

**Strukturen der β -D-Xylosidase aus
Geobacillus stearothermophilus T-6 in
verschiedenen kristallinen und
funktionellen Zuständen**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt von
Christian Br \ddot{u} x
aus Krefeld

Köln 2005

Berichtersteller:

Prof. Dr. Dietmar Schomburg
Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung:

7. Februar 2005

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg für das interessante und herausfordernde Projekt, dass er mir stets ein offenes Ohr schenkte und mir Freiheiten bei Planung und Durchführung des Projektes einräumte,

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

Herrn Dr. Karsten Niefind für die geduldige Einführung in die theoretischen Hintergründe der Proteinkristallographie, die vielen praktischen Hilfen und Diskussionen, die stete Unterstützung bei den unzähligen Schwierigkeiten der Proteinkristallographie, die Betreuung an den hauseigenen Röntgenanlagen und die Durchsicht der Arbeit,

Herrn Prof. Dr. Yuval Shoham, Frau Dalia Shallom und Herrn Alon Ben-David für die ausgezeichnete Kooperation, die hervorragende Qualität der mir zur Verfügung gestellten Proteinproben, die aufschlussreichen Diskussionen und die Hilfe bei der Interpretation, Einordnung und Publikation der Ergebnisse,

Frau Dr. Annette Faust und Herrn Dr. Guido Hansen für die geduldige Hilfe bei unendlich vielen kleinen und großen Problemen, die die Röntgenstrukturanalyse mit sich bringt,

meinen kristallographischen Leidensgenossen Astrid Höppner und Jan Schoepe für die kristallographischen Diskussionen und das gegenseitige Verständnis für das jeweilige Unverständnis,

allen, die mit mir an den Synchrotronen in Berlin und Hamburg die Nächte durchwacht haben,

Herrn Michael Zimmermann für die schnelle und unkomplizierte Lösung von computertechnischen Problemen,

Dr. Shivani Chatterjee, Frau Sabine Lohmer und Anja Hochheiser für ihre Unterstützung im Laboralltag,

Herrn Bao Lide, Frau Astrid Gruhl, Frau Eliane Hornemann und ganz besonders Herrn Dr. Sebastian Buchinger für das phantastische Arbeitsklima, welches als moralische Stütze für den Erfolg dieses Projektes von entscheidender Bedeutung war und mir geholfen hat, nach Rückschlägen wieder auf die Beine zu kommen,

der gesamten RPG-Runde, die einmal wöchentlich dazu beigetragen hat, mich daran zu erinnern, dass es ein Leben jenseits des Instituts gibt,

meiner Familie und besonders meiner Freundin Yvonne für den Rückhalt, ohne den diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

vielen, vielen Dank !

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VII

1 Einleitung.....	1
1.1 Glycosidasen	1
1.1.1 Allgemeine Grundlagen	1
1.1.2 Hemicellulasen	2
1.1.3 Historie der Glykosid-Hydrolasen	3
1.1.4 Unterteilung der Glykosid-Hydrolasen in Familien und Klane	4
1.1.5 β -Xylosidasen	4
1.1.6 Die Reaktionsmechanismen der Glykosid-Hydrolasen	5
1.1.7 Retinierende Glycosidasen	5
1.1.8 Invertierende Glycosidasen	6
1.2 Die- β -D-Xylosidase3 aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> T-6	7
1.2.1 Kinetische Analysen der katalytischen Mutanten der XynB3	8
1.2.2 Identifikation der katalytischen Aminosäuren	8
1.2.3 Identifikation der katalytischen Säure E187	9
1.2.4 Identifikation der katalytischen Base D15	10
1.2.5 Substratspezifität der XynB3	10
1.2.6 Exoglykosidischer Charakter der XynB3	11
1.2.7 Biotechnologische Bedeutung	11
1.3 Spezielle kristallographische Kapitel	12
1.3.1 Strukturlösung und Phasierung	12
1.3.2 MIR-Phasierung	12
1.3.3 MAD-Phasierung	13
1.3.4 Molekularer Ersatz	15
1.4 Zielsetzung der Arbeit	16

2 Material und Methoden

2.1	Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und EDV Systeme	17
2.1.1	Chemikalien	17
2.1.2	Materialien, Geräte und EDV-Systeme	18
2.2	Proteinexpression und Reinigung	19
2.3	Überprüfung der Reinheit	20
2.3.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
2.3.2	Massenspektrometrie	20
2.4	Proteinkonzentration	21
2.5	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	21
2.6	Analytische Gelfiltration	22
2.7	Proteinkristallisation	22
2.7.1	Kristallisation der Apo-Proteine	22
2.7.2	Kokristallisation mit 1,4- β -D-Xylobiose	24
2.8	Cryoprotokoll	24
2.9	Diffraktionsexperimente	26
2.9.1	Allgemeines	26
2.9.2	Datensätze der XynB3 und der Mutanten	26
2.10	Datenreduktion	28
2.11	Strukturlösung der XynB3 durch Molekularen Ersatz	28
2.12	Modellbau und Verfeinerung	29
2.13	Validierung und Darstellung der Modelle	30
2.14	Identifizierung des Metalls	30
3	Ergebnisse und Diskussion	33
3.1	Proteinanalytik	33
3.1.1	SDS-Gelelektrophorese	33
3.1.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	34
3.1.3	Gelfiltration	36
3.1.4	Massenspektrometrie	37
3.2	Kristallisation	38
3.2.1	Kristallisation der XynB3	38
3.2.2	Kristallisation der Selenomethionin derivatisierten XynB3	41

3.2.3	Kristallisation und Kokristallisation der XynB3 Mutanten mit Xylobiose	41
3.3	Cryoprotokoll	42
3.4	Diffraktionsmessungen	42
3.5	Kristallpackung	43
3.6	Berechnung der Selbstrotationsfunktionen	45
3.6.1	orthorhomische Kristallform	45
3.6.2	tetragonale Kristallform	46
3.7	Strukturlösung und Verfeinerung	48
3.7.1	Molekulare Ersatzrechnung der selenomethionin-derivatisierten XynB3	48
3.7.2	Modellbau der selenomethionin-derivatisierten XynB3 mit ARP/wARP und manuellen Methoden	49
3.7.3	Molekulare-Ersatz Rechnungen der nativen XynB3 sowie der Mutanten D15G, D128G und E187G in der tetragonalen Kristallform	50
3.7.4	Strukturverfeinerung	51
3.8	Qualität der XynB3-Strukturen	53
3.9	Tertiärstruktur	57
3.9.1	Die katalytische fünfblättrige β -Propeller Domäne	58
3.9.2	Die C-terminale β -sandwich Domäne	58
3.10	Quartärstruktur	61
3.10.1	Dimerisierung	61
3.10.2	Tetramerisierung	63
3.11	Die native Quartärstruktur - Dimer oder Tetramer ?	66
3.11.1	Zusammenfassung der Quartärstruktur	75
3.12	Analyse des Metallatoms	76
3.13	Die Struktur des aktiven Zentrums	80
3.14	Die katalytischen Aminosäuren	82
3.15	Das Substrat Xylobiose in den Strukturen der D128G und E187G Mutanten	84
3.15.1	Substratkoordinierung	86
3.16	Reaktionsmechanismus	87

3.16.1	Allgemeiner Reaktionsmechanismus in invertierenden Glykosidasen	87
3.16.2	Reaktionsmechanismus der XynB3	88
3.17	Substratspezifität	90
3.18	Topologievergleich der aktiven Zentren von XynB3 und der α -L-Arabinanase aus <i>Cellvibrio japonicus</i>	92
3.18.1	Unterschiede in der Wirkungsweise	92
3.18.2	Unterschiede in der Substratspezifität	95
4	Zusammenfassung	97
5	Literaturverzeichnis	99
6	Anhang	111
A1	Kurzzusammenfassung	111
A2	Abstract	112
A3	Vorabveröffentlichungen.....	113
A4	Abbildungsverzeichnis	114
A5	Tabellenverzeichnis.....	116
A6	Erklärung	119
A7	Lebenslauf	121

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

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

Sonstige Abkürzungen

Å	Ångström (1 Å = 0,1 nm)
a, b, c	Gittervektoren im realen Raum
α , β , γ	Winkel zwischen den Gitterachsen
Abb.	Abbildung
AU	asymmetrische Einheit der Elementarzelle eines Kristalls
B	Temperaturfaktor
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung m. b. H
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumine)
C	Celsius
Ca	Kalzium
ca.	circa
CCP4	Collaborative Computing Project Number 4
Cu	Kupfer
Da	Dalton
DDAO	N,N-Dimethyldecylamine-beta-oxid
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron
DLS	DLS dynamische Lichtstreuung (engl. dynamic light scattering)
DORIS	Doppelring-Speicher
E.coli	Darmbakterium Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-di-Natriumsalz
EDX	Energiedispersive Röntgenanalyse (Energy Dispersive X-ray Analysis)
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
eV	Elektronenvolt
F_c	berechnete Strukturfaktoramplituden
F_o	gemessene Strukturfaktoramplituden
ggf.	gegebenenfalls

GH	Glykosid-Hydrolase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethans Sulfonsäure
HCl	Salzsäure
I	Intensität
K	Kelvin
λ	Wellenlänge
$\sigma(I)$	Standardabweichung der Intensität
M	molar (Mol/Liter)
MAD	Multiple anomale Dispersion
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations Massenspektroskopie (engl. matrix assisted laser desorption and ionization)
HEGA-8	Octanoyl-N-hydroxyethylglucoamid
MES	2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure
Mol	Teilchenzahl (1 Mol $\approx 6.023 \times 10^{23}$ Teilchen)
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MR	Molekularer Ersatz
MW	Molekulargewicht
NCS	nicht-kristallographische Symmetrie (engl. non crystallographic symmetry)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PISA	Protein Interface, Oberflächen und Zusammenschlüsse (eng. Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies)
PDB	protein data bank
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentia hydrogenii
PQS	Protein Quartär Struktur (engl. Protein Quaternary Structure)
PSF	Protein Struktur Fabrik (engl. Protein structure Factory)
REM	Rasterelektronenmikroskop
R_{free}	freier R-Wert
R_{work}	R-Wert des Arbeitsdatensatzes

RMSD	mittlere quadratische Abweichung (engl. root mean square deviation)
SeMet	Selenomethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TLS	Translations-, Librations-, und Schraubenachsen-Rotations-Tensoren
TOF	Flugzeit (engl. time of flight)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
vgl.	vergleiche
V_M	Matthews-Koeffizient
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
XynB3	β -D-Xylosidase 3 aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> T-6
Zn	Zink

1 Einleitung

1.1 Glycosidasen

1.1.1 Allgemeine Grundlagen

Der größte Teil der durch photosynthetische CO₂ Fixierung produzierten Biomasse wird in Zellwänden in Form von polymeren Kohlenhydraten, hauptsächlich als Cellulose oder Hemicellulose, gespeichert. Der Abbau dieser polymeren Kohlenwasserstoffe stellt einen Schlüsselschritt des Kohlenstoffzyklus dar, in dem die pflanzliche Biomasse zu löslichen Zuckern abgebaut wird. Für den mikrobiellen Abbau der pflanzlichen Zellwände bedarf es einer Vielzahl zusammenwirkender Glykosid-Hydrolasen wie Cellulasen und Hemicellulasen.

Xylan (Abbildung 1-1) ist das am häufigsten vorkommende Heteropolysaccharid der pflanzlichen Hemicellulose. Es macht etwa 30-35% der Trockenmasse pflanzlicher Zellwände aus. Xylan besteht vorwiegend aus 1,4-verknüpften Xylopyranosylresten. Diese bilden lange lineare Polyxylosestränge, welche durch Verknüpfung mit anderen Zuckern der Hemicellulose oder durch Verknüpfung mit Acetyl oder Ferulasäure vielfältig modifiziert sind. Die am häufigsten beobachteten Zucker, die mit dem Polyxylosegerüst verknüpft sind, sind Mannose, Methylglukuronsäure, Arabinose, Glukose sowie Galaktose. Viele der freien Hydroxylgruppen des Polyxylangerüsts sind acetyliert oder mit Ferulasäure verknüpft (Kürschner, 1966 und Holzkunde 2005). Xylose ist der Hauptbestandteil des Xylans und damit nach der Glucose der zweithäufigste Zucker auf der Welt. β -D-Xylosidasen (EC 3.2.1.37) sind Exohemicellulasen. Sie hydrolysieren die endständige β -1,4-glycosidische Bindung zwischen zwei Xyloseeinheiten. Diese Enzyme sind Teil der Gesamtheit der Hemicellulasen und sind gemeinsam mit den Endohemicellulasen Xylanasen verantwortlich für

1 Einleitung

die komplette Degradation des Polyxylosegerüsts des Xylan zu einzelnen Xylosemolekülen.

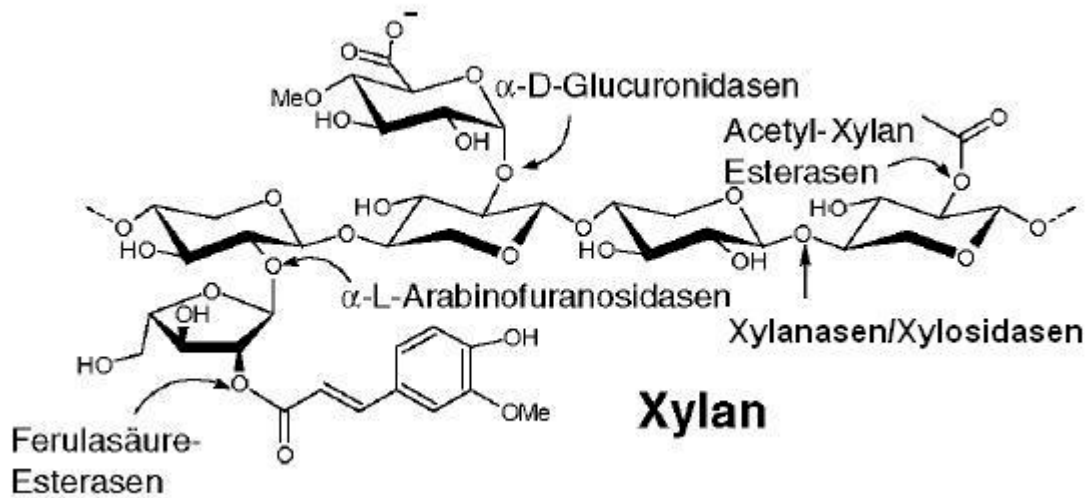


Abbildung 1-1: Die strukturellen Komponenten des Xylans. Zusätzlich sind einige Hemicellulasen genannt, die für den Abbau des Xylans verantwortlich sind - Spaltungstellen sind mit Pfeilen markiert (Abbildung übernommen aus Nurizzo et al. 2002_a).

Die glykosidische Bindung zwischen zwei Zuckern ist eine der stabilsten Bindungen in der Natur. Die spontane Hydrolyse einer O-glykosidischen Bindung bei Raumtemperatur verläuft extrem langsam. Ihre Halbwertszeit beträgt über 5 Millionen Jahre (Wolfenden et al., 1998). Die enzymatische Hydrolyse, die von Glykosid-Hydrolasen (Glykosidasen) katalysiert wird, sorgt für eine bis zu 10^{17} -fache Beschleunigung der Reaktion, was sie zu den effektivsten aller bekannten Enzyme macht.

1.1.2 Hemicellulasen

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

gebunden. Der Abbau der Cellulose und Hemicellulose wird von Mikroorganismen durchgeführt, die sowohl in der freien Natur als auch als Teil des Verdauungstrakts höherer Tiere zu finden sind. Aufgrund der verschiedenen Strukturen und Organisationen der Polysaccharide werden für den kompletten Abbau der Hemicellulose viele unterschiedliche Enzyme benötigt. In vielen Bereichen ist dieser Prozess aufgrund der unlöslichen und rigiden Struktur der pflanzlichen Zellwand und der begrenzten Verfügbarkeit der cellolytischen und hemicellolytischen Mikroorganismen sehr langsam. Da ein großer Teil der Polymere entweder unlöslich oder mit der unlöslichen Cellulose assoziiert ist, sind viele Hemicellulasen modulare Proteine und besitzen neben ihrer katalytischen Domäne andere funktionale Module. Die wichtigsten Module sind kohlenhydratbindende Module (Carbohydrate-binding modules, CBM's), die das Binden der Enzyme an die unlöslichen Polysaccharide vermitteln (Bourne & Henrissat, 2001).

Hemicellulasen sind entweder Glykosid-Hydrolasen (GH), welche die glykosidische Bindung zwischen zwei Zuckermonomeren hydrolysieren oder Kohlenhydrat-Esterasen, welche die durch Esterbindung verknüpfte Acetate oder Ferulasäuren hydrolytisch abspalten (Abbildung 1-1).

1.1.3 Historie der Glykosid-Hydrolasen

Bei der ersten Kristallstruktur eines Enzyms handelt es sich um den wohl bekanntesten und am meisten untersuchten Vertreter der Glykosid-Hydrolasen, dem Hühnereiweiß-Lysozym. Die Kristallstruktur des Lysozyms wurde bereits 1965 gelöst (Blake, 1965). Anhand der Kristallstruktur und zahlreicher folgender Untersuchungen schlug Phillips einen zweiseitigen Reaktionsmechanismus vor mit einem Carbeniumion als Zwischenprodukt. Dieser Reaktionsmechanismus wurde als Phillips-Mechanismus in der Literatur bekannt (Phillips 1966). Es dauerte bis zum Jahr 2001, bis diese Vermutung revidiert wurde. Mit Hilfe der Kristallstruktur und der massenspektrometrischen Identifikation eines kovalenten Reaktionsintermediats konnte der von Koshland 1953 vorgeschlagene (Koshland, 1953a) Reaktionsmechanismus abgesichert werden (Vocadlo et al., 2001). Bereits vor der Publikation dieser Ergebnisse

gab es Untersuchungen mit anderen β -reternierenden Glykosidasen, die wichtige Hinweise auf einen gemeinsamen Reaktionsmechanismus dieser Enzyme lieferten (Koshland, 1953b, Sinnott, 1990, Davies et al., 1998). Erst mit der Veröffentlichung des kovalenten Reaktionsintermediats des Hühnereiwei β -Lysozyms konnte ein genereller Reaktionsmechanismus für alle β -Glykosidasen formuliert werden.

1.1.4 Unterteilung der Glykosid-Hydrolasen in Familien und Klane

In den letzten Jahren gab es einen erheblichen Zuwachs an Informationen über Glykosidasen sowohl im Bereich der Sequenzen als auch im Bezug auf die Veröffentlichung neuer Strukturen. Derzeit sind mehr als 12600 Sequenzen von Glykosidasen bekannt und die sequenzbasierte Klassifizierung ihrer katalytischen Domänen in Glykosid-Hydrolase (GH) Familien und Klane ist auf dem stets aktuellen Server für kohlenhydrataktive Enzyme (Carbohydrate-Active Enzymes CAZy, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>) verfügbar. Basierend auf ihren Sequenzen werden die Glykosidasen derzeit in 99 verschiedene Familien unterteilt (Zechel and Withers, 1999). Kristallstrukturen eines Vertreters von wenigstens 30 dieser Familien sind bekannt, und die Strukturen zeigen trotz der Tatsache, dass all diese Enzyme die gleiche Reaktion - die Hydrolyse eines Acetals - katalysieren, eine große strukturelle Vielfalt. Einige Familien besitzen ähnliche generelle Faltungen und werden daher in Klänen zusammengefasst. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind 14 Klane beschrieben worden (Henrissat and Davies, 1997): GH-A (Glykosid-Hydrolase-A) bis GH-N.

1.1.5 β -Xylosidasen

Derzeit sind 56 Sequenzen von verschiedenen β -Xylosidasen bekannt. Diese sind gemäß der sequenzbasierten Klassifizierung der verschiedenen bakteriellen, fungiden und pflanzlichen β -Xylosidase Mitglieder in die GH-Familien 3, 39, 43, 51, 52 und 54 unterteilt.

Die β -D-Xylosidase 3 (XynB3) von *Geobacillus stearothermophilus* gehört zur Familie 43 und zusammen mit Glykosid-Hydrolasen der Familie 62 zum Klan

GH-F. In diesem Klan finden sich Glykosid-Hydrolasen mit verschiedensten Substratspezifitäten wie β -Xylosidase, α -L-Arabinofuranosidasen, Arabinanansen und Xylanasen.

1.1.6 Die Reaktionsmechanismen der Glykosid-Hydrolasen

Die enzymatische Hydrolyse der glykosidischen Bindung führt entweder zu einer Umkehrung oder zur Beibehaltung der Konfiguration am anomeren Kohlenstoff (*inverting/retaining*) (Zechel & Withers, 1999). Bei etwa 2/3 aller charakterisierten GH-Familien bleibt die anomere Konfiguration erhalten. In den GH-Familien der β -Xylosidasen sind beide Reaktionsmechanismen zu finden: Enzyme der Familien 3, 39, 51, 52 und 54 hydrolysieren unter Erhalt der anomeren Konfiguration, wo hingegen die Glykosidasen der Familie 43 die Konfiguration umkehren (Armand et al., 1996)

1.1.7 Retinierende Glykosidasen

Die meisten retinierenden Glykosidasen spalten die glykosidische Bindung unter Verwendung von zwei Carboxylsäuren, die als Nukleophil und als Säure/Base fungieren. Die Hydrolyse vollzieht sich über einen 2-Schritt S_N1 Mechanismus mit einem kovalenten Zucker-Enzym-Reaktionsintermediat (Abbildung 1-2) (Sinnott, 1990; Davies et al., 1998; Vocadlo et al., 2001). Im ersten Schritt der Reaktion fungiert eine der Carboxylgruppen als Säure und protoniert zeitgleich zur Spaltung der Bindung den Sauerstoff des abgehenden Aglykons. Gleichzeitig erfolgt der Angriff des katalytischen Nukleophils auf den anomeren Kohlenstoff, was zur Ausbildung des kovalenten Reaktionsintermediats führt ($E-S^*$, Abbildung 1-2). Im zweiten Schritt der Katalyse wird ein Wassermolekül von der katalytischen Säure/Base deprotoniert, welches am anomeren Kohlenstoff angreift, um die Hydrolyse des kovalenten Zucker-Enzym-Komplexes zu ermöglichen. Im hydrolysierten Produkt (P_2) bleibt somit die Konfiguration des anomeren Kohlenstoffs erhalten (Abbildung 1-2).

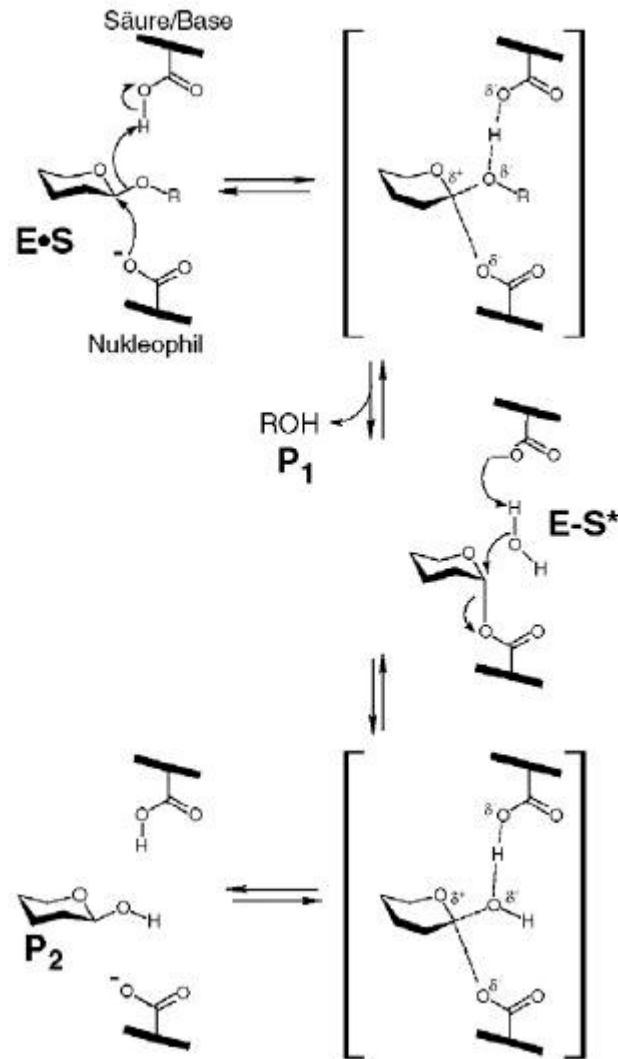


Abbildung 1-2: Der Reaktionsmechanismus der retinierenden Glykosidasen nach Koshland (Abbildung übernommen aus Davies & Henrissat 1995).

1.1.8 Invertierende Glykosidasen

Die invertierenden Glykosidasen spalten die glykosidische Bindung in einem 1-Schritt S_N2 -Mechanismus (Koshland, 1953b). Die beiden Carboxylgruppen fungieren als Säure und Nukleophil und sind in einer geeigneten Entfernung zueinander positioniert, damit das Substrat und ein Wassermolekül zwischen ihnen gebunden werden kann (Abbildung 1-3). In invertierenden Glykosidasen sind die beiden Carboxylgruppen im Durchschnitt 9 Å voneinander entfernt, im Gegensatz dazu beträgt der Abstand in retinierenden Glykosidasen durchschnittlich 5.5 Å (Zechel & Withers, 2001), was mit dem 2-Schritt

Mechanismus konsistent ist (Abbildung 1-2). β -Xylosidasen treten in den GH-Familien 3, 39, 51, 52 und 54 als retinierende Hydrolasen und in Familie 43 als invertierende Hydrolasen auf. (Davies & Withers 1998)

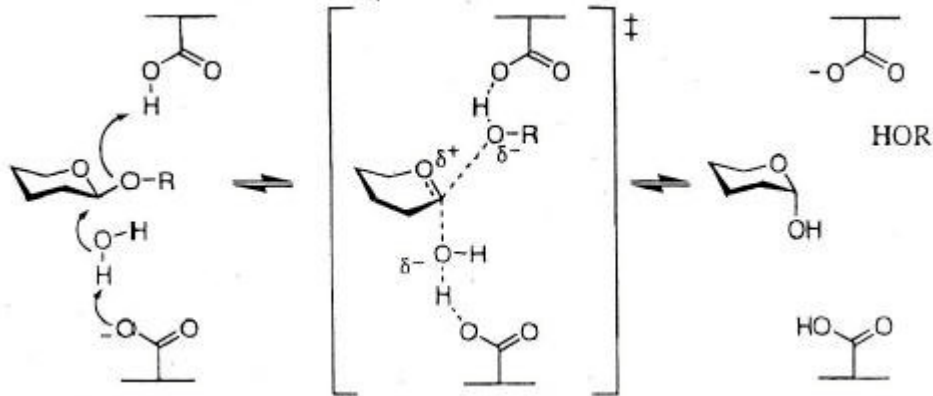


Abbildung 1-3: Mechanismus der invertierenden Glykosidasen, der zu einer Umkehrung der Konfiguration am anomeren Kohlenstoff führt (Abbildung entnommen aus Shallom et al. 2005).

1.2 Die β -D-Xylosidase3 aus *Geobacillus stearothermophilus* T-6

Die β -D-Xylosidase 3 aus *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (XynB3) steht im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Das Enzym besteht aus 535 Aminosäuren und gehört zur Glykosid-Hydrolasen Familie 43 (GH-43). Die Expression und Reinigung der nativen XynB3, des Selenomethionin-Derivats und der katalytisch inaktiven Mutanten (D15G, D128G und E187G), die im Laufe der Arbeit kristallisiert und röntgenkristallographisch charakterisiert wurden, wurde vom Kooperationspartner in Israel durchgeführt: Das *xynB3* T-6 Gen wurde in den Vektor pET9D (Novagen) kloniert und in *Escherichia Coli* BL21 Zellen (DE3) (Novagen) exprimiert.

Die Reinigung der XynB3 wurde mit Hilfe von Hitzebehandlung bei 333 K und anschließender Gelpermeationschromatographie durchgeführt (Shallom et al 2005). Die drei Mutationen (D15G, D128G, E187G) wurden mit Hilfe des QuickChange Kits (Stratagene, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Die Reinigung erfolgte wie bei den anderen Proteinproben.

1.2.1 Kinetische Analysen der katalytischen Mutanten der XynB3

Parallel zur Strukturlösung der XynB3 wurden vom Kooperationspartner in Israel die katalytischen Aminosäuren Glu187 und Asp15, sowie die hoch konservierte Aminosäure Asp128 durch kinetische Analysen der jeweiligen Mutanten identifiziert (Shallom et al. 2005). Diese Arbeiten sollen an dieser Stelle beschrieben werden, um auf der einen Seite den Reaktionsmechanismus der invertierenden Glykosidasen tiefergehend vorzustellen. Auf der anderen Seite läßt sich aus diesen Experimenten die methodische Vorgehensweise der kristallographischen Arbeiten, insbesondere für die Darstellung der Substrat-Enzym-Komplexe, ableiten.

1.2.2 Identifikation der katalytischen Aminosäuren

Die Identifizierung der katalytischen Aminosäuren in Glykosidasen basiert hauptsächlich auf Sequenzvergleichen mit verwandten Enzymen. Stark konservierte saure Residuen deuten auf katalytisch relevante Aminosäuren hin. Durch Substitution der fraglichen Carboxylgruppe durch eine nicht ionisierbare Aminosäure und anschließende Charakterisierung des mutierten Enzyms kann die fragliche Aminosäure auf ihre mögliche Funktion als katalytisch relevante Aminosäure hin untersucht werden. Dies umfasst die kinetische Analyse der Mutanten gegenüber Substraten mit unterschiedlichen Abgangsgruppen, sowie der Wiederherstellung der katalytischen Aktivität mit Hilfe von externen Nukleophilen wie Azid-Ionen. Für diese Experimente wurde das artifizielle Substrat 4-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranosid verwendet. Gleichzeitig wird durch Circular dichroismus-Spektroskopie sicher gestellt, dass die Gesamtfaltung des Enzyms weiterhin unverändert ist und die Reduzierung der Aktivität nicht durch eine missgefaltete Proteinstruktur zustande kommt.

Die jeweilige Aktivität des Enzyms und der Mutanten wurde mit diversen synthetischen Substraten überprüft. Die Substrate bestanden auf einer p-Nitrophenylgruppe welche mit verschiedenen Zuckern verknüpft war. Die

höchste Aktivität wurde mit dem Substrat 4-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranosid beobachtet.

1.2.3 Identifikation der katalytischen Säure E187

Unterschiedliche synthetische Arylglykosidsubstrate werden in der Analyse von Glykosidasen häufig verwendet, um die katalytischen Residuen auf biochemischem Weg zu identifizieren. Diese Arylglykoside unterscheiden sich durch den pKa-Wert der bei der Spaltung frei werdenden Arylgruppe. Je niedriger der pKa-Wert, desto einfacher lässt sich die Abgangsgruppe abspalten. Kinetische Untersuchungen mit solchen unterschiedlichen Abgangsgruppen stellen einen der wichtigsten Schritte bei der Identifizierung und Charakterisierung der katalytischen Residuen bei Glykosidasen dar. Meist wird dieser Ansatz bei der Charakterisierung von Glykosidasen verwendet, denen ein retinierender Mechanismus zu Grunde liegt, da dort ein S_N1 -Reaktionsmechanismus vorliegt, bei dem es zu zwei verketteten Einzelreaktionen kommt. In der ersten Teilreaktion kommt es nach Koshland (Koshland 1953b) zu einer kovalenten Bindung des Zuckersubstrates mit dem Enzym bei gleichzeitiger Spaltung und Freisetzung der Abgangsgruppe. Das bedeutet, dass nur der erste Schritt, der sogenannte Glykosylierungsschritt, durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Abgangsgruppen bestimmt wird. Invertierende Glykosidasen benutzen einen S_N2 -Ein-Schritt Reaktionsmechanismus, bei dem die Abgangsgruppe simultan mit dem nukleophilen Angriff des aktivierten Wassers abgespalten wird. Daher gibt es auch dort eine Abhängigkeit von katalytischer Säure zum pKa der verschiedenen Abgangsgruppen. Auf diesem Wege wurde vom Kooperationspartner in Israel Glu187 als katalytische Säure über einen biochemischen Ansatz identifiziert (Shallom et al. 2005).

1.2.4 Identifikation der katalytischen Base D15

Der Austausch der katalytischen Base durch eine kleine Aminosäure, die nicht über die katalytisch notwendige saure Seitenkette verfügt, wie zum Beispiel Glycin, führt zur Inaktivierung des Enzyms unabhängig von der gewählten Abgangsgruppe. In invertierenden Glykosidasen führt der Ersatz der katalytischen Base durch eine kleinere Aminosäure zu einer Höhle innerhalb des aktiven Zentrums, in die exogene Nukleophile wie Azid-Ionen eindringen können. Das Azid-Ion, das im Gegensatz zum Wasser der Katalyse der Base nicht bedarf, kann das Substrat nukleophil attackieren, was zur Ausbildung eines Zucker-Azid Produktes führt. Durch die Verwendung von Natrium-Azid kann der Verlust der Aktivität wieder rückgängig gemacht werden. Auf diesem Wege wurde vom Kooperationspartner Asp15 als katalytische Base über die Generierung der katalytisch inaktiven Mutante D15G in einem biochemischen Ansatz identifiziert (Shallom et al. 2005).

1.2.5 Substratspezifität der XynB3

Die meisten Glykosid-Hydrolasen sind hoch spezifisch hinsichtlich der Substrate in (-1)-Position im katalytischen Zentrum (Davies et al. 1997). Nach Davies et al. (1997) bezeichnet die (-1)-Position das erste Zuckermonomer, von der Spaltungstelle aus gesehen, in Richtung nicht-reduzierendes Ende der Saccharidkette. Zur Zeit sind in der Glykosidase Familie 43 β -Xylosidasen, α -L-Arabinofuranosidasen, Arabinanasen und Xylanasen, sowie bifunktionelle β -Xylosidasen/ α -L-Arabinofuranosidasen beschrieben worden (Whitehead et al. 2001; Utt et al. 1991; Sakka et al. 1993). Polyspezifität zwischen Xylo- oder Arabino-Substraten wurde auch bei anderen Glykosidasen der Familien 3, 51 und 54 gezeigt (Lee et al. 2003; Shallom et al. 2002).

XynB3 zeigt eine deutliche Spezifität hinsichtlich Xylopyranose. Andere Substrate werden kaum oder nicht messbar umgesetzt (Shallom et al. 2005).

1.2.6 Exoglykosidischer Charakter der XynB3

Glykosidasen können in Endo- und Exoglykosidasen unterschieden werden. Endoglykosidasen spalten glykosidische Bindungen mittig einer Polysaccharidkette, während Exoglykosidasen endständige Mono- oder Disaccharide abspalten. Dabei können letztgenannte endständige Saccharide entweder vom reduzierenden oder vom nicht-reduzierenden Teil der Polysaccharidkette abspalten. In der GH Familie 43 kommen sowohl Endoglykosidasen (Skjot et al. 2001), Exoglykosidasen (Gasparic et al. 1995), sowie Glykosidasen mit beiden Reaktionstypen (McKie et al. 1997) vor.

Die β -D-Xylosidase 3 von *Geobacillus stearothermophilus* zeigt ausschließlich Exoglykosidasefunktion, sie spaltet einzelne Xylosezucker vom nicht reduzierenden Teil einer Polyxylosekette ab (Shallom et al. 2005).

1.2.7 Biotechnologische Bedeutung

Hemicellulasen rücken aufgrund der potentiellen industriellen Anwendung in den Prozessen der Biobleichung des Zellstoffs und der Umwandlung der Lignocellulose zu verdaubaren Produkten immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. Durch Einsatz von Hemicellulosen kann die Verwendung chemischer Bleichstoffe wie Chlor und die damit verbundene Entstehung chlorierter Kohlenwasserstoffe vermieden werden (Khasin et al. 1993, Viikari et al. 1991).

Weitere Verwendungsmöglichkeiten von Xylosidasen bestehen in der biochemischen Herstellung von Ethanol aus Xylose mit Hilfe von Xylanasen und Xylosidasen.

Ein neuer biotechnologischer Aspekt ist die Verwendung der Glykosid-Hydrolasen in der enzymatischen Synthese von Oligosacchariden (Palcic, 1999). In Kombination mit Glykosid-Transferasen ermöglicht der biochemische Einsatz von Glykosidasen multiple Möglichkeiten in der gezielten Synthese von

1 Einleitung

Oligosacchariden für biochemische, lebensmittelorientierte und therapeutische Anwendungsgebiete (McAuliffe et al. 1997, Witczak et al 1997 und Holzkunde 2005).

1.3 Spezielle kristallographische Kapitel

1.3.1 Strukturlösung und Phasierung

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

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

Die Strukturfaktoramplituden F_{hkl} lassen sich direkt aus den Diffraktionsmessungen bestimmen und den Gitterpunkten des reziproken Raumes hkl zuordnen, während sich die Phaseninformation α_{hkl} nicht detektieren lässt. Dies stellt das kristallographische Phasenproblem dar. Folgende Verfahren zur experimentellen und rechnerischen Ermittlung der Phasen stehen generell zur Verfügung, wobei sich die einzelnen Verfahren gegenseitig ergänzen können (Blundell & Johnson 1976).

1.3.2 MIR-Phasierung

Beim multiplen isomorphen Ersatz (MIR) werden neben nativen Kristallen isomorphe Kristalle gemessen, die mit schweren Atomen (Schwermetalle, Iod, Edelgase) derivatisiert worden sind. Aus den isomorphen Differenzen zwischen

den Strukturfaktoramplituden des nativen und eines Derivatdatensatzes lassen sich über Pattersonfunktionen die Lagen der Schweratome bestimmen (Rould et al. 1992). Aus diesen Positionen können dann die ersten Phasen berechnet werden. Da bei der Verwendung von isomorphen Differenzen von einem Derivat für jeden Reflex zwei Phasenwinkel möglich sind, die sich zunächst einmal nicht trennen lassen (Phasenambiguität), sind mindestens zwei Derivate oder die Messung von anomalen Differenzen notwendig (Terwilliger & Berendzen 1996).

1.3.3 MAD-Phasierung

Die Absorption eines Röntgenphotons sorgt für einen Elektronenübergang, der die Amplitude und Phase der gebeugten Röntgenstrahlen beeinflusst und dies führt zur anomalen Streuung. Die Größe der Röntgenbeugung nimmt mit zunehmendem Beugungswinkel ab, die Größe der anomalen Streuung ist jedoch unabhängig vom Beugungswinkel.

$$\mathbf{f} = \mathbf{f}_0 + \mathbf{f}' + i\mathbf{f}''$$

Die gesamte Streuung f besteht aus f_0 , der normalen oder Thomson-Streuung und f' und f'' , den dispersiven und anomalen Anteilen der anomalen Streuung. Der Streubeitrag der anomalen Streuung ist abhängig von der Energie der Messwellenlänge und somit an der Absorptionskante des anomal streuenden Atoms am größten. Die spezifische Energie für einen solchen Elektronenübergang wird als Absorptionskante bezeichnet und kann mit Hilfe eines Röntgenabsorptionsspektrums identifiziert werden. Für die typischerweise im Proteinkristall enthaltenen Atome C, N, O, und S ist die Größe der anomalen Streuung normalerweise klein und kann vernachlässigt werden. In den letzten Jahren wurde jedoch an einigen Beispielen gezeigt, dass auch das anomale Signal des Schwefels für die Bestimmung der kristallographischen Phaseninformation genutzt werden kann (Dauter et al., 1999).

1 Einleitung

Die Synchrotrone, die für die Proteinkristallographie nutzbar sind, verfügen über eine modulierbare Wellenlänge in einem Energiebereich zwischen 25 und 6 keV (0.5 - 2.0 Å). In diesem Bereich liegen zahlreiche Absorptionskanten von Atomen, die ein für die Phasierung nutzbares Signal liefern. Diese Atome sind oft natürlicherweise in Proteinkristallen enthalten (beispielsweise Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo) oder können eingebracht werden (Se, Br, Kr, Hg, Pt, Lanthanide) (Hendrickson & Ogata, 1997; Pappa et al., 1996). Die Auswahl des geeigneten anomal streuenden Atoms ist von der jeweiligen Situation abhängig. So ist z. B. für die Phasierung eines Metalloproteins keine Derivatisierung des Kristalls notwendig.

Selen ist trotz relativ kleiner anomaler und dispersiver Streubeiträge der beliebteste anomale Streuer (Ogata, 1998; Walsh et al., 1999) Durch Proteinexpression in methioninauxotrophen Organismen oder durch Inhibition des Methionin-Anabolismus unter Zugabe von Selenomethionin lassen sich gezielt Selenomethionin-Derivate produzieren (Hendrickson et al., 1990; Doublet, 1997). Für die Phasierung mit MAD-Daten gibt es zwei generelle Wege: Nach dem klassischen algebraischen Formalismus von Hendrickson (Hendrickson 1991) werden wellenlängen-abhängige Terme von wellenlängen-unabhängigen Termen separiert. Dieses Verfahren ist im Programm MADSYS (Hendrickson et al., 1988) realisiert. Eine andere Vorgehensweise (Phillips & Hodgson, 1980; Ramakrishnan & Biou, 1997) ist die Behandlung der MAD-Daten als Sonderfall der MIR-Phasierung mit anomalen Beiträgen. Diese Vorgehensweise wird in fast allen anderen gebräuchlichen Phasierungsprogrammen angewendet und ist derzeit das übliche Verfahren. Prinzipiell reichen die Phaseninformationen von zwei Wellenlängen zur eindeutigen Phasierung aus. Es werden jedoch häufig mehrere Wellenlängen gemessen, da durch eine Überbestimmung der Gleichungssysteme die Qualität der erhaltenen Phasen steigt. Die verwendeten Wellenlängen werden so ausgewählt, dass die anomalen und dispersiven Differenzen maximal werden. Diese lassen sich durch Röntgen-Fluoreszenzspektren ermitteln. Im klassischen MAD-Experiment werden mehrere Datensätze gemessen: Zwei Datensätze bei Wellenlängen in der Nähe der Absorptionskante, die *peak-*

Wellenlänge mit maximalem $\Delta f''$ und die *inflection*-Wellenlänge mit minimalem $\Delta f'$ und ein oder mehrere Datensätze bei Wellenlängen entfernt von der Absorptionskante (*remote* Wellenlänge).

1.3.4 Molekularer Ersatz

Die Technik zur Strukturlösung durch Molekularen Ersatz (Rossmann, 1972) hat sich in den vergangenen Jahren deutlich weiterentwickelt (Vagin A, Teplyakov A. 2000). Beim molekularen Ersatz werden die ersten Phaseninformationen aus einem strukturell ähnlichen Protein gewonnen. Mit jeder bekannten Struktur erhöht sich damit die Wahrscheinlichkeit, dass die Struktur eines unbekanntes Proteins mittels der Technik des Molekularen Ersatzes erfolgreich gelöst werden kann. Durch Patterson-Suchrechnungen muss das Modell so in der Einheitszelle orientiert werden wie das Protein in der zu lösenden Kristallstruktur. Wegen der Größe des Suchraumes werden meistens die Rotations- und Translationsrechnungen separiert. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass bei einer Sequenzidentität von ca. 30% eine vergleichbare Faltung vorliegt und sich das Modell verwenden lassen sollte (Rossmann 1990).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Aufgabenstellung der Arbeit war die röntgenkristallographische Untersuchung der β -D-Xylosidase aus *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (XynB3) um Informationen über Faltung des Proteins, sowie Architektur des aktiven Zentrums zu gewinnen. Vom Kooperationspartner aus Israel (Dalia Shallom und Yuval Shoham) wurde eine ausreichende Menge Protein zur Verfügung gestellt. Da zu Beginn der Arbeit keine Struktur mit hinreichender Homologie bekannt war, mußte die Struktur *de novo* gelöst werden. Im Laufe der Arbeit wurde jedoch die Struktur der β -Xylosidase aus *Bacillus subtilis* bekannt (Patskovsky & Almo, 2005). Damit stand nun ein strukturverwandtes Suchmodell zur Verfügung und eine Strukturlösung mittels der Technik des Molekularen Ersatzes war möglich. Es bestand nun keine Notwendigkeit mehr die Struktur über MAD-Techniken zu lösen, und die bis dahin erzielten Ergebnisse einer Strukturlösung mittels selenomethionin-derivatisierten XynB3 Proteinen waren hinfällig.

Daher wurde die Zielsetzung der Arbeit auf die Untersuchung des Reaktionsmechanismus ausgeweitet. Anhand der Strukturen katalytisch inaktiver Mutanten sollte der Reaktionsmechanismus und die Substratspezifität der XynB3 erklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und EDV Systeme

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, über die Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) und Fluka (Deisenhofen) bezogen. Zur Herstellung von Lösungen wurde entionisiertes Wasser verwendet, das mit Hilfe einer Reinstwasseranlage (Seral, Ransbach-Burbach) gewonnen wurde. Sämtliche Lösungen wurden durch eine 0.2 µm-Membran filtriert.

Die wichtigsten Chemikalien waren:

- PEG (Polyethylenglycol) 6000 Merk, Darmstadt
- MES (2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat) Merk, Darmstadt
- Glycerin MP Biomedicals Inc., Eschwege

Detergentien:

- N,N-Dimethyldecylamine-beta-oxid (DDAO) Fluka, Deisenhofen
- Octanoyl-N-hydroxyethylglucoamid (HEGA-8) Anatrace Inc, Maumee, Ohio, USA

Substrat

- 1,4-β-D Xylobiose Megazyme, Wicklow Bray Republic of Ireland

2.1.2 Materialien, Geräte und EDV-Systeme

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

Tabelle 2-1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
EDV-Systeme	
Linux Desktop PC (Suse 9.0)	Theis, Köln
SGI Octane (Irix 6.5)	Silicon Graphics, München
Massenspektrometer	
MALDI-MS Biflex III (TOF)	Bruker, Bremen
Stereomikroskope	
Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Stemi SV-8	Zeiss, Jena
pH-meter	
pH-meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Waagen	
Analysenwaage FA-210-4i	Faust, Langenfeld
Laborwaage FA 1500-2	Faust, Langenfeld
Laborwaage SBA 52	Scaltec, Heiligenstadt
Photometer	
Ultrapec 2000	Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden
Zentrifugen	
5417 C und 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Chromatographiesystem	
FPLC	Amersham/Pharmacia Biotech Uppsala, Schweden
Elektrophoresesystem	
Criterion	Bio Rad, München
Dynamische Lichtstreuung	
DynaPro-801	Protein Solutions, Charlottesville, USA
institutseigene Röntgenanlagen	
1) Drehanode FR 591	Nonius, Delft, Niederlande
Monochromator MAC-XOS	MAC Science, Yokohama, Japan
Flächenzähler DIP-2030H	MAC Science, Yokohama, Japan
2) Drehanode Rotaflex RU-200	B Rigaku, Düsseldorf
Monochromator CMF12-38Cu6	Osmic, Northwood, USA
Flächenzähler MAR 345	MAR Research, Hamburg
Cryostream Cooler	Oxford Cryosystems, Oxford, England

Tabelle 2-2: Sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Proteinkonzentratoren	
Centrikon Amicon 30 kDa	Millipore, Schwalbach
Sterilfilter Millex GP 0.22µm	Millipore, Schwalbach
Bradford Proteinassay	BioRad, München
Gelelektrophorese	
Nu-PAGE 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Superdex 200 HR 26/60	Amersham, Uppsala, Schweden
Kristallplatten HR3-160	Hampton Research, Laguna Niguel, USA
Kristallisationsscreens	Hampton Research, Laguna Niguel, USA Jena Bioscience, Jena
Cryoloops	Hampton Research, Laguna Niguel, USA
sonstige Cryowerkzeuge	Hampton Research, Laguna Niguel, USA

Tabelle 2-3: Computerprogramme

<i>Programm</i>	<i>Literaturangabe</i>
Auswertung von Röntgendaten	
CCP4/CCP4i-suite	CCP4 (1994)
CNS-suite	Brunger et al. (1998)
HKL-suite	Otwinowski & Minor (1997)
ARP/wARP	Perrakis et al. (1999)
Graphikprogramme	
O	Jones et al. (1991)
Pymol	DeLano(2002)
Sonstige Programme	
DS Gene	Accelrys Inc.
GLRF	Tong & Rossman (1997)
Moleman	Kleywegt et al (2001)

2.2 Proteinexpression und Reinigung

Die Gewinnung und Reinigung der XynB3 wurde von dem Kooperationspartner wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Shallom et al. 2005)

2.3 Überprüfung der Reinheit

Die Reinheit der Proteinlösungen wurde über Gelelektrophorese und MALDI-TOF-Massenspektrometrie überprüft

2.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde mit Hilfe des Criterion Gelelektrophoresesystems von BioRad (München) und vorgefertigter Nu-PAGE 4-12% Bis-Tris-Gele (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Falls erforderlich wurden zu analysierende Proteinlösungen mit Wasser verdünnt, anschließend nach Herstellerangaben mit SDS-Auftragspuffer (BioRad, München) versetzt und bei 95 °C für 5 min inkubiert.

Die Elektrophorese wurde mit MES-Puffer nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie-Reagenz (Rotiphorese Blau R; Roth, Karlsruhe) sichtbar gemacht.

Als Größenmarker wurde der Molekulargewichtsstandard Roti-Mark 10-150 der Firma Roth verwendet, der unveröffentliche Proteine mit den definierten Massen 10 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 60 kDa, 80 kDa, 100 kDa und 150 kDa enthielt.

2.3.2 Massenspektrometrie

Gereinigte Proteine wurden mit Hilfe von MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert (MALDI, engl. *matrix assisted laser desorption ionization*; TOF, engl. *time of flight*).

Proteinproben mit einer Konzentration von 10 pmol/µl wurden gegen 0,1% TFA dialysiert. 5 µl des Dialysats wurde mit 15 µl 0,1% TFA und 30 µl einer mit Sinapinsäure gesättigten Acetonitril-Wasser-Lösung 1:1 (v/v) gemischt. Markierungen auf dem Probenhalter wurden mit einer Ethanol-Dünnschicht

(0.5 µl gesättigte Lösung von Sinapinsäure in Ethanol) benetzt und nach dem Trocknen wurden jeweils 0,5 µl der Probe aufgetragen.

Durch Bestrahlung der vorbereiteten Proteinprobe mit Laserlicht einer Wellenlänge im Bereich des Absorptionsmaximums der Matrixsubstanz (337 nm) wurde die Probe in die Gasphase überführt. Massenspektren wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 19 kV aufgenommen. Das Masse/Ladungsverhältnis (m/z) wurde anschließend mit Hilfe eines Flugzeitanalysators gemessen. Um das Signal des Proteins zu verstärken, wurden Ionen mit einer Masse unter 1000 Da abgelenkt.

Als Standard für die externe Kalibrierung wurde Rinder-Serum-Albumin (BSA) verwendet.

2.4 Proteinkonzentration

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

2.5 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung bestimmt den hydrodynamischen Radius des Proteins, woraus über das Molekulargewicht des Proteins das Oligomerisierungsverhalten bzw. die Homogenität auf der Ebene der Aggregation abgeleitet werden kann. Für die Messung wurde das Gerät DynaPro-801 (Protein Solutions) verwendet. Für die Messungen bei 20°C wurden Proteinkonzentrationen zwischen 18-30 mg/ml eingesetzt. Der verwendete Puffer enthielt 50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 100 mM NaCl. Die

Proteinproben wurden vor jeder Messung durch einen 0,02 µm Filter (Whatman) filtriert. Für die einzelnen Proben wurden mindestens 40 Einzelmessungen aufgenommen. Die Auswertung erfolgte unter der Annahme einer monomodalen oder bimodalen Verteilung mit dem Modell eines globulären Proteins für die Berechnung der Molmasse aus dem hydrodynamischen Radius mit der Software des Geräts.

2.6 Analytische Gelfiltration

Gereinigte Proteine wurden mittels eines FPLC-Systems der Firma Pharmacia über eine Superdex 200 HR 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Dazu wurden 1000 µl einer XynB3 Wildtyp Proteinlösung der Konzentration 3,2 mg/ml bei einer Flussrate von 0,7 ml/min. Der verwendete Laufpuffer glich dem Proteinpuffer und enthielt 50 mM Tris/HCl pH 7,0, 100 mM NaCl. Zur Eichung der Gelfiltrationssäule wurden die Proteine Ferritin (MW 440000 Da), Katalase (MW 240000 Da), BSA (MW 66000 Da) und RNase A (MW 12000 Da) zusammen mit Dextranblau auf die Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,7 ml/min aufgetrennt. Der Laufpuffer enthielt 50 mM Tris/HCl pH 7,0, 100 mM NaCl.

2.7 Proteinkristallisation

2.7.1 Kristallisation der Apo-Proteine

Die Kristallisationsversuche wurden nach der Methode des sitzenden Tropfens durchgeführt. Es wurden 24-well HR3-160 Kristallisationsschalen mit integrierten Kristallisationsbrücken verwendet (Hampton Research, Laguna Niguel, USA). Für Kristallisationsexperimente mit dem XynB3 Wildtyp, sowie mit den Mutanten D15G, D128G und E187G wurden die Proteine mit Centricon

Proteinkonzentratoren (Millipore, Schwalbach) auf Konzentrationen von 24-30 mg/ml konzentriert. Der Proteinpuffer hatte die Zusammensetzung: 50 mM Tris/HCl pH 7,0, 100 mM NaCl. Die Proteinlösung wurde danach ständig auf Eis gekühlt oder im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Dabei wurde stets versucht, die Proteine so kurz wie möglich dem Licht auszusetzen. Kristallisationstropfen wurden manuell gemischt und bestanden aus Proteinlösung, Reservirlösung und gegebenenfalls Additivlösungen. Die Kristallisationsansätze wurden bei 25°C, 20°C, 12°C oder 4°C inkubiert. Ergebnisse der Kristallisationsexperimente wurden in regelmäßigen Abständen unter einem Stereomikroskop untersucht, protokolliert und photographisch dokumentiert. Bei der Beschreibung der Kristallisationsbedingung in dieser Arbeit handelt es sich grundsätzlich um die Beschreibung des Reservoirs. Dies wurde im Regelfall in einem Verhältnis 1:1 mit der Proteinlösung gemischt. Im Falle einer Kristallisation mit Detergentien und Substrat wurden diese ausschließlich in den Kristallisationstropfen gegeben, das Reservoir enthielt weder Detergenz noch Substrat.

Initiale Kristallisationsexperimente nach dem Schema der unvollständigen faktoriellen Suche (engl. sparse matrix screen; Jancarik und Kim, 1991) wurden mit kommerziell erhältlichen Lösungen (Kristallisations-*Screens*) durchgeführt (Tab. 2-4). Das Kristallisationsverhalten der Proteine konnte so bei insgesamt 434 unterschiedlichen initialen Bedingungen getestet werden. Wurde eine Bedingung identifiziert, bei der kristalline Objekte beobachtet werden konnten, erfolgte eine Optimierung durch systematische Variation der Kristallisationsparameter.

Tabelle 2-4: Übersicht über die verwendeten Kristallisations-*Screens*

Screen	Hersteller
Crystal Screen I	
Crystal Screen II	
PEG/Ion Screen	Hampton Research, La Jolla, USA
Grid Screen PEG 6000	
Grid Screen PEG/LiCl	
JBScreen Classic 1-10	Jena Bioscience, Jena

Nach initialer Optimierung der Kristallisationsbedingung, wurden die Additivscreens 1-3 und Detergentienscreen 1 bis 3 der Firma *Hampton Research* (La Niguella, USA) mit den optimierten Kristallisationsbedingungen nach Herstellerangaben kombiniert.

2.7.2 Kokristallisation mit 1,4- β -D-Xylobiose :

Die Kokristallisation der Mutanten D15G, D128G und E187G unterschied sich von der Kristallisation des Wildtyps und der Kristallisation der Mutanten ohne Substrat dadurch, dass zum Kristallisationstropfen zusätzlich 0,4 μ l einer 500 mM 1,4- β -D-Xylobioselösung hinzugegeben wurde (bei einem Tropfenvolumen von insgesamt 11,4 μ l).

2.8 Cryoprotokoll

Um eine Tieftemperaturmessung durchführen zu können, ist es von essentieller Bedeutung, dass die den Kristall umgebende Mutterlauge keine Wassereiskristalle gebildet hat, da diese das Streuverhalten von Proteinkristallen negativ beeinflussen. Um das Auftreten von Wassereis zu unterdrücken, verwendet man in der Proteinkristallographie verschiedene Techniken. Die gängigste Methode ist das Einbringen von sogenannten Cryoprotektoren. Dies sind Stoffe, welche die Temperatur, bei der wässrige Lösungen in einen glasartigen Zustand übergehen, erhöhen. Dadurch wird beim Schockfrieren dieser sogenannte "glass transition" schneller erreicht und es bilden sich keine Wassereiskristalle. Substanzen, die in der Proteinkristallographie für diese Zwecke verwendet werden, sind Glycerin, Polyethylenglycole (PEG), Methanol, Ethanol, Methylpentandiol (MPD), Saccharide oder hohe Salzkonzentrationen. (Garman & Doublé 2003).

In dieser Arbeit wurden die Kristalle der XynB3 nach der Optimierung der Kristallisationsbedingungen in Lösungen mit Cryoprotektant überführt. Dies wurde auf verschiedene Weise durchgeführt.

Die Kristalle wurden mittels einer feinen Nylonschleife aus dem Kristallisationstropfen heraus gefischt und sehr kurz (ca. 1 sec) in eine Cryo-Lösung getaucht. Die Zusammensetzung der Cryo-Lösung glich der des Reservoirs gegen den der Kristallisationstropfen equilibriert wurde, enthielt jedoch zusätzlich noch ein Cryoprotektant. Unmittelbar danach wurden die Kristalle in flüssigen Stickstoff getaucht, um bei 100 Kelvin schockgefroren zu werden.

Bei der anderen verwendeten Methode wurde zum Kristalltropfen über einen Zeitraum von 4 Tagen hinweg stetig kleine Volumina (2-5 μ l bei ca. 10 μ l Tropfenvolumen) von Pufferlösungen hinzu gegeben. Diese zugegebenen Pufferlösungen hatten die gleiche Zusammensetzung wie das Reservoir gegen das der Kristallisationstropfen equilibriert wurde, enthielten aber zusätzlich noch ein Cryoprotetant in stetig steigender Konzentration. Dadurch wurde eine sehr langsame und kontinuierliche Konzentrationserhöhung des Cryoprotektants erreicht und der osmotische Stress, dem die Kristalle beim Überführen in eine Cryolösung unterliegen, minimiert (Garman & Doublé 2003). Um das Volumen des Kristalltropfens möglichst konstant zu halten, wurde kurz vor Zugabe von Pufferlösung das gleiche Volumen dem Tropfen zuvor entnommen. Weiterhin wurde in das Reservoir ebenfalls Cryoprotektant in zum Kristalltropfen vergleichbarer Endkonzentration gegeben, um die Diffusion von Wasser vom Reservoir in den Kristallisationstropfen zu vermeiden.

Im Falle der Kokristallisierung der XynB3 Mutanten enthielten alle verwendeten Cryolösungen ebenfalls das Substrat, um ein Auswaschen des Substrates aus dem aktiven Zentrum während der Überführung in Cryobedingungen zu verhindern.

Die Kristalle wurden bis zur Diffraktionsmessung in flüssigem Stickstoff bei 100 Kelvin gelagert.

2.9 Diffraktionsexperimente

2.9.1 Allgemeines

Sämtliche Kristalle wurden an den instituteigenen Drehanoden mit Cu-K α Strahlung charakterisiert und auf ihr Diffraktionsverhalten hin begutachtet.

Es wurden XynB3 Datensätze an den Synchrotronen des DORIS-Speicherrings des Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY-Hamburg) an den Messplätzen des *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) Hamburg-Außenstation, und an der Beamline 1 der *Protein Structure Factory* (PSF) der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung BESSY (Berlin) gemessen.

Die ideale Messstrategie wurde entweder mit dem Programm "*best*" (Popow & Bourenkov 2003), im Falle einer Messung am EMBL Hamburg, oder mit dem HKL 2000 angegliederten Programmen zur Messstrategie, im Falle einer Messung am BESSY, ermittelt.

Alle Diffraktionsexperimente wurden bei einer Temperatur von 100 K mit Hilfe von flüssigem Stickstoff durchgeführt.

2.9.2 Datensätze der XynB3 und der Mutanten

Ein Datensatz eines selenomethionin-derivatisierten XynB3 WT Kristalls der orthorhombischen Raumgruppe wurde am BL1-Messplatz der PSF am BESSY (Berlin) aufgenommen. Dieser Messplatz verfügte über einen MAR-165mm CCD Detektor.

Ein Datensatz eines nativen XynB3-WT-Kristalls in der tetragonalen Raumgruppe wurde an der Beamline BW7b des EMBL Hamburg Außenstation, (DESY) aufgenommen. Dieser Messplatz verfügte über einen MAR IP 345mm Flächenzählerdetektor.

Ein Datensatz der Mutante E187G, kokristallisiert mit dem Substrat Xylobiose wurde an der Beamline X13 des EMBL Hamburg Außenstation, (DESY) aufgenommen. Dieser Messplatz war mit einem MAR CCD 165mm Detektor ausgerüstet.

Die Datensätze der Mutanten D15G und D128G, jeweils kokristallisiert mit dem Substrat Xylobiose, wurden an der Beamline X12 des EMBL Hamburg Außenstation, (DESY) aufgenommen. Dieser Messplatz verfügte über einen MAR IP 345mm Detektor.

Sowohl die institutseigenen Röntgenanlagen als auch die Synchrotron Messplätze am EMBL Hamburg und BESSY Berlin waren mit Cryoanlagen der Firma Oxford Cryosystems, Oxford UK, ausgestattet. Alle Messungen wurden bei 100 K durchgeführt.

Eine detaillierte Übersicht über die einzelnen Messparameter kann Tabelle 2-5 entnommen werden:

Tabelle 2-5: Messparameter für die Datensätze der XynB3

Kristall	Xyl181	Xyl 309	Xyl330	Xyl334	Xyl335
Protein	SeMet XynB3 WT	XynB3 D187G Xylobiose Kokristall	XynB3 WT	XynB3 D15G Xylobiose Kokristall	XynB3 D128G Xylobiose Kokristall
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Messplatz	BL 1 PSF BESSY,	X13 EMBL Hamburg	BW7b EMBL Hamburg	X12 EMBL Hamburg	X12 EMBL Hamburg
Wellenlänge [Å]	0,9797	0,8048	0,8426	0,9239	0,9239
Kristall Detektor Abstand [mm]	170,0	209,0	354,85	280,0	270,0
höchste Auflösung [Å]	2,3	2,2	1,82	2.15	2.2
Rotation/Bild [°]	0,2	0,1	0,1	0,25	0,25
Anzahl der Bilder	823	772	953	600	800
Rotation gesamt [°]	164,6	77,2	95,3	150	200

2.10 Datenreduktion

Die Röntgendiffraktionsbilder aller gemessenen Datensätze wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK aus dem HKL-Programmpaket (Otwinowski and Minor, 1997) indiziert, integriert und skaliert. Die Strukturfaktoramplituden wurden bei allen Datensätzen mit TRUNCATE (CCP4, 1994) aus den gemessenen Intensitäten berechnet. Für beide Kristallformen wurde die Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit (Packungsdichte) bzw. die Packungsdichte im Kristall mit dem Programm *MATTHEWS_COEFF* (CCP4,1994) abgeschätzt. Die Selbstrotationsfunktionen wurden mit dem Programm GLRF (Tong & Rossman,1997) berechnet.

2.11 Strukturlösung der XynB3 durch Molekularen Ersatz

Als Suchmodell für den Molekularen Ersatz der XynB3 in der orthorhombischen Kristallform wurde die Struktur der 1,4-Xylosidase aus *Bacillus subtilis* (Patskovsky, & Almo 2005, PDB-Eintrag: 1YIF) verwendet. Dieses Enzym weist eine Sequenzidentität von 65% zur XynB3 auf.

Vor Beginn der Rechnungen wurden alle Wassermoleküle aus der Datei entfernt. Die Rechnungen zum Molekularen Ersatz wurde parallel mit den Programmen AmoRE und Molrep (CCP4, 1994) in Auflösungsbereichen von 3-15 Å durchgeführt. An die Rotations- und Translationssuche schloss sich eine Starre-Körper-Verfeinerung gegen normalisierte Strukturfaktoramplituden an. Die Struktur der tetragonalen Kristallform der XynB3 wurde unter Verwendung der verfeinerten Proteinstruktur aus der orthorhombischen Kristallform der XynB3 als Suchmodell gelöst.

2.12 Modellbau und Verfeinerung

Ein erstes Modell der XynB3 wurde mit Hilfe von Methoden des Molekularen Ersatzes erhalten. Dieses Modell basierte auf einem Datensatz bis zu einer Auflösung von 2.5 Å, gemessen an der BL1 der Protein Structure Factory (PSF) am Synchrotron der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY). Es ergab sich eine physikalisch mögliche Kristallpackung.

Der eigentliche Modellbau geschah durch Kombination eines automatisierten Modellbaus mit dem Programm *ARP/wARP* (Perrakis et al., 1999) und manuellen Modellbautechniken mit Hilfe des Programms *O* (Jones et al., 1991). Sowohl beim automatischen, als auch beim manuellen Modellbau wurde die Sequenz der XynB3 mit der Struktur der Xylosidase von *Bacillus subtilis* überlagert. Dabei wurden unterschiedliche Aminosäuren ausgetauscht und die Aminosäure, welche in der Sequenz der Xylosidase von *Bacillus subtilis* fehlt, eingefügt. Zunächst wurde die nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) durch Verfeinerung eines Monomers und festen NCS-Operationen berücksichtigt (NCS *constraints*). Später wurde dann mit allen Monomeren gerechnet, wobei die Abweichungen der weiteren Monomere vom Referenzmonomer mit im Laufe der Verfeinerung sinkenden Energietermen belegt wurden (NCS *restraints*).

Ausgehend von diesem Modell konnte die Struktur der nativen XynB3, sowie die Strukturen aller Mutanten in tetragonaler Kristallform vollständig gelöst werden. Die verwendeten Datensätze wurden an Beamlines des EMBL (Hamburg) aufgenommen.

Zur Verfeinerung aller Modelle wurden iterative Zyklen von manueller Anpassung des Strukturmodells mit dem Programm *O* (Jones, 1991) und molekularen Verfeinerungsrechnungen mit REFMAC5 (CCP4, 1994) verwendet. Zu Beginn der Verfeinerung wurden nicht-kristallographische Symmetrien durch NCS-Operatoren (*restraints*) berücksichtigt. Während der letzten Phasen des Verfeinerungsprozesses wurden Wassermoleküle mit Hilfe von *ARP/wARP* (Perrakis et al., 1999) eingefügt. Metallatome, Inhibitormoleküle

und Pufferkomponenten wurden manuell eingefügt. Die dreidimensionale Struktur des Substrates, sowie eine Topologiedatei zur Verfeinerung des Substrates mit dem Programm REFMAC5 wurden mit Hilfe des Dundee PRODRG2 Server (Schuettelkopf & van Aalten, 2004) generiert.

Um Dislokationen einzelner Moleküle und Anisotropie der Daten zu berücksichtigen, wurden Translations-, Librations-, und Schraubenachsen-Rotations-Tensoren (TLS; Winn et al., 2001) während der letzten Verfeinerungsschritte definiert. Unter Verwendung dieser Tensoren wurde die finale Verfeinerung der Strukturen in REFMAC5 durchgeführt.

2.13 Validierung und Darstellung der Modelle

Während der Verfeinerung der Strukturen wurden die Modelle durch Validierungsroutinen der verwendeten Programme auf ihre stereochemische Validität überprüft. Ramachandran-Plots wurden mit PROCHECK (Laskowski et al., 1993) angefertigt.

Abbildungen wurden mit dem Programm Pymol (DeLano, 2002) erstellt.

Zur Berechnung von Kontaktflächen wurde das Programm CNS_solve mit der Option "*buried_surface*" verwendet (Brunger et al., 1998).

2.14 Identifizierung des Metalls

Metallatome können in Proteinen auf verschiedene Arten nachgewiesen werden. Eine davon ist die Fluoreszenzspektroskopie. Viele Synchrotronmessplätze sind mit fluoreszenzspektroskopischen Messanlagen ausgerüstet. Diese werden jedoch meist zur Analyse der optimalen Wellenlänge bei der Verwendung anormaler Streuer eingesetzt und selten zur Identifizierung. Möglichkeiten zur Identifikation von Metallen in Proteinen bieten beispielsweise die Atom-Absorptions-Spektroskopie, oder die in dieser Arbeit angewandte Energiedispersive Röntgenanalyse für die Elektronenmikroskopie (EDX). Die

Variante, die mit EDX vom englischen Energy Dispersive X-ray Analysis bezeichnet wird, wird üblicherweise in Kombination mit Rasterelektronenmikroskopen (REM) betrieben. Dabei wird der Elektronenstrahl des REM dazu benutzt, die Probe zur Emission von charakteristischen Röntgenstrahlen anzuregen. Diese werden von einem seitlich angebrachten Detektor erfasst, der die Energie jedes eintreffenden Röntgenphotons mißt. Wird ein Röntgenphoton im sensitiven Bereich des Detektors absorbiert, so entstehen dort Elektron-Loch-Paare, deren Anzahl proportional zur Energie des Photons ist. Der Vorteil der Kombination von REM und EDX-Detektor besteht darin, dass eine Probe nicht nur integral als Gesamtheit analysiert werden kann, sondern auch die örtliche Verteilung der Elementzusammensetzung bestimmt werden kann (Schmidt et al. 1994 , Reimert & Pfefferkorn 1997).

Zur Durchführung der EDX-Analysen wurden mehrere XynB3-Kristalle getrocknet und von Prof. Dr. W. Jung und Dr. A. Czybulka am Institut für Anorganische Chemie der Universität zu Köln vermessen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Proteinanalytik

3.1.1 SDS-Gelelektrophorese

Die vom Kooperationspartner exprimierte und gereinigte Proteinprobe wurde mit SDS Gelelektrophorese analysiert. In Abbildung 3-1 ist das Ergebnis der SDS-PAGE dargestellt. Zu sehen ist die elektrophoretische Auftrennung der nativen XynB3, sowie die Mutanten D15G, D128G und E187G.

Das SDS-Gel der XynB3 (Abb. 3-1) zeigt jeweils nur eine einzige Bande und liefert folglich keine Hinweise auf eine Kontamination mit Fremdproteinen. Das Protein war demnach elektrophoretisch rein. Die linke Spur (M) zeigt die Marker-Proteine, deren Größen links neben dem Gel angegeben sind. Die Spuren 1-4 sind Proben, des XynB3-Wildtypproteins (1), sowie der Mutanten D15G (2), D128G (3) und E187G (4). Das SDS-Gel bestätigt das aus der Sequenz berechnete Molekulargewicht der monomeren XynB3 von etwa 61 kDa.

Die Proteine wurden durch die *Coomassie Brilliant Blue stain* Färbetechnik sichtbar gemacht.

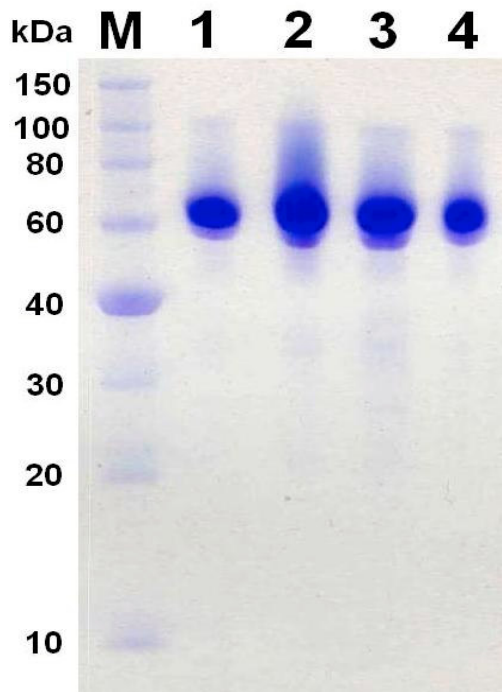


Abbildung 3-1: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der XynB3. Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel des XynB3-Wildtyps (Spur 1), sowie der Mutanten D15G (Spur 2), D128G (Spur 3) und E187G (Spur 4). Die Spur (M) zeigt den Marker zur Größenabschätzung.

3.1.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Mit der dynamischen Lichtstreuung wurde der hydrodynamische Radius gemessen und daraus das Aggregationsverhalten und das Molvolumen der XynB3 untersucht. Durch die Berechnung der *Baseline* und des *SOS-Fehler* konnte anschließend die Qualität der Messung abgeschätzt werden. Die *Baseline* leitet sich von der Vollständigkeit der Autokorrelationsfunktion ab. Der *SOS-Fehler* (*sum of squares*) gibt die Summe der mittleren quadratischen Fehler zwischen den gemessenen und den an die Autokorrelationsfunktion angepaßten Daten an. Für eine monomodale Verteilung sollte laut Herstellerangaben der Wert der *Baseline* unter 1.005, der *SOS-Fehler* unter 5 und die Polydispersität unter 30 % sein (DynaPro 1998). Die Ergebnisse der nativen XynB3 sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Tabelle 3-1: Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung

	XynB3
hydrodynamischer Radius [nm]	5.52
Polydispersität [%]	21.7
resultierendes Molekulargewicht [kDa]	183.1
Qualitätskriterien der Messungen	
Baseline	1.003
SOS-Error	1.429

Die Polydispersität liegt mit 21.7 % deutlich unter dem Schwellenwert von 30 %, der allgemein für die Kristallisierbarkeit von Proteinproben angenommen wird (Ferre-D'Amare, 1997). Das nach dem Modell für globuläre Proteine aus dem hydrodynamischen Radius berechnete Molekulargewicht deutet auf eine trimäre Quartärstruktur der XynB3 in Lösung mit einem theoretisches Molekulargewicht von 184,0 kDa (3 x 61,3 kDa) hin. Die Molekulargewichtsabschätzungen der dynamischen Lichtstreuung sollten jedoch mit Bedacht interpretiert werden, da diese Methode der Größenbestimmung mit dem verwendeten Gerät, einen Fehler von laut Herstellerangaben 20% mit sich bringt (DynaPro 1998). In der Laborpraxis werden oft noch weit höhere Abweichungen festgestellt, so dass eine Größenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung unzuverlässig ist. Gelfiltrationen oder Dichtegradientenzentrifugation führen meist zu zuverlässigeren Ergebnissen. Eindeutig konnte anhand der Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung die monomodale Verteilung der Proteine in Lösung gezeigt werden.

3.1.3 Gelfiltration

Die Gelfiltrationsschromatographie wurde nicht zur Reinigung der XynB3 Proben, sondern lediglich zu analytischen Zwecken durchgeführt, um das Oligomerisierungsverhalten der XynB3 in Lösung zu studieren. Die Auswertung erfolgte durch eine Eichgerade.

Die Gelfiltration und die Eichung wurden wie unter Punkt 2.3.1 beschrieben durchgeführt.

Anhand der in Tabelle 3-2 aufgeführten Retentionsvolumina der Eichproteine und der linearen Abhängigkeit, die zwischen Retentionsvolumen und Logarithmus der Molekülmasse (log MW) besteht, kann die Molekulare Masse der XynB3 abgeschätzt werden.

Tabelle 3-2: Retentionsvolumen der Eichproteine und der XynB3 bei der Gelfiltrationschromatographie

Protein [kDa]	log MW	Retentionsvolumen [ml]
Ferritin 440	5,64	62.2
Katalase 240	5,38	72.0
BSA 66	4,82	81.5
RNAse A 12	4,08	104.0
XynB3		70.6

Für das gemessene Retentionsvolumen der nativen XynB3 von 70.6 ml ergibt sich aus der Kalibrierung der Molekulargewichtssäule ein theoretisches Molekulargewicht von 228 kDa.

Dieser Wert deutet auf eine trimere oder tetramere Quartärstruktur (theoretische Molekularmasse 180. bzw. 244 kDa) hin. Im Zuge der Strukturlösung konnte eine trimere Struktur jedoch ausgeschlossen werden (vgl. Punkt 3.10).

3.1.4 Massenspektrometrie

Die MALDI-MS Massenbestimmung diente zum einen zur Überprüfung der Reinheit, zum anderen erlaubt sie Schlüsse auf die Aminosäuresequenz. Das aus der Sequenz berechnete theoretische Molekulargewicht beträgt 61891,55 Da (535 Aminosäuren).

Mittels MALDI-Massenspektrometrie wurde die Molmasse der nativen XynB3 ermittelt, wodurch sich ein Molekulargewicht von 61657 Da (Abbildung 3-2) ergab.

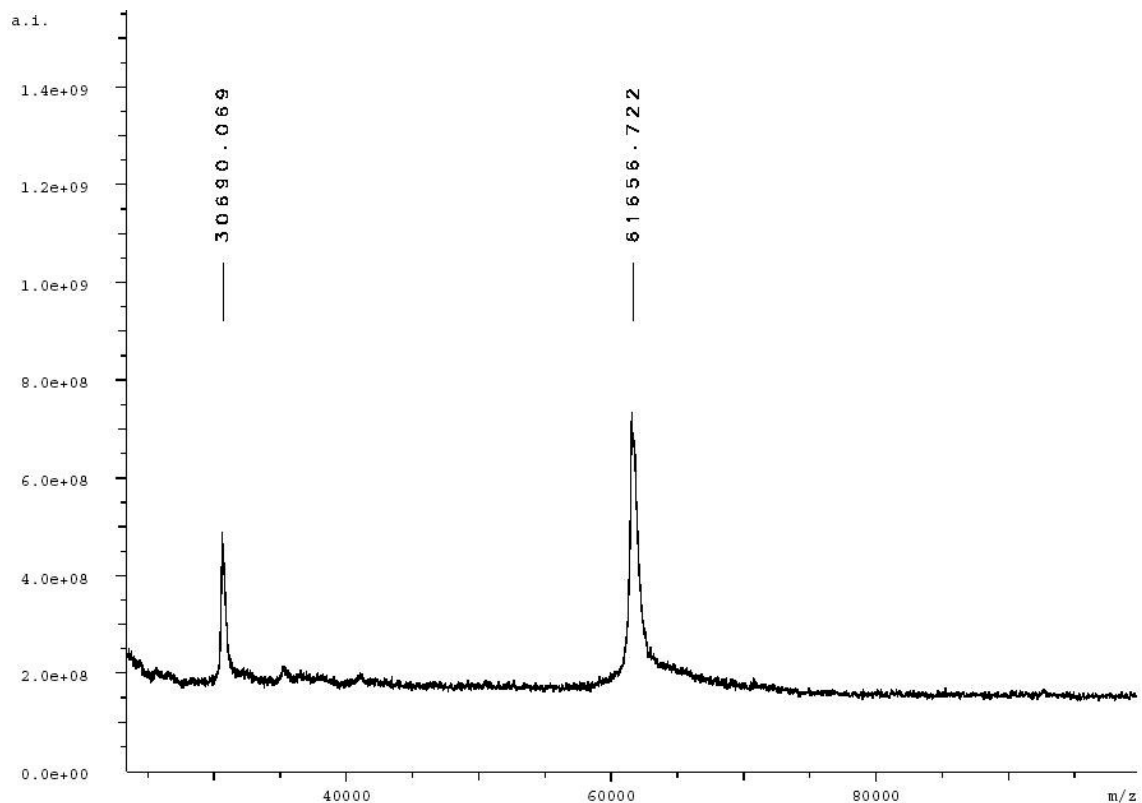


Abbildung 3-2: MALDI-Massenspektrum der XynB3. Das Maximum bei einem Verhältnis der Masse zu Ladung von 61657 zeigt das einfach geladene, das Maximum bei 30690 das zweifach geladene XynB3-Moleküle.

In *E.coli* wird im Regelfall das N-terminale Methionin abgespalten (Hirel et al. 1989 und Dalboge et al. 1990). Daraus resultiert ein theoretisches Molekulargewicht von 61760,35 Da. Auch unter der Berücksichtigung der, experimentell ermittelten, Fehlergrenze des verwendeten MALDI-TOF Gerätes von 0,15% in diesem Massenbereich, entspricht das gemessene

Molekulargewicht der nativen XynB3 nicht dem erwarteten Wert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine weitere N-terminale Verkürzung der Primärstruktur sein. In diesem Falle würde das Alanin 2 fehlen und zu einer theoretischen Masse von 61689,27 Da führen. Der damit erhaltene theoretische Wert stimmt mit dem gemessenen Wert im Rahmen der Messungenauigkeiten überein.

Im Zuge der Strukturlösung konnte in keiner der Proteinstrukturen jemals eine Elektronendichte für das N-terminale Ala2 beobachtet werden. Die erste durch Elektronendichte definierte Aminosäure war stets Lys3 (vgl. Punkt 3.8).

3.2 Kristallisation

Die Kristallisation eines Proteins ist ein Vorgang, der *in vivo* im allgemeinen nicht auftritt. Die Bedingungen, unter denen ein Protein kristallisiert, müssen empirisch ermittelt werden und können nicht vorhergesagt werden.

Regelmäßige und kompakte Proteineinkristalle sind eine Voraussetzung für die röntgenkristallographische Strukturlösung von Proteinen (McPherson, 1999).

3.2.1 Kristallisation der XynB3

Erste Hinweise auf das Kristallisationsverhalten der XynB3 lieferten die Kristallisations-*screens* PEG/LiCl Grid screen, PEG 6000 grid screen (Hampton Research), sowie die Hampton Research screens 1 und 2. Bei Verwendung dieser Kristallisations-*screens* konnten stark verwachsene Kristalle oder winzige Mikrokristalle beobachtet werden. Eine Übersicht über die initialen Kristallisationsbedingungen ist in Tabelle 3-3 aufgelistet.

Tabelle 3-3: Anfängliche Kristallisationsbedingungen. Aufgelistet sind die Reservoirbedingungen bei denen erste Kristalle beobachtet werden konnten.

Reservoirbedingung	Screen / Nummer der Lösung
30% (w/v) PEG 4000, 100mM Tris/HCl pH 8,5 200mM MgCl ₂	Hampton Research screen 1 (Lösung 6)
30% (w/v) PEG 1500	Hampton Research screen 1 (Lösung 43)
30% (w/v) PEGMME 2000, 100mM NaAcetat pH 4,6, 200mM Ammoniumsulfat	Hampton Research screen 2 (Lösung 13)
20% (w/v) PEG 3350, 200mM NaAcetat pH 7,8	PEG / ION screen (Lösung 27)
30% (w/v) PEG 6000, 100mM MES pH 6,0, 1M LiCl	PEG / LiCl grid screen (Lösung 21)
30% (w/v) PEG 6000, 100mM Citronensäure pH 5,0	PEG 6000 grid screen (Lösung 20)
30% (w/v) PEG 6000, 100mM MES pH 6,0	PEG 6000 grid screen (Lösung 21)
30% (w/v) PEG 6000, 100mM HEPES pH 7,0	PEG 6000 grid screen (Lösung 22)
30% PEG 6000, 100mM Tris pH 8,0	PEG 6000 grid screen (Lösung 23)

Verbesserte Resultate, bezüglich Größe, Form und Verwachsungsgrad der resultierenden Kristalle, zeigten sich bei der Verwendung von PEG 6000 in Kombination mit einem MES Puffer. Mit der optimierten Kristallisationsbedingung 19% (w/v) PEG 6000, 100mM MES pH 5,4 wurden die Additiv *screens* 1 bis 3, sowie die Detergentien-*screens* 1 bis 3 von *Hampton Research* durchgeführt. Bei dieser Art von *screen* wird zu den Kristallisationsbedingungen jeweils eine definierte Menge an Additiven oder Detergentien zum Tropfen und ggf. zum Reservoir hinzugegeben.

Es zeigten sich nach etwa 5 Tagen unverwachsene Einkristalle bei Verwendung der Detergentien N,N-Dimethyldecylamine-beta-oxide (DDAO) und Octanoyl-N-hydroxyethylglucoamide (HEGA-8). Unter Verwendung dieser Detergentien konnten die XynB3-Kristalle weiter optimiert und zuverlässig reproduziert werden.

XynB3-Kristalle konnten je nach verwendetem Detergenz entweder in der Raumgruppe P2₁2₁2 (DDAO) oder in der Raumgruppe P4₃2₁2 (HEGA-8)

3 Ergebnisse und Diskussion

beobachtet werden. Die genauen Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle 3-4 aufgelistet.

Tabelle 3-4: Übersicht über die optimierten Kristallisationsbedingungen die zur reproduzierbaren Gewinnung ausreichend großer Einkristalle führten. Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Stammlösungen und nicht auf die Endkonzentration im Kristallisationstropfen.

<i>Raumgruppe</i>	<i>optimierte Reservoirbedingungen</i>	<i>Zusammensetzung des Kristalltropfens</i>
P ₂ ₁ 2 ₁ 2	19% (w/v) PEG 6000, 100mM MES pH 5,4	5µl Proteinlösung 22-30 mg/ml + 5µl Reservoir + 1µl DDAO Lösung (104mM)
P ₄ ₃ 2 ₁ 2	19% (w/v) PEG 6000, 100mM MES pH 5,4	5µl Proteinlösung 22-30 mg/ml + 5µl Reservoir + 1µl HEGA-8 Lösung (109mM)

Die Kristalle der beiden Raumgruppen P₂₁2₁2 und P₄₃2₁2 unterschieden sich auch optisch. Kristalle der orthorhombischen Raumgruppe (P₂₁2₁2), die bei Verwendung von DDAO wuchsen, erschienen makroskopisch als lange dünne Plättchen (Abbildung 3-3 A). Kristalle der tetragonalen Raumgruppe (P₄₃2₁2), die bei Verwendung des Detergenz HEGA-8 wuchsen, zeigten ein bipyramidales Erscheinungsbild (Abbildung 3-3 B).

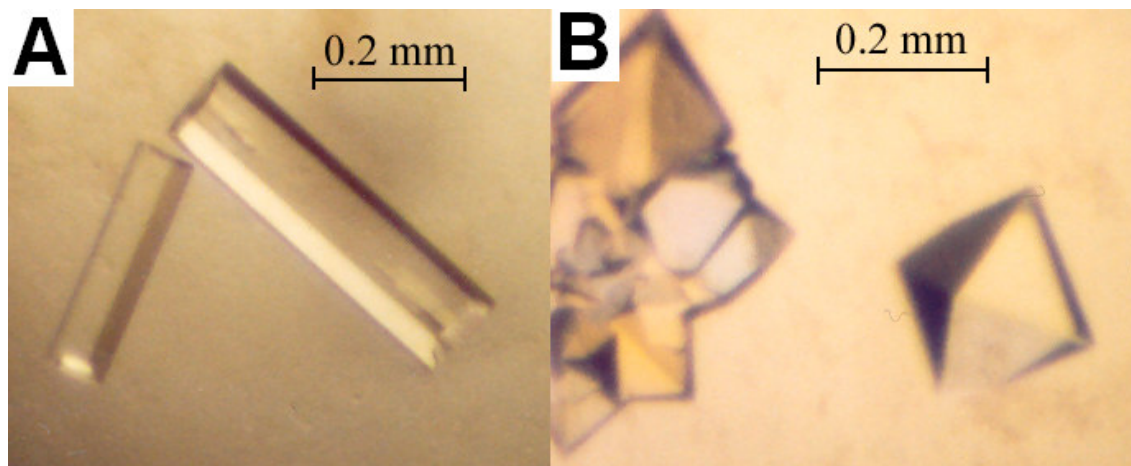


Abbildung 3-3: XynB3-Kristalle (A) in der orthorhombischen Kristallform bei Kristallisation mit DDAO und (B) in der tetragonalen Kristallform bei Kristallisation mit HEGA-8

3.2.2 Kristallisation der selenomethionin-derivatisierten XynB3

Das selenomethionin-derivatisierte XynB3-Protein (SeMet XynB3) unterschied sich in seinem Kristallisationsverhalten in der orthorhombischen Kristallform nicht von dem des Wildtyps. Allerdings konnten keine Kristalle der tetragonalen Raumgruppe erzeugt werden. Die Kristallisationsansätze mit HEGA-8 als Detergenz, die im Falle des Wildtyps und der katalytischen Mutanten zu Kristallen tetragonaler Raumgruppe führten, blieben klar oder zeigten ausgefallenes Protein.

3.2.3 Kristallisation und Kokristallisation der XynB3 Mutanten mit Xylobiose

Die katalytischen Mutanten D15G, D128G und E187G wurden bei identischen Bedingungen wie der Wildtyp kristallisiert. Das Kristallisationsverhalten unterschied sich nicht von denen des Wildtyps. Alle Mutanten wurden ausschließlich in der tetragonalen Kristallform kristallisiert.

Im Falle einer Kokristallisation wurde zusätzlich das natürliche Substrat Xylobiose zum Kristallisationstropfen gegeben. Der Kristalltropfen enthielt somit 5 µl Protein (Konzentration 22-30 mg/ml), 5µl Reservoir (19%(w/v) PEG 6000, 100 mM MES pH 5,4 und 1 µl HEGA-8 (109 mM)) und zusätzlich noch 0,4 µl einer 500 mM Xylobioselösung. Damit betrug die Konzentration des Substrates Xylobiose im Kristallisationstropfen zu Beginn des Kristallisationsprozesses etwa 17,5 mM und die des Proteins ca. 0,22 mM. Damit war die Konzentration des Substrates ca. 80 mal höher als die des Proteins. Dieser Überschuss an Substrat sollte gewährleisten, dass das Substrat im aktiven Zentrum gebunden wird und bei Röntgendiffraktionsmessung des Kokristalls in der Elektronendichte zu erkennen ist.

3.3 Cryoprotokoll

Die Kristalle der XynB3 wuchsen unter Bedingungen, die bei Tieftemperaturmessungen Eiskristalle ausbilden. Um die Kristalle bei Tieftemperaturen messen zu können, mussten sie in eine Bedingung überführt werden, die das Auftreten von Eiskristallen verhindert. Ein direktes Überführen in einen Cryopuffer aus 19% PEG 6000, 100 mM MES pH 5,4 und 17% Glycerin als Cryoprotektant führte dazu, dass die Kristalle Risse bekamen und zerbrachen. Das Streuverhalten der Kristalle war nach einer direkten Überführung in den Cryopuffer für die Messung eines Datensatzes nicht ausreichend. Die Verwendung anderer Cryoprotektoren wie z.B. eine hohe PEG Konzentrationen, 2-Methyl-2,4-Pentandiol (MPD), Saccharose oder Öle führte zu keinem besseren Resultat. Nur eine sehr behutsame und langsame Konzentrationserhöhung, welche sich über einen Zeitraum von 4 Tagen erstreckte, ergab Kristalle, die ein gutes Streuverhalten aufwiesen.

3.4 Diffraktionsmessungen

Die Datensätze der XynB3 sind an den Synchrotronmessplätzen der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY Berlin) und des *European Molecular Biology Laboratory* EMBL Hamburg am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY Hamburg) gemessen worden. Die selenomethionin-derivatisierte XynB3 in der orthorhombischen Kristallform wurde am Messplatz BL1 der *Protein Structure Factory* PSF (BESSY) in Berlin gemessen. Die Datensätze des XynB3-Wildtypes sowie der kokristallisierten Mutanten D15G, D128G und E187G (jeweils in der tetragonalen Raumgruppe) wurden an den Messplätzen BW7b, X13 und X12 am EMBL Hamburg gemessen. Einzelheiten der Messungen sind in Tabelle 3-5 aufgelistet:

Tabelle 3-5: Ausgewählte kristallographische Parameter der XynB3 Datensätze

Datensatz	SeMet WT	Wildtype	D15G	D128G	D187G
Messplatz	BL1 PSF Berlin BESSY	BW7B EMBL Hamburg DESY	X12 EMBL Hamburg DESY	X12 EMBL Hamburg DESY	X13 EMBL Hamburg DESY
Wellenlänge [Å]	0.9797	0.8426	0.9239	0.9239	0.8048.
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Gitterkonstanten					
a [Å]	99,352	140,027	140,175	140,383	139,870
b [Å]	98,241	140,027	140,175	140,383	139,870
c [Å]	257,979	231,599	232,322	232,907	232,025
Mosaizität	0,356	0,266	0,450	0,487	0,408
Oszillationswinkel pro Aufnahme [°]	0,3	0,1	0,25	0,25	0,1
Anzahl der Bilder	823	953	600	800	772
Temperatur der Datensammlung [K]	100	100	100	100	100
Anzahl der Reflexe unabhängige Reflexe	3044731 88547	9254959 187065	5526740 126449	9198787 118549	5966877 116620
Auflösungsbereich [Å]	30-2,5	40-1,88	30-2,15	30-2,20	40-2,2
Redundanz		7.3	9.7	13.9	5.7
Rsym-Wert insgesamt	6,6	6,4	13,0	12,1	7,1
höchste Auflösung <l>/ sigma	12,4	30,5	44,1	62,1	19,6
gesamt	22,6	16,7	14,0	18,3	11,98
höchste Auflösung Vollständigkeit [%]	12,8	5,2	2,90	3,13	6,76
gesamt	99,9	99,3	99,8	99,9	99,5
höchste Auflösung	99,1	90,2	98,4	99,9	97,8

3.5 Kristallpackung

Die Anzahl der Proteinmonomere pro asymmetrischer Einheit lässt sich unter Verwendung der Kristallparameter aus der Indizierung, des Molekulargewichts (61 kDa) und unter der Annahme einer für Proteinkristalle typischen

3 Ergebnisse und Diskussion

Proteindichte von ca. 1,22 g/ml (Andersson & Hovmoller, 2000) berechnen. In Tabelle 3-6 sind die möglichen Packungsdichten für die orthorhombische und tetragonale Kristallform aufgeführt. Die angenommene Anzahl von Monomeren je asymmetrischer Einheitszelle (AU) ist jeweils aufgeführt.

Tabelle 3-6: Packungsdichten der XynB3-Kristallformen P₂₁2₁2 und P₄₃2₁2

	Monomere je AU	V_M [Å³/Da]	Lösungsmittelanteil [%]
P ₂ ₁ 2 ₁ 2	2	5.1	75.9
	3	3.4	63.9
	4	2.6	51.8
	5	2.1	39.8
	6	1.7	27.7
P ₄ ₃ 2 ₁ 2	2	4.6	73.2
	3	3.1	59.8
	4	2.3	46.4
	5	1.9	33.0

Eine Packungsdichte (V_M-Wert) von 2.6 bzw. 2.3 Å³/Da (Matthews, 1968) für vier Moleküle pro asymmetrischer Einheit liegen in dem für Proteinkristalle üblichen Bereich zwischen 2,1 und 3,0 (Matthews, 1968). Jedoch ist eine asymmetrische Einheit mit 3 oder 5 Monomeren nicht auszuschließen, daher kann anhand des V_M-Wertes keine eindeutige Aussage über die Anzahl der Monomere in der asymmetrischen Einheit getroffen werden. Erst die Ergebnisse der Selbstrotation und der Strukturlösung (Punkt 3.6 und 3.7) bestätigen die anhand des Matthews-Koeffizienten postulierte Anzahl von vier Monomeren je asymmetrischer Einheit.

3.6 Berechnung der Selbstrotationsfunktionen

3.6.1 orthorhombische Kristallform

Nichtkristallographische Symmetrien (NCS) im Kristall lassen sich mit Hilfe von Selbstrotationsfunktionen identifizieren. Die Selbstrotationsfunktionen für Rotationswinkel von $\kappa = 0$ bis 180° unter Verwendung von Daten im Auflösungsbereich von 15-3.5 Å wurden mit dem Programm GLRF (Tong & Rossman, 1997) berechnet und sind in Abbildung 3-4 dargestellt. In Tabelle 3-7 sind die intensivsten Maxima der Selbstrotationsfunktion der orthorhombischen Kristallform aufgeführt.

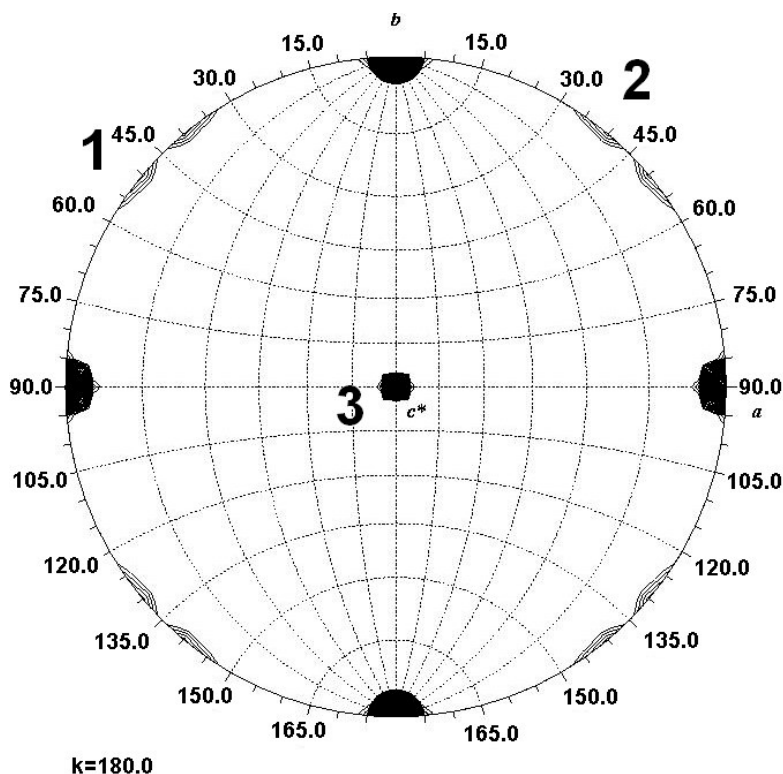


Abbildung 3-4: Selbstrotationsfunktionen der $P2_12_12$ Kristalle bei $\kappa = 180^\circ$. Die mit 1, 2 und 3 bezeichneten Signale stehen jeweils 90° zueinander und bilden ein 222-System, wie man es für ein Tetramer erwarten würde. Eine der lokalen Symmetrieachsen ist parallel zur kristallographischen Achse. Daher ist ein Peak vom Ursprungmaximum bei C (3) verdeckt.

Erkennbar ist eine Symmetrie, die durch die Peaks 1, 2 und 3 gebildet wird. Diese Peaks stehen senkrecht zueinander und bilden ein 222-System, wie man es bei einer tetrameren Anordnung der Moleküle in der asymmetrischen Einheit erwarten würde.

Tabelle. 3-7: Maxima der Selbstrotation der orthorhombischen Kristallform der XynB3. Die Tabelle zeigt zusätzlich das erste nicht signifikante Maximum der Selbstrotationsfunktion.

phi [°]	psi [°]	kappa [°]	Height	I/Sigma	Interpretation
0.00	0.00	0.00	1000.00	19.52	Ursprungspik
50.00	90.00	179.97	270.95	5.02	NCS
90.00	90.00	90.00	163.95	2.90	nicht signifikant

3.6.2 tetragonale Kristallform

Die Selbstrotationsfunktion der tetragonalen Kristalle ist in Abbildung 3-5 dargestellt. Auch hier deuten die Peaks auf eine tetramere Anordnung der Moleküle hin. Zu erkennen sind die Peaks 1, 2 und 3, die senkrecht zueinander stehen. Wie bei den orthorhombischen Kristallen liegt auch hier das Protein so, dass eine lokale Symmetrieachse des Tetramers parallel zu einer kristallographischen Achse liegt. Daher ist einer der drei zu erwartenden Peaks der drei 90° Achsen (3) von dem Ursprungspik überdeckt. In Tabelle 3-8 sind die intensivsten Maxima der Selbstrotationsfunktion der tetragonalen Kristallform aufgeführt.

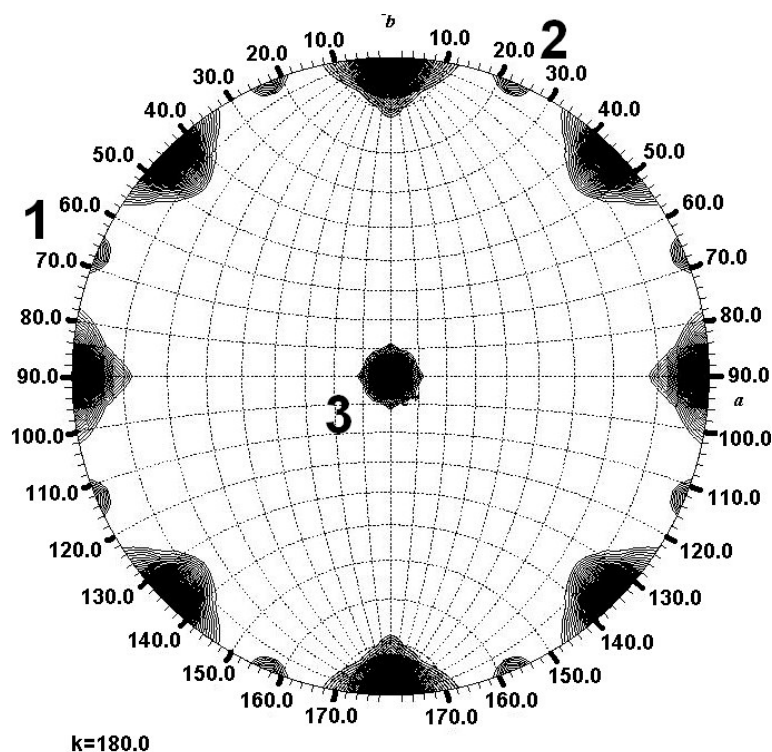


Abbildung 3-5: Selbstrotationsfunktionen der $P4_32_12$ Kristalle bei $\kappa = 180^\circ$. Die Peakpunkte 1, 2 und 3 stehen jeweils 90° zueinander und bilden ein 222 System, wie man es für ein Tetramer erwarten würde. Eine der Achsen des Tetramers liegt parallel zur kristallographischen, und daher ist ein Peak vom Ursprungspik bei C (3) verdeckt.

Tabelle 3-8: Maxima der Selbstrotation der tetragonalen Kristallform der XynB3. Die Tabelle zeigt zusätzlich das erste nicht signifikante Maximum der Selbstrotationsfunktion.

<u>phi [°]</u>	<u>psi [°]</u>	<u>kappa [°]</u>	<u>Height</u>	<u>I/Sigma</u>	<u>Interpretation</u>
0.00	0.00	0.00	1000.00	15.87	Ursprungspik
22.00	90.00	180.00	188.30	2.72	NCS
180.00	44.00	180.00	100.94	1.31	nicht signifikant

Die Daten der Selbstrotationsrechnungen deuten auf eine tetramere Anordnung der vier Monomere in der Asymmetrischen Einheit hin. Dieses Ergebnis bestätigt die Ergebnisse der Gelfiltrationschromatographie (Punkt 3.1.3) und der wahrscheinlichsten Packungsdichte anhand des V_M -Wertes (Punkt 3.5).

3.7 Strukturlösung und Verfeinerung

3.7.1 Molekulare Ersatzrechnung der selenomethionin-derivatisierten XynB3

Ein erstes Modell der Struktur der XynB3 wurde durch Molekularen Ersatz unter Verwendung des am BESSY gemessenen Datensatzes der selenomethionin-derivatisierten XynB3 in orthorhombischer Kristallform erstellt. Als Suchmodell in den Rechnungen zum Molekularen Ersatz wurde die Struktur der Xylosidase aus *Bacillus subtilis* in ihrer tetrameren Konformation eingesetzt (Patskovsky & Almo 2005; PDB-Eintrag: 1YIF). Die Ergebnisse der Kreuzrotationsfunktion sind in Tabelle 3-9 aufgeführt.

Tabelle 3-9: Ergebnisse der Kreuzrotationsrechnungen zum Molekularen Ersatz. Neben dem Korrelationsfaktor für beobachtete und berechnete Strukturfaktoramplituden ist der von AmoRE berechnete R-Wert aufgeführt. Neben den vier korrekten Lösungen ist eine exemplarische falsche Lösung gezeigt.

	<i>Rotation</i>			<i>Translation</i>			Korrelationsfaktor	R-Wert
	alpha	beta	gamma	x	y	z		
Lösung 1	49,85	71,29	264,59				22,4	52,7
Lösung 2	50,34	71,07	84,44				22,4	52,7
Lösung 3	130,08	71,23	85,07				21,4	52,9
Lösung 4	129,60	71,40	265,23				21,4	52,9
Lösung 5	128,06	55,36	265,23				13,5	55,1

Es konnten vier Lösungen identifiziert werden, die sich bezüglich der berechneten Korrelationsfaktoren (Strukturfaktoramplituden, Intensität, Pattersonkorrelationsfaktor) und des R-Wertes deutlich von den übrigen Lösungen abhoben, jedoch untereinander in der Qualität von Korrelationsfaktor und R-Wert kaum unterschieden. Das Ergebnis der Kreuzrotation bestätigt die Ergebnisse der Selbstrotationsfunktion mit vier Molekülen in einer tetrameren Quartärstruktur.

Eine darauf folgende Translationssuche mit einer der Rotationslösungen lieferte eine Lösung mit sehr guten Qualitätsparametern (Tab. 3-10) und bildete die

Grundlage für die Modellierung der Struktur der selenomethionin-derivatisierten XynB3 in ihrer orthorhombischen Kristallform.

Tabelle 3-10: Ergebnisse der Translations- und Verfeinerungsrechnung zum Molekularen Ersatz. Neben der korrekten Translationslösung ist eine exemplarische falsch Lösung gezeigt.

	<i>Rotation</i>		<i>Translation</i>			Korrelationsfaktor	R-Wert	
	alpha	beta	gamma	x	y			z
Translationsuche								
	49,85	71,29	264,59	0,1652	0,1379	0,2333	52,6	42,5
	49,85	71,29	264,59	0,1659	0,3932	0,2335	33,5	49,2
Verfeinerung								
	49,77	71,26	264,45	0,1656	0,1377	0,2333	59,9	40,8

3.7.2 Modellbau der selenomethionin-derivatisierten XynB3 mit ARP/wARP und manuellen Methoden

Im Rahmen der Proteinkristallographie ist die Anwendung automatischer Modellbauroutinen nur bei ausreichender Auflösung und guter Qualität der Elektronendichtefunktion möglich (Perrakis et al. 1999). Im Fall der XynB3 zeigten die Kristalle der selenomethionin-derivatisierten XynB3 Beugungseigenschaften, welche an die Grenzen des für den automatisierten Modellbau Möglichen gingen. Daher wurde der automatische Modellbau mit manuellem Methoden kombiniert. Ein automatischer Modellbau mit ARP/wARP (Perrakis et al., 1999) wurde mit einer manuellen Modifizierung des Suchmodells (1YIF) kombiniert. Bei der manuellen Modifizierung erfolgte ein schrittweiser Austausch derjenigen Aminosäuren, welche sich im Suchmodell von denen der XynB3 unterscheiden. Dies führte in Kombination mit dem automatisierten Modellbau zu einer ersten XynB3-Struktur, die wiederum für die Berechnung des Molekularen Ersatzes für den XynB3-Wildtyp sowie die Mutanten D15G, D128G und E187G in der tetragonalen Kristallform diente.

3 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3-11 zeigt eine Übersicht über den iterativen Prozess des Modellbaus bis zu einer XynB3-Struktur, die für weitere Molekulare-Ersatzrechnungen verwendet werden konnte.

Tabelle 3-11: Qualitätsmerkmale der Struktur der selenomethionin-derivatisierten XynB3 nach ausgewählten Verfeinerungsschritten.

Schritt	R _{work} [%]	R _{free} [%]	Wasser- moleküle	Strukturmodell
1	40,8	-	-	nach Molekularem Ersatz
2	29,8	35,8	-	nach automatisiertem Modellbau
3	23,8	28,8		nach automatisiertem Modellbau in Kombination mit manuellem
4	21,2	28,1	1393	nach Wassereinbau

3.7.3 Molekulare-Ersatz Rechnungen der nativen XynB3 sowie der Mutanten D15G, D128G und E187G in der tetragonalen Kristallform

Das Strukturmodell aus der selenomethionin-derivatisierten XynB3 der orthorhombischen Kristallform diente als Vorlage für den Molekularen Ersatz zur Strukturaufklärung der nativen XynB3 in der tetragonalen Kristallform. In diesem besonderen Fall des Molekularen Ersatzes unterscheidet sich das Suchmodell nur in der räumlichen Orientierung, nicht jedoch in Sequenz und Struktur von der gemessenen Struktur. Daher ist ein zusätzlicher Modellbau nicht notwendig. Da sich die Kristalle der nativen XynB3 und der Mutanten im Wesentlichen nicht unterschieden, war eine exemplarische Molekulare Ersatz Rechnung ausreichend. Die ermittelte räumliche Orientierung der XynB3 in den tetragonalen Kristallen konnte auf alle Messdatensätze dieser Raumgruppe, namentlich native XynB3, sowie die Mutanten D15G, D128G und E187G jeweils in ihrer kokristallisierten Form, übertragen werden. In Tabelle 3-12 ist die Rotations- und Translationssuche der XynB3 in der tetragonalen Raumgruppe aufgeführt. Als Suchmodell wurde die Struktur der selenomethionin-derivatisierten XynB3 aus der orthorhombischen Raumgruppe verwendet. Als

exemplarische Strukturdaten wurde der Diffraktionsdatensatz der mit Xylobiose kokristallisierten XynB3 E187G Mutante verwendet.

Tabelle 3-12: Ergebnisse der Rotations-, Translations- und Verfeinerungsrechnung zum exemplarischen Molekularen Ersatz der tetragonalen Raumgruppe. Als Datensatz dienten Diffraktionsdaten der kokristallisierten E187G Mutante. Als Suchmodell wurde die verfeinerte Struktur der selenomethionin-derivatisierten XynB3 verwendet.

	Rotation			Translation			Korrelations -faktor	R-Wert
	alpha	beta	gamma	x	y	z		
Verfeinerung	55,67	33,84	351,28	0,2529	-0,2577	0,0071	72,4	34,3

3.7.4 Strukturverfeinerung

Ausgehend von der verfeinerten Rotations- und Translationslösung der Molekularen Ersatz Rechnung wurden die Strukturen der nativen XynB3 sowie der kokristallisierten Mutanten D15G, D128G und E187G verfeinert. Da diese Proteine in gleicher Kristallform vermessen wurden, war eine Molekulare Ersatz Rechnung für alle Strukturen der tetragonalen Raumgruppe ausreichend. Die einmal in die korrekte räumliche Orientierung gebrachte Struktur der Mutante E187G konnte als Modell für alle anderen Datensätze herangezogen werden, ohne dass eine erneute Rotations- und Translationsänderung notwendig war. Die im Vergleich zum Wildtyp unterschiedliche Aminosäure Glu187 und im Falle der Mutanten D15G und D128G auch die Aminosäuren Asp15 bzw. Asp128 wurden im Zuge der Strukturverfeinerung ausgetauscht. Im Allgemeinen wurden als erste Verfeinerungsschritte zwei starre Körper Verfeinerungen (*rigid body refinement*) durchgeführt, wobei eine auf das gesamte Tetramer angewendet wurde. Eine weitere verfeinerte die vier Monomere unabhängig voneinander. Im Anschluss daran wurden iterative Verfeinerungszyklen

3 Ergebnisse und Diskussion

durchgeführt, die stets in Kombination mit einer visuellen Überprüfung der Struktur und der zugehörigen Elektronendichten abliefen. Im Verlauf der Verfeinerung erfolgte ein automatischer Wassereinbau unter Verwendung des Programms ARP/wARP (Perrakis et al., 1999). Weiterhin wurden Translations-, Librations-, und Schraubenachsen-Rotations-Tensoren (TLS; Winn et al., 2001) eingeführt und verfeinert sowie Substrat, Puffermoleküle und Metallatome in die Struktur integriert. Die Tabellen 3-13 bis 3-17 geben eine Übersicht über die Qualität der Strukturen des selenomethionin-derivatisierten Wildtyps, der nativen XynB3 sowie der drei kokristallisierten Mutanten D15G, D128G und E187G während ausgewählter Verfeinerungsabschnitte.

Tabelle 3-13: Qualitätsmerkmale der Struktur der selenomethionin-derivatisierten XynB3 nach ausgewählten Verfeinerungsschritten.

Schritt	R _{work} [%]	R _{free} [%]	Wasser- moleküle	Strukturmodell
1	40,8	-	-	nach Molekularem Ersatz
2	23,8	28,8	-	nach Modellbau
3	21,2	28,1	1393	nach Wassereinbau

Tabelle 3-14: Qualitätsmerkmale der Struktur der kokristallisierten XynB3 Mutante E187G nach ausgewählten Verfeinerungsschritten.

Schritt	R _{work} [%]	R _{free} [%]	Wasser- moleküle	Strukturmodell
1	38,0	37,3	-	nach Starre Körper Verfeinerung
2	22,9	27,3	-	nach TLS-Verfeinerung
3	18,9	24,2	1110	nach Wassereinbau

Tabelle 3-15: Qualitätsmerkmale der Struktur der nativen XynB3 nach ausgewählten Verfeinerungsschritten.

Schritt	R _{work} [%]	R _{free} [%]	Wasser- moleküle	Strukturmodell
1	28,6	37,3	-	nach Starre Körper Verfeinerung
2	22,8	28,7	1832	nach Wassereinbau
3	22,7	28,6	1830	nach TLS-Verfeinerung

Tabelle 3-16: Qualitätsmerkmale der Struktur der kokristallisierten XynB3 Mutante D15G nach ausgewählten Verfeinerungsschritten.

Schritt	R _{work} [%]	R _{free} [%]	Wasser- moleküle	Strukturmodell
1	28,9	29,0	-	nach Starre Körper Verfeinerung
2	22,4	26,8	-	nach TLS-Verfeinerung
3	19,2	27,9	2143	nach Wassereinbau

Tabelle 3-17: Qualitätsmerkmale der Struktur der kokristallisierten XynB3 Mutante D128G nach ausgewählten Verfeinerungsschritten.

Schritt	R _{work} [%]	R _{free} [%]	Wasser- moleküle	Strukturmodell
1	30,7	30,1	-	nach Starre Körper Verfeinerung
2	22,4	26,7	-	nach TLS-Verfeinerung
3	20,4	28,2	1785	nach Wassereinbau

3.8 Qualität der XynB3-Strukturen

Im Verlauf der Verfeinerung wurde das Substrat Xylobiose, welches mit den katalytischen Mutanten kokristallisiert worden war, in die Struktur integriert, sofern die Elektronendichte dies rechtfertigte. Weiterhin wurden je Tetramer vier Kalziumatome sowie vier Glycerin- und drei MES-Puffermoleküle in die Struktur eingebracht. Im letzten Verfeinerungsschritt wurden die verfeinerten Strukturen des nativen Enzyms sowie aller 3 Mutanten übereinandergelegt, um unklar definierte Aminosäureseitenketten anhand der anderen Strukturen optimieren zu können. Auftretende Unterschiede zu den anderen Strukturen wurden anhand der Elektronendichte der zugehörigen Struktur - unter Berücksichtigung der möglicherweise anderen Konformation - genauer untersucht und ggf. geändert.

Tabelle 3-18 zeigt die wichtigsten statistischen Parameter der verfeinerten Strukturen. Im Hinblick auf die hohe Auflösung der Datensätze sind die erzielten R-Werte von ca. 18-23% für *R_{work}* und ca. 24-28% für *R_{free}* zufriedenstellend. Die ermittelten stereochemischen Parameter für Bindungslängen und

3 Ergebnisse und Diskussion

Bindungswinkel sind verglichen mit den Idealwerten nach Engh und Huber (1991) sehr gut. Die Abweichungen liegen in Bereichen, die für Strukturen mit ähnlichen Auflösungen erwartet werden.

Tabelle 3-18: Ausgewählte Parameter der Verfeinerung der selenomethionin-derivatisierten, der nativen XynB3 sowie der Strukturen der drei kokristallisierten, katalytisch inaktiven Mutanten D15G, D128G, E187G. Die RMS-Abweichungen wurden mit REFMAC5 berechnet, die B-Faktoren mit MOLEMAN.

Datensatz	SeMet WT	Wildtyp	D15G	D128G	D187G
Raumgruppe	p2 ₁ 2 ₁ 2	p4 ₃ 2 ₁ 2	p4 ₃ 2 ₁ 2	p4 ₃ 2 ₁ 2	p4 ₃ 2 ₁ 2
Auflösungsbereich	30-2.5	40-1.88	30-2.15	30-2.20	40-2.2
Anzahl der Proteinatome	17504	17508	17492	17492	17488
Anzahl der Wasser und Pufferatome	1130	1891	2147	1787	1267
R_{work}	21	23.3	19.9	20.5	18.5
R_{free}	27.3	28.6	27.6	28.2	23.8
RMS Abweichung von den Idealwerten					
Bindungslänge (Å)	0.014.	0.008.	0.009.	0.015.	0.010.
Bindungswinkel (°)	1.729.	1.299.	1.300.	1.616.	1.340.
Isotrope B-Faktoren (Å²)					
Protein		34.897	31.418	36.185	43.376
Wasser		40.206	36.770	37.785	44.249
Ligand				58.951	67.431

Die endgültigen Modelle der orthorhombischen und tetragonalen XynB3-Kristallform bestehen aus jeweils vier Molekülen pro asymmetrischer Einheit. Die Modelle enthalten 533 Aminosäuren pro Molekül. In keiner Struktur konnten die ersten beiden N-terminalen Aminosäuren Methionin1 und Alanin2 beobachtet werden. Dies ist entweder auf die hohe Flexibilität der besagten Aminosäuren in der Kristallstruktur zurück zu führen, oder die Aminosäuren werden im Zuge der Expression im *E.coli* Wirtsorganismus posttranslational abgespalten. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der XynB3 deuten auf das zuletzt genannte hin (vgl. Punkt 3.1.4).

Im Ramachandran-Plot (Abbildung 3-7) liegen ca. 83% aller Residuen in den am meisten favorisierten Bereichen (*most favoured*) und ca. 16% in den zusätzlich erlaubten (*additionally allowed*). Die übrigen Residuen liegen in den großzügig erlaubten Bereichen (*generously allowed*) und in den verbotenen Bereichen (*disallowed region*) des Plots. Dies gilt mit gewissen Schwankungen für alle Strukturen und alle Ketten der gelösten Strukturen. Jede Aminosäure, die im Ramachandran-Plot in verbotenen oder nur großzügig erlaubten Bereichen liegt, wurde anhand der Elektronendichte genauer auf ihre wirkliche Lage hin überprüft (Abbildung 3-6).

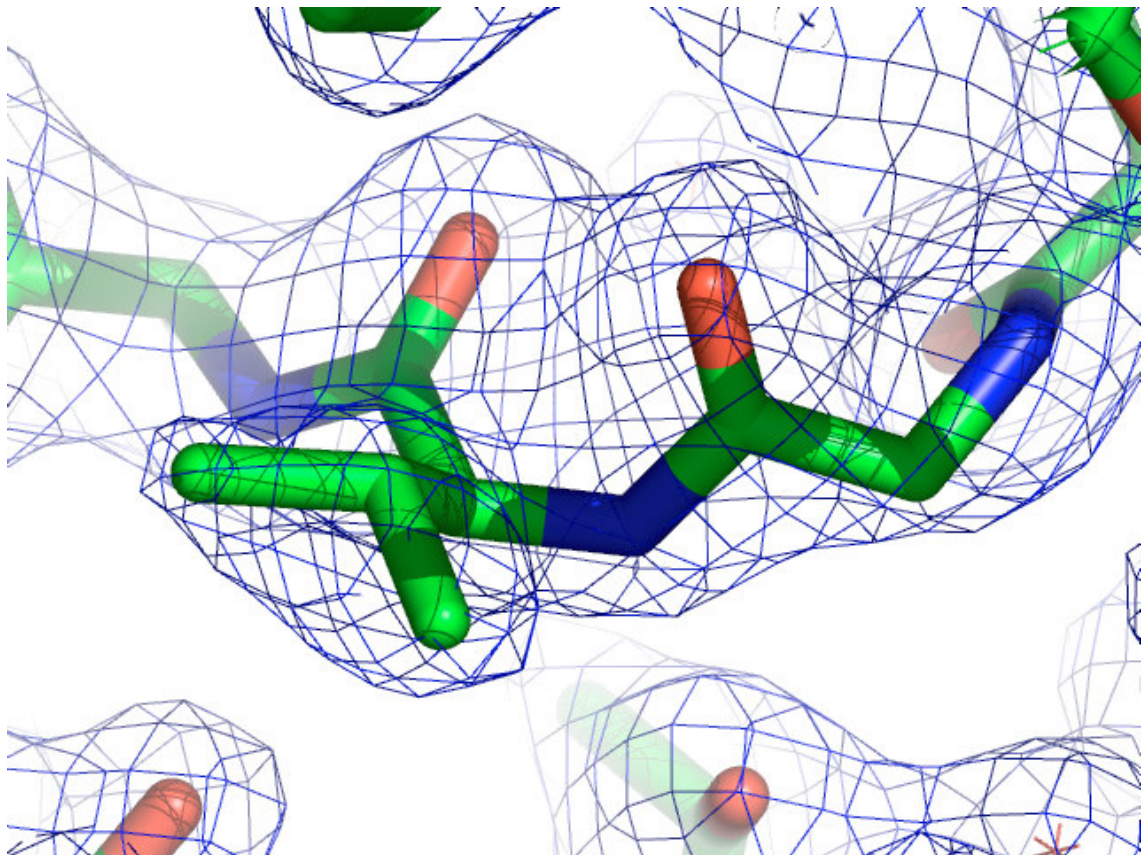


Abbildung 3-6: Elektronendichte der Aminosäure Val38, als Beispiel einer Aminosäure aus der verbotenen Region des Ramachandran-Plots (vgl. Abb. 3-7)

Diese Residuen sind eindeutig in der Elektronendichte des nativen Enzyms definiert, und aufgrund der hohen Qualität der vorliegenden Dichte war eine Veränderung der Torsionswinkel weder sinnvoll noch möglich.

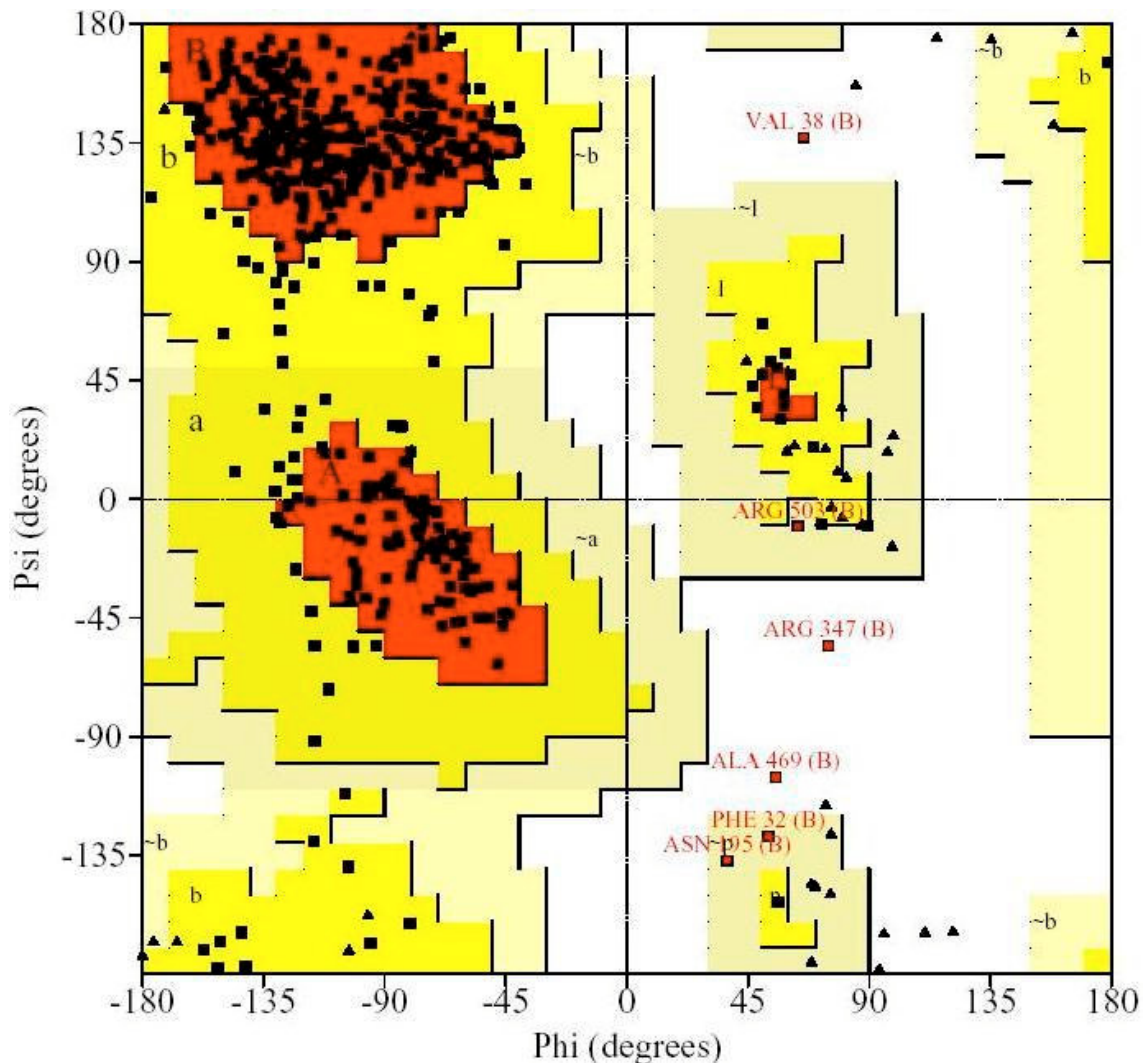


Abbildung 3-7: Ramachandran-Plot der XynB3 E187G Mutante (Kette B). Die sechs Residuen (Phe32, Val38, Asn195, Arg347, Ala469, Arg503), die in den großzügig erlaubten (hellgelb, *generously allowed*) und in den verbotenen Bereichen (weiß, *disallowed region*) liegen, sind in allen Ketten und allen Strukturen an vergleichbarer Position des Ramachandran-Plots. Zur besseren Übersicht sind nur die Residuen der Kette B dargestellt. In allen gezeigten Ramachandran-Plots sind Glycine als Dreiecke dargestellt.

3.9 Tertiärstruktur

Die XynB3 kristallisiert sowohl in der orthorhombischen als auch in der tetragonalen Kristallform als Tetramer. Das XynB3-Monomer besteht aus 533 Aminosäuren, die N-terminalen Aminosäuren Met1 und Ala2 fanden sich in keiner der gelösten Strukturen. Die Aminosäuren sind in zwei Domänen organisiert (Abbildung 3-8). Die N-terminale katalytische Domäne weist eine fünfblättrige β -Propeller (*five-blade β -propeller*) Topologie auf, die sich über die Residuen 3 bis 318 erstreckt, und eine C-terminale Domäne mit β -sandwich Faltung (Residuen 330-535). Beide Domänen sind mit einem 11 Aminosäuren langen Linker verbunden (Residuen 319-329). Die Strukturen des Wildtyps sowie die der drei katalytisch inaktiven Mutanten zeigen eine identische Struktur und unterscheiden sich ausschließlich in den ausgetauschten Aminosäuren. Eine Überlagerung der Strukturen der 3 katalytischen inaktiven Mutanten, jeweils mit dem Wildtyp, ergibt eine mittlere RMS-Abweichung der C α -Atome von 0,226 Å für die E187G Mutante, 0,177 Å für die D15G und 0,157 Å für die D128G Mutante. Diese Abweichungen werden durch geringe konformationelle Unterschiede der Moleküle verursacht. Die Regionen, in denen die Unterschiede lokalisiert sind, befinden sich zumeist in Oberflächenloops oder anderen flexiblen Bereichen des Proteins. Auch beim Vergleich des Wildtyps der tetragonalen Raumgruppe mit der Struktur der selenomethionin-derivatisierten XynB3 der orthorhombischen Kristallform sind keine grundlegenden konformationellen Unterschiede festzustellen. Die RMS-Abweichung der C α -Atome liegt bei 0.449 Å. Im folgenden wird deshalb die Struktur nur eines XynB3-Moleküls im Detail beschrieben. Sofern nicht gesondert erwähnt, kann das beschriebene auf die Strukturen aller Mutanten und Derivate übertragen werden.

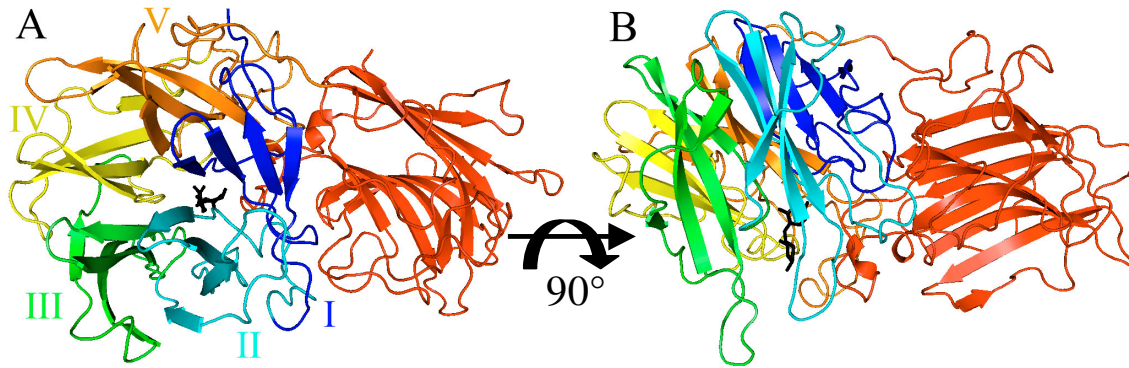


Abbildung 3-8: Die Faltung des XynB3-Monomers als Banddiagramm. Das Enzym ist aus zwei verschiedenen Blickwinkeln zu sehen, die durch eine horizontale Rotation um 90° entlang der x-Achse zueinander in Beziehung stehen. Die fünf Flügel des β -Propellers sind dunkelblau (erster), cyan (zweiter), grün (dritter), gelb (vierter) und orange (fünfter) eingefärbt. Die β -sandwich Domäne ist rot gefärbt. Das im aktiven Zentrum gebundene Substratmolekül Xylobiose ist schwarz eingefärbt.

3.9.1 Die katalytische fünfblättrige β -Propeller Domäne

Eine *five-blade β -propeller* Faltung wurde zuerst für Tachylektin aus dem japanischen Pfeilschwanzkrebs (*Tachypleus tridentatus*) beschrieben (Beisel et al. 1999) und wurde auch in den Enzymen α -L-Arabinanase aus *Cellvibrio japonicus* (Nurizzo et al. 2002) und Invertase aus *Thermotoga maritima* (Alberto et al. 2004) beobachtet. Die fünf Flügel des Propellers sind kreisförmig angeordnet und bilden auf beiden Seiten jeweils in der Mitte des Kreises eine Grube. In einer dieser beiden Gruben liegt die katalytische Region. Wie in allen bisher bekannten β -Propeller Strukturen sind die β -Faltblätter derart stark verdreht, dass zwischen erstem und letztem Blatt eines Flügels ein Winkel von 90° besteht.

3.9.2 Die C-terminale β -sandwich Domäne

Die C-terminalen Residuen 329 bis 535 der XynB3 bilden eine eigenständige β -sandwich Domäne aus (Abb. 3-9). Sie besteht aus zwei Blättern mit fünf bzw.

sechs antiparallelen β -Faltblättern. Diese Domäne ist über einen aus 11 Aminosäure bestehenden Linker mit der N-terminalen katalytischen Domäne verbunden.

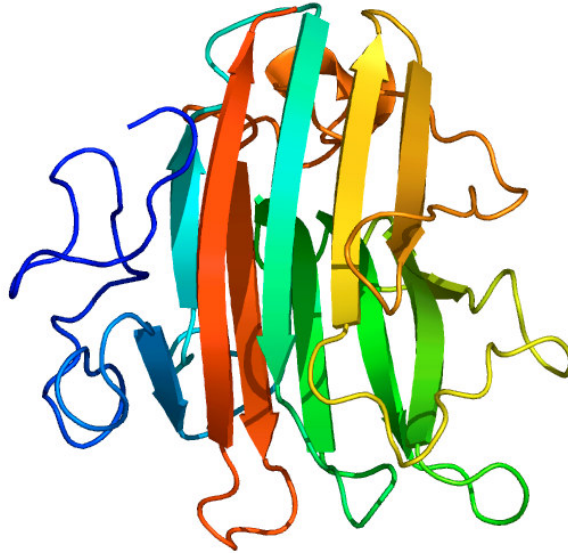


Abbildung 3-9: Faltung der β -sandwich Domäne. Die β -sandwich Domäne ist als Banddiagramm dargestellt. Die Sekundärstrukturelemente sind mit gleitenden Übergängen von blau (N-Terminus) über grün und gelb nach rot (C-Terminus) eingefärbt.

Ein Strukturvergleich der β -sandwich Domäne mit anderen β -sandwich Strukturen, mittels des Programms DALI (Holm & Sander 1994), zeigt eine Ähnlichkeit zur β -sandwich Domäne der Sialidase aus *Trypanosoma rangeli* (PDB Eintrag: 1MZ5; DALI z-score:10,9). Die Struktur der Sialidase weist ebenfalls eine *five-blade β -propeller* Faltung auf, welche die katalytische Aktivität vermittelt. Bei der Sialidase aus *Trypanosoma rangeli* ist keine katalytische Funktion der β -sandwich Domäne bekannt (Buschiazzo et al. 2000).

Die nächste vergleichbare β -sandwich Struktur, die keine gemeinsame Propellerfaltung aufweist, ist die Struktur der 1,4- β -D-glucan-1,4-galactosyltransferase I, eine Cellulase aus dem Pilz *Trichoderma reesei* (Divne et al., 1994; PDB Eintrag: 1CEL, DALI z-score 8.4). Bei diesem Enzym hat die β -sandwich Struktur eine katalytische Cellulase-Funktion.

Die Funktion der β -sandwich Domäne der XynB3 war vor dieser Arbeit unbekannt. Sollte sie jemals über eine katalytische Funktion verfügt haben, so hat sie ihre katalytische Aktivität im Laufe der Evolution verloren. Es wäre

3 Ergebnisse und Diskussion

möglich, dass die β -sandwich Domäne der XynB3 aus *Geobacillus stearothermophilus* im Verlauf der Evolution erhalten blieb, um die Faltung des gesamten Enzyms bei hohen Temperaturen zu gewährleisten. Alberto et al. schlug eine derartige Funktion für die β -sandwich Domäne der Invertase aus *Thermotoga maritima* vor (Alberto et al. 2004). Die Verteilung der Temperaturfaktoren der XynB3 sprechen für diese Hypothese. In Abbildung 3-10 ist die Verteilung der Temperaturfaktoren des XynB3-Wildtyps über alle C α -Atome dargestellt. Neben der für ein Protein normalen Verteilung der Temperaturfaktoren mit etwas höheren Faktoren für an der Oberfläche des Proteins gelegene Loopregionen ist zu erkennen, dass der C-terminale Bereich des Proteins (Residuen 330-535), der die β -sandwich Domäne bildet, deutlich geringere Temperaturfaktoren aufweist, als die N-terminal gelegene katalytische Domäne (Residuen 3-318).

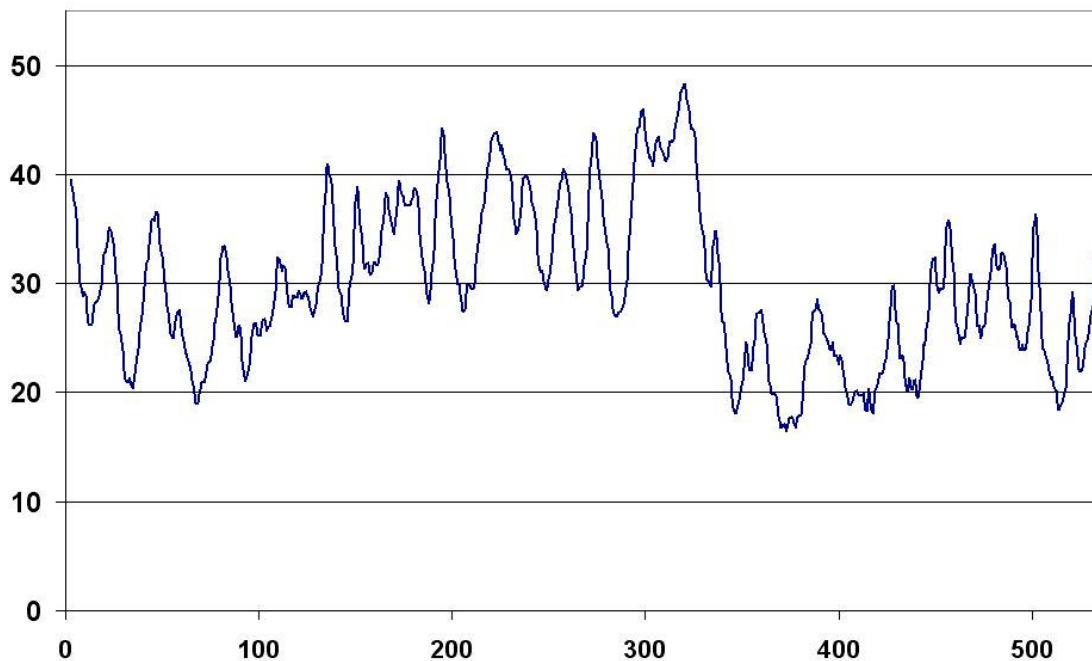


Abbildung 3-10: Verteilung der Temperaturfaktoren des XynB3-Wildtyps. Dargestellt sind die 533 C α -Atome der Kette A des Wildtyps (X-Achse) und ihre jeweiligen Temperaturfaktoren (Y-Achse) in Å². Zu erkennen ist, dass die C-terminale β -sandwich Domäne (Residuen 330-535) im Durchschnitt geringere Temperaturfaktoren als die N-terminale katalytische Domäne aufweist.

Der durchschnittliche Temperaturfaktor der N-terminalen, katalytischen Domäne beträgt etwa $32,6 \text{ \AA}^2$, während der Temperaturfaktor der β -sandwich Domäne nur $24,8 \text{ \AA}^2$ beträgt. Dieser Unterschied in den durchschnittlichen Temperaturfaktoren ist ein Indiz für eine stabilere Struktur der β -sandwich Domäne und spricht für die Möglichkeit, dass die β -sandwich Domäne zur Stabilität der XynB3 bei höheren Umgebungstemperaturen beiträgt.

Eine weitere bedeutende Funktion der β -sandwich Domäne wird unter Punkt 3.10 näher erläutert. Betrachtet man das Oligomerisierungsverhalten der XynB3, so kann der β -sandwich Domäne eine entscheidende Funktion bei der Aufrechterhaltung der Quartärstruktur zugesprochen werden.

Die β -sandwich Domäne ist ebenso von einer bedeutenden Funktion bei der Substraterkennung. Ein Loop der β -sandwich Domäne (Residuen 494-507) bildet eine Seite des aktiven Zentrums und vermittelt dort, über die bei den Xylosidasen der Familie 43 konservierte Aminosäure Phe506, eine hydrophobe Umgebung im aktiven Zentrum (Abbildung 3-14). Die durch den Loop der β -sandwich Domäne gebildete hydrophobe Seite des katalytischen Zentrums ist für die Substraterkennung von entscheidender Bedeutung (vgl. Punkt 3.17 und 3.18).

3.10 Quartärstruktur

Die Kristallstrukturen zeigten die XynB3 in beiden Kristallformen als ein Homotetramer mit einer 222 Punktsymmetrie. Am besten kann die beobachtete Quartärstruktur als ein Dimer aus zwei Dimeren beschrieben werden (Abbildung 3-12).

3.10.1 Dimerisierung

In Abbildung 3-11 ist der Zusammenschluss zweier Monomere zu einem Dimer gezeigt. Diese beiden Monomere orientieren sich antiparallel zueinander. Die

Bindung der beiden Monomere wird dabei über drei Loopregionen der N-terminalen, katalytischen Domäne stabilisiert. Zwei der drei Loops, die jeweils zum Propellerblatt zwei bzw. drei gehören (vg. Abbildung 3-8), interagieren dabei mit der C-terminalen β -sandwich Domäne des anderen Monomers und umgekehrt. Die dritte Loopregion gehört zu einem Bereich, der die Propellerblätter eins und zwei miteinander verbindet. Dieser interagiert mit dem äquivalenten Bereich des benachbarten Monomers. Die Kontaktfläche zwischen beiden Monomeren beträgt 4003 \AA^2 (Tabelle 3-19).

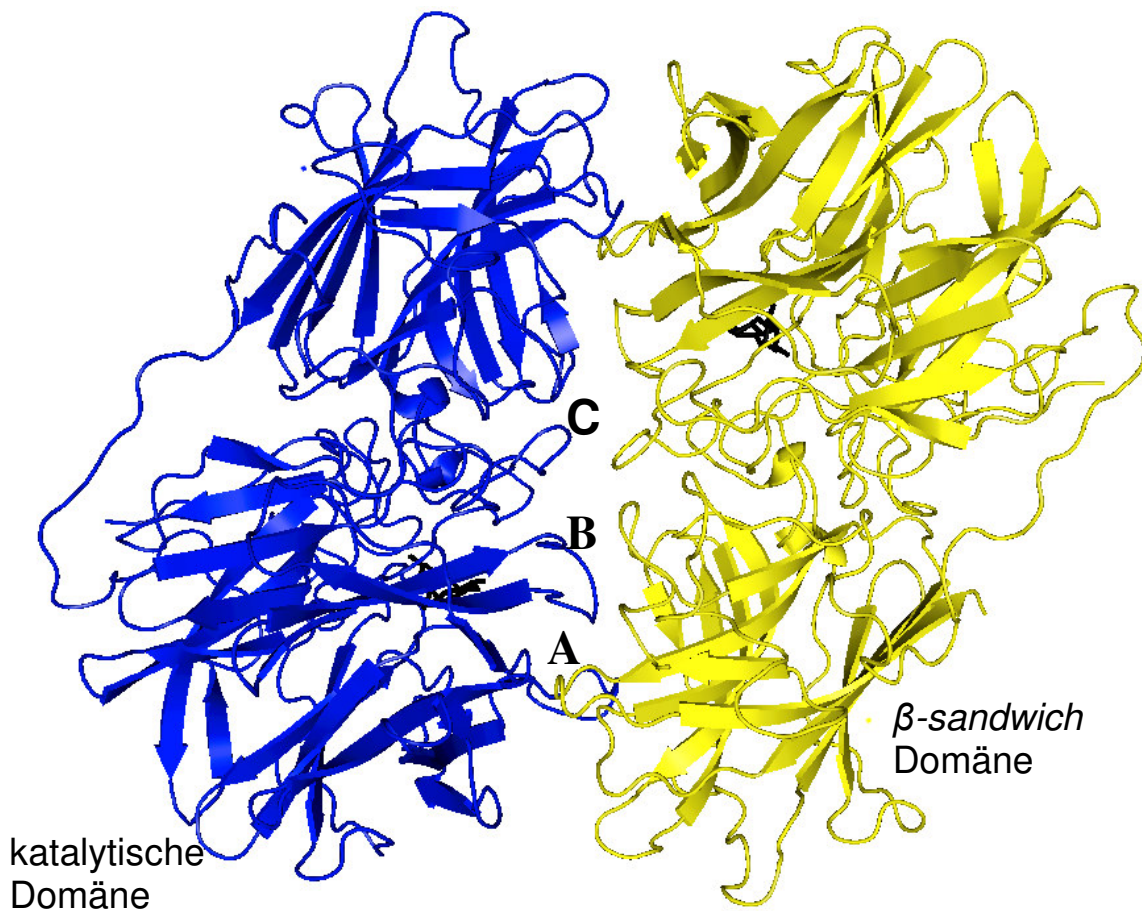


Abbildung 3-11: Interaktion zwischen zwei Monomeren. Zwei Monomere (blau und gelb) lagern sich antiparallel orientiert zueinander. Ihre Bindung wird durch jeweils drei Loopregionen der katalytischen Domänen stabilisiert. Die Loopregionen A und B der katalytischen Domäne interagieren mit der β -sandwich Domäne des benachbarten Monomers. Die Loopregion C interagiert mit der äquivalenten Region des Partnermonomers. Ein in der katalytischen Bindungstasche befindliches Xylobiosemolekül ist schwarz eingefärbt, um die Lage des aktiven Zentrums zu veranschaulichen.

3.10.2 Tetramerisierung

Zwei der oben beschriebenen Dimere (Punkt 3.10.1) lagern sich zusammen und bilden damit die tetramere Quartärstruktur mit einer 222 Punktsymmetrie innerhalb des Proteinkomplexes. Eines der beiden Dimere ist dabei um 90° gegenüber dem anderen gedreht (Abbildung 3-12). Das Tetramer wird vorwiegend durch eine große Loopregion je Monomer stabilisiert. Dieser Loop (Residuen 272 bis 281) ist Teil des fünften Propellerblattes der N-terminalen, katalytischen Domäne. Er ragt deutlich aus der Struktur des *five-blade* β -*propellers* heraus. Dabei interagieren diese Loops mit einer Region zwischen viertem und fünftem Propellerblatt (Residuen 180-185) des Nachbardimers. Die β -*sandwich* Domäne spielt bei der Stabilisierung des Tetramers keine Rolle. Im Gegensatz zu den ausgeprägten Interaktionen der β -*sandwich* und katalytischer β -Propeller Domäne zweier Monomeren bei der Ausbildung eines Dimers können keinerlei Kontakte der β -*sandwich* Domäne bei Ausbildung der tetrameren Quartärstruktur beobachtet werden (Abbildung 3-13).

Durch das Hervorstehen des Bindungsloops aus der Struktur werden die interagierenden Dimere des Tetramers auf Abstand gehalten. Dadurch bildet sich eine etwa 12-14 Å breite Spalte zwischen den Dimeren. Diese Spalte macht den Kern des Tetramers zugänglich für Substrat und Solventmoleküle.

Die Substratbindungstaschen der vier Monomere weisen alle in Richtung Zentrum des Tetramers (Abbildung 3-13).

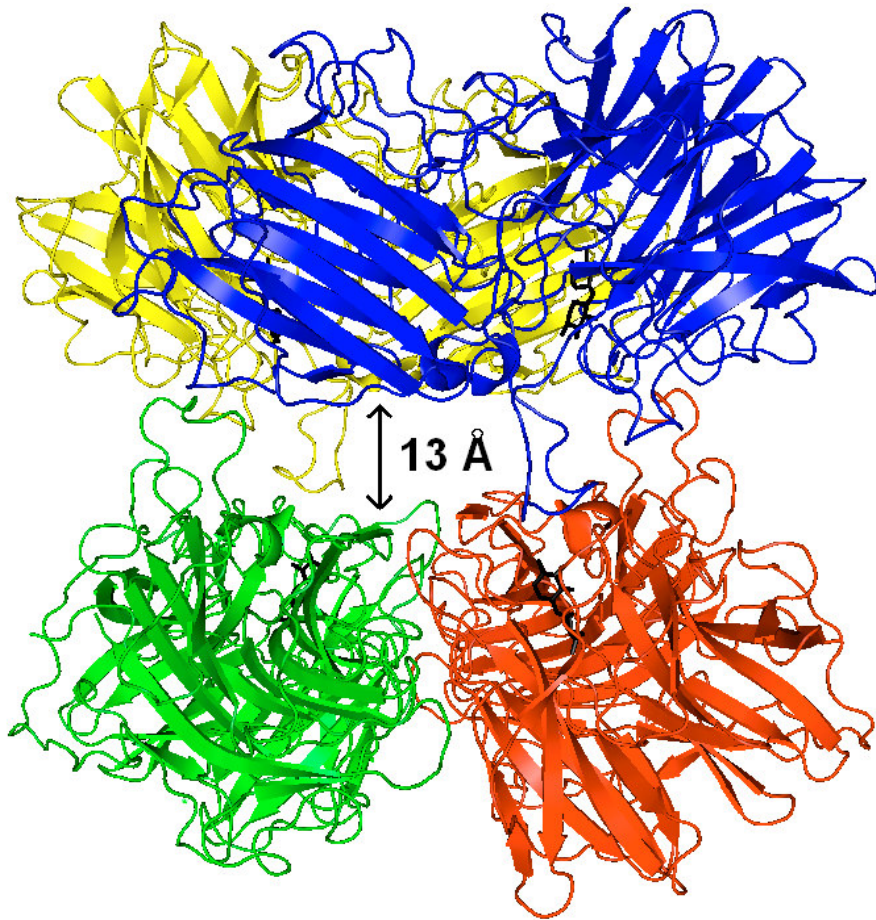


Abbildung 3-12: Quartärstruktur des XynB3-Tetramers. Die das Tetramer bildenden Monomere sind gelb, blau, rot und grün eingefärbt. Zu erkennen ist die 90° Verdrehung der oberen (blau-gelb) dimeren Substruktur zur unteren (rot-grün). Die tetramere Quartärstruktur wird fast ausschließlich über die vier einzelnen Loops der vier katalytischen Propellerdomänen aufrecht erhalten. Da sie deutlich aus den Propellerdomänen herausragen, bildet sich eine ca. 13 Å breite Spalte die den Kern des Tetramers für Substrat und Solvent zugänglich macht.

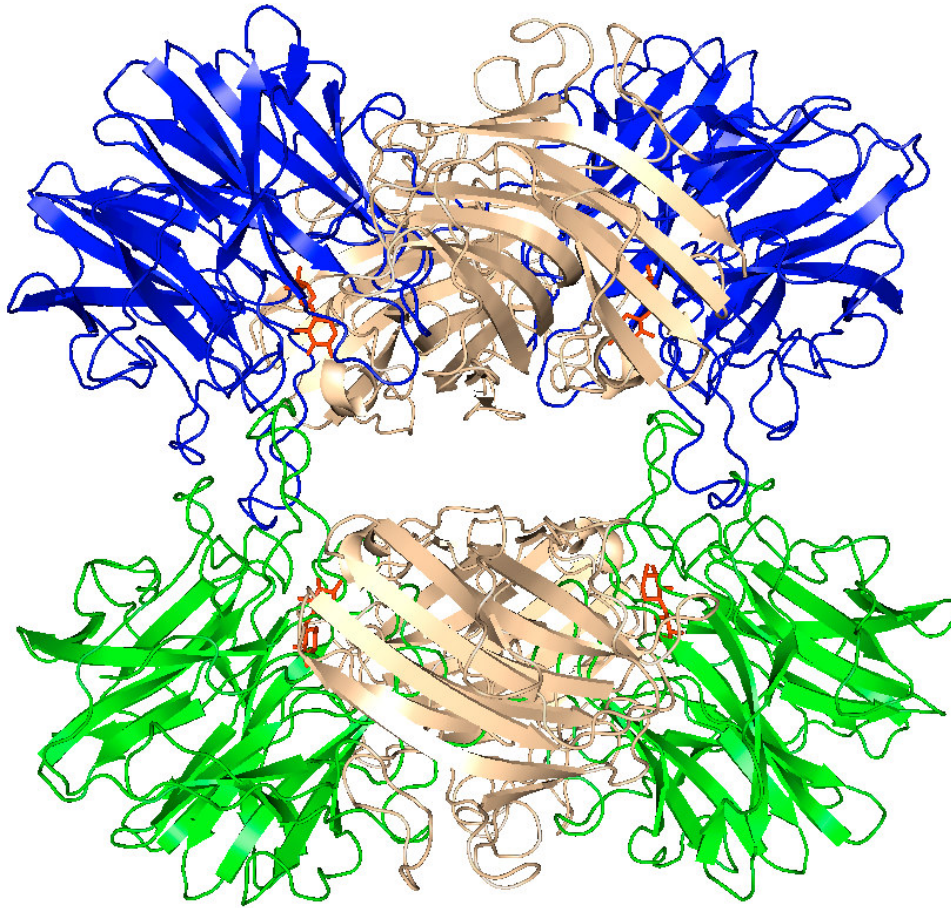


Abbildung 3-13: Quartärstruktur des XynB3-Tetramers. Die N-terminalen katalytischen Domänen sind blau und grün gefärbt, die β -sandwich Domäne sandfarben. In den katalytischen Bindungstaschen befindliche Xylobiosemoleküle sind rot eingefärbt. Die Stabilisierung des tetrameren Holoenzym erfolgt ausschließlich über die N-terminale, katalytische Domäne. Die β -sandwich Domäne spielt bei der Stabilisierung des Tetramers keine Rolle. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Substratbindungstaschen aller vier Monomere im Tetramer in Richtung Kern des Tetramers weisen.

Tabelle 3-19: Berechnung der Kontaktflächen zwischen der Monomerkette A und den Ketten B, C und D sowie die Kontaktfläche der Dimere der Ketten A & D und der Ketten B & C. Die Kontaktflächen wurden mit der "buried_surface" Methode des Programms CNS_solve (Brunger & Warren 1998) berechnet. In der letzten Spalte ist die Differenz der Einzeloberflächen zur Oberfläche des jeweiligen Komplexes aufgelistet. Sie ist gleichbedeutend mit der Kontaktfläche zwischen den jeweiligen Monomerketten.

	gesamte Oberfläche Molekül 1	gesamte Oberfläche Molekül 2	gesamte Oberfläche des Komplexes aus Molekül 1 und 2	Differenz der Einzeloberflächen zur Oberfläche des Komplexes
Kette A zu D (Å²)	20356.2	20358.7	36712.1	4002.85
Kette A zu B (Å²)	20356.2	20448.1	40793.5	10.8
Kette A zu C (Å²)	20356.2	20500.9	39311.9	1545.22
Kette AD zu BC (Å²)	36712.1	36887.4	70464.1	3135.41

3.11 Die native Quartärstruktur - Dimer oder Tetramer ?

In der Kristallstruktur wurde eine tetramere Quartärstruktur der XynB3 beobachtet. Es gibt jedoch Anhaltspunkte, die an der Existenz eines Tetramers *in vivo* zweifeln lassen. Im folgenden Abschnitt werden, die Ergebnisse die jeweils für eine dimere oder eine tetramere Quartärstruktur sprechen, gegenübergestellt und eingehend diskutiert.

Röntgenkristallographische Untersuchungen von Makromolekülen ermitteln zwar die Struktur, doch sind diese Untersuchungen und damit die Ergebnisse nicht frei von Einflüssen der kristallographischen Symmetrie. Dadurch kann es zu Kristallisationsartefakten kommen, bei denen die beobachtete Quartärstruktur im Proteinkristall nicht der Quartärstruktur *in vivo* entspricht (Henrick & Thornton 1998). Dies kann entweder dazu führen, dass in der Kristallstruktur ein geringerer (Czjzek et al. 2005), oder ein höherer (Blaber et al. 1993) Oligomerisierungsgrad beobachtet wird, als er *in vivo* tatsächlich vorliegt.

Der einfachste Weg, die native Quartärstruktur eines Proteins zu überprüfen, ist die Gelfiltrationschromatographie. Diese Technik erlaubt es, im Regelfall die Größe eines Proteins recht gut abzuschätzen. Jedoch geht mit dieser Technik ein großer Fehler einher, da das Laufverhalten eines Proteins auf einer Gelfiltrationssäule nicht nur durch seine Größe sondern auch durch seine Form bestimmt wird. Im Falle der XynB3 wurde die Masse mittels Gelfiltrationschromatographie bestimmt und beträgt ca. 228 kDa. (Punkt 3.1.3). Dieser Wert ist zu klein für ein Tetramer (4x61 kDa), aber auch deutlich zu groß für ein Dimer.

XynB3 wird in dieser Arbeit als ein Tetramer beschrieben, ein Dimer aus Dimeren. Wie oben beschrieben ist der Kontakt, den zwei Monomere bei Bildung eines Dimers aufweisen, viel intensiver, als der Kontakt zwischen zwei Dimeren bei Bildung des Tetramers. Die Interfacefläche zwischen den beiden Ketten eines Dimers beträgt ca. 4000 Å², das entspricht 2000 Å² je Kette (Tabelle 3-19). An der Grenzfläche jedes Dimers partizipieren eine Vielzahl von Residuen, die sich über die gesamte Länge der interagierenden Monomere erstrecken. Viele der beteiligten Residuenpaare, die die Dimerisierung stabilisieren (z.B. Asp101-Ser371, His103-Glu370, Asp149-Blu427 oder Trp146-Gln404), sind stark konserviert (Abbildung 3-14). Eine starke Konservierung der beteiligten Residuen spricht im Regelfall für eine biologisch begründete Interaktion und gegen ein kristallographisches Artefakt (Elcock & McCammon 2001).

							10							20						30											
XynB3	-	M	A	K	I	K	N	P	I	L	T	G	F	H	P	D	P	S	I	C	R	V	G	D	D	Y	Y	I	A	V	
1Y1F	-	-	M	K	I	T	N	P	V	L	K	G	F	N	P	D	P	S	I	C	R	A	G	E	D	Y	Y	I	A	V	
1Y7B	-	M	S	L	I	K	N	P	I	L	R	G	F	N	P	D	P	S	I	C	R	A	D	T	D	Y	Y	I	A	T	
1YRZ	M	V	N	R	I	Q	N	P	I	L	P	G	F	H	P	D	P	S	I	V	R	V	G	D	D	Y	Y	I	A	T	
	M	m	X	X	I	X	N	P	i	L	X	G	F	X	P	D	P	S	I	c	R	X	g	X	D	Y	Y	I	A	X	
							40													50									60		
XynB3	S	T	F	E	W	F	P	G	V	R	I	Y	H	S	K	D	L	K	N	W	R	L	V	A	R	P	L	N	R	L	
1Y1F	S	T	F	E	W	F	P	G	V	Q	I	H	H	S	K	D	L	V	N	W	H	L	V	A	H	P	L	Q	R	V	
1Y7B	S	T	F	E	W	F	P	G	V	Q	I	H	H	S	K	D	L	V	N	W	H	L	V	A	H	P	L	N	R	T	
1YRZ	S	T	F	E	W	F	P	G	V	R	I	H	H	S	R	D	L	K	H	W	R	F	V	S	S	P	L	T	R	T	
	S	T	F	E	W	F	P	G	V	X	I	n	H	S	k	D	L	X	n	W	X	I	V	a	X	P	L	X	R	X	

3 Ergebnisse und Diskussion

XynB3
1Y1F
1Y7B
1YRZ

S	Q	L	N	M	I	G	N	P	D	S	G	G	V	W	A	P	H	L	S	Y	S	D	G	K	F	W	L	I	Y
S	Q	L	D	M	K	G	N	P	N	S	G	G	V	W	A	P	C	L	S	Y	S	D	G	K	F	W	L	I	Y
S	L	L	D	M	K	G	N	P	N	S	G	G	I	W	A	P	D	L	S	Y	H	D	G	K	F	W	L	I	Y
S	Q	L	D	M	K	G	N	P	N	S	G	G	I	W	A	P	C	L	S	Y	H	D	G	K	F	W	L	I	Y

S q L d M k G N p n S G G X W A P X L S Y X D G K F w L I Y

XynB3
1Y1F
1Y7B
1YRZ

T	D	V	K	V	V	E	G	Q	W	K	D	G	H	N	Y	L	V	T	C	D	T	I	D	G	A	W	S	D	P
T	D	V	K	V	V	D	G	A	W	K	D	C	H	N	Y	L	V	T	C	E	T	I	N	G	D	W	S	E	P
T	D	V	K	V	T	D	G	M	W	K	D	C	H	N	Y	L	T	T	C	E	S	V	D	G	V	W	S	D	P
T	D	V	K	Q	W	H	G	A	F	K	D	A	H	N	Y	L	V	T	A	Q	N	I	E	G	P	W	S	D	P

T D V K v X X G X w K D X H N Y L v T c X X i X G X W S d P

XynB3
1Y1F
1Y7B
1YRZ

I	Y	L	N	S	S	G	F	D	P	S	L	F	H	D	E	D	G	R	K	Y	L	V	N	M	Y	W	D	H	R
I	K	L	N	S	S	G	F	D	A	S	L	F	H	D	T	D	G	K	K	Y	L	L	N	M	L	W	D	H	R
I	T	L	N	S	S	G	F	D	A	S	L	F	H	D	N	D	G	K	K	Y	L	V	N	M	Y	W	D	Q	R
I	Y	L	N	S	S	G	F	D	P	S	L	F	H	D	D	D	G	R	K	W	L	V	N	M	I	W	D	Y	R

I X L N s S G F D X S L F H D X D G X K y L v N M X W D X R

XynB3
1Y1F
1Y7B
1YRZ

V	D	H	H	P	F	Y	G	I	V	L	Q	E	Y	S	V	E	Q	K	K	L	V	G	E	P	K	I	I	F	K
I	D	R	H	S	F	G	G	I	V	I	Q	E	Y	S	D	K	E	Q	K	L	I	G	K	P	K	V	I	F	E
T	Y	N	H	N	F	Y	G	I	V	L	Q	E	Y	S	D	K	E	K	K	L	I	G	K	A	K	I	I	Y	K
K	G	N	H	P	F	A	G	I	I	L	Q	E	Y	S	E	A	E	Q	K	L	V	G	P	V	K	N	I	Y	K

X X X H X F X G I v I Q E Y S X X e X K L X G X X K X I X k

XynB3
1Y1F
1Y7B
1YRZ

G	T	D	L	R	I	T	E	G	P	H	L	Y	K	I	N	G	Y	Y	Y	L	L	T	A	E	G	G	T	R	Y
G	T	D	R	K	L	T	E	A	P	H	L	Y	H	I	G	N	Y	Y	Y	L	L	T	A	E	G	G	T	R	Y
G	T	D	I	K	Y	T	E	G	P	H	L	Y	H	I	G	D	Y	Y	Y	L	F	T	A	E	G	G	T	T	Y
G	T	D	I	Q	L	T	E	G	P	H	L	Y	K	K	D	G	Y	Y	Y	L	L	V	A	E	G	G	T	E	Y

G T D X X X T E g P H I Y X i X X Y Y Y L I t A E G G T X Y

XynB3
1Y1F
1Y7B
1YRZ

N	H	A	A	T	I	A	R	S	T	S	L	Y	G	P	Y	E	V	H	P	D	N	P	L	L	T	S	W	P	Y	
E	H	A	A	T	I	A	R	S	A	N	I	E	G	P	Y	E	V	H	P	D	N	P	I	L	L	T	S	W	H	D
E	H	S	E	T	V	A	R	S	K	N	I	D	G	P	Y	E	I	D	P	E	Y	P	L	L	T	S	W	H	D	
E	H	A	A	T	L	A	R	S	Q	S	I	D	G	P	Y	E	T	D	P	S	Y	P	L	V	T	S	T	G	Q	

e H a a T X A R S X X i X G P Y E X X P X X P I I T S w X X

XynB3
1Y1F
1Y7B
1YRZ

P	R	N	P	L	Q	K	A	G	H	A	S	I	V	H	T	H	T	D	E	W	F	L	V	H	L	T	G	R	P
P	G	N	P	L	Q	K	C	G	H	A	S	I	V	Q	T	H	T	D	E	W	Y	L	A	H	L	T	G	R	P
P	R	N	S	L	Q	K	C	G	H	A	S	L	V	H	T	H	T	D	E	W	Y	L	A	H	L	V	G	R	P
P	E	L	A	L	Q	K	A	G	H	G	S	L	V	E	T	Q	N	G	E	W	Y	L	A	H	L	C	G	R	P

P X n X L Q K X G H a S X V X T h t d E W y L a H L X G R P

XynB3
1Y1F
1Y7B
1YRZ

L	P	R	E	G	Q	P	L	L	E	H	R	G	Y	C	P	L	G	R	E	T	A	I	Q	R	L	E	W	K	D
I	H	P	D	D	S	I	F	Q	Q	R	G	Y	C	P	L	G	R	E	T	A	I	Q	K	L	Y	W	K	D	
L	P	V	G	N	Q	P	V	L	E	Q	R	G	Y	C	P	L	G	R	E	T	S	I	Q	R	I	E	W	V	D
L	K	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	Y	C	T	L	G	R	E	T	A	I	Q	K	V	N	W	T	E

I X X X X q p X I e q R g Y C p L G R E T a I Q X X X W X d

XynB3
1Y1F
1Y7B
1YRZ

G	-	-	W	P	Y	V	V	G	G	N	G	P	S	L	E	I	D	G	P	S	V	E	E	V	S	W	E	K	D
E	-	-	W	P	Y	V	V	G	G	K	E	G	S	L	E	V	D	A	P	S	I	P	E	T	I	F	E	A	T
N	-	-	W	P	R	V	V	G	G	K	Q	G	S	V	N	V	E	A	P	K	I	P	E	V	K	W	E	K	T
D	G	W	L	R	I	E	D	G	G	N	H	P	L	R	E	V	T	A	P	D	L	P	E	H	P	F	E	K	E

X G W w p X v v G G X X X s X e v X a P X X p E X X X E k X

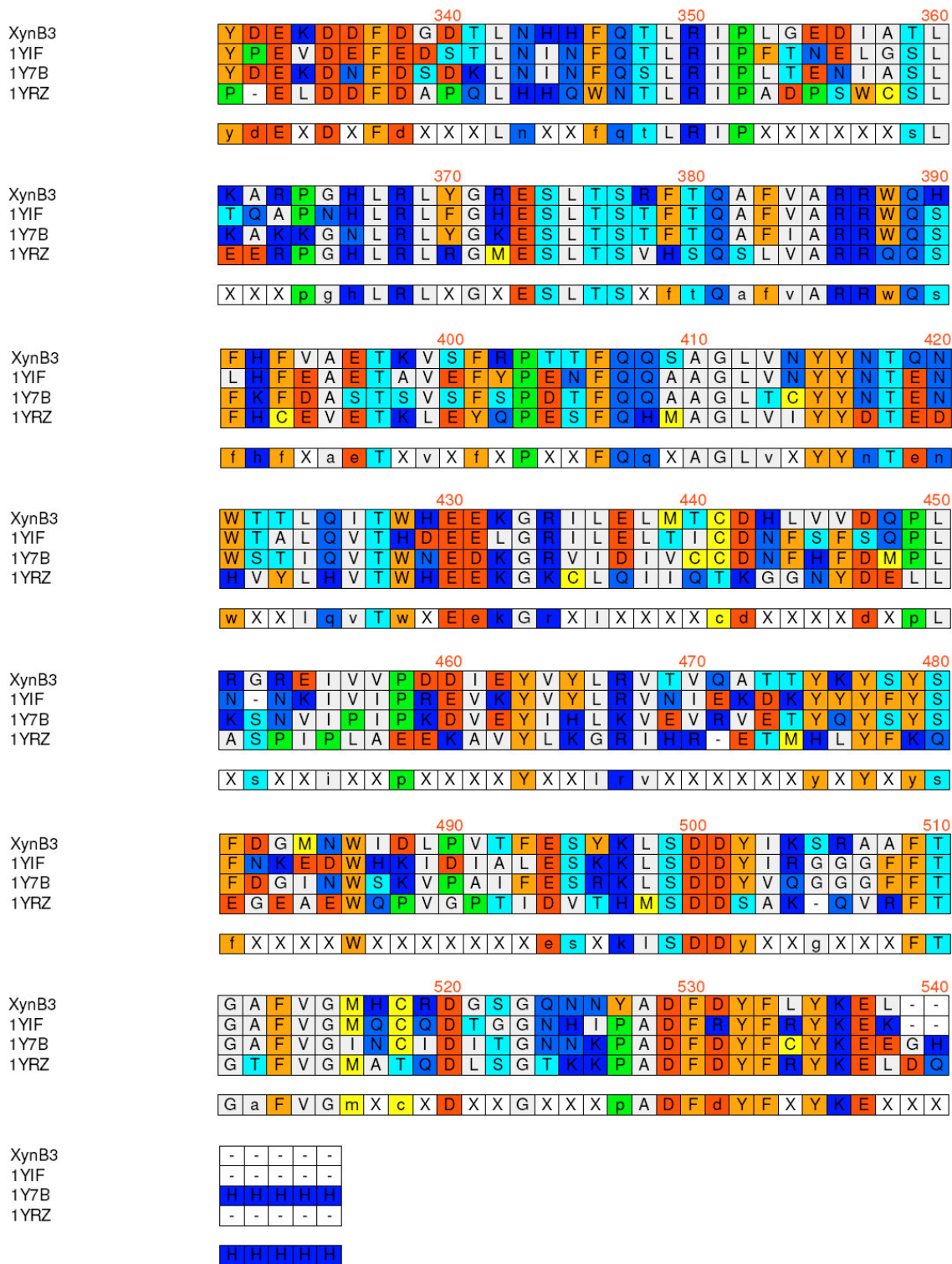


Abbildung 3-14: Sequenzalignments der Xylosidasen aus *Geobacillus stearothermophilus* (XynB3), *Bacillus subtilis* (1YIF), *Clostridium acetobutylicum* (1Y7b) und *Bacillus halodurans* C-125 (1YRZ). Die verschiedenen Aminosäuretypen sind farblich gekennzeichnet. In der untersten Zeile ist die Konsensussequenz dargestellt, die das Erkennen einer konservierten Aminosäure erleichtert. Die Abbildung wurde mit dem Programm DS Gene erstellt (Accelrys).

Im Gegensatz zur großen Kontaktfläche der Dimere beträgt die Interfaceregion des Tetramers in etwa 3135 \AA^2 , das entspricht etwas mehr als 780 \AA^2 pro Monomer (Tabelle 3-19). Wie oben beschrieben, ist an der Tetramerisierung nur ein einziger Loop je Kette beteiligt. Die beteiligten Aminosäuren sind weit weniger konserviert als die Aminosäuren, die an der Dimerisierung beteiligt sind. Dennoch sind gewisse Ähnlichkeiten der beteiligten Aminosäuren im Vergleich der Xylosidasen verschiedener Spezies offensichtlich. In Tabelle 3-20, sind die bei der Tetramerisierung der XynB3 beteiligten Aminosäuren aufgelistet und zu äquivalenten Aminosäuren der Xylosidasen aus *Bacillus subtilis* und *Clostridium acetobutylicum* in Beziehung gesetzt. Die Xylosidasen aus *Bacillus subtilis* und *Clostridium acetobutylicum* werden in der Literatur ebenfalls als Tetramere in der Kristallstruktur beschrieben. Da die Xylosidase aus *Bacillus halodurans C-125* (PDB Eintrag 1YRZ) in der Literatur als Dimer beschrieben wurde, ist sie hier nicht im Vergleich der Ähnlichkeiten, der an der Tetramerisierung beteiligten Aminosäuren, aufgelistet. Der Loopbereich, der für die Tetramerisierung der XynB3 entscheidend ist (Residuen 272-281), fehlt bei der Xylosidase aus *Bacillus halodurans C-125* (Abbildung 3-14).

AS beteiligt in Tetramerisation	AS in 1YIF Sequenz	AS in 1Y7b Sequenz	Vergleich
Asp182	Asp	Asp	gleich
Leu183	Arg	Ile	unterschiedlich / hydrophob
Arg184	Lys	Lys	basisch
Asn210	Asp	Asp	ähnlich
Trp237	Trp	Trp	gleich
Arg241	Gly	Arg	unterschiedlich / gleich
Gly274	Asp	Asn	Interaktion erfolgt über Carboxyl-O; Seitenkette nicht benötigt
Leu277	Ile	Val	hydrophob
Leu278	Phe	Leu	hydrophob
Glu279	Gln	Glu	ähnlich / gleich

Tabelle 3-20: Vergleich der bei der Tetramerisierung beteiligten Aminosäuren (AS) zu äquivalenten Aminosäuren der Xylosidase aus *Bacillus subtilis* (1YIF) und *Clostridium acetobutylicum* (1Y7b).

Um die Möglichkeit einer dimeren Quartärstruktur der XynB3 *in vivo* zu überprüfen, wurde der *Protein Quaternary Structure Server* (PQS) genutzt. Dieser analysiert automatisch alle in der Protein Datenbank PDB eingetragenen Proteine hinsichtlich ihrer möglichen nativen Quartärstruktur. Die Kontaktflächen der Oligomere werden automatisch überprüft, in wieweit es sich um biologische oder um kristallographische Kontakte handelt. Die Quartärstrukturen der Xylosidasen aus *Bacillus subtilis* (1YIF) und *Clostridium acetobutylicum* (1Y7b) wurden von den Erstautoren als Tetramere beschrieben. Die theoretische Analyse des PQS Server kommt jedoch zu dem Schluss, dass in beiden Fällen die Enzyme *in vivo* als Dimere vorliegen sollten. Die tetramere Quartärstruktur wäre demzufolge ein Kristallisationsartefakt. Dies spräche dafür dass die XynB3 ebenfalls als Dimer *in vivo* vorkommt, da die Sequenzidentität zwischen den drei Xylosidasen hoch ist (Tabelle 3-21).

Sequenzvergleich	Sequenzidentität [%]
XynB3 zu 1YIF	65
XynB3 zu 1Y7b	64

Tabelle 3-21: Sequenzidentitäten zwischen der XynB3 und den Xylosidasen aus *Bacillus subtilis* (1YIF) und *Clostridium acetobutylicum* (1Y7b) auf Proteinebene. Alignments wurden mit dem Programm "blastp" gemacht.

Andererseits verwendet der PQS Server einen Schwellenwert von 400 \AA^2 pro Kette, um biologische von kristallografischen Proteinkontakten zu unterscheiden (Henrick & Thornton 1998). Im Falle der XynB3 ist dieser Wert mit 780 \AA^2 pro Kette deutlich überschritten. Demzufolge könnte es sich bei den Proteinkontakten im Tetramer um biologisch begründete Kontakte handeln. Hinzu kommt, dass in der Literatur wird die Fehlerquote des PQS Servers mit 12,5% angegeben (Ponstingl et al. 2000).

Eine Alternative zur theoretischen Berechnung der Quartärstruktur ist der "Protein interfaces, surfaces and assemblies service" PISA am European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html) von E. Krissinel und K. Henrick" kurz PISA Server (Krissinel & Henrick 2005). Dieser berechnet in einem ersten Schritt alle Möglichkeiten eine Oligomerisierung der in der Kristallstruktur enthaltenen Moleküle. In einem zweiten Schritt wird die chemische Stabilität dieser theoretischen Oligomere berechnet.

Die Berechnungen der möglichen Quartärstruktur mit Hilfe des PISA Servers kommen zu dem Resultat, dass sowohl die Xylosidasen aus *Bacillus subtilis* (1YIF) und *Clostridium acetobutylicum* (1Y7b), als auch die Xylosidase XynB3 ein stabiles Tetramer ausbilden können. Dieses Ergebnis widerspricht dem Ergebnis des PQS Servers, der eine tetramere Quartärstruktur der Xylosidasen aus *Bacillus subtilis* und *Clostridium acetobutylicum* revidierte. Im direkten Vergleich der beiden theoretischen Ansätze die Quartärstruktur zu berechnen, sollten die Ergebnisse des PISA Server glaubwürdiger sein, da die dem Server zugrundeliegenden Algorithmen und Suchansätze moderner sind und die Erfolgsquote der korrekten Quartärstruktur-Vorhersage mit 90% über der Erfolgsquote des PQS Servers liegt (Krissinel & Henrick 2005).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass es einige Anzeichen dafür gibt, dass XynB3 *in vivo* als Dimer vorkommt. So sind die an der Tetramerisierung beteiligten Aminosäuren, im Gegensatz zu den Residuen die an der Dimerisierung beteiligt sind, nicht konserviert und die Kontaktfläche des Tetramers ist im Vergleich zur Kontaktfläche des Dimers relativ klein. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass der PQS Server eine tetramere Quartärstruktur für nicht wahrscheinlich hält, obwohl die Kontaktfläche von 780 Å² je Kette deutlich über dem Schwellenwert liegt, den der PQS Server zur Unterscheidung von biologischen und kristallographischer Proteinbeziehung heranzieht.

Allerdings gibt es einige Indizien, die für eine tetramere Quartärstruktur der XynB3 sprechen. Die Ergebnisse der Gelfiltration ergaben eine Masse von 228 kDa, die bedeutend näher an der Masse eines möglichen Tetramers (244 kDa) als an der Masse eines Dimers (122 kDa) liegt. Anhand der Gelfiltration ist daher eine tetramere Quartärstruktur wahrscheinlicher als eine dimere. Die Aminosäuren, die an der Tetramerisierung beteiligt sind, zeigen Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Spezies (Tabelle 3-20). Eine theoretische Berechnung der Quartärstruktur mit Hilfe des PISA Servers kommt zu dem Ergebnis, dass eine tetramere Quartärstruktur chemisch stabil und sehr wohl möglich ist. Hinzu kommt, dass die Xylosidase aus *Bacillus subtilis* in Raumgruppe P12₁1 und die Xylosidase aus *Clostridium acetobutylicum* in Raumgruppe P2₁2₁2₁ kristallisiert wurde (Patskovsky & Almo 2005, Teplyakov et al. 2005). In dieser Arbeit wurde die Xylosidase XynB3 in den Raumgruppen P4₃2₁2 und P2₁2₁2 kristallisiert. In allen vier Fällen wurde eine tetramere Quartärstruktur beobachtet. Es scheint unwahrscheinlich, dass in vier unterschiedlichen Kristallpackungen sich stets ein artifizielles Tetramer aus zwei Dimeren bildet, vor allem, da bei allen drei Quartärstrukturen die Dimere jeweils gleich zueinander angeordnet sind. (Abbildung 3-15).

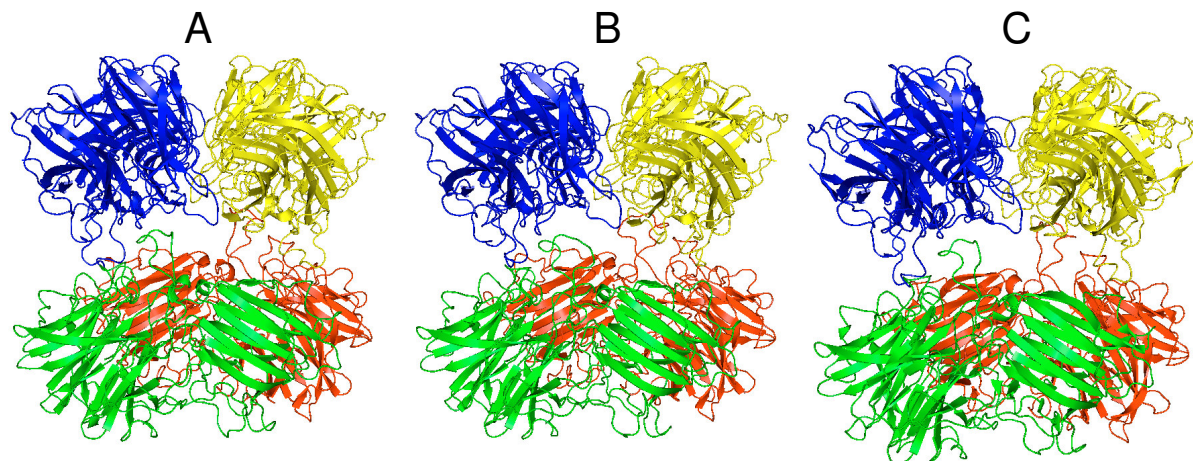


Abbildung 3-15: Gezeigt sind die drei Quartärstrukturen der Xylosidasen aus *Geobacillus stearothermophilus* (A), *Bacillus subtilis* (B) und *Clostridium acetobutylicum* (C). Die jeweils vier Ketten der Tetramere sind blau, gelb, rot und grün gefärbt. Zu erkennen ist die ähnliche Koordination der vier Monomere im Tetramer die in allen drei Strukturen aus vier verschiedenen Kristallpackungen identisch ist.

Die Ergebnisse der Gelfiltrations- und Strukturuntersuchungen sprechen dafür, dass die XynB3 *in vivo* tatsächlich als Tetramer vorliegt. Es ist möglich, dass sich die XynB3 gerade auf einem evolutionären Zwischenschritt zwischen Dimer und Tetramer befindet. Dies könnte die relativ geringe Konservierung, der an der Tetramerisierung beteiligten Aminosäuren erklären.

Betrachtet man die phylogenetische Beziehung zwischen den Xylosidasen aus *Geobacillus stearothermophilus* (XynB3), *Bacillus subtilis* (1YIF), *Clostridium acetobutylicum* (1Y7B) und *Bacillus halodurans* (1YRZ) so wird die evolutive Verwandtschaft der ersten drei sowie die Außenseiterstellung der Xylosidase aus *Bacillus halodurans* deutlich (Abbildung 3-16).

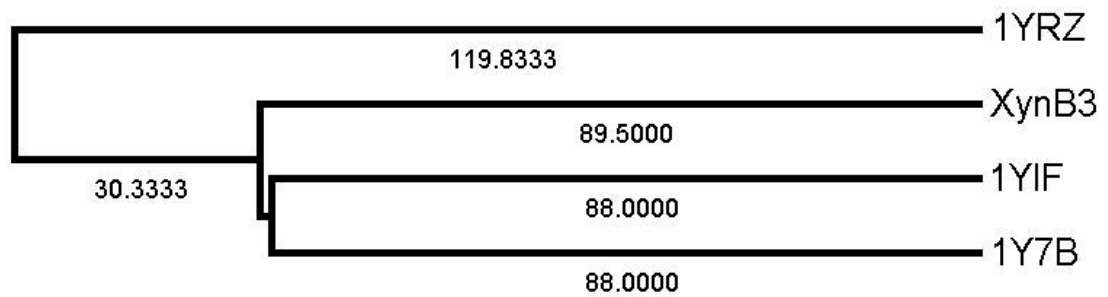


Abbildung 3-16: Phylogenetischer Stammbaum der Xylosidasen aus *Geobacillus stearothermophilus* (XynB3), *Bacillus subtilis* (1YIF), *Clostridium acetobutylicum* (1Y7B) und *Bacillus halodurans* (1YRZ). Verwandtschaftsbeziehung wurde mit dem Programm DS Genes (Accelrys) berechnet.

Der phylogenetische Abstand zwischen der Xylosidase aus *Bacillus halodurans* zu den anderen Xylosidasen ist eine mögliche Erklärung für den unterschiedlichen Oligomerisierungszustand, der bei der Xylosidase aus *Bacillus halodurans* beobachtet werden kann. Diese ist in der Kristallstruktur als Dimer beschrieben, während die Xylosidasen aus *Bacillus subtilis* und *Clostridium acetobutylicum* als Tetramere beschrieben wurden.

3.11.1 Zusammenfassung der Quartärstruktur

Das Enzym XynB3 ist nach den vorliegenden Ergebnissen ein Tetramer, dessen Quartärstruktur sich am besten als ein Dimer aus Dimeren beschreiben lässt. Der Kontakt zwischen zwei Monomeren im Dimer ist sehr intensiv. Die *β-sandwich* Domäne spielt dabei eine entscheidende Rolle. Die Interaktion zwischen zwei Dimeren zum Tetramer wird vorwiegend über einen Loop der katalytischen Domäne vermittelt. Dieser ragt deutlich aus der katalytischen Domäne hervor und funktioniert wie ein Abstandhalter zwischen den beiden Dimeren. Daraus resultiert eine Furche zwischen den Dimeren, die den Kern des Tetramers und damit die Substratbindungstaschen zugänglich macht.

3.12 Analyse des Metallatoms

Ein erstes Indiz für ein mögliches Metallatom in der Struktur der XynB3 gab ein Fluoreszenzspektrum eines selenomethionin-derivatisierten Proteins am BESSY Synchrotron (Berlin).

Neben dem erwarteten Signal des Selen konnte ein weiteres Signal gemessen werden, welches sich, bei anschließenden Messungen bei 9670 eV als Zinksignal herausstellte (Abbildung 3-17).

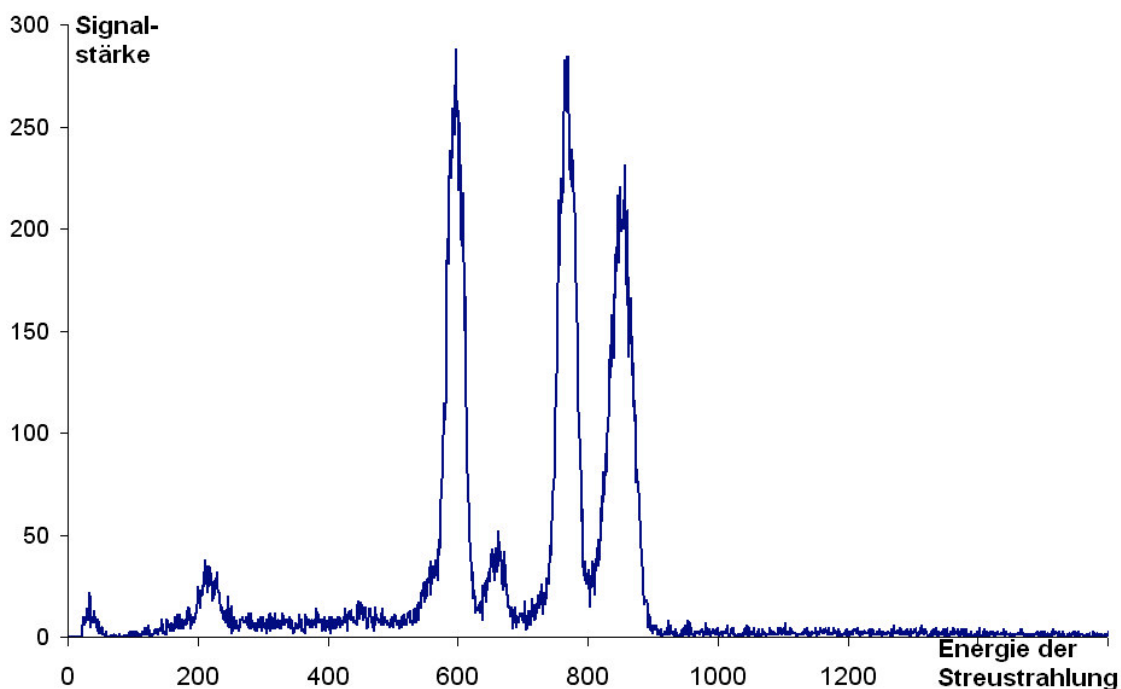


Abbildung 3-17: Fluoreszenzscan des selenomethionin-derivatisierten Proteinkristalls. Die eingesetzte Energie betrug 10.000 eV. Neben dem zu erwartenden beiden Signalpeaks für das im Protein enthaltene Selen (rechts), kann man deutlich ein weiteres Signal erkennen (links). Weitere Untersuchungen identifizierten dies als Zinksignal.

Im Verlauf der Strukturverfeinerung konnte bei allen XynB3-Strukturen im Bereich der Aminosäuren Asp333, Gly362 und Asp528 eine intensive Elektronendichte beobachtet werden, welche nicht durch Kristallwasser erklärt werden konnte. Alles deutet darauf hin, dass sich dort ein Metallatom in der Struktur befindet. Die fluoreszenzspektroskopische Messung am BESSY Synchrotron deutete auf ein Zink als Metallatom hin.

Koordiniert wird dieses Metallatom in der Struktur durch die Sauerstoffatome der Seitenketten Asp333 und Asp528 sowie die Sauerstoffatome der Carboxylgruppen der Aminosäuren Asp333, Asp528 und Gly362. Diese Art der Koordinierung wäre für ein Zinkion äußerst ungewöhnlich. Vergleichsstudien zeigten, dass Zink in Proteinen im Regelfall über Histidin- oder Cysteinreste koordiniert wird (Harding, 2004). Weitere - an nativen und selenomethionin-derivatisierten Kristallen gemessene - Fluoreszenzspektren (EMBL- bzw. BESSY-Synchrotron) ergaben keine weiteren Fluoreszenzsignale für Zink. Mit Hilfe von Prof. Dr. Jung und Dr. Czybulka vom Institut für Anorganischen Chemie der Universität zu Köln, wurde ein EDX-Spektrum der XynB3-Kristalle aufgenommen. Dies zeigt deutlich, dass sich kein Zink in der XynB3-Probe befand (Abbildung 3-18).

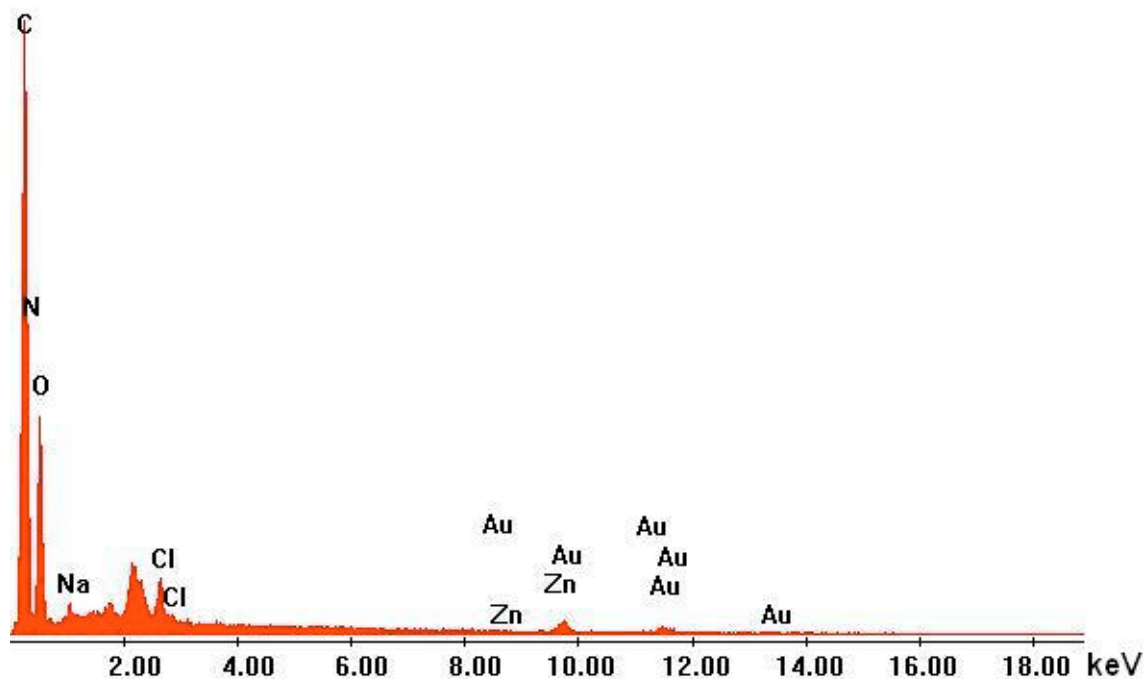


Abbildung 3-18: EDX-Spektrum einer Probe aus XynB3 Kristallen. Es ist kein Signal für Zink erkennbar. Die Gold Signale stammen von der Beschichtung bei der Probenvorbereitung.

Zieht man statistische Untersuchungen über die Verteilung der in Proteinen vorkommenden Metallatome und über Aminosäuren, die die Metallatome koordinierenden, zu Rate (Tabelle 3-22) (Harding 2004), so ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dem im Protein befindlichen Metallatom um

3 Ergebnisse und Diskussion

Kalzium handelt. Die Struktur der Xylosidasen β -D-Xylosidase aus *Clostridium acetobutylicum* (PDB Eintrag 1Y7b) (Teplyakov et al. 2005) weist an identischer Stelle der Struktur ebenfalls ein Kalziumatom auf.

	D,N	E,Q	S,T	H	C	M	K,R	Y	Hauptk. O	gesamt
Ca	339	127	34	3	-	-	-	1	309	813
Mg	88	42	38	3	-	-	1	2	54	228
Mn	51	30	3	22	1	-	-	-	6	113
Fe	12	30	-	60	18	3	-	5	7	134
Cu	2	3	3	77	26	10	-	1	4	126
Zn	63	50	1	179	206	1	3	-	10	517
Na	22	12	6	-	-	-	1	-	93	135
K	16	17	18	-	-	-	-	-	79	130

Tabelle 3-22: Anzahl der verschiedenen Aminosäureseitenketten, die an der Koordination diverser Metallatome in Proteinen beteiligt sind (jeweils im Ein-Buchstaben-Code angegeben). Hauptk. O steht für das Carbonyl-Sauerstoffatom der Proteinhauptkette. Diese Tabelle wurde der Veröffentlichung von Harding (2004) entnommen.

Die beobachteten Bindungslängen zwischen dem Metallatom und den koordinierenden Proteinatomen liegen im Bereich von 2,22 und 2,48 Å mit einer mittleren Bindungslänge von 2,37 Å (Abbildung 3-19). Vergleicht man die in der Literatur beschriebenen Bindungslängen für diverse Metallatome, so findet man für Kalzium eine mittlere Bindungslänge von 2,36 Å, für Zink 2,04 Å und für Magnesium 2,26 Å (Harding, 2001). Auch die Anzahl von 7 Koordinationspartnern entspricht dem aus statistischen Untersuchungen erwartetem Wert für Kalzium. Magnesium hat meist 6, Zink meist 4 Koordinationspartner (Harding, 2001).

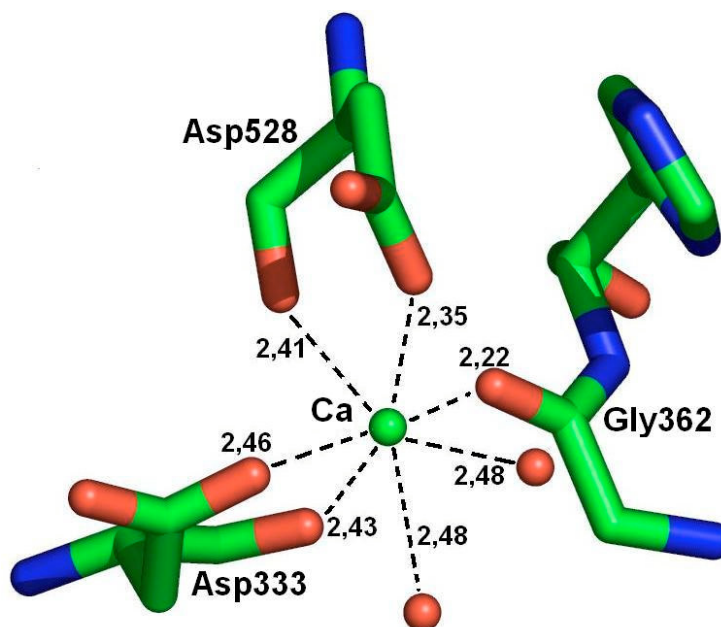


Abbildung 3-19: Koordination des Kalzium. Das Kalziumatom (Ca) (grün) wird koordiniert über die Seitenketten und Carboxyl-Sauerstoffe der Aminosäuren Asp333 und Asp528 sowie über das Carboxyl-Sauerstoff der Aminosäure Gly362, sowie über zwei Wassermoleküle (rot dargestellt). Die Bindungslängen zu den Koordinationspartnern sind in Angstrom (Å) angegeben.

Das beobachtete Metallatom in der Struktur wird hier als Kalzium identifiziert. Das beobachtete Zinksignal im Fluoreszenzspektrum, trat nur bei einem einzigen Kristall auf. Bei keinem der anderen Fluoreszenzspektren konnte jemals wieder ein Zinksignal beobachtet werden. Es ist denkbar, dass das beobachtete Zinksignal des Fluoreszenzspektrums auf eine mit zinkhaltiger Lösung verunreinigten Cryoloop zurück zu führen ist.

Das Kalzium liegt in der Struktur an der Außenseite der N-terminalen β -sandwich Domäne, fernab dem aktiven Zentrum (Abbildung 3-20). Es ist weder in der Katalyse, noch in der Stabilisierung der Quartärstruktur beteiligt. Es scheint unwahrscheinlich, dass es eine Relevanz für Funktion oder Struktur des Enzyms hat.

Weder der Proteinpuffer, noch der Kristallisationspuffer enthielt Kalzium oder andere Metalle außer Natrium. Eine artifizielle Kalziumbindung, die auf die kristallographischen Bedingungen zurück zu führen ist, scheint daher unwahrscheinlich, da Kalzium in den Kristallisationsbedingungen nicht oder nur in marginalen Spuren vorlag. Trotzdem wurde ein Kalzium in allen Ketten aller

Strukturen beobachtet. Dies deutet darauf hin dass die Bindung des Kalziums in der Struktur der XynB3 spezifisch ist.

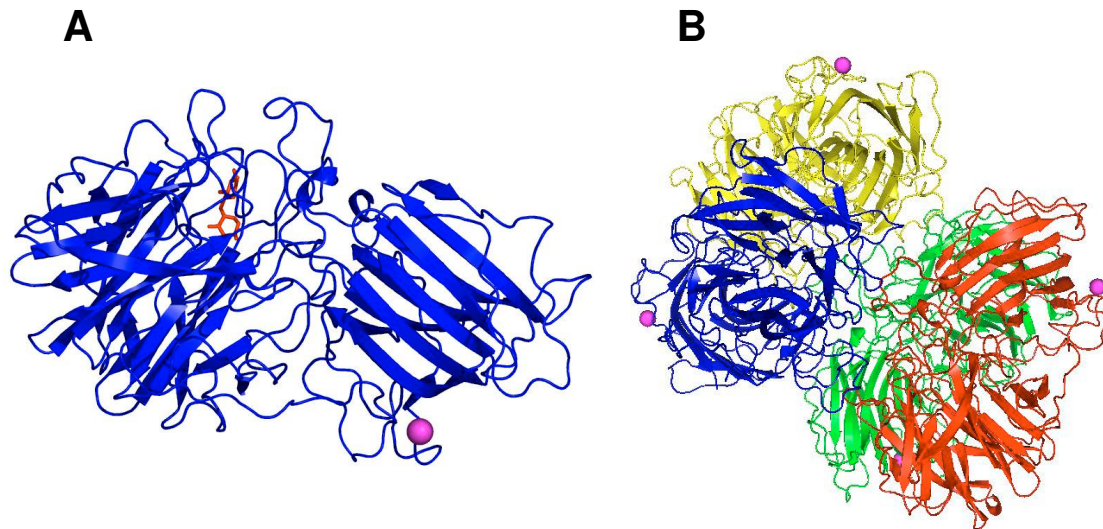


Abbildung 3-20: Lage des Metallatoms in der Tertiär- und Quartärstruktur.

A: Das Ca-Ion ist in magenta eingefärbt und als übergroße Kugel dargestellt. Es liegt an der Oberfläche der β -sandwich Domäne fernab des aktiven Zentrums. Das Substrat Xylobiose im aktiven Zentrum ist in rot gefärbt. B: In der Quartärstruktur liegen die Ca-Ionen an der Außenseite des Tetramers. Sie haben keinen offensichtlichen Einfluss bei der Aufrechterhaltung der Quartärstruktur.

3.13 Die Struktur des aktiven Zentrums

Bei Glykosidasen können drei Arten von Topologien des aktiven Zentrums beobachtet werden. Dies ist unabhängig davon, ob es sich um invertierende oder retinierende Glykosid-Hydrolasen handelt (Davies & Henrissat 1995). Die sogenannte *pocket* oder *crater* Topologie (deutsch: Tasche oder Krater) wird häufig bei Enzymen beobachtet, die nicht-reduzierende Enden von Poly- oder Oligosaccharidketten erkennen. Sie zeichnet sich durch eine grubenähnliche Struktur aus, bei der es nur einen Zugang zum aktiven Zentrum gibt. Meist sind Glykosid-Hydrolasen, welche eine *pocket*- oder *crater*- Topologie aufweisen, Exoglykosidasen (Davies & Henrissat 1995).

Eine andere häufig beobachtete Topologie des aktiven Zentrums ist die *cleft* oder *groove* Topologie (deutsch: Spalte oder Furche). Diese "offene" Struktur ermöglicht die Bindung einer längeren polymeren Saccharidkette. Diese Art der

Topologie wird meist in Endoglykosidasen, welche in der Mitte einer Polysaccharidkette hydrolysieren können, beobachtet.

Die dritte beobachtete Topologie des aktiven Zentrums bei Glykosidasen wird als Tunneltopologie bezeichnet. Diese Topologie wird als eine Modifizierung der *groove* Struktur beschrieben, bei der eine verlängerte Loopregion das aktive Zentrum bedeckt und somit ein Tunnel gebildet wird, in dessen Inneren das aktive Zentrum liegt. Diese Struktur des aktiven Zentrums wird seltener als die anderen beiden beobachtet und wurde in der Glykosid-Hydrolase-Familie 43, zu der XynB3 gehört, noch nicht beschrieben.

Betrachtet man das aktive Zentrum der XynB3, so ist erkennbar, dass sich die Substratbindungstasche an einem Ende der Vertiefung befindet, die der fünfblättrige β -Propeller bildet. Abbildung 3-21 zeigt deutlich die krater- oder taschenähnliche Struktur des aktiven Zentrums. Diese Art der Topologie stimmt mit der von Shallom et al. (2005) beobachteten ausschließlichen Exofunktion der XynB3 überein. In dieser Bindungstasche befinden sich die Residuen Asp15, Asp128 und Glu187, welche von Shallom et al. (2005) als die katalytischen Residuen identifiziert worden sind.

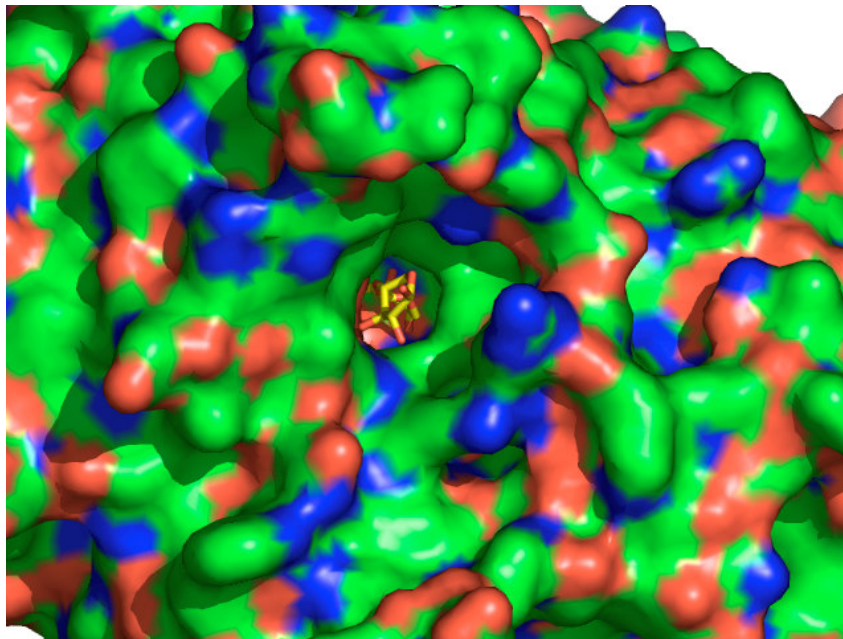


Abbildung 3-21: Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums. Das im Aktiven Zentrum gebundene Substrat Xylobiose ist in gelb dargestellt; das Protein in grün. Zu erkennen ist die krater- oder taschenähnliche Struktur des aktiven Zentrums.

3.14 Die katalytischen Aminosäuren

Durch biochemische Untersuchungen konnte Glu187 als die katalytische Säure und Asp15 als das katalytische Nukleophil identifiziert werden (Shallom et al. 2005). Shallom et al. zeigten weiterhin, dass die Aminosäure Asp128 für die katalytische Aktivität der XynB3 von essentieller Bedeutung ist. Ersetzt man die Aminosäure Asp128 durch ein Glycin, sinkt die katalytische Aktivität der XynB3 auf ein nicht messbares Niveau. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch von Reddy und Maley und Alberto et al. an der Invertase aus *Thermotoga maritima* erzielt werden. (Reddy & Maley 1990 und 1996 und Alberto et al. 2004). Die somit für die Aktivität der XynB3 erforderlichen Aminosäuren Asp15, Asp128 und Glu187 sind nicht nur in Enzymen der Glykosidase-Familie 43 sehr streng konserviert, sondern auch in den Glykosidase-Familien 32, 62 und 68 (Naumhoff 1999, Naumhoff 2001, Pons et al. 2004).

Betrachtet man die räumliche Anordnung der drei katalytischen Aminosäuren und vergleicht man diese mit denen anderer Glykosidasen aus den Familien 32, 43, und 68, so beobachtet man eine konservierte Topologie. In Abbildung 3-22 sind die drei katalytischen Residuen der XynB3 mit den äquivalenten Aminosäuren der Enzyme Invertase aus *Thermotoga maritima* (PDB Eintrag 1UYP) als Vertreter der Glykosidase-Familie GH32, α -L-Arabinanase aus *Cellvibrio japonicus* (PDB Eintrag 1GYD, Glykosidase-Familie GH43) und Levansucrase aus *Bacillus subtilis* (PDB Eintrag 1PT2, Glykosidase-Familie 68) überlagert, um die topologische Ähnlichkeit zwischen den katalytisch aktiven Residuen der drei Familien zu verdeutlichen.

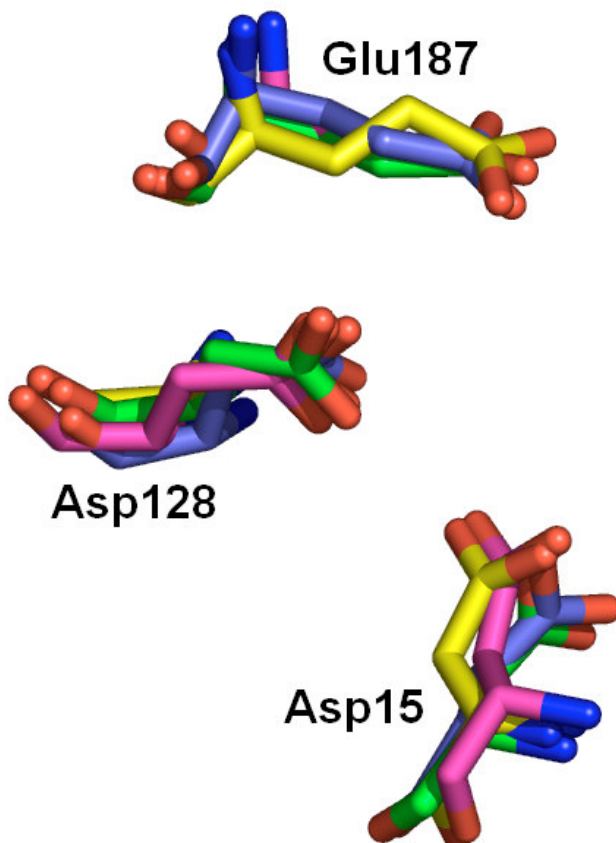


Abbildung 3-22: Struktureller Vergleich der katalytischen Aminosäuren der Familien GH32, GH43 und GH68. Überlagert sind die drei katalytischen Aminosäuren der XynB3 (grün), der Invertase aus *Thermotoga maritima* (blau (PDB 1UYP) GH Familie 32), der α -L-Arabinanase aus *Cellvibrio japonicus* (gelb (PDB 1GYD) Familie 43) und der Levansucrase aus *Bacillus subtilis* (magenta (PDB 1PT2) GH Familie 68).

Für die Glykosidase-Familie 62 ist bislang keine Struktur bekannt, es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass auch diese Familie eine vergleichbare Architektur des aktiven Zentrums aufweist, da auch in dieser Familie drei Aminosäuren (zwei Asparaginsäuren und eine Glutaminsäure) hoch konserviert sind (Pons et al. 2005).

Interessanterweise gibt es bei gleicher Topologie der drei katalytischen Aminosäuren unterschiedliche stereochemische Produkte. Während in den Familien 32, 62 und 68 die Konformation des anomeren Kohlenstoff erhalten bleibt (Alberto et al. 2004, Nurizzo et al. 2002, Naumoff, 1999), wird sie bei Glykosidasen der Familie 43 invertiert (Shallom et al. 2005).

Im klassischen Fall einer Glykosidase stehen sich die katalytische Säure und die nukleophile Aminosäure gegenüber. Dies gilt sowohl für invertierende, als auch für retinierende Glykosidasen. Bei invertierenden Glykosidasen sind die beiden katalytischen Aminosäuren im Durchschnitt 9 Å voneinander entfernt, bei retinierenden Glykosidasen beträgt der Abstand durchschnittlich nur 5,5 Å. In beiden Fällen befinden sich die zwei katalytischen Residuen auf gegenüberliegenden Seiten des zu hydrolysierenden Substrates (Sinnott et al. 1988, Davies & Henrissat 1995, Bourne & Henrissat 2001). Bei dieser klassischen Anordnung hängt der Reaktionsmechanismus der Glykosidase (retinierend versus invertierend) maßgeblich vom Abstand der beiden katalytischen Residuen ab (Davies & Henrissat 1995).

Anders als bei der klassischen Architektur von Glykosidasen mit zwei sich gegenüberstehenden katalytischen Residuen, wird bei der Architektur der XynB3 und den oben genannten Glykosidasen der Familien 32, 43 und 68 die stereochemische Determinierung des Produktes nicht durch den Abstand der katalytischen Residuen bestimmt. Alberto et al. (2004) zeigte anhand von Vergleichsuntersuchungen zwischen der Invertase aus *Thermotoga maritima* und der α -L-Arabinanase aus *Cellvibrio japonicus*, dass bei der vorliegenden Architektur des aktiven Zentrums, die Stereochemie des Produktes nur über die Orientierung des Substrates im aktiven Zentrum bestimmt wird (vgl. Punkt 3.16.1) und nicht über den Abstand der katalytischen Säure zur nukleophilen Aminosäure.

3.15 Das Substrat Xylobiose in den Strukturen der D128G und E187G Mutanten

Zum besseren Verständnis des Reaktionsmechanismus der XynB3 wurden drei katalytisch inaktive Mutanten mit dem natürlichen Substrat Xylobiose kokristallisiert und röntgenkristallographisch vermessen. Die resultierenden Strukturen des Wildtyps und der drei Mutanten erlauben einen weitgehenden

Einblick in die katalytische Funktion des Enzyms und geben eine Erklärung für die beobachtete Substratspezifität.

In zwei der drei Mutanten (D128G und E187G) konnte in den Elektronendichten das Substrat Xylobiose im aktiven Zentrum beobachtet werden. Im Fall der kokristallisierten Mutante D15G konnte das Substrat nicht in den Elektronendichtekarten gefunden werden. Die Substrabindungsstelle ist bei dieser kokristallisierten Mutante wie beim Wildtypenzym mit Kristallwasseratomen gefüllt. Die Präsenz des Substrates wurde in allen Fällen durch Berechnung einer *simulated annealed omit map* (Brunger & Warren 1998) überprüft. Bei dieser Berechnung werden die Elektronendichten ohne Berücksichtigung der Substrate berechnet. Die resultierenden Elektronendichtekarten bestätigen die Position der Substrate in den Strukturen der Mutanten D128G und E187G. Abbildung 3-23 zeigt die beobachteten Positionen des Substrates in den Mutanten D128G und E187G, jeweils überlagert mit der Wildtypstruktur. Bild C zeigt exemplarisch die *omit map* der katalytischen Region der Mutante D128G.

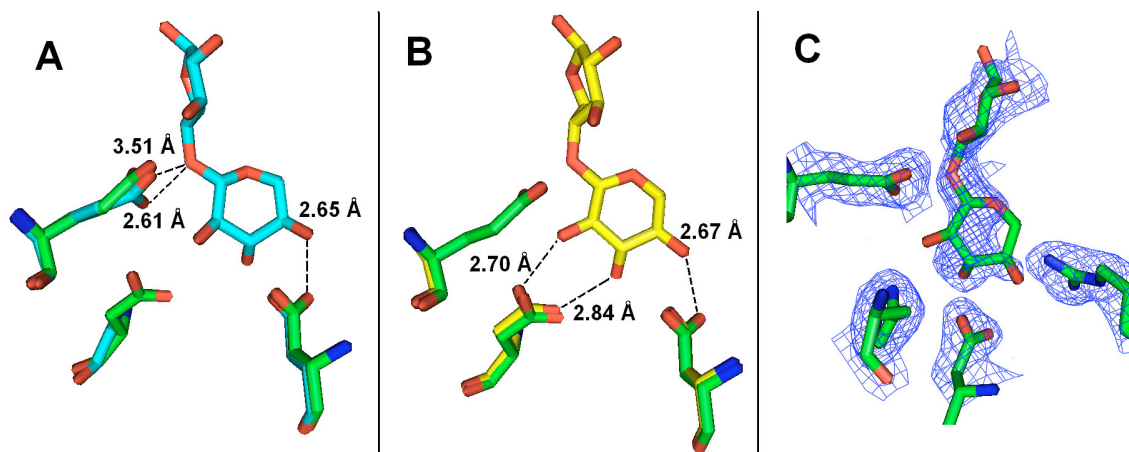


Abbildung 3-23: Position des Substrates Xylobiose in den kokristallisierten Strukturen der Mutanten D128G (A) (cyan) und E187G (B) (gelb), jeweils im Vergleich mit der Wildtypstruktur (grün). C: *annealed omit map* der mit Xylobiose kokristallisierten D128G Mutante.

3.15.1 Substratkoordinierung

Das Substrat Xylobiose wird im aktiven Zentrum über eine Vielzahl von Interaktionen koordiniert. Tabelle 3-23 gibt eine Übersicht über die Interaktionen der Atome im Substrat mit Seitenketten oder Atomen der Proteinhauptkette.

Tabelle 3-23: Wasserstoffbrücken und Kontakte zwischen dem Substrat und den Residuen und Hauptkettenatomen der Mutanten D126G und E187G. Die (-1)-Xylose ist der Xylosezucker, der von der zu spaltenden glykosidischen Bindung aus gesehen in Richtung nicht reduzierendes Ende der Xylobiosekette liegt. Diese Nomenklatur wurde von Davies et al. (1997) übernommen.

Xylobioseatom	XynB3-Atome	Abstand (D128G)	Abstand (E187G)
		[Å]	[Å]
O4 (-1)-Xylose	Asp15-O δ2	2,65	2,67
O4 (-1)-Xylose	Asp15-O δ1	3,18	3,26
O4 (-1)-Xylose	Arg288-NH1	2,41	2,92
O4 (-1)-Xylose	Arg288-NH-2	2,68	3,09
O3 (-1)-Xylose	Ala75-N	2,93	3,36
O3 (-1)-Xylose	Asp128-O δ1		2,84
O2 (-1)-Xylose	Asp128-O δ1		3,30
O2 (-1)-Xylose	Asp128-O δ2		2,70
O2 (-1)-Xylose	His249-N δ1	3,25	4,13
O2 (-1)-Xylose	Glu187-O ε1	2,57	
O-glykosidische Bindung	Glu187-O ε1	2,61	
O3 (+1)-Xylose	Thr207-N	3,12	2,63
O3 (+1)-Xylose	Glu187-O ε1	2,70	
O (+1)-Xylose	Lys100-N ε	4,12	4,44

3.16 Reaktionsmechanismus

3.16.1 Allgemeiner Reaktionsmechanismus in invertierenden Glykosidasen

In biochemischen Untersuchungen wurde beobachtet, dass der XynB3 ein invertierender Hydrolasemechanismus zu Grunde liegt (Shallom et al. 2005). Das anomere Zentrum des Substrates wird im Zuge der Spaltungsreaktion invertiert. Diese Art der Reaktion geht mit einem S_N2 Reaktionsmechanismus einher, der in nur einem einzigen Schritt abläuft. Während dieser Reaktion protoniert die katalytische Säure die glykosidische Bindung, während gleichzeitig ein deprotoniertes Wasser das anomere Kohlenstoff C1 der (-1)-Xylose nukleophil angreift (die Numerierung der Zucker erfolgte nach Davies et al. 1997). Das nukleophile Wasser wird im Zuge der Reaktion zur neu entstehenden Hydroxygruppe der (-1)-Xylose. Im klassischen Fall einer invertierenden Hydrolase stehen sich die katalytische Säure und die das nukleophile Wasser koordinierende Aminosäure (katalytisches Nukleophil) gegenüber. Sie befinden sich durchschnittlich 9 Å voneinander entfernt auf gegenüberliegenden Seiten des zu hydrolysierenden Substrates. Für diese klassische Enzymarchitektur, die beispielsweise bei dem humanen Enzym Mannosidase (PDB Eintrag 1FO2) zu beobachten ist, bedarf es nur zwei katalytischer Residuen.

Im Falle der XynB3 liegt allerdings nicht diese klassische Topologie der katalytischen Residuen vor. Die katalytische Säure Glu187 und das katalytische Nukleophil Asp15 stehen sich nicht gegenüber. Sie bilden etwa einen 90° Winkel zueinander und sind ca. 6,6 Å voneinander entfernt (Abbildung 3-24). Diese Topologie wird sowohl bei den bislang bekannten Glykosidasen der Familie 43 als auch bei retinierenden Glykosidasen der Familien 32 und 68 beobachtet (vgl. Punkt 3.14). Diese Topologie des aktiven Zentrums zeichnet sich durch das Vorhandensein einer zusätzlichen dritten hochkonservierten Aminosäure aus. Im Falle der XynB3 interagiert diese dritte hochkonservierte Aminosäure des aktiven Zentrums (Asp128) mit den Hydroxygruppen des C2

und des C3 der (-1)-Xylose und ist damit an der Stabilisierung des Substrates im aktiven Zentrum von entscheidender Bedeutung.

Dies alleine erklärt jedoch nicht den drastischen Aktivitätsverlust, der bei einer Mutation an dieser Position des Enzyms auftritt. Shallom et al. zeigten, dass der Austausch des Aspartats der XynB3 an Position 128 durch ein Glycin zu einem Aktivitätsverlust führt, der höher ist als bei der Substitution der katalytischen Säure oder des katalytischen Nukleophils (Shallom et al. 2005). Der aus der Struktur der XynB3 ersichtliche, relativ geringe Abstand zwischen katalytischer Säure/Base und Nukleophil ist eine mögliche Erklärung dafür. Asp128 ist etwa 5,5 Å vom Nukleophil (Asp15) und 3,99 Å von der katalytischen Säure (Glu187) entfernt. In beiden Fällen ist eine pKa-Modulation der jeweiligen Aminosäuren denkbar. Eine Entfernung der Aspartatgruppe würde sowohl zu einer verschlechterten Bindung des Substrates als auch zu einer Verschiebung des Ionisierungszustandes der katalytischen Aminosäuren Glu187 und/oder Asp15 führen. Nurizzo et al. schlug eine ähnliche Funktion für das Asp158 (äquivalent der Asp128 in XynB3) in der Struktur der α -L-Arabinanase aus *Cellvibrio Japonicus* vor (Nurizzo et al. 2002).

3.16.2 Reaktionsmechanismus der XynB3

Anhand der Strukturen des Wildtyps sowie der kokristallisierten Mutanten D128G und E187G, welche jeweils das Substrat Xylobiose in der Kristallstruktur zeigten, lässt sich ein möglicher Reaktionsmechanismus ableiten. Dabei entscheidend ist ein fixiertes Kristallwassermolekül, welches in allen gelösten Strukturen - mit Ausnahme der Struktur der Mutante D128G - an dieser Position zu finden war. Dieses Wasser wird über die Residuen Asp15, Arg288 und Thr207 koordiniert.

Abbildungen 3-24 zeigt das im aktiven Zentrum gebundene Substrat, sowie die an der katalytischen Hydrolyse beteiligten Aminosäuren. Abbildung 3-25 zeigt das aktive Zentrum in einer stereographischen Darstellung.

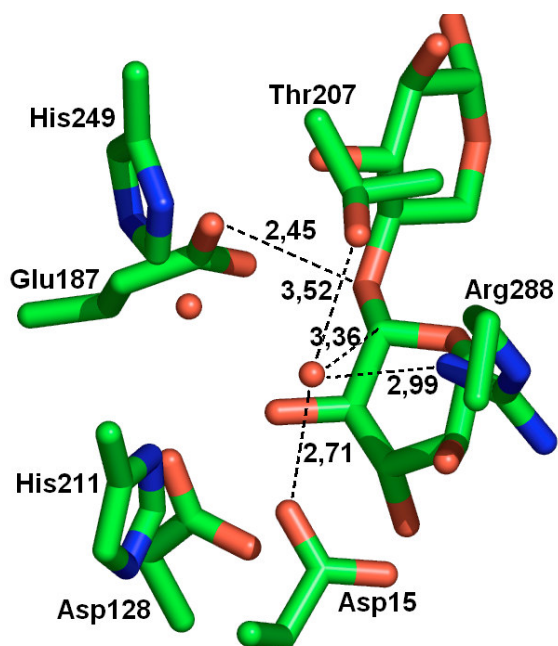


Abbildung 3-24: Darstellung des aktiven Zentrums dem mit gebundenen Substrat Xylobiose und den an der Reaktion beteiligten Aminosäuren. Die Lage des Substrates wurde anhand der Positionen in den katalytischen Mutanten auf den Wildtyp übertragen.

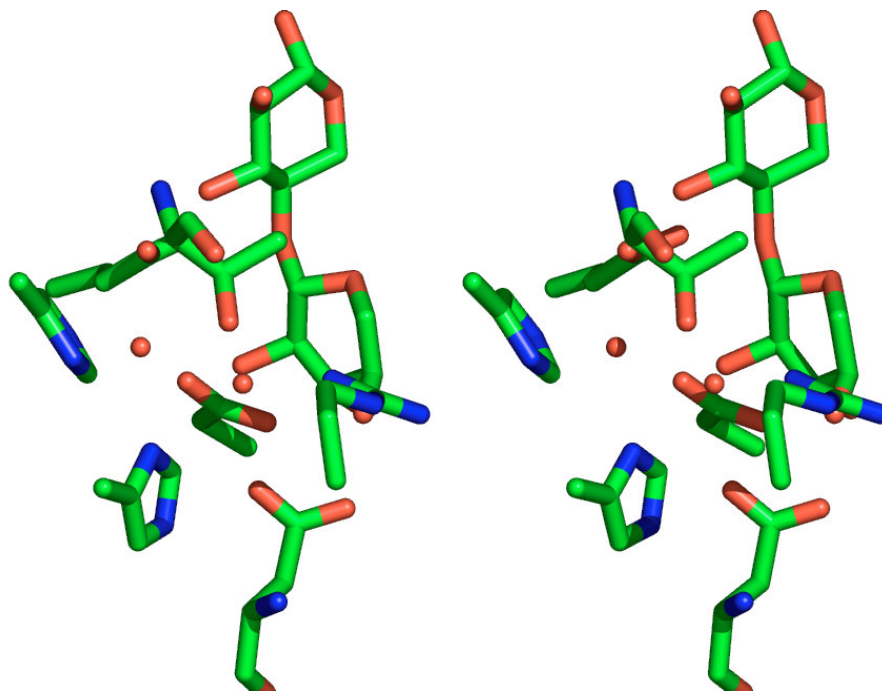


Abbildung 3-25: Stereographische Darstellung des aktiven Zentrums.

Das Substrat wird, wie unter Punkt 3.15 und in den Abbildungen 3-23 bis 3-25 beschrieben, im aktiven Zentrum gebunden. Das katalytische Wassermolekül wird über die Residuen Asp15, Arg288 und Thr207 gebunden. Darüber hinaus bildet sich eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem zweiten Wassermolekül, welches durch die Histidine His211 und His249 koordiniert wird. Das katalytische Wasser wird so in einem Abstand von ca. 3,3 Å zum C1 der (-1)-Xylose fixiert. Glu187 protoniert die O-glykosidische Bindung zwischen der (-1)- und der (+1)-Xylose. Gleichzeitig greift das fixierte Wassermolekül das C1 Atom der (-1)-Xylose nukleophil an. Anhand der Struktur ist es nicht ersichtlich, ob das katalytische Wasser im Verlauf des nukleophilen Angriffs deprotoniert wird, oder bereits vorher deprotoniert als Hydroxidion vorliegt.

3.17 Substratspezifität

Die meisten Glykosidasen sind hoch spezifisch den Substratzucker in der (-1)-Position betreffend (Helferich & Jung 1958, Blanchard & Withers 2001). Bei Glykosidasen der Familie 43 sind bislang β -Xylosidasen, α -L-Arabinofuranosidasen, Arabinanasen und Xylanasen, sowie bifunktionelle β -Xylosidase/ α -L-Arabinofuranosidasen beschrieben worden (Utt et al. 1991, Sakka et al. 1993, Whitehead et al. 2001). Polyspezifität zwischen Xylo- oder Arabino-Substraten wurde auch bei anderen Glykosidasen der Familien 3, 51 und 54 gezeigt (Lee et al. 2003; Shallom et al. 2002).

Biochemische Untersuchungen der XynB3 (Shallom et al. 2005) zeigten, dass das Enzym eine hohe Spezifität zu Substraten, die in (-1)-Position ein Xylosezucker als Pyranosering aufweisen, besitzt. Substrate, die an dieser Position einen anderen Zucker aufweisen - beispielsweise α -L-Arabinofuranose, α -L-Arabinopyranose, β -D-Glucopyranose oder β -D-Galaktopyranose - werden deutlich schlechter enzymatisch hydrolysiert (4,5-0,05% Aktivität im Vergleich zur Xylose). Durch die aus den ermittelten Strukturen ersichtliche Topologie der Aminosäuren im aktiven Zentrum kann diese Substratspezifität zu Xylose erklärt werden. Abbildung 3-26 zeigt wie die Spezifität der XynB3 zu Substraten mit

einem Xylosezucker in der (-1)-Position strukturell erklärt werden kann. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 3-26 die Substratzucker Galactose, Arabinopyranose und Arabinofuranose in die (-1)-Position modelliert, um im direkten Vergleich zur Xylose die entstehenden sterischen Konflikte zwischen Substrat und Proteinresiduen zu verdeutlichen.

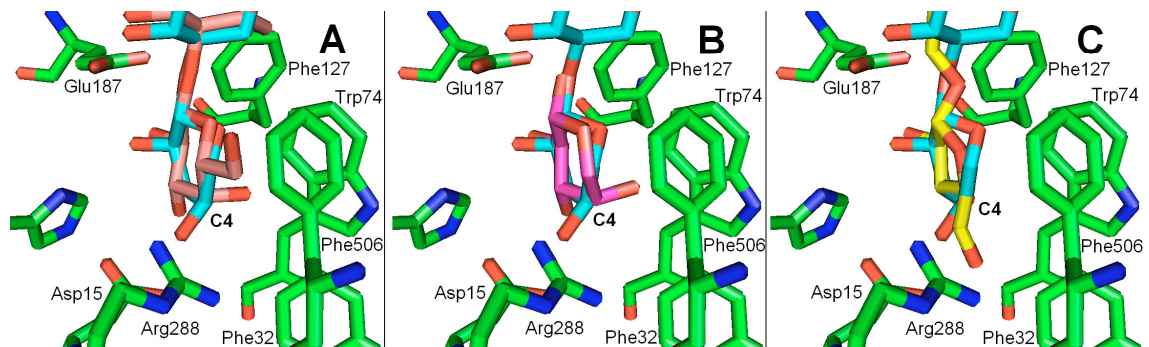


Abbildung 3-26: Überlagerung des Xylobiosesubstrates (cyan gefärbt), gebunden im aktiven Zentrum mit modellierten den Substraten, A Galaktose (fleischfarben), B Arabinopyranose (rosa) und C Arabinofuranose (gelb). Residuen des Proteins sind grün gefärbt.

Die C4 Hydroxygruppe der Zucker Galaktose oder Arabinopyranose ist enantiomorph zur C4 Hydroxygruppe einer Xylose. Aus diesem Grund können weder Galaktose noch Arabinopyranose in der (-1)-Position eine Wasserstoffbrücke zu dem hochkonservierten Arg288 ausbilden. Weiterhin würden sie in sterische Konflikte (2,7 Å) zum hydrophoben Bereich kommen, welcher durch die Aminosäuren Trp74, Phe127, Phe32 und Phe506 in diesem Bereich vermittelt wird. Im Falle der Galaktose würde es darüber hinaus zu sterischen Konflikten zwischen der, im Vergleich zur Xylose, zusätzlichen CH₂OH-Gruppe und der Phenylalanin-Gruppe der Aminosäure Phe506 (1,4 Å) kommen. Im Unterschied zu Galaktose oder Arabinopyranose würde Arabinofuranose an dieser Position keine sterischen Konflikte verursachen. Da dieser Zucker jedoch eine Furanosestruktur aufweist, ist es im Vergleich zu Xylose um eine CH₂OH-Gruppe verlängert. Wie man in Abbildung 3-26 C erkennen kann, würde es aus diesem Grund zu sterischen Konflikten zwischen Arg288 und dem C5 der Arabinofuranose kommen. Darüber hinaus würde die

Hydroxygruppe des Kohlenstoffs C5 in Abhängigkeit von ihrer Ausrichtung in sterische Konflikte mit den Residuen Asp15, Phe32 oder Arg288 kommen.

3.18 Topologievergleich der aktiven Zentren von XynB3 und der α -L-Arabinanase aus *Cellvibrio japonicus*

3.18.1 Unterschiede in der Wirkungsweise

Die α -L-Arabinanase aus *Cellvibrio japonicus* gehört ebenso wie XynB3 zur GH Familie 43. Sie weist eine ähnliche Gesamtfaltung der katalytischen Domäne sowie eine vergleichbare Topologie der katalytischen Residuen im aktiven Zentrum auf (Nurizz et al. 2002 b). Es gibt jedoch signifikante Unterschiede im katalytischen Zentrum, die die unterschiedliche Substratspezifität bei gleicher Topologie der drei katalytischen Residuen erklären. Im Gegensatz zur XynB3 ist die α -L-Arabinanase aus *Cellvibrio japonicus* eine Endoglykosidase. Sie verfügt über eine katalytische Furche, während XynB3 als Exoglykosidase eine aktive Bindungstasche aufweist. In Abbildung 3-27 sind die im aktiven Zentrum gebundenen Substrate der XynB3 und der α -L-Arabinanase dargestellt, um die Unterschiede der substrat-bindenden Region zu verdeutlichen.

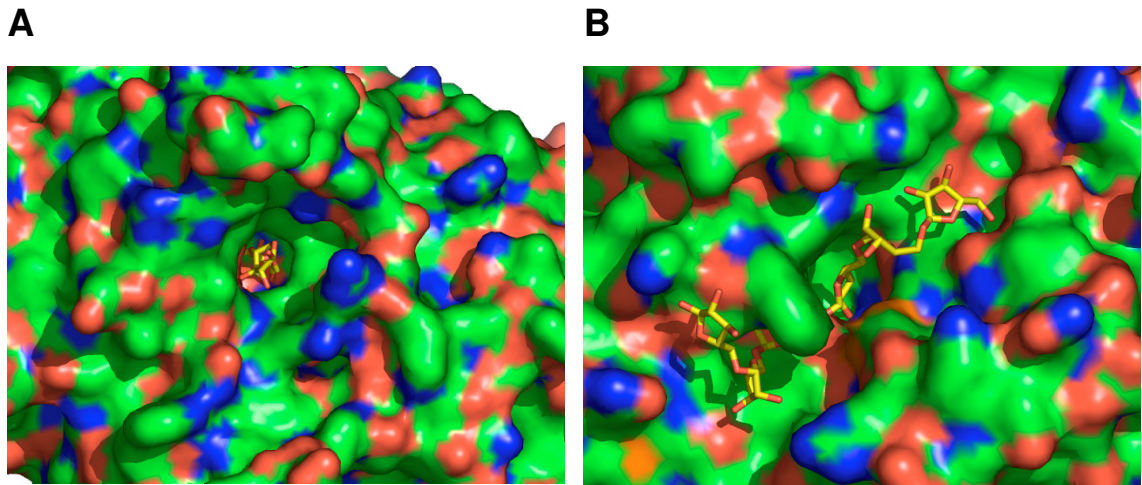


Abbildung 3-27: Oberflächendarstellung der katalytischen Region der Familie 43 Glykosidasen XynB3 (A) und α -L-Arabinanase aus *Cellvibrio japonicus* (B), mit jeweils gebundenem Substrat: Xylobiose im Falle der XynB3 (A) und Arabinohexose im Falle der Arabinanase (B). Die Substrate sind jeweils gelb gefärbt. Die katalytischen Residuen der Arabinanase liegen in dieser Darstellung im Bereich der Verbindung zwischen drittem und vierten Zucker der Arabinohexose.

Die aktive Bindungstasche der XynB3 wird unter anderem auch durch einen Teil der β -sandwich Domäne gebildet (Abbildung 3-28). Diese Loopregion der β -sandwich Domäne vermittelt eine für die Substraterkennung mitverantwortliche hydrophobe Umgebung (vgl. Punkt 3.9 und 3.17) und bildet eine Wandseite des aktiven Zentrums.

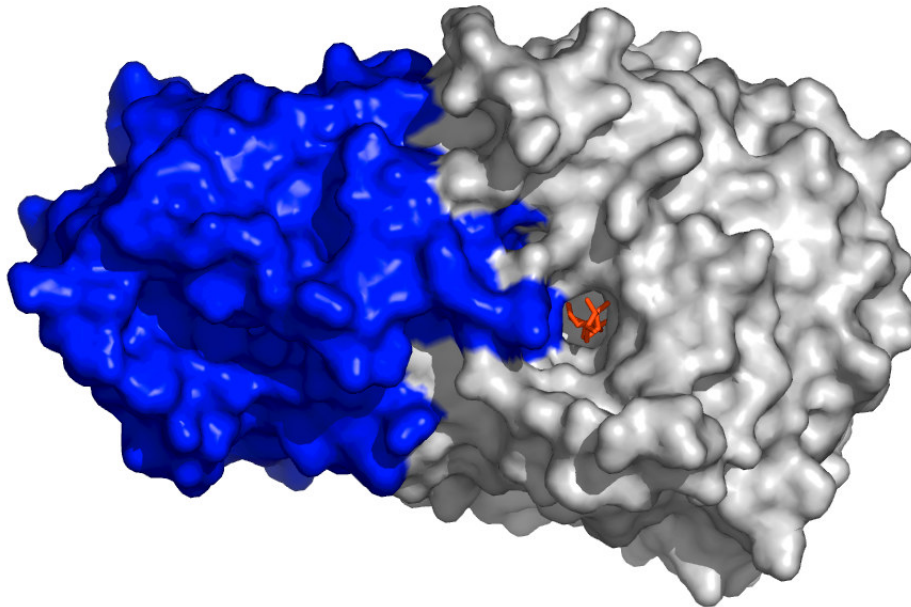


Abbildung 3-28: Oberflächendarstellung der XynB3. Die katalytische Domäne ist weiß, die β -sandwich Domäne blau dargestellt. Das im aktiven Zentrum gebundene Substrat Xylobiose ist rot gefärbt. Ein Loop der β -sandwich Domäne bildet eine Wand der katalytischen Taschenstruktur.

Dieser Loop fehlt in der α -L-Arabinanase aus *Cellvibrio japonicus*, die keine β -sandwich Domäne aufweist, völlig (Abbildung 3-29). Dies führt zu den unterschiedlichen Topologien der Substratbindungsregionen mit einer Bindungstasche im Falle der XynB3 und einer Bindungsfurche im Falle der Arabinanase. Die unterschiedliche Topologie könnte die unterschiedlichen Funktionen der beiden Enzyme erklären. Im Falle der XynB3 resultiert die Bindungstasche in einer ausschließlichen exo-Funktions des Enzyms, während mit der Furchenstruktur des aktiven Zentrums der Arabinanase eine endo-Funktion des Enzyms einhergeht (vgl. Punkt 3.13).

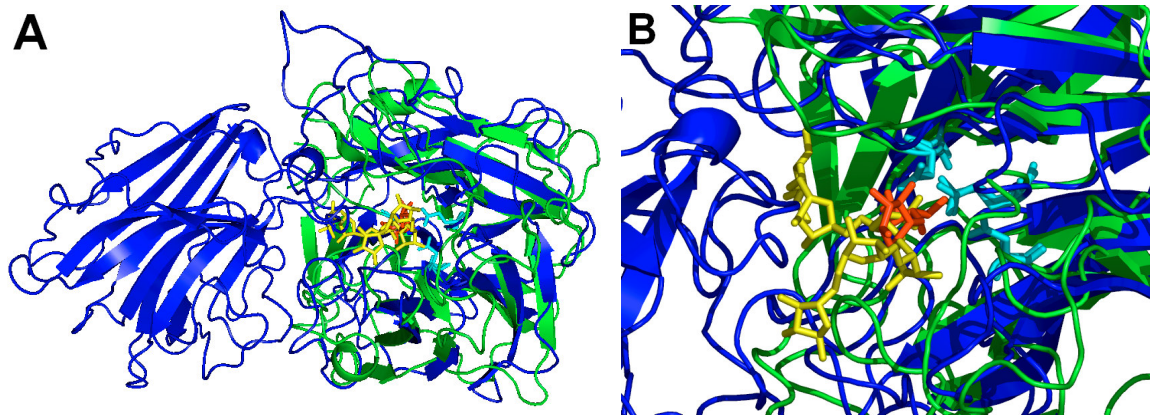


Abbildung 3-29: Topologievergleich des aktiven Zentrums der XynB3 mit der der α -L-Arabinanase aus *Cellvibrio japonicus*. A: Überlagerung der XynB3 (blau) und der Arabinanase aus *Cellvibrio japonicus*. (grün). Das Substrat der Arabinanase (Arabinohexose) ist gelb gefärbt, das Substrat der XynB3 (Xylobiose) ist rot gefärbt. Die drei katalytischen Aminosäuren sind in beiden Enzymen jeweils cyan gefärbt. B: Detailansicht der aktiven Zentren.

3.18.2 Unterschiede in der Substratspezifität

Neben den unterschiedlichen Wirkungsweisen der XynB3 und der α -L-Arabinanase aus *Cellvibrio japonicus* zeigen die beiden Enzyme ebenfalls eine unterschiedliche Substratspezifität. Bei gleicher Topologie der drei katalytischen Aminosäuren (vgl. Punkt 3.14), wird diese durch den Vergleich der aktiven Zentren verständlich. In Abbildung 3-30 wurden die katalytischen Aminosäuren und jeweils im aktiven Zentrum gebundenes Substrat überlagert, um dies zu verdeutlichen.

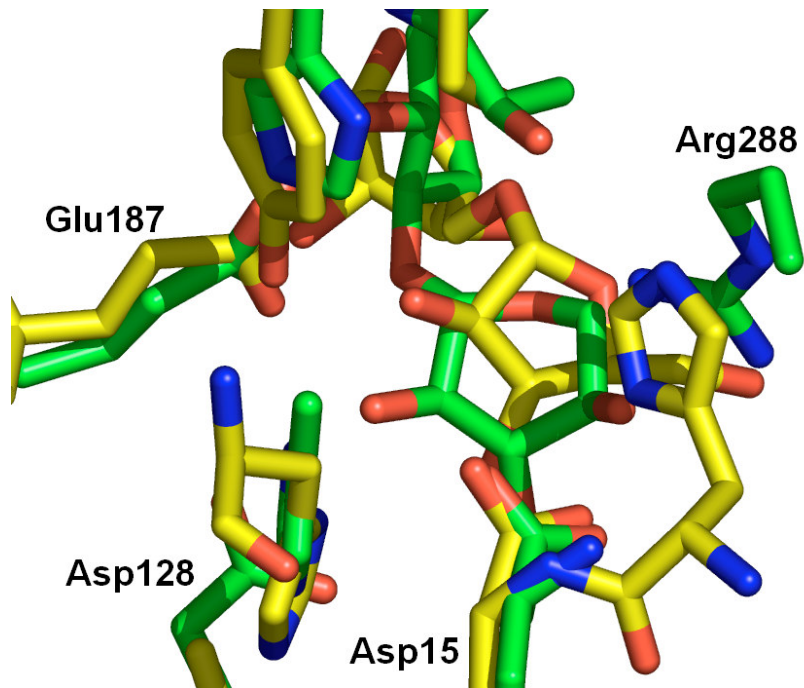


Abbildung 3-30: Überlagerung der katalytischen Zentren von XynB3 (grün) und Familie 43 α -L-Arabinanase aus *Cellvibrio japonicus* (gelb) mit jeweils gebundenen Substraten Xylobiose (grün) und Oligoarabinofuranose (gelb). Die Beschriftungen der Aminosäuren beziehen sich ausschließlich auf die Residuennummern der XynB3. Zu erkennen ist der strukturelle Unterschied an Position Arg288 (rechts im Bild) der eine mögliche Erklärung für die beobachteten Spezifitäten der beiden Familie 43 Glykosidasen ist.

Die Affinität der α -L-Arabinanase zu Arabinofuranose als Substrat in (-1)-Position ist durch den Austausch der in Xylosidasen konservierten Aminosäure Arg288 zu erklären. Dieses Arg288 führt bei der XynB3 dazu, dass Arabinofuranose in (-1)-Position des aktiven Zentrums nur schlecht gebunden werden kann (vgl. Punkt 3.17). Bei der α -L-Arabinanase aus *Cellvibrio japonicus* findet man anstelle des Arginins ein Histidin. Durch das Fehlen des Arginins kommt es im Falle einer Arabinofuranosebindung bei der Arabinanase nicht zu den unter Punkt 3.17 gezeigten sterischen Konflikten zwischen Substrat und Protein, was dazu führt, dass die α -L-Arabinanase Arabinofuranose als Substrat umsetzen kann (McKie et al. 1997).

Diese kleine Modifikation der katalytisch aktiven Region führt bei sonst sehr ähnlicher Topologie der katalytischen Domäne und des aktiven Zentrums zu den unterschiedlichen Substratspezifitäten der beiden Glykosidasen aus Familie 43.

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die röntgenkristallographische Charakterisierung der Familie 43 β -D-Xylosidase aus *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (E.C. 3.2.1.37, XynB3) vorgestellt.

Die XynB3 gehört zur Familie 43 der Glykosid-Hydrolasen. Das Enzym hydrolysiert die glykosidische β -1,4-Bindung zwischen zwei Xylosezuckern in kurzen Xyloseoligosacchariden und ist gemeinsam mit anderen Hemicellulasen, an der vollständigen Zersetzung der pflanzlichen Hemizellulose beteiligt.

Das Enzym wurde in zwei verschiedenen Kristallformen (P₂₁₂₁₂ und P₄₃₂₁₂) kristallisiert. Die Struktur der XynB3 konnte mit Hilfe der Technik des Molekularen Ersatzes gelöst werden. Als Referenzmodell diente eine β -Xylosidase aus *Bacillus subtilis*.

Das Enzym ist sowohl in der Kristallstruktur als auch *in vivo* als Tetramer organisiert. Jedes Monomer besteht aus zwei Domänen, einer N-terminalen *five-blade- β -propeller* Domäne und einer C-terminalen *β -sandwich* Domäne. Die N-terminale Propellerdomäne vermittelt die katalytische Funktion des Enzyms, während die C-terminale *β -sandwich* Domäne eine wichtige Funktion bei der Stabilisierung der Quartärstruktur übernimmt und darüber hinaus wahrscheinlich eine Rolle bei der Thermostabilisierung der XynB3 spielt.

Im Falle der XynB3 liegt nicht die klassische Architektur der invertierenden Glykosidasen mit einer katalytischen Säure und einem katalytischen Nukleophil, die jeweils ca. 9 Å voneinander entfernt sind, vor. Statt dessen beobachtet man bei der XynB3 eine Topologie des aktiven Zentrums mit drei katalytischen Residuen, bei der die katalytische Säure nur ca. 6,6 Å von der katalytischen Base entfernt ist. Diese Topologie wurde bislang sowohl bei anderen invertierenden Glykosidasen der Familie 43, als auch bei retinierenden Glykosidasen der Familien 32, 62 und 68 gefunden.

Neben der nativen XynB3 wurden auch die Strukturen von drei katalytisch inaktiven Punktmutanten der XynB3 (D15G, D128G und E187G) gelöst. Diese wurden mit dem natürlichen Substrat Xylobiose kokristallisiert. Zwei der drei

4 Zusammenfassung

Mutanten (D128G und E187G) zeigen das im aktiven Zentrum gebundene Substrat in der Elektronendichte. Das Substrat ist durch ein komplexes Netzwerk von Wasserstoffbrücken im aktiven Zentrum gebunden. Die Kristallstrukturen der kokristalisierten Mutanten ermöglichen ein besseres Verständnis der Substratbindung. Anhand dieser Strukturen ist die in biochemischen Vorarbeiten beobachtete Substratspezifität nun auf struktureller Basis ersichtlich und erklärbar. Darüber hinaus ermöglichen die Kristallstrukturen der Mutanten ein Verständnis des biochemisch beobachteten Reaktionsmechanismus.

Im direkten Vergleich der XynB3 mit der bekannten Familie 43 α -L-Arabinanase Struktur aus *Cellvibrio japonicus* sind die Unterschiede in Substratspezifität und Reaktionstyp, die beide Enzyme aufweisen, nun auf struktureller Basis erklärbar.

5 Literaturverzeichnis

Alberto, F., Bignon, C., Sulzenbacher, G., Henrissat, B. & Czjzek, M. (2004). The three-dimensional structure of invertase (beta-fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *J Biol Chem* 279, 18903-18910.

Andersson, K.M. and Hovmoller, S. (2000). The protein content in crystals and packing coefficients in different space groups. *Acta Cryst. D*, **56**, 789-790.

Armand, S., Vieille, C., Gey, C., Heyraud, A., Zeikus, J.G., and Henrissat, B. (1996). Stereochemical course and reaction products of the action of P-xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-R1. *Eur. J. Biochem.* **236**, 706-713

Beisel, H. G., Kawabata, S., Iwanaga, S. Huber, R. And Bode, W. (1999). *EMBO J.* **18**, 2313-2322

Blaber, M. et al. (1993) *Biochemistry* 32, 11363-11373

Blake, C.C.F.e.a. (1965). Structure of hen-egg-white lysozyme. A three dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, **206**, 757-761.

Blanchard JE, Withers SG. (2001). Rapid screening of the aglycone specificity of glycosidases: applications to enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Chem Biol.* Jul;8(7):627-33.

Blundell, T. L. & Johnson, L. N. (1976). Protein Crystallography. *Academic Press, New York* .

Bourne, Y. and Henrissat, B. (2001). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 593-600.

Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D*, **54**, 905-921.

Buschiazzo, A., Tavares, G. A., Campetella, O., Spinelli, S., Cremona, M. L., Paris, G., Amaya, M. F., Frasch, A. C. C., Alzari, P. M.(2000). Structural Basis of Sialyltransferase Activity in Trypanosomal Sialidases. *EMBO Journal* Vol. **19**, pp. 16-24.

CCP4. (1994) The CCP4 suite: programmes for protein crystallography. *Acta Cryst. D*, **50**, 760-763.

Czjzek, M., Ben David, A., Bravman, T., Shoham, G., Henrissat, B. and Shoham, Y (2005).; Enzyme–Substrate Complex Structures of a GH39 beta-Xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. *J. Mol. Biol.* accepted 1 September 2005

Dalboge H, Bayne S, Pedersen J. (1990). In vivo processing of N-terminal methionine in *E. coli*. *FEBS Lett.* Jun 18;**266**(1-2):1-3.

Davies G. und Henrissat B.(1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases, *structure* **15** September, 3 853-859

Davies, G. J., Wilson, K. S., and Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases, *Biochem. J.* **321**, 557-559.

Davies, G., Sinnott, M.L., Withers, S.G. (1998). *Comprehensive Biological Catalysis* pp119-209, Academic Press Limited, London, U.K.

Deacon, A. M., Weeks, C. M., Miller, R. & Ealick, S. E. (1998). The Shake-and-Bake structure determination of triclinic lysozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9284–9.

Deacon, A. M. & Ealick, S. E. (1999). Selenium-based MAD phasing: setting the sites on larger structures. *Structure Fold Des* **7**, R161–6.

Deacon, A. M., Ni, Y. S., & Ealick, S. E. (2000). The crystal structure of ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase: catalysis with a twist. *Structure Fold Des* **8**, 453–62.

Divne C, Stahlberg J, Reinikainen T, Ruohonen L, Pettersson G, Knowles JK, Teeri TT, Jones TA.(1994). The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science*. Jul 22;**265**(5171):524-8.

Ducruix, A. & Giege, R. (1999). Crystallization of nucleic acids and proteins, a practical approach. *Oxford University Press*.

DynaPro Theory and Data Interpretation. Protein solutions Incorporated (1998)

Elcock, A., McCammon, J.A. (2001) Identification of protein oligomerization states by analysis of interface conservation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 13;**98**(6):2990-4

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

Gasparic, A., Martin, J., Daniel, A. S., and Flint, H. J. (1995). A xylan hydrolase gene cluster in *Prevotella ruminicola* B14: Sequence relationships, synergistic

interactions, and oxygen sensitivity of a novel enzyme with exoxylanase and α -(1,4)-xylosidase activities, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2958-2964.

Garman, E. F. & Schneider, T. R. (1997). Macromolecular Cryocrystallography. *J. Appl Cryst* **30**, 211–37.

Garman E. and Doublie S. (2003). Cryocooling of Macromolecular Crystals: Optimising Methods. *Methods in Enzymology* Volume 368, Pages 188-216

Gonzalez, A., Pedelacq, J., Sola, M., Gomis-Ruth, F. X., Coll, M., Samama, J. & Benini, S. (1999). Two-wavelength MAD phasing: in search of the optimal choice of wavelengths. *Acta Cryst D* **55** (Pt 8), 1449–58.

Grosse-Kunstleve, R. W. & Brunger, A. T. (1999). A highly automated heavy atom search procedure for macromolecular structures. *Acta Cryst D* **55** (Pt 9), 1568–77.

Gu, X. Y., Liu, Y. D., Hao, Q., Ealick, S. E. & Fan, H. F. (2001) Direct-Method-Aided Phasing of MAD Data. *Acta Cryst D* **57**, 250–3.

Henrissat, B. and Davies, G. (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 637-644.

Harding M.M. (2001). Geometry of metal-ligand interactions in proteins
Acta Cryst. D **57**, 401-411

Harding M.M., (2004). The architecture of metal coordination groups in proteins,
Acta Cryst. D, **60**, 849-859

Helferich B., Jung K.H. (1958). Specificity of glycosidases; differences between the beta-D-glucosidase and beta-D-galactosidase of sweet almond emulsin on adsorption by poly-hydroxystyreneglycosides. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*; **311**(1-3):54-62.

Hendrickson W.A. (1991). Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science*, **254**, 51-58.

Henrick K, Thornton JM.(1998). PQS: a protein quaternary structure file server. *Trends Biochem. Sci. Sep*;23(9):358-61

Hirel PH, Schmitter MJ, Dessen P, Fayat G, Blanquet S. (1989). Extent of N-terminal methionine excision from Escherichia coli proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A. Nov*;86(21):8247-51.

Holm, L., & Sander, C. (1994). Searching protein structure databases has come of age. *Proteins*, **19**, 165-173.

Holzkunde; Autorengemeinschaft der Professur Holzwissenschaften ETH Zürich (2005) <http://e-collection.ethbib.ethz.ch/show?type=lehr&nr=87>

Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst. A*, **47**, 110-119.

Khasin, A., Alchanati, I. and Shoham, Y. (1993). Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, (6) p.1725-1730

Krissinel, E. und Henrick, K. (2005). Detection of Protein Assemblies in Crystals. In: M.R. Berthold et.al. (Eds.): *CompLife 2005*, LNBI 3695, pp. 163--174. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Kleywegt, G. J. & Read, R. J. (1997). Not your average density. *Structure* **5**, 1557–69.

Kleywegt G.J. (1992-2004). Uppsala University, Uppsala, Sweden. Unpublished program.

Kleywegt, G.J., Zou, J.Y., Kjeldgaard, M. & Jones, T.A. (2001). Around O. In: "*International Tables for Crystallography, Vol. F. Crystallography of Biological Macromolecules*" (Rossmann, M.G. & Arnold, E., Editors). Chapter 17.1, pp. 353-356, 366-367.

Koshland, D. E. (1953a). *Biol. Rev.* **28**, 416-436

Koshland, D. E. (1953b) *Biol. Rev. Camb. Philos. SOC.* **28**,416-426

Kürschner, K. (1966): Chemie des Holzes. Zweite verbesserte Auflage. Technischer Verlag Herbert Cram, Berlin: 277 S

Lee, R. C., Hrmova, M., Burton, R. A., Lahnstein, J., and Fincher, G. B. (2003) Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with alpha-L-arabinofuranosidase and *beta*-D-xylosidase activity. Characterization, primary structures, and COOH-terminal processing, *J. Biol. Chem.* **278**, 5377-5387.

Matthews, B.W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, **33**, 491-497.

McAuliffe JC, Hindsgaul O (1997). Carbohydrate drugs — an ongoing challenge. *Chem. Ind.* 170-174.

McKie, V. A., Black, G. W., Millward-Sadler, S. J., Hazlewood, G. P., Laurie, J. I., and Gilbert, H. J. (1997). Arabinanase A from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* exhibits both an endo and an exo mode of action, *Biochem. J.* **323** (part 2), 547-555.

McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallisation. *Eur. J. Biochem.*,**189**, 1-23.

Naumoff, D. G. (1999). Conserved sequence motifs in levansucrases and bifunctional *beta*-xylosidases and alpha-L-arabinases, *FEBS Lett.* **448**, 177-179.

Naumoff, D. G. (2001) beta-Fructosidase superfamily: Homology with some alpha-L-arabinases and beta-D-xylosidases, *Proteins* **42**, 66-76.

Nurizzo, D., Nagy, T., Gilbert, H.J. und Davies, G.J. (2002). The Structural Basis for Catalysis and Specificity of the *Pseudomonas cellulosa* α -Glucuronidase, GlcA67A. *Structure*, Vol. **10**, 547–556.

Nurizzo, D., Turkenburg, J.P., Charnock, S.J., Roberts, S.M., Dodson, E.J., McKie, V.A., Taylor, E.J., Gilbert, H.J., and Davies, G.J. (2002). *Cellvibrio japonicus* alpha-L-arabinanase 43A has a novel five-blade beta-propeller fold. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 665-668.

Otwinowski Z. and Minor W., (1997). "Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode", *Methods in Enzymology*, Volume **276**: Macromolecular Crystallography, part A, p.307-326, 1997

Palcic, M.M. (1999). Biocatalytic synthesis of oligosaccharides. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10**, 616-624.

Patskovsky, Y., Almo, S. C. (2005). New York Structural Genomics Research Consortium (Nysgrc) Crystal Structure Of beta-1,4-Xylosidase From *Bacillus Subtilis* (to be published)

Perrakis, A., Morris, R. & Lamzin, V. S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat Struct Biol* **6**, 458–63.

Phillips, D.C. (1966). The Three-Dimensional structure of an Enzyme Molecule. *Sci. Amer.* **215/5** S. 78-90

Pons, T., Naumoff, D. G., Martinez-Fleites, C., and Hernandez, L. (2004) Three acidic residues are at the active site of a beta-propeller architecture in glycoside hydrolase families 32, 43, 62, and 68, *Proteins* 54, 424-432.

Ponstingl H., Henrick K. und Thornton J.M. (2000). Discriminating between homodimeric and monomeric proteins in the crystalline state. *Proteins*. 2000 Oct 1;41(1):47-57.

Popov AN, Bourenkov GP (2003). Choice of data-collection parameters based on statistic modelling. *Acta Cryst. D*. Jul;59(Pt 7):1145-53.

Reddy, V. A., und Maley, F. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 10817–10820

Reddy, V. A., und Maley, F. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 13953–13957

Reimer, L. und Pfefferkorn G. (1997): Rasterelektronenmikroskopie, Springer Verlag 1997

Rice, L. M., Earnest, T. N. & Brunger, A. T. (2000). Single-wavelength anomalous diffraction phasing revisited. *Acta Cryst. D* **56** (Pt 11), 1413–20.

Rossmann, M. G. (1972). The Molecular Replacement Method. *New York: Gordon & Breach*.

Rossmann MG.(1990). The molecular replacement method. *Acta Cryst. A*. Feb 1; **46** (Pt 2):73-82. Review.

Rould MA, Perona JJ, Steitz TA. (1992). Improving multiple isomorphous replacement phasing by heavy-atom refinement using solvent-flattened phases. *Acta Cryst. A*. Sep 1;**48** (Pt 5):751-6.

Sakka, K., Yoshikawa, K., Kojima, Y., Karita, S., Ohmiya, K., and Shimada, K. (1993) Nucleotide sequence of the *Clostridium stercorarium* xylA gene encoding

a bifunctional protein with *beta*-Dxylosidase and alpha-L-arabinofuranosidase activities, and properties of the translated product, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 268-272.

Schuettelkopf A. W. und van Aalten D. M. F. (2004). PRODRG - a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Cryst. D* **60**, 1355-1363.

Schmidt P.F. und 13 Mitautoren (1994). Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse, *expert-Verlag* 1994

Shallom, D., Belakhov, V., Solomon, D., Gilead-Gropper, S., Baasov, T., Shoham, G., and Shoham, Y. (2002). The identification of the acid-base catalyst of alpha-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase, *FEBS Lett.* **514**, 163-167.

Shallom D., Leon M., Bravman T., Ben-David A., Zaide G., Belakhov V., Shoham G., Schomburg D., Baasov T. and Shoham Y. (2005). Biochemical Characterization and Identification of the Catalytic Residue of a Family 43 beta-D-Xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6. *Biochemistry*, **44**, 387-397

Shnueli, U. (1996). International tables for crystallography, Vol. B reciprocal space. *Kluwer Academic Press*, Dordrecht .

Sinnott, M. L. (1988) in *Enzyme Mechanisms* (Page, M. I., and Williams, A., eds) pp. 259-296, *Royal Society of Chemistry*, London

Skjot, M., Kauppinen, S., Kofod, L. V., Fuglsang, C., Pauly, M., Dalboge, H., and Andersen, L. N. (2001). Functional cloning of an endo-arabinanase from *Aspergillus aculeatus* and its heterologous expression in *A. oryzae* and tobacco, *Mol. Genet. Genomics* **265**, 913-921.

Teplyakov, A., Fedorov, E., Gilliland, G. L., Almo, S. C., New York Structural Genomics Research Consortium (Nysgrc): (2005) Crystal Structure of Beta-Xylosidase from *Clostridium Acetobutylicum* PDB entry 1Y7B, To be Published

Terwilliger, T.C.& Berendzen, J. (1996). Correlated phasing of multiple isomorphous replacement data. *Acta Cryst. D* Jul 1;**52**(Pt 4):749-57.

Terwilliger, T. C. & Berendzen, J. (1999). Evaluation of macromolecular electron density map quality using the correlation of local r.m.s. density. *Acta Cryst D* **55**, 1872–7.

Uson, I. & Sheldrick, G. M. (1999). Advances in direct methods for protein crystallography. *Curr. Opin. Struct. Bio.* **19**, 643–8.

Utt, E. A., Eddy, C. K., Keshav, K. F., and Ingram, L. O. (1991). Sequencing and expression of the *ButyrVibrio fibrisonens* xylB gene encoding a novel bifunctional protein with beta-D-xylosidase and alpha-L-arabinofuranosidase activities, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1227-1234.

Vagin, A. und Teplyakov A.(1997). *MOLREP*: an Automated Program for Molecular Replacement, *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022-1025

Vagin A, Teplyakov A. (2000). An approach to multi-copy search in molecular replacement. *Acta Cryst. D.* **56**, 1622-1624

Viikari, L., J. Sundquist, and J. Kettunen. (1991). Xylanase enzymes promote pulp bleaching. *Paperi ja Puu - Paper and Timber* **73**:384-389.

Vocadlo, D.J., Davies, G.J., Laine, R. and Withers, S.G. (2001). Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, **412**, 835-838.

Weeks, C. M. & Miller, R. (1999). Optimizing Shake-and-Bake for proteins. *Acta Cryst. D* **55** (Pt 2), 492–500.

Whitehead, T. R., and Cotta, M. A. (2001). Identification of a broad-specificity xylosidase/arabinosidase important for xylooligosaccharide fermentation by the ruminal anaerobe *Selenomonas ruminantium* GA192, *Curr. Microbiol.* **43**, 293-298.

Winn, M.D., Isupov, M.N. and Murshudov, G.N. (2001). Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Cryst. D*, **57**, 122-133.

Witczak JZ, Nieforth KA (1997): *Carbohydrates in Drug Design*. New York: Marcel Dekker.

Wolfenden, R., Lu, X., und Young, G. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6814-6815.

Yu-dong, L., Harvey, I., Yuan-xin, G., Chao-de, Z., Yi-zong, H., Hai-fu, F., Hasnain, S. S. & Hao, Q. (1999). Is single-wavelength anomalous scattering sufficient for solving phases? A comparison of different methods for a 2.1 Å structure solution. *Acta Cryst D* **55** (Pt 9), 1620–1622.

Zechel, D.L. and Withers, S.G. (1999) Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.*, **33**, 11-18.

Zechel, D. L., and Withers, S. G. (2001). Dissection of nucleophilic and acid-base catalysis in glycosidases, *Curr. Opin. Chem. Biol.***5**, 643-649.

6 Anhang

A1 Kurzzusammenfassung

Die β -D-Xylosidase aus *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (E.C. 3.2.1.37, XynB3) gehört zu der Glykosid Hydrolasen Familie 43. Das Enzym hydrolysiert die glykosidische β -1,4- Bindung zwischen zwei Xylosezuckern in kurzen Xyloseoligosacchariden. Xylosidasen, und ist, gemeinsam mit anderen Hemicellulasen, an der vollständigen Zersetzung der pflanzlichen Hemizellulose beteiligt.

Die Struktur der XynB3 konnte mit Hilfe der Technik des Molekularen Ersatzes gelöst werden.

Das Enzym weist eine tetramer Quartärstruktur auf. Jedes Monomer besteht aus zwei Domänen, einer N-terminalen katalytischen *five-blade- β -propeller* Domäne und einer C-terminalen β -sandwich Domäne.

Bei der XynB3 findet man nicht die für invertierende Glykosidase klassische Architektur des aktiven Zentrums, sondern eine Topologie mit drei katalytischen Residuen. Diese Topologie wurde bislang sowohl bei anderen invertierenden Glykosidasen der Familie 43, als auch bei reternierenden Glykosidasen der Familien 32, 62 und 68 gefunden.

Neben der nativen XynB3 wurden auch die Strukturen von drei katalytisch kokristallisierten, inaktiven Punktmutanten (D15G, D128G und E187G) gelöst. Zwei dieser Mutanten (D128G und E187G) zeigen das im aktiven Zentrum gebundene natürliche Substrat Xylobiose in der Struktur. Die Kristallstrukturen der kokristallisierten Mutanten ermöglichen ein besseres Verständnis der Substratbindung. Und geben Aufschluss über die biochemisch beobachtete Substratspezifität und den Reaktionsmechanismus der XynB3 und der Familie 43 Glykosidasen im allgemeinen.

A2 Abstract

The β -D-Xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (E.C. 3.2.1.37, XynB3) is part of the glycoside hydrolase family 43. The enzyme hydrolyses the β -1,4 glycosidic bond between two xylose units in short xylooligosaccharides. Xylosidases are in association with other hemicellulases responsible for the complete degradation of herbal hemicellulose.

The structure of XynB3 was solved using molecular replacement techniques.

The Enzyme exhibits a tetrameric quaternary structure. Each monomer consists of two domains: one N-terminal catalytic five-blade- β -propeller domain and one C-terminal β -sandwich domain.

The XynB3's active site does not follow to the classic architecture of inverting glycosidases; it shows a topology of three catalytic residues instead. This topology was found in other inverting glycosidases of family 43, but also in retaining glycosidases of glycosid hydrolase families 32, 62 and 68.

Additionally to the native XynB3 structure, the structures of three catalytic cocrystallized inactive Mutants (D15G, D128G and E187G) were solved. Two of the three mutants (D128G and E187G) show the natural substrate xylobiose bound in the active site. The structures of the cocrystallized mutants allow a better understanding of the substrate binding and the observed biochemical substrate specificity while gaining insight into the reaction mechanism of the XynB3 and the family 43 glycosidases in general.

A3 Vorabveröffentlichungen

Brüx, C., Niefind, K., Ben-David, A., Leon, M., Shoham, G., Shoham, Y. and Schomburg, D., (2005) - Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a family 43 β -D-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6. Acta Cryst. F 2005, Volume F61, 1054-1057.

Brüx, C., Ben-David, A., Niefind, K., Leon, M., Shoham, G., Shoham, Y. and D., Schomburg (2006) - The Structure of an Inverting GH43 β -Xylosidase *from Geobacillus stearothermophilus* with its Substrate Reveals the Role of the Three Catalytic Residues. JMB 2006; accepted and to be published.

A4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Die strukturellen Komponenten des Xylans	2
Abbildung 1-2:	Der Reaktionsmechanismus der reternierenden Glykosidasen nach Koshland	6
Abbildung 1-3:	Mechanismus der invertierenden Glykosidasen	7
Abbildung 3-1:	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der XynB3	34
Abbildung 3-2:	MALDI-Massenspektrum der XynB3	37
Abbildung 3-3:	XynB3 Kristalle	40
Abbildung 3-4:	Selbstrotationsfunktionen der P ₂ ₁ 2 ₁ 2 Kristalle	45
Abbildung 3-5:	Selbstrotationsfunktionen der P ₄ ₃ 2 ₁ 2 Kristalle	47
Abbildung 3-6:	Elektronendichte der Aminosäure Val38	55
Abbildung 3-7:	Ramachandran-Plot der XynB3 E187G Mutante	56
Abbildung 3-8:	Die Faltung des XynB3 Monomers als Banddiagramm.	58
Abbildung 3-9:	Faltung der β -sandwich Domäne.	59
Abbildung 3-10:	Verteilung der Temperaturfaktoren des XynB3 Wildtyps.	60
Abbildung 3-11:	Interaktion zwischen zwei Monomeren	62
Abbildung 3-12:	Quartärstruktur des XynB3 Tetramers	64
Abbildung 3-13:	Quartärstruktur des XynB3 Tetramers	65
Abbildung 3-14:	Sequenzalignments der Xylosidasen aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i> und <i>Bacillus halodurans C-125</i> .	67 69
Abbildung 3-15:	Quartärstrukturen der Xylosidasen aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Clostridium acetobutylicum</i> .	74
Abbildung 3-16:	Phylogenetischer Stammbaum der Xylosidasen aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i> und <i>Bacillus halodurans</i> .	75
Abbildung 3-17:	Fluoreszenzscan des Selenomethionin derivatisierten Proteinkristalls.	76
Abbildung 3-18:	EDX-Spektrum einer Probe aus XynB3 Kristallen	77
Abbildung 3-19:	Koordination des Kalzium	79

Abbildung 3-20:	Lage des Metallatoms in der Tertiär- und Quartärstruktur	80
Abbildung 3-21:	Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums	81
Abbildung 3-22:	Struktureller Vergleich der katalytischen Aminoräuren der Familien GH32, GH43 und GH68	83
Abbildung 3-23:	Position des Substrates Xylobiose in den kokristallisierten Strukturen der Mutanten	85
Abbildung 3-24:	Darstellung des aktiven Zentrums dem mit gebundenen Substrat Xylobiose und den an der Reaktion beteiligten Aminosäuren	89
Abbildung 3-25:	Stereographische Darstellung des aktiven Zentrums	89
Abbildung 3-26:	Überlagerung des Xylobiosesubstrates, gebunden im aktiven Zentrum mit modellierten den Substraten, Galaktose, Arabinopyranose und Arabinofuranose	91
Abbildung 3-27:	Oberflächendarstellung der katalytischen Region der Familie 43 Glykosidasen XynB3 und α -L-Arabinanase aus <i>Cellvibrio japonicus</i> , mit jeweils gebundenem Substrat	93
Abbildung 3-28:	Oberflächendarstellung der XynB3	94
Abbildung 3-29:	Topologievergleich des Aktiven Zentrums der XynB3 mit der der α -L-Arabinanase aus <i>Cellvibrio japonicus</i>	95
Abbildung 3-30:	Überlagerung der katalytischen Zentren von XynB3 und Familie 43 α -L-Arabinanase aus <i>Cellvibrio japonicus</i> mit jeweils gebundenen Substraten Xylobiose und Oligoarabinofuranose.	96

A5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Verwendete Geräte	18
Tabelle 2-2	Sonstige Materialien	19
Tabelle 2-3	Computerprogramme	19
Tabelle 2-4	Übersicht über die verwendeten Kristallisations- <i>Screens</i>	23
Tabelle 2-5	Messparameter für die Datensätze der XynB3	27
Tabelle 3-1:	Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung	35
Tabelle 3-2:	Retentionsvolumen der Eichproteine und der XynB3 bei der Gelfiltrationschromatographie	36
Tabelle 3-3	Anfängliche Kristallisationsbedingungen	39
Tabelle 3-4	Übersicht über die optimierten Kristallisationsbedingungen	40
Tabelle 3-5	Ausgewählte kristallographische Parameter der XynB3 Datensätze	43
Tabelle 3-6	Packungsdichten der XynB3-Kristallformen $P2_12_12$ und $P4_32_12$	44
Tabelle. 3-7	Maxima der Selbstrotation der orthorhombischen Kristallform der XynB3.	46
Tabelle. 3-8:	Maxima der Selbstrotation der tetragonalen Kristallform der XynB3	47
Tabelle. 3-9	Ergebnisse der Kreuzrotationsrechnungen zum Molekularen Ersatz.	48
Tabelle. 3-10	Ergebnisse der Translations- und Verfeinerungsrechnung zum Molekularen Ersatz	49
Tabelle 3-11:	Qualitätsmerkmale der Struktur der Selenomethionin derivatisierten XynB3 nach ausgewählten Verfeinerungsschritten.	50
Tabelle 3-12	Ergebnisse der Rotations-, Translations und Verfeinerungsrechnung zum exemplarischen Molekularen Ersatz der tetragonalen Raumgruppe.	51
Tabelle 3-13:	Qualitätsmerkmale der Struktur der Selenomethionin	52

	derivatisierten XynB3 nach ausgewählten Verfeinerungsschritten	
Tabelle 3-14:	Qualitätsmerkmale der Struktur der kokristallisierten XynB3 Mutanten E187G nach ausgewählten Verfeinerungsschritten	52
Tabelle 3-15:	Qualitätsmerkmale der Struktur der nativen XynB3 nach ausgewählten Verfeinerungsschritten	52
Tabelle 3-16:	Qualitätsmerkmale der Struktur der kokristallisierten XynB3 Mutanten D15G nach ausgewählten Verfeinerungsschritten	52
Tabelle 3-17:	Qualitätsmerkmale der Struktur der kokristallisierten XynB3 Mutanten D128G nach ausgewählten Verfeinerungsschritten	53
Tabelle 3-18:	Ausgewählte Parameter der Verfeinerung der Selenomethionin derivatisierten, der nativen XynB3 sowie der Strukturen der drei kokristallisierten, katalytisch inaktiven Mutanten D15G, D128G, E187G.	54
Tabelle 3-19:	Berechnung der Kontaktflächen zwischen der Monomerkette A und den Ketten B, C und D sowie die Kontaktfläche der Dimere der Ketten A & D und der Ketten B & C.	65
Tabelle 3-20:	Vergleich der bei der Tetramerisierung beteiligten Aminosäuren zu äquivalenten Aminosäuren der Xylosidase aus <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Clostridium acetobutylicum</i> .	70
Tabelle 3-21:	Sequenzidentitäten zwischen der XynB3 und den Xylosidasen aus <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Clostridium acetobutylicum</i> auf Proteinebene.	71
Tabelle 3-22:	Anzahl der verschiedenen Aminosäureseitenketten, die an der Koordination diverser Metallatome in Proteinen beteiligt sind.	77
Tabelle 3-23:	Wasserstoffbrücken und Kontakte zwischen dem Substrat und den Residuen und Hauptkettenatomen der Mutanten D126G und E187G.	85

A6 Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von oben angegebenen Teilpublikationen (Abschnitt A3) - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Dietmar Schomburg betreut worden.

Christian Brück

A7 Lebenslauf Christian Brück

Persönliche Daten

Name: Christian Brück
Geburtsdatum: 25. Juni 1976
Geburtsort: Krefeld
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1982-86 Katholische Grundschule Gießerpfad, Krefeld
1986-95 Gymnasium Horkesgath, Krefeld
Schulabschluss Abitur

Wehrdienst

1995-96 Wehrdienst bei 9.SanBttl/7, Hamm und
1.PiBrBttl140, Emmerich

Studium

1996-97 Biologiestudium JWG Universität, Frankfurt
1997-19.12.01 Biologiestudium Universität zu Köln
Diplomarbeit: "Bindungs- und Strukturstudien des menschlichen
Keratinozyten-Wachstumsfaktors, komplexiert mit
der extrazellulären Domäne seines Rezeptors"
Studienabschluss Diplom Biologe

Promotion

ab 15. April 2002 Promotionsstudium am Institut für Biochemie der
Universität zu Köln; Arbeitskreis Schomburg.
Promotionsarbeit: "Strukturen der β -D-Xylosidase aus *Geobacillus*
stearothermophilus T-6 in verschiedenen kristallinen
und funktionellen Zuständen"