumosmat(VI), Kalium-hexachloropalladat(II), Kaliumtetrachloroplatinat(II), cis-Diaminchloro-platin(II), Kaliumhexachloroplatinat(IV), Kaliumtetracyanoplatinat(II), Dichloro(ethylen-diamin)platin (II), Kaliumtetranitroplatinat(II), Quecksilber(II)chlorid, Ethyl-quecksilber(II)chlorid, Methylquecksilber(II)chlorid, Diphenylquecksilber, Na-4-Hydroxymercuribenzoat, Phenyl-Quecksilberacetat, p-Aminophenylqueck-silberacetat, Thiomersal, Mersalylsäure, Merbromin, Uranylнитrat und Natriumwolframat in Konzentrationen von 0.1-100 mM bei Soakzeiten zwischen 30 Minuten und 120 Stunden verwendet.

#### ***3.4 Diffraktionsmessungen und Rechnungen mit nativen Datensätzen***

##### **3.4.1 Bestimmung der Raumgruppen**

In Tabelle 3.4 sind die Datenstatistiken der nativen Röntgendatensätze aufgeführt. Ein erster nativer Datensatz eines  $P2_12_12_1$  Kristalls wurde am Synchrotron in Grenoble bis zu einer Auflösung von  $1.4\text{\AA}$  vermessen. Der Datensatz ist aufgrund der Strahlenschädigung des Kristalls nicht vollständig (Vollständigkeit 86.7%) und wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Von einem weiteren Kristall wurde am Synchrotron in Hamburg zuerst ein niedrig aufgelöster Datensatz bis  $2.5\text{\AA}$  vermessen. Anschließend wurde vom gleichen Kristall ein hochaufgelöster Datensatz bis  $1.2\text{\AA}$  gemessen. Beide Datensätze wurde für die Datenstatistik zusammengefasst. Ein  $C222_1$  Kristall wurde in

Hamburg mit Synchrotronstrahlung bis zu einer Auflösung von 1.6 Å vermessen. Der erhaltene Datensatz ist, aufgrund der vielen überlappenden Reflexe, nicht vollständig.

**Tabelle 3.4:** ausgewählte Parameter der nativen Datensätze

	Messplatz ID29, EMBL outstation Grenoble	Messplatz X11, EMBL outstation Hamburg	Messplatz X13, EMBL outstation Hamburg
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C222 <sub>1</sub>
Gitterkonstanten (Å)	a= 65.70 b= 109.71 c= 134.40	a= 65.70 b= 109.71 c= 134.40	a=64.1 b=85.2 c=186.4
Auflösung (Å)	1.4	1.4	1.5
Vollständigkeit gesamt (äußere Schale)	86.7 (85.7)	99.8 (92.5)%	86.7 (85.6)%
Signal/Rauschverhältnis gesamt (äußere Schale)	18.0 (6.2)	34.4 (3.9)	18 (6.2)
R <sub>sym</sub>	6 (12)	8 (60)%	6 (12)%
Anzahl Reflexe	973.381	3.9 Mio.	406.075
Anzahl unabhängiger Reflexe	171.629	290.588	134.801
Multiplizität	3.1 (2.7)	13.4 (8.4)	3.01 (2.72)

Als Auflösungsgrenze für die Skalierung wird üblicherweise ein Signal/Rauschverhältnis  $\geq 2$  gewählt; alle Kristalle sind daher nicht bis zu ihrem Auflösungsmaximum vermessen worden. Die Qualität aller Datensätze ist mit R<sub>merge</sub>-Werten zwischen 6-8% über alle Auflösungsschalen hoch.

### 3.4.2 Kristallpackung

Die Anzahl der Proteinmonomere pro asymmetrischer Einheit lässt sich nach Matthew (Matthew 1968) unter Verwendung der Kristallparameter aus der Indizierung, dem Molekulargewicht des Proteins (54.2 kDa) und unter der Annahme einer für Proteinkristalle typischen Dichte von 1.22mg/ml (Anderson, Hovmöller, 2000) berechnen. Der Matthew-Koeffizient, der Lösungsmittelanteil und die Anzahl der Monomere pro asymmetrischer Einheit sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

**Tabelle 3.5:** Übersicht über Matthew-Koeffizient, LM-Anteil und Anzahl der Monomere pro asymmetrischer Einheit für beide Kristallformen

	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C222 <sub>1</sub>
V <sub>m</sub> -Wert [	2.229	2.6
Monomere/ASU	2	1
Lösungsmittelanteil	43%	52%

### 3.4.3 Rechnungen zur Selbstrotationsfunktion

Nichtkristallographische Symmetrien (NCS) im Kristall lassen sich mit Hilfe von Selbstrotationsfunktionen identifizieren. Für die Daten der primitiv orthorhombischen Kristallform wurden Selbstrotationsfunktionen berechnet. Dabei konnte kein Nicht-Ursprungpeak identifiziert werden. Die interne Symmetrie des Dimers ließ sich auf diesem Wege nicht detektieren.

### 3.5 Diffraktionsmessungen und Rechnungen mit Derivat-Datensätzen

#### 3.5.1 Screening nach potentiellen Derivaten

Von den in 3.4.4 beschriebenen, potentiellen Derivaten wurden (Teil-) Datensätze nach Inkubation für 24 Stunden in 10mM Derivatisierungsreagenz aufgenommen. Die Auflösungsgrenzen dieser Kristalle sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

**Tabelle 3.6:** Zusammenstellung der Auflösungsgrenzen der mit unterschiedlichen Reagenzien behandelten Kristalle nach 24-stündiger Inkubation und 10mM-Konzentration

Verbindung	
Bleiacetat	keine Diffraktion
Trimethyl-Bleiacetat	keine Diffraktion
Triethyl-Bleiacetat	keine Diffraktion
Gold(III)iodid	-2.5Å
N-Iodsuccinimid	keine Diffraktion
Kaliumhexachloroiridat	keine Diffraktion
Lanthan(III)acetat	keine Diffraktion
Kaliumhexachloroosmat(IV)	~3 Å
Kaliumosmat(VI)	keine Diffraktion
Kaliumhexachloropalladat(II)	~3 Å
Kaliumtetrachloroplatinat(II)	~2.5 Å
cis-Diamin-chloro-platin(II)	keine Diffraktion
Kaliumhexachloroplatinat(IV)	keine Diffraktion
Kaliumtetracyanoplatinat(II)	~3.5 Å

### 3 Ergebnisse

---

Dichloro(ethyldiamin)platin (II)	keine Diffraktion
Kaliumtetranitroplatinat(II)	~2.7 Å
Quecksilber(II)chlorid	- 2.3 Å
Ethyl-Quecksilber(II)chlorid	~3.0 Å
Methyl-Quecksilber(II)chlorid	~ 2.5 Å
Diphenylquecksilber	~12 Å
Na-4-Hydroxymercuribenzoat	keine Diffraktion
Phenyl-Quecksilberacetat	keine Diffraktion
p-Aminophenyl-Quecksilberacetat	keine Diffraktion
Thiomersal	keine Diffraktion
Mersalysäure	~2.0 Å
Merbromin	~2.0 Å
Uranylнитrat	~3.0 Å
Natriumwolframat	~3.0 Å

#### 3.5.2 Bewertung der Derivate mit der SIR-Methode

Von Kristallen, deren Auflösungsgrenze oberhalb von 4 Å lag, wurden Datensätze mit 50 Bildern (1°/Bild) aufgenommen. Diese wurden dann mit SOLVE gegen die nativen Daten skaliert. Aus den isomorphen Differenzen wurden dann mögliche Schweratompositionen berechnet. Die Auswahl von geeigneten Kristallen für die anschließende Diffraktionsmessung mit Synchrotronstrahlung erfolgte anhand der Ergebnisse aus SOLVE nach dem FOM-Wert, dem Besetzungsgrades der gefundenen Schweratompositionen, der Größe der isomorphen Differenzen und der nachfolgenden Verbesserung des FOM-Wertes bei der Dichtemodifikation in RESOLVE. Bei allen Datensätzen wurden Daten im Auflösungsbereich zwischen 10-3.5 Å zur Phasierung verwendet.

Bei der Derivatisierung mit Kaliumtetrachloroplatinat mit hohen Konzentrationen oder langen Inkubationszeiten kam es zu einer Veränderung der Zellparameter (Nicht-Isomorphie), wobei sich die längste Achse bis zu 5% von der nativen Zelle unterschied. Bei geringen Konzentrationen oder kurzen Soakzeiten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Derivat und nativem Protein gefunden werden.

Die Auswertung der Diffraktionsdaten von mehreren mit Quecksilberchlorid derivatisierten Kristallen ergab vier Quecksilberpositionen. Von einem solchen für 24 Stunden mit 10mM Quecksilberchlorid derivatisierten Kristall wurde ein drei Wellenlängen- MAD-Datensätze am BESSY in Berlin aufgenommen. Nachdem die Auswertung der MAD-Daten nicht zur Strukturlösung führte, wurde von einem Kristall, der für 24 Stunden in 10mM Quecksilberchlorid derivatisiert wurde, ein SAD-Datensatz am EMBL in Hamburg aufgenommen, dessen anomalen Signals zur Strukturlösung der verwendet werden konnte.

### **3.5.3 MAD des Quecksilberderivates**

Nach Durchführung eines Fluoreszenzscans des Kristalls wurden die drei Messwellenlängen manuell aus dem Spektrum ermittelt. Diese lagen sehr nah an den theoretischen Werten. Bei der peak-, inflection- und high energy-remote-Wellenlänge wurden von dem Kristall drei Datensätze im gleichen Winkelbereich aufgenommen. Dabei wurde der peak-Datensatz mit höherer Redundanz vermessen, um eventuell die Strukturlösung als SAD-Fall zu ermöglichen. In der nachfolgenden Tabelle sind ausgewählte Parameter dieser MAD-Datensätze zusammengestellt:

### 3 Ergebnisse

---

**Tabelle 3.7:** ausgewählte Parameter der Datenstatistiken der MAD-Datensätze

	<b>peak</b>	<b>inflection</b>	<b>remote</b>
Wellenlänge [ $\lambda$ ]	1.0086	1.00952	0.9311
Energie(eV)	12291.89	12281.64	13315.79
Auflösungsbereich [ $\text{\AA}$ ]	100-2.25	100-2.25	100-2.25
$R_{\text{sym}}$	7.7 (10.4)	7.7 (10.4)	8.4 (12.2)
Multiplizität	14.3 (9.5)	7.9 (7.1)	8.2 (8.1)
Vollständigkeit [%] (äußere Schale)	98.9 (89.2)	98.4 (97.3)	100 (100)

Die Datensätze wurden mit DENZO und SCALEPACK mit der *no merge original index* und *anomalous* Option indiziert, prozessiert und skaliert und als MAD-Fall mit SOLVE/RESOLVE ausgewertet. Die Korrelation der Daten bei den einzelnen Wellenlängen war entgegen der Erwartung sehr gering. Darüberhinaus wurde versucht, den Peak-Datensatz als SAD-Fall auszuwerten. Die vorab mit SIR gefundenen Quecksilberpositionen konnten mit keiner dieser Methoden bestimmt werden. Dabei waren die Positionen nur zu 5-12% besetzt. Die Verwendung dieser Substruktur führte in Kombination mit den MAD-Daten nicht zu einer Verbesserung der Phasen. Die Verwendung der entsprechenden Routinen in CNS war ebenfalls nicht erfolgreich. Da die Datenqualität sehr gut war, wurde als Grund für die schlechte Phasierung die geringe Besetzung der Positionen im Kristall vermutet. Das Fluoreszenzspektrums des für das MAD-Experiment verwendeten Kristalls, am X31-Messplatz der Außenstation des EMBL in Hamburg zeigte wie auch andere mit Quecksilberchlorid derivatisierten Kristalle, kein wellenlängenabhängiges Fluoreszenzsignal. Dies erklärt nachträglich die Probleme bei der Auswertung mit den MAD-Daten, da bei dieser Methode die Korrelation der Daten der verschiedenen Wellenlängen für die erfolgreiche Phasierung eine große Rolle spielt.

Für alle nachfolgenden Experimente wurden Kristalle ausgewählt, in denen die Besetzung der Positionen (bei Auswertung als SIR-Fall) möglichst hoch waren (20-50%) und die gute Datenstatistiken besaßen.

### 3.6 Strukturlösung des Quecksilberderivates als SAD-Fall

#### 3.6.1 Detektion der Quecksilber-Substruktur

Nachdem die Aufnahme von Fluoreszenzspektren mehrerer mit 10mM Quecksilberchlorid für 24 Stunden inkubierten Kristalle kein wellenlängenabhängiges Signal zeigte dieser Kristall bei der Auswertung als SIR Fall aber eindeutig 4 Quecksilber Positionen. Von einem Kristall wurde ein Datensatz bei der theoretischen Peakwellenlänge von  $\lambda=1.008$  am X31-Messplatz der EMBL-Außenstation in Hamburg aufgenommen.

**Tabelle 3.8:** ausgewählte Parameter der Datenstatistiken der SAD-Datensätze

	<b>peak</b>
Wellenlänge [ $\lambda$ ]	1.008
Auflösungsbereich [ $\text{Å}$ ]	20-2.45
$R_{\text{sym}}$	11.2 (35.2)
Multiplizität	15.3 (10.1)
Vollständigkeit [%]	100 (99.9)
(äußere Schale)	

Die vier Positionen der Quecksilbersubstruktur wurden unabhängig mit den Programmen SOLVE, SHELX und autoSHARP bestimmt. Es konnten mit allen Programmen interpretierbare Elektronendichten nach der Phasierung berechnet werden. Zur

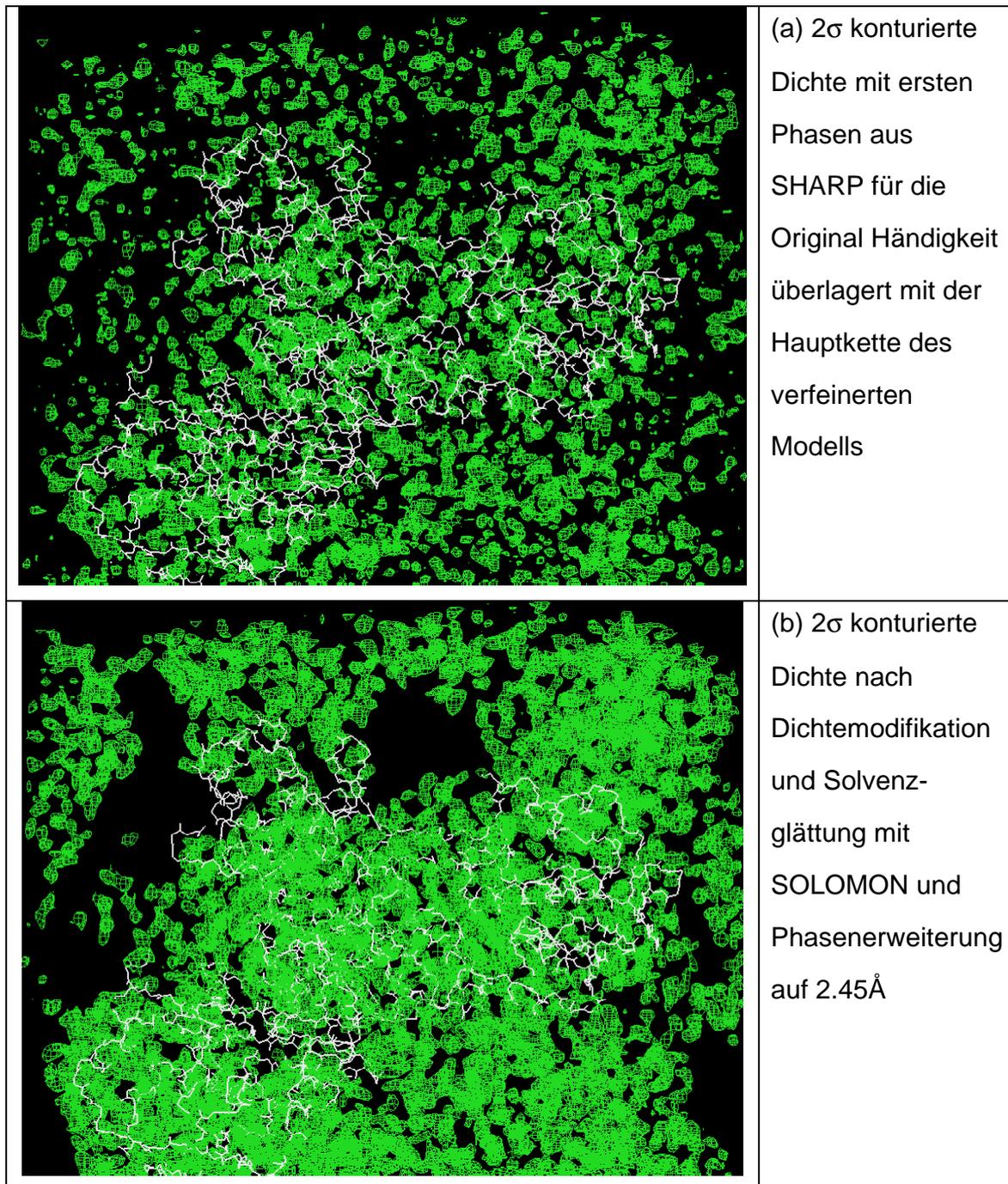
### 3 Ergebnisse

---

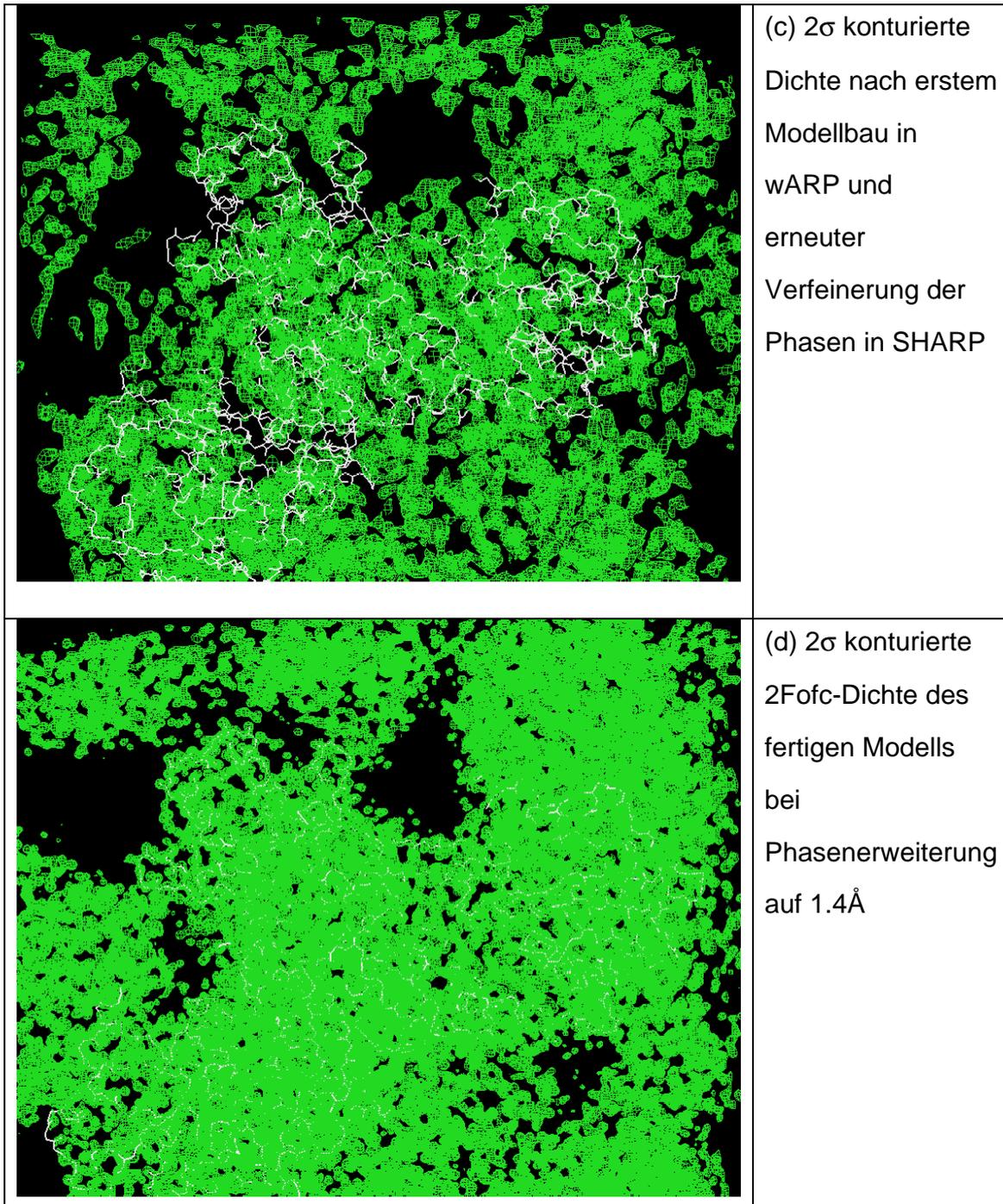
Phasierung wurden Daten im Auflösungsbereich bis 2.7Å verwendet. Mit SHARP wurden aus den verfeinerten Quecksilberpositionen die ersten Phasen mit einem *figure of merit* (FOM(azentrisch)) = 0.38 und (FOM(zentrisch))= 0.11 berechnet. Die anomale *phasing power* betrug 1.103.

#### 3.6.2 Dichtemodifikation und Solvenzglättung

Das beim SAD-Fall auftretende Problem der Wahl der Händigkeit ließ sich mit Hilfe der berechneten Korrelationskoeffizienten nach einer ersten Dichtemodifikation klar lösen. Die Korrelation betrug danach für die Original Händigkeit 24.5% und für die alternative Händigkeit 10.6%. Nach der zweiten Dichtemodifikation unter Beibehaltung der originalen Händigkeit betrug die Korrelation zu den normierten Strukturfaktoramplituden bereits 70.5%, die aus der Phasierung mit SHARP erhaltene Elektronendichte hatte schon eine hohe Qualität (Abb. 3.10 (a)). Nach der ersten Dichtemodifikation war die Konnektivität des Proteinmodells bereits in weiten Teilen erkennbar (Abb. 3.10 (b)). In den folgenden Dichtemodifikationen nach stetiger Phasenerweiterung auf 2.45 Å wurde der Lösungsmittelanteil verfeinert, um den exakten Lösungsmittelanteil zu bestimmen. Dieser ergab sich zu 43.5%. Die Berücksichtigung des verfeinerten Solventanteils ergab eine weitere Verbesserung der berechneten Elektronendichten. Es waren bereits klare Bereiche mit Sekundärstrukturen zu erkennen (Abb. 3.10 (c)).



**Abbildung 3.9 (a) - (d):** Verbesserung der Phasen und der daraus berechneten Elektronendichtekarten im Verlauf der Strukturlösung. Zur Orientierung ist die Hauptkette des Dimes des endgültigen Strukturmodells der roLAAO ebenfalls dargestellt.



**Abbildung 3.9 (a) - (d):** Verbesserung der Phasen und der daraus berechneten Elektronendichtekarten im Verlauf der Strukturlösung. Zur Orientierung ist die Hauptkette des Dimes des endgültigen Strukturmodells der roLAO ebenfalls dargestellt.

### 3.6.3 Automatischer Modellbau mit ARP/wARP

Aufgrund der hohen Qualität der phasenerweiterten experimentellen Elektronendichte bis  $2.45\text{\AA}$  ließ sich die Struktur der LAAO mit der automatischen Modellbauroutine warpNtrace des Programms ARP/wARP einfach modellieren. Der erste Modellbau fand innerhalb des Programmpaketes autoSHARP statt. Der Fortschritt des Modellbaus ist in Tabelle 3.10 für die durchgeführten Zyklen zusammengefasst.

**Tabelle 3.9:** Fortschritt beim automatischen Bau des Hybrid-Modells der LAAO Hauptkette mit ARP/wARP. Ein Zyklus besteht aus 10 Verfeinerungsrunden mit REFMAC5 und einem anschließenden Modellbau.

Zyklus	Anzahl der Ketten	Anzahl der Residuen	Konnektivität in %
1	65	455	71
2	61	502	75
3	60	558	79
4	63	552	77
5	61	568	78
6	60	551	79
7	60	575	79
8	55	538	79
9	60	598	80

Bereits nach dem zweiten Modellbauzyklus konnten mehr als zwei Drittel der Hauptkette automatisch erzeugt werden. Obwohl der automatische Modellbau mit ARP erst gute Ergebnisse mit einer Auflösung  $>2.0\text{\AA}$  liefern soll war das erste Modell bereits sehr gut. Allerdings war an diesem Punkt noch kein automatischer Einbau der Seitenketten entsprechend der Sequenz (*side chain docking*) mit der verwendeten ARP/wARP

### 3 Ergebnisse

---

Version 5.1 möglich. Mit diesem ersten Modellbau konnten mit ARP/wARP 81% der Proteinhauptkette automatisch gebaut werden.

Die nach dem Modellbau berechneten Phasen wurden mit den nativen Daten kombiniert und eine Dichtemodifikation mit stufenweiser Phasenerweiterung im DM (CCP4, ) auf 2.0Å durchgeführt. Unter Verwendung des ersten Modells aus ARP/wARP wurde innerhalb des CCP4-Programmpaketes ein zweiter Modellbau mit ARP/wARP für die Hauptkette durchgeführt. Dessen Fortschritt ist in der nachfolgenden Tabelle und in Abb. 3.12 dargestellt:

**Tabelle 3.10:** Fortschritt beim automatischen Bau des Hybrid-Modells der LAAO mit ARP/wARP nach Phasenerweiterung auf 2.0 Å. Ein Zyklus besteht aus 5 Verfeinerungsrunden mit REFMAC5 und anschließenden Modellbau.

Zyklus	Anzahl der Ketten	Anzahl der Residuen	Konnektivität in %
2	52	418	76
3	45	648	86
4	35	698	90
5	32	809	92
6	22	890	95
7	18	896	96
8	14	905	97
9	13	915	97
10	11	921	98
11	11	924	98
12	9	925	98
13	8	927	98
14	7	928	99
20	7	935	99
30	6	943	99
39	7	938	99

Bereits nach den ersten Zyklen war eine deutliche Erhöhung der Residuen und der Konnektivität zu beobachten. Nach 30 Zyklen konvergierte der Modellbau des Hybridmodells. Für den sequenzrichtigen Einbau der Proteinseitenketten (*side chain docking*) wurden die verbleibenden sieben Kettenfragmente nach Visualisierung in O ( ) manuell zwei Monomeren zugeordnet. In Tabelle 3.13 (a) und (b) sind die Ergebnisse des *side chain docking* für beide Monomere dargestellt. Für das erste Monomer (Kette

### 3 Ergebnisse

A) konnten 467 der 489 Residuen (95.5%), für das zweite Monomer 471 der 489 Residuen (96.3%) mit Seitenketten gebaut werden. Das funktionelle Dimer wurde durch Anwendung der entsprechenden Symmetrioperation (Anwendung der zweizähligen Symmetrie ( $C_2$ ) entlang der z- und x-Achse, Translation um eine asymmetrische Einheit entlang der x-Koordinate) erzeugt. Eine weitere Phasenerweiterung brachte keine Verbesserung des Modells.

**Tabelle 3.11:** Statistik des *side chain dockings* für Monomer A und B. Mit der Zuweisung der Kettenfragmente

	Monomer A	Monomer B
<b>Kettenfragmente</b>	A 219 Residuen (1-219) C 199 Residuen (220-418) G 48 Residuen (419-466)	B 201 Residuen (1-201) D 144 Residuen (202-345) E 78 Residuen (346-423) F 49 Residuen (424-472)
<b>Anzahl gebauter Seitenketten</b>	466	472
<b>Anzahl der Rotamere (prozentualer Anteil)</b>	433 (89%)	427 (87%)
<b>Anzahl Residuen des Dimer</b>	938 von 980 (95.7%)	

**Tabelle 3.12:** Ergebnisse des *side chain docking* für Monomer A (a) und Monomer B (b): Unter der Sequenz sind die Bezeichnungen der jeweiligen Ketten angegeben.

(a)

Number:	01...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence:	AAGDLIGKVKGSHSVVVLGGGPAGLCSAFELQKAGYKVTVLEARTRPGGR
Chain:	-----AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Number:	51...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence:	VWTARGGSEETDLSGETQKCTFSEGHFYNVGATRIPQSHITLDYCRELGV
Chain:	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```
Number: 101...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: EIQGFQGNANTFVNYQSDTSLSGQSVTYRAAKADTFGYMSELLKKATDQ
Chain: AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Number: 151...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: GALDQVLSREDKDALSEFLSDFGLSDDGRYLGSSRRGYDSEPGAGLNFG
Chain: AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Number: 201...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: TEKKPFAMQEVIRSGIGRNFSDFGYDQAMMMFTPVGGMDRIYAFQDRI
Chain: AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA--CCCCCCCCCCCCCCCCCC

Number: 251...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: GTDNIVFGAEVTSMKNVSEGVTVVEYTAGGSKKSITADYAICTIPPHLVGR
Chain: CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC

Number: 301...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: LQNNLPDVLTKAAKPSSSGKLGIEYSRRWETEDRIYGGASNTDKDI
Chain: CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC

Number: 351...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: SQIMFPYDHYNSDRGVVVAYYSSGKRQEAFFESLTHRQLAKAIAEGSEIH
Chain: CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC

Number: 401...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: GEKYTRDISSFSGWRRTKYSESAWANWAGSGGSHGGAATPEYEKLEP
Chain: CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC-----GGGGGGGGGG

Number: 451...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence: VDKIYFAGDHLNSNAIAWQHGAITSARDVVTHIHERVAQEA_____
Chain: GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG--
```

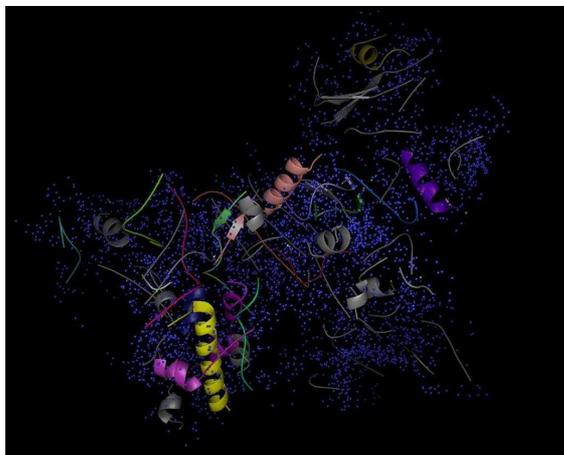
### 3 Ergebnisse

---

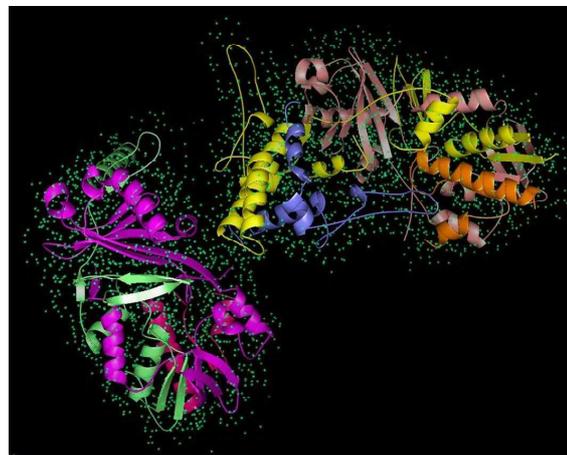
(b)

Number:	01...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence:	AAGDLIGKVKGSHSVVVLGGGPAGLCSAFELQKAGYKVTVLEARTRPGGR
Chain:	---DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
Number:	51...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence:	VWTARGGSEETDLSGETQKCTFSEGHFYNVGATRIPQSHITLDYCRELGV
Chain:	DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
Number:	101...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence:	EIQGFGNQANTFVNYQSDTSLSGQSVTYRAAKADTFGYMSELKKATDQ
Chain:	DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD---
Number:	151...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence:	GALDQVLSREDKDALSEFLSDFGLSDDGRYLGSSRRGYDSEPGAGLNFG
Chain:	EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE
Number:	201...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence:	TEKKPFAMQEVIRSGIGRNFSFDFGYDQAMMFTVPVGGMDRIYYAFQDRI
Chain:	EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE--BBBBBBBBBBBBBBBBBBBB
Number:	251...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence:	GTDNIVFGAEVTSMKNVSEGVTVETAGGSKKSITADYAICTIPPHLVGR
Chain:	BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB
Number:	301...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence:	LQNNLPGDVLTAALKAAKPSSGKLGIEYSRRWETEDRIYGGASNTDKDI
Chain:	BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB
Number:	351...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence:	SQIMFPYDHYNDRGVVVAYYSSGKRQEAFFESLTHRQLAKAIAEGSEIH
Chain:	BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB
Number:	401...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence:	GEKYTRDISSFSGSRRTKYSESAWANWAGSGGSHGGAATPEYEKLEP
Chain:	BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBE-----FFFFFFFFFFFF
Number:	451...+...10...+...20...+...30...+...40...+...50
Sequence:	VDKIYFAGDHLNSNAIAWQHGALTSARDVVTHIHERVAQEA

Chain: FFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFF--



(a) Strukturmodell aus wARP/ARP für SAD-Datensatz bei 2.45Å



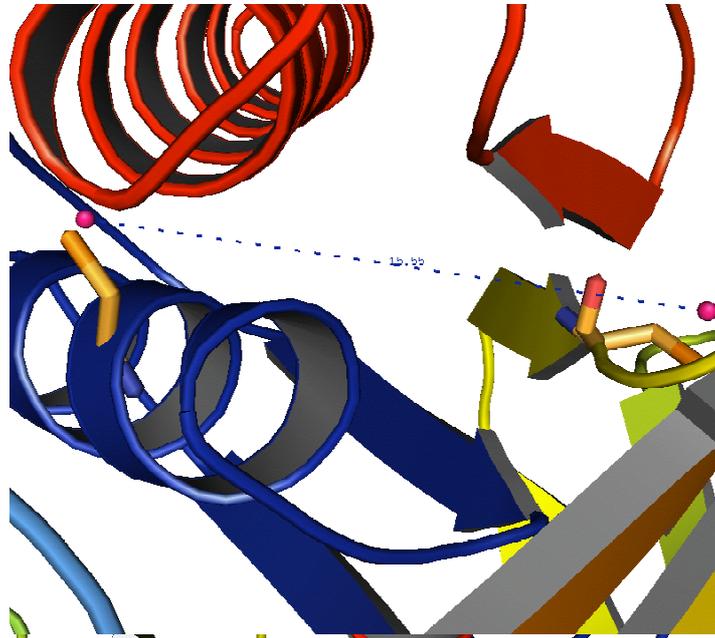
(b) Strukturmodell aus wARP/ARP nach Phasenerweiterung auf 2.0Å



(c) endverfeinertes Strukturmodell der roLAAO bei 1.4Å

**Abbildung 3.10:** Fortschritt beim automatischen Bau des Hybrid-Modells der LAAO mit ARP/wARP. (a) erstes Modell unter Verwendung des SAD-Datensatzes bis 2.45Å; (b) Modell nach Phasenerweiterung auf 2.0 Å. (c) endverfeinerte Struktur bei 1.4Å. Die Sekundärstrukturelemente sind als Banddiagramm dargestellt. Die Einfärbung der Ketten erfolgt in (a) und (b) entsprechend der gefundenen Kettenfragmente. In (c) ist das Bandmodell entsprechend dem Verlauf der Aminosäuresequenz von blau nach rot eingefärbt.

Im endverfeinerten Strukturmodell befinden sich die inkorporierten Quecksilberatome im Abstand von 1.7Å zum Cys26 und 2.5Å zum Cys291.



**Abbildung 3.11:** Position der inkorporierten Quecksilberatome. Die Sekundärstrukturelemente der Proteinkette sind als Banddiagramm dargestellt, die koordinierenden Cysteinresiduen als Stäbchenmodell, die Hg-Atome als violette Kugeln. Der Abstand zwischen den beiden Quecksilberatomen ist in Å angegeben.

### 3.7 Strukturlösung LAAO, C222<sub>1</sub>

Bei der Strukturlösung der LAAO der Raumgruppe C222<sub>1</sub> wurde ein Monomer der bei 1.4Å verfeinerten LAAO der Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> als Suchmodell verwendet. Bei der Kreuzrotationssuche mit PHASER hob sich eine Lösung deutlich von den übrigen ab. In der folgenden Tabelle sind die Rotationswinkel und Translationsvektoren für das Monomer A der LAAO der Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> nach der Verfeinerung in PHASER aufgelistet.

Das funktionelle Dimer der LAAO liegt in diesem Fall auf einer speziellen Lage, so dass das Dimer durch die kristallographische Symmetrie erzeugt wird. Die Lösung hatte in der

anschließenden Starre-Körper-Verfeinerung R-Werte von  $R(\text{work})=40.7\%$  und  $R(\text{free})=41.4\%$ . Die durchgeführten Verfeinerungsschritte sind in Tabelle 3.15 zusammengestellt. Die weitere Verfeinerung der Daten mit Einbau des FAD und Wassers führte zu R-Werten, die für die Qualität der Daten und des Modells viel zu hoch waren ( $R_{\text{free}}=35.8\%$  ,  $R_{\text{work}}=27.3\%$ ). Daher wurde vermutet, dass die Daten fälschlicherweise in einer höhersymmetrischen Raumgruppe prozessiert wurden, bedingt durch die interne nicht-kristallographische Symmetrie des Dimers. Eine Prozessierung in der entsprechend niedrigeren Raumgruppe  $P_12_1$  führte mit den gemessenen Daten lediglich zu einer Vollständigkeit des Datensatzes von 45% über den gesamten Auflösungsbereich. Damit konnten diese Daten zwar für erste Rechnungen zum Molekularen Ersatz verwendet werden, die Elektronendichten waren aber aufgrund der geringen Vollständigkeit sehr schlecht definiert. Da eine hochaufgelöste Struktur der LAAO mit den Kristallen der primitiv orthorhombischen Kristallform möglich war, wurde auf die weitere Auswertung der Daten verzichtet.

**Tabelle 3.13:** Ergebnis der Kreuzrotations- und Translationssuche nach der Starre-Körper-Verfeinerung unter Annahme der Raumgruppe  $C222_1$

$\theta_1$	$\theta_2$	$\theta_3$	trans x	trans y	trans z
123.4	48.8	313.8	0.876	-0.268	0.230

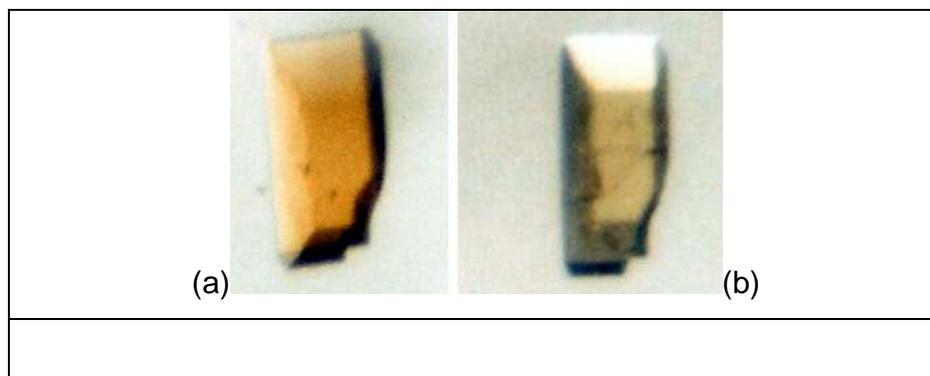
**Tabelle 3.14:** Ergebnis der Kreuzrotations- und Translationssuche nach der Starre-Körper-Verfeinerung unter Annahme der Raumgruppe  $P_12_1$ .

$\theta_1$	$\theta_2$	$\theta_3$	trans x	trans y	trans z
122.5	49.1	314.4	0.481	0.000	0.290
57.53	-130.93	-45.65	0.492	-0.009	0.103

### 3.8 Strukturlösung der Komplexe

#### 3.8.1 P<sub>2</sub><sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>-LAAO im Komplex mit L-Alanin

L-Alanin ist eines der besten Substrate für die LAAO aus *Rh. opacus* (Geueke, 2001). Zur Darstellung des Enzyme-Substrat-Komplexes wurden native Kristalle der Raumgruppe P<sub>2</sub><sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> in eine gesättigte Lösung des L-Alanins in Stabilisierungspuffer überführt und solange *gesoaked*, bis eine deutliche Entfärbung auftrat (Abbildung 3.12). Dieser Prozess dauerte einige Minuten und wurde unter dem Stereomikroskop verfolgt. Durch die Anordnung der Proteinmoleküle im Kristall wurde die Reaktion mit Sauerstoff verlangsamt und so die Re-Oxidation des FADs verhindert, wenn die Kristalle sofort in Cryopuffer überführt und tiefgefroren wurden.



**Abbildung 3.12:** Kristall vor (a) und nach (b) Inkubation mit L-Alanin. Die Entfärbung des Kristalls, die durch die Reduktion des FADs hervorgerufen wird, ist deutlich zu erkennen.

Ausgewählte kristallographische Parameter eines am BL2-Messplatz der PSF am BESSY aufgenommenen Datensatzes des LAAO-L-Alanin-Komplexes sind in Tabelle 3.15 zusammengestellt.

**Tabelle 3.15:** Ausgewählte kristallographische Parameter der Datensätze der LAAO- Komplexe. Die Datensätze wurden an der BL2 der PSF am BESSY in Berlin gemessen.

Substrat	L-Alanin	L-Phenylalanin	o-Aminobenzoat
Wellenlänge (Å)	0.9195	0.9195	0.9195
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
a (Å)	65.9	66.05	65.65
b (Å)	109.93	110.06	109.68
c (Å)	134.49	134.53	134.37
Unabhängige Reflexe	142028	157853	83174
Auflösung (Å)	15-1.55	30-1.45	30-1.85
Vollständigkeit (%)	99.8 (99.6)	91.3 (86.1)	99.2 (98.7)
Signal/Rausch-Verhältnis (äußere Schale)	25.3 (10.0)	11.9 (2.1)	9.5 (2.0)
R <sub>sym</sub> (%) (äußere Schale)	8.3 (23.3)	10.4 (47.7)	14.9 (50.3)

### 3.8.2 P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>-LAAO mit Komplex mit L-Phenylalanin

Das L-Phenylalanin hat im Vergleich zum L-Alanin nur die Hälfte der relativen Aktivität. Das zweite Substrat wurde ausgewählt, da vermutet wurde, dass ein Substrat mit aromatischem Ring in der Elektronendichte leichter zu identifizieren sei. Die Bindung von zwei Substraten kann zudem Aufschluss über die Substratspezifität geben. Ein nativer Kristall wurde, wie in 3.8.1 beschrieben, in eine gesättigte L-Phenylalanin-Lösung in Stabilisierungspuffer überführt und die Entfärbung des Kristall visuell verfolgt. Die Datenstatistik eines am BL2-Messplatz der PSF am BESSY aufgenommenen Datensatzes des LAAO-L-Phenylalanin-Komplexes ist in Tabelle 3.15 zusammengestellt.

### 3.8.3 P<sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub>-LAAO im Komplex mit Anthranilat

Anthranilsäure (o-Aminobenzoat) wird sowohl für die DAAO aus Schweineniere (Mattevi 1996) und Hefe (Pollegioni 2002), als auch für die LAAO aus *Calloselasma rhodostoma* (Pawelek 2000) als Inhibitor beschrieben. Für die crLAAO existieren bislang keine Enzym-Substrat-Komplexe. Daher wurde dieser Komplex mit der LAAO aus *Rh. opacus* ebenfalls mit Röntgendiffraktion charakterisiert. Ein nativer Kristalle wurde schrittweise in die Cryolösungen (bis 15% MPD) überführt. Die Cryolösung mit 20% MPD war mit Anthranilsäure gesättigt. Da das 2-Aminobenzoat auch von der LAAO aus *Rh. opacus* wie vermutet nicht umgesetzt wird, wurde keine Entfärbung beobachtet. Die Kristalle wurden für ca. 20 Minuten *gesoaked* und anschließend tiefgefroren. Ausgewählte Parameter des am BL2-Messplatz der PSF am BESSY vermessenen Kristalls sind in Tabelle 3.15 zusammengestellt. Längere *Soak*-zeiten mit Anthranilat führten zu einer leichten Verschlechterung der Diffraktionseigenschaften der Kristalle.

## 3.9 Verfeinerung und Qualität der Strukturen

### 3.9.1 Quecksilber-Derivat, P<sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub> bis 2.45 Å

In dem mit ARP/wARP generierten Strukturmodell wurden bereits 81% der Proteinhauptkette gebaut; Seitenketten konnten in dieses Modell noch nicht automatisch eingebaut werden. Die R-Werte für dieses Modell betragen  $R_{\text{work}}=25.3\%$  und  $R_{\text{free}}=38.5\%$ . Dieses Modell wurde als Startmodell für die native Struktur verwendet.

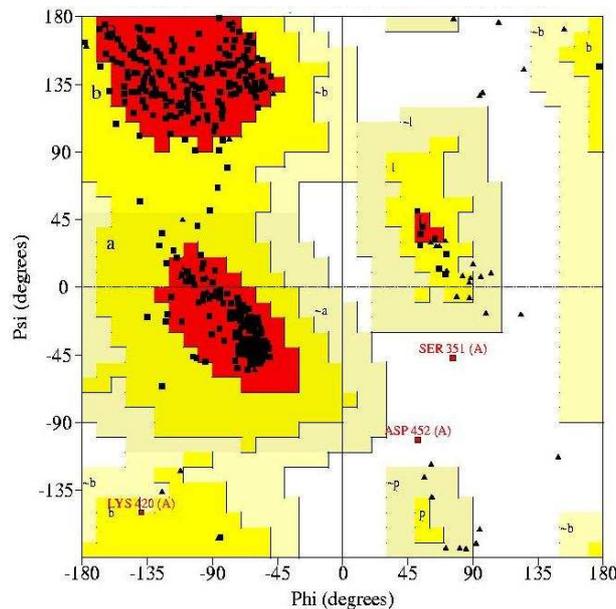
### 3.9.2 Native LAAO, P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> bis 1.4 Å

Das unter 3.10.1 beschriebene Modell wurde für den Modellbau des nativen Enzyms verwendet. Dabei wurde nach Phasenerweiterung auf 2.0Å und Dichtemodifikation mit DM mit ARP/wARP in 40 Zyklen ein neues Modell erzeugt. Die erhaltenen Modelle wurden jeweils in 5 Refmac5-Zyklen verfeinert. Die R-Werte während des Modellbaus verringerten sich von  $R_{\text{work}}=42.2\%$  und  $R_{\text{free}}=41.5\%$  auf  $R_{\text{work}}=26.6\%$  und  $R_{\text{free}}=14.2\%$  für das Modell der Proteinhauptkette, welches 938 von 980 Residuen enthielt. Dabei werden zur Berechnung der R-Faktoren auch die ungebundenen *Dummy*-Atome berücksichtigt. Visuell wurden in O den sieben Kettenfragmenten zwei Monomere zugeordnet. Abschließend erfolgte der Einbau der Seitenkettenatome mit dem side-chain-docking-Algorithmus in ARP/wARP. Die Vervollständigung und Verfeinerung des Strukturmodells bestand aus mehreren Zyklen der manuellen Anpassung des Strukturmodells an die Elektronendichte in 'O' und anschließender Verfeinerungsrechnungen mit dem Programm REFMAC5. Bis auf die ersten drei Residuen, die letzten beiden Residuen und die Residuen 432-440, für die die Qualität der Elektronendichte nicht ausreichend war, konnten alle fehlenden Aminosäuren in 'O' eingebaut werden. Das so erzeugte Modell wurde mit dem Programm SFCHECK (Berechnung der Elektronendichte-Korrelationskoeffizienten für alle Haupt- und Seitenkettenatome jeder einzelnen Aminosäure) auf lokale Fehler hin untersucht. Alle Aminosäuren waren gut in der Elektronendichte positioniert. Auch die Elektronendichte des FAD war in beiden Monomeren sehr gut zu erkennen. Der Einbau des FAD-Cofaktors erfolgte manuell in 'O'. Der Einbau von 1048 Wassern wurde mit der ARP/wARP-Routine zum Einbau von Solvenzmolekülen, in die die Verfeinerung des Modells mit REFMAC5 implementiert ist, durchgeführt. Keines der eingebauten Wasseratome hatte einen B-Faktor  $>50\text{Å}^2$ . Die nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) des Dimers wurde bei der Verfeinerung nicht berücksichtigt. Nach anisotroper Verfeinerung der B-Faktoren und teilweiser Freigabe der Planarität des mittleren Rings

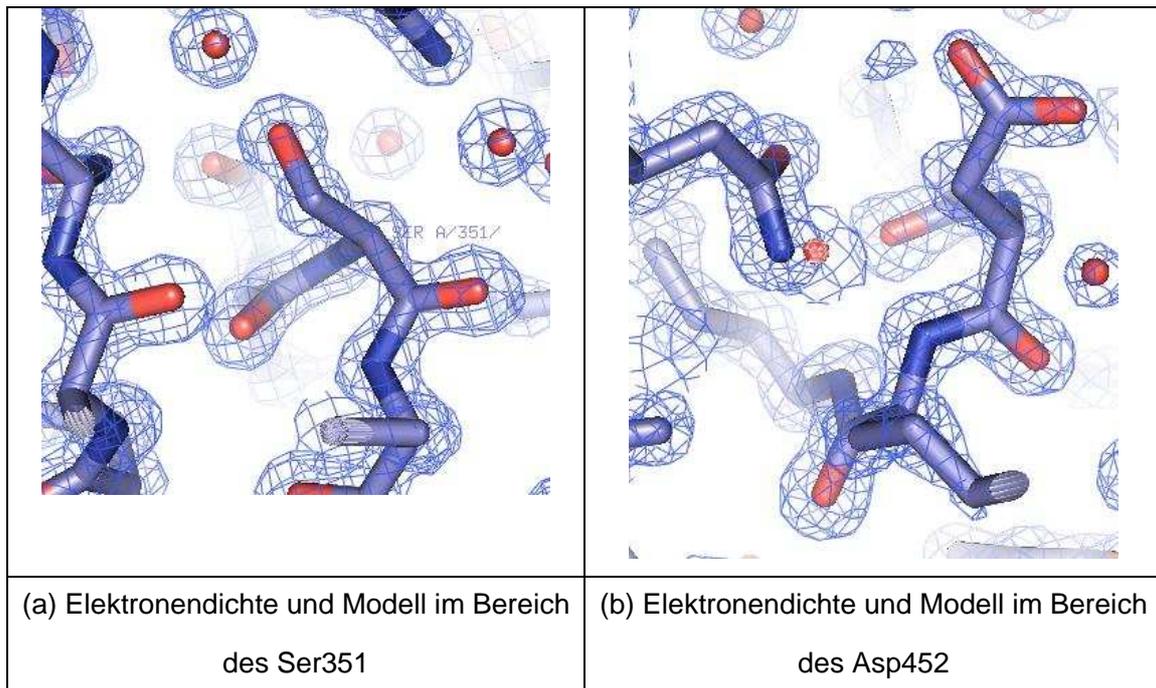
### 3 Ergebnisse

---

des Isoalloxozins des FADs konnte das Strukturmodell bis zu einem  $R_{\text{work}}=16.8\%$  und  $R_{\text{free}}=15.1\%$  verfeinert werden. Die stereochemische Qualität der Struktur wurde mit PROCHECK überprüft. Im Ramachandran-Plot (Verteilung der Hauptkettentorsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$ ) liegen 90.9% der bevorzugten (*most allowed regions*) und 8.6 % in den zusätzlich erlaubten Bereichen (*additionally allowed regions*). Die übrigen zwei Residuen des Monomers (0.5%) liegen in verbotenen Bereichen (*disallowed regions*), sind aber gut in der Elektronendichte definiert (Abb. 3. 15).

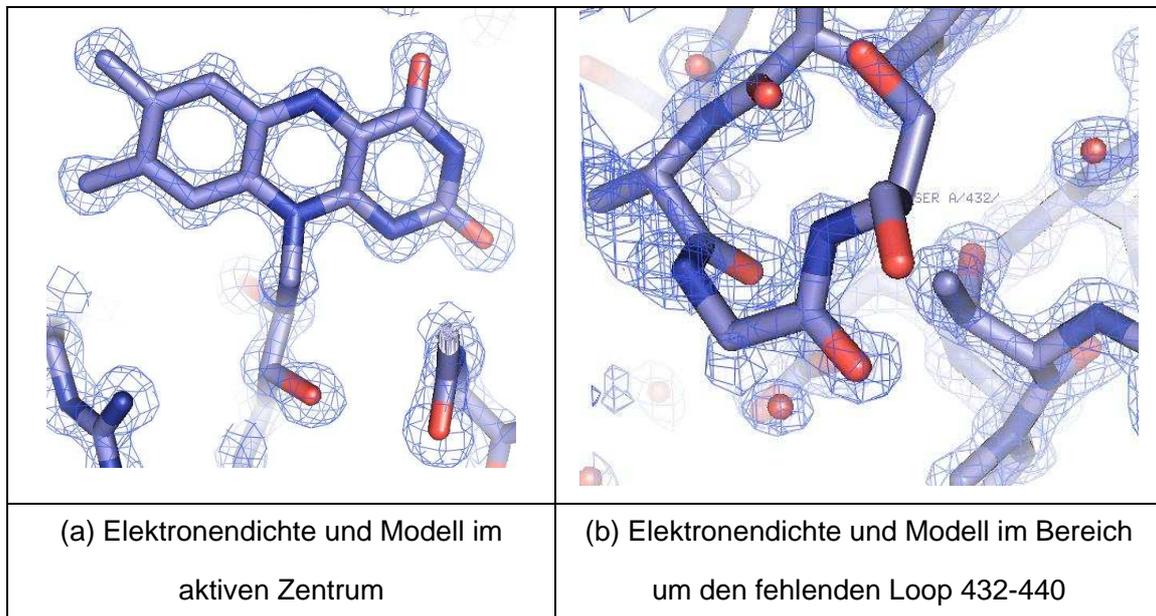


**Abbildung 3.13:** Ramachandran-Plot der nativen LAAO, P<sub>21</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>. Die zwei Residuen Ser351 und Asp452, die in den verbotenen Bereichen (weiß, *disallowed regions*) liegen, sind in beiden Ketten des LAAO-Dimers in diesen Bereichen des Plots zu finden. Zur besseren Übersicht sind nur die Residuen der Kette A dargestellt. Glycine sind als Dreiecke dargestellt; alle anderen Aminosäuren als Quadrate.



**Abbildung 3.14 (a) und (b):** Repräsentativer Ausschnitt der  $2DF_{\sigma}$ - $mF_{\sigma}$  gewichteten nativen LAAO Elektronendichte bei  $1.4\text{\AA}$ . Die gezeigte Elektronendichte ist bei  $2.0\sigma$  kontouriert. Gezeigt sind die im Ramachandran-Plot in verbotenen Regionen liegenden Aminosäuren Ser351 (a) und Asp 452 (b). Die Stickstoffatome sind dunkelblau, die Sauerstoffatome rot, Schwefelatome orange und Kohlenstoffe blau dargestellt.

### 3 Ergebnisse

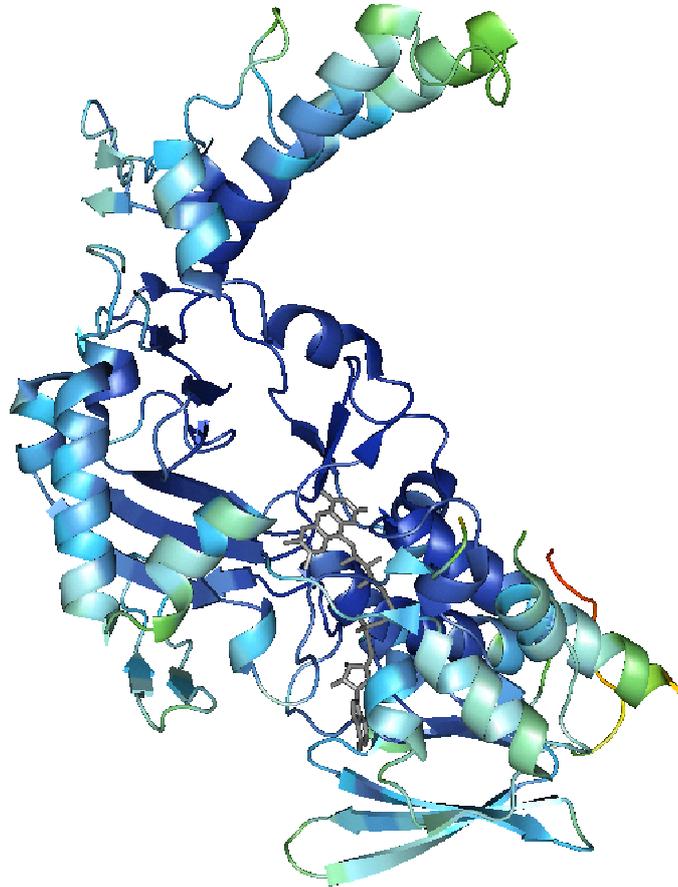


**Abbildung 3.15 (a) und (b):** Repräsentativer Ausschnitt der  $2DF_o - mF_c$  gewichteten nativen LAAO Elektronendichte bei  $1.4\text{\AA}$ . Die gezeigte Elektronendichte ist bei  $2.0\sigma$  kontouriert. (a) aktives Zentrum: Die katalytischen Aminosäuren, wie auch der Cofaktor haben eine gut definierte Elektronendichte. (b) fehlender Loop zwischen Residue 432-440. Hier ist keine Elektronendichte zu sehen. Die Stickstoffatome sind dunkelblau, die Sauerstoffatome rot, Schwefelatome orange und Kohlenstoffe blau dargestellt.

Das Modell besitzt eine hohe stereochemische Qualität. Die Temperaturfaktoren sind, mit Ausnahme der ersten drei N-terminalen Residuen und dem Loop zwischen den Aminosäuren 432-440, die nicht in die Elektronendichte modelliert werden konnten, sehr niedrig (Mittelwert für Proteinatome  $11\text{ \AA}^2$ , FAD  $7.2\text{ \AA}^2$ ). Das gesamte Protein hat eine sehr starre Struktur. In der folgenden Tabelle sind einige Kenngrößen der Struktur aufgeführt.

**Tabelle 3.16:** Verfeinerung der nativen Struktur. Der DPI und der Luzzati-Plot wurden mit SFCHECK berechnet. Ferner wurden mit SFCHECK Dichtekorrelationskoeffizienten für alle Haupt- und Seitenkettenatome berechnet. Die B-Faktoren wurden mit BAVERAGE berechnet.

<b>Inhalt des Modells</b>	
Residuen (Kette A/B)	478/477
Substrat	-
Wasser	993
FAD	212
<b>Verfeinerung</b>	
Auflösungsbereich[Å]	16-1.25
R <sub>work</sub> [%]	15,10
R <sub>free</sub> [%]	16,80
<b>RMS Abweichungen</b>	
DPI [Å]	0,042
Bindungslängen[Å]	0,008
Bindungswinkel[°]	1,277
Chirale Volumen[Å <sup>3</sup> ]	0,070
Luzatti plot [Å]	0,136
<b>B-Faktoren</b>	
Alle Proteinatome [Å <sup>2</sup> ], Kette A/B	12.22/10.94
Atome der Hauptkette [Å <sup>2</sup> ], Kette A/B	11.54/10.33
Atome der Seitenkette [Å <sup>2</sup> ], Kette A/B	12-95/11.60
FAD[Å <sup>2</sup> ]	7,19
Substrat [Å <sup>2</sup> ]	-
Wasser [Å <sup>2</sup> ]	20,35



**Abbildung 3.16:** Bandstrukturen des Monomers A der LAAO, gefärbt von blau nach rot entsprechend der Temperaturfaktoren. (Blau:  $B < 10 \text{ \AA}^2$ , hellblau  $B < 20 \text{ \AA}^2$ , grün  $B < 30 \text{ \AA}^2$ , gelb bzw. rot :  $B > 30 \text{ \AA}^2$ ). Rigide Bereiche der Struktur sind blau, flexible Bereiche rot gefärbt.

### 3.9.3 Komplexe der LAAO

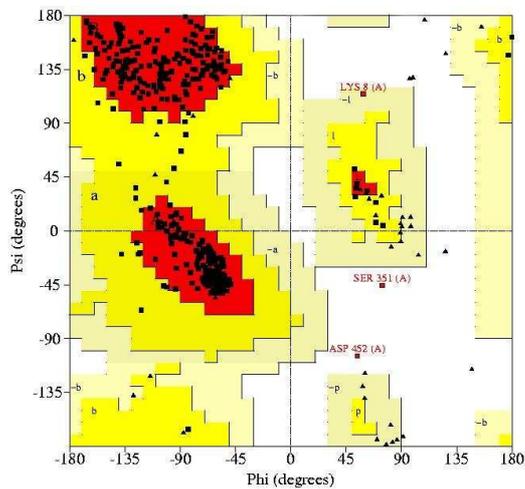
Die Vorgehensweise bei der Verfeinerung der Komplexstrukturen war identisch wie die der nativen LAAO. Als Startmodell wurde die verfeinerte Struktur der nativen LAAO verwendet. Für die gebundenen Substrate L-Phenylalanin und L-Alanin und den Inhibitor Anthranilsäure wurden bereits nach dem ersten Verfeinerungsschritt gut definierte Elektronendichten im aktiven Zentrum erhalten, in die die Moleküle eindeutig eingepasst werden konnten. Die B-Faktoren der beiden Substrate sind nicht höher als die der Gesamtstruktur und geben damit einen Hinweis auf den hohen Besetzungsgrad des aktiven Zentrums durch die Substratmoleküle. Bei keiner Verfeinerung wurde die nicht-kristallographische Symmetrie des Dimers berücksichtigt. Die B-Faktoren wurden im letzten Schritt anisotrop verfeinert. Die B-Faktoren der drei Komplexstrukturen sind generell etwas höher als die des Apoenzyms. Da deutliche Auflösungsunterschiede zwischen den Datensätzen vorliegen, sind die Niveaus der B-Faktoren generell unterschiedlich. Aber auch bei den Komplexen zeigt sich, dass die Residuen, die an der Substrat- und Cosubstratbindung beteiligt sind, sehr rigide sind. Die erhaltenen Strukturmodelle wurden hinsichtlich ihrer stereochemischen Qualität mit PROCHECK überprüft. Die Ramachandranplots der drei Komplexe unterscheiden sich nicht von denen des ungebundenen Proteins. Auch hier finden sich die zwei Aminosäuren außerhalb der erlaubter Bereiche, obwohl sie gut in der Elektronendichte definiert sind.

### 3 Ergebnisse

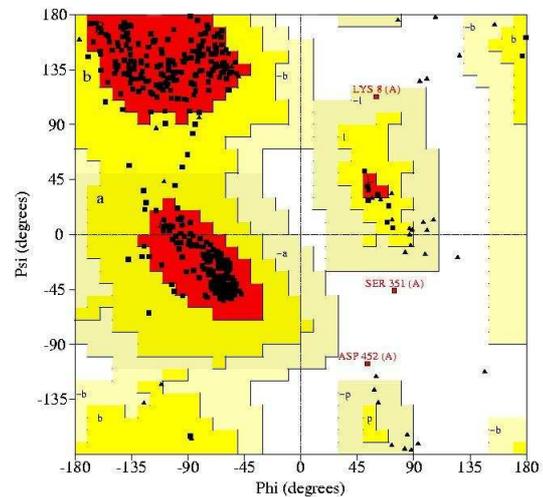
**Tabelle 3.17:** Verfeinerung der Komplex-Strukturen. Der DPI und der Luzzati-Plot wurden mit SFCHECK berechnet. Ferner wurden mit SFCHECK Dichtekorrelationskoeffizienten für alle Haupt- und Seitenkettenatome berechnet. Die B-Faktoren wurden mit BAVERAGE berechnet.

<b>Substrat</b>	o-Aminobenzoat	L-Alanin	L-Phenylalanin
Inhalt des Modells			
Residuen (Kette A/B)	478/477	478/477	478/477
Substrat	20	14	24
Wasser	892	842	504
FAD	212	212	212
<b>Verfeinerung</b>			
Auflösungsbereich[Å]	20-1.85	15-1.55	15-1.45
R <sub>work</sub> [%]	14.98	14.70	18.10
R <sub>free</sub> [Å]	20.42	17.30	20.60
<b>RMS Abweichungen</b>			
DPI [Å]	0.120	0.065	0.089
Bindungslängen[Å]	0.013	0.009	0.009
Bindungswinkel[°]	1.446	1.248	1.259
Chirale Volumen[Å <sup>3</sup> ]	0.081	0.072	0.074
Luzatti plot [Å]	0.187	0.155	0.168
<b>B-Faktoren</b>			
Alle Proteinatome [Å <sup>2</sup> ], Kette A/B	18.96/18.37	12.86/11.99	18.18/17.09
Atome der Hauptkette [Å <sup>2</sup> ], Kette A/B	18.37/18.94	12.18/11.37	17.58/16.54
Atome der Seitenkette [Å <sup>2</sup> ], Kette A/B	19.58/17.84	13.58/12.65	18.82/17.09
FAD[Å <sup>2</sup> ]	13.80	7.75	12.22
Substrat [Å <sup>2</sup> ]	44.90	10.16	21.47
Wasser [Å <sup>2</sup> ]	27.10	20.33	21.92

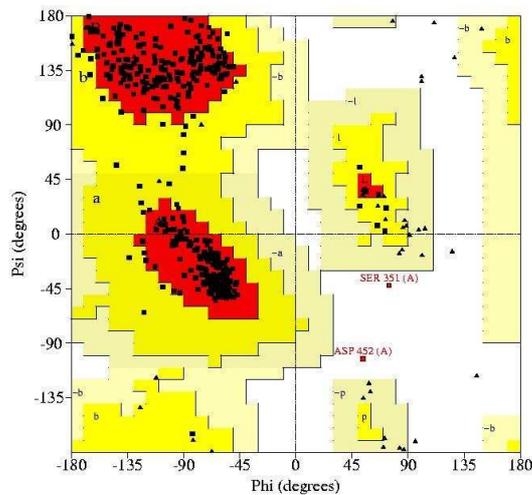
Die folgende Abbildung zeigt die Ramachandran-Plots der drei endverfeinerten Komplexstrukturen der roLAAO.



(a) roLAAO im Komplex mit L-Alanin



(b) roLAAO im Komplex mit L-Phenylalanin

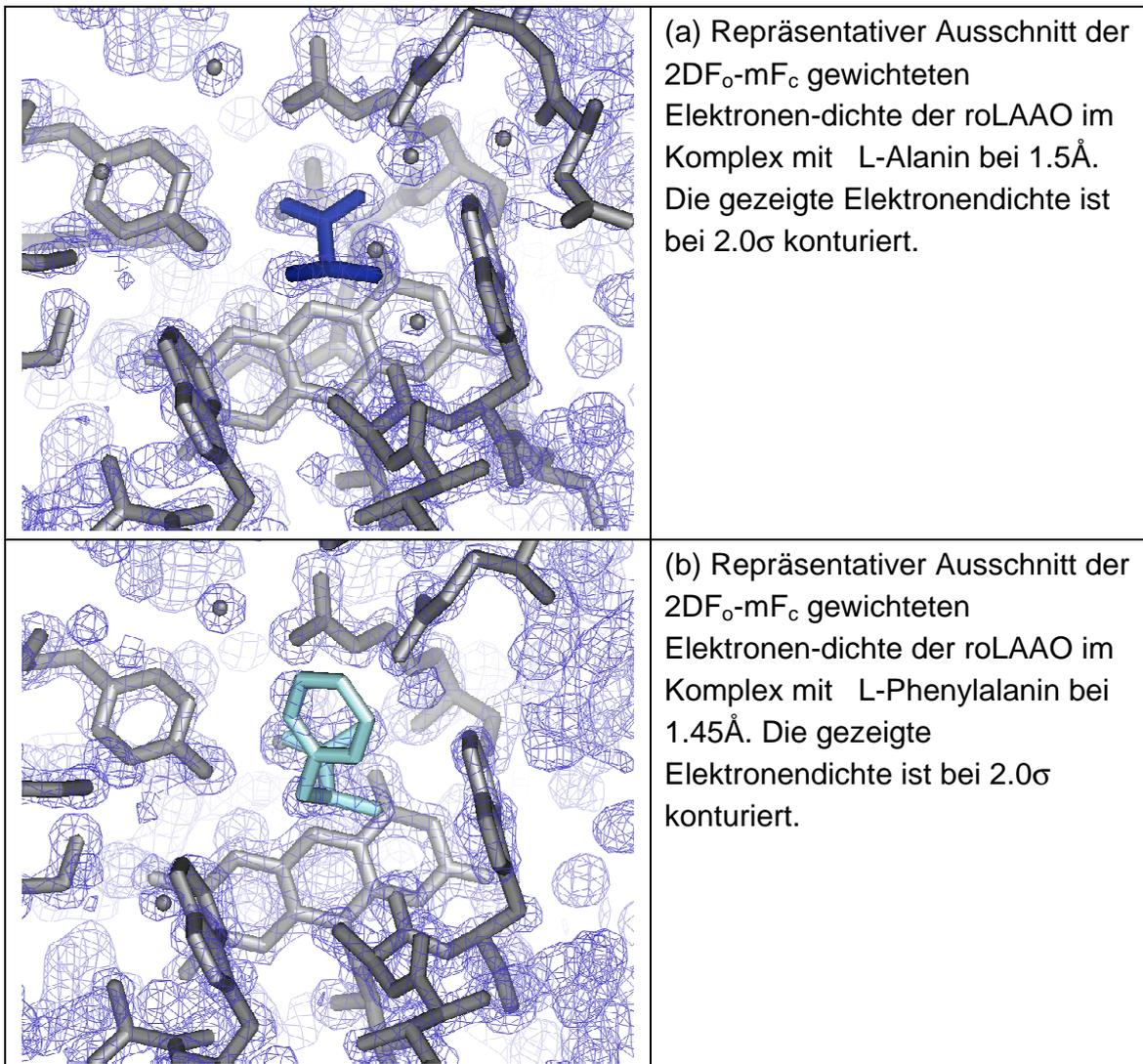


(c) roLAAO im Komplex mit o-Aminobenzoat

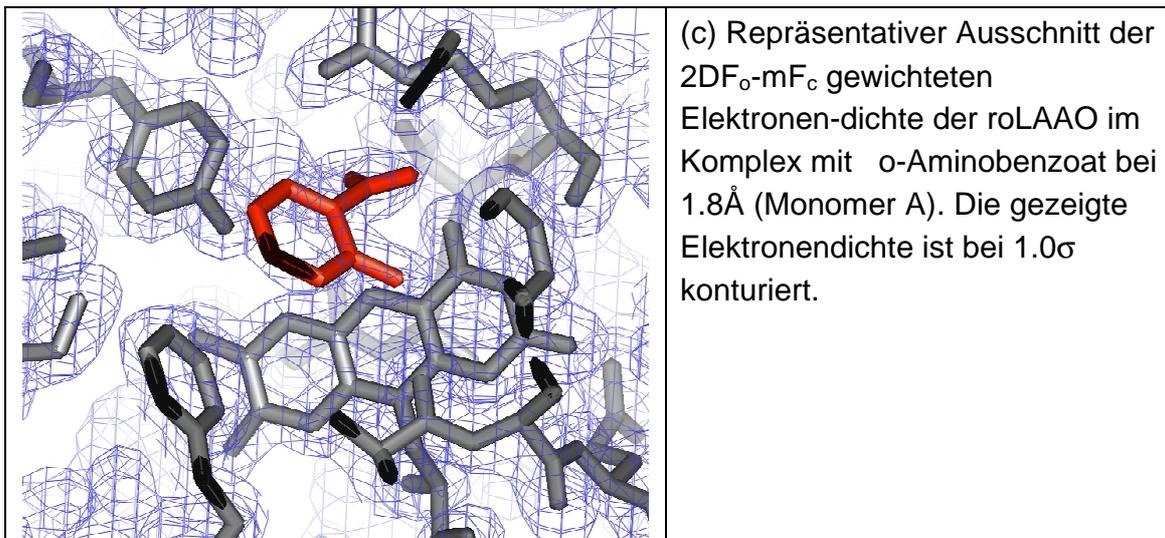
**Abbildung 3.17 (a) - (c):** Ramachandran-Plot der Komplexstrukturen der LAAO, P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>. Die zwei Residuen Ser351 und Asp452, die in den verbotenen Bereichen (weiß, *disallowed regions*) liegen, sind jeweils in beiden Ketten des LAAO-Dimers in diesen Bereichen des Plots zu finden. Zur besseren Übersicht sind nur die Residuen der Kette A dargestellt. Glycine sind als Dreiecke dargestellt; alle anderen Aminosäuren als Quadrate.

### 3 Ergebnisse

Die folgenden Abbildungen zeigen Ausschnitte aus den Elektronendichten im Bereich der Substratbindungsstelle am Isoallaxozinring.



**Abbildung 3.18 (a) - (c):** Repräsentativer Ausschnitt der  $2DF_o-mF_c$  gewichteten Elektronendichten der roLAAO im Komplex mit L-Alanin (a), L-Phenylalanin (b) und o-Aminobenzoat (c). Dargestellt ist der Bereich der Substratbindungsstelle am Isoallaxozinring des FADs. Die aktiven Residuen und das FAD sind in grau als Stäbchenmodell dargestellt. Das L-Alanin ist in dunkelblau, das L-Phenylalanin in hellblau und das o-Aminobenzoat in rot als Stäbchenmodell gezeigt.



**Abbildung 3.18 (a) - (c):** Repräsentativer Ausschnitt der  $2DF_o$ - $mF_c$  gewichteten Elektronendichten der roLAAO im Komplex mit L-Alanin (a), L-Phenylalanin (b) und o-Aminobenzoat (c). Dargestellt ist der Bereich der Substratbindungsstelle am Isoalloxozinring des FADs. Die aktiven Residuen und das FAD sind in grau als Stäbchenmodell dargestellt. Das L-Alanin ist in dunkelblau, das L-Phenylalanin in hellblau und das o-Aminobenzoat in rot als Stäbchenmodell gezeigt.

### ***3.10 Vergleich der Struktur der roLAAO mit denen homologer Proteine***

Nachdem die dreidimensionale Struktur der roLAAO gelöst worden war, wurde mit dem Programm DALI durch Vergleich der Sekundärstrukturelemente nach strukturhomologen Proteinen in der PDB-Datenbank gesucht. Diese Suche ergab die höchsten Strukturhomologien zu anderen Proteinen der GH<sub>2</sub>-Familie. Das Ergebnis des Strukturalignment für einige ausgewählte Proteine aus der DALI-Suche ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 3.18:** Ergebnisse des Strukturvergleiches mit Standardeinstellungen anhand der Sekundärstrukturelemente mit dem DALI-Server. Dabei sind die PDB-Kürzel der Strukturen, die Länge der Aminosäuresequenz, die Anzahl alignierter Residuen, die sich daraus ergebende RMS-Abweichung der C $\alpha$ -Atome, die Sequenzidentität und die nach Dym erfolgte Zuordnung zur GH $_2$ -Familie (Dym 2001) aufgeführt.

Name	PDB-ID	Länge	Align	RMS	Seq.Id.[%]	Familie
L-Aminosäure Oxidase, Schlangengift	1f8r-A	483	375	1.9	26	GR2
Monoamin Oxidase, human	1oja_A	497	350	2.6	23	GR2
Polyamin Oxidase, Zea maize	1b37-B	462	347	3	18	GR2
D-Aminosäureoxidase, Schweineniere	1an9-A	340	246	3.6	15	GR2
Sarcosin Oxidase, Bacillus spec.	1el5-A	385	239	4.2	15	GR2
Glycin oxidase, Arthrobacter globiformis	1ng3-A	364	233	4.1	14	
P-Hydroxybenzoat Hydroxylase (phbh), Pseudomona	1pbe_A	391	259	4.4	14	GR2
Phenol Hydroxylase	1foh-A	649	268	4.1	16	GR2
Cholesterol Oxidase	1mxt_A	498	216	4.1	14	GR2
N,N-Dimethylglycin Oxidase	1pj5-A	827	252	3.6	15	
Glucose Oxidase	1gal_A	587	229	4.6	11	GR2

Zusätzlich wurden für einige homologe Proteine noch paarweise Strukturvergleiche mit dem Programm BRAGI (Schomburg 1998) als automatisches Strukturalignment zur roLAAO mit Standardeinstellungen berechnet. Diese Ergebnisse sind in der Tabelle 3.18 zusammengestellt.

**Tabelle 3.19:** Ergebnisse des automatischen, paarweisen Strukturalignments der roLAAO mit anderen Vertretern der GH $_2$ -Familie. Neben dem PDB-Kürzeln sind die Anzahl alignierter C $\alpha$ -Atome, die RMS-Abweichung der alignierten C $\alpha$ -Atome und die sich daraus ergebene Strukturidentität aufgetragen.

Name	PDB-ID	Nr. align. C $\alpha$	RMSD(C $\alpha$ ) [Å]	Struktur-Id.[%]
L-Aminosäure Oxidase, Schlangengift	1f8r-A	314	1.062	65.7
L-Aminosäure Oxidase, Schlangengift	1reo_A	321	1.084	67.2
Monoamin Oxidase, human	1oja_A	222	1.176	44.6
Polyamin Oxidase, Zea maize	1b37-B	184	1.173	38.5
D-Aminosäureoxidase, Schweineniere	1an9-A	113	1.2	23.6
D-Aminosäure Oxidase, Hefe	1c0l_A	119	1.308	24.9
P-hydroxybenzoate hydroxylase (phbh), Pseudomona	1pbe_A	126	1.129	26.4

## **4 Diskussion I**

### **4.1 Expression und Aufreinigung**

Die Übertragung des vorhandenen Aufreinigungsprotokoll für die roLAAO (Geueke 2002) konnte erfolgreich durchgeführt werden. Der Zellaufschluss mit der French-Press funktionierte gut. Diese Methode machte allerdings die Verwendung größerer Puffervolumina nötig. Das Rohlysat konnte direkt auf die Anionenaustausch-Chromatographiesäule aufgetragen werden. Die roLAAO wurde nach zwei Chromatographieschritten in hoher Reinheit und guter Ausbeute erhalten. Ein deutlicher Vorteil der verwendeten Säulen ist die hohe Flussrate von 5ml/min, mit denen die Trennung durchgeführt werden konnte. Damit konnte der Zeitaufwand für die Reinigung der roLAAO um den Faktor 20 verringert werden.

### **4.2 Proteinanalytik**

Da bereits am Institut für Enzymtechnologie der Universität zu Düsseldorf (im Forschungszentrum Jülich) das Protein in vielerlei Hinsicht analysiert wurde und durch erste Kristallisationsversuche bereits bewiesen war, dass das Protein für die Kristallisation rein genug war, wurde im Weiteren auf zusätzliche Experimente zur Charakterisierung verzichtet. Die Reinheit des aus den gefrorenen Zellen nach den beiden Chromatographieschritten erhaltenen Proteins wurde mit SDS-PAGE überprüft und die Proteinkonzentration mit dem Bradford-Test bestimmt. Die Proteinlösung war nicht mit Fremdproteinen kontaminiert. Zu hohe Konzentrationen der roLAAO (> 30mg/ml) führten in einigen Fällen zur Fragmentation des Proteins bei längerer

Lagerzeit. Die roLAAO konnte mit Konzentrationen von 10-20mg/ml in 50ml Glycin pH 8.6 gelagert werden und erwies sich bei 4°C über mehrere Wochen als stabil.

### 4.2.1 SDS-PAGE und native Gelelektrophorese

Die Ergebnisse der SDS-PAGE als auch die der nativen Gelelektrophorese für das native Protein zeigen, dass keine Verunreinigung mit Fremdproteinen nach der Reinigung feststellbar ist. Darüberhinaus liegt die roLAAO einheitlich als Dimer vor. Die Methode konnte zudem gute Hinweise auf die zu testenden Derivatisierungsreagenzien geben. Allerdings sind die zu beobachtenden Unterschiede häufig sehr gering und schwer zu detektieren. Andererseits ist, wie im Falle des Wolframats oder der Osmiumverbindungen gesehen, ein deutlich zu beobachtender Shift im Gel keine Garantie für eine erfolgreiche Derivatisierung. Das für die Phasierung der roLAAO verwendete Quecksilberchlorid führte in zu hohen Konzentrationen (> 20mM) und bei Verwendung frisch angesetzter Lösungen zu einer Zerstörung des Proteins, was erste Hinweise auf den Effekt der Verringerung der Aktivität der Lösung durch längere Standzeiten ergab, die dann erfolgreich optimiert werden konnten, das eine ausreichend hohe Besetzung der Quecksilberpositionen für die Phasierung erreicht werden konnte. Die Methode ist bei Verwendung von Kristallen sehr zeitaufwändig und deutlich weniger aussagekräftig als eine Röntgendiffraktionsmessung. Die Methode kann aber bereits während der Optimierung der Kristallisationsbedingungen eingesetzt werden und durch Voruntersuchungen die benötigte Messzeit für die Röntgendiffraktion verringern.

### 4.2.2 Massenspektrometrische Untersuchungen

Die beobachtete Fragmentierung der roLAAO im MALDI-tof-MS-Experiment wurde nicht durch die für die Messung notwendigen Zusätze von Säuren und Matrixmaterial bedingt. Dies konnte aus den Ergebnissen der SDS-Gelelektrophorese ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich wird durch die Bestrahlung der Probe mit LASER-Licht das Protein zerstört. Die Vermessung der für die MALSI-tof-MS-Experimente eingesetzten Proben mit ESI-MS bestätigten diese Vermutung. Die ESI-MS-Spektren zeigten sehr deutlich die hohe Microheterogenität des Proteins. Dadurch war die Dekonvolierung der Spektren sehr schwierig. Beide massenspektrometrischen Methoden konnten nicht zur Untersuchung von erfolgreichen Derivatisierungen verwendet werden, da die durch die Microheterogenität der Probe bedingte Massenungenauigkeit im Bereich der zu untersuchenden Differenzen lag.

Der Vergleich von Spektren der Proteinlösung und Kristalle zeigt eine deutliche Verringerung dieser Microheterogenität und damit den Reinigungseffekt des Kristallisationsvorgangs. Welche Ursachen die Microheterogenität hat, lässt sich nur vermuten. Es könnte sich z.B. um unspezifische Phosphorylierungen handeln. So ergibt die Suche nach Sequenzmotiven mit Hilfe des Programms PROSCAN mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen der roLAAO. Um genauere Aussagen machen zu können, müsste das Protein eingehender untersucht werden. Die war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

### **4.3 Kristallisation**

Die Kristallisation der roLAAO in der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  erwies sich als sehr zuverlässig, wenn sie durch Impfkristallisation initiiert wurde (*microseeding*). Die Kristalle hatten sehr gute Beugungseigenschaften und auch die Handhabung der Kristalle bei der Überführung in Derivatisierungs- oder Cryolösungen war problemlos. Vor der Überführung mussten die Kristalle jedoch meist erst vorsichtig von der Microbrücke gelöst werden. Dazu musste das Tropfenvolumen erhöht werden. Dies konnte durch Zugabe von Reservoirlösung zum Tropfen geschehen. Die Verwendung einer künstlichen Mutterlauge mit um 20% erhöhten Konzentrationen des Puffers und der Fällungsmittel erwies sich als günstig, wenn die Kristalle für längere Zeit inkubiert wurden.

Die Verwendung von Methylpentandiol anstelle des Isopropanols und PEG 4000 führte zu einer zweiten Kristallform. Die Kristalle hatten ebenfalls gute Beugungseigenschaften, die Reproduzierbarkeit dieser Kristalle gelang ebenfalls zufriedenstellend unter Verwendung von Impfkristallen der  $P2_12_12_1$ -Kristallform; das Wachstum der Kristalle war aber sehr viel langsamer. Aus diesem Grunde wurden für die Derivatisierungsexperimente ausschließlich Kristalle der  $P2_12_12_1$ -Kristallform eingesetzt. Der Vorteil dieser Kristalle ist allerdings, dass sie in Cryopuffer wachsen und direkt aus dem Tropfen montiert werden können. Dadurch hatten die Kristalle durch den geringeren mechanischen Stress weniger Fehlordnungen.

#### **4.4 Derivate und erste Phasierungen**

Die Ansätze zur Cokristallisation mit Schwermetallreagenzien führte zwar mit Kaliumtetrachloroplatinat, Kaliumhexachloroosmat und Merbromin zu Kristallen, diese konnten aber teils aufgrund der geringen Größe nicht vermessen werden. Die mit Kaliumhexachloroosmat und Merbromin cokristallisierten Kristalle besaßen ein zu schwaches Signal, um zur Phasierung eingesetzt werden zu können. Daher wurde das native Protein erst kristallisiert und die nativen Kristalle anschließend durch *soaking* derivatisiert.

Die potentiellen Derivate wurden durch Berechnung der isomorphen Differenzen und der daraus berechneten Positionen der Schweratome bewertet. Das Auffinden reproduzierbarer Schweratompositionen bei mit dem gleichen Reagenz behandelten Kristallen war ein guter Hinweis auf eine erfolgreiche Derivatisierung. Das zu erwartende anomale Signal konnte zwar nicht abgeschätzt werden, daher wurden ein möglichst hoher Besetzungsgrad der Positionen und eine gute Datenstatistik des Kristalls als Kriterien für die Auswahl der Kristalle für die Strukturlösung herangezogen. Alle in SOLVE verwendeten Bewertungskriterien zeigten eine hohe Korrelation zum Besetzungsgrad der Positionen.

Bei der Derivatisierung mit Quecksilberchlorid konnte aus Diffraktionsdaten für viele Kristalle reproduzierbar die Substruktur von vier Quecksilberatomen in SOLVE berechnet werden.

Aufgrund der geringen Korrelation der Datensätze und der schwachen Besetzung der Quecksilberpositionen konnte die Struktur der roLAAO aus den MAD-Diffraktionsdaten nicht ermittelt werden.

### **4.5 Optimierung der Derivatisierung**

Um die Intensität des anomalen Signal zu optimieren, wurde bei der Quecksilberchlorid-Derivatisierung bei den verwendeten Kristallen auf das Auffinden der vier Quecksilberpositionen und die berechnete Besetzung dieser Positionen in SOLVE geachtet. Der für das SAD-Experiment verwendete Kristall hatte bei der Auswertung als SIR-Fall eine um den Faktor sieben höhere Besetzung der Positionen als der Kristall der MAD-Messung. Alle mit Quecksilberchlorid durchgeführten Derivatisierungen zeigten, dass die Standzeit der verwendeten Derivatisierungslösung eine große Rolle spielte. Frisch angesetzte Lösungen waren zu reaktiv, sodass die Kristalle stark geschädigt wurden. Lösungen, die über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr gelagert worden waren, waren nicht mehr reaktiv genug und führten in den Kristallen zu einer sehr schwachen Besetzung der Schweratompositionen, wie im Falle des Kristalls des MAD-Experimentes (5-12% bei SIR-Auswertung). Der für die Strukturlösung verwendete Kristall wurde mit einer Lösung derivatisiert, die eine Standzeit von fünf Monaten hatte.

Da kein wellenlängen-abhängiges Fluoreszenzsignal des Quecksilbers detektiert werden konnte, obwohl mit den SIR-Daten dieses Kristalls die vier Quecksilberpositionen mit guter Besetzung gefunden worden waren, wurde von einem Kristall ein Datensatz bei der theoretischen *peak*-Wellenlänge der Quecksilber L(III)-Kante bei  $\lambda=1.008\text{\AA}$  mit einer hohen Redundanz aufgenommen.

Es wurde darauf verzichtet, Daten bis zur Auflösungsgrenze des Kristalls aufzunehmen, da in den meisten Fällen das anomale Signal bei einer Auflösung oberhalb von  $2.5\text{\AA}$  zu schwach ist. Die Optimierung der Messstrategie durch die Verwendung des Programms BEST (Popov 2003) war erfolgreich und trug zur optimalen Ausnutzung der vorhandenen Synchrotronmesszeit bei. Dabei wurden durch das Programm sowohl der Drehwinkel/Bild, als auch die für ein Signal/Rauschverhältnis von 5 über den

gewünschten Auflösungsbereich notwendige Belichtungszeit vorgeschlagen. Die berechneten Datenstatistiken stimmten mit den experimentellen überein.

Durch das Vorliegen eines Dimers in der asymmetrischen Einheit und die Inkorporation von zwei Quecksilberatomen pro Monomer besteht die Substruktur aus nur vier Atomen, die mit den direkten Methoden in SHELX oder SHARP als auch den Patterson-Suchroutinen (SOLVE) verlässlich gefunden wurden. Neben hoher Redundanz war die gute Datenqualität ausschlaggebend für den Erfolg der Phasierung mit der SAD-Methode. Aus den berechneten Anfangsphasen konnte die Händigkeit bestimmt und damit die Phasenambiguität überwunden werden.

#### **4.6 Strukturlösung mit SAD und Modellbau**

Die mit dem automatischen Skript in autoSHARP durchgeführte Substruktursuche und Phasierung lieferte ausgezeichnete Ergebnisse. Dabei war, wie erwartet, die Verbesserung der Phasen durch die Dichtemodifikation mit SOLOMON (CCP4, (Collaborative Computational Project 1994) am effektivsten (Rice 2000). Die nach der Dichtemodifikation erhaltenen Elektronendichten besaßen bereits eine hohe Qualität. Das mit ARP/wARP innerhalb des autoSHARP-Paketes nach Phasenerweiterung auf 2.45Å (Auflösungsgrenze des SAD-Datensatzes) erzeugte Strukturmodell besaß bereits ohne Verwendung der nativen Daten 67% der Hauptkettenatome des Proteins; die Strukturlösung war somit allein mit den Derivatdaten möglich. Die Phasenerweiterung und die Dichtemodifikation auf 2.0Å nach Kombination mit den nativen Daten führten zu einer Elektronendichte, in die im zweiten Modellbauzyklus mit ARP/wARP nahezu das vollständige Strukturmodell des Dimers der LAAO, inklusive der Cofaktoren, automatisch eingebaut werden konnte. Nur vier Residuen, die in der Elektronendichte nicht sehr gut definiert waren und hohe B-Faktoren besaßen, mussten manuell eingebaut werden. Für den Loop zwischen den Residuen 432-440 ist keine Elektronendichte zu erkennen.

Dieser Bereich ist in beiden Monomeren zu flexibel, das gleiche gilt für die ersten 2 und letzten drei Residuen am N- bzw. C-Terminus der roLAAO, die nicht in das Modell eingebaut werden konnten. Insgesamt war mit den verwendeten Datensätzen des Derivates und des nativen Proteins eine schnelle und fast vollautomatische Strukturlösung möglich.

### **4.7 Komplexstrukturen der roLAAO**

In den beiden Substratstrukturen sind die funktionellen Gruppen der Substrate sehr gut in den Elektronendichten definiert. Die B-Faktoren der Amino- und Carboxylgruppe liegen im Bereich der Proteinatome im aktiven Zentrum ( $B \sim 10 \text{ \AA}^2$ ). Der Phenylring des L-Phenylalanins ragt aus der Bindungsstelle am Isoalloxozinring in den hydrophoben Trichter des Zugangsbereiches des aktiven Zentrums und kann dort eine flexible Position einnehmen. Daher ist die Elektronendichte in diesem Bereich schlechter definiert. Die Atome des aromatischen Ringes haben durch die Flexibilität höhere B-Faktoren, die zwischen  $24\text{-}29 \text{ \AA}^2$  liegen.

Die Elektronendichte des o-Aminobenzoatmoleküls ist nicht so klar wie die der beiden Substrate, aber deutlich zu erkennen, sodass eine Positionierung in beiden Untereinheiten des Moleküls möglich war. Die B-Faktoren sind daher deutlich höher als für die Substrate ( $\sim 45 \text{ \AA}^2$ ), da sich die gebundenen Moleküle nicht exakt in der gleichen Orientierung befinden.

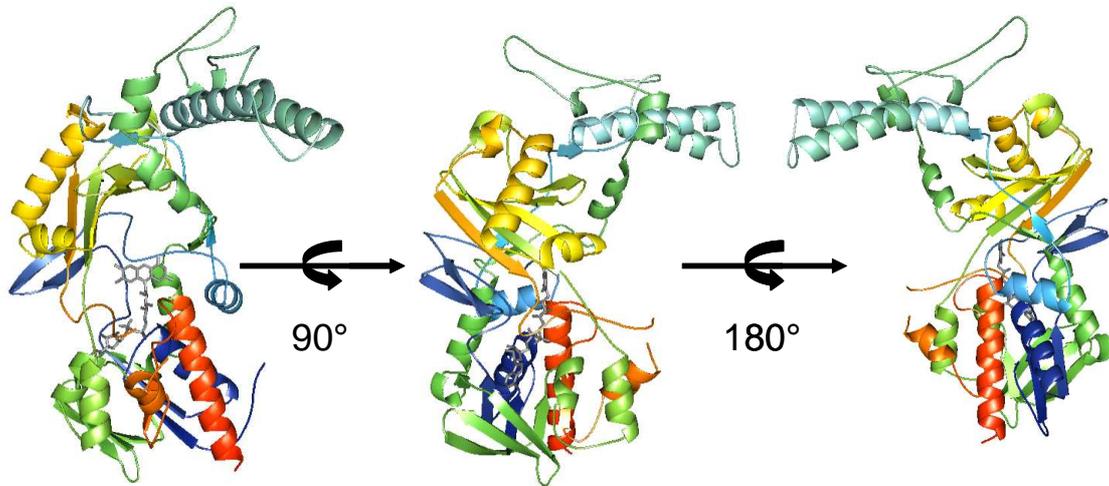
## 5 Diskussion II: Die Struktur der roLAAO

### 5.1 Tertiärstruktur und Quartärstruktur der roLAAO

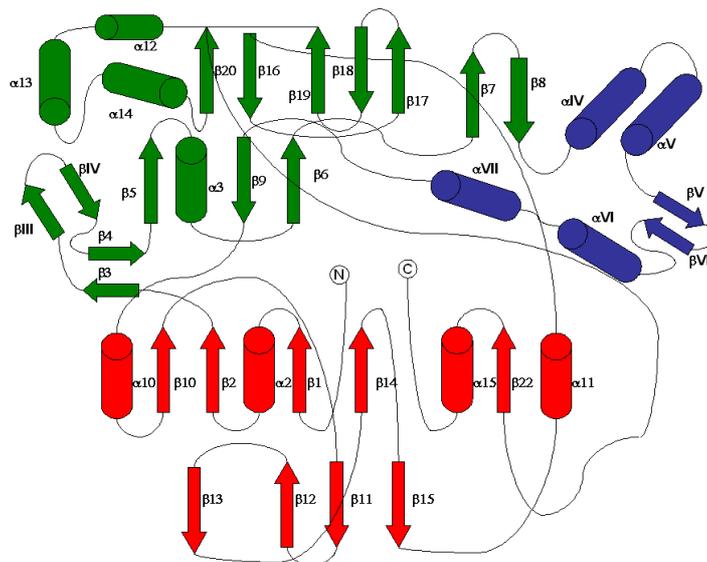
Die RoLAAO kristallisiert in der Kristallform der Raumgruppe  $P2_12_12_1$ , mit zwei Monomeren in der asymmetrischen Einheit. Das Monomer hat eine räumliche Ausdehnung von  $79\text{\AA} \times 52\text{\AA} \times 44\text{\AA}$ , das Dimer von  $100\text{\AA} \times 64\text{\AA} \times 68\text{\AA}$ .

Die beiden Monomere eines Dimers unterscheiden sich kaum voneinander. Die Verfeinerung der Struktur der roLAAO wurden ohne Berücksichtigung der nicht-kristallographischen Symmetrie vorgenommen, d.h. die beiden Monomere wurden unabhängig voneinander verfeinert. Die beiden Monomere können im ungebundenen Protein mit RMS-Abweichungen der Hauptkettenatome mit einem  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha} = 0.11\text{\AA}^2$  aufeinander angepasst werden. Die Unterschiede liegen in der Anordnung einzelner, flexibler Reste auf der Proteinoberfläche, erkennbar an den höheren B-Faktoren. Die Unterschiede lassen sich auf die statische und dynamische Unordnung der Monomere im Kristall zurückführen. In Abbildung 5.1 ist die Struktur eines Monomers mit Sekundärstrukturelementen aus verschiedenen Perspektiven dargestellt.

Das Protomer der roLAAO besteht aus 13  $\alpha$ -Helices, 27  $\beta$ -Strängen und sechs  $3_{10}$ -Helices, die in drei Domänen zu finden sind. Die Bezeichnung der Sekundärstrukturelemente wurde denen der LAAO aus *Calloselasma rhodostoma* (Pawelek 2000) weitest möglich angepasst. Abbildung 5.2 zeigt schematisch die Topologie der roLAAO.



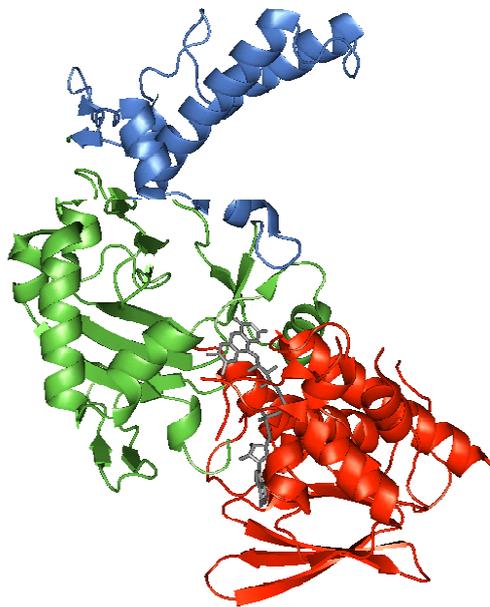
**Abbildung 5.1:** Das Monomer der roLAAO als Banddiagramm aus verschiedenen Blickwinkeln. Dabei wurde das Monomer entlang vertikal des Isoalloxozinringes um  $90^\circ$  bzw.  $270^\circ$  gedreht. Die Einfärbung folgt von blau nach rot der Aminosäuresequenz vom N- zum C-Terminus.



**Abbildung 5.2:** Topologiediagramm des Monomers der roLAAO. Faltblätter sind durch Pfeile, Helices durch Tonnen dargestellt. Die zur FAD-Bindungsdomäne gehörenden Sekundärstrukturelemente sind rot, die der Substrat-Bindungsdomäne grün und die der helicalen Domäne blau eingefärbt. Die Nomenklatur wurde, soweit wie möglich, denen der Sekundärstrukturelemente der crLAAO angepasst.

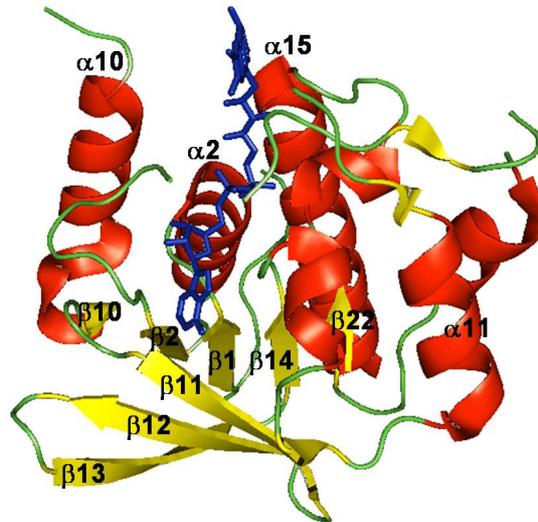
### 5.1.1 Die Domänenstruktur der roLAAO

Die LAAO besteht aus drei gut definierten Domänen, der FAD-Bindungsdomäne, der Substratbindungsdomäne und einer helicalen oder Dimerisierungsdomäne. Die Anordnung der Domänen ist in Abbildung 5.3 dargestellt.



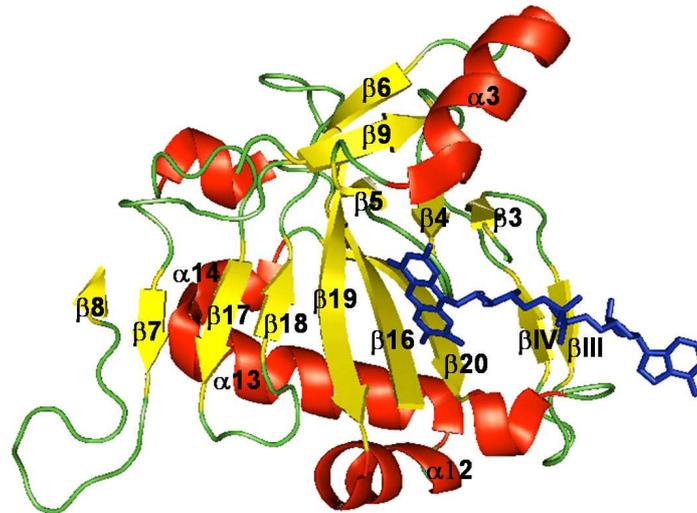
**Abbildung 5.3:** Die Domänen eines Monomers der roLAAO als Banddiagramm. Die FAD-Bindungsdomäne ist in rot, die Substratbindungsdomäne in grün und die helicale Domäne in blau eingefärbt. Das FAD ist als Stäbchenmodell in grau dargestellt.

Die FAD-Bindungsdomäne (Abb. 5.4) wird aus drei unzusammenhängenden Regionen der Struktur (Residuen 4-50, 237-315, 423-488) gebildet. Sie besteht aus einem zentralen fünfsträngigen ( $\beta$ 1,2,10,14,22), parallelen Faltblatt, welches auf einer Seite von drei Helices ( $\alpha$ 10, 14, 15) und auf der anderen Seite von einem viersträngigen ( $\beta$ 11-13, 15), antiparallelen Faltblatt eingefasst wird. Diese Domäne zeigt die klassische Rossmann-Faltung, die typisch für NAD(P)- und FAD-bindende Proteine ist.



**Abbildung 5.4:** Bandendiagramm der FAD-Bindungsdomäne der roLAAO. Die Helices sind in rot, die Faltblätter in gelb, und der Verlauf der Proteinhauptkette in grün dargestellt. Das FAD ist als Stäbchenmodell dargestellt.

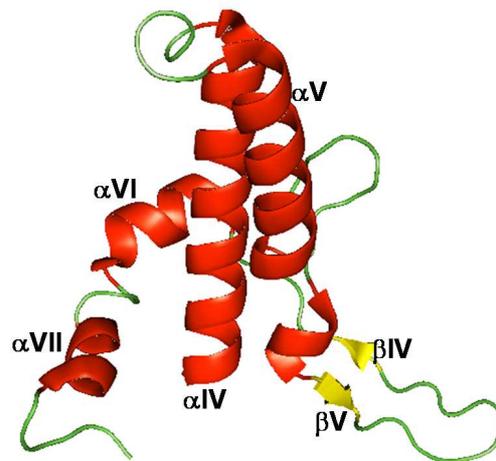
Die Substratbindungsdomäne (Abb. 5.5) setzt sich aus den Residuen 52-128, 230-238 und 321-422 zusammen. Eine ausgedehnte Faltblatt-Struktur aus einem siebensträngigen parallelen ( $\beta 7$ ,  $\beta 8$ ,  $\beta 16-20$ ) und einem zweisträngigen ( $\beta 7$  und  $\beta 8$ ), antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt wird von zwei Helices ( $\alpha 13$  und  $\alpha 12$ ) flankiert. Ein weiteres, dreisträngiges antiparallelen Faltblatt ( $\beta 5$ ,  $6$  und  $9$ ) wird von einer Helix ( $\alpha 14$ ) flankiert. Das Faltblatt wird durch ein zusätzliches zweisträngiges ( $\beta III$  und  $\beta IV$ ), antiparalleles Faltblatt stabilisiert.



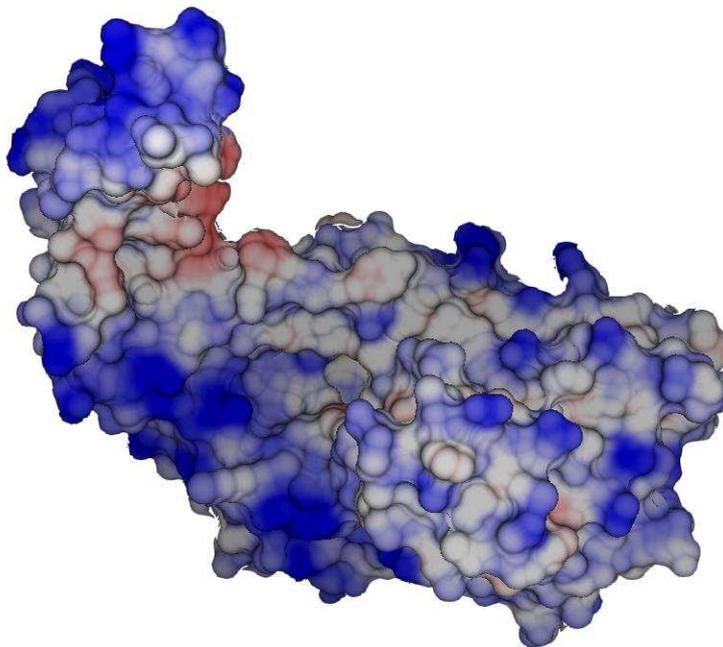
**Abbildung 5.5:** Bandendiagramm der Substrat-Bindungsdomäne der roLAAO. Die Helices sind in rot, die Faltblätter in gelb, und die restliche Proteinhauptkette in grün, das FAD-Molekül als blaues Stäbchenmodell dargestellt.

Die helicale Domäne des Proteins besteht aus vier Helices (Residuen 127-225,  $\alpha$ IV-VII) und einen ausgedehnten Loop, der durch ein zweisträngiges, antiparalleles Faltblatt ( $\beta$ V, VI) stabilisiert wird.

Ein zweisträngiges antiparalleles Faltblatt findet sich zwischen FAD- und Substratbindungsdomäne. Insgesamt gibt es sieben Interdomänenverbindungen.



**Abbildung 5.6:** Bandendiagramm der helicalen Domäne der roLAAO. Die Helices sind in rot, der Verlauf der Proteinhauptkette in grün, das FAD-Molekül als Stäbchenmodell dargestellt.



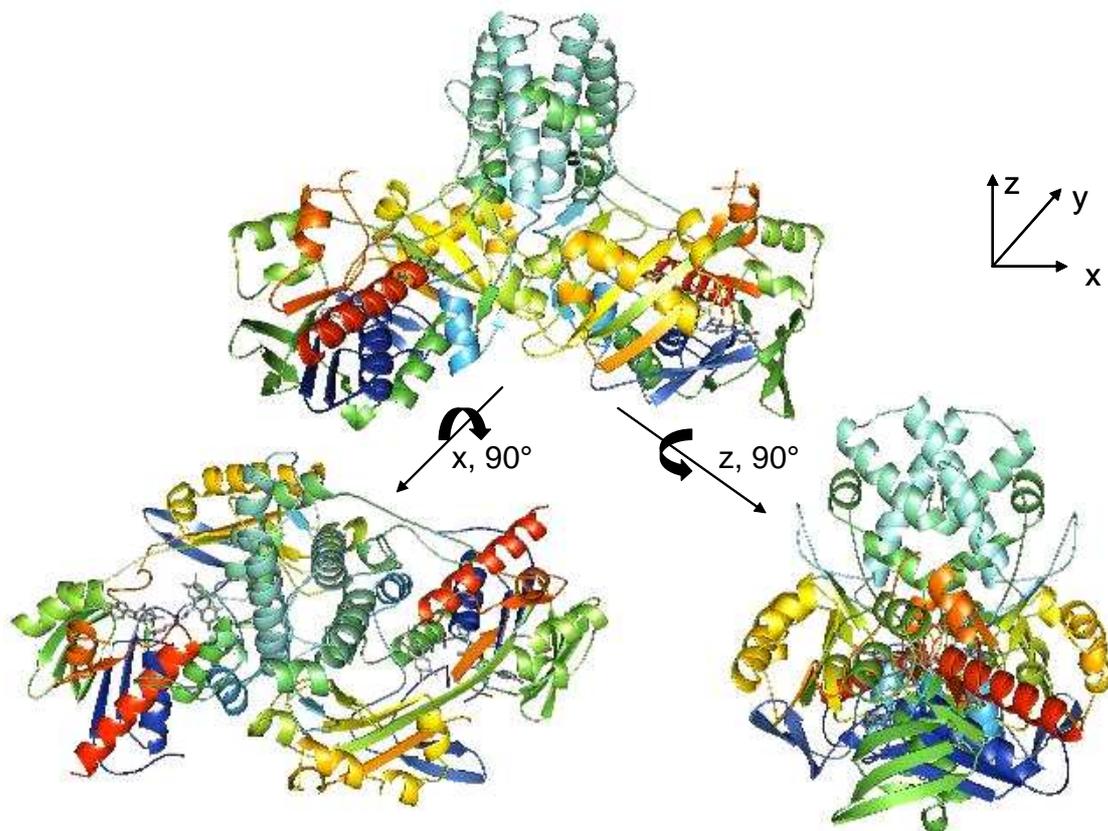
**Abbildung 5.7:** Die hydrostatische Oberfläche eines roLAAO Monomers, berechnet in BRAGI (Schomburg 1998). Die Färbung erfolgt von blau (hydrophil) über weiß (neutral) nach rot (hydrophob).

### 5.1.2 Das funktionelle Dimer

Alle bislang untersuchten LAAOs sind als Homodimere beschrieben (Pawelek 2000). Auch die LAAO aus *Rhodococcus opacus* liegt in Lösung als Dimer vor (Geueke 2002).

Das Vorliegen in der monomeren Form wäre aufgrund der großen hydrophoben Bereiche des helicalen Loops und dessen ausgedehnter Oberfläche energetisch sehr ungünstig (Abb. 5.7). Durch die Dimerisierung jedoch werden diese hydrophoben Bereiche der helicalen Domänen abgedeckt. Der lange, durch zwei kurze, zweisträngige antiparallele Falblätter stabilisierte Loop der helicalen Domäne eines Monomers umschlingt zudem das korrespondierende Monomer und bildet einen Teil des zum aktiven Zentrum führenden Trichter.

Die hohe Stabilität des Dimers zeigt sich auch an der Größe der Kontaktfläche. Die Kontaktfläche der roLAAO innerhalb des Dimers beträgt  $3589\text{\AA}^2$  und ist damit doppelt so groß wie die mittlere Kontaktfläche nach Jones und Thornton für Homodimere von  $1685\text{\AA}^2$  (Jones und Thornton, 1996).



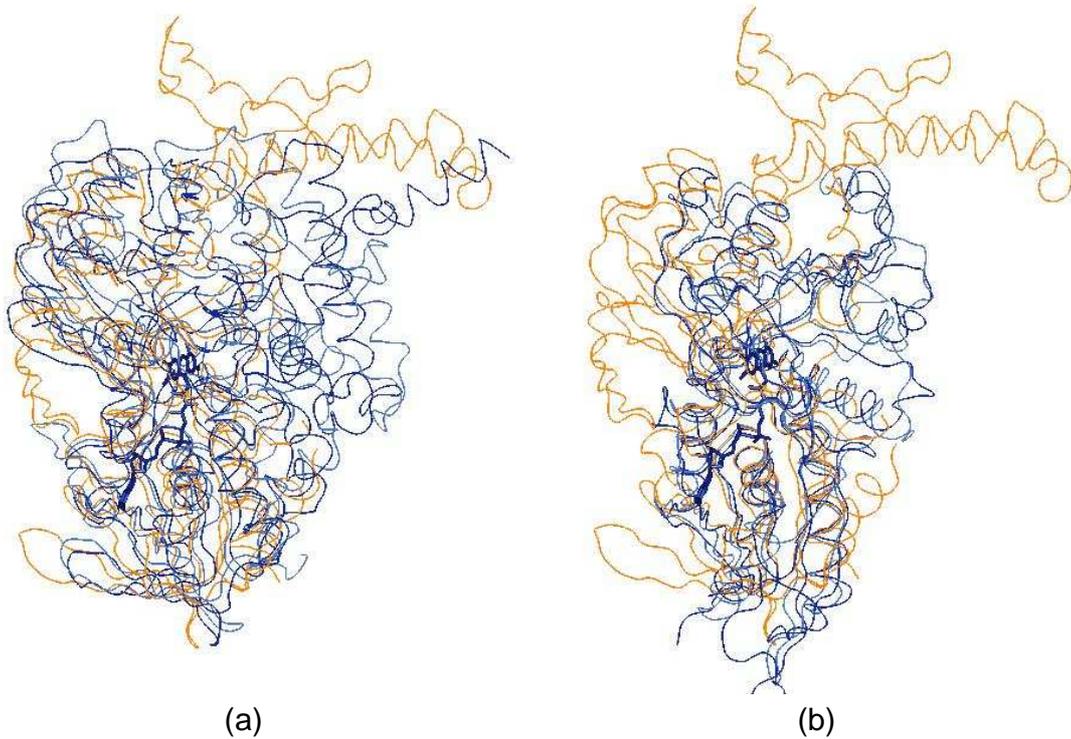
**Abbildung 5.8:** Das funktionelle Dimer der roLAAO als Banddiagramm aus verschiedenen Blickwinkeln. Die Färbung der Ketten erfolgt vom N- zum C-Terminus von blau nach rot in den Monomeren. Die FAD-Moleküle sind als Stäbchenmodell in grau dargestellt.

## 5.2 Strukturhomologe Proteine

Bei den Proteinen der GH<sub>2</sub>-Familie ist eine deutliche Sequenzhomologie nur im N-terminalen Bereich vorhanden, der an der Ausbildung der FAD-Bindung beteiligt ist. Der Vergleich der dreidimensionalen Strukturen zeigt wie erwartet, dass die Topologien dieser Proteine sehr viel ähnlicher sind, als die Sequenzidentität vermuten lässt. Obwohl zwischen den Schlangengift LAAOs und der LAAO aus *Rhodococcus opacus* nur eine 23 bzw 26% Sequenzidentität besteht, beträgt die strukturelle Übereinstimmung 66 bzw. 67%, wenn bei einem strukturellen Alignment für strukturell äquivalente C<sub>α</sub>-Atome eine obere Zuordnungsgrenze von 1.8 Å gesetzt wird. Die Strukturidentität zur Monoamin

Oxidase und zur Polyamin Oxidase beträgt noch 45 bzw 39%. Die D-Aminosäureoxidasen, die die gleiche Reaktion wie die LAAOs für die D-Enantiomere der Aminosäuren katalysieren, zeigen noch eine Strukturidentität von ~25%. Die Struktur der roLAAO ist ein erneutes Beispiel für die bei Vallon und Dym & Eisenberg diskutierte Topologieähnlichkeit der FAD-bindenden Proteine der GH<sub>2</sub>-Familie (Dym & Eisenberg 2001, Vallon 2000). Die folgenden Abbildung zeigen die Superposition der roLAAO mit verschiedenen Vertretern der GH<sub>2</sub>-Familie.

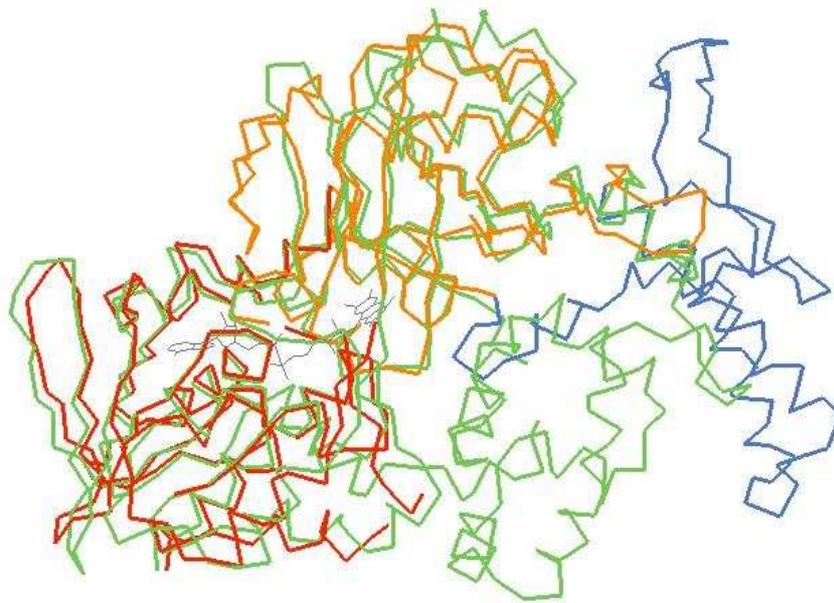
Dabei befinden sich, wie die Superpositionen der roLAAO mit der Polyamin Oxidase, der Monoamin Oxidase und den D- und L-Aminosäure Oxidasen (Abb. 5.11 (a)-(c)) zeigt, die strukturellen Übereinstimmungen hauptsächlich im Bereich der FAD-Bindungsdomäne. In den D-Aminosäure Oxidasen sind die Substratbindungsdomänen weniger ausgedehnt. Die DAAOs, die PAO und MAO besitzen keine helicalen Domänen. Eine der roLAAO vergleichbare räumliche Anordnung helicaler Bereiche oder Loopregionen findet sich in keiner der homologen Proteine.



**Abbildung 5.9 (a)+(b):** Superposition der Hauptketten der homologen Proteine der GH<sub>2</sub>-Familie. Die roLAAO ist in allen Abbildungen in orange gefärbt. Das FAD ist als Stäbchenmodell in blau dargestellt. (a) Superposition der Hauptketten der Polyaminoxidase (hellblau, PDB-Kürzel 1B37\_A) und Monoamin Oxidase (dunkelblau, PDB-Kürzel 1OJA\_A) mit der roLAAO. (b) Superposition der Hauptketten der D-Aminosäure Oxidasen aus Schweineniere ( hellblau, PDB-Kürzel 1DAO\_A) und Rh. gracilis (dunkelblau, PDB-Kürzel:1C0P\_A ) mit der roLAAO.

### 5.2.1 Strukturvergleich zwischen roLAAO und crLAAO

Die roLAAO besteht, wie die crLAAO aus drei Domänen. In der folgenden Abbildung sind die Strukturen der beiden L-Aminosäureoxidasen superpositioniert.



**Abbildung 5.10:** Superposition der C<sub>α</sub>-Ketten der LAAO aus *Calloselasma rhodostoma* (grün) und der aus *Rhodococcus opacus*. Zur Übersicht sind die Domänen der roLAAO, die FAD-bindende Domäne in rot, die Substrat-bindende in orange und die Dimerisierungsdomäne in blau, farblich gekennzeichnet.

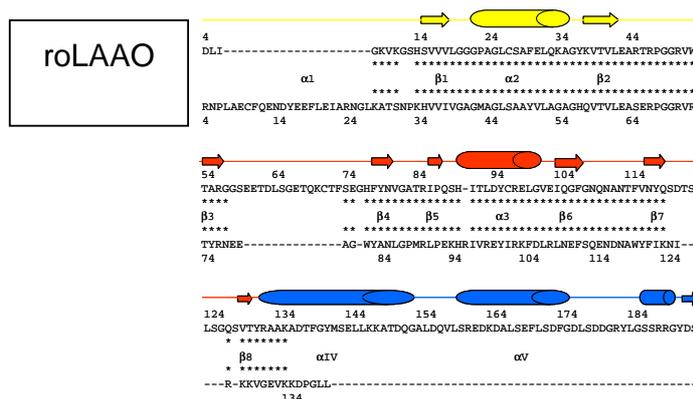
Die FAD-Bindungsdomäne beider Proteine weist die größte Ähnlichkeit auf. Hier unterscheiden sich die Strukturen nur im Detail. Bei der roLAAO existiert die in der crLAAO vorhandene Helix  $\alpha_1$  nicht. Die Sequenz der roLAAO beginnt mit dem ersten Faltblatt des Rossmann-Folds. Die korrespondierenden Residuen des in der Elektronendichte der roLAAO nicht definierten Bereiches der Residuen 433-439 gehören in der crLAAO zu einer Interdomänen-Helix zwischen Substrat- und FAD-Bindungsdomäne, die in der Topologie nicht bezeichnet ist. Diese Helix findet sich auch

## 5 Diskussion II: Die Struktur der roLAAO

in der roLAAO, ist aber deutlich kürzer. Innerhalb der Substratbindungsdomäne ist der Loop zwischen den beiden antiparallelen Strängen  $\beta 3$  und  $\beta 4$  deutlich länger als in der crLAAO und bildet ein weiteres zweisträngiges, antiparalleles Faltblatt ( $\beta III$  und  $\beta IV$ ) aus. Die Position der Stränge  $\beta 3$  und  $\beta 4$  erweitert das dreisträngige, antiparallele Faltblatt der crLAAO zu einem fünfsträngigen, antiparallelen Faltblatt.

Der größte Unterschied zwischen den beiden Proteinen ergibt sich aber aus der Position und der Struktur der helicalen Domänen. Ein Teil der helicalen Domäne des zweiten Monomers des roLAAO-Dimers befindet sich in der Position, die die Loop-Region in der crLAAO einnimmt. Die Anordnung der helicalen Domänen führt zur Bildung völlig verschiedener Dimere. Dies könnte der Grund für den Misserfolg der Strukturbestimmung der roLAAO mit molekularem Ersatz sein, bei der das Monomer der crLAAO als Suchmodell verwendet wurde.

Die folgende Abbildung zeigt das strukturrichtige Sequenzalignment der beiden L-Aminosäureoxidasen.



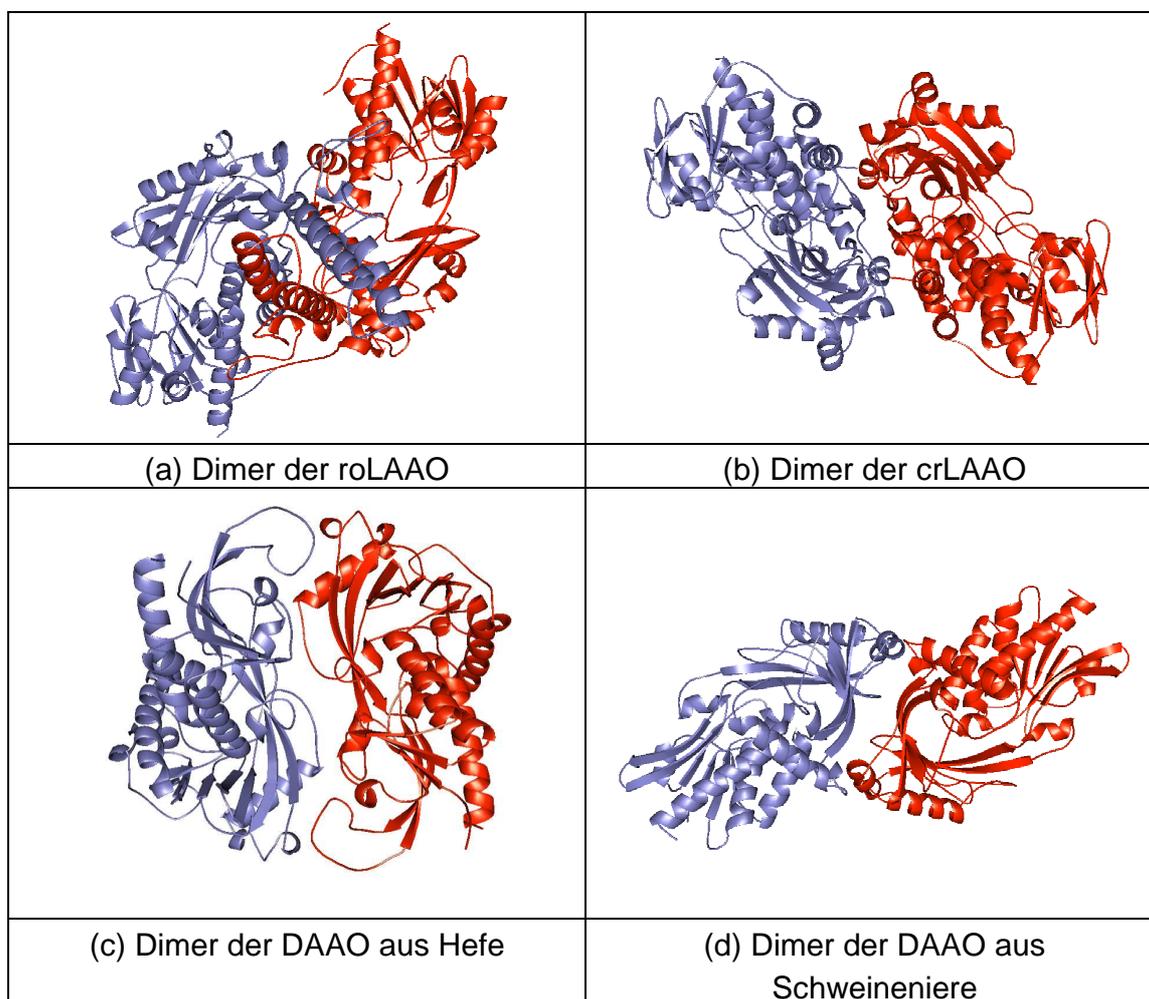


## 5 Diskussion II: Die Struktur der roLAAO

---

abgeschirmt werden. Diese Art der Dimerisierung kommt in keinem der Proteine der GH<sub>2</sub>-Familie vor. Das Dimer der crLAAO unterscheidet sich von dem der roLAAO auch durch die relative Lage der beiden Monomere zueinander. Ein Grund könnte sein, dass die crLAAO glykosyliert ist und sich eine Glykosylierungsstelle in der helicalen Domäne befindet, sodass die Anordnung des Dimers dadurch anderen Zwängen unterliegt als in der roLAAO. Die aktiven Zentren sind in der roLAAO auf der selben Seite des Moleküls angeordnet, in der crLAAO auf entgegengesetzten Seiten.

Bei den DAAOs zeigen die Proteine aus verschiedenen Organismen (Schweineniere und Hefe) ebenfalls ein unterschiedliches Dimerisierungsverhalten. Während die pcDAAO in der Kopf-an-Kopf-Anordnung vorliegt, bildet die yDAAO eine Kopf-an-Schwanz-Dimerisierung. Die Größe der Kontaktflächen ist in beiden Proteinen vergleichbar. Im Falle der yDAAO wird diese Dimerisierung hauptsächlich durch einen Loop erreicht. Durch Mutationsexperimente konnte gezeigt werden, dass die Verkürzung dieses Loops dazu führt, dass das Protein nicht mehr als Dimer stabil ist und in der monomeren Form vorliegt (Piubelli 2003).



**Abbildung 5.12 (a)-(d):** Die Dimere der LAAOs und DAAOs als Banddiagramme. Zur besseren Unterscheidung ist je ein Monomer blau, eins rot gefärbt.

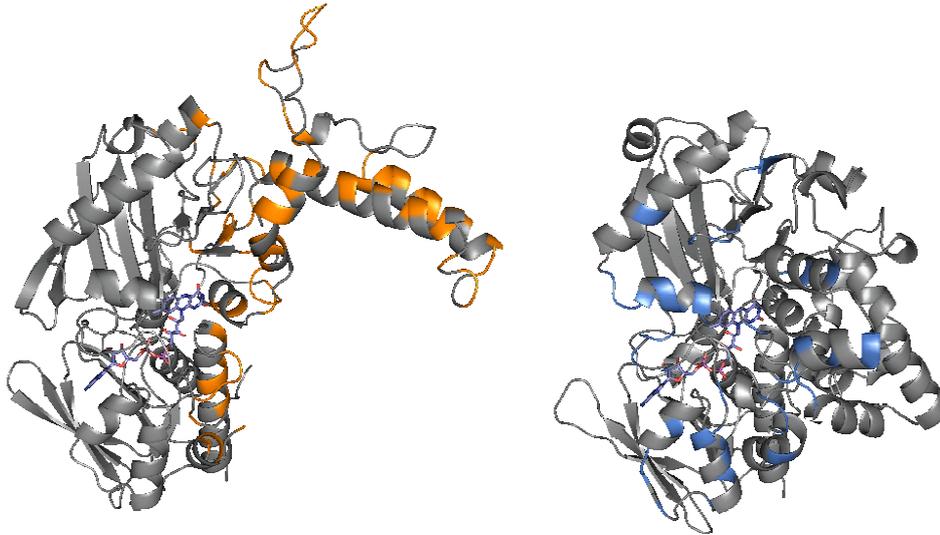
**Tabelle 5.1:** Übersicht über die Größe der Oberflächen und Kontaktflächen der LAAOs und DAAOs.

Protein	roLAAO	crLAAO	pkDAAO	yDAAO
PDB-Kürzel		1F8R	1DDO	1C0P
Oberfläche der Monomere ( $\text{\AA}^2$ )	20809	20736	14745	16069
Oberfläche des Komplexes ( $\text{\AA}^2$ )	34441	37549	26512	29277
Gesamtkontaktfläche ( $\text{\AA}^2$ )	7178	3923	2977	2860
Kontaktfläche pro Monomer ( $\text{\AA}^2$ )	3589	1961	1489	1430
Anteil Kontaktfläche an Gesamtfläche des Monomers (%)	17.2	9.5	10.1	8.9

## 5 Diskussion II: Die Struktur der roLAAO

---

Die Kontaktflächen der beiden DAAOs und der crLAAOs machen 9-10% der Oberfläche des Monomers aus ( $1430\text{-}1961\text{\AA}^2$ ), was im Bereich der für Homodimere beschriebenen mittleren Kontaktfläche liegt (Jones 1996). Im Falle der roLAAO ist diese Fläche mit  $3589\text{\AA}^2$  doppelt so groß.



**Abbildung 5.13:** Vergleich der Kontaktflächen der beiden LAAOs. Die beiden Monomere der roLAAO (links) und crLAAO (rechts) sind als Bandmodelle dargestellt; die Teile des Proteins, die an der Dimerisierung beteiligt sind, sind in orange (roLAAO) bzw. blau (crLAAO) markiert; das FAD-Molekül ist als Stäbchenmodell gezeigt.

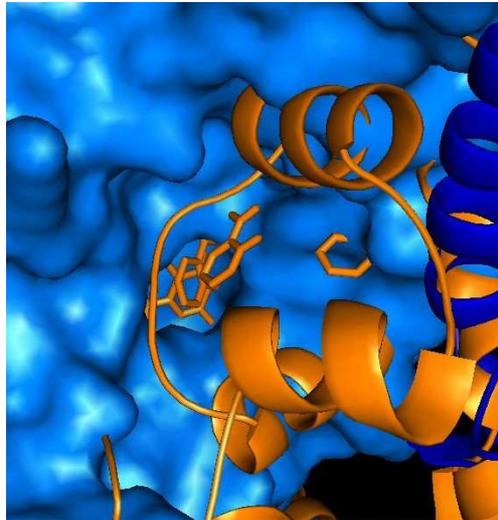
Der Vergleich der an der Dimerisierung beteiligten Residuen zeigt, dass in der roLAAO die Kontaktfläche fast ausschliesslich durch Residuen der helicalen Domäne gebildet wird. Ausser der C-terminale Helix sind keine Reste der Substrat- und FAD-Bindungsdomäne an der Dimerisierung beteiligt. In der crLAAO findet die Dimerisierung sowohl über Bereiche der helicalen Domäne als auch über andere helicale Bereichen der Substrat- und FAD-Bindungsdomäne statt. Die bei der Dimerisierung der crLAAO gebildete vier-Helix-Bündel Struktur hat strukturell grosse Ähnlichkeit mit der Rezeptorbindungsstelle des *human growth factor*. Dort liegt die Rezeptorbindungsstelle zwischen zwei solcher Helixbündel (Brandon & Tooze 1999). Aufgrund der Ähnlichkeit

ließe sich eventuell vermuten, dass dieser Bereich in der Evolution einmal eine katalytische Funktion hatte, die verloren gegangen ist.

### **5.3 Das aktive Zentrum der roLAAO**

Das aktive Zentrum der roLAAO, in dessen Mittelpunkt der Isoalloxozinring des FAD liegt, befindet sich zwischen Substrat- und FAD-Bindungsdomäne. Im Dimer liegen die Zugänge zu den aktiven Zentren auf derselben Oberfläche des Dimers.

Das aktive Zentrum ist von einem hydrophoben Trichter von 23Å x 20Å Breite und 21Å Tiefe umgeben. Am Boden des Trichters verengt sich dieser unmittelbar vor der Substratbindungsstelle am Isoalloxozinring auf 5Å x 6Å. Im Vergleich dazu gelangt das Substrat in der crLAAO durch einen Kanal, der von Residuen der helicalen Domäne gebildet wird, zum aktiven Zentrum. Ungeeignete Substrate können so nicht in die Nähe des aktiven Zentrums gelangen. In der roLAAO existiert dieser begrenzte Zugang nicht, was das sehr breite Substratspektrum des Enzyms erklärt. Die Seitenketten der Substrate liegen in dem breiten hydrophoben Trichter und sind zum Solvenz exponiert.

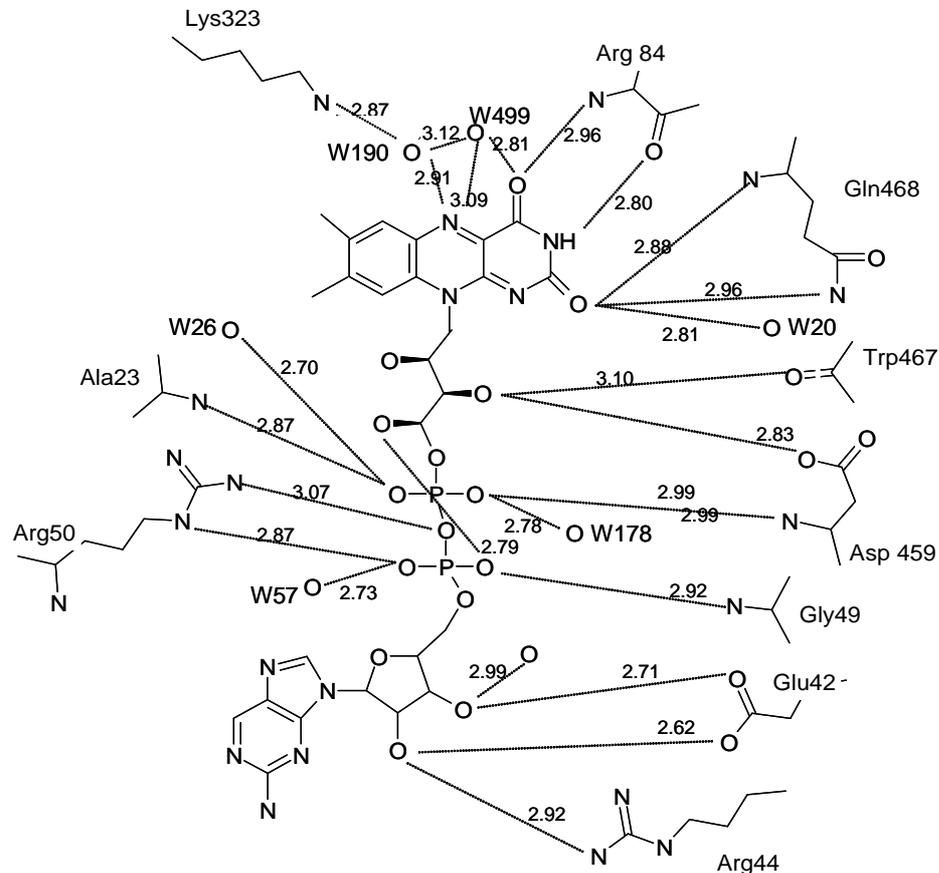


**Abbildung 5.14:** Vergleich des Zugangs zum aktiven Zentrum in den beiden L-Aminosäureoxidasen. Die Oberfläche eines Monomers in der Umgebung des aktiven Zentrums der roLAAO ist in hellblau dargestellt. Die blaugefärbte Helix gehört zum zweiten Monomer des Dimers. Der durch die Residuen der helicalen Domäne gebildete Tunnel der crLAAO ist als Banddiagramm in orange dargestellt; die o-Aminobenzoatmoleküle, die den Weg des Substrates beschreiben, und der Isoalloxozinring sind als orange Stäbchenmodelle gezeigt.

### 5.3.1 Die Koordination des FAD-Cofaktors

Wie bei den meisten Vertretern der GR<sub>2</sub>-Familie (Dym 2001) ist das FAD nicht kovalent in der elongierten Form gebunden. Der Cofaktor wird durch zahlreiche Wechselwirkungen mit dem Protein und konservierten Wassermolekülen in seiner Position im Inneren des Proteins fixiert. Durch Behandlung mit Kaliumbromid ist es zwar möglich, den Cofaktor aus der roLAAO zu extrahieren; diese Reaktion ist aber irreversibel - eine Rekonstitution des aktiven Proteins durch Zugabe von FAD ist nicht möglich (Geueke, 2002).

Der Isoalloxozinring des FAD ist zwischen der Substrat- und FAD-Bindungsdomäne lokalisiert. Die meisten der potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen werden durch das Protein ausgebildet, was zu einem engen Netzwerk an Wechselwirkungen führt. Die Temperaturfaktoren des Cofaktors sind wie die des gesamten Proteins sehr niedrig ( $B_{7-12} \text{ \AA}^2$ ). Auch im ungebundenen Zustand ist der Isoalloxozinring leicht gebogen und nicht völlig planar (RMSD Abweichung von der idealen Planarität  $0.17 \text{ \AA}$ ). Die C(2)=O und C(4)=O-Gruppen und die Methylgruppen sind leicht aus der Ringebene heraus orientiert. In den Substratkomplexen ist der Isoalloxozinring deutlich stärker gebogen (RMSD Abweichung von der idealen Planarität  $0.27 \text{ \AA}$ ).



**Abbildung 5.15:** Darstellung der nicht-kovalenten Kontakte zwischen FAD und Protein. Die Entfernungen (Wasserstoffbrückenbindungsabstände) sind in Å angegeben. Der Sauerstoff der C(2)=O Gruppe bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu N(ε)-Amidgruppe des Gln468 aus, das in der α15-Helix liegt, der Sauerstoff der C(4)=O Gruppe je eine Wasserstoffbrückenbindung zur N(η)- und N(ε)-Amidgruppe des Arg84 (β15-Strang). Der am Stickstoff N(5) gebundene Wasserstoff des Isoalloxazinringes wechselwirkt nicht direkt mit dem Protein, sondern mit den Sauerstoffen der Wassermoleküle W 499 und W 150. Die mittlere Alkoholgruppe des Ribitols interagiert mit der Carboxylgruppe des Trp 467, welches in einem Loop zwischen β22 und α15 lokalisiert ist. Die Phosphatsauerstoffe werden durch die Carboxylgruppe des Asp459 (β22), die Amidgruppe und die N(ε)-Amidgruppe des Arg50 (Loop zwischen β2 und β3), die Amidgruppe des Gly49 (Loop zwischen β2 und β3) und die Amidgruppe des Ala23 (α2) koordiniert. Der O(ε)-Sauerstoff des Glu42 (β2) und ein N(η) des Arg44 (Loop zwischen β2 und β3) wechselwirken mit den Wasserstoffen der OH-Gruppen des AMP-Ribose-Anteils des FAD. Zusätzlich existieren noch sechs Koordinationen durch Wassermoleküle, die die Position des FAD im Protein

stabilisieren. Van der Waals Wechselwirkungen mit Trp416 und Trp426 bestehen zudem zu den beiden Methylgruppen des Isoalloxozinringes.

### 5.3.2 Die Koordination von Substraten und Inhibitor

Die funktionellen Gruppen des L-Alanin und L-Phenylalanin befinden sich in identischen Positionen. Ein Sauerstoff der Carboxylgruppe des Substrates wird durch den Hydroxylsauerstoff des Tyr371, den N( $\eta$ ) des Arg84 und den Sauerstoff des Wassermoleküls (W190) koordiniert; der zweite Sauerstoff durch das N( $\epsilon$ ) des Arg84 und das N( $\epsilon$ ) des Gln228. Die Aminogruppe der Substrate wird durch den Carbonylsauerstoff des Ala466 und den Sauerstoff des Wassermoleküls W250 durch polare Kontakte im aktiven Zentrum fixiert. Der Phenylring des L-Phenylalanins ragt aus der Bindungsstelle am Isoalloxozinring in den hydrophoben Trichter des Zugangsbereiches des aktiven Zentrums und kann dort eine flexible Position einnehmen.

Das o-Aminobenzoat ist so im aktiven Zentrum positioniert, dass die Aminogruppe und die Säurefunktion in etwa die Position der entsprechenden Gruppe in den Aminosäuresubstraten einnehmen; allerdings ist die exakte Positionierung aufgrund der zusätzlichen C-C-Bindung zwischen Amino- und Carboxylfunktion nicht möglich. Die verfeinerte Position der Carboxylgruppe des Aminobenzoats und die daraus resultierende Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen unterscheidet sich in den unabhängig voneinander verfeinerten Monomeren leicht. Das Molekül kann in leicht variierenden Positionen im aktiven Zentrum gebunden werden. Dies führt zu den deutlich höheren B-Faktoren ( $\sim 30\text{-}40 \text{ \AA}^2$ ), die Elektronendichte zeigt im Bereich des Inhibitors die Mittelung aller vorkommenden Positionen. In einer der möglichen Positionen des o-Aminobenzoats ( im Monomer A des Strukturmodells) befindet sich ein

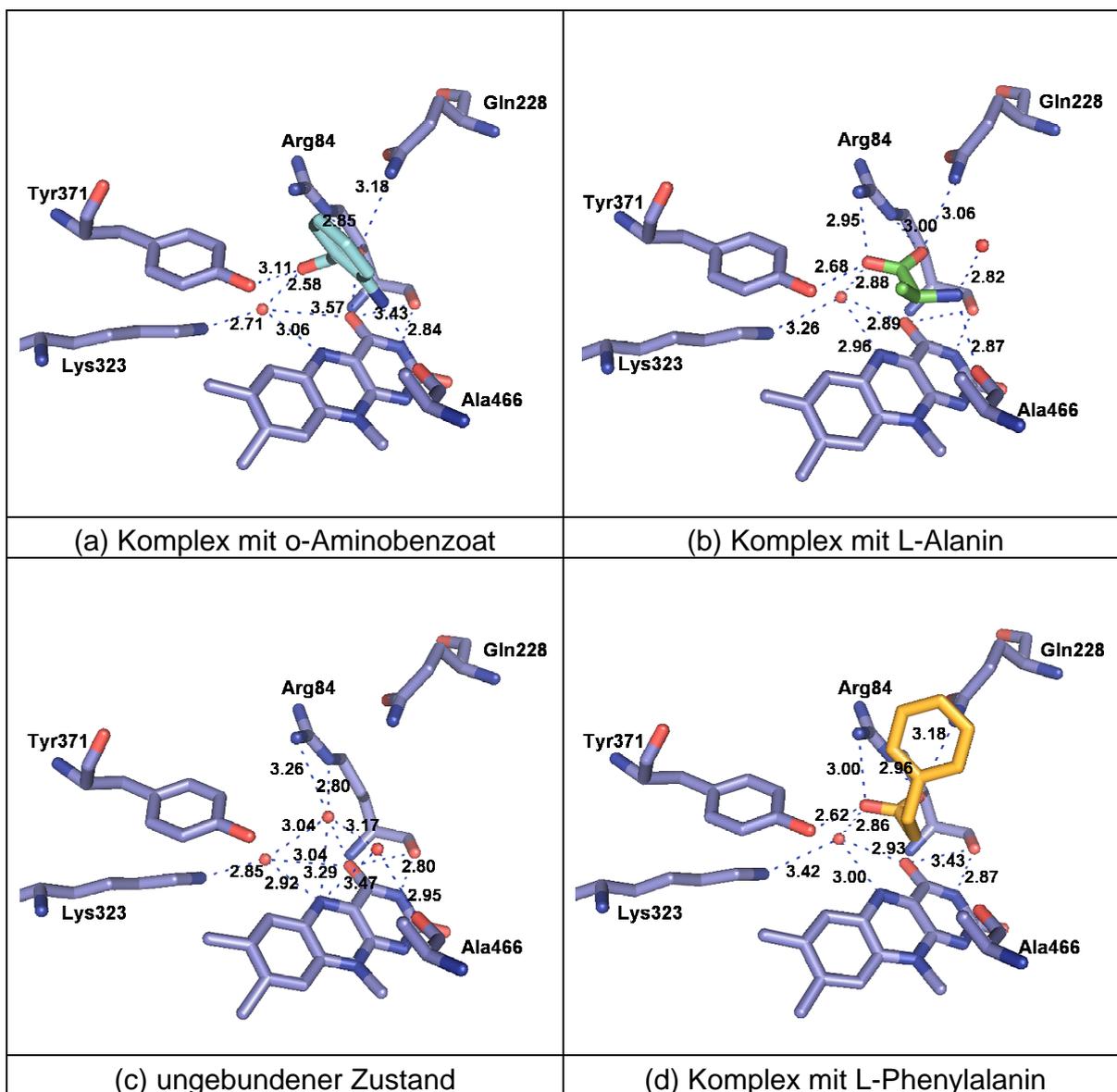
## 5 Diskussion II: Die Struktur der roLAAO

---

Sauerstoff in geeignetem Wasserstoffbrückenbindungsabstand zum Wassermolekül W159, der Hydroxylgruppe des Tyr371 und der C(2)=O Gruppe des Isoalloxozinringes; der zweite Sauerstoff bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Wasserstoff am N( $\epsilon$ ) des Gln228 aus. Alternativ wird die Carboxylgruppe (im Monomer B der verfeinerten Struktur) durch polare Wechselwirkungen eines Sauerstoffs mit dem Wassermolekül W 159 und den N( $\eta$ )- und N( $\epsilon$ )-Aminogruppen des Arg84, der zweite durch die C(2)=O Gruppe des Isoalloxozinringes, durch polare Wechselwirkungen gebunden. Die Aminogruppe des o-Aminobenzoates wird, wie die der Substrate, in beiden Monomeren, durch den Carbonylsauerstoff des Ala466 koordiniert. Da durch die räumliche Struktur des Inhibitors nicht alle zur Substratbindung zur Verfügung stehenden Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden können, ist die Bindung des o-Aminobenzoats flexibler als die der Substrate.

In der ungebundenen roLAAO ist das aktive Zentrum mit einem dichten Netzwerk aus Wassermolekülen bedeckt. Anstatt der funktionellen Gruppen der Substrate werden Wassermoleküle von den aktiven Residuen koordiniert.

Die Struktur des Proteins verändert sich kaum bei der Bindung der Substrate oder des Inhibitors. Die RMS-Abweichung der Proteinkette beträgt zwischen der ungebundenen Form und dem L-Alaninkomplex für die C $_{\alpha}$ -Atome 0.124 Å, für die Seitenkettenatome 0.204 Å. Im Bereich des aktiven Zentrums ist die veränderte Position der Seitenkette des Asp227 im Substratkomplex zu beobachten. Diese koordiniert in dieser Position über zwei Wassermoleküle die Aminogruppe des Substrates.



**Abbildung 5.16 (a)-(d):** Die aktiven Zentren der roLAAO in den verschiedenen funktionellen Zuständen. Die aktiven Residuen, der Cofaktor FAD, die Substrate und der Inhibitor sind als Stäbchenmodell, die Wasseratome als Kugeln dargestellt. Kohlenstoffatome sind in hellblau, Stickstoffatome in dunkelblau und Sauerstoffatome in rot gefärbt. Das L-Alanin ist in grün, das o-Aminobenzoat in hellblau und das L-Phenylalanin in orange dargestellt. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte, blaue Linien eingezeichnet. Die Abstände sind in Å angegeben.

### 5.3.3 Der Oxidationszustand des FADs und die gebundene Spezies in den Substratkomplexen

Durch das veränderte Absorptionsverhalten des konjugierten, aromatischen Systems ist die oxidierte Form des FADs gelb, die reduzierte farblos. Die erwartete Farbveränderung beim Einbringen der Kristalle in die Substrat-haltige Lösung war deutlich zu erkennen. Die Zugabe des o-Aminibenzoates führte hingegen, wie vermutet, nicht zu einer Farbveränderung. Die Frage war, inwieweit sich die Unterschiede des Redoxzustandes des FADs mit den Strukturmodellen der Substrat- und Inhibitor-Komplexe belegen lassen. Die reduzierte Form des Flavins unterscheidet sich strukturell von der oxidierten Form (Porter 1976). Durch die Reduktion des Flavins wird die Doppelbindung zwischen N(5)=C(4a) zur Einfachbindung. Damit verändert sich die Bindungslänge von 1.3Å für die Doppelbindung auf 1.45Å für die Einfachbindung. Die Detektion einer solch geringen Veränderung von Bindungsabständen ist nur mit sehr hochaufgelösten Strukturen möglich. Die Freigabe von Zwängen bei der Verfeinerung der Atompositionen hinsichtlich der Planarität, Bindungslängen und -winkel des Isoalloxozinringes spielt dabei allerdings eine sehr grosse Rolle. Die Bindungslängenveränderungen im Bereich von 0.1-0.2Å sind auch aus den für die roLAAO vorliegenden hochaufgelösten Elektronendichten nicht exakt zu bestimmen. Die Elektronendichte aller Strukturen der LAAO wurde zuerst ohne Cofaktor im Strukturmodell berechnet. Dabei zeigten sich tatsächlich Unterschiede in den Elektronendichten für das FAD im ungebundenen Zustand und denen der Substratkomplexe. Bei der Verfeinerung der Strukturen wurden die Zwänge für die Planarität des Isoalloxozinringes aufgehoben. Lediglich die Planaritäten für die Kohlenstoffe des Benzolringes und die Ringatome des Pyrimidins wurden beibehalten. Alle Strukturen wurden sowohl mit der aus der Kleinmolekül-Datenbank übernommenen Struktur des reduzierten als auch des oxidierten Flavins verfeinert. Die beste Anpassung an die Elektronendichte wurde in den Substratkomplexen mit der reduzierten Form gefunden; im Falle des Inhibitor-Komplexes

und der ungebundenen Form des Proteins lieferte die Verfeinerung mit der oxidierten Form des Isoalloxozins die besseren Ergebnisse. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf das Vorliegen des Flavins in der reduzierten Form in den Substratkomplexen und korreliert mit der Beobachtung der Farbveränderung der Kristalle.

In den Substratkomplexen ist der Isoalloxozinring stärker gebogen, was hauptsächlich durch die veränderte Position des N(5) Stickstoffes bedingt wird. Der Abstand zwischen N(5) und dem C $\alpha$  des Substrates beträgt 3.4 Å.

Da im Kristall eine Reaktion stattgefunden haben muss, da Flavin in den Substratkomplexen in der reduzierten Form vorliegt, stellt sich die Frage, ob es sich bei der im aktiven Zentrum gebundenen Spezies um das Substrat, das Produkt oder ein Intermediat handelt. Im Substrat ist der C $\alpha$ -Kohlenstoff der Aminosäure sp<sup>3</sup>-hybridisiert. Daraus ergibt sich eine tetraedrische Anordnung der Liganden. Durch die im Produkt vorhandene Doppelbindung ist dieser Kohlenstoff sp<sup>2</sup>-hybridisiert; das Produkt ist planar. Die Elektronendichten im Bereich der Substratbindung sind in beiden Komplexen sehr gut und die tetraedrische Anordnung ist eindeutig zu erkennen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass in der Kristallstruktur das gebundene Substrat vorliegt. In der Lösung ist das Substrat in hohem Überschuss vorhanden. Nach Umsetzung eines Substrates konnte das FAD im Kristall nicht durch Luftsauerstoff oxidiert werden. Daher wurde ein weiteres Substratmolekül gebunden, aber nicht mehr umgesetzt.

### **5.3.4 Die Substratspezifität der L-Aminosäure Oxidase aus *Rh. opacus***

Wie schon gezeigt, lässt sich das bei der roLAAO gefundene, breite Substratspektrum des Enzyms hauptsächlich aus der Architektur des Zugangs zum aktiven Zentrum erklären. Anders als in den homologen Proteinen wie der PAO, der crLAAO und den DAAOs existiert kein Tunnel, durch den die Substrate zum aktiven Zentrum geleitet

werden. Nur der direkte Zugang zum Isoalloxozinring wird durch eine Verengung der Bindungstasche erreicht. Die beiden Tryptophane Trp 416 und 426 können van der Waals Wechselwirkungen zu den Substratseitenketten ausbilden. Dies erklärt die bevorzugte Umsetzung von aromatischen Aminosäuren. Die Orientierung der Seitenketten wird ansonsten nicht durch das Protein vermittelt. Diese ragen aus der hydrophoben Tasche heraus und sind zum Solvenz exponiert.

Das Aminosäuren mit voluminösen, am C $\beta$ -verzweigten Resten wie L-tert-Leucin nicht von der roLAAO (Geueke 2002) umgesetzt werden, läßt sich aus sterischen Konflikten bei der Bindung im aktiven Zentrum erklären.

In der Reaktion der pcDAAO ist die Freisetzung des Produktes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt aufgrund eines Loops, der den Zugang zum aktiven Zentrum verschließt oder ermöglicht (Mattevi 1996). Dies ist in der roLAAO nicht der Fall.

### ***5.4 Der Vergleich mit homologen Aminosäureoxidasen***

#### **5.4.1 Die aktiven Residuen der homologen Aminosäureoxidasen**

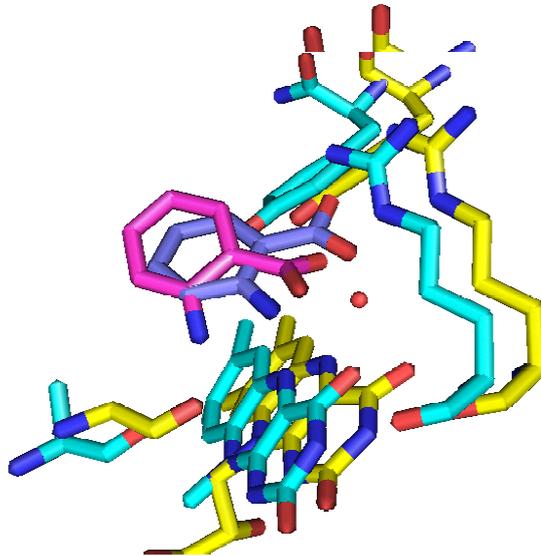
Die aus den Kristallstrukturen der roLAAO gewonnenen Informationen lassen sich durch Vergleiche mit den Strukturen der homologen Aminosäureoxidasen hinsichtlich der Identifizierung und Funktion der aktiven Residuen erweitern. Das aktive Zentrum der D-Aminosäure Oxidasen ist das Spiegelbild dessen der L-Aminosäureoxidasen. Dabei liegt die Spiegelebene parallel zur Ebene durch die N(1) und N(3)-Stickstoffe des Isoalloxozinringes (Pawelek 2000).

Die aktiven Residuen der roLAAO konnten aus den Koordinationen der Substrate und des Inhibitors identifiziert werden. Es handelt sich um die Residuen Tyr371, Arg84,

Lys323 und Ala466. Im aktiven Zentrum der L-Aminosäure Oxidase aus *Calloselasma rhodostoma* finden sich entsprechende Residuen (Tyr372, Arg90, Lys326 und Gly464). Die Position des Gln228 der roLAAO wird in der crLAAO von Phe227 besetzt. Desweiteren befinden sich die Residuen Ser373, Trp426 und Trp416 der roLAAO an den gleichen Positionen wie die Residuen Ile374, Ile430 und Trp420 der crLAAO. In der DAAO aus Hefe (Umhau 2000) und Schweineiere (Mattevi 1996) finden sich ebenfalls ein Arginin (Arg285/Arg283) und ein Tyrosin (Tyr223/Tyr228) im aktiven Zentrum. Die weiteren strukturell homologen Reste sind Tyr238/Phe242 und Phe58/Tyr55. Die Position des Ala466 der roLAAO wird in der yDAAO von Ser334, in der pcDAAO von Gly312 besetzt. Das in den LAAOs wie auch in der PAO vorkommende Lysin existiert in den aktiven Zentren der DAAOs nicht.

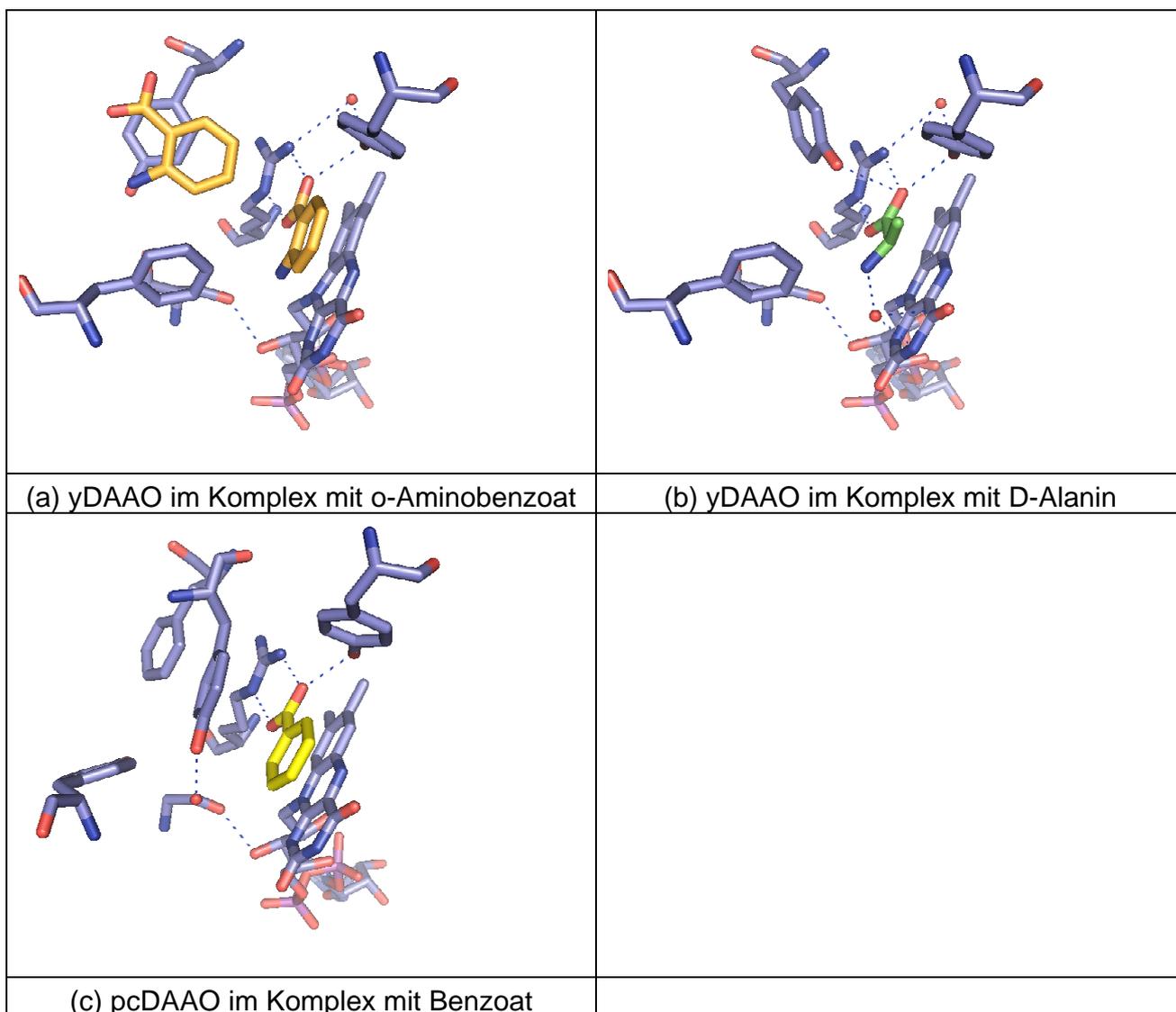
### 5.4.2 Die Komplexe mit Alanin und (o-Amino-)benzoat

Die Koordination der Carboxyl- und Aminofunktion des o-Aminobenzoates im aktiven Zentrum ist in beiden L-Aminosäure Oxidasen vergleichbar. Lediglich die relative Lage des aromatischen Ringes unterscheidet sich in beiden Strukturen. Dieser wird in der crLAAO von den beiden Residuen Ile430 und Ile374 durch van der Waals Wechselwirkungen *gesandwiched*. In der Kristallstruktur finden sich noch zwei weitere Aminobenzoatmoleküle, deren Position den Weg des Substrates zum aktiven Zentrum andeutet. Dabei erfolgt die Orientierung der Moleküle durch die elektrostatischen Eigenschaften des Tunnels (Pawelek 2000). Durch den weit geöffneten Trichter, der den Zugang zum aktiven Zentrum der roLAAO bildet, kann kein weiteres Anthranilatmolekül außerhalb des aktiven Zentrums fixiert werden.



**Abbildung 5.17:** Superposition der aktiven Residuen bei der Bindung von o-Aminobenzoat in den beiden LAAOs. Die Kohlenstoffatome der Residuen und des FAD der roLAAO sind in hellblau gekennzeichnet, die der crLAAO in gelb. Die Kohlenstoffatome des gebundenen Inhibitors o-Aminobenzoat sind für die roLAAO in violett, für die crLAAO in blau eingefärbt. Die Stickstoffatome sind in dunkelblau, die Sauerstoffe in rot gekennzeichnet. Das an der Bindung beteiligte Wassermolekül ist für die roLAAO als Kugel dargestellt.

In der Kristallstruktur des Komplexes der  $\gamma$ DAAO mit o-Aminobenzoat finden sich entsprechend dem Zugangsbereich zum aktiven Zentrum zwei Aminobenzoatmoleküle. Die Koordination der funktionellen Gruppen des im aktiven Zentrum befindlichen Moleküls entspricht der der L-Aminosäure Oxidasen. In der pcDAAO wird ein Benzoatmolekül entsprechend durch das Arg283 und Tyr228 über die Carboxylsauerstoffe koordiniert.



**Abbildung 5.18 (a)-(c):** Die Koordination von (o-Amino)benzoat und L- bzw. D-Alanin in den Komplexstrukturen der crLAAO und den DAAOs. Die aktiven Residuen und die gebundenen Moleküle sind als Stäbchenmodelle dargestellt. Die Sauerstoffe sind in rot, die Stickstoffatome in dunkelblau, die Phosphatome in violett und die Kohlenstoffe entsprechend der Zugehörigkeit zum Protein oder FAD in blau, zum Alanin in grün, zum o-Aminobenzoat in orange und zum Benzoat in gelb gefärbt.

Die Bindung und Orientierung der Substrates wird in der roLAAO durch die Koordination der Carboxylsauerstoffe durch Wasserstoffbrückenbindungen zum Arg84, Glu228, dem Tyr371 und einem Wassermolekül erreicht; die Fixierung der Aminofunktion erfolgt über

den Carbonylsauerstoff der Hauptkette des Ala466 und ein Wassermolekül. Die Koordination des D-Alanins erfolgt in der yDAAO in analoger Form.

### 5.4.3 Die aktiven Residuen der Aminosäureoxidasen

Aus dem Vergleich mit der L-Aminosäure Oxidase aus Schlangengift und den strukturell charakterisierten D-Aminosäure Oxidasen aus Hefe und Schweineleiere lassen sich weitere Residuen im aktiven Zentrum der roLAAO charakterisieren, die an der oxidativen Deaminierung der Aminosäuren beteiligt sind.

In allen vier Aminosäureoxidasen werden die Carboxylat-Sauerstoffe durch Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Tyrosin und einem Arginin koordiniert. In der roLAAO erfolgt die Koordination noch zusätzlich über das Gln228. Die Koordination der Aminogruppe erfolgt über eine Hauptkettencarboxylgruppe und ein Wassermolekül.

Die Orientierung der Seitenkette erfolgt in der crLAAO durch van der Waals Wechselwirkungen mit zwei Isoleucinen, in den DAAOs durch ein Phenylalanin und ein Tyrosin. In der roLAAO finden sich an entsprechenden Stellen Ser373 und Trp426.

In den beiden LAAOs besteht zum Wassermolekül im aktiven Zentrum, das einen der Carboxylsauerstoffe koordiniert, eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Lysin (roLAAO Lys323, crLAAO Lys326). Dieser Rest kommt in den DAAOs nicht vor, findet sich aber im aktiven Zentrum der PAO. Es wird vermutet (Pawelek 2000), dass das Lysin, aufgrund seiner hydrophoben Umgebung einen erniedrigten pK-Wert besitzt und als Base dienen kann, um die Nucleophilie des Wassers für den Angriff am Imino-Intermediat zu erhöhen. Dies spräche, im Vergleich zu den DAAOs, wo eine spontane Hydrolyse des Intermediates vermutet wird, für die Beteiligung der LAAOs an diesem Schritt.

In der Struktur der crLAAO liegt das His223 im aktiven Zentrum in den beiden Inhibitor-komplexen in alternativen Konformationen vor. Eine entsprechende

Konformationsänderung wird auch bei einem Serin in der  $\gamma$ DAAO bei der Bindung des *o*-Aminobenzoates und des D-Alanins beobachtet. Dieser Rest (His224) wurde im Falle der crLAAO als potentielle katalytische Base für einen Carbanionenmechanismus diskutiert (Pawelek 2000). In der roLAAO findet sich an dieser Stelle kein Aminosäurerest. Wahrscheinlicher ist daher die Schlussfolgerung von Umhau et al., dass diese Residuen die Freisetzung eines Protons von der Aminogruppe erleichtern, indem sie dies auf die umgebenden Lösungsmittelmoleküle übertragen (Umhau 2000). In der roLAAO könnte diese Funktion das Asp227 haben, welches ebenfalls eine Konformationsänderung zwischen Substrat- und ungebundenen Komplex zeigt. Dieser Rest koordiniert in der roLAAO allerdings nicht direkt die Aminogruppe, sondern steht mit dieser über ein Wasserstoffbrückenbindungssystem mit zwei Wassermolekülen in Verbindung. Ebenfalls wird durch diesen Rest der Stickstoff des Trp 426 koordiniert, der ebenfalls über ein Wassermolekül mit der Aminogruppe interagiert. In der pcDAAO könnte diese Funktion entsprechend vom Tyr224 übernommen werden. Da in diesem Falle keine Substratkomplexstruktur existiert, kann dies strukturell nicht bestätigt werden.

### **5.5 Der katalytische Mechanismus der roLAAO**

Aus den gewonnenen Strukturinformationen über die Bindung des Substrates im aktiven Zentrum der roLAAO läßt sich der Reaktionsmechanismus der Teilreaktion zur Bildung des Imino-Intermediates in Analogie zu dem der DAAOs (Mattevi 1996; Umhau 2000) beschreiben. Da im aktiven Zentrum der roLAAO keine Aminosäure vorhanden ist, die als katalytische Base fungieren könnte, kann die Reaktion nicht über einen Carbanionen-Mechanismus ablaufen. Die Funktion des His223 als potentielle Base kann durch die Struktur der crLAAO ausgeschlossen werden. Darüberhinaus ist die

## 5 Diskussion II: Die Struktur der roLAAO

---

Anordnung der C $\alpha$ -H Funktion des Substrates zum N(5) des Isoalloxozinring optimal für einen effektiven Hydridtransfer.

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich ein überraschend einfacher Reaktionsmechanismus der LAAO. Bei einem optimalen pH-Wert  $\geq 8$  ist die Aminofunktion der L-Aminosäure ungeladen (Porter 1976). Durch die richtige Positionierung des Orbitals der C $\alpha$ -H Bindung zum LUMO des N(5) Stickstoff des Isoalloxozinrings, können die beiden Orbitale überlappen, wobei sich die Aminofunktion in einem Abstand von 3.4Å oberhalb der C(4a)-C(4)-Bindung des Flavins befindet. Die Übertragung des Hydrids ist mit dem Übergang des tetraedrischen Substrates in das planare Produkt gekoppelt und führt direkt zur Bildung des reduzierten Enzym-Produkt Komplexes M2. Dabei wird die negative Ladung des Flavins über den Pyrimidinring delokalisiert und durch die positive Ladung des entstandenen Produkt ( $\alpha$ C=NH $_2^+$ -Gruppe) stabilisiert. Die Wechselwirkung dieser Ladungen scheint für die Thermodynamik der Reaktion bei der DAAO eine grosse Rolle zu spielen (Umhau 2000). Die Umsetzungsgeschwindigkeiten der LAAO sind pH-abhängig (Porter 1980). Aus diesen Untersuchungen wurde ein apparenter pK $_{\alpha}$ -Wert von 8.6 berechnet, was bedeutet, dass eine der an der Reaktion beteiligten Gruppen deprotoniert vorliegen muss. Man vermutet, dass die Aminogruppe des Substrates diese Rolle übernimmt. Dies wird analog auch für die DAAO postuliert.

Bei einem pH-Wert von 7, bei dem die Aminosäure in der Zwitterionenstruktur vorliegt (Michealis Komplex M1) erfolgen der Hydridtransfer und die Deprotonierung der  $\alpha$ -NH $_3^+$ -Gruppe konzertiert. Daher ist die Frage zu stellen, wie die Übertragung des Protons auf das Solvenz funktioniert. In der  $\gamma$ DAAO kann der Sauerstoff des Ser335 das Proton übernehmen, indem die Seitenkette in die entsprechende Orientierung klappt. Dabei führt die Anordnung des Sauerstoffs des Serins und des Wassermoleküls zu einer festeren Wasserstoffbrückenbindung für den planaren Zustand des Übergangzustandes und des Produktes im Vergleich zum tetraedrischen Zustand des Substrates. Somit kann die Übertragung des Protons durch das Serin erfolgen. In der roLAAO gibt es zwar keine

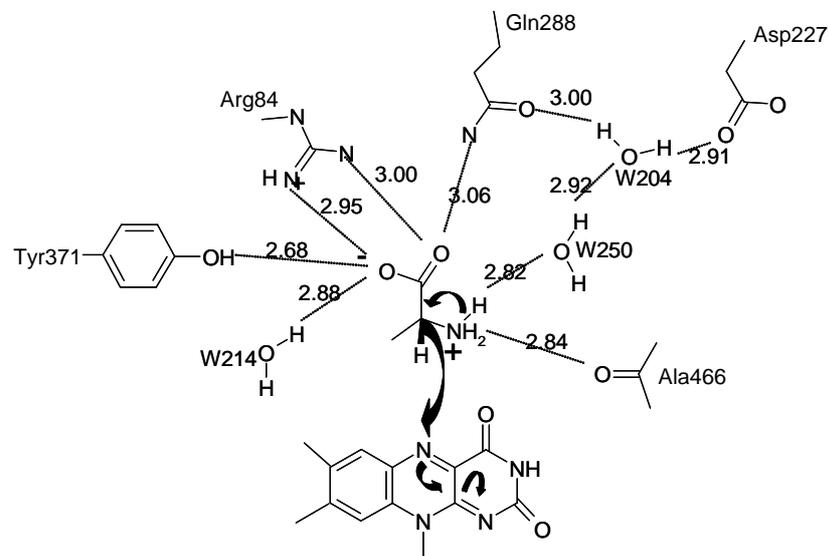
entsprechende Aminosäure in der entsprechenden Position, die diese Aufgabe übernehmen könnte. Das Netzwerk aus Wassermolekülen, die Wasserstoffbrückenbindungen zur Aminogruppe bilden, steht aber im direkten Kontakt zu Asp227, dessen Seitenkette in den Substratkomplexen ebenfalls eine Konformationsänderung erfährt. Daher kann man vermuten, dass das Proton über die Wassermoleküle auf das Aspartat übertragen wird und von dort auf das Solvenz. Bei einem höheren pH-Wert, bei der die Aminogruppe ungeladen vorliegt, ist diese Interaktion nicht notwendig. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Mutationsstudien der  $\gamma$ DAAO, bei der der Austausch des Serins gegen Glycin bei hohen pH-Werten keinen Einfluss auf die Umsetzungsgeschwindigkeiten des Substrates zeigte, bei pH 6 betrug die Umsetzungsgeschwindigkeit nur ein zehntel der des Wildtyps (Umhau 2000). Die alternative Konformation des His223 in der Struktur der crLAAO unterstützt ebenfalls diese Annahme.

Das in den LAAOs, der PAO und anderen Vertretern der GH2-Familie vorkommende Lysin fehlt in den DAAOs. Man nimmt an, dass die  $\text{NH}_3^+$ -Gruppe des Lysins ebenfalls zur Stabilisierung der negativen Ladung am Flavin dient. Zusätzlich wird eine katalytische Funktion bei der Hydrolyse des Imino-Intermediates vermutet (Pawelek 2000). Aus den vorliegenden Strukturdaten kann zwar die Konservierung des Lys323 in dieser Position für die roLAAO ebenfalls bestätigt werden, Aussagen über die Funktion lassen sich aber nicht treffen. Mutationsstudien und die Untersuchung weiterer Komplexe des Enzyms sind dafür notwendig.

Die vorliegenden Strukturdaten liefern gute Beweise für den Hydridmechanismus bei der Teilreaktion zur Bildung des Iminosäure-Intermediates. Dieser Mechanismus erscheint ungewöhnlich, da die chemische Umsetzung des Substrates ohne die aktive Beteiligung funktioneller Gruppen des Enzyms erfolgt. Die meisten Residuen des aktiven Zentrums der LAAO dienen der Substrat-Erkennung, Bindungen und Fixierung, d.h. sie sorgen dafür, dass die entsprechenden Orbitale der miteinander interagierenden Atome so orientiert werden, dass eine Überlappung möglich ist. Dabei erfolgt neben dem

## 5 Diskussion II: Die Struktur der roLAAO

Hydridtransfer der Übergang des tetraedrischen Substrates in das planare Produkt. In dieser Form des Reaktionsmechanismus sind die Wechselwirkungen und Orientierungen der Molekülorbitale die wichtigsten Faktoren für die chemische Reaktion. Ein solches Konzept wurde auch von der Koshland-Gruppe diskutiert, wonach die Orientierung der Orbitale einen grossen Anteil an der enzymatischen Katalyse besitzt (Mesezar 1997).



**Abbildung 5.19:** schematische Darstellung des Michaelis-Komplexes M1. Es sind schematisch die Wechselwirkungen des Substrates mit den aktiven Resten zur Erläuterung des Hydridtransfers aufgeführt. L-Alanin ist in der zwitterionischen Form gebunden. Zusätzlich sind die Entfernungen in Å angegeben.





## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die röntgenkristallographische Charakterisierung der L-Aminosäure Oxidase aus *Rhodococcus opacus* (roLAAO) beschrieben. Dabei handelt es sich um die ersten Strukturinformationen einer bakteriellen L-Aminosäure Oxidase. Diese gehört zur GH2-Familie der FAD-abhängigen Oxidoreduktasen. Bislang war nur die Struktur einer aus Schlangengift isolierten L-AAO bekannt. Zum ersten Mal wurden Substratkomplexe einer LAAO strukturell charakterisiert. Darüberhinaus ist dies die erste Struktur einer Aminosäureoxidase, die ohne Inhibitor oder Substrat in der ungebundenen Form charakterisiert werden konnte.

Die L-Aminosäure Oxidase aus *Rh. opacus* wurde in zwei Kristallformen mit sehr guten Diffraktionseigenschaften kristallisiert. Aufgrund der längeren Wachstumsphase der Kristalle der zweiten Kristallform wurde zur Strukturlösung und der Untersuchung der Substrat- und Inhibitor Komplexe der LAAO nur die primitiv orthorhombische Kristallform verwendet. Da Rechnungen zum molekularen Ersatz mit dem Schlangengiftzym als Suchmodell nicht erfolgreich waren und ansonsten keine homologen Strukturen existierten, musste die Struktur *de novo* gelöst werden. Die kristallographische Phaseninformation konnte mit einem Quecksilberderivat aus den anomalen Differenzen bei einer Wellenlänge (SAD) gewonnen werden. Die Anwendung der MAD Phasierung war aufgrund des nicht detektierbaren, wellenlängen-abhängigen Fluoreszenzsignals des Quecksilbers nicht möglich. Die Substruktur bestand aus vier Quecksilberatomen/Dimer. Die Phasenambiguität konnte mit Hilfe der hochredundanten Daten überwunden und die Hängigkeit der Substruktur bestimmt werden. Aufgrund der Qualität der SAD-Daten und durch Kombination mit den nativen Daten konnten 96% des Strukturmodells automatisch modelliert werden.

## 6 Zusammenfassung

---

Die LAAO bildet ein Homodimer mit einer sehr grossen Kontaktfläche. Eine vergleichbare Art der Dimerisierung findet sich bislang bei keinem Vertreter der GH<sub>2</sub>-Familie. Das Monomer besteht aus drei Domänen, der FAD-Bindungsdomäne, deren generelle Faltung innerhalb der Familie stark konserviert ist, der Substratbindungsdomäne, die weitestgehend der der LAAO aus Schlangengift entspricht und der helicalen Domäne, die ausschließlich für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich ist und zu der ungewöhnlichen Dimerisierung führt.

Im Laufe der Arbeit konnten mit der primitiv orthorhombischen Kristallform einige hochaufgelöste Strukturen des ungebundenen Proteins, zweier Substrat- und eines Inhibitor-Komplexes bestimmt werden. Aus den so erhaltenen Strukturinformationen konnten durch Vergleich mit den Strukturen der Schlangengift LAAO und der die D-Aminosäuren oxidierenden DAAOs wichtige Hinweise auf den Reaktionsmechanismus der LAAOs gewonnen werden. Dabei erfolgt, wie für die DAAOs gezeigt, die Reduktion des Flavins über einen Hydridmechanismus, bei dem ausschließlich die Orientierung der überlappenden Orbitale des Substrates und des Flavins durch Koordination des Substrates durch die aktiven Residuen des Proteins sichergestellt wird. Ob das Enzym an der Hydrolyse des Iminocarbonsäure Intermediats beteiligt ist oder diese spontan abläuft, lässt sich aus den Kristallstrukturen nicht begründen. Der Vergleich mit der Schlangengift LAAO und der PAO deutet aber, anders als bei den DAAOs auf die Vermittlung dieser Reaktion durch einen aktiven Rest des Proteins hin.

## Anhang

### **A.1 Kurzzusammenfassung**

Die L-Aminosäure Oxidase aus *Rh. opacus* gehört zur Klasse der Nucleotid-bindenden Oxidoreduktasen und darin zur GH<sub>2</sub>-Familie der flavinabhängigen Oxidasen. Diese Einteilung erfolgt aufgrund eines hochkonservierten Sequenzmotivs. Sie katalysiert stereoselektiv die oxidative Deaminierung von L-Aminosäuren in die entsprechenden  $\alpha$ -Ketosäuren über ein Iminosäure-Intermediat, wobei Ammoniak und Wasserstoffperoxid entstehen. Da keine ausreichend homologe Struktur bekannt war, wurde die Struktur *de novo* mit Hilfe der SAD-Methode unter Verwendung eines Quecksilberderivates gelöst.

Die LAAO bildet ein Homodimer mit einer ungewöhnlich großen Kontaktfläche. Eine vergleichbare Art der Dimerisierung findet sich bislang bei keinem Vertreter der GH<sub>2</sub>-Familie. Das Monomer besteht aus drei Domänen, der FAD-Bindungsdomäne, deren generelle Faltung innerhalb der Familie stark konserviert ist, der Substratbindungsdomäne, die weitestgehend der der LAAO aus Schlangengift entspricht und der helicalen Domäne, die ausschließlich für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich ist und zu der ungewöhnlichen Dimerisierung führt.

Aus den hochaufgelösten Strukturen des ungebundenen Proteins, zweier Substrat- und eines Inhibitor-Komplexes konnten durch Vergleich mit den Strukturen der Schlangengift LAAO und der D-Aminosäuren oxidierenden DAAOs wichtige Hinweise auf den Reaktionsmechanismus der LAAOs erhalten werden. Dabei erfolgt, wie schon für die DAAOs gezeigt, die Reduktion des Flavins und die Umsetzung der L-Aminosäure in die Iminosäure über einen Hydridmechanismus, bei dem ausschließlich die zur Überlappung der Orbitale wichtige Orientierung des Substrates und des Flavins durch die aktiven Residuen des Proteins sichergestellt wird. An der eigentlichen Reaktion ist kein Rest des Proteins beteiligt.



## **A.2 Abstract**

L-amino acid oxidase from *Rhodococcus opacus* is classified as a member of the GH<sub>2</sub>-family of flavin-dependent oxidoreductases according to a highly conserved sequence motif. The protein contains non-covalently bound FAD in the elongated form. LAAO catalyzes the stereospecific oxidative deamination of an L-amino acid substrate to the corresponding  $\alpha$ -keto acid along with the production of ammonia and hydrogenperoxide via an imino acid intermediate. With no homologous structure known the structure was solved *de novo* from anomalous differences of a mercury derivative using the SAD-technique.

The bacterial LAAO forms a homodimer with an unusual huge contact area. This mode of dimerization is not known for other members of the GH<sub>2</sub>-family so far. The monomer consists of three well-defined domains: the FAD-binding domain corresponding to a general topology throughout the GH<sub>2</sub>-family; a substrate-binding domain with almost the same topology than the snake venom LAAO and a helical domain exclusively responsible for the unusual dimerization mode of the protein and not found in other members of the family.

The high-resolution structures of the unbound protein as well as two substrate and one inhibitor complex compared to the structure of snake venom LAAO and DAAO from yeast and pig kidney give insight into the mode of reaction of this enzymes. Reduction of the flavin leads to an imino acid intermediate using a hydrid transfer mechanism. This mechanism appears to be uncommon in that the chemical transformation can proceed efficiently without the involvement of amino acid functional groups. Most groups present at the active side are involved in substrate recognition, binding and fixation, i.e. they direct the trajectory of the interacting orbitals. In this mode of catalysis orbital steering/interactions are the predominant factors for the chemical step(s).



### A.3 Lebenslauf

6. November 1968	geboren in Wermelskirchen
Staatsangehörigkeit	deutsch
1975-1979	Grundschule in Wermelskirchen
1979-1988	Gymnasium in Wermelskirchen
1988-1990	Berufsbildende Schulen in Köln
	Ausbildung zur biologisch -technischen Assistentin
1990-1994	Studium des Chemieingenieurwesens (FH) in Jülich
1994-2001	Studium der Chemie in Siegen und Köln
August 2000-April 2001	Diplomarbeit bei Prof. Dr. D. Schomburg, Institut für Biochemie, Universität zu Köln  'Strukturchemische Charakterisierung und Röntgenstrukturuntersuchungen der Restriktionsendonuclease <i>EcoRV</i> -VI41 im Komplex mit den spezifischen Oligonucleotiden d(AAAGATATCTT) und d(GACGATATCGT)'
April 2001	Prüfung zur Diplom Chemikerin
Juni 2001 - Oktober 2004	Doktorarbeit bei Prof. Dr. D. Schomburg, Institut für Biochemie, Universität zu Köln  ' Die Struktur der L-Aminosäure Oxidase aus <i>Rhodococcus opacus</i> in verschiedenen funktionellen Zuständen'
seit 18.10.04	Proteinkristallographin bei Oxford Diff. Ltd., Abingdon, England



#### ***A.4 Vorabveröffentlichungen***

keine



### **A.5 Posterbeiträge**

Faust, A., Niefind K. , Schomburg, D. (2002)- Crystallization and Preliminary X-ray analysis of an *EcoRV* variant with altered substrate specificity, ICCBM9, Jena, Gemany



## **A.6 Literaturverzeichnis**

- Ahn, M. Y., Ryu, K.S., Lee, Y.W., Kim, Y.S. (2000). "Cytotoxicity of L-amino acid oxidase activity of crude insect drugs." Arch. Pharm. Res. **23**: 477-481.
- Ali, S. A. e. a. (2000). "Isolation, structural and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from Leaf-nosed Viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom." Arch. Biochem. Biophys. **384**(2): 216-226.
- Allen, F.H. (2002). "The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising." Acta Cryst. B **58**: 380-388.
- Blundell, T. L., Johnson, L.N. (1976). Protein Crystallography. New York, Academic Press.
- Boggon, T. J., Shapiro, L. (2000). "Screening for phasing atoms in protein crystallography." Structure **8**: R143-149.
- Böhmer, A., Müller, A., Passarge, M., Liebs, P., Honeck, H., HG, H. (1989). "A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus*." Eur. J. Biochem. **182**: 327-332.
- Bouvette, P., Luong, J.H.T. (1994). "Isolation, purification and further characterization of an L-phenylalanine oxidase from *Morganella morganii*." Appl. Biochem. Biotechnol. **48**: 61-74.
- Branden, C., Tooze, J (1999). Introduction to Protein Science.
- Braun, M. K., J.M.; Schmid, R.D. (1992). "Purification and some properties of an extracellular L-amino acid oxidase from *Cellulomonas cellulans* AM8 isolated from soil." Appl. Microbiol. Biotechnol. **37**: 594-598.
- Brearley, G. M. P., C.P.; Atkinson, T., Hammond, P.M (1994). "Purification and partial characterization of a broad-range L-amino acid oxidase from *Bacillus carotarum* 2Pfa isolated from soil." Appl. Microbiol. Biotechnol. **41**: 670-676.
- Bricogne, G., Vonrhein, C, Flensburg, C, Schiltz, M, Paciorek, W (2003). "Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP2.0." Acta Cryst. D Biol. Crystallogr. **59**: 2023-2030.

- Brigogne, G. V., C. ; Flensburg, C. ; Schiltz, M. ; Paciorek, W. (2003). "Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0." Acta Cryst. D **59**: 2023-2030.
- Bruenger, A. e. a. (1998). "Crystallography & NMR Systems: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination." Acta Cryst. D **54**: 905-921.
- Cioaca, C., Ivanof, A. (1974). "Bacterial amino acid oxidases. I. L-amino acid oxidase and its distribution in bacteria." Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol. **33**: 211-222.
- Cohen SL, Padovan JC, Chait BT. (2000). "Mass spectrometric analysis of mercury incorporation into proteins for X-ray diffraction phase determination." Anal. Chem. **72**(2): 574-9.
- Cohen, S.L., Chait, B.T. (2001). "Mass spectrometry as a tool for protein crystallography." AnnuRev. Biophys. Biomol. Struct. **30**: 67-85.
- Collaborative Computational Project, N. (1994). "The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography." Acta Cryst. D **50**: 760-763.
- Coudert, M. (1975). "Characterization and physiological functions of an soluble L-amino acid oxidase in *Corynebacterium*." Arch. Microbiol. **102**: 151-153.
- Crick, F. H. C., Magdoff, B.S. (1956). "The theory of the method of isomorphous replacement of protein crystals. I." Acta Cryst. **9**: 901-908.
- Dauter, Z., Dauter, M., de la Fertelle, E., Bricogne, G., Sheldrick, G.M. (1999). "Can Anomalous Signal of Sulfur Become a Tool for Solving Protein Crystal Structures?" J. Mol. Biol. **289**: 83-92.
- Krebs, H. A. (1935). "Metabolism of amino-acids. III. Deamination of amino-acids." Biochem. J. **29**: 1620-1625.
- DeBusk, R. M., Ogilvie, S. (1984). "Participation of an extracellular deaminase in amino acid utilization by *Neurospora crassa*." J. Bacteriol. **159**: 583-589.
- Doublet, S. (1997). "Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination." Methods of Enzymology **276**: 523-529.

- Drechsel, H., Thieken, A., Reisbrodt, R., Jung, G. Winkelmann, G. (1993). "Alpha-keto acids are novel siderophores in the genera *Proteus*, *Provincia* and *Morganella* and are produced by amino acid deaminases." J. Bacteriol. **175**: 2727-2733.
- Drenth, J. (1999). Principles of Protein X-ray Crystallography 2nd Edition. Berlin, Springer-Verlag.
- Ducruix, A., Giege, R. (1999). Crystallization of nucleic acids and proteins, a practical approach. Oxford, Oxford University Press.
- Dym, O., Eisenberg, D (2001). "Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins." Protein Science **10**: 1712-1728.
- Garman, E. M., J.W. (2003). "Heavy-atom derivatization." Acta Cryst. D **59**: 1903-1913.
- Geueke, B., Hummel, W , (2002). "A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization." Enzyme and Microbiol. Technology **31**: 77-87.
- Green, D. W., Ingram, V.M., Perutz, M.F. (1954). "The structure of haemoglobin IV. Sign determination by the isomorphous replacement method." Proc. R. Soc. London Ser.A **225**: 287-307.
- Hanson, R. L., Bembenek, K.S., Patel, R.N., Szarka, L.J. (1992). "Transformation of N-epsilon-CBZ-L-lysine to CBT-L-oxyllysine using L-amino acid oxidase from *Providencia alcalifaciens* and L-2-hydroxy-isocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus confusus*." Appl. Microbiol. Biotechnol. **37**: 599-603.
- Hendrickson, W.A., Teeter, M.M. (1981) "Structure of the hydrophobic protein Crambin determined directly from the anomalous scattering of Sulfur." nature **290**: 107-113.
- Hersh, L. B., Schumann-Jorns, M. (1975). J. Biol. Chem. **248**: 8728-8734.
- Hersh, L. B., Jorns, M.S. (1975). "Use of 5-deazaFAD to study hydrogen transfer in the D-amino acid oxidase reaction." J. Biol. Chem. **250**(22): 8728-8734.
- Jankarik, J., Kim, SH (1991). "Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins." J. Appl. Cryst. **24**: 409-411.
- Jones, S., Thornton, J.M. (1996). "Principles of protein-protein interactions." Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS) **93**: 13-20.

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 this models." Acta Cryst. A **47**(Pt 2): 110-119.

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

Kamei, T., Asano, K, Kondo, H, Matsukaki, M, Nakamura, S (1983). "L-Glutamate oxidase from *Streptomyces violascens* II Properties." Chem. Pharm. Bull. **31**: 3609-3616.

Kamei, T., Asano, K, Suzuki, H, Matsukaki, M, Nakamura, S (1983). "L-Glutamate oxidase from *Streptomyces violascens* I Production, isolation and some properties." Chem. Pharm. Bull. **31**: 1307-1314.

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

Koyama, H. (1983). "Further characterization of a novel L-phenylalanine oxidase (deaminating and decarboxylating) from *Pseudomonas sp.*" J. Biochem. (Tokyo) **93**: 1313-1319.

Krebs, H. A. (1935). "Metabolism of amino-acids. III. Deamination of amino-acids" Biochem. J. **29**: 1620-1625.

Kusakabe, H., Kodama, K., Kuninaka, A., Yoshino, H., Misono, H., Soda, K. (1980). "A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties." J. Biol. Chem. **255**: 976-981.

Lamzin, V., Wilson, KS (2003). "Automated refinement of protein models." Acta Cryst. D **49**: 129-147.

Laskowski, R.A. (1995). "SURFNET: A program for visualizing molecular surfaces, cavities and intermolecular interactions." J. Mol. Graphics **13**: 323-330.

Le, K. H., Villanueva, V.R. (1978). "Purification and characterization of epsilon-N-trimethyllysine L-amino oxidase from *Neurospora crassa*." Biochim Biophys Acta **524**: 288-296.

- Lee, Y. C., Huh, M.H. (1998). "Development of biosensor with immobilized L-amino acid oxidase for determination of L-amino acids." Journal of Food Biochemistry **1999**: 173-185.
- Liu, L., Wang, J. (1999). "Remarkable thermostability of bioelectrodes based on enzymes immobilized within hydrophobic semi-solid matrices." Biotechnol. Appl. Biochem. **30**: 177-183.
- Loo JA. (1997). "Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry." Mass Spectrom Rev. **16**(1): 1-23
- Massad, G., Zhao, H., Mobley, H.L. (1995). "*Proteus mirabilis* amino acid daminase: cloning, nucleotide sequence, and characterization of aad." J. Bacteriol. **177**: 5878-5883.
- Mattevi, A. V., M. A.; Todone, F.; Rizzi, M.; Teplyakov, A.; Coda, A.; Bolognesi, M.; Curti, B. (1996). "Crystal structure of D-amino acid oxidase: A case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome b<sub>2</sub>." Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS) **93**: 7496 - 7501.
- Matthew, B. (1968). "Solvent content of protein crystals." J. Mol. Biol. **33**: 491-497.
- McPherson, A. (1999). Crystallisation of Biological macromolecules. Cold Spring Harbor, N.Y., US, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mesecar, A. D., Stoddard, B.L., Koshland, D.E. Jr. (1997). "Orbital steering in the catalytic power of enzymes: small structural changes with large catalytic consequences." Science **277**: 202-206.
- Miura, R., Setoyama, C., Nishina, Y., Shiga, N., Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K. (1997). "Structural and mechanical studies on D-amino acid oxidase x substrate complex: implications of the crystal structure of enzyme x analog complex." J. Biochem (Tokyo) **122**: 825-833.
- Mizutani, H. M., I.; Hirotsu, K.; Nishina, Y.; Shiga, K.; Setoyama, C.; Miura, R. (1996). "Three-dimensional structure of porcine kidney D-amino acid oxidase at 3.0Å resolution." J. Biochem (Tokyo) **120**: 14-17.
- Munoz-Blanco, J., Hidalgo-Martinez, J, Cardenas, J (1990). "Extracellular deamination of L-amino acids by *Chlamydomonas reinhardtii* cells." Planta **182**: 194-198.

Otwinowski, Z., Minor, W, Ed. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. Methods in Enzymology, Academic Press.

Pantaleone, D. P., Geller, A.M., Taylor, P.P. (2001). "Purification and characterization of an L-amino acid deaminase used to prepare unnatural amino acids." J. Mol. Catal. B: Enzymatic **11**: 795-803.

Pawelek, P. D. C., J.; Coulombe, R.; Macheroux, P.; Ghisla, S.; Vrielink, A. (2000). "The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site." The EMBO Journal **19**(16): 4204-4215.

Perrakis, A., Morris, R., Lamzin, V. S. (1999). "Automated protein model building combined with iterative structure refinement." nature structural biology **6**(5): 458 - 463.

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 Cryst. D **53**: 448-455.

Piedras, P., Pineda, M., Munoz, J., Cardenas, J. (1992). "Purification and characterization of an L-amino acid oxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*." Planta **188**: 13-18.

Piubelli, L. M., G.; Caldinelli, L.; Pilone, M.S.; Pollegioni, L. (2003). "Dissection of the structural determinants involved in formation of the dimeric form of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*: role of the size of the bF5-bF6 loop." Protein Engineering **16**(12): 1063-1069.

Pollegioni, L., Blodig, W., Ghisla, S. (1997). "On the mechanism of D-amino acid oxidase. Structure/linear free energy correlations and deuterium effects using p-substituted phenylglycines." J. Biol. Chem. **272**(4924-4934).

Pollegioni, L., Diederichs, K., Molla, G. , Umhau, S. , Welte, W. , Ghisla, S. , Pilone, M. S. (2002). "Yeast D-Amino acid oxidase: structural basis of its catalytic properties." Journal of Molecular Biology **324**: 535-546.

Ponnudurai, G. C., M. C. M.; Tan, N. H. (1994). "Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom." Arch. Biochem. Biophys. **313**(2): 373 - 378.

- Popov, A., Bourenkov, GP (2003). "Choice of data-collection parameters based on statistic modelling." Acta Cryst. D **59**: 1145-1153.
- Porter, D. J. T. B., H. J. (1969). Biochem. Biophys. Res. Commun. **36**: 209-214.
- Porter, D. J. T. B., H. J., Ed. (1976). *Flavins and Flavoproteins*. New York, Elsevier.
- Porter, D. J. T. B., Harold J. (1980). "Interpretation of the pH-Dependance of Flavin Reduction in the L-Amino Acid Oxidase Reaction." The Journal of Biological Chemistry **225**(7): 2969-2975.
- Rao, S. T., Rossman, M.G (1973). "Comparison of super-secondary structures in proteins." J. Mol. Biol. **76**: 241-256.
- Rice, R., Earnest, TN, Brunger, AT (2000). "Single-wavelength anomalous diffraction phasing revisited." Acta Crystallographica Section D(56): 1413-1420.
- Rossman, M. G., Moras, ., Olsen, K.W. (1974). "Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein." Nature **250**: 194-199.
- Sakurai, Y., Takasuka, H., Yoshioka, A., Matsui, T., Suzuki, M., Titani, K., Fujimura, Y. (2001). "Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja Naja kaouthia* venom." Toxicon. **39**: 1827-1833.
- Sanchez, E., Magalhaes, A (1991). "Purification and partial characterization of an L-amino acid oxidase from bustmaster snake (*Surucucu Pico de Jaca*) *Lachesis muta muta* venom." Braz. J. Med. Biol. Res. **24**: 249-260.
- Schomburg, D., Reichelt, J. (1998). "A Comprehensive Protein Modelling Program System." J. Mol. Graphics **6**: 161-165.
- Setford, S. J., White, S.F., Bolbot, J.A. (2002). "Measurement of protein using eletrochemical bi-enzyme sensor." Biosens. Bioelectron. **17**: 79-86.
- Sheldrick, G. M. (1990). "Phase annealing in SHELX-90: direct methods for larger substructures." Acta Cryst. A **46**: 467-473.
- Shnueli, U. (1996). *International tables for crystallography B reciprocal space*. Dordrecht, Kluver Academic Press.

Sikora, L., Marzluf, G.A. (1982). "Regulation of L-amino acid oxidase and of D-amino acid oxidase in *Neurospora crassa*."

Souza, D. H. F. E., L.M.; Fletcher, J.E.; Jiang, M.; Garratt, R.C.; Oliva, G.; Selistre-de-Araujo, H.S. (1999). "Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data." Arch. Biochem. Biophys. **368**(2): 285-290.

Suhr, S., Kim, DS (1996). "Identification of the snake venom substance that induces apoptosis." Biochem. Biophys. Res. Commun. **224**: 134-139.

Suhr, S., Kim, DS (1999). "Comparison of the apoptotic pathways induced by L-amino acid oxidase and hydrogen peroxide." J. Biochem. **125**: 305-309.

Takahashi, E., Furui, M., Seko, H., Shibatani, T. (1997). "D-methionine preparation from racemic methionines by *Proteus vulgaris* IAM 12003 with asymmetric degrading activity." Appl. Microbiol. Biotechnol. **47**: 173-179.

Takatsuka, H., et al. (2001). "Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation." Biochem. Biophys. Acta **1544**: 267-277.

Tan, N. S., N. (1991). "Substrate specificity of king cobra (*Ophiophagus Hannah*) venom L-amino acid oxidase." Int. J. Biochem. **23**(3): 323-327.

Tan, N. S., S. (1992). "Purification properties of the L-amino acid oxidase from monocellate cobra (*Naja Naja Kaouthia*) venom." Int. J. Biochem. **24**(6): 967-973.

Terwilliger, T. (2002). "Automated structure solution, density modification and model building." Acta Cryst. D **58**: 1937 - 1940.

Terwilliger, T., Berendzen, J (1999). "Automated MAD and MIR structure solution." Acta Cryst. D **55**: 849-861.

Tong, L., Rossmann, M., Ed. (1997). Rotation Function Calculations with GLRF program. Methods in Enzymology.

Torii, S., Naito, M, Tsuruo, T (1994). "Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamond rattlesnake venom." J. Biol. Chem. **272**: 9539-9542.

Umhau, S. P., L.; Molla, G.; Diederichs, K.; Welte, W.; Pilone, M. S.; Ghisla, S. (2000). "The x-ray structure of D-amino acid oxidase at very high resolution identifies the chemical mechanism of flavin-dependent substrate dehydrogenation." Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS) **97**(23): 12463-12468.

Vallon, O. (2000). "New sequence motifs in flavoproteins: Evidence for common ancestry and tools to predict structure." Proteins: Structure, Function and Genetics **38**: 95-114.

Walsh, C. T., Schonbrunn, A., Abeles, R.H. (1971). "Studies on the mechanism of action of D-amino acid oxidase. Evidence for removal of substrate alpha-hydrogen as a proton." J. Biolog. Chem. **246**: 6855-6866.

Walsh, C. T. (1978). "Chemical approaches to the study of enzymes catalyzing redox transformations." Annu. Re. Biochem. **47**: 881-931.

Warburg, O., Christian, W. (1938). "Chemische Konstitution von Fermenten." W. Biochem. Z. **298**: 150-155

Wierenga, R. K., Drenth, J., Schultz, G.E. (1983). "Comparison of the three-dimensional protein and nucleotide structure of the FAD-binding domain of p-hydroxybenzoate hydroxylase with the FAD- as well as NADPH-binding domains of glutathion reductase." J. Mol. Biol. **167**(725-739).

Yang, C., Pflugrath, J.W. ( 2001). "Applications of anomalous scattering from S atoms for improved phasing of protein diffraction data collected at Cu Ka wavelength." Acta Cryst. **D57**: 1480-1490.

Zeller, A. (1944). "Über eine neue l-Aminosäure-oxydase." Helv. Chim.Acta **27**: 1888-1903.



## A.7 Abbildungsverzeichnis

<b>ABBILDUNG 1.1:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES IDEALISIERTEN ROSSMAN-FALTUNGSMOTIVS ALS BANDDIAGRAMM .....	2
<b>ABBILDUNG 1.2:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DURCH DIE L-AAO KATALYSIERTEN REAKTION.....	3
<b>ABBILDUNG 3.1:</b> CHROMATOGRAMME DER LAAO, IN DENEN DIE ABSORBANZ BEI 280NM UND DIE LEITFÄHIGKEIT GEGEN DAS ELUTIONSVOLUMEN AUFGETRAGEN SIND.....	42
<b>ABBILDUNG 3.2:</b> ERGEBNISSE DER SDS-PAGE DER UNTERSUCHTEN FRAKTIONEN NACH BEIDEN SÄULENLÄUFEN.....	43
<b>ABBILDUNG 3.3:</b> ERGEBNIS DER SDS-PAGE (A) UND DER NATIVEN PAGE (B) DER GEREINIGTEN LAAO NACH ZWEI CHROMATOGRAPHIESCHRITTEN. ...	44
<b>ABBILDUNG 3.4:</b> SDS-PAGE DER FÜR DIE MALDI-TOF-MS VORBEREITETEN PROBEN .....	45
<b>ABBILDUNG 3.5:</b> DEKONVULIERTES ESI-MS-SPEKTRUM DER GEREINIGTEN LAAO IM MASSE/LADUNGSBEREICH VON 53.1-54.4KDA.....	46
<b>ABBILDUNG 3.6:</b> KRISTALLE DER RAUMGRUPPE $P2_12_12_1$ .....	48
<b>ABBILDUNG 3.7:</b> KRISTALLE DER ZENTRIERT ORTHORHOMBISCHEN RAUMGRUPPE .....	49
<b>ABBILDUNG 3.8:</b> DEKONVULIERTES ESI-MS-SPEKTRUM DER GEREINIGTEN LAAO IM MASSE/LADUNGSBEREICH VON 53.1-54.4KDA.....	51
<b>ABBILDUNG 3.9 (A) + (B):</b> VERBESSERUNG DER PHASEN UND DER DARAUS BERECHNETEN ELEKTRONENDICHTEKARTEN IM VERLAUF DER STRUKTURLÖSUNG.....	63
<b>ABBILDUNG 3.9 (C) + (D):</b> VERBESSERUNG DER PHASEN UND DER DARAUS BERECHNETEN ELEKTRONENDICHTEKARTEN IM VERLAUF DER STRUKTURLÖSUNG.....	64
<b>ABBILDUNG 3.10:</b> FORTSCHRITT BEIM AUTOMATISCHEN BAU DES HYBRID-MODELLS DER LAAO MIT ARP/WARP. (A) ERSTES MODELL UNTER VERWENDUNG DES SAD-DATENSATZES BIS 2.45Å; (B) MODELL NACH PHASENERWEITERUNG AUF 2.0 Å. (C) ENDVERFEINERTE STRUKTUR BEI 1.4Å.....	71
<b>ABBILDUNG 3.11:</b> POSITION DER INKORPORIERTEN QUECKSILBERATOME.....	72
<b>ABBILDUNG 3.12:</b> KRISTALL VOR (A) UND NACH (B) INKUBATION MIT L-ALANIN. ....	74
<b>ABBILDUNG 3.13:</b> RAMACHANDRAN-PLOT DER NATIVEN LAAO, $P2_12_12_1$ .....	78

<b>ABBILDUNG 3.14 (A) UND (B):</b> REPRÄSENTATIVER AUSSCHNITT DER $2DF_{O-MF_C}$ GEWICHTETEN NATIVEN LAAO ELEKTRONENDICHTE BEI 1.4Å.....	79
<b>ABBILDUNG 3.15 (A) UND (B):</b> REPRÄSENTATIVER AUSSCHNITT DER $2DF_{O-MF_C}$ GEWICHTETEN NATIVEN LAAO ELEKTRONENDICHTE BEI 1.4Å. DIE GEZEIGTE ELEKTRONENDICHTE IST BEI $2.0\sigma$ KONTOURIERT. (A) AKTIVES ZENTRUM. (B) FEHLENDER LOOP ZWISCHEN RESIDUE 432-440.....	80
<b>ABBILDUNG 3.16:</b> BANDSTRUKTUREN DES MONOMERS A DER LAAO. ....	82
<b>ABBILDUNG 3.17 (A) - (C):</b> RAMACHANDRAN-PLOT DER KOMPLEXSTRUKTUREN DER LAAO, $P2_12_12_1$ .....	85
<b>ABBILDUNG 3.18 (A) - (B):</b> REPRÄSENTATIVER AUSSCHNITT DER $2DF_{O-MF_C}$ GEWICHTETEN ELEKTRONENDICHTEN DER ROLAAO IM KOMPLEX MIT L-ALANIN (A), L-PHENYLALANIN (B). ....	86
<b>ABBILDUNG 3.18 (C):</b> REPRÄSENTATIVER AUSSCHNITT DER $2DF_{O-MF_C}$ GEWICHTETEN ELEKTRONENDICHTEN DER ROLAAO IM KOMPLEX MIT O-AMINOBENZOAT (C). ....	87
<b>ABBILDUNG 5.1:</b> DAS MONOMER DER ROLAAO ALS BANDDIAGRAMM AUS VERSCHIEDENEN BLICKWINKELN.....	98
<b>ABBILDUNG 5.2:</b> TOPOLOGIEDIAGRAMM DES MONOMERS DER ROLAAO. ....	98
<b>ABBILDUNG 5.3:</b> DIE DOMÄNEN EINES MONOMERS DER ROLAAO ALS BANDDIAGRAMM. ....	99
<b>ABBILDUNG 5.4:</b> BANDDIAGRAMM DER FAD-BINDUNGSDOMÄNE DER ROLAAO. ....	100
<b>ABBILDUNG 5.5:</b> BANDDIAGRAMM DER SUBSTRAT-BINDUNGSDOMÄNE DER ROLAAO. ....	101
<b>ABBILDUNG 5.6:</b> BANDDIAGRAMM DER HELICALEN DOMÄNE DER ROLAAO.. .	102
<b>ABBILDUNG 5.7:</b> DIE HYDROSTATISCHE OBERFLÄCHE EINES ROLAAO MONOMERS, BERECHNET IN BRAGI (SCHOMBURG 1998). ....	102
<b>ABBILDUNG 5.8:</b> DAS FUNKTIONELLE DIMER DER ROLAAO ALS BANDDIAGRAMM AUS VERSCHIEDENEN BLICKWINKELN. ....	104
<b>ABBILDUNG 5.9 (A)+(B):</b> SUPERPOSITION DER HAUPTKETTEN DER HOMOLOGEN PROTEINE DER $GH_2$ -FAMILIE. (A) SUPERPOSITION DER HAUPTKETTEN DER POLYAMINOXIDASE (HELLBLAU, PDB-KÜRZEL 1B37_A) UND MONOAMIN OXIDASE (DUNKELBLAU, PDB-KÜRZEL 1OJA_A) MIT DER ROLAAO. (B) SUPERPOSITION DER HAUPTKETTEN DER D-AMINOSÄURE OXIDASEN AUS SCHWEINENIERE ( HELLBLAU, PDB-KÜRZEL 1DAO_A) UND RH. GRACILIS (DUNKELBLAU, PDB-KÜRZEL:1C0P_A ) MIT DER ROLAAO...	106
<b>ABBILDUNG 5.10:</b> SUPERPOSITION DER $C_{\alpha}$ -KETTEN DER LAAO AUS <i>CALLOSELASMA RHODOSTOMA</i> (GRÜN) UND DER AUS <i>RHODOCOCCUS OPACUS</i> . ....	107

---

<b>ABBILDUNG 5.11:</b> STRUKTURRICHTIGES SEQUENZALIGNMENT DER ROLAAO (OBERE ZEILE) UND CRLAAO (UNTERE ZEILE). .....	109
<b>ABBILDUNG 5.12 (A)-(D):</b> DIE DIMERE DER LAAOS UND DAAOS ALS BANDDIAGRAMME. ....	111
<b>ABBILDUNG 5.13:</b> VERGLEICH DER KONTAKTFLÄCHEN DER BEIDEN LAAOS. .	112
<b>ABBILDUNG 5.14:</b> VERGLEICH DES ZUGANGS ZUM AKTIVEN ZENTRUM IN DEN BEIDEN L-AMINOSÄUREOXIDASEN. ....	114
<b>ABBILDUNG 5.15:</b> DARSTELLUNG DER NICHT-KOVALENTEN KONTAKTE ZWISCHEN FAD UND PROTEIN. DIE ENTFERNUNGEN .....	116
<b>ABBILDUNG 5.16 (A)-(D):</b> DIE AKTIVEN ZENTREN DER ROLAAO IN DEN VERSCHIEDENEN FUNKTIONELLEN ZUSTÄNDEN. ....	119
<b>ABBILDUNG 5.17:</b> SUPERPOSITION DER AKTIVEN RESIDUEN BEI DER BINDUNG VON O-AMINOBENZOAT IN DEN BEIDEN LAAOS.....	124
<b>ABBILDUNG 5.18 (A)-(C):</b> DIE KOORDINATION VON (O-AMINO)BENZOAT UND L-BZW. D-ALANIN IN DEN KOMPLEXSTRUKTUREN DER CRLAAO UND DEN DAAOS.....	125
<b>ABBILDUNG 5.19:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES MICHEALIS-KOMPLEXES M1. ....	130
<b>ABBILDUNG 5.20:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES REDUZIERTEN FLAVIN-PRODUKT KOMPLEXES M2.....	131



## A.8 Tabellenverzeichnis

<b>TABELLE 2.1:</b> VERWENDETE GERÄTE .....	19
<b>TABELLE 2.2:</b> SONSTIGE MATERIALIEN.....	21
<b>TABELLE 2.3:</b> COMPUTERPROGRAMME .....	22
<b>TABELLE 2.4:</b> MESSPARAMETER NATIVER DATENSATZ, P <sub>2,2,2</sub> <sub>1</sub> .....	32
<b>TABELLE 2.5:</b> MESSPARAMETER NATIVER DATENSATZ, C <sub>222</sub> <sub>1</sub> .....	32
<b>TABELLE 2.6:</b> MESSPARAMETER MAD-DATENSATZ, HGCL <sub>2</sub> -DERIVAT .....	34
<b>TABELLE 2.7:</b> MESSPARAMETER SAD-DATENSATZ, HGCL <sub>2</sub> -DERIVAT.....	35
<b>TABELLE 2.8:</b> MESSPARAMETER DER KOMPLEX-DATENSÄTZE, P <sub>2,2,2</sub> <sub>1</sub> .....	36
<b>TABELLE 3.1:</b> AUSBEUTE PROTEIN NACH DEN CHROMATOGRAPHIESCHRITTEN. ES SIND DIE PROTEINKONZENTRATION, DAS VOLUMEN DER PROTEINLÖSUNGEN UND DIE GESAMTMENGE PROTEIN ANGEGEBEN. ....	41
<b>TABELLE 3.2:</b> ÜBERSICHT ÜBER VERBINDUNGEN, DIE DAS LAUFVERHALTEN DER LAAO IM NATIVEN PAGE BEEINFLUSSTEN, MIT DEN DAZU ERFORDERLICHEN MINDESTKONZENTRATIONEN UND INKUBATIONSZEITEN.....	52
<b>TABELLE 3.3:</b> ÜBERSICHT ÜBER DIE FÜR DIE KOKRISTALLISATION EINGESETZTEN REAGENZIEN MIT DEN ENTSPRECHENDEN VERWENDETEN KONZENTRATIONEN .....	53
<b>TABELLE 3.4:</b> AUSGEWÄHLTE PARAMETER DER NATIVEN DATENSÄTZE.....	55
<b>TABELLE 3.5:</b> ÜBERSICHT ÜBER MATTHEW-KOEFFIZIENT, LM-ANTEIL UND ANZAHL DER MONOMERE PRO ASYMMETRISCHER EINHEIT FÜR BEIDE KRISTALLFORMEN .....	56
<b>TABELLE 3.6:</b> ZUSAMMENSTELLUNG DER AUFLÖSUNGSGRENZEN DER MIT UNTERSCHIEDLICHEN REAGENZIEN BEHANDELTEN KRISTALLE NACH 24- STÜNDIGER INKUBATION UND 10MM-KONZENTRATION.....	57
<b>TABELLE 3.7:</b> AUSGEWÄHLTE PARAMETER DER DATENSTATISTIKEN DER MAD- DATENSÄTZE .....	60
<b>TABELLE 3.8:</b> AUSGEWÄHLTE PARAMETER DER DATENSTATISTIKEN DER SAD- DATENSÄTZE .....	61
<b>TABELLE 3.9:</b> FORTSCHRITT BEIM AUTOMATISCHEN BAU DES HYBRID- MODELLS DER LAAO HAUPTKETTE MIT ARP/WARP. EIN ZYKLUS BESTEHT AUS 10 VERFEINERUNGSRUNDEN MIT REFMAC5 UND EINEM ANSCHLIEßENDEN MODELLBAU. ....	65
<b>TABELLE 3.10:</b> FORTSCHRITT BEIM AUTOMATISCHEN BAU DES HYBRID- MODELLS DER LAAO MIT ARP/WARP NACH PHASENERWEITERUNG AUF 2.0	

Å. EIN ZYKLUS BESTEHT AUS 5 VERFEINERUNGSRUNDEN MIT REFMAC5 UND ANSCHLIEßENDEN MODELLBAU.....	67
<b>TABELLE 3.11:</b> STATISTIK DES <i>SIDE CHAIN DOCKINGS</i> FÜR MONOMER A UND B. MIT DER ZUWEISUNG DER KETTENFRAGMENTE.....	68
<b>TABELLE 3.12:</b> ERGEBNISSE DES <i>SIDE CHAIN DOCKING</i> FÜR MONOMER A (A) UND MONOMER B (B): UNTER DER SEQUENZ SIND DIE BEZEICHNUNGEN DER JEWEILIGEN KETTEN ANGEGEBEN.....	68
<b>TABELLE 3.13:</b> ERGEBNIS DER KREUZROTATIONS- UND TRANSLATIONSSUCHE NACH DER STARRE-KÖRPER-VERFEINERUNG UNTER ANNAHME DER RAUMGRUPPE C222 <sub>1</sub> .....	73
<b>TABELLE 3.14:</b> ERGEBNIS DER KREUZROTATIONS- UND TRANSLATIONSSUCHE NACH DER STARRE-KÖRPER-VERFEINERUNG UNTER ANNAHME DER RAUMGRUPPE P <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> .....	73
<b>TABELLE 3.15:</b> AUSGEWÄHLTE KRISTALLOGRAPHISCHE PARAMETER DER DATENSÄTZE DER LAAO- KOMPLEXE. DIE DATENSÄTZE WURDEN AN DER BL2 DER PSF AM BESSY IN BERLIN GEMESSEN.....	75
<b>TABELLE 3.16:</b> VERFEINERUNG DER NATIVEN STRUKTUR. DER DPI UND DER LUZZATI-PLOT WURDEN MIT SFCHECK BERECHNET. FERNER WURDEN MIT SFCHECK DICHTEKORRELATIONSKOEFFIZIENTEN FÜR ALLE HAUPT- UND SEITENKETTENATOME BERECHNET. DIE B-FAKTOREN WURDEN MIT BAVERAGE BERECHNET.....	81
<b>TABELLE 3.17:</b> VERFEINERUNG DER KOMPLEX-STRUKTUREN. DER DPI UND DER LUZZATI-PLOT WURDEN MIT SFCHECK BERECHNET. FERNER WURDEN MIT SFCHECK DICHTEKORRELATIONSKOEFFIZIENTEN FÜR ALLE HAUPT- UND SEITENKETTENATOME BERECHNET. DIE B-FAKTOREN WURDEN MIT BAVERAGE BERECHNET.....	84
<b>TABELLE 3.18:</b> ERGEBNISSE DES STRUKTURVERGLEICHES MIT STANDARDEINSTELLUNGEN ANHAND DER SEKUNDÄRSTRUKTURELEMENTE MIT DEM DALI-SERVER. DABEI SIND DIE PDB-KÜRZEL DER STRUKTUREN, DIE LÄNGE DER AMINOSÄURESEQUENZ, DIE ANZAHL ALIGNIERTER RESIDUEN, DIE SICH DARAUS ERGEBENDE RMS- ABWEICHUNG DER C <sub>α</sub> -ATOME, DIE SEQUENZIDENTITÄT UND DIE NACH DYM ERFOLGTE ZUORDNUNG ZUR GH <sub>2</sub> -FAMILIE (DYM 2001) AUFGEFÜHRT. .....	88
<b>TABELLE 3.19:</b> ERGEBNISSE DES AUTOMATISCHEN, PAARWEISEN STRUKTURALIGNMENTS DER ROLLAO MIT ANDEREN VERTRETEREN DER GH <sub>2</sub> -FAMILIE. NEBEN DEM PDB-KÜRZELN SIND DIE ANZAHL ALIGNIERTER C <sub>α</sub> -ATOME, DIE RMS-ABWEICHUNG DER ALIGNIERTEN C <sub>α</sub> -ATOME UND DIE SICH DARAUS ERGEBENE STRUKTURIDENTITÄT AUFGETRAGEN. ....	88

**TABELLE 5.1: ÜBERSICHT ÜBER DIE GRÖÖE DER OBERFLÄCHEN UND  
KONTAKTFLÄCHEN DER LAAOS UND DAAOS. .... 111**