Röntgenkristallographische Studien von Nukleotidkofaktor-bindenden und tRNA-modifizierenden Enzymen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Tanja Sgraja

aus Schweinfurt

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen

am:	19.05.2004
Erstgutachter:	Prof. Dr. G. Klebe
Zweitgutachter:	PD Dr. K. Reuter
Tag der mündlichen Prüfung:	21.06.2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. G. Klebe und PD Dr. K. Reuter am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereiches Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Oktober 2000 bis April 2004 durchgeführt.

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
aqua bidest.	zweifach bidestilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuleinsäure (engl. *desoxy ribonucleic acid*)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
$FeSO_4$	Eisen-(II)-sulfat
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazino]ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthio-ß-galaktosid
kDa	Kilo-Dalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
Km	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
min	Minuten
MPD	2-Methyl-2,4-Pentandiol
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
$Na_xH_y(PO_4)$	Dinatriumhydrogenphosphat/Natriumdihydrogenphosphat
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
$NiSO_4$	Nickelsulfat
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*)
PDB	Protein-Datenbank (engl. *protein data bank*)
PEG	Polyethylenglykol
$preQ_0$	7-Cyano-7-deazaguanin
$preQ_1$	7-Aminomethyl-7-deazaguanin
QueA	S-Adenosylmethionin-tRNA-Ribosyltransferase/Isomerase
RNA	Ribonuleinsäure (engl. *ribonucleic acid*)
SAM	S-Adenosylmethionin

SCOP	engl. *structural classification of proteins*
SDR	Kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s	Sekunden
TCA	Trichloressigsäure
TGT	tRNA-Guanin Transglykosylase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

2 Die Kristallstruktur der Carbonylreduktase Sniffer aus *Drosophila melanogaster* 3

2.1 Einleitung 3
2.1.1 Neurodegenerative Erkrankungen 3
2.1.2 Funktion des Sniffer-Proteins 5
2.1.2.1 Die Fruchtfliege *D. melanogaster* 5
2.1.2.2 *In vivo*-Studien mit der Fruchtfliege *D. melanogaster* 6
2.1.2.3 Strukturelle Klassifizierung des Sniffer-Proteins 7
2.1.3 Faltungsmuster der Kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen 9
2.2 Ergebnisse und Diskussion 10
2.2.1 Kristallisation und Bewertung der Kristallqualität 10
2.2.2 Bestimmung der Kristallstruktur des Sniffer-Proteins 12
2.2.2.1 Molekularer Ersatz 12
2.2.2.2 Durchführung des MAD-Experiments 14
2.2.2.3 Modellbau 16
2.2.2.4 *Soaking*-Experimente mit Substrat 18
2.2.3 Kristallstruktur des Sniffer-Proteins 19
2.2.3.1 Tertiärstruktur 19
2.2.3.2 Quartärstruktur 22
2.2.3.3 Bindetasche des Kofaktors 25
2.2.3.4 Aktives Zentrum 27
2.2.3.5 Vergleich mit der Schweinecarbonylreduktase 31
2.3 Zusammenfassung und Ausblick 34
2.4 Material und Methoden 37
2.4.1 Präparation des nativen Sniffer-Proteins 37
2.4.1.1 Transformation und Expression 37
2.4.1.2 Zellaufschluss 38
2.4.1.3 Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie 38
2.4.1.4 Gehaltsbestimmung 39
2.4.2 Kristallisation 39
2.4.3 Präparation eines Selenomethionylderivats des Sniffer-Proteins 40

2.4.4 Röntgenbeugungsexperimente und Datenprozessierung 41
2.4.5 Molekularer Ersatz 41
2.4.6 Verfahren der anomalen Dispersion bei multiplen Wellenlängen 42
2.4.6.1 Durchführung des MAD-Experiments 43
2.4.6.2 Bestimmung der Startphasen 44
2.4.7 Modellbau und Verfeinerung 45
2.4.8 Analyse der Struktur 46
2.4.9 Ligandenbasiertes *Docking* 47

3 Die Rolle des Aspartat 280 in der katalytischen Reaktion der tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) 48

3.1 Einleitung 48
3.1.1 Biologische Funktion der TGT 48
3.1.1.1 Biosynthese von tRNA-Queuosin 48
3.1.1.2 Rolle der TGT in der Pathogenese von Shigellen 49
3.1.2 Kristallstruktur der *Zymomonas mobilis* TGT 50
3.1.2.1 Sekundärstruktur 51
3.1.2.2 Erkennung der tRNA durch die TGT 52
3.1.2.3 Aktives Zentrum 53
3.1.3 TGT im Komplex mit RNA-Substrat 53
3.1.4 Katalytischer Mechanismus der TGT 55
3.2 Ergebnisse und Diskussion 57
3.2.1 Biochemische Studien 57
3.2.1.1 Kinetische Charakterisierung verschiedener TGT(D264)-Enzyme 57
3.2.1.2 *band-shift*-Experimente 59
3.2.2 Kristallographische Studie der *Z. mobilis* TGT(D280E) 61
3.2.3 Relative katalytische Aktivität der *Z. mobilis* TGT(D280E) 65
3.3 Zusammenfassung und Ausblick 67
3.4 Material und Methoden 69
3.4.1 Präparation der *Z. mobilis* TGT(D280E) 69
3.4.1.1 Expression der *Z. mobilis tgt*(D280E) 69
3.4.1.2 Zellaufschluss 70
3.4.1.3 Aufreinigung mittels Säulenchromatographie 70
3.4.1.4 Gehaltsbestimmung 71
3.4.2 Röntgenstrukturanalyse der *Z. mobilis* TGT(D280E) im Komplex mit preQ$_1$ 71
3.4.2.1 Kristallisation der *Z. mobilis* TGT(D280E) 71

3.4.2.2 *Soaking* der Kristalle mit $preQ_1$ ... 72
3.4.3 Sammlung des Datensatzes ... 72
3.4.4 Verfeinerung des Datensatzes ... 72
3.4.5 Bestimmung der relativen spezifischen Aktivität ... 73
3.4.5.1 Enzymassay ... 73
3.4.5.2 Auswertung der kinetischen Daten ... 74

4 Die archaebakterielle tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) ... 76

4.1 Einleitung ... 76
4.1.1 Die Archaea *Archaeglobus fulgidus*, *Aeropyrum pernix* und *Pyrococcus horikoshii* ... 76
4.1.2 Eigenschaften der Proteine hyperthermophiler Organismen ... 78
4.1.3 Funktion der archaebakteriellen TGT ... 78
4.1.4 TGT aus *P. horikoshii* ... 80
4.1.4.1 Kristallstruktur der TGT im Komplex mit $preQ_0$ ... 80
4.1.4.2 Kristallstruktur der TGT im Komplex mit tRNA ... 82
4.2 Ergebnisse und Diskussion ... 84
4.2.1 Vergleich der TGTasen ... 84
4.2.2 Expressionssysteme und Reinigungsverfahren ... 86
4.2.3 Die *A. fulgidus* TGT ... 90
4.2.3.1 Proteinreinigung ... 90
4.2.3.2 Kristallisation ... 91
4.2.4 Die N-terminale Domäne der *A. fulgidus* TGT ... 94
4.2.4.1 Proteinreinigung ... 94
4.2.4.2 Kristallisation ... 96
4.2.5 Die C-terminalen Domänen der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT ... 96
4.2.6 Homologiemodelle der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT ... 98
4.3 Zusammenfassung und Ausblick ... 101
4.4 Material und Methoden ... 103
4.4.1 Biochemische Methoden ... 103
4.4.1.1 Amplifikation von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA mittels PCR ... 103
4.4.1.2 Mutagenese mittels PCR ... 104
4.4.1.3 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonucleasen ... 105
4.4.1.4 Agarosegelelektrophorese ... 106
4.4.1.5 Ligation ... 106

4.4.1.6 Kulturmedien ... 107
4.4.1.7 Transformation ... 107
4.4.1.8 Minipräparation der Plasmid-DNA ... 108
4.4.1.9 Maxipräparation der Plasmid-DNA ... 108
4.4.1.10 DNA-Sequenzierung ... 109
4.4.1.11 Gehaltsbestimmung der DNA ... 109
4.4.1.12 Polyacrylamid-Gelelektrophorese ... 109
4.4.1.13 Silberfärbung von Proteingelen ... 110
4.4.2 Klonierung der archaebakteriellen *tgt*-Gene ... 110
4.4.2.1 Primer ... 111
4.4.2.2 Plasmide ... 112
4.4.2.3 Bakterienstämme ... 112
4.4.3 Reinigung der archaebakteriellen TGT ... 113
4.4.3.1 Präparation der *A. fulgidus* TGT ... 113
4.4.3.2 Präparation der N-terminalen Domäne der *A. fulgidus* TGT ... 114
4.4.3.3 Präparation der C-terminalen Domänen der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT ... 115
4.4.4 Kristallisation der archaebakteriellen TGT ... 117
4.4.4.1 Kristallisation der *A. fulgidus* TGT ... 117
4.4.4.2 Kristallisation der N-terminalen Domäne der *A. fulgidus* TGT ... 118

5 Die Domänen der S-Adenosylmethionin: tRNA-Ribosyl-transferase/Isomerase ... 119

5.1 Das QueA-Enzym ... 119
5.1.1 Reaktionsmechanismus ... 119
5.1.2 Tertiärstruktur ... 120
5.1.3 Problemstellung ... 123
5.2 Ergebnisse und Diskussion ... 125
5.2.1 Die kleinere Domäne der QueA ... 125
5.2.2 Die größere Domäne der QueA ... 128
5.3 Zusammenfassung und Ausblick ... 131
5.4 Material und Methoden ... 133
5.4.1 Klonierung ... 133
5.4.2 Mutagenese ... 133
5.4.3 Expression und Reinigung ... 135
5.4.4 Gehaltsbestimmung ... 137

5.4.5 Kristallisation 137

Anhang 139

A. Sequenzalignment der archaebakteriellen TGT-Enzyme 139
B. Sequenzalignment der QueA-Enzyme 141
C. Überexpressionsvektoren 142

Literaturverzeichnis 146

1 Einleitung

Röntgenkristallographische Studien geben einen Einblick in die vielfältigen Strukturmotive von Proteinen sowie die spezifische Bindung der Liganden in die aktiven Zentren der Enzyme. Daraus lassen sich häufig wichtige Informationen über deren katalytische und physiologische Funktion ableiten. Diese Arbeit befasst sich mit der Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von potenziellen Arzneistofftargets sowie der Bestimmung von Enzymen mit neuartigen Strukturmotiven durch molekularbiologische und kristallographische Methoden. Die Arbeit ist in vier verschiedene Kapitel gegliedert, in denen Nukleotidkofaktor-bindende und tRNA-modifizierende Enzyme vorgestellt werden.

In Nukleotidkofaktor-bindenden Enzymen ist das Cosubstrat Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+), Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat ($NADP^+$), Flavinmononukleotid (FMN), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) oder Coenzym A (CoA) an der Reaktion beteiligt. Die Nikotinamid- und Flavin-Coenzyme katalysieren Redoxreaktionen, während beim Coenzym A häufig ein Acyltransfer stattfindet. Viele Organismen können bestimmte Cosubstrate oder ihre Vorstufen nicht selbst vollständig synthetisieren und müssen sie deshalb mit der Nahrung aufnehmen. Beispielsweise wird das Vitamin Nikotinamid für die Synthese des Cosubstrats NAD^+ bzw. $NADP^+$ benötigt [Voet & Voet, 1992].

Das Sniffer-Protein aus *Drosophila melanogaster* ist ein Nukleotidkofaktor-bindendes Enzym, welches das Nikotinamid-Cosubstrat NADPH spezifisch erkennt und an ein so genanntes Rossmann-Faltungsmuster bindet. Das Sniffer-Protein gehört zur Familie der Kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen. Die Kristallstruktur zeigt, dass das Sniffer-Protein im Hinblick auf seine Tertiärstruktur den Enzymen dieser Proteinfamilie ähnelt, jedoch gegenüber den meisten Kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen einige Besonderheiten im Bereich der Substratbindeschleife aufweist. Aus der Kristallstruktur ergibt sich eine interessante Schlussfolgerung auf eine mögliche Funktion der humanen Orthologen des Sniffer-Proteins im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen. *In vivo*-Studien haben eindrucksvoll gezeigt, dass bei einer reduzierten Expressionsrate des *sniffer*-Gens der altersabhängige neurodegenerative Prozess in den Fruchtfliegen beschleunigt wird [Botella et al., 2004].

Neben diesem eukaryontischen Enzym wurden tRNA-modifizierende Enzyme aus der Domäne Archaea und Eubakterien untersucht. Diese Enzyme erkennen spezifisch bestimmte Bereiche in der L-förmigen Tertiärstruktur der Transfer-RNA (tRNA). In der katalytischen Reaktion werden die Nukleotide der tRNA posttranslational modifiziert.

Die eubakterielle tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) spielt für die Expression beinahe aller wichtigen Virulenzfaktoren des Bakterienruhrerregers *Shigella* eine bedeutende Rolle. Das tRNA-modifizierende Enzym führt die modifizierte Base $preQ_1$ in die *wobble*-Position des

Antikodons bestimmter tRNAs ein. Dabei verläuft die katalytische Reaktion über ein kovalentes Intermediat, das zwischen der tRNA und dem Asp280 ausgebildet wird. In einer biochemischen und kristallographischen Studie wurde die Funktion des Asp280 näher untersucht.

Im Gegensatz zur eubakteriellen tRNA-Guanin Transglykosylase katalysiert das archaebakterielle Enzym den Einbau der modifizierten Base Archaeosin in die D-Schleife der meisten tRNAs. Im Vergleich zu den eubakteriellen TGTasen besitzen diese Enzyme eine zusätzliche, archaespezifische C-terminale Domäne, die ein neuartiges Faltungsmuster aufweist. Auch innerhalb der Domäne Archaea unterscheiden sie sich signifikant in der Länge dieser C-terminalen Domäne. Für die *Archaeglobus fulgidus* TGT wurde erfolgreich ein Reinigungsprotokoll etabliert und anschließend Kristallisationsversuche durchgeführt.

Auch die S-Adenosylmethionin: tRNA-Ribosyltransferase/Isomerase (QueA) zählt zu den tRNA-modifizierenden Enzymen. Das QueA-Enzym überträgt in einer außergewöhnlichen Reaktion den Riboserest des Nukleotid-Kofaktors S-Adenosylmethionin auf die Base $preQ_1$ in der modifizierten tRNA. Ein erstes Strukturmodell der *B. subtilis* QueA mit einer Auflösung von 3,0 Å ist mit extrem hohen B-Faktoren behaftet und wird gegenwärtig den Anforderungen an eine vollständige und zuverlässige Kristallstruktur nicht gerecht. Deshalb wurden die beiden deutlich voneinander abgegrenzten Domänen des QueA-Enzyms separat kloniert, produziert und gereinigt sowie Kristallisationsversuche durchgeführt.

2 Die Kristallstruktur der Carbonylreduktase Sniffer aus *Drosophila melanogaster*

2.1 Einleitung

2.1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Im letzten Jahrhundert führten verbesserte Lebensbedingungen und medizinischer Fortschritt zu einer Veränderung der Altersstruktur in unserer Gesellschaft. Durch die zunehmende Lebenserwartung der Menschen steigt jedoch auch die Zahl altersbedingter Erkrankungen. Dazu zählen neben den klassischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder der Apoplexie[1] auch die neurodegenerativen Erkrankungen, für deren Pathogenese erst in den letzten Jahren schlüssige Hypothesen entwickelt wurden [De Felice & Ferreira, 2002]. Intensive Studien seitens der akademischen Forschung und der pharmazeutischen Industrie tragen dazu bei, die Ursachen der neurodegenerativen Krankheiten aufzuklären, um neue therapeutische Strategien entwickeln zu können. Die genauen Vorgänge auf neuronaler und zellulärer Ebene sind bis heute noch nicht ausreichend verstanden, wodurch die Suche nach innovativen Therapiemöglichkeiten erschwert wird. Im Allgemeinen ist das Krankheitsbild der Neurodegeneration durch den fortschreitenden Untergang bestimmter Populationen von Nervenzellen im Gehirn und deren Ersatz durch Gliagewebe[2] gekennzeichnet [Gorman et al., 1996]. Neurodegenerative Erkrankungen treten vor allem sporadisch bei älteren Menschen ab einem Lebensalter von 60 Jahren auf. Die Wissenschaftler beschäftigen sich hauptsächlich mit der Fragestellung, warum besonders ältere Menschen von der Neurodegeneration betroffen sind und sich der Untergang des neuronalen Gewebes oft nur auf bestimmte Gehirnareale beschränkt.

Oxidativer Stress spielt bei der Pathogenese der neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle [Gorman et al., 1996]. Bei vielen zellulären Prozessen sind Radikale an enzymatischen Reaktionen beteiligt. Molekularer Sauerstoff fungiert beispielsweise in der Atmungskette der Mitochondrien als Elektronenakzeptor und bewirkt sekundär die Synthese des energiereichen Adenosintriphosphats [Boyer et al., 1977]. Reaktive Sauerstoffverbindungen können jedoch auch die zellulären Bestandteile wie Proteine oder DNA schädigen und die Ablagerung der Makromoleküle in neuronales oder zelluläres Gewebe fördern. Um die Schädigung der Zellkomponenten durch oxidativen Stress zu vermeiden, besitzen alle

[1] Apoplexie: Schlaganfall

[2] Gliagewebe: bindegewebige Stützsubstanz des Zentralnervensystems

aeroben Organismen ein Gleichgewicht innerhalb der Zelle, das die Bildung freier Radikale durch antioxidative Abwehrmechanismen reguliert [Gorman et al., 1996]. Durch eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen oder einen Mangel an Antioxidantien wird dieses Gleichgewicht empfindlich gestört [Schulz et al., 2000]. Die Radikalbildung wird besonders durch Stoffwechselprozesse in den Mitochondrien oder dem Arachidonsäure-metabolismus und durch hohe Konzentrationen von Metallionen innerhalb der Zelle induziert [Christen, 2000]. In den Einschlusskörpern von Alzheimer-Patienten wurde beispielsweise ein erhöhter Gehalt an Eisen gefunden. Die Konzentration reaktiver Sauerstoffverbindungen wird durch Antioxidantien wie Glutathion, Thioredoxin, Glutaredoxin oder Vitamin E und Enzyme wie Superoxiddismutase, Katalase oder Peroxidase gering gehalten [Smith et al., 1996]. Im Gegensatz zu anderen Organen des Körpers scheint das Zentralnervensystem aufgrund seiner geringen antioxidativen Aktivität nur unzureichend gegen oxidativen Stress geschützt zu sein. Darüber hinaus benötigt das menschliche Gehirn mit einem Anteil von nur 2 % der Gesamtkörpermasse bei körperlicher Ruhe etwa 20 % der Sauerstoffmenge des gesamten Organismus, was die Produktion von Radikalen besonders begünstigt [Dringen, 2000].

Alzheimer, Parkinson, Huntington und Creutzfeld-Jakob sind altersbedingte, neurodegenerative Erkrankungen, die gewöhnlich bei Menschen im mittleren bis späteren Lebensalter auftreten. Die Klassifizierung der verschiedenen neurodegenerativen Formen erfolgt gemäß ihrer Symptomatik, dem Krankheitsbild und den Vorgängen auf zellulärer Ebene [Shulman et al., 2003]. Alzheimer ist die häufigste Form der Demenz bei der älteren Generation. Die Patienten leiden vor allem unter Sprachproblemen sowie räumlicher und zeitlicher Desorientierung [Michaelis et al., 2002]. Histopathologisch ist die Krankheit durch die Ablagerung des Peptids ß-Amyloid in Einschlusskörpern des menschlichen Gehirns sowie die Aggregation des phosphorylierten Mikrotubulin-assoziierten Proteins Tau charakterisiert [De Felice & Ferreira, 2002]. Das idiopathische Parkinson-Syndrom ist die zweithäufigste Form der neurodegenerativen Erkrankungen. Durch Schädigung der von der Substantia nigra compacta[3] zum Corpus striatum[4] ziehenden dopaminergen Neurone im Zentralnervensystem entsteht ein Ungleichgewicht zwischen der dopaminergen und cholinergen Neurotransmission. Die Patienten leiden hauptsächlich an motorischen Bewegungsstörungen. Als fakultative Begleitsymptome treten vor allem vegetative Störungen und Depression auf [Mouradian, 2002]. Der starke Neuronenverlust und die Ablagerung der abnormen Form des Prionproteins im Gewebe des Gehirns führt bei der Creutzfeld-Jakob Krankheit symptomatisch zu einer rasch fortschreitenden Demenz sowie

[3] Substantia nigra compacta: Teil des extrapyramidal-motorischen Systems im Mittelhirn

[4] Corpus striatum: in der Basis jeder Großhirnhälfte seitlich des Thalamus liegendes Basalganglion

Ataxie[5] und motorischen Störungen [Knight, 2001]. Die Prionenerkrankungen des Menschen kommen als übertragene, genetische oder sporadische Form vor. Letztere ist die weltweit häufigste Erkrankungsform. Genetische Disposition spielt bei Huntington eine entscheidende Rolle, da Individuen mit einer Insertion eines Polyglutamats von mehr als 35 Aminosäuren im N-Terminus des Proteins Huntingtin ein höheres Risiko besitzen, an dieser neurodegenerativen Form zu erkranken [Bates, 2003]. Die genaue toxische Wirkung dieses modifizierten Enzyms ist bisher jedoch nicht bekannt. Die Krankheit ist durch Demenz, Ataxie[5] und Muskelatrophie[6] gekennzeichnet.

2.1.2 Funktion des Sniffer-Proteins

2.1.2.1 Die Fruchtfliege *D. melanogaster*

Zur Charakterisierung neurodegenerativer Prozesse werden häufig *Drosophila* Fliegen als Modellorganismus in *in vivo*-Studien verwendet. Deshalb wird die Fruchtfliege im Folgenden näher vorgestellt.

Die Spezies *D. melanogaster* gehört zur Klasse der Insekten [Wikipedia]. Der eukaryontische Organismus ist bevorzugt in tropischen Gebieten beheimatet, in der Sommerzeit aber auch in kühleren Regionen der Erde zu finden. Wie der deutsche Name vermuten lässt, sammelt sich dieses kleine Insekt bevorzugt an verfaulendem Obst. Sie wurde um 1910 von dem Nobelpreisträger (1933) Thomas Hunt Morgan als Versuchsobjekt der Genetik eingeführt. *Drosophila* wird seit fast einem Jahrhundert als Modellorganismus benutzt, um beispielsweise das Zusammenspiel zwischen Genregulation und Proteinproduktion aufzudecken. Viele Wissenschaftler arbeiten auch heute noch an ganz verschiedenen Aspekten mit der Fruchtfliege, insbesondere an der *Drosophila*-Entwicklung [Giot et al., 2003]. Ein großer Vorteil ist die geringe Größe der Fruchtfliege von etwa 4 mm (geringer Platzbedarf), die billige Haltung im Großmaßstab und die kurze Lebensdauer von ungefähr zwei Wochen. Mit Hilfe genetischer Transformationssysteme können fremde Gene in das Genom der Fliege eingeschleust und ihre Funktion im eukaryontischen Organismus studiert werden [Atkinson et al., 2001]. Weiterhin sind die Mutanten im Phänotyp vom Wildtyp leicht unterscheidbar. Das Genom der Fruchtfliege besteht aus nur vier Chromosomenpaaren, den XY Geschlechtschromosomen und den Autosomen 2, 3 und 4, wobei das vierte Chromosom sehr klein ist. Das Genom hat eine Größe von 117 Megabasen und enthält schätzungsweise

---

[5] Ataxie: Störung im geordneten Ablauf und in der Koordination von Muskelbewegungen

[6] Muskelatrophie: Muskelschwund

13400 Protein-kodierende Gene (zum Vergleich: das menschliche Genom umfaßt ca. 3000 Megabasen und etwa 30000 Gene). Das Genom wurde im Jahre 2000 von Craig Venter und seinen Mitarbeitern bei Celera Genomis vollständig sequenziert [Adams et al., 2000]. In der FlyBase-Datenbank sind Informationen über die Genetik, das Expressionsprofil und die zugehörigen Proteine von allen Spezies der Familie Drosophilidae verzeichnet [Flybase].

Abb. 1: Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gehört in die Ordnung der Zweiflügler (Diptera) in der Klasse der Insekten (Insecta) und damit zum Stamm der Gliederfüßler (Arthropeda).

2.1.2.2 *In vivo*-Studien mit der Fruchtfliege *D. melanogaster*

Um die Entstehung und den Verlauf neurodegenerativer Prozesse erforschen zu können, sind Tierversuche unentbehrlich. Zu diesem Zweck wird auch die Fruchtfliege *D. melanogaster* verwendet. Durch Manipulation des Genoms können menschliche Erkrankungen in der Fliege relativ einfach nachgeahmt werden [Shulman et al., 2003]. Das Zentralnervensystem der Fliege besteht aus Neuronen und Gliazellen und funktioniert nach den gleichen Prinzipien wie das menschliche Gehirn. Trotz des verhältnismäßig primitiven Aufbaus des *Drosophila*-Gehirns ist das Insekt lernfähig und besitzt ein Erinnerungsvermögen. Die Entschlüsselung des Genoms von *D. melanogaster* [Adams et al., 2000] und *Homo sapiens* [Lander et al., 2001; Venter et al., 2001] ermöglicht die Suche nach homologen Genen und Enzymen sowie den Vergleich der Expressionsprofile der beiden Organismen.

Eine *in vivo*-Studie mit der Fruchtfliege *D. melanogaster* lieferte einen Einblick in die Funktion des Sniffer-Proteins. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym bei neurodegenerativen Erkrankungen eine entscheidende Bedeutung hat [Botella et al., 2004]. Das *sniffer*-Gen ist im Genom auf dem X-Chromosom lokalisiert und wird in allen Gewebezellen unabhängig vom Alter der Fliege transkribiert. Um die Funktion des *sniffer*-Gens genauer analysieren zu können, wurde ein variables P-Element in das Gen integriert.

Dieses Transposon behindert die Transkription des *sniffer*-Gens, so dass in den Zellen der hypomorphen Mutante, genannt *Sniffer*, nur geringe Mengen des Sniffer-Proteins gegenwärtig sind. Die Veränderungen im Genotyp spiegeln sich auch im Phänotyp wider. Die *sniffer*-Fliegen besitzen im Gegensatz zum Wildtyp eine signifikant verkürzte Lebensdauer und leiden an altersbedingter Neurodegeneration sowie motorischen Bewegungsstörungen. Viele Symptome des veränderten Geno- und Phänotyps ähneln denen von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen. Histopathologische Analysen haben gezeigt, dass das Neuropil[7] in 25 Tage alten *sniffer*-Fliegen im Gegensatz zum gleichaltrigen Wildtyp, eine apoptotische[8] Morphologie aufweist. Dieser neurodegenerative Prozess ist altersabhängig. Bei 5 Tage alten Mutantenfliegen waren die Neuronen im Gewebe der Hirnrinde intakt und von Gliazellen umgeben, während 20 Tage später nur noch Zellfragmente und eine Vielzahl von Einschlusskörpern gefunden wurden. Beim Wildtyp konnte über den gesamten Zeitraum keine morphologische Veränderung des Gewebes festgestellt werden. In einem weiteren Experiment wurden die Fliegen einer Atmosphäre mit 99,5 % Sauerstoffgehalt ausgesetzt, um den Effekt des oxidativen Stresses zu untersuchen. Die Lebensdauer der *sniffer*-Fliegen und des Wildtyps verkürzte sich um etwa 90 %. Sowohl unter normalen als auch erhöhten Sauerstoffkonzentrationen der Luft konnte die apoptotische Wirkung durch verstärkte Transkription des *sniffer*-Gens deutlich reduziert und dadurch die Lebensdauer der Mutantenfliegen signifikant verlängert werden [Botella et al., 2004].

Diese Studie zeigt, dass Sniffer in *D. melanogaster* eine wichtige Funktion besitzt. Das Enzym schützt den Organismus vor altersbedingter Neurodegeneration, die häufig durch oxidativen Stress hervorgerufen wird. Unklar ist jedoch, welche natürlichen Substrate von Sniffer in *D. melanogaster* umgesetzt werden, in welchen Stoffwechselprozessen das Enzym involviert ist und wie Sniffer seine schützende Wirkung auf zellulärer Ebene ausübt.

2.1.2.3 Strukturelle Klassifizierung des Sniffer-Proteins

Die Mitglieder der Familie der Kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR) katalysieren die Umsetzung ihrer Substrate in einer NAD^+- bzw. NADPH-abhängigen Reaktion [Jörnvall et al., 1995]. Die Enzyme dieser Familie besitzen zwei hochkonservierte Bereiche in der Aminosäuresequenz, ein Glycin-reiches Motiv und ein Sequenzmotiv, das die katalytischen Reste Tyrosin und Lysin enthält. Diese charakteristischen Motive sind auch in der Primärsequenz des Sniffer-Proteins vorhanden. Kinetische Studien belegen die NADPH-

[7] Neuropil: dichtes Netzwerk aus Neuronen und Gliazellen im Zentralnervensystem

[8] apoptotisch: durch den kontrollierten Untergang von Zellen oder Gewebe gekennzeichnet

abhängige Aktivität von Sniffer, also seine Zugehörigkeit zu den Carbonylreduktasen innerhalb der SDR-Familie und zeigen, dass das Enzym eine breite Substratspezifität aufweist. Dabei wurden die kinetischen Parameter für verschiedene, artifizielle Substrate bestimmt, die bereits in früheren kinetischen Studien mit anderen SDR-Enzymen verwendet wurden [Terada et al., 2000]. In Tab. 1 sind die Substrate und die zugehörigen kinetischen Daten aufgelistet. Die höchste Affinität zu Sniffer besitzt das Substrat 9,10-Phenanthrenchinon, gefolgt von p-Nitrobenzaldehyd, Pyridin-4-carbaldehyd und Menadion. Methylglyoxal und Benzoylpyridin haben nur eine geringe Affinität zum Sniffer-Protein. Bei der Katalyse wird die Carbonylgruppe der Substrate stereospezifisch zum Alkohol reduziert.

Substrate	**K_M [µM]**	**V_{max} [U/mg]**	**k_{kat} [min^{-1}]**	**k_{kat}/K_M [$M^{-1} \times s^{-1}$]**
9,10-Phenanthrenchinon	1	23	640	11×10^6
p-Nitrobenzaldehyd	200	8,2	230	$1,8 \times 10^4$
Pyridin-4-carbaldehyd	350	8,5	240	$1,1 \times 10^4$
Menadion	250	4,7	130	$8,7 \times 10^3$
Methylglyoxal	3500	9,8	270	$1,3 \times 10^3$
Benzoylpyridin	550	0,78	22	$6,7 \times 10^6$

Tab. 1: Substratspezifität des rekombinanten Sniffer-Proteins. Die Carbonylreduktase Aktivität wurde nach Zugabe verschiedener Konzentrationen des Substrats spektrometrisch bei 340 nm anhand des Verbrauchs des Kofaktors gemessen.

Bisher werden nur wenige Enzyme der SDR-Familie in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen gebracht. Die Sepiapterin-Reduktase katalysiert die Umsetzung der Diketogruppe des 6-Pyrovyl-Tetrahydropterins zu Tetrahydrobiopterin. Das Produkt spielt bei der Biosynthese von Katecholaminen und Indolaminen eine wichtige Rolle und ist an der Degradation von Phenylalanin beteiligt [Auerbach et al., 1997]. Eine verminderte Produktion des Tetrahydrobiopterins in den Zellen des Zentralnervensystems fördert die Entstehung neurodegenerativer Prozesse. Die humane Hydroxylacyl-CoA Dehydrogenase vom Typ II, auch bezeichnet als ß-Amyloid bindende Alkoholdehydrogenase, ist an der ß-Oxidation von Fettsäureresten in den Mitochondrien beteiligt [Powell et al., 2000]. Durch Oxidation der Ketogruppe des ß-Hydroxybutyrats steigert das Enzym den metabolischen Stress innerhalb der Zelle. Die Fähigkeit des Enzyms, ß-Amyloid zu binden, fördert die Ablagerung des Peptids in Einschlußkörpern und führt zu einer Beeinträchtigung zellulärer und neuronaler Funktionen.

2.1.3 Faltungsmuster der Kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen

Die geringen Sequenzidentitäten zwischen den Kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen im Bereich von 15 bis 30 % sind ein typisches Merkmal für die Enzyme dieser Familie. Dagegen ist die strukturelle Ähnlichkeit sowie die Analogie in der Funktion verhältnismäßig hoch [Jörnvall et al., 1995]. Alle SDR-Enzyme besitzen ein Dinukleotid-Bindemotiv, die so genannte Rossmann-Faltung, die für die Bindung des NAD^+ oder $NADP^+$ verantwortlich ist [Rossmann et al., 1975]. Dieses Faltungsmuster besteht aus zwei ßαßαß-Einheiten, die über die Helix αC zu einem zentralen, parallelen ß-Faltblatt verbunden sind (Abb. 2). Die Helices flankieren das Faltblatt auf beiden Seiten, wobei die Helices der N-terminalen Hälfte oberhalb und die Helices der C-terminalen Hälfte unterhalb des Faltblattes liegen. In Abhängigkeit von der Bindung des Kofaktors NAD^+ oder $NADP^+$ werden die SDR-Enzyme in die Gruppe der Dehydrogenasen oder Reduktasen eingeteilt. Der Bindungsort des Kofaktors befindet sich an der C-terminalen Flanke des ß-Faltblattes. Unter physiologischen Bedingungen bilden die meisten SDR-Enzyme Homodimere oder Homotetramere nach einem ähnlichen Oligomerisierungsmuster aus [Jörnvall et al., 1995]. Die Schweinecarbonyl-reduktase ist bisher die einzige bekannte Kristallstruktur eines Enzyms aus dieser Familie, das als Monomer vorliegt [Ghosh et al., 2001].

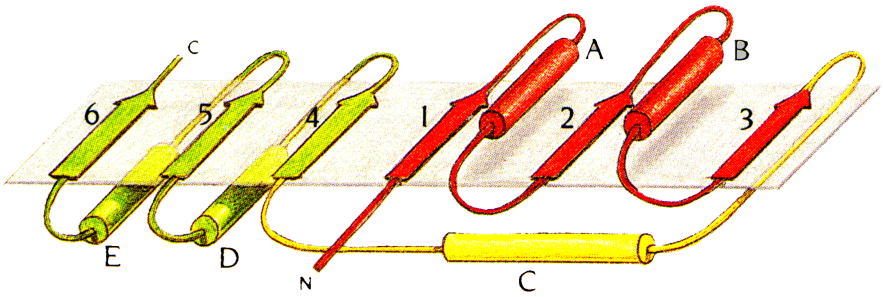


Abb. 2: Rossmann-Faltungsmotiv aus zwei ßαßαß-Einheiten, die zueinander über eine zweizählige Rotationsachse in der Mitte angeordnet sind. Folglich flankieren die Helices beide Seiten des ß-Faltblattes. Am C-Terminus des parallelen ß-Faltblattes wird der Kofaktor NADH oder NADPH gebunden [Abb. entnommen aus Branden & Tooze, s. 145].

2.2 Ergebnisse und Diskussion

2.2.1 Kristallisation und Bewertung der Kristallqualität

Die Sniffer-Kristalle wurden bei 4°C und einer Proteinkonzentration von 22 mg/ml nach dem Verfahren des hängenden Tropfens gezüchtet. Der Kristallisationstropfen, bestehend aus 1 µl Wasser, 3 µl Reservoirlösung und 3 µl Proteinlösung, wurde zuerst gegen die Reservoirlösung mit einer Präzipitanzkonzentration von 24 % PEG 4000 äquilibriert. Nach dem Ansetzen des Kristallisationstropfens bildeten sich die ersten, unter dem Mikroskop sichtbaren Kristallkeime bereits schon nach etwa einer Stunde. Schnelles Kristallwachstum begünstigt jedoch die Entstehung von ungeordneten Bereichen im Kristall und führt zu einer Verschlechterung der Kristallqualität. Außerdem wurden unter diesen Bedingungen häufig nur kleine Kristalle erhalten, die nicht für die Röntgenstrukturanalyse geeignet waren. Da die Kristalle durch die Methode des *makroseeding* nicht vergrössert werden konnten, wurden die Anfangsbedingungen im Kristallisationsansatz optimiert. Bei konstanter Puffer- und Salzkonzentration von 0,075 M Tris/HCl pH 8,5 und 0,15 M NaAc wurde nur die Präzipitanzkonzentration in der Reservoirlösung erniedrigt. In einem Konzentrationsbereich zwischen 16,5 und 21 % PEG 4000 wuchsen Kristalle in einer für die Röntgenstrukturanalyse geeigneten Grösse. Die Kristallqualität variierte in Abhängigkeit von der Proteincharge, so dass die Kristallisationsbedingungen nach jeder Proteinreinigung individuell optimiert werden mussten. Weiterhin wurde die Geschwindigkeit des Kristallwachstums herabgesetzt, in dem die zugegebene Wassermenge zum Kristallisationstropfen von 1 µl auf 3 µl erhöht wurde. Die Erniedrigung der Proteinkonzentration sowie die Zugabe von 3 bis 5 % MPD oder Glycerol zur Reservoirlösung hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Kristallisationsgeschwindigkeit.

Für die Durchführung der Röntgenbeugungsexperimente unter Tieftemperaturbedingungen wurden die Kristalle in einem Kälteschutzpuffer aus 0,075 M Tris/HCl, 0,15 M NaAc, 21 % (w/v) PEG 4000, 22 % MPD, 130 mM NaCl und 21 mM $Na_xH_y(PO_4)$-Puffer pH 8,0 *gesoakt*. Die Anwesenheit von Phosphat und Natriumchlorid im Puffer verbesserte deutlich die Stabilität der Kristalle beim *Soaking*. Dies läßt sich dadurch erklären, dass die Proteinlösung, die zum Ansetzen des Kristallisationstropfens verwendet wurde, nach der Reinigung gegen $Na_xH_y(PO_4)$-Puffer und NaCl dialysiert wurde. Die Suche nach einem geeigneten Kälteschutzmittel und einem Verfahren, die Kristalle ohne Qualitätsverlust in den Kälteschutzpuffer zu überführen, war eine besondere Herausforderung. Bei Verwendung des Kälteschutzmittels PEG 400 bzw. Glycerol lösten sich die Kristalle rasch auf. Mit Paratone-N bildete sich beim Frieren des Kristalls im Stickstoffstrom kristallines Eis, was an den so

genannten „Eisringen“ auf dem Beugungsbild erkennbar war. Ethylenglycol und MPD in einer Konzentration von 22 % im Kälteschutzpuffer waren am besten geeignet. Für weitere Experimente wurde das Kälteschutzmittel MPD gewählt. Der direkte Transfer der Kristalle von der Mutterlauge in den Kälteschutzpuffer mit 22 % MPD war nur mit sehr kleinen Kristallen möglich. Die größeren Kristalle waren beim schnellen Überführen in den Kälteschutzpuffer mechanisch instabil. Deshalb wurden die Kristalle bei 4°C alle 15 Minuten in einen Kälteschutzpuffer mit steigender Konzentration an MPD (2,5 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % und 22 %) überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Durch diese Prozedur konnten nun auch größere Kristalle für Röntgenbeugungsexperimente verwendet werden, die ein besseres Streuvermögen aufwiesen. Durch das langsame *Soaking* verbesserte sich die Auflösung um etwa 0,5 Å sowie das Reflexprofil, da eine weitere Erhöhung der Mosaizität verhindert wurde. Röntgenbeugungsexperimente bei Raumtemperatur haben ergeben, dass die hohe Mosaizität der Sniffer-Kristalle auch auf das schnelle Kristallwachstum zurückzuführen ist. Ein Kristall, der bei Raumtemperatur vermessen wurde, besaß eine Mosaizität von 1,35°. Alle Kristalle wiesen eine ausgeprägte Anisotropie auf, da sie die Röntgenstrahlung in Abhängigkeit von der Orientierung unterschiedlich stark beugten. Entlang einer Achse waren im Beugungsbild Reflexe bis zum maximal möglichen Auflösungsbereich zu erkennen, entlang der Senkrechten verringerte sich jedoch das Streuvermögen um etwa 0,7 Å. In einer Testserie zeigten nur wenige Kristalle ausreichende Qualität für eine Datensammlung. Für sehr große Kristalle ab einer Kantenlänge von 0,25 mm konnten keine geeigneten *Soaking*-Bedingungen etabliert werden.

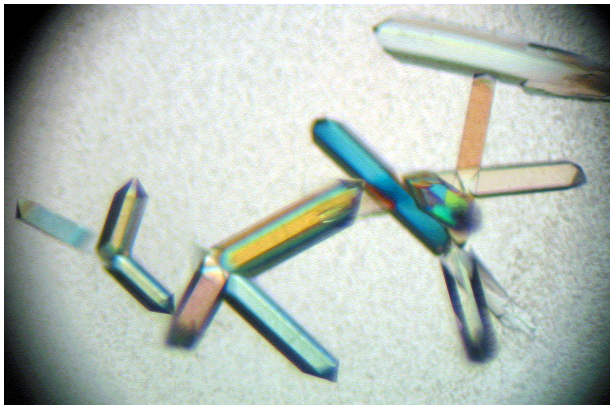


Abb. 3: Kristalle des Sniffer-Proteins aus *D. melanogaster* im polarisierten Licht.

2.2.2 Bestimmung der Kristallstruktur des Sniffer-Proteins

2.2.2.1 Molekularer Ersatz

Die Kristallstruktur des Sniffer-Proteins sollte zunächst mit der Methode des Molekularen Ersatzes bestimmt werden [Rossmann & Blow, 1962]. Dazu wurde ein nativer Datensatz mit einer Auflösung von 2,4 Å an einer im Institut vorhandenen Drehanode gesammelt, der für den Molekularen Ersatz verwendet wurde (Tab. 2). Die Analyse des Datensatzes ergab, dass das Enzym in der orthorhombischen Raumgruppe I222 mit einer Dimension der Zellachsen von a = 71,7 Å, b = 73,9 Å und c = 92,3 Å kristallisiert und ein Molekül in der asymmetrischen Einheit enthält.

	Nativer Datensatz
Raumgruppe	I222
Zellkonstanten:	
a (Å)	a = 71,44
b (Å)	b = 73,92
c (Å)	c = 91,95
Auflösung (Å)	25,0 - 2,4 (2,44 - 2,40)
Zahl der gemessenen Reflexe	27208
Zahl der unabhängigen Reflexe	9086
Redundanz	3,0 (3,1)
Vollständigkeit der Daten (%)	93,0 (90,4)
I/σ	17,4 (3,7)
R_{sym}^{*} (%)	9,1 (35,8)

Werte in Klammern kennzeichnen die Daten für die äußerste Schale.

*$R_{sym} = [\ \Sigma_h\Sigma_i\ |\ I_i(h) - \langle I(h)\rangle|\ /\ \Sigma_h\Sigma_i\ I(h)] \times 100$, wobei $I_i(h)$ die gemessene Intensität und $\langle I(h)\rangle$ die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist.

Tab. 2: Statistik des nativen Datensatzes mit einer Auflösung von 2,4 Å, der zum Molekularen Ersatz verwendet wurde.

Für die Bestimmung der Kristallstruktur der Carbonylreduktase Sniffer mit Hilfe des Molekularen Ersatzes wurde eine potentiell ähnliche Proteinstruktur als Startmodell benötigt. Verschiedene Enzyme aus der Familie der Kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen, die eine hohe strukturelle Homologie zum Sniffer-Protein aufweisen sollten, wurden als Modellstruktur ausgewählt. Diese besitzen nur eine geringe Sequenzidentität zum Sniffer-Protein von weniger als 30 %, die mit dem Programm SIM [Huang & Miller, 1991] aus der Expasy-Datenbank [Expasy] berechnet wurde. In Tab. 3 sind verschiedene Kurzkettige

Dehydrogenasen/Reduktasen nach ihrem Zugriffscode in der Protein-Datenbank (PDB) [Berman et al., 2000] aufgelistet. In blauer Farbe sind die Enzyme hervorgehoben, die als Modellstrukturen für den Molekularen Ersatz mit dem Programm AMoRe verwendet wurden [Navaza, 1994]. Eine Rotations- und Translationssuche mit der Modellstruktur der Schweinecarbonylreduktase mit dem PDB-*code* 1N5D, die die höchste Sequenzidentität zum Sniffer-Protein aufweist, wurde auch mit CNS [DeLano & Brünger, 1995], EPMR [Kissinger et al., 1999] und MOLREP [Vagin & Teplyakov, 1997] durchgeführt. Für alle Modellstrukturen wurden der Korrelationskoeffizient und der R-Faktor berechnet. Bei Korrelationskoeffizienten von etwa 25 bzw. R-Faktoren von 56 % hob sich keine der Lösungen aus der Rotations- und Translationssuche deutlich ab. Folglich konnte keine Aussage darüber getroffen werden, welche der möglichen Lösungsansätze für den Molekularen Ersatz geeignet sind.

PDB code	Sequenz-identität	PDB code	Sequenz-identität	PDB code	Sequenz-identität
1N5D	28,3 %	1I01	25,1 %	1G0O	23,4 %
1AE1	27,7 %	1B16	24,8 %	1JA9	23,4 %
1NFF	27,0 %	1A4U	24,7 %	1EK6	23,1 %
1HDC	26,2 %	1GCO	24,7 %	1N2S	23,0 %
1ENO	25,9 %	1H5Q	24,3 %	1GZ6	22,9 %
1DHR	25,9 %	1UDC	24,3 %	1DB3	22,8 %
1BDB	25,9 %	1E6W	24,2 %	1KEP	22,4 %
1EDO	25,9 %	1E6U	24,0 %	1BXK	22,2 %
1CYD	25,7 %	1E7W	24,0 %	1HDO	22,2 %
1AHH	25,7 %	1GEG	23,8 %	1QRR	21,8 %
1FMC	25,7 %	1BHS	23,6 %	1N7G	21,6 %
1QG6	25,7 %	1BVS	23,4 %	1G1A	21,4 %
1FJH	25,6 %	1EQ2	23,4 %	1K6X	21,0 %
1OAA	25,4 %	1HDR	23,4 %	1DU3	19,6 %

Tab. 3: Auflistung verschiedener Kurzkettiger Dehydrogenasen/Reduktasen, benannt nach ihrem Zugriffscode in der Protein-Datenbank (PDB). Diese sind gemäß ihrer Sequenzidentität zum Sniffer-Protein angeordnet. Die in blauer Farbe hervorgehobenen PDB-Zugriffscodes kennzeichnen die Enzyme, die als Modellstrukturen im Molekularen Ersatz getestet wurden.

Mit dem Programm MODELLER [Sali & Blundell, 1993] wurde ein Homologiemodell des Sniffer-Proteins erstellt. Das Modell und eines seiner ßαßαß-Untereinheiten wurden im

Molekularen Ersatz getestet, die Korrelation zwischen den beiden *Patterson maps* war jedoch außerordentlich gering. Für das Scheitern der Methode des Molekularen Ersatzes sind vermutlich bereits geringe Unterschiede in der Form und Anordnung der einzelnen Sekundärstrukturelemente zwischen der Modellstruktur und der unbekannten Proteinstruktur ausreichend.

2.2.2.2 Durchführung des MAD-Experiments

Die Phaseninformationen für die Kristallstruktur des Sniffer-Proteins wurde mit Hilfe des Verfahrens der anomalen Dispersion bei multiplen Wellenlängen (MAD = *multiple wavelength anomalous disperion*) bestimmt [Hendrickson et al., 1990]. Als anomale Streuer wurden Selenatome verwendet, die in Form von Selenomethioninresten in das Enzym eingebracht wurden. Das Proteinderivat konnte ohne Schwierigkeiten analog zu dem nativen Enzym aufgereinigt und kristallisiert werden. Der erfolgreiche Einbau des Selenomethionins in das Protein wurde durch MALDI-TOF bestätigt.

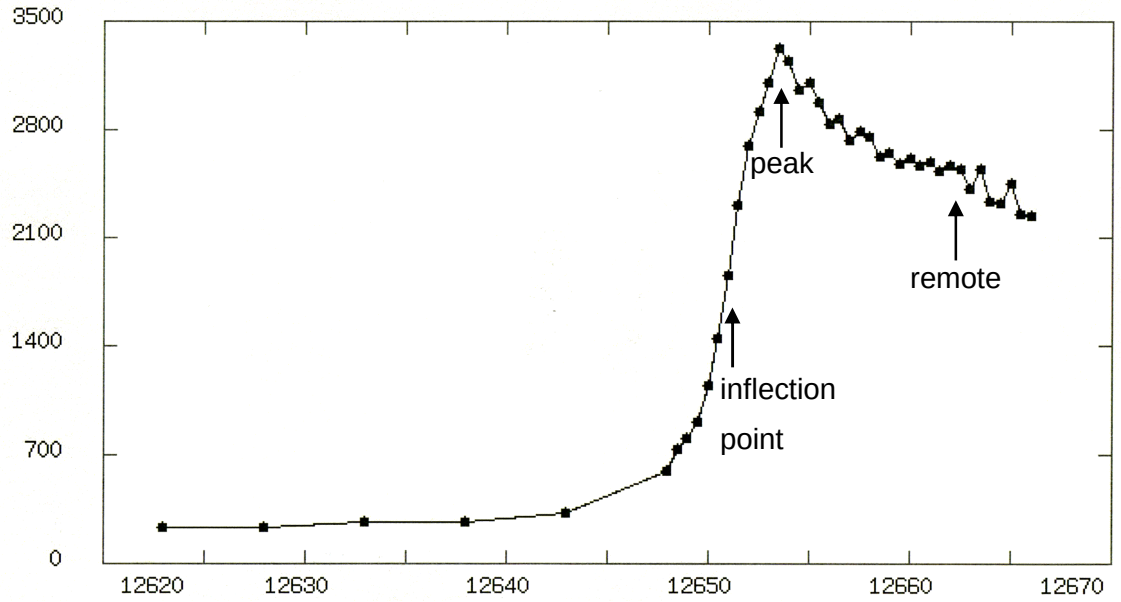


Abb. 4: Floureszenzspektrum vom Kristall des Selenomethionylderivats des Sniffer-Proteins, aufgenommen in der Proteinstrukturfabrik am BESSY, *Beamline* II in Berlin. Das MAD-Experiment wurde bei drei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt, bei der *remote* (0,932328 Å bzw. 13300 kEv), der *peak* (0,979944 Å bzw. 12654 kEv) und der *inflection point* (0,980163 Å bzw. 12651 kEv) Wellenlänge.

	MAD-Datensätze		
	peak	***inflection***	***remote***
Wellenlänge	0,979944	0,980163	0,932328
Zellkonstanten (Å)	a = 71,7	a = 71,7	a = 71,7
	b = 73,9	b = 73,9	b = 73,9
	c = 92,2	c = 92,2	c = 92,2
Raumgruppe	I222	I222	I222
Auflösung (Å)	30 - 1,95 (1,98 - 1,95)	30 - 1,90 (1,93 - 1,90)	30 - 1,75 (1,75 - 1,78)
Zahl der gemessenen Reflexe	132945	145059	179183
Zahl der unabhängigen Reflexe	17706	19277	24381
Redundanz	7,5 (7,4)	7,5 (7,4)	7,3 (7,3)
Vollständigkeit der Daten (%)	97,4 (99,3)	97,5 (99,5)	97,5 (98,7)
I/σ	19,1 (4,4)	22,9 (4,5)	22,7 (3,1)
R_{sym}*(%)	9,5 (45,6)	8,9 (48,4)	7,3 (49,8)
f´/f´´	-7,9/4,3	-9,4/2,3	2,5/-3,0

Zahlen in Klammern beziehen sich auf die äußerste Schale.

*$R_{sym} = [\Sigma_h\Sigma_i | I_i (h) - \langle I(h)\rangle | / \Sigma_h\Sigma_i I(h)] \times 100$, wobei I(h) die gemessene Intensität und <I(h)> die durchschnittliche Intensität für multiple Messungen ist.

Tab. 4: Statistik der Datensätze des MAD-Experiments, aufgenommen in der Proteinstrukturfabrik am BESSY, *Beamline* II in Berlin.

Mit mehreren Kristallen des Selenomethionylderivats wurden Beugungsexperimente am Röntgengenerator durchgeführt. Die Zellparameter, die Raumgruppe, die Kristallqualität und das Streuvermögen waren mit denen der Kristalle des nativen Sniffer-Proteins identisch. Ein einziger Kristall des Selenomethionylderivats von Sniffer wurde für das MAD-Experiment am Synchrotron BESSY, *Beamline* II in Berlin verwendet. In Abb. 4 ist ein Floureszenzspektrum gezeigt, das vor der Datensammlung von diesem Selenomethionyl-Kristall des Sniffer-Proteins aufgenommen wurde und als Grundlage für die Auswahl der einzelnen Wellenlängen für das MAD-Experiment diente. Das starke Absorptionssignal in der Nähe der K-Absorptionskante deutet auf ein starkes anomales Streuvermögen der Selenatome im Kristall hin. Aus dem Spektrum wurden auch die Streufaktoren f´ und f´´ für die Wellenlängen *peak* und *inflection point* berechnet. Die Sammlung der Daten erfolgte bei drei verschiedenen Wellenlängen (Abb. 4) nach der *inverse beam*-Methode. Das MAD-Experiment wurde über einen Zeitraum von fast sechs Stunden durchgeführt. Trotz Kühlung des Kristalls im Stickstoffstrom führte die lange Messdauer und die starke Synchrotronstrahlung zu einer Abnahme des Streuvermögens des Kristalls und damit zu

einer leicht reduzierten Qualität der Datensätze der *peak*- und *inflection point*-Wellenlänge. Alle relevanten statistischen Parameter aus dem MAD-Experiment sind in Tab. 4 zusammengefasst. Da alle gesammelten nativen Datensätze eine geringere Auflösung und eine höhere Mosaizität im Vergleich zu den Datensätzen aus dem MAD-Experiment aufwiesen, wurde die Sniffer-Struktur gegen den hochaufgelösten Datensatz bei der *remote*-Wellenlänge verfeinert

2.2.2.3 Modellbau

Die aus dem MAD-Experiment gewonnenen Phaseninformationen wurden gewichtet und zur Berechnung einer solvenskorrigierten Elektronendichtekarte benutzt. Diese Dichte wies einen gut definierten Kernbereich auf, der im Wesentlichen aus dem siebensträngigen ß-Faltblatt und einiger umliegenden α-Helices gebildet wurde. Das Programm ARP/wARP plazierte nach 200 Verfeinerungszyklen die Hauptkette von nur 138 der insgesamt 267 Aminosäurereste von Sniffer in die Elektronendichte [Lamzin & Wilson, 1993]. Die geringe Einbaurate spiegelt sich auch im niedrigen Konnektivitätsindex von 0,77 wider. Das erste Strukturmodell des Sniffer-Proteins umfasste im Wesentlichen die Stränge des ß-Faltblattes sowie die beiden Helices αE und αF, die an der Grenzfläche des Dimers liegen. Die Hauptkette der Sekundärstrukturelemente wurde unter Nutzung der *baton-build*-Funktion des Programms O in Form einer C_α-Spur manuell in die Elektronendichte eingepasst [Jones et al., 1991]. Schwierigkeiten bereitete die Verknüpfung der einzelnen Fragmente über die in der Dichte schlecht definierten Schleifenbereiche. Das Homologiemodell des Sniffer-Proteins wurde mit der unvollständigen Kristallstruktur im Programm O manuell überlagert und diente als Hilfe bei der Interpretation der Elektronendichte. Mit großer Sorgfalt wurden die Schleifenbereiche zwischen den einzelnen Sekundärstrukturelementen im Homologiemodell mit der Dichtekarte verglichen. Nur bei ausreichend definierter Elektronendichte wurden die Aminosäurereste in die Dichte eingefügt und die Sekundärstrukturelemente miteinander verbunden. Tyrosin- und Tryptophan-Seitenketten dienten als Erkennungsmarker für die Lokalisation der Aminosäurereste in der Kristallstruktur. Zuletzt wurde die Helix αC und die Substratbindeschleife, die Wassermoleküle sowie der $NADP^+$-Kofaktor in die Elektronendichte eingefügt. Die Verfeinerung der Kristallstruktur erfolgte zunächst mit dem Programm CNS [Brünger et al., 1998]. Nach mehreren Verfeinerungszyklen mit dem Programm SHELXL [Sheldrick & Schneider, 1997] wurden, aufgrund der hohen Anisotropie des Datensatzes, für die höchsten Schalen keine R-Werte mehr berechnet. Der Ausschluss der Option „anisotrope Korrektur“ führte zu einer dramatischen Verschlechterung des kristallographischen und des freien R-Faktors. Deshalb erfolgte die abschließende

Verfeinerung der Kristallstuktur mit dem Programm CNS. Eine Zusammenfassung der Verfeinerungsdaten ist in Tab. 5 gezeigt.

Verfeinerungsstatistik MAD	
Auflösung	30 - 1,75
R_{cryst}[a] (%)	24,7
R_{free}[b] (%)	28,4
rmsd Bindungslängen (Å)	0,005
rmsd Bindungswinkel (°)	1,2
Anzahl der Atome	
Protein	1848
$NADP^+$	48
Wasser	57
Durchschnittlicher B-Faktor	
Protein (Å^2)	33,8
Hauptkette (Å^2)	32,9
Seitenkette (Å^2)	34,8
$NADP^+$ (Å^2)	33,6
Wasser (Å^2)	33,9
Ramachandran Diagramm	
besonders bevorzugt (%)	90,1
zusätzlich erlaubt (%)	9,4
allgemein erlaubt (%)	0,5
verboten (%)	0

[a] $R_{cryst} = \Sigma_{hkl} | F_o - F_c | / \Sigma_{hkl} | F_o |$
[b] Der R_{free}-Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflexen aus 5% der Daten berechnet.

Tab. 5: Statistik der Verfeinerung der Sniffer-Proteinstruktur. Die Kristallstruktur wurde gegen den Datensatz bei der *remote*-Wellenlänge verfeinert.

Die finale Kristallstruktur des Sniffer-Proteins besteht aus 248 Aminosäureresten, dem Kofaktor $NADP^+$ und 57 Wassermolekülen in der asymmetischen Einheit. Die Kristallstruktur im Komplex mit $NADP^+$ mit einer Auflösung von 1,75 Å wurde bis zu einem kristallographischen R-Faktor von 24,7 % und einem freien R-Faktor von 28,4 % verfeinert. Die R-Werte sowie die erhöhten Temperaturfaktoren des Proteins von 33,8 Å^2 weisen darauf hin, dass einige Bereiche des Enzyms eine gesteigerte Flexibilität besitzen. Der durchschnittliche B-Faktor ist im N-Terminus (41,7 Å^2), der die Aminosäurereste 1 bis 80 umfasst, und im Bereich der Substratbindeschleife (43,6 Å^2) im Vergleich zum restlichen

Protein signifikant erhöht. Eine auffallend hohe Flexibilität hat vor allem die Helix αC mit einem durchschnittlichen B-Wert von 54,5 $Å^2$. Die erhöhte Flexibilität des Proteins könnte erklären, warum das Programm ARP/wARP nur 52 % der Kristallstruktur des Sniffer-Proteins in die Elektronendichte bauen konnte. In der Kristallstruktur sind die Aminosäuren 10 bis 18, 22 bis 26 sowie 37 bis 53 nur unzureichend in der Elektronendichte definiert, konnten jedoch in die Proteinstruktur integriert werden. Der aus 19 Aminosäurenresten bestehende His-*tag* am N-Terminus des Proteins, wurde aufgrund fehlender Elektronendichte nicht in das Strukturmodell eingefügt. Die Seitenketten der Aminosäuren 40, 41, 43, 47 und 229 waren in der Elektronendichte nicht ausreichend geordnet und wurden als Alanine in die Kristallstruktur eingebaut. Die Güte des Strukturmodells spiegelt sich im Ramachandran Diagramm wider, in dem 90,1 % der Aminosäurereste in „besonders bevorzugten" Regionen zu finden sind und kein Rest im „verbotenen“ Bereich liegt.

2.2.2.4 *Soaking*-Experimente mit Substrat

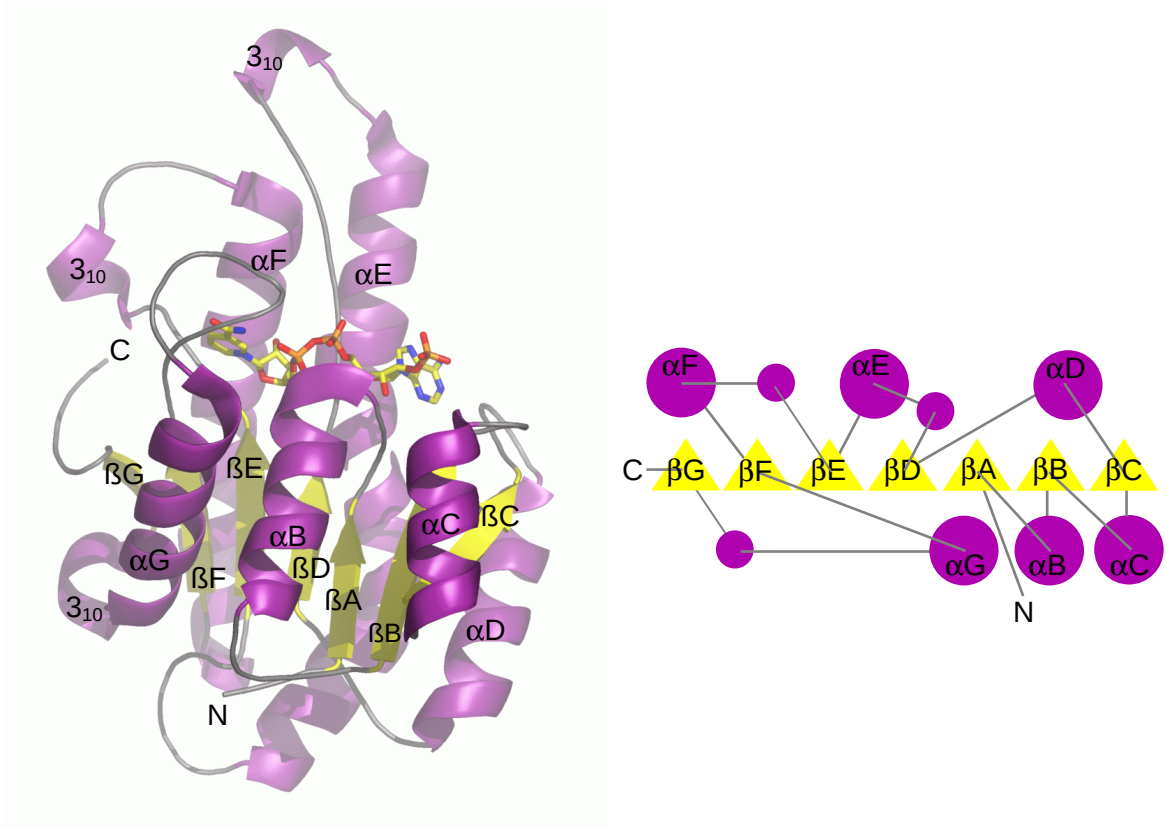
Um die Kristallstruktur des Sniffer-Proteins im Komplex mit Kofaktor und Substrat zu erhalten, wurden die kommerziell erhältlichen Substrate p-Nitrobenzaldehyd und 9,10-Phenanthrenchinon verwendet. Die Sniffer-Kristalle wurden dazu in einen Tropfen bestehend aus 0,075 M Tris/HCl, 0,15 M NaAc, 21 % (w/v) PEG 4000, 130 mM NaCl, 21 mM $Na_xH_y(PO_4)$-Puffer pH 8,0 und Substrat transferiert. Beim *Soaking*-Verfahren gelangt das Substrat durch Diffusion zwischen den Wasserkanälen der einzelnen Proteinmoleküle innerhalb des Kristalls an seinen Bindungsort. Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist die ausreichende Löslichkeit des Substrats im *Soaking*-Puffer, eine ausreichend hohe Bindungsaffinität des Liganden zum Protein und der freie Zugang des Liganden zur Bindetasche. Eine Überprüfung des aktiven Zentrums des Sniffer-Proteins und der Kristallpackung zeigte, dass die Bindetasche für den Liganden zugänglich sein sollte.
Allerdings bereitete die Löslichkeit der Substrate Probleme. Sie waren nur unzureichend in Wasser löslich. DMSO konnte aufgrund seines Schmelzpunktes bei 20°C nicht für *Soaking*-Experimente bei 4°C verwendet werden. Die Substrate wiesen eine gute Löslichkeit in 100 %igen, organischen Lösungsmitteln wie Ethanol, Methanol, Dimethylformamid, Aceton bzw. Acetonitril auf. Allerdings konnte aufgrund der geringen Verträglichkeit der Kristalle gegenüber organischen Lösungsmitteln für das *Soaking* das Substrat p-Nitrobenzaldehyd nur in einer Konzentration von 0,6 mM (Ethanol) bzw. 2,5 mM (Methanol) eingesetzt werden. Die Endkonzentration des Substrats 9,10-Phenanthrenchinon im *Soaking*-Puffer war noch geringer als die des p-Nitrobenzaldehyds. Die Zeitdauer des *Soaking* musste auf wenige Stunden begrenzt werden. Um die Diffusion des Substrats aus dem Kristall in den

Kristallisationstropfen beim *Soaking* im Kälteschutzpuffer zu vermeiden, wurde diesem das Substrat zugesetzt. Die geringe Löslichkeit der Substrate könnte der Grund dafür gewesen sein, warum in der Kristallstruktur in der Bindetasche des Sniffer-Proteins keine Elektronendichte sichtbar war, die einem Substratmolekül hätte zugeordnet werden können.

2.2.3 Kristallstruktur des Sniffer-Proteins

2.2.3.1 Tertiärstruktur

Die Kristallstruktur des Sniffer-Proteins aus *D. melanogaster* im Komplex mit $NADP^+$ enthält ein Molekül in der asymmetrischen Einheit. Das Enzym bildet jedoch sowohl in Lösung als auch im Kristall ein Homodimer. Bei der Reinigung von Sniffer über die Gelfiltrationssäule erfolgte die Elution bei einem Volumen von 200 ml, was dem Molekulargewicht eines dimeren Proteins entspricht. Durch Symmetrieoperationen entlang der zweifachen, kristallographischen Rotationsachse im Kristall wird eine Untereinheit in das symmetrieverwandte Molekül des Dimers überführt. Eine Untereinheit besitzt ein Molekulargewicht von 28 kDa und besteht aus einer Domäne, in der die α-Helices und ß-Stränge alternierend miteinander verknüpft sind. Dieses Faltungsmuster ist charakteristisch für die Enzyme der Kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR), die eine bemerkenswerte Homologie in ihrer Tertiärstruktur aufweisen, obwohl sie untereinander nur eine geringe Sequenzidentität von weniger als 30 % besitzen [Jörnvall et al., 1995]. Neben der strukturellen Analogie haben diese Enzyme aufgrund hochkonservierter Aminosäurereste im aktiven Zentrum auch eine ähnliche katalytische Funktion. Die Architektur des Sniffer-Proteins ist mit dem Aufbau der Kristallstrukturen anderer SDR-Enzyme vergleichbar. Die Tertiärstruktur einer Untereinheit des Sniffer-Proteins und das zugehörige Topologieschema sind in Abb. 5 gezeigt. Alle Kurzkettigen Dehydrogenasen/ Reduktasen bestehen aus einem Dinukleotid-Bindemotiv, der so genannten Rossmann-Faltung, die aus zwei ßαßαß-Einheiten aufgebaut ist [Rossmann et al., 1975]. Dieses Faltungsmotiv ist für die Bindung des Kofaktors verantwortlich und bildet ein sechssträngiges ß-Faltblatt aus, das von helikalen Strukturelementen umgeben ist. In den Proteinstrukturen der SDR-Enzyme sind weitere Sekundärstrukturelemente integriert, die dem Enzym seine charakteristischen Eigenschaften wie beispielsweise Substratspezifität oder Quartärstruktur verleihen.



(I) (II)

Abb. 5: Tertiärstruktur (I) und Topologiediagramm (II) einer Untereinheit des Sniffer-Proteins. Die endständigen Amino- und Carboxylgruppen der Kristallstruktur sind mit N bzw. C gekennzeichnet. Die Zuweisung der Sekundärstrukturelemente erfolgte mit dem Programm PROMOTIF [Hutchinson & Thornton, 1996] und sind gemäß ihrer Anordnung im Protein benannt. Die ß-Stränge sind in gelb, die α-Helices in lila hervorgehoben. (I) Das $NADP^+$-Molekül befindet sich am C-Terminus des ß-Faltblattes. (II) In dem Topologieschema sind die Helices als Kreise und die ß-Stränge als Dreiecke dargestellt. Die kleinen Kreise repräsentieren 3_{10}-Helices. Die Kolorierung erfolgte analog zur Tertiärstruktur.

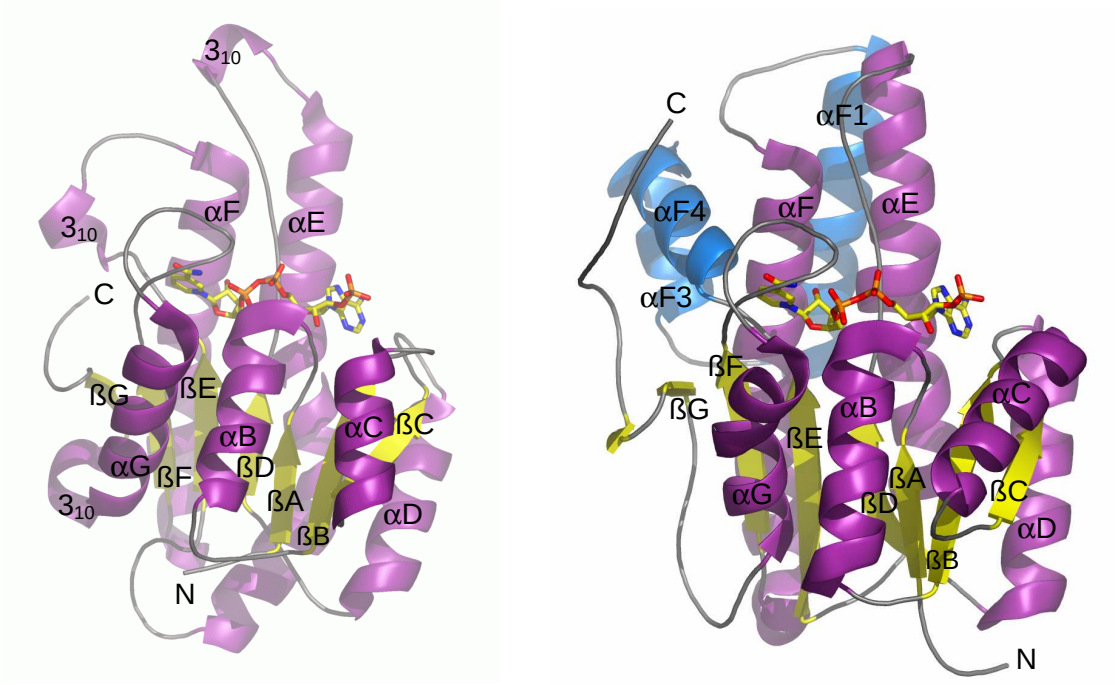
Das Sniffer-Protein besteht aus einem parallelen, siebensträngigen ß-Faltblatt, das auf der einen Seite von den Helices αD, αE und αF, und auf der anderen Seite von den Helices αB, αC und αG flankiert wird. Zusätzlich sind drei 3_{10}-Helices zwischen dem Strang ßD und der Helix αE, dem Strang ßE und der Helix αF bzw. der Helix αG und dem Strang ßG in die Kristallstruktur eingefügt. Am C-Terminus des ß-Faltblattes war in der Elektronendichte ein grosser, zusammenhängender Bereich in der positiven F_o-F_c-Dichte zu erkennen, in die mühelos der Kofaktor eingefügt werden konnte. Das eingebaute $NADP^+$-Molekül nimmt eine ähnliche Konformation wie der Kofaktor in anderen SDR-Enzymen ein. Da dem Kristallisationstropfen kein NADPH zugegeben wurde, stammt der Kofaktor vermutlich aus

dem *E. coli* Expressionsstamm und blieb während der Reinigung des Sniffer-Proteins in der Kofaktorbindetasche gebunden.

Im Vergleich zu den anderen Mitgliedern dieser Familie weist das Sniffer-Protein signifikante Unterschiede im Bereich der Substratbindeschleife auf. Normalerweise sind zwischen dem Strang ßF und der Helix αG mehr als 20 Aminosäurereste in das Enzym integriert. In der apo-Struktur sowie im binären Komplex mit Kofaktor ist die Substratbindeschleife durch ihre hohe Flexibilität meistens nur unzureichend in der Elektronendichte geordnet. Erst im ternären Komplex mit Kofaktor und Substrat ist diese Region, die bevorzugt aus helikalen Sekundärstrukturelementen geformt wird, geordnet und spielt bei der spezifischen Erkennung des Substrats eine wichtige Rolle. Im Sniffer-Protein sind keine Sekundärstrukturelemente in der Substratbindeschleife vorhanden. Eine relativ kurze Schleife, die bereits im binären Komplex mit $NADP^+$ in der Elektronendichte lokalisiert werden konnte, verbindet den Strang ßF mit der Helix αG. Die geordnete Konformation der Substratbindeschleife bildet sich offensichtlich nach der Bindung des Kofaktors aus, der beinahe vollständig von dem Sniffer-Protein umschlossen wird. Die Substratbindeschleife fungiert dabei als Deckel, die sich über den Nikotinamidrest und die benachbarten Phosphatgruppen legt und auf diese Weise das aktive Zentrum des Enzyms weitgehend vom Solvens abschirmt. Weitere strukturelle Änderungen sind bei der Bindung des Substrats nicht zu erwarten. Der Zugang zum aktiven Zentrum ist für das Substrat weiterhin über den C-Terminus des Sniffer-Proteins möglich. Die Struktur der Substratbindeschleife in Sniffer ist zu dem Faltungsmotiv in der monomeren Schweinecarbonylreduktase (PTCR) [Ghosh et al., 2001] sehr ähnlich. Bei einer Datenbanksuche nach strukturell homologen Proteinen mit dem Programm DALI [Holm & Sander, 1993] wurde die Schweinecarbonylreduktase mit einem z-Wert von 21,6 bewertet (bei $z < 2$ werden die Strukturen als verschiedenartig eingestuft). Dieses monomere Enzym besitzt, abgesehen von der 41 Aminosäuren umfassenden Insertion nach dem Strang ßE, nicht nur die höchste Sequenzidentität zu dem Sniffer-Protein, sondern auch die größte strukturelle Homologie (Abb. 6).

Die Länge und die Form des C-Terminus sind bei den SDR-Enzymen sehr unterschiedlich ausgeprägt. In der humanen 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase [Ghosh et al., 1995] beispielsweise besteht der C-Terminus aus mehreren α-Helices. In der Kristallstruktur der *Drosophila* Alkohol-Dehydrogenase [Benach et al., 1998] ist ein achter ß-Strang in das ß-Faltblatt inseriert, der antiparallel zum benachbarten Strang ßG liegt. Die Enoyl-Acyl-Carrier Protein Reduktase [Rafferty et al., 1995] dagegen besitzt zwei 3_{10}-Helices in ihrer C-terminalen Region. Im Sniffer-Protein besteht der C-Terminus nur aus wenigen Aminosäureresten. Nach dem Strang ßG verläuft die Schleife fast senkrecht zum zentralen ß-Faltblatt und berührt an ihrem Ende die 3_{10}-Helix, die zwischen dem Strang ßE und der

Helix αF integriert ist. Der C-Terminus ist an der Stabilisierung des Dimers beteiligt, scheint jedoch bei der spezifischen Erkennung des Substrats keine Rolle zu spielen.



(I) (II)

Abb. 6: Tertiärstruktur einer Untereinheit des dimeren Sniffer-Proteins (I) und der monomeren Schweinecarbonylreduktase (PTCR) (II) im Komplex mit $NADP^+$. Die Kolorierung erfolgte analog zur Tertiärstruktur in Abb. 6 I. (II) Die Helices in blau verhindern die Ausbildung des Dimers in PTCR und sind folglich in Sniffer nicht vorhanden.

2.2.3.2 Quartärstruktur

Sowohl das Verhalten des Sniffer-Proteins bei der Gelfiltration als auch die Kristallstruktur zeigen, dass es ein Homodimer bildet. Die Grenzflächenregion des Dimers lieferte innerhalb des Kristalls die ausgedehnteste Proteinkontaktfläche. Sie entsteht, indem die langen Helices αE und αF zweier Untereinheiten zusammen ein Vierhelixbündel bilden, das vor allem durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird (Abb. 7). Mit einer einzigen Ausnahme treten die Untereinheiten bei allen bekannten dimeren SDR-Enzymen nach genau diesem Muster miteinander in Wechselwirkung. Lediglich in der 3α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *Comamonas testosteroni* wird das Dimer entlang einer Ebene geformt, die sonst zur Ausbildung von SDR-Tetrameren benötigt wird [Grimm et al., 2000a]. In Sniffer sind zwei Prolinreste, Pro119 und Pro128, in die Helix αE integriert. Diese Helixbrecher verursachen einen Knick innerhalb des Sekundärstrukturelements, wodurch wahrscheinlich

die Dimerisierung der beiden Untereinheiten erleichtert wird. Das C-terminale Drittel der Helix αE ist nicht an der Ausbildung der Grenzfläche beteiligt.

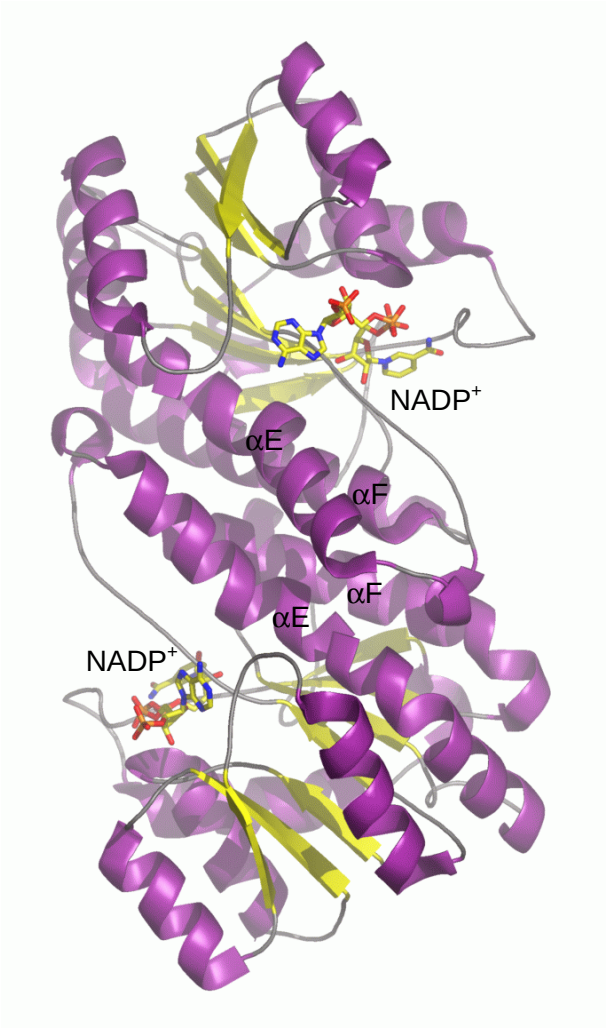


Abb. 7: Struktur des Dimers im Komplex mit $NADP^+$. Die beiden Untereinheiten des Sniffer-Proteins können über eine zweifache, kristallographische Symmetrieachse ineinander überführt werden. Die Grenzfläche des Dimers wird hauptsächlich durch die Helices αE und αF der beiden Untereinheiten gebildet.

Neben dem Vierhelixbündel stabilisieren auch die 3_{10}-Helix (Aminosäurereste 159-163), die zwischen dem Strang ßE und der Helix αF in die Kristallstruktur integriert ist, und der C-Terminus die dimere Struktur des Sniffer-Proteins (Abb. 8). Die C-terminalen Schleifen der beiden Untereinheiten nähern sich einander und berühren an ihren Enden die 3_{10}-Helix der jeweils benachbarten Untereinheit. Dabei interagiert das planare Indolsystem der Trp248-Seitenkette über van-der-Waals-Kontakte mit der Seitenkette des Ile159 (3,5 Å), die in der 3_{10}-Helix lokalisiert ist. Beim Bau des Strukturmodells konnte der Hauptketten-Carbonylgruppe von Trp248 zwei Konformere zugewiesen werden. Das Sauerstoffatom der

beiden alternativen Konformere stabilisiert die Faltung der 3_{10}-Helix durch intramolekulare Interaktion mit den Hauptkettenamiden des Ile159 (2,8 Å) und Glu160 (3,2 Å). Die Seitenkette von Lys182 liegt an der Oberfläche der Helix αF und weist mit ihrer endständigen Aminogruppe in Richtung der 3_{10}-Helix und des C-Terminus. Über ein Wassermolekül formt die ζ-Aminogruppe eine intramolekulare Wasserstoffbrücke (2,9 und 2,8 Å) zum benachbarten Stickstoffatom der Trp248-Seitenkette, bindet aber gleichzeitig auch an das Hauptketten-Carbonyl-Sauerstoffatom von Ile159 der benachbarten Untereinheit (3,0 Å). Die Aminogruppe der Asn162-Seitenkette bildet an der Grenzfläche der beiden Untereinheiten polare Kontakte zu der Hydroxylgruppe des Ser183 (2,9 Å) und über ein Wassermolekül zur Carbonylgruppe des Ala179 (2,8 und 3,0 Å) aus.

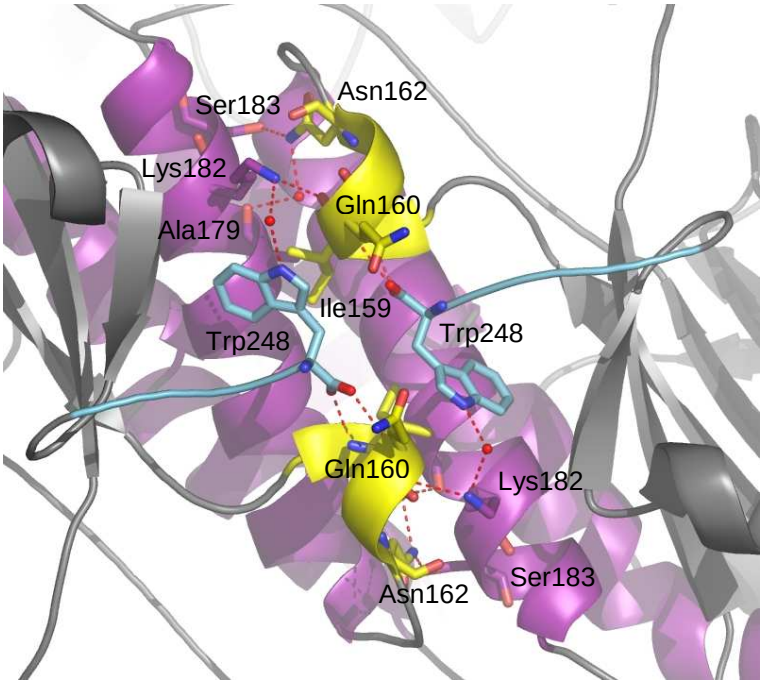


Abb. 8: Die 3_{10}-Helix zwischen dem Strang ßE und der Helix αF (gelb) sowie die C-terminale Schleife (hellblau) sind an der Ausbildung der Kontaktfläche zwischen den beiden Untereinheiten des dimeren Sniffer-Proteins beteiligt. Diese Strukturelemente befinden sich in unmittelbarer Nähe zu den beiden Helices αE und αF, die lila gefärbt sind. Die Aminosäurereste, die mit der benachbarten Untereinheit interagieren, sind als Stabmodell dargestellt und in Analogie zur Kristallstruktur nummeriert. Wasserstoffbrücken sind als rote, gestrichelte Linien und Wassermoleküle als rote Kugeln hervorgehoben.

Interaktionen zwischen Proteinen können durch viele verschiedene Eigenschaften wie beispielsweise die Größe und Form der Kontaktfläche oder die Polarität der Aminosäurereste in der Grenzflächenregion charakterisiert werden [Jones & Thornton, 1996]. Die

lösungsmittelzugängliche Oberfläche (ΔASA) kann in Abhängigkeit von dem Molekulargewicht des Homodimers in einem Bereich zwischen 368 $Å^2$ und 4768 $Å^2$ variieren. Für jede Untereinheit des Sniffer-Proteins wurde mit Hilfe des Programms MS [Connolly, 1983] eine ΔASA von 1496 $Å^2$ berechnet. Die Größe der ΔASA in Sniffer ist vergleichbar mit der durchschnittlichen ΔASA für ein Homodimer von 1685 $Å^2$, die von Jones & Thornton berechnet wurde. Die dimere Struktur des Sniffer-Proteins wird über 254 van-der-Waals-Interaktionen und 20 Wasserstoffbrückenbindungen in der Kontaktregion stabilisiert.
Viele Mitglieder der SDR-Familie bilden Tetramere aus, in denen zwei Dimere über ihre C-terminale Flanke miteinander verbunden sind. Dabei werden die zentralen ß-Faltblätter zweier benachbarter Untereinheiten durch parallele Aneinanderlagerung ihrer ß-Stränge zu einem „Quasi-vierzehnsträngigen-Faltblatt“ kombiniert („quasi“, da die Aneinanderlagerung der beiden ß-Stränge über Seitenketten-Interaktionen erfolgt). In Sniffer scheint die Bildung eines Tetramers aus sterischen Gründen nicht möglich zu sein. Die C-terminale Schleife, die beinahe senkrecht zum ß-Faltblatt verläuft, schirmt den Strang ßG vom Solvensbereich ab. Weiterhin ragen die beiden 3_{10}-Helices auf der C-terminalen Seite weit aus der Proteinstruktur heraus. In der Kristallstruktur ist die ΔASA zwischen den beiden benachbarten Molekülen am C-Terminus mit 451 $Å^2$ klein und kommt nur durch die Ausbildung der Kristallkontakte zustande.

2.2.3.3 Bindetasche des Kofaktors

Obwohl kein NADPH zum Kristallisationsansatz zugegeben worden war, ist der Kofaktor in der Elektronendichte der Kristallstruktur eindeutig erkennbar. Offensichtlich besitzt der Kofaktor eine sehr hohe Affinität zum Sniffer-Protein und bleibt während des gesamten Reinigungsverfahrens gebunden. Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 340 nm mit äquimolaren Mengen $NADP^+$, NADPH und Sniffer-Protein belegen, dass in der Kristallstruktur überwiegend das Produkt $NADP^+$ anwesend ist. Das Sniffer-Protein zeigte eine 4,3-fach niedrigere Absorption als der Kofaktor NADPH, während die Absorption gegenüber dem $NADP^+$ nur um den Faktor 2,9 erhöht war.
In Abb. 9 ist zu sehen, dass das $NADP^+$ von kontinuierlicher Elektronendichte (F_o-F_c-Dichte mit einem Sigma-Niveau von 1,5) umgeben ist und von den benachbarten Seitenketten über ein dichtes Wasserstoffbrückennetzwerk in der Bindetasche eingeschlossen wird. Der Bindungsmodus des $NADP^+$ an das Rossmann-Faltungsmotiv ist zu denen anderer SDR-Enzyme sehr ähnlich.

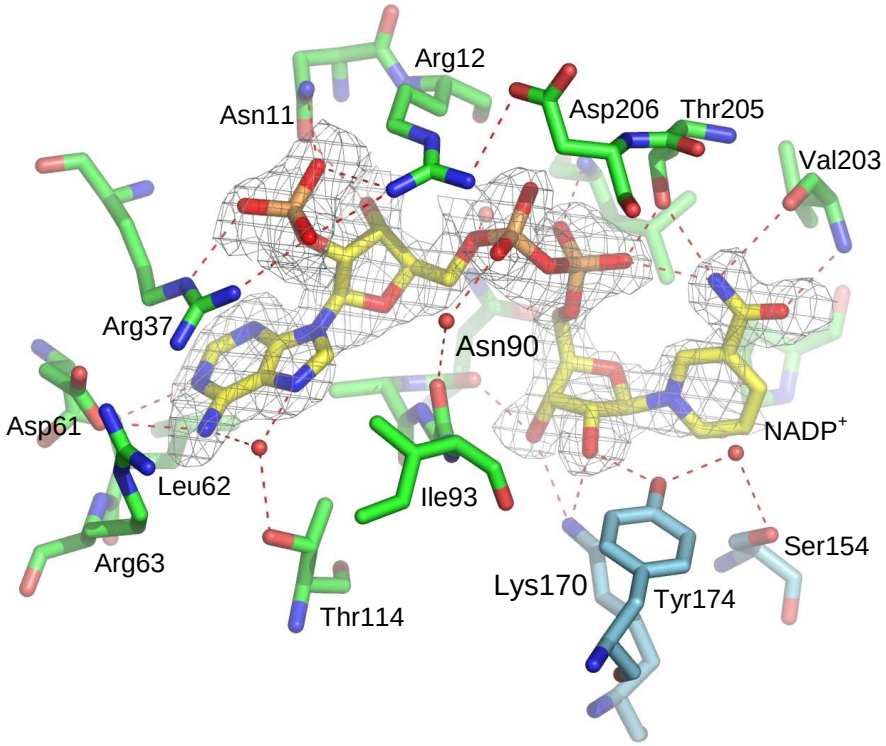


Abb. 9: Kofaktorbindetasche des Sniffer-Proteins. Der Kofaktor $NADP^+$ ist in gelb gefärbt und von einer kontinuierlichen Elektronendichte (F_o-F_c-Dichte bei σ = 1,5) in grauer Farbe umgeben. Mehrere Aminosäurereste sind an der Bindung des Kofaktors in der Bindetasche beteiligt und als Stabmodell in grün bzw. hellblau dargestellt. Alle Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäureresten des Proteins und dem Kofaktor sind durch rote, gestrichelte Linien und die Wassermoleküle als rote Kugeln gezeigt. Asn11, Arg12 und Arg37 sind an der spezifischen Erkennung der 2´-Phosphatgruppe des Kofaktors beteiligt. Tyr174 und Lys170 bilden mit dem benachbarten Ser154 die katalytische Triade im aktiven Zentrum und sind in hellblau hervorgehoben.

Der Adeninring des Cosubstrats wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zum Hauptketten-Amid von Leu62 und der Carboxylgruppe der Asp61-Seitenkette (je 3,3 Å) in die anti-Konformation orientiert. Weiterhin vermittelt ein Wassermolekül polare Kontakte zwischen der Thr114-Seitenkette (3,0 Å) und der exozyklischen Aminogruppe sowie dem Stickstoffatom am Fünfring (beide 2,8 Å) des Kofaktors $NADP^+$. Neben einer kleinen Anzahl hydrophiler Interaktionen ist der Adeninring in der hydrophoben Bindetasche bevorzugt durch van-der-Waals-Kontakte zu Ile93, Leu62 und den polaren Resten Asp63 und Arg37 an das Protein gebunden. Die Arg37-Seitenkette ist parallel zur Oberfläche des planaren Adeninrings angeordnet und bindet über ihre Guanidinogruppe an die Sauerstoffatome der 2´-Phosphatgruppe des 2´, 5´-ADP. Zusammen mit den Seitenketten von Asn11 und Arg12,

die in der konservierten Aminosäuresequenz GXXXGXG im Schleifenbereich zwischen dem Strang ßA und der Helix ßB zu finden sind, ist diese Aminosäure für die Diskriminierung von NADPH gegenüber NADH verantwortlich. Dieses Bindemotiv ist in NADPH-abhängigen Reduktasen der SDR-Familie weitgehend konserviert [Lesk, 1995]. In NADH-abhängigen SDR-Enzymen hingegen, wie beispielsweise der 7α-Hydroxysteroid Dehydrogenase [Tanaka et al., 1996a] oder der 3α, 20ß-Hydroxysteroid Dehydrogenase [Ghosh et al., 1991], bildet die Carboxylgruppe eines Aspartatrestes Wasserstoffbrücken zu den Hydroxylgruppen der Adeninribose aus. Diese Aminosäure fehlt in NADPH-abhängigen SDR-Enzymen, da sich die negativ geladenen Sauerstoffatome der Aspartat-Seitenkette und der Wasserstoff-brückenakzeptor an der 2´-Phosphatgruppe der Ribose gegenseitig abstoßen würden [Hülsmeyer et al., 1998; Oppermann et al., 1997]. In Sniffer ist das Aspartat gegen ein Cystein ausgetauscht. Die Pyrophosphatgruppe des Kofaktors, die sich in der Nähe des Glycin-reichen Bindemotivs und des aktiven Zentrums befindet, bildet zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäureresten der Kofaktorbindetasche und der Substratbindeschleife aus.
Der Riboserest des Nikotinamids wird über die Hauptketten-Carbonylgruppe von Asn90 (2,8 Å) und den Seitenketten des Lys170 (2,9 und 3,1 Å) und Tyr174 (2,6 Å), die zur katalytischen Triade gehören, in der Kofaktorbindetasche gebunden. Seine syn-Konformation wird durch Interaktion der Val203-Hauptkette mit dem Säureamid des Nikotinamids stabilisiert (3,1 und 3,4 Å). Weiterhin interagiert das exozyklische Stickstoffatom mit der Thr205-Seitenkette (3,1 Å) und bindet gleichzeitig über eine intramolekulare Wasserstoffbrücke an das Sauerstoffatom des Pyrophosphats (3,0 Å). Dadurch wird der Sechsring des Nikotinamids mit seiner B-Seite zum aktiven Zentrum orientiert. Bei der katalytischen Reaktion erfolgt ein stereoselektiver pro-S Hydridtransfer zwischen dem Kofaktor und dem Substrat, das im ternären Komplex der SDR-Enzyme zwischen dem Nikotinamidring und dem Tyr174 gebunden ist [Tanaka et al., 1996b].

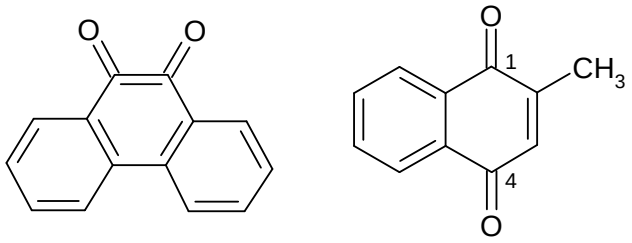
2.2.3.4 Aktives Zentrum

Die Aminosäuren Ser154, Lys170 und Tyr174 sind in allen SDR-Enzymen konserviert und spielen bei der Katalyse eine wichtige Rolle [Ghosh et al., 1995]. Aus verschiedenen Kristallstrukturen von SDR-Enzymen im Komplex mit Kofaktor und Substrat ist bekannt, dass das Substrat im aktiven Zentrum zwischen dem Nikotinamidrest des Kofaktors und der katalytischen Triade bindet. Dabei bildet die Hydroxyl- bzw. Carbonylgruppe des Liganden Wasserstoffbrückenbindungen zu den Seitenketten des katalytischen Tyrosins und Serins aus. Die Lys170-Seitenkette orientiert das Nikotinamid des Kofaktors in der Bindetasche,

wodurch der Hydridtransfer zwischen dem Kofaktor und dem Substrat ermöglicht wird [Breton et al., 1996]. Mutagenesestudien an der *Drosophila* Alkohol Dehydrogenase haben gezeigt, dass zwischen dem katalytischen Tyrosin und dem Liganden der Protonentransfer stattfindet [Chen et al., 1993]. Durch die positiv geladene Seitenkette des Lys170 [Tanaka et al., 1996a], die Hydroxylgruppe des Ser154 und die hydrophoben Aminosäuren in der Umgebung des aktiven Zentrums wird der pK_a-Wert des katalytischen Tyrosins herabgesetzt [Chen et al., 1993; Somers et al., 1998]. Mit Hilfe der Differentialmethode der Poisson-Boltzmann-Gleichung im Programm MEAD [Bashford, 1997] wurde der pK_a des katalytischen Tyrosins in Sniffer berechnet, der in der apo-Struktur einen Wert von etwa acht besitzt. Im Komplex mit $NADP^+$ erhöht sich der pK_a-Wert um eine Einheit. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Hydroxylgruppe des Tyr174 vor Ablauf der Katalyse wahrscheinlich in protonierter Form vorliegt (Czodrowski, persönliche Mitteilung). In allen SDR-Enzymen liegt das katalytische Tyrosin und Serin jeweils in dem charakteristischen Bindemotiv YXXXK [Persson et al., 1991]. Die Ser154-Seitenkette ist bei der Ausrichtung des Substrats in der Bindetasche behilflich. Außerdem bindet ihre Hydroxylgruppe über ein Wassermolekül an das benachbarte Tyr174 und stabilisiert dadurch seine deprotonierte Form nach der Katalyse. In Sniffer wird bei der katalytischen Reaktion ein Hydrid von der B-Seite des Nikotinamids und gleichzeitig ein Proton von der Hydroxylgruppe des Tyrosins auf die Carbonylgruppe des Substrats übertragen. Dieses wird stereospezifisch zur pro S-Konfiguration des Alkohols reduziert, während das NADPH zum $NADP^+$ oxidiert wird.

Die reduzierende Aktivität des Sniffer-Proteins wurde mit Hilfe verschiedener artifizieller Substrate untersucht, da das natürliche Substrat bisher nicht bekannt ist. Intensive Bemühungen, eine ternäre Kristallstruktur mit Kofaktor und einem der artifiziellen Substrate zu erhalten, blieben ohne Erfolg. Deshalb wurden die Substrate 9,10-Phenanthrenchinon, p-Nitrobenzaldehyd, Menadion und Pyridin-4-carbaldehyd mit dem Programm AutoDock [Morris et al., 1998] in das aktive Zentrum eingepasst, um einen ersten Einblick in einen möglichen Bindungsmodus der Liganden zu erhalten. Für jeden Liganden wurden 100 Positionen generiert, die *Docking*-Lösungen in Abhängigkeit von ihrem Bindungsmodus im aktiven Zentrum gruppiert und anschließend gemäß des berechneten, elektrostatischen Potentials in einer Rangliste sortiert.

Überzeugende Ergebnisse wurden mit den Substraten 9,10-Phenanthrenchinon und Menadion erhalten (Abb. 10).



(I) (II)

Abb. 10: Chemische Formeln der Substrate 9,10-Phenanthrenchinon (I) und Menadion (II).

Im Falle des 9,10-Phenanthrenchinon wurden über 50 % der erzeugten *Docking*-Lösungen auf den erste Rang bewertet (violett in Abb. 11 I). Der Ligand ist in unmittelbarer Nähe der katalytischen Triade und des Nikotinamids platziert. Das Substrat nimmt eine alternative Orientierung ein, die auf Rang zwei bewertet wurde (rosa in Abb. 11 I). Trotz der ungünstigeren Elektrostatik kann diese Position des Liganden als eine gute *Docking*-Lösung interpretiert werden, da der Ligand Wasserstoffbrücken zum katalytischen Tyrosin und Serin ausbildet (3,3 und 3,4 Å). Etwa 40 % der *Docking*-Lösungen wurde auf den dritten und damit letzten Rang gesetzt. Das planare Ringsystem des 9,10-Phenanthrenchinon ist parallel zur Trp202-Seitenkette orientiert und bildet günstige π-π-Wechselwirkungen mit dem Indolrest aus (nicht gezeigt). Auch wenn die Position dieses Liganden auf den ersten Blick günstig zu sein scheint, kann das Substrat in diesem Bindungsmodus, aufgrund der großen Distanz zur katalytischen Triade, vom Enzym nicht zum Produkt umgesetzt werden.

Ein Drittel der *Docking*-Lösungen des Substrats Menadion wurde auf Rang 1 bewertet. Das Indolsystem des Substrats und der Trp202-Seitenkette sind, analog zu dem Bindungsmodus des 9,10-Phenanthrenchinon, das auf Rang 3 platziert wurde, parallel zueinander ausgerichtet. In dieser Orientierung wird die Katalyse aufgrund fehlender Interaktion zwischen der Carbonylgruppe des Liganden und dem katalytischen Tyrosin mit großer Wahrscheinlichkeit nicht stattfinden können. Von AutoDock wurden jedoch auch zwei annehmbare Bindungsmodi für das Menadion vorhergesagt (Abb. 11 II). Einer der beiden Liganden wurde als energetisch gleichwertig zu dem auf Rang 1 bewerteten angesehen, die 37 *Docking*-Lösungen jedoch auf Rang 2 gesetzt (violett in Abb. 11 II). In dieser Orientierung interagiert die Carbonylgruppe des Menadions an Position 1 mit der Hydroxylgruppe der Seitenkette des Tyr174 und Ser154 (3,3 und 3,2 Å). Zusätzlich bildet die Methylgruppe günstige hydrophobe Wechselwirkungen mit dem benachbarten Schwefelatom (Selenatom) der (Se)Met207-Seitenkette aus. Eine alternative Konformation des Liganden im aktiven Zentrum des Sniffer-Proteins wurde für 20 % der *Docking*-Lösungen vorhergesagt und von AutoDock auf Rang 3 bewertet (rosa in Abb. 11 II). In dieser Orientierung ist die

Carbonylgruppe an Position 4 zu den Seitenketten der katalytischen Triade orientiert und gegenüber dem Bindungsmodus auf Rang 2 um 180° in der Bindetasche gedreht. Vermutlich wurde diese Position des Liganden aufgrund ungünstiger Wechselwirkungen zwischen der Methylgruppe des Menadions und der benachbarten Carbonylgruppe des (Se)Met207 als energetisch weniger günstig bewertet.

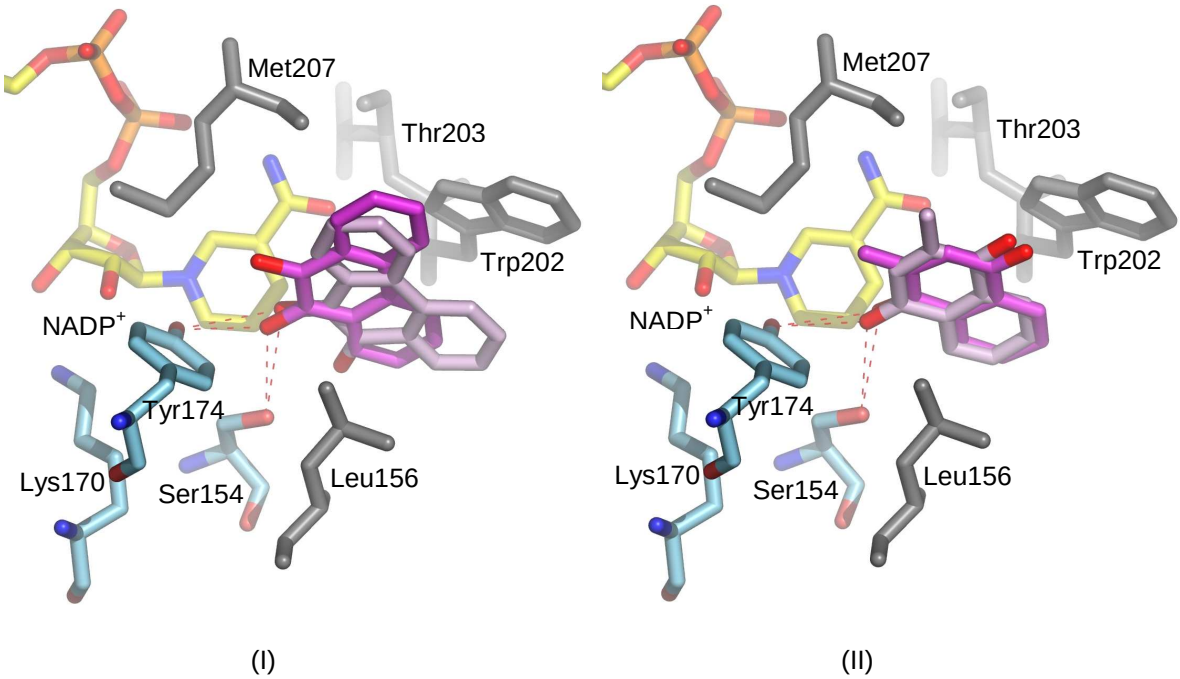


Abb. 11: Anordnung der Substrate 9,10-Phenanthrenchinon (I) und Menadion (II) innerhalb des aktiven Zentrums des Sniffer-Proteins, generiert mit dem Programm AutoDock. Die Liganden sind zwischen dem gelb gefärbten Nikotinamidrest des Kofaktors und den Aminosäuren der katalytischen Triade in hellblau in der Bindetasche positioniert. Das Trp202 liegt in der Nähe des Substrats und ist in dunkelgrau dargestellt. Die Carbonylgruppen der Substrate bilden Wasserstoffbrücken mit den Seitenketten des Tyr174 und Ser154. (I) Die Orientierung des 9,10-Phenanthrenchinons auf Rang 1 ist in violett, die auf Rang 2 bewertete in rosa gezeigt. (II) Die gezeigten Orientierungen des Menadions wurden auf Rang 2 (violett) und Rang 3 (rosa) bewertet.

Mit dem Programm AutoDock wurden somit sinnvolle *Docking*-Lösungen für beide Substrate gefunden. Die vorgeschlagenen Bindungsmodi sind vergleichbar mit der Orientierung der Substrate in den Kristallstrukturen anderer SDR-Enzyme. Die *Docking*-Studie lässt vermuten, dass die Trp202-Seitenkette bei der Positionierung des Liganden im aktiven Zentrum involviert ist. Die für das *Docking* verwendeten Substrate sind zu klein, um die gesamte Bindetasche des aktiven Zentrums vollständig zu besetzen, weshalb von AutoDock für 9,10-Phenanthrenchinon und Menadion verschiedene Bindungsmodi generiert wurden.

Aufgrund der Größe der Bindetasche von Sniffer könnten vermutlich auch größere Moleküle wie Steroide oder Prostaglandine im aktiven Zentrum gebunden werden.

2.2.3.5 Vergleich mit der Schweinecarbonylreduktase

Die Primärstruktur des Sniffer-Proteins besitzt nur eine geringe Sequenzidentität zu anderen SDR-Enzymen. Das beste Ergebnis wurde für die Schweinecarbonylreduktase (PTCR) mit einer Identität von 28,7 % ermittelt [Ghosh et al., 2001]. Trotz der geringen Analogie in der Aminosäuresequenz weist die Tertiärstruktur des Sniffer-Proteins eine sehr hohe strukturelle Homologie zur Schweinecarbonylreduktase auf (Abb. 6). Die Standardabweichung in der C_α-Kette von 199 Aminosäureresten beträgt nur 2,5 Å. In ihrer Quartärstruktur unterscheiden sich die beiden Proteinstrukturen jedoch deutlich voneinander. Während bei der monomeren Schweinecarbonylreduktase die Ausbildung des Dimers durch eine 41 Aminosäuren umfassende Insertion, die aus vier α-Helices zwischen dem Strang ßE und der Helix αF besteht, verhindert wird, ist im dimeren Sniffer-Protein der ß-Strang über eine kurze Schleife direkt mit der α-Helix verknüpft.

Die Kristallstruktur des Sniffer-Proteins wurde mit der PTCR-Struktur überlagert. Die beiden Enzyme sind sich in den Primärsequenzen ihrer Substratbindeschleifen sehr ähnlich (Abb. 12). Neben der hohen Sequenzhomologie besitzen sie auch eine bemerkenswerte Analogie in den räumlichen Anordnungen der einzelnen Aminosäurereste in den Substratbindeschleifen (Abb. 13). Die Standardabweichung in der C_α-Kette der Aminosäurereste 200 bis 215 beträgt 2,4 Å und ist damit vergleichbar zum rmsd-Wert des gesamten Enzyms.

```
                200     205     210     215
Sniffer:-PGWVKTDMGGSSAPLD-
PTCR:    -PGWVRTDMGGPKAPKS-
```

Abb. 12: Vergleich der Primärsequenzen von Sniffer und PTCR im Bereich ihrer Substratbindeschleifen. Die Aminosäurereste sind nach der Proteinsequenz in Sniffer nummeriert. Das Alignment wurde mit dem Programm ProFit 2.2 erstellt [McLachlan, 1982].

Die Substratbindeschleifen sind im Sniffer-Protein und PTCR im Vergleich zu anderen SDR-Enzymen deutlich verkürzt und bereits im binären Komplex mit Kofaktor vollständig geordnet. Die Enzyme der SDR-Familie besitzen normalerweise eine lange Insertion zwischen Strang ßF and Helix αG, die meist aus helikalen Sekundärstrukturelementen besteht und in Abwesenheit des Liganden im aktiven Zentrum nicht geordnet ist. Im Sniffer-Protein ist die

Bindetasche vor der Anlagerung des NADPH wahrscheinlich ausreichend zum Solvens exponiert, um den Zugang des Kofaktors zur Bindestelle zu ermöglichen. Nach der Bindung des Kofaktors wird der Schleifenbereich durch Interaktion mit dem Pyrophophat und dem Nikotinamidrest des NADPH geordnet. Leichte Konformationsänderungen finden vermutlich auch im Bereich der Kofaktorbindetasche statt. In der Kristallstruktur des Sniffer-Proteins ist das $NADP^+$ beinahe vollständig von den Aminosäureresten des Enzyms umgeben. Berechnungen der ΔASA mit dem Programm MS [Connolly, 1983] ergaben, dass 95 % der Oberfläche des Kofaktors von Protein umschlossen ist.

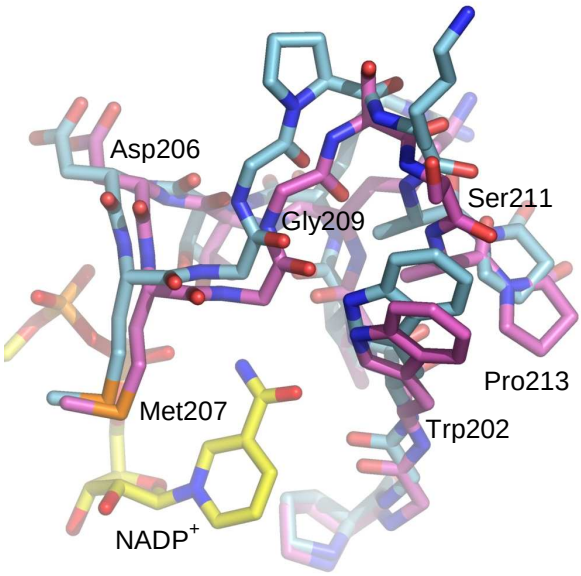


Abb. 13: Stabmodell der Substratbindeschleifen des Sniffer-Proteins (lila) und der Schweinecarbonyl-reduktase (hellblau) nach Überlagerung der beiden Kristallstrukturen mit dem Programm ProFit 2.2 [McLachlan, 1982]. Der Kofaktor $NADP^+$ des Sniffer-Proteins ist in gelber Farbe dargestellt. Die Aminosäurereste sind gemäß der Kristallstruktur des Sniffer-Proteins nummeriert.

Die Kristallstrukturen des Sniffer-Proteins und PTCR wurden im Komplex mit Kofaktor bestimmt, obwohl in beiden Fällen kein NADPH dem Kristallisationsmedium zugegeben wurde. Wie im Sniffer-Protein bindet die Schweinecarbonylreduktase bevorzugt $NADPH/NADP^+$, das in der Bindetasche eine ähnliche Konformation einnimmt. In beiden Proteinstrukturen bindet die Seitenkette des Arg37 (3,0 und 3,1 Å) und Asn11 (2,9 Å) über Wasserstoffbrücken an die 2´-Phosphatgruppe des 2´, 5´-ADP. Die positiv geladene Aminosäure Arg12 in Sniffer, die zwei Wasserstoffbrücken zur benachbarten Phosphatgruppe ausbildet (3,2 und 3,5 Å), ist in PTCR gegen ein Lysin ausgetauscht. Kleine Konformationsunterschiede zwischen den beiden Kristallstrukturen sind in der N-terminalen

Region der Helix αC zu finden. Die Arg38-Seitenkette ist von der Kofaktorbindetasche weggedreht, während die entsprechende Aminosäure Arg40 in PTCR an der Bindung des $NADP^+$ beteiligt ist. Dafür wird der Kofaktor in Sniffer durch van-der-Waals Kontakte zwischen der exocyclischen Aminogruppe des $NADP^+$ und der Guanidinogruppe des Arg63, das in PTCR gegen ein Isoleucin ausgetauscht ist, in der Bindetasche fixiert.

Steroide und Prostaglandine werden mit hoher Affinität an das aktive Zentrum der Schweinecarbonylreduktase gebunden. Das Trp202 in Sniffer ist in der Kristallstruktur des PTCR an der gleichen Position im aktiven Zentrum zu finden. *Docking*-Experimente haben gezeigt, dass die Trp202-Seitenkette möglicherweise bei der Positionierung des Liganden in der Bindetasche behilflich ist. Die C-terminale Schleife in PTCR ist vermutlich an der Substratbindung beteiligt, die sich wie ein Deckel über das aktive Zentrum legt. Dadurch ist die Substratkavität in PTCR gegenüber dem Sniffer-Protein verkleinert. Die C-terminale Schleife ist in Sniffer deutlich verkürzt und im Gegensatz zu PTCR vermutlich nicht an der spezifischen Erkennung des Substrats beteiligt. Der C-Terminus bildet hingegen ein ausgedehntes Wasserstoffbrückennetzwerk zum benachbarten Molekül des Dimers aus. Konformationsänderungen im Bereich der C-terminalen Schleife sind daher, trotz der Nähe zum aktiven Zentrum, nicht zu erwarten. Aufgrund der größeren Substratkavität und der verkürzten C-terminalen Schleife ist das aktive Zentrum im Vergleich zu PTCR mehr zum Solvens exponiert. Dadurch können voraussichtlich auch Steroide und Prostaglandine in das aktive Zentrum des Sniffer-Proteins gebunden werden. Die Bindungsaffinität dieser Substrate zu Sniffer wird im Vergleich zu PTCR vermutlich herabgesetzt sein.

2.3 Zusammenfassung und Ausblick

Altersbedingte, neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson werden häufig durch oxidativen Stress hervorgerufen. In diesem Zusammenhang wurde die Funktion des Sniffer Proteins aus *D. melanogaster* näher untersucht [Botella et al., 2004]. *In vivo*-Studien mit der Fruchtfliege belegen, dass eine reduzierte Expression des *sniffer*-Gens zu einer Verkürzung der Lebensdauer der Fliegen führt und den neurodegenerativen Prozess beschleunigt. Das Sniffer-Protein gehört zur Familie der Kurzkettigen Dehydrogenasen/ Reduktasen (SDR). Die Carbonylreduktase bindet spezifisch NADPH an das aktive Zentrum und weist eine breite Substratspezifität auf. In dieser Arbeit wurde das Protein produziert, über Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend kristallisiert. Die Selenomethionyl-derivat-Kristallstruktur des Sniffer-Proteins im Komplex mit $NADP^+$ wurde durch die Methode der multiplen Wellenlängen unter Nutzung anomaler Differenzen (MAD) am Synchrotron BESSY, PSF-*Beamline* II in Berlin mit einer Auflösung von 1,7 Å bestimmt.

Das Sniffer-Protein besteht aus einem siebensträngigen ß-Faltblatt, das auf beiden Seiten von jeweils drei Helices flankiert wird. Im aktiven Zentrum des dimeren Enzyms befindet sich die katalytische Triade. Diese Aminosäuren sind bei allen SDR-Enzymen streng konserviert. Mit Hilfe eines genetischen *Docking*-Algorithmus des Programms AutoDock wurden die artifiziellen Substrate des Sniffer-Proteins in die Bindetasche eingepasst, um eine Vorstellung über ihren denkbaren Bindungsmodus im aktiven Zentrum zu erhalten. Die Aldehyd- bzw. Ketogruppen der Substrate binden über Wasserstoffbrücken an die Tyr- und Ser-Seitenketten der katalytischen Triade, die durch das benachbarte Nikotinamid des Kofaktors stereoselektiv zu Alkoholgruppen reduziert werden. Die natürlichen Substrate, die von Sniffer umgesetzt werden, sind bisher jedoch noch nicht bekannt. In der Nähe des aktiven Zentrums befindet sich die Substratbindeschleife, die bei den meisten SDR-Enzymen aus mehr als 20 Aminosäuren besteht und erst im ternären Komplex mit Kofaktor und Substrat eine geordnete Konformation einnimmt. Im Sniffer-Protein hingegen ist die Substratbindeschleife sehr kurz und bereits im binären Komplex mit $NADP^+$ vollständig geordnet.

Das Sniffer-Protein weist, besonders im Bereich der Substratbindeschleife, eine hohe strukturelle Homologie zur Schweinecarbonylreduktase (PTCR) auf. Dies lässt vermuten, dass diese beiden Enzyme eine orthologe Funktion besitzen. Die Klärung dieser Frage wäre von großer Bedeutung, da PTCR eine hohe Sequenzidentität zu den humanen Carbonylreduktasen 1 und 3 aufweist. Die humanen Enzyme katalysieren die Reduktion von Steroiden, Prostaglandinen und eine Reihe anderer Substrate, die Carbonylgruppen in ihrem Grundgerüst enthalten [Sciotti et al., 2000]. Die Sequenzidentität des Sniffer-Proteins zu den humanen Carbonylreduktasen liegt unterhalb von 30 % (Abb. 14). Die Schweinecarbonyl-

reduktase hingegen hat eine recht hohe Sequenzidentität von 77 % zur humanen Carbonylreduktase 1 [Wermuth et al., 1988], die auch unter dem Namen Prostaglandin-9-Ketoreduktase/15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase bekannt ist, und von 62 % zur humanen Carbonylreduktase 3 [Watanabe et al., 1998].

	Sniffer	PTCR
humane Carbonylreduktase 1	27,4%	76,7%
humane Carbonylreduktase 3	24,9%	62,2%

Abb. 14: Überblick über die Sequenzidentitäten zwischen der humanen Carbonylreduktasen 1 und 3, der Schweinecarbonylreduktase und Sniffer.

Im Gegensatz zu Sniffer befindet sich in den humanen Enzymen eine große Insertion, die den vier helikalen Sekundärstrukturelementen hinter dem Strang ßE in der Schweine-carbonylreduktase entspricht. Deshalb dürften die humanen Carbonylreduktasen, analog zu PTCR, als monomere Enzyme in Lösung vorliegen. Aus der Sequenzanalyse geht weiterhin hervor, dass die humanen Enzyme wie Sniffer und PTCR eine sehr kurze Substratbindeschleife (Abb. 15) und eine ähnlich gestaltete Kofaktorbindetasche aufweisen. Eine signifikante Homologie im Bereich der Substratbindeschleife besteht auch zu anderen eukaryontischen Carbonylreduktasen wie z. B. der Maus oder dem chinesischen Hamster [Terada et al., 2000].

```
            200     205     210     215
Sniffer:-PGWVKTDMGGSSAPLD-
PTCR:    -PGWVRTDMGGPKAPKS-
hCR 1:   -PGWVRTDMAGPKATKS-
hCR 3:   -PGPVKTDMDGKDSIRT-
```

Abb. 15: Sequenzalignment des Sniffer-Proteins mit PTCR sowie der humanen Carbonylreduktase 1 (hCR 1) und 3 (hCR 3) im Bereich der Substratbindeschleife.

Welchen Einfluss die verkürzte Substratbindeschleife im Hinblick auf die Substratspezifität besitzt, ist bisher noch nicht bekannt. *Docking*-Experimente lassen vermuten, dass das Trp202 in Sniffer bei der Positionierung des Liganden im aktiven Zentrum eine wichtige Rolle spielt. Wie Sequenzalignments zeigen, befindet sich in der Schweinecarbonylreduktase und der humanen Carbonylreduktase 1 an äquivalenter Position ebenfalls jeweils ein Tryptophan. Ob die neuroprotektive Funktion des Sniffer-Proteins allerdings auf die humanen Carbonylreduktasen übertragbar ist, kann aus dem Sequenzvergleich nicht abgeleitet

werden. Die *in vivo*-Studien mit *D. melanogaster* könnten jedoch dazu beitragen, um die komplexen Zusammenhänge der Neurodegeneration besser zu verstehen und um neue therapeutische Ansätze für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen zu entwickeln.

2.4 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Riedel-de-Häen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Seelze) bezogen. Der Vektor und der Expressionsstamm wurden von Qiagen (Hilden), die Bestandteile für Kulturmedien von den Firmen Difco (Augsburg) und Roth verwendet. Der Protease-Inhibitor-Cocktail wurde von Roche Diagnostics (Mannheim) geliefert. Die Materialien zur Säulenchromatographie stammten von Amersham Pharmacia Biosciences (Uppsala, Schweden). Die Filtersysteme und Centricon wurden von Millipore (Schwalbach) bezogen.

2.4.1 Präparation des nativen Sniffer-Proteins

Das Plasmid, in das das *sniffer*-Gen eingefügt wurde, der Expressionsstamm sowie das Reinigungs- und Kristallisationsprotokoll wurden von Julia Ulschmid aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. K. Becker-Brandenburg vom Interdisziplinären Forschungszentrum der Universität Gießen bereitgestellt.

Für die Aufreinigung des Proteins wurden folgende Lösungen verwendet:

Protease-Inhibitor-Stammlösung: 1 Tablette Complete™ (EDTA-frei) in 2 ml Wasser gelöst
Puffer 1: 50 mM $Na_xH_y(PO_4)$-Puffer pH 8,0, 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol
Puffer 2: 50 mM $Na_xH_y(PO_4)$-Puffer pH 8,0, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol
Puffer 3: 50 mM $Na_xH_y(PO_4)$-Puffer pH 8,0, 300 mM NaCl, 1mM DTT

2.4.1.1 Transformation und Expression

Der Vektor pQE-16, der die kodierende Gensequenz von *sniffer* enthält, wurde in *E. coli* Zellen des Expressionstamms M15 transformiert (Kapitel 4.4.1.7). Die Bakterien wurden auf Selektions-Agar-Platten mit 100 mg/l Ampicillin und 50 mg/l Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Klon wurde von der Platte in 5 ml LB-Medium (Kapitel 4.4.1.6), das die oben genannten Antibiotika in gleicher Konzentration enthielt, überführt und bei 37°C über Nacht angezogen. Die Menge von 1 l des gleichen Mediums wurde mit der Vorkultur in einer Verdünnung von 1:500 versetzt und die Hauptkultur bei 37°C und 250 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Bei einer optischen Dichte von 0,8 bei 600 nm wurde die Expression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Expressionstemperatur wurde auf 25°C gesenkt und die Zellkultur über 6 h inkubiert. Die

Zellen wurden durch Zentrifugation (Beckmann JA-10-Rotor, 10 min, 4000 U/min, 4°C) geerntet und bei -20°C tiefgefroren.

2.4.1.2 Zellaufschluss

Für die Reinigung des Sniffer-Proteins wurden die Zellen nach schonendem Auftauen mit 10 ml Puffer 1, 600 µl Protease-Inhibitor-Stammlösung und Lysozym versetzt. Durch Behandlung mit Ultraschall (Branson Sonifier 250, 6 x 30 s, *duty cycle* 70%, *output control* 3,5) auf Eis konnten die Zellen vollständig aufgeschlossen werden. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (Beckmann JA-25,50-Rotor, 60 min, 25000 U/min, 4°C) abgetrennt und verworfen. Der Überstand wurde für die anschließende Aufreinigung des Proteins mittels Säulenchromatographie verwendet.

2.4.1.3 Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung des Sniffer-Proteins erfolgte mit Hilfe säulenchromatographischer Verfahren an einer FPLC-Anlage (Äkta™, Amersham Pharmacia Biosciences). Vor der Durchführung des Reinigungsprotokolls wurde die Affinitätssäule (HiTrap Chelating, 5 ml) mit einer 0,1 M $NiSO_4$-Lösung gespült. Die mit Metallionen beladene Säulenoberfläche ermöglicht die spezifische Bindung eines Polyhistidinrestes. Nach der Expression des *sniffer*-Gens mit Hilfe des Vektors pQE-16 ist am N-Terminus des resultierenden Fusionsproteins ein so genannter His-*tag* gebunden, der an die Affinitätssäule bindet. Durch Anwendung eines einzigen Reinigungsschrittes und anschließende Dialyse konnte Protein von hoher Reinheit erhalten werden.

Der Rohextrakt wurde zunächst auf die mit Puffer 1 äquilibrierte Nickel-Chelatkomplex-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen erfolgte die Elution des Sniffer-Proteins mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 50 mM bis 150 mM Imidazol (Puffer 2) bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die auf Eis gesammelten Fraktionen wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht und solche mit ausreichender Reinheit und hohem Gehalt an Sniffer-Protein vereinigt. Um das Imidazol aus dem Elutionspuffer zu entfernen, wurde die Proteinlösung zweimal gegen das 100-fache Volumen von Puffer 3 bei 4°C dialysiert. Das Protein wurde anschließend mit Centricon YM-10 auf eine Konzentration von mindestens 22 mg/ml eingeengt. Die Anwesenheit von 1 mM DTT bei gleichzeitiger Lagerung des Proteins bei 4°C ermöglichte eine Aufbewahrung über mehrere Wochen ohne sichtbare Denaturierung des Proteins. Der N-terminale His-*tag*, der aus 19 Aminosäuren besteht, wurde nicht vom Sniffer-Protein abgetrennt.

2.4.1.4 Gehaltsbestimmung

Nach Dialyse und Ankonzentrieren der Proteinlösung erfolgte die photometrische Gehaltsbestimmung bei 280 nm (Bio-Rad SmartSpec™ 3000). Dazu wurde der Absorptionskoeffizient anhand der Aminosäuresequenz des Sniffer-Proteins zu 1 mg/ml Sniffer-Protein ≅ 0,637 A_{280} ermittelt [Gill & von Hippel, 1989].

Jede Charge lieferte eine Ausbeute von ungefähr 40 mg Protein pro Liter Kultur. Die konzentrierte Proteinlösung wurde mit dem Dialysepuffer auf die für den jeweiligen Kristallisationsansatz benötigte Endkonzentration verdünnt.

2.4.2 Kristallisation

Alle Kristallisationsexperimente wurden in Platten mit 24 Vertiefungen (Hampton Research, USA) nach der Technik des hängenden Tropfens im Kälteraum bei 4°C angesetzt. Für die Kristallisation wurde eine Proteinkonzentration zwischen 18 und 22 mg/ml eingestellt. Erste Kristalle wurden von unseren Kooperationspartnern in Gießen aus dem kommerziell erhältlichen *Crystal Screen* Nr. 22 (0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 0,2 M NaAc, 30 % (w/v) PEG 4000) von der Firma Hampton Research, USA erhalten. Da die gewonnenen Kristalle zu klein waren, um sie für Röntgenbeugungsexperimente zu verwenden, wurde die Reservoirlösung sowie der Kristallisationstropfen mit Wasser verdünnt. Die Reservoirlösung aus dem Kristallisationsscreen wurde mit Wasser in einem Mischungsverhältnis 3:1 gemischt. Die PEG-Konzentration in der Reservoirlösung wurde vor dem Verdünnen so variiert, dass die Endkonzentration des Präzipitanz zwischen 16,5 % und 21 % betrug. Danach wurden 800 µl der Verdünnung in die Vertiefung der Kristallisationsplatte gegeben. Bei der Kristallisation des nativen Proteins wurde der Reservoirlösung DTT in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt, bei Verwendung des selenomethioninhaltigen Proteins auf 5 mM erhöht. Je 1 - 3 µl Wasser wurde mit 3 µl Proteinlösung und 3 µl der verdünnten Reservoirlösung auf dem Deckgläschen vermischt. Der an dem Deckgläschen hängende Tropfen wurde über die Vertiefung gelegt und luftdicht mit niedrigviskoser Silikonpaste (Bayer-Silikon, Roth) verschlossen. Aus dem löslichen Sniffer-Protein bildeten sich nach wenigen Tagen röhrenförmige Kristalle, die an einem Ende zu einem sternförmigen Büschel zusammengewachsen waren. Die entgültige Grösse der Kristalle von 0,1 mm x 0,1 mm x 0,5 mm wurde meist erst nach einem Zeitraum von 2 - 3 Wochen erreicht.

Die Kristalle waren unter einer Haut eingeschlossen, die vermutlich aus dem Fällungsmittel PEG 4000 oder denaturiertem Protein besteht. Diese wurde mit einem Skalpell entfernt und

die zusammengewachsenen Kristalle vorsichtig voneinander getrennt.
Um erste Beugungsexperimente unter Tieftemperaturbedingungen bei ca. -170°C durchführen zu können, wurden die Kristalle vor dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines *Cryoloops* (Hampton Research, USA) von der Mutterlauge in einen Kälteschutzpuffer überführt. Zu diesem Zweck wurde die genaue Zusammensetzung der Mutterlauge als Grundlage für die Erstellung des Kälteschutzpuffers verwendet. Der Kälteschutzpuffer setzte sich aus 0,075 M Tris/HCl, 150 mM NaAc, 21 % (w/v) PEG 4000, 130 mM NaCl, 21 mM $Na_xH_y(PO_4)$-Puffer pH 8,0 und 22 % MPD zusammen. Die Kristalle wurden in dem Kälteschutzpuffer langsam unter schrittweise Erhöhung der Konzentration von MPD bei 4°C innerhalb von einer Stunde eingelegt und im flüssigen Stickstoff für die anschließende Röntgenstrukturanalyse eingefroren.

2.4.3 Präparation eines Selenomethionylderivats des Sniffer-Proteins

Für Multi-Wellenlängen-Beugungsexperimente unter Nutzung der Unterschiede in den anomalen Streubeiträgen (MAD) wurde ein Selenomethionylderivat des Sniffer-Proteins hergestellt [Hendrickson et al., 1990]. Durch Expression in Selenomethionin-haltigem Medium sollten die sieben im Sniffer-Protein vorhandenen Schwefelatome in der Aminosäure Methionin gegen das schwerere Homologe Selen ausgetauscht werden [Van Duyne et al., 1993]. Zu diesem Zweck erfolgte die Produktion des Proteins im Methionin-prototrophen *E. coli* Stamm in einem M9-Minimalmedium bei pH 7,4, einem Salzmedium definierter Zusammensetzung mit 10 g/l NH_4Cl, 60 g/l Na_2HPO_4, 30 g/l KH_2PO_4 und 50 g/l NaCl. Die herangewachsenen Zellen aus einer 2 ml Vorkultur in LB-Medium wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in 1 l Minimalmedium resuspendiert. Neben den Antibiotika Ampicillin und Kanamycin enthielt das Medium 4 g/l Glukose, die als Kohlenstoff-Quelle diente, 240 mg/l $MgSO_4$, 25 mg/l $FeSO_4$ sowie die Vitamine Niacinamid, Pyridoxin und Riboflavin jeweils in einer Konzentration von 1 mg/l. Weiterhin wurde dem Medium alle Aminosäuren außer Methionin in einer Endkonzentration von je 40 mg/l zugegeben. Die Kultur wurde bei 37°C über mehrere Stunden inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,4 bei 600 nm erfolgte die Zugabe von 60 mg/l L-Selenomethionin (Acros Biochemicals, Geels, Belgien). Nach einer weiteren Inkubationsperiode von 1 h wurde die Produktion von Selenomethionin-haltigem Sniffer-Protein mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach 6 h Expressionszeit bei 25°C wurden die Zellen durch Zentrifugation (Beckmann JA-10-Rotor, 10 min, 4000 U/min, 4°C) geerntet.
Die Reinigung und die Kristallisation des Proteinderivats erfolgten analog zu dem Verfahren, das für das native Protein beschrieben wurde. Um die Oxidation des Selens zu verhindern,

wurde dem Dialysepuffer und allen bei der Kristallisation verwendeten Puffern DTT in einer Konzentration von 5 mM zugesetzt. Die Anwesenheit der Selenatome im Protein wurde durch Bestimmung des Molekulargewichts des Selenomethionin-haltigen und des nativen Proteins mittels MALDI-TOF bestätigt.

2.4.4 Röntgenbeugungsexperimente und Datenprozessierung

Die Kristalle wurden unter Verwendung eines *Cryoloops* im Kälteraum bei 4°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren. An dem im Hause vorhandenen Röntgengerät wurden die Kristalle auf ihre Fähigkeit, Röntgenstrahlen zu beugen, getestet und von einem Kristall ein nativer Datensatz mit einer Auflösung von 2,4 Å gesammelt. Der *Cryoloop*, in dem der Kristall durch die Oberflächenspannung des Kälteschutzpuffers gehalten wird, wurde mit Hilfe einer magnetischen Halterung auf den Goniometerkopf gesetzt und der Kristall im Primärstrahlengang zentriert. Eine permanente Kühlung des Kristalls im Stickstoffstrom bei ca. -170°C verlangsamt die Einwirkung von Strahlenschäden während des Messvorgangs. Die energiereiche Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von 1,5418 Å wurde auf einer Rigaku RU-300 Drehanode mit Kupfer als Anodenmaterial erzeugt und durch Omnic Spiegel fokussiert. Der Generator wurde mit einer Anodenspannung bei 50 kV und 90 mA betrieben. Der Abstand zwischen Kristall und Detektor betrug 150 mm. Der Kristall wurde für die Aufnahme eines Beugungsbildes 5 min belichtet und die Intensitäten der gebeugten Reflexe am R-axis IV++ Flächendetektorsystem (MSC, USA) elektronisch ausgelesen. Bei Drehung des Kristalls in 0,5°-Schritten wurden insgesamt 194 Beugungsbilder aufgenommen.
Die gesammelten Daten wurden mit dem Programm XDISP angesehen, mit DENZO prozessiert und mit SCALEPACK skaliert [Otwinowski & Minor, 1996].

2.4.5 Molekularer Ersatz

Zunächst wurde versucht, die Kristallstruktur des Sniffer-Proteins unter Verwendung des 2,4 Å Datensatzes durch die Methode des Molekularen Ersatzes [Rossmann & Blow, 1962] zu bestimmen, in dem die Phasen durch ein geeignetes Startmodell zur Berechnung einer ersten Elektronendichtekarte des Sniffer-Proteins verwendet wurden. Dabei wird durch Rotation und anschließende Translation des Modells versucht, eine Korrelation zwischen den Strukturdaten des Startmodells und denen der unbekannten Proteinstruktur zu finden [Grosse-Kunstleve & Adams, 2001]. Hierbei wird aus den gemessenen Reflexintensitäten der experimentellen Daten durch Fourier-Transformation eine *Patterson map* berechnet. Die

Strukturdaten des Modells werden, in Abhängigkeit seiner Orientierung im realen Raum, ebenfalls in eine *Patterson map* umgewandelt und versucht, diese durch Rotation und Translation mit der *Patterson map*, die aus der unbekannten Struktur berechnet wurde, zu überlagern. Ein Korrelationskoeffizient > 0,45 und ein R-faktor < 50 % deutet darauf hin, dass die Lösung des Phasenproblems durch Molekularen Ersatz möglich sein könnte. Der Erfolg des Molekularen Ersatzes zeigt sich erst nach visueller Inspektion der errechneten Elektronendichtekarte.

Durch die Suche nach Carbonylreduktasen und Kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen in der PDB (engl. *protein data bank*) [Berman et al., 2000] sowie den Vergleich der Proteinsequenz von Sniffer mit homologen Proteinen durch das Programm Blast [Gish & States, 1993] aus der Expasy-Datenbank sollten geeignete Startmodelle gefunden werden. Aus der SCOP-Datenbank (engl. *structural classification of proteins*) [Murzin et al., 1995], in der 127 Einträge von Kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen verzeichnet sind, wurden willkürlich weitere 24 Proteinstrukturen herausgenommen. Mit dem Programm SIM [Huang & Miller, 1991] aus der Expasy-Datenbank wurde die Sequenzidentität zwischen dem Sniffer-Protein und den 42 Proteinen bekannter Kristallstruktur berechnet. Aus diesen Modellstrukturen wurden 18 für die Rotations- und Translationssuche mit dem Programm AMoRe aus der CCP4-Programmsammlung ausgewählt [Navaza, 1994]. Ferner wurde die Kristallstruktur der Schweinecarbonylreduktase (Zugriffscode der PDB: 1N5D) [Ghosh et al., 2001], welche die höchste Sequenzidentität von 28,3 % zum Sniffer-Protein aufweist, für den Molekularen Ersatz mit den Programmen CNS [DeLano & Brünger, 1995], EPMR [Kissinger et al., 1999] und MOLREP [Vagin & Teplyakov, 1997] verwendet. Die Rotations- und Translationssuche erfolgte jeweils in der Raumgruppe I222 bei einem Auflösungsbereich von 4 bis 30 Å mit den Raumkoordinaten des Polyalaningerüsts der Modellstruktur. Für eine weitere Suche wurden zusätzlich die flexiblen Schleifenbereiche des Modells entfernt. Weiterhin diente ein Homologiemodell des Sniffer-Proteins sowie seine ßαßαß-Untereinheit als Modellstruktur.

2.4.6 Verfahren der anomalen Dispersion bei multiplen Wellenlängen

Liefert die Methode des Molekularen Ersatzes keine geeigneten Startphasen für die Berechnung einer ersten Dichtekarte der Struktur, können diese mit Hilfe des MAD-Experiments (MAD = *multiple-wavelength anomalous dispersion*) bestimmt werden [Hendrickson & Ogata, 1997]. Neben der normalen Röntgenbeugung, bei der ein Phasensprung von 180° auftritt, wird ein geringer Teil der Strahlung unter Veränderung des Phasenwinkels gebeugt, der einen von 180° abweichenden Wert annimmt. Dieser Effekt wird

als anomale Streuung bezeichnet. Die Stärke des anomalen Signals ist für leichte Atome vernachlässigbar gering, jedoch für Atome mit höherer Koordinationszahl signifikant. Das maximale, anomale Streuvermögen tritt an der Absorptionskante auf. Wird die Wellenlänge der Strahlenquelle im Bereich der Absorptionskante geringfügig variiert, so verändert sich auch die Stärke des anomalen Streuvermögens. Obwohl der Anteil der anomalen Streuung an der Gesamtstreuung nur wenige Prozent beträgt, kann aus den anomalen Differenzen der relative Phasenunterschied berechnet und zur Abschätzung der Startphasen genutzt werden. Für die Durchführung des Experiments werden daher Proteinkristalle benötigt, die mindestens ein Schweratom enthalten, dessen Absorptionskante im Wellenlängenbereich des Synchrotrons liegt.

2.4.6.1 Durchführung des MAD-Experiments

Durch Expression des Sniffer-Proteins in Selenometionin-haltigem Medium wurde ein Proteinderivat hergestellt (Kapitel 2.4.3), das sieben Selenatome enthält. Die Kristalle des Selenomethionylderivats wurden zur Erzeugung der anomalen Streuung und die Durchführung des MAD-Experiments verwendet. Diese wurden nach dem gleichen Verfahren wie die nativen Kristalle mit Kälteschutzpuffer behandelt, am im Institut vorhandenen Röntgengenerator auf ihr Streuvermögen überprüft und Kristalle von guter Qualität in flüssigem Stickstoff gelagert. Das MAD-Experiment wurde in der Proteinstrukturfabrik (PSF) am Synchrotron BESSY, *Beamline* II, in Berlin durchgeführt. Zuerst wurde ein Floureszenzspektrum im Bereich von 12620 bis 12670 keV aufgenommen, in dem die K-Absorptionskante des Selens zu finden ist. Für die anschließende Datensammlung bei drei verschiedenen Wellenlängen nach der *inverse beam*-Methode wurde nur ein Kristall des Selenomethionylderivats des Sniffer Proteins verwendet. Der Kristall wurde unter Kühlung im Stickstoffstrom bei -173°C in die Mitte des Strahlengangs zentriert. Der Startwinkel für die Messung wurde mit Hilfe der Strategiefunktion in HKL2000 bestimmt. Für jede Wellenlänge wurden 90°-Datensätze in einem Winkelbereich von 70° bis 160° und von 250° bis 340° unter Rotation des Kristalls in 1°-Schritten aufgenommen. Der Kristall wurde pro Bild drei Sekunden belichtet und die Reflexintensitäten an einem Mar345 Image-Plate-Detektor, der sich in einem Abstand von 180 mm zum Kristall befand, ausgelesen. Die Aufnahme des ersten Datensatzes erfolgte deutlich oberhalb der Absorptionskante, der *remote*-Wellenlänge mit 0,932328 Å, der zweite Datensatz am Absorptionsmaximum, der *peak*-Wellenlänge mit 0,979944 Å, der dritte Datensatz am Wendepunkt des Floureszenzspektrums, dem *inflection point* mit einer Wellenlänge von 0,980163 Å. Für die Einstellung der einzelnen Wellenlängen aus der Synchrotronstrahlung diente ein Silicium-111 Kristall als Monochromator.

Die 180°-Datensätze der einzelnen Wellenlängen wurden in HKL2000 mit DENZO prozessiert und mit SCALEPACK skaliert [Otwinowski & Minor, 1996]. Bei der Skalierung der Reflexe wurden die Friedelpaare durch Verwendung des Makros *no merge original index* nicht vereinigt und der Anteil der anomalen Streuung (Option *anomalous*) bei der Skalierung berücksichtigt.
Der gesammelte Datensatz bei der *remote*-Wellenlänge mit einer Auflösung von 1,75 Å wurde als nativer Datensatz verwendet. Die Prozessierung und Skalierung erfolgte ebenfalls in HKL2000, jedoch wurden dabei die symmetrieverwandten Reflexe vereinigt.

2.4.6.2 Bestimmung der Startphasen

Mit dem Programm XPREP wurde die Datenqualität und die Stärke des anomalen Signals untersucht [Sheldrick, 2003]. Aus dem Floureszenzspektrum wurde für die Wellenlänge *peak* und *inflection point* die anomalen Streufaktoren f´ und f´´ bestimmt und daraus die anomalen Differenzen für die Strukturfaktoren der einzelnen Friedelpaare berechnet. Die Streufaktoren der *remote*-Wellenlänge wurden unter Vorgabe von Erfahrungswerten abgeschätzt und dienten als Referenz für die Berechnung des Korrelationskoeffizienten. Bis zu einer Auflösung von 2,2 Å war das anomale Signal/Rausch-Verhältnis (> 1,5) und der Korrelationskoeffizient (> 30) signifikant, trotzdem wurden nur Daten bis 3,0 Å für die Lokalisation der Selenatome verwendet. Alle sieben im Sniffer-Protein vorhandenen Selenatome wurden mit dem Programm SHELXD durch Berechnung einer *Patterson map* lokalisiert [Schneider & Sheldrick, 2002]. Für die beste Lösung wurden ein Korrelations-koeffizient von 50,3 und ein R-Faktor von 44,3 % berechnet. Alle Selenatome wurden für die Berechnung der Startphasen mit SHELXE verwendet [Sheldrick, 2002]. Das richtige Enantiomorph der *Patterson*-Funktion mit einem Kontrast von 0,65 und einem Konnektivitätsindex von 0,93 hob sich deutlich von der invertierten Seite (Kontrast: 0,38; Konnektivität: 0,87) ab. Dabei wurde eine Phasenerweiterung mit dem nativen Datensatz mit einer Auflösung von 1,75 Å durchgeführt. Nach der Gewichtung der gewonnenen Startphasen aus dem MAD-Experiment wurden vor Berechnung der Elektronendichtekarte zwei Programme aus dem CCP4-Packet angewendet [CCP4, 1994]. Mit dem Programm CAD wurden alle Reflexe einer asymmetrischen Einheit zugewiesen. Der Wasseranteil in der Zelle wurde mit Hilfe des Matthew-Koeffizienten [Kantardjieff & Rupp, 2003] berechnet und zur Modifikation der Dichte mit dem Programm DM verwendet [Cowtan & Zhang, 1999]. Für das *solvent flattening* wurde automatisch eine Maske generiert, die den Proteinanteil vom Solvenz abtrennt, bevor aus dem nativen Datensatz mit den modifizierten Phasen eine erste Elektronendichtekarte berechnet wurde.

2.4.7 Modellbau und Verfeinerung

Das Programm ARP/wARP kann bei Verwendung hochaufgelöster Daten zum Modellbau verwendet werden [Lamzin & Wilson, 1993]. Dabei werden Sauerstoffatome in der Elektronendichte positioniert und verfeinert, um anschließend automatisch zu einer Proteinhauptkette und teilweise auch zu Seitenketten verknüpft zu werden. Die fehlenden Bereiche der Proteinstruktur wurden mit dem Programm O manuell in die Elektronendichte einbaut [Jones et al., 1991]. Die Verfeinerung und die damit einhergehende Verbesserung der Elektronendichtestruktur erfolgte in einem frühen Stadium der kristallographischen Verfeinerung mit dem Programm CNS [Brünger et al., 1998]. Nach der Minimierung der Proteinstruktur und der Verfeinerung der Temperaturfaktoren wurden die Elektronendichten ($3F_o$-$2F_c$, F_o-F_c) berechnet und mit dem Programm MAPMAN in das in O lesbare dn6-Format konvertiert [Kleywegt & Jones, 1996]. Alternierend wurden die fehlenden Aminosäurereste in die Proteinstruktur eingefügt, zuletzt die Helix αC und die Substratbindeschleife. In einem großen, zusammenhängenden Bereich aus positiver Elektronendichte wurde der $NADP^+$-Kofaktor eingepasst. Mit dem Konvertierungsprogramm SHELXPRO wurden die *restraints* für die Bindungslängen und -winkel für das $NADP^+$-Molekül erzeugt [Sheldrick & Schneider, 1997]. Die anschließende Strukturverfeinerung und die Positionierung von Wassermolekülen in die Elektronendichte ($2F_o$-F_c, F_o-F_c) erfolgten in mehreren Zyklen mit dem Programm SHELXL [Sheldrick & Schneider, 1997]. In den letzten Verfeinerungsschritten wurden die Schwefelatome der Aminosäure Methionin gegen Selenatome ausgetauscht. Die abschließende Verfeinerung erfolgte mit dem Programm CNS. Die Struktur wurde solange verfeinert, bis in der F_o-F_c-Elektronendichte keine signifikanten Maxima mehr vorhanden waren.

Für die Verfeinerung wurden 5 % der Reflexe zufällig ausgewählt und nicht in die Berechnung des kristallographischen R-Faktors einbezogen. Aus diesen Reflexen wurde der freie R-Faktor berechnet, um eine objektive Interpretation der Strukturdaten zu gewährleisten [Brünger, 1992]. Nach jedem Verfeinerungszyklus wurde die Qualität der Struktur mit Hilfe des Programms PROCHECK untersucht, in dem der Ramachandran Plot und andere statistische Parameter berechnet wurden [Laskowski et al., 1993].

Die Koordinaten des Sniffer-Proteins sowie die Reflexdaten wurden in der PDB unter dem Zugriffscode 1SNY abgelegt.

2.4.8 Analyse der Struktur

Bindung des Kofaktor

Bei 340 nm wurde die Absorption von äquimolaren Mengen $NADP^+$, NADPH und Sniffer-Protein gemessen. NADPH zeigt im Gegensatz zu $NADP^+$ eine starke Absorption bei 340 nm. Aus dem Verhältnis der Absorption von $NADP^+$, NADPH und Protein bei 340 nm wurde abgeleitet, ob überwiegend das Produkt $NADP^+$ oder das Edukt NADPH in der Kofaktorbindetasche des Sniffer-Proteins gebunden ist. Für die Durchführbarkeit des Experiments müssen zwei wichtige Voraussetzungen erfüllt sein. Der Kofaktor muss nach der Expression vollständig und im Verhältnis 1:1 an das Sniffer-Protein gebunden sein. Weiterhin darf das Protein selbst keine Absorption bei 340 nm aufweisen. Ein Absorptionsspektrum von 200 nm bis 600 nm zeigte einen starke Abnahme der Absorption des Sniffer-Proteins ab einer Wellenlänge von 300 nm, so dass der Beitrag des Proteins zur Absorption bei 340 nm gering war.

Größenausschlusschromatographie

Durch Grössenausschlusschromatographie (HiLoad 26/60 Superdex 75 prep) wurde der Oligomerisierungszustand des Sniffer-Proteins bestimmt. Von dem gereinigten Protein wurden etwa 4 mg auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen, die vorher mit einem Puffer aus 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 und 200 mM NaCl äquilibriert wurde. Die Elution des Proteins erfolgte bei einem Volumen von etwa 200 ml. Zur Eichung der Gelfiltrationssäule dienten die Proteine QueA aus *B. subtilis* (39 kDa), Aldosereduktase aus *Homo sapiens* (36 kDa) und *A. fulgidus* TGT (55 kDa), die als Monomere in Lösung vorliegen.

Bestimmung der Sekundärstrukturelemente

Das Faltungsmuster des Sniffer-Proteins wurde mit den Programmen PROMOTIF [Hutchinson & Thornton, 1996] und PROSITE [Bairoch & Murzin, 1997] analysiert. Die Zuweisung der Sekundärstrukturelemente zu den einzelnen Aminosäureresten wurde visuell überprüft.

Suche nach homologen Strukturen

Die Suche nach strukturell ähnlichen Proteinen erfolgte mit Hilfe des Programms DALI [Holm & Sander, 1993]. Dabei wurden diese Proteinstrukturen mit der Kristallstruktur des Sniffer-Proteins überlagert und der Grad der Verwandtschaft durch Berechnung eines Korrelationskoeffizienten (Z-Wert) bestimmt. Für die homologen Proteinstrukturen wurden die zum Sniffer-Protein äquivalenten Aminosäurereste in den Sekundärstrukturelementen angegeben.

Überlagerung homologer Strukturen

Mit dem Programm ProFit 2.2 [McLachlan, 1982] wurde die Kristallstruktur des Sniffer-Proteins mit der in DALI gefundenen, homologen Struktur der Schweinecarbonylreduktase [Ghosh et al., 2001] überlagert. Dabei wurden die zueinander äquivalenten Sekundärstrukturelemente aus der DALI-Suche für die Überlagerung verwendet und die Standardabweichung zwischen den einzelnen Aminosäureresten der beiden Proteine ermittelt.

Berechnung der vergrabenen Oberfläche des Dimers

Da das Sniffer-Protein nur ein Molekül in der asymmetrischen Einheit enthält, wurden die symmetrieverwandten Moleküle mit Hilfe des Programms PDBSET aus dem CCP4-Packet erzeugt [CCP4, 1994]. Die Grenzfläche zwischen den Untereinheiten des Dimers, der benachbarten Moleküle sowie zwischen dem Protein und dem Kofaktor wurde mit dem Programm MS berechnet [Connolly, 1983].

2.4.9 Ligandenbasiertes *Docking*

Die Substrate des Sniffer-Proteins, die in das aktive Zentrum der Proteinbindetasche eingepasst werden sollten, wurden in SYBYL gebaut und anschließend minimiert [SYBYL]. Den einzelnen Atomen der Substrate und des $NADP^+$-Moleküls wurden Partialladungen mit Hilfe der Gasteiger-Funktion zugewiesen. Die Anzahl der drehbaren Bindungen wurde in AutoTors berechnet und der Ligand innerhalb eines Gitters mit einer Dimension von 24 x 22 x 22 $Å^3$, welches das aktive Zentrum umgibt, plaziert. Die Substrate wurden in Anwesenheit des Kofaktors mit Hilfe des genetischen Algorithmus von Lamarck, das im Programm AutoDock 3,0 implementiert ist, flexibel in die Bindetasche des Sniffer-Proteins eingepasst [Morris et al., 1998]. Aus der Kristallstruktur wurden vorher alle vorhandenen Wassermoleküle entfernt. Für jeden Liganden wurden 100 Bindungsmodi generiert, diese nach einer Konformationsanalyse gruppiert und durch die Bewertungsfunktion des Programms AutoDock nach ihrer durchschnittlichen *Docking*-Energie in eine Rangliste eingeteilt. Mit dem Programm Pymol erfolgte die visuelle Inspektion der Ergebnisse [Pymol].

3 Die Rolle des Aspartat 280 in der katalytischen Reaktion der tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT)

3.1 Einleitung

3.1.1 Biologische Funktion der TGT

3.1.1.1 Biosynthese von tRNA-Queuosin

Queuin ist eine modifizierte Base, die in eubakteriellen und eukaryontischen Organismen in der $tRNA^{Asn}$, $tRNA^{Asp}$, $tRNA^{His}$ und $tRNA^{Tyr}$ an der *wobble* Position 34 zu finden ist. Zur *de novo*-Synthese von Queuin sind ausschließlich eubakterielle Organismen befähigt. Eukaryonten hingegen nehmen Queuin mit der Nahrung auf und bauen es direkt in die tRNA ein [Romier et al., 1998]. Wahrscheinlich spielt die Queuin-Base eine modulierende Rolle im Translationsprozess. Darüber hinaus wird eine Korrelation des Queuin-Gehalts in der tRNA mit der Zelldifferenzierung in Eukaryonten diskutiert. Über die exakte physiologische Funktion der Queuin-Base ist bisher jedoch wenig bekannt.

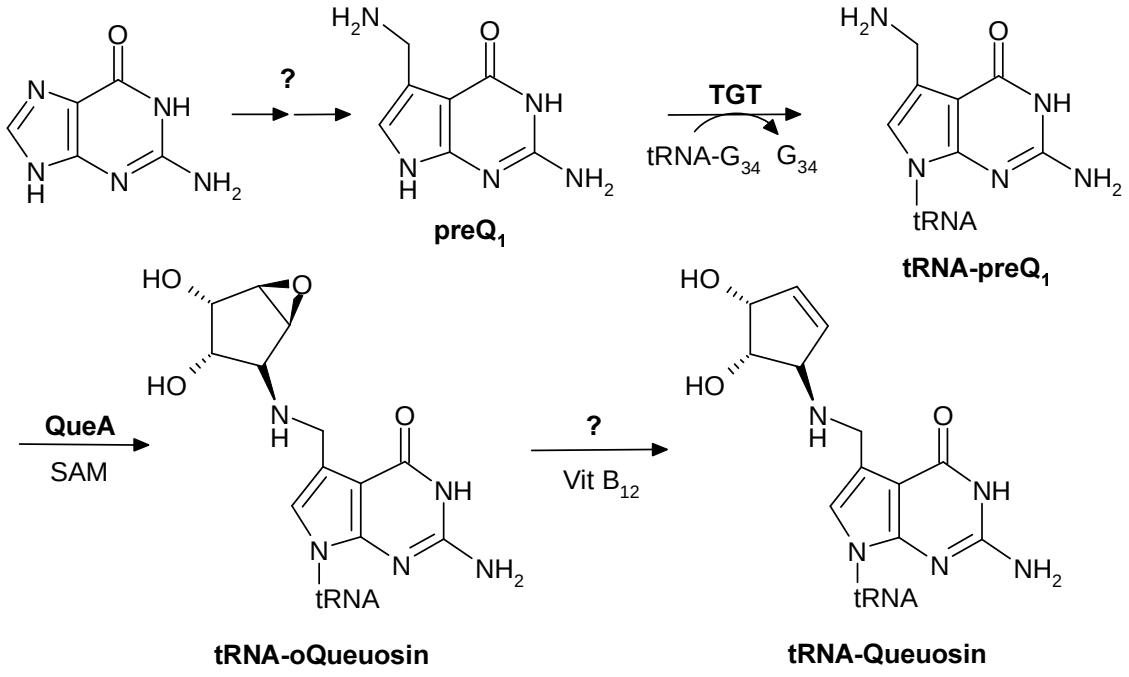


Abb. 16: Biosynthese von tRNA-Queuosin in Eubakterien.

In Eubakterien wird zunächst in unbekannten enzymatischen Prozessen aus Guanosintriphosphat die prämodifizierte Base $preQ_1$ (7-(Aminomethyl)-7-deazaguanin) synthetisiert [Slany et al., 1994]. Diese Base wird dann durch die tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) in die *wobble* Position 34 bestimmter tRNAs im Austausch gegen Guanin eingebaut [Okada & Nishimura, 1979]. Die S-Adenosylmethionin: tRNA-Ribosyltransferase/Isomerase (QueA) katalysiert in einer S-Adenosylmethionin-abhängigen Reaktion die Übertragung von Epoxycyclopentandiol auf das Stickstoffatom der tRNA-Aminomethylgruppe am $preQ_1$ [Slany et al., 1993]. In einem Coenzym-B_{12}-abhängigen Schritt wird das Epoxyqueuosin (7-((N-(2,3-Epoxy-4,5-cis-dihydroxycyclopent-1-yl)amino)methyl)-7-deazaguanosin) schließlich zu Queuosin (7-(((4,5-cis-dihydroxy-2-cyclopenten-1-yl)amino)-methyl)-7-deazaguanosin) reduziert [Frey et al., 1988].

3.1.1.2 Rolle der TGT in der Pathogenese von Shigellen

Shigellen sind Gram-negative, sporenlose, fakultativ anaerobe Stäbchen und Erreger der Bakterienruhr [Sansonetti, 2001]. Als nahe Verwandte von *Escherichia coli* gehören sie zur Familie der Enterobakterien. Die endemische Form der Bakterienruhr wird von den Spezies *S. flexneri* und *S. sonnei* hervorgerufen; Ursache für die epidemische Form mit häufig tödlichem Ausgang ist *S. dysenteriae*, wohingegen eine Infektion durch *S. boydii* mit einem milden Verlauf der Erkrankung einhergeht.

Die Übertragung der Erreger erfolgt meist auf dem fäkal-oralen Weg. Die minimale Infektionsdosis ist mit 10 - 100 Bakterien äußerst gering. Hauptrisikofaktor ist vor allem mangelnde Hygiene. Kennzeichnende Symptome sind anfänglich flüssige Diarrhö, kurz danach Fieber, starke Eingeweidekrämpfe und blutig-schleimige Stühle. Gelegentlich treten Komplikationen wie Bauchfellentzündungen oder Nierenversagen auf. Jährlich erkranken ungefähr 150 Millionen Menschen, davon 99 % in Ländern der Dritten Welt. Fast eine Millionen Menschen, darunter meist Kleinkinder, sterben pro Jahr an den Folgen der Bakterienruhr.

Die Behandlung erfolgt durch orale Gabe von Salzlösungen in einer definierten Zusammensetzung und durch Einnahme von Antibiotika, die meist aus der Stoffklasse der Fluoroquinolone stammen wie beispielsweise Norfloxacin [Bhattacharya & Sur, 2003]. Gegen die früher verwendeten Antibiotika wie Sulfonamide, Tetracycline, Ampicillin und Cotrimoxazol entwickelten die Erreger zunehmend Resistenzen. Deshalb ist die Suche nach innovativen Therapiemöglichkeiten und die Entwicklung neuer Antibiotika dringend geboten.

Nach oraler Aufnahme gelangen die Bakterien im Dickdarm über so genannte M-Zellen an die basolaterale (dem Darmlumen abgewandte) Seite des Epithels, von wo aus die Invasion in die Epitelzellen erfolgt [Sansonetti & Phalipon, 1999]. Das Eindringen in die Zellen über

die apikale (dem Darmlumen zugewandte) Seite ist nicht möglich. Die Shigellen besitzen ein 220 Kilobasen großes Virulenzplasmid, das die Produktion von Invasinen und damit die bakterielle Zellinvasion durch Makropinocytose ermöglicht. Im nährstoffreichen Zytoplasma können sich die Erreger schnell vermehren und sich durch die Zellmembran auf benachbarte Epithelzellen ausbreiten. Ein Teil der eingedrungenen Krankheitserreger wird durch Makrophagen auf der basolateralen Seite der Dickdarmmukosa phagozytiert. Dadurch kommt es zu einer Freisetzung von Zytokinen, die eine heftige Entzündung des Darmepithels verursachen. Durch Rekrutierung von Granulozyten, die das Darmepithel durchwandern, entstehen Lücken im Epithel, was die Erreger nutzen, um das Abschlussgewebe zu überwinden. Die Abwehrmechanismen des menschlichen Körpers fördern daher die bakterielle Invasion in die Darmmukosa, was die Symptomatik der Bakterienruhr verstärkt [Dehio, 1998].

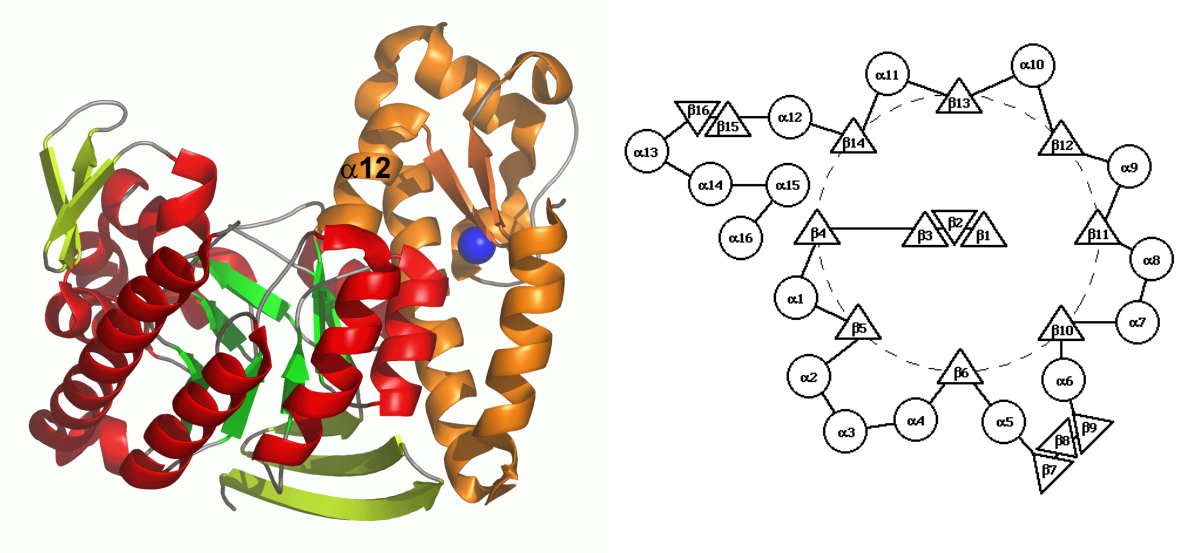
Die Anwesenheit modifizierter tRNAs im eubakteriellen Organismus ist eine wichtige Voraussetzung für die Translation bestimmter Virulenzfaktoren. Insbesondere die Queuin-Base in der *wobble* Position 34 und die Base 2-Methylthio-N^6-isopentenyladenin an Position 37 sind für die Pathogenität der Shigellen essentiell [Durand et al., 2000]. Ein Defekt des *tgt*-Gens, das an der tRNA-Queuin-Synthese beteiligt ist [Durand et al., 1994], sowie des *miaA*-Gens, das bei der Biosynthese des 2-Methylthio-N^6-isopentenyladenosins eine Rolle spielt [Durand et al., 1997], führen im Vergleich zum Wildtyp zu einer deutlichen Verminderung der Virulenz. In beiden Fällen ist dies auf die stark reduzierte Translation der virF-mRNA zurückzuführen, deren Produkt kaskadenartig die Expression einer Vielzahl weiterer Virulenzfaktoren steuert. Enzyme, die an der Biosynthese dieser modifizierten Basen beteiligt sind, bieten deshalb einen idealen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Antibiotika gegen die Bakterienruhr.

3.1.2 Kristallstruktur der *Zymomonas mobilis* TGT

Die tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) tauscht das an Position 34 vorhandene Guanin in der Antikodonsequenz GUN (N = beliebige Base) gegen die modifizierte Base $preQ_1$ aus [Okada & Nishimura, 1979]. Die Kristallstruktur der *Zymomonas mobilis* TGT wurde von Romier et al. [1996a] mit einer Auflösung von 1,85 Å bestimmt. Das tRNA-modifizierende Enzym besitzt eine Sequenzidentität von 55 % zur *S. flexneri* TGT. Die Aminosäurereste in der Bindetasche sind in beiden TGT-Enzymen weitgehend konserviert. Deshalb dient die *Z. mobilis* TGT sowohl als Modell für das Design neuartiger, selektiver Inhibitoren gegen die Bakterienruhr als auch als Modell für strukturelle Untersuchungen, um bei der Aufklärung des Enzymmechanismus behilflich zu sein.

3.1.2.1 Sekundärstruktur

Wie die Kristallstruktur zeigt, ist die 42 kDa große *Z. mobilis* TGT aus zwei Subdomänen aufgebaut. Die N-terminale Subdomäne repräsentiert im Wesentlichen ein $(ß/\alpha)_8$-Fass, ein Faltungsmuster, das im Kernbereich aus einem achtsträngigen, parallelen ß-Faltblatt besteht. Die Außenseite des Fasses ist von α-Helices umgeben. Am N-Terminus verschließt ein dreisträngiges, antiparalleles ß-Faltblatt die N-terminale Seite des Fasses. In der Familie der $(ß/\alpha)_8$-Strukturen ist eine α-Helix alternierend mit einem ß-Strang verknüpft. Im Falle der *Z. mobilis* TGT sind bis zu drei α-Helices bzw. zusätzlich ein dreisträngiges, antiparalleles ß-Faltblatt zwischen zwei ß-Strängen des Fasses inseriert. Die Helix α12 bildet die Schnittstelle zwischen dem N-terminalen Fass und dem C-terminalen Strukturmotiv. In der kleinen C-terminalen Subdomäne ist ein Zink-Ion durch die Seitenketten von drei Cysteinen und einem Histidin koordiniert. Die Bindung der tRNA an die TGT erfolgt über die positiv geladene Oberfläche des C-Terminus, insbesondere durch basische Aminosäuren der terminalen Helix α12, die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der tRNA interagiert.



(I) (II)

Abb. 17: Bandmodell (I) und Topologieschema (II) der *Z. mobilis* TGT. (I) Die acht ß-Stränge des $(ß/\alpha)_8$-Fasses sind in grün gefärbt. Die umliegenden α-Helices sind in roter Farbe hervorgehoben. Das Zink-Ion ist als blaue Kugel dargestellt. Die α-Helices und die beiden antiparallelen ß-Stränge in oranger Farbe gehören zur C-terminalen Subdomäne der TGT. (II) ß-Stränge sind als Dreiecke und α-Helices als Kreise dargestellt. Die acht kreisförmig angeordneten ß-Stränge (ß4, ß5, ß6, ß10, ß11, ß12, ß13 und ß14) bilden die fassartige Struktur der N-terminalen Subdomäne.

3.1.2.2 Erkennung der tRNA durch die TGT

Die TGT katalysiert den Austausch von Guanin gegen $preQ_1$ an der ersten Position des Antikodons der $tRNA^{Asn}$, $tRNA^{Asp}$, $tRNA^{His}$ und $tRNA^{Tyr}$ [Okada & Nishimura, 1979]. Diese tRNAs beinhalten die Antikodonsequenz GUN (N = beliebige Base) an Position 34 - 36. Die Basenfolge UGU an Position 33 - 35 der Antikodonschleife, die aus sieben ungepaarten Basen besteht, ist das minimale tRNA-Strukturmotiv, das von der TGT spezifisch erkannt wird. Die Substitution der Nukleotide an Position 34 und 35 in den vier tRNAs bzw. der Austausch der Uridin-Base an Position 33 gegen ein Pyrimidin verhindert die Bildung des TGT-tRNA-Komplexes [Curnow & Garcia, 1995; Nakanishi et al., 1994]. Die Uridin-Base an Position 33 ist in allen prokaryontischen tRNAs konserviert. Bei der katalytischen Reaktion wird nicht die gesamte tRNA an das Protein gebunden. Bereits ein 17 Basen umfassendes Oligoribonukleotid, das die Antikodonschleife und den zugehörigen Stamm der $tRNA^{Tyr}$ repräsentiert, wird von der *E. coli* TGT erkannt [Curnow et al., 1993]. Die Anwesenheit eines Pyrimidin-Nukleotids an Position 32 ist für die Erkennung der tRNA durch die TGT essentiell [Nakanishi et al., 1994]. Das Pyrimidin an Position 32 beeinflusst zusammen mit U_{33} in den natürlichen tRNAs der TGT die Konformation der Antikodonschleife bei der tRNA-Bindung [Nonekowski & Garcia, 2001].

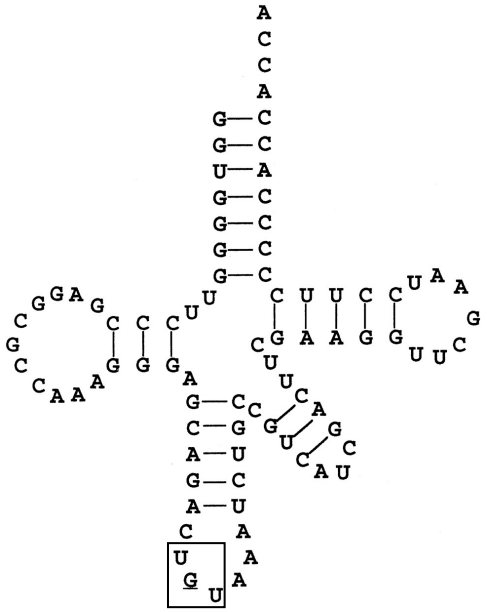


Abb. 18: Schematische Darstellung der *E. coli* $tRNA^{Tyr}$. Die TGT erkennt spezifisch die Basenfolge UGU in der Antikodonschleife. An Position 34 wird das Guanin gegen $preQ_1$ ausgetauscht.

3.1.2.3 Aktives Zentrum

Auf der C-terminalen Seite des $(ß/\alpha)_8$-Fasses befindet sich das aktive Zentrum der *Z. mobilis* TGT [Romier et al., 1996a]. Das Asp102 und Asp280 sind an der katalytischen Reaktion beteiligt. In der Kristallstruktur der TGT im Komplex mit $preQ_1$ wird das Substrat durch ein ausgedehntes Wasserstoffbrückennetzwerk in der Bindetasche des Enzyms positioniert. Die Seitenketten der Aminosäuren Ser103, Asp156, Gln203 und Gly230 sind an der Erkennung des Substrats beteiligt. Das planare Ringsystem der Base ist über π-π-Wechselwirkungen an den Phenolring der Tyr106-Seitenkette gebunden, der in der apo-Form des Proteins den Zugang zum aktiven Zentrum verschließt. Auf der gegenüberliegenden Seite wird die Bindetasche durch einen hydrophoben Kontakt zur Met260-Seitenkette begrenzt. Die Aminomethylgruppe an Position 7 des Substrats wird spezifisch vom Carbonyl-Sauerstoff des Leu231 und teilweise auch von der Cys158-Seitenkette der TGT erkannt. Alle Aminosäuren sind mit Ausnahme des Tyr106 in den Bindetaschen der *S. flexneri* und *E. coli* TGT konserviert. Dort ist das Tyr106 gegen ein Phenylalanin ausgetauscht.

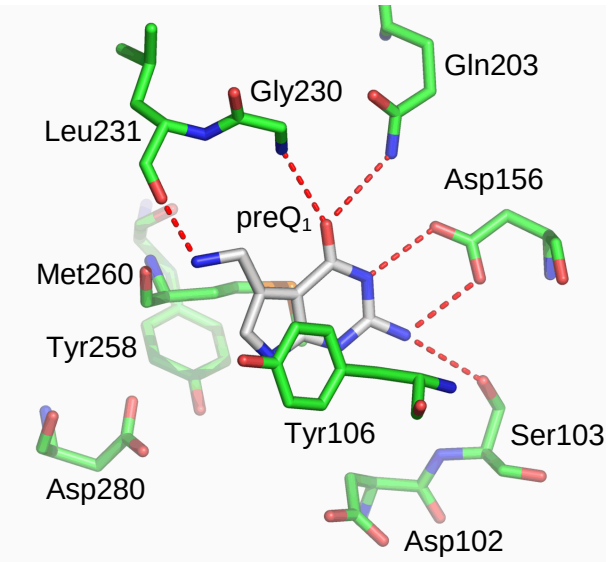


Abb. 19: Substratbindetasche der *Z. mobilis* TGT. Das Substrat $preQ_1$ und die benachbarten Seitenketten sind als Stabmodell in grüner Farbe dargestellt. Die roten, gestrichelten Linien kennzeichnen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und Substrat.

3.1.3 TGT im Komplex mit RNA-Substrat

Im Verlauf dieser Arbeit wurden von Xie et al. [2003] zwei Kristallstrukturen der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit RNA-Substrat (Antikodonschleife der tRNA) mit einer Auflösung von je 2,9 Å veröffentlicht. Durch Zugabe des Basenanalogons 9-Deazaguanin zum TGT-RNA-

Gemisch bildete sich ein stabiler kovalenter Komplex zwischen der TGT und dem RNA-Substrat aus, der kristallisiert werden konnte. In der zweiten Kristallstruktur ist das $preQ_1$ kovalent an die Ribose des RNA-Substrats gebunden. Durch Zugabe von $preQ_1$ in die Kristalllösung konnte die Basenaustauschreaktion innerhalb des Kristalls erfolgen. Die Kristallstrukturen weisen einige überraschende neue Erkenntnisse in Bezug auf die Funktion des Asp280 und Asp102 auf.

In den Kristallstrukturen ist das RNA-Substrat an der C-terminalen Seite des $(ß/\alpha)_8$-Fasses positioniert und wird von dem dreisträngigen, antiparallelen ß-Faltblatt zwischen Helix α5 und α6 flankiert (Abb. 20). Die N-terminale Subdomäne des Proteins bindet an die ungepaarten Nukleotide 32 - 36 am 5´-Ende der Antikodonschleife. Die Basenfolge UGU an Position 33 - 35 der tRNA, die von der TGT spezifisch erkannt wird, befindet sich in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms. Die C-terminale Subdomäne, insbesondere die Strukturmotive ß14 bis α15, binden an das Phosphatrückgrat des Antikodonstamms. Der erste Kontakt zwischen der TGT und dem RNA-Substrat wird vermutlich über eine relativ unspezifische Interaktion mit der Base U_{33} gebildet. Diese induziert eine Konformationsänderung in der flexiblen Antikodonschleife, um die Anlagerung der Basen G34 und U35 des RNA-Substrats an die TGT zu ermöglichen.

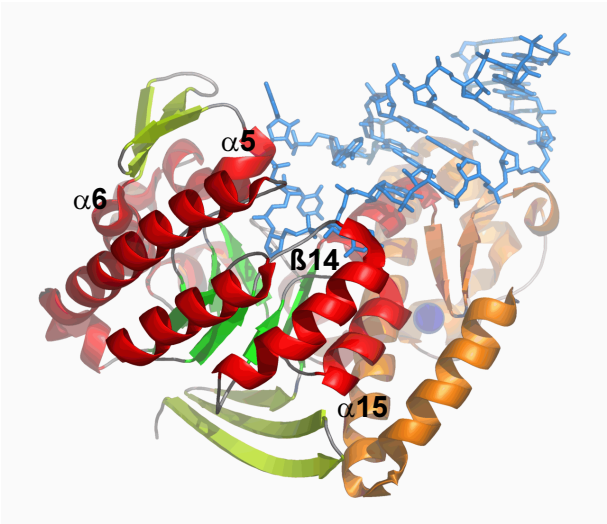


Abb. 20: Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit RNA-Substrat. Die Sekundärstrukturelemente sind in den gleichen Farben dargestellt wie in Abb. 17 (I). Die Antikodonschleife ist als Stabmodell in blauer Farbe gezeigt. Der Schleifenbereich des RNA-Substrats bindet an die C-terminale Seite des $(ß/\alpha)_8$-Fasses in der Nähe des aktiven Zentrums. Der Antikodonstamm wird von der C-terminalen Subdomäne der TGT erkannt.

Im ternären Komplex der TGT mit RNA-Substrat und 9-Deazaguanin ist die Carboxylatgruppe der Asp280-Seitenkette kovalent mit dem 1´-Kohlenstoffatom der Ribose

verbunden (Abb. 21 I). Der verbleibende Sauerstoff der Carbonylgruppe bildet eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe der Tyr258-Seitenkette. Dadurch wird die Asp280-Seitenkette optimal in der Bindetasche positioniert, um den nukleophilen Angriff an der Ribose des RNA-Substrats zu ermöglichen. Aus der Kristallstruktur geht zweifelsfrei hervor, dass das Asp280 als katalytisches Nukleophil fungiert. Aufgrund der fehlenden Nukleophilie an Position 9 des Basenanalogons ist das kovalente Intermediat zwischen der TGT und dem RNA-Substrat sehr stabil. In der Kristallstruktur der TGT im Komplex mit RNA-Substrat und $preQ_1$ wurde das kovalente Intermediat gespalten und das RNA-Substrat mit $preQ_1$ verknüpft. Dies führt zu einer Veränderung der Konformation der Ribose und einer Verschiebung der $preQ_1$-Base in Richtung des Zuckermoleküls, so dass die Ausbildung des modifizierten RNA-Substrats ermöglicht wird (Abb. 21 II). Die Asp102-Seitenkette orientiert sich in die Bindetasche und bindet über Wasserstoffbrücken an die Liganden 9-Deazaguanin bzw. $preQ_1$. Nach der Konformationsänderung der Ribose bildet die Asp102-Seitenkette eine Wasserstoffbrücke zur 2´-Hydroxylgruppe der Ribose aus.

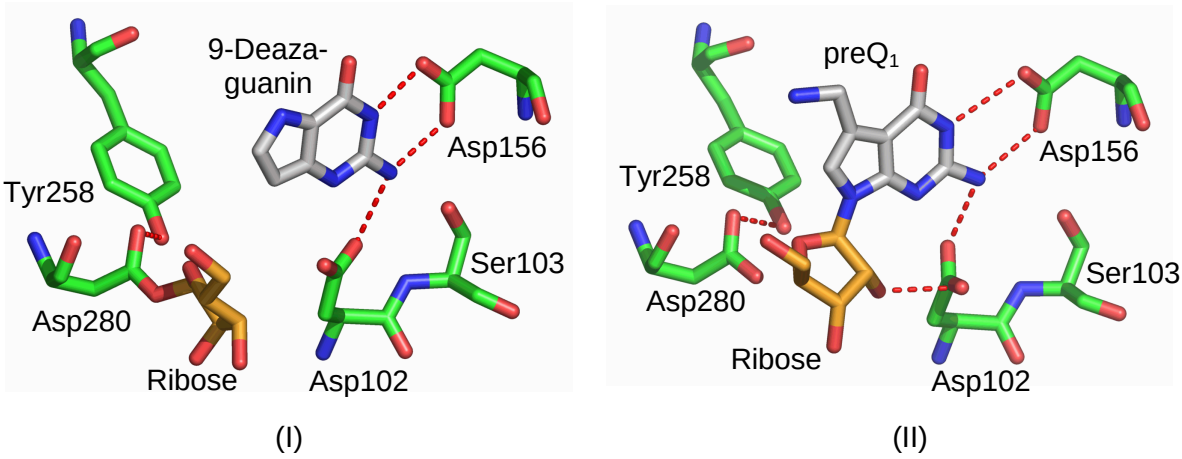


Abb. 21: Die Kristallstrukturen der ternären TGT-RNA-Komplexe mit den Substraten 9-Deazaguanin (I) bzw. $preQ_1$ (II). Die Aminosäurereste im aktiven Zentrum sind als Stabmodell in grün dargestellt. Das 9-Deazaguanin und das $preQ_1$ sind in weiß gezeigt. Der Riboserest an Position 34 des RNA-Substrats ist in orange hervorgehoben. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch rote, gestrichelte Linien angedeutet.

3.1.4 Katalytischer Mechanismus der TGT

Die TGT katalysiert den Austausch der Base Guanin gegen $preQ_1$ nach einem assoziativen Mechanismus über ein kovalentes Intermediat. Auf der Grundlage der kristallographischen Daten der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit RNA und Kleinmolekül-Substrat wurde von Xie et al. [2003] folgender Enzymmechanismus für die TGT-Enzyme vorgeschlagen. Nach

spezifischer Erkennung der tRNA durch die TGT wird die Antikodonschleife an das Enzym gebunden. Die Carboxylatgruppe der Asp280-Seitenkette greift nukleophil am 1´-Kohlenstoffatom der Ribose an, die sich an Position 34 in der tRNA befindet. Die Bindung zwischen der Ribose und Guanin wird gespalten und gleichzeitig das kovalente Intermediat zwischen der tRNA und der Asp280-Seitenkette gebildet. Das Guanin wird protoniert und aus der Bindetasche freigesetzt. Anschließend bindet das Substrat preQ$_1$, vermutlich durch leichte Konformationsänderung der Tyr106- und Cys158-Seitenketten, an das aktive Zentrum der TGT. Das Proton der Base an Position N9 wird vermutlich auf die Asp102-Seitenkette übertragen. Durch nukleophilen Angriff spaltet das preQ$_1$ die kovalente Bindung zwischen dem 1´-Kohlenstoffatom der Ribose und der Asp280-Seitenkette. Dabei wird die modifizierte tRNA gebildet. Das tRNA-Produkt dissoziiert anschließend von der TGT ab. Bisher ist noch nicht zweifelsfrei geklärt, wie die Protonierung der freigesetzten Base Guanin und die für den nukleophilen Angriff erforderliche Deprotonierung von preQ$_1$ erfolgen. Aus der Kristallstruktur sowie Ergebnissen von Mutagenesestudien kann jedoch mit einiger Wahrscheinlichkeit abgeleitet werden, dass das Asp102 dabei als generelle Säure-Base fungiert.

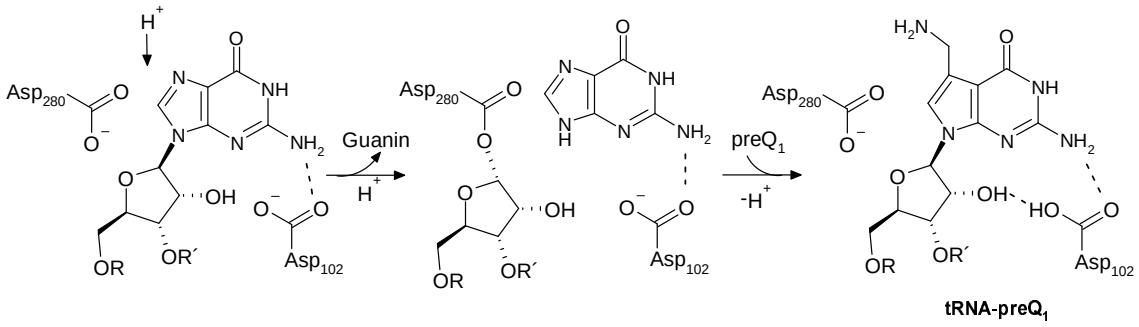


Abb. 22: Assoziativer Mechanismus der TGT, abgeleitet aus der Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit tRNA und den Substraten 9-Deazaguanin bzw. preQ$_1$. Bei der katalytischen Reaktion bildet die Asp280-Seitenkette intermediär einen kovalenten Komplex mit dem 1´-Kohlenstoffatom der Ribose an Position 34 der tRNA.

3.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit einem RNA-Substrat und 9-Deazaguanin zeigt, dass das Asp280 als katalytisches Nukleophil bei der Basenaustauschreaktion fungiert [Xie et al., 2003]. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine auf Mutationsstudien basierende biochemische Charakterisierung verschiedener *E. coli* TGT-Enzyme, in denen das Asp280 gegen verschiedene Aminosäurereste ausgetauscht wurde. Weiterhin wurde eine kristallographische Studie der *Z. mobilis* TGT(D280E) durchgeführt [Kittendorf et al., 2003]. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zum Zeitpunkt ihrer Veröffentlichung aufgrund der damals noch fehlenden TGT-RNA-Komplexstruktur im Hinblick auf die Funktionsweise des Asp280 im aktiven Zentrum nicht eindeutig interpretiert werden. Die Resultate belegen jedoch eindeutig die Funktionsweise des Asp280 als katalytisches Nukleophil.

Die biochemische Charakterisierung der *E. coli* TGT(D264)-Enzyme, in denen das Aspartat gegen verschiedene Aminosäurereste ausgetauscht wurde, erfolgte durch Jeffrey D. Kittendorf am Institut für medizinische Chemie der Universität in Michigan (USA). Da für die *E. coli* TGT noch keine geeigneten Kristallisationsbedingungen gefunden werden konnten, wurde die entsprechende Mutation in die *Z. mobilis* TGT eingefügt, die in kristalliner Form erhältlich ist. Die Bestimmung der Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT(D280E) sowie ihre kinetische Charakterisierung erfolgte am Institut für Pharmazeutische Chemie in Marburg.

Es wird darauf hingewiesen, dass das Asp89 in der *E. coli* TGT dem Asp102 in der *Z. mobilis* TGT entspricht und dass das Asp264 in der *E. coli* TGT zum Asp280 in der *Z. mobilis* TGT äquivalent ist.

3.2.1 Biochemische Studien

3.2.1.1 Kinetische Charakterisierung verschiedener TGT(D264)-Enzyme

Die Funktion des Asp264 in der *E. coli* TGT wurde zunächst von unseren Kooperationspartnern in kinetischen Studien näher untersucht [Kittendorf et al., 2003]. In früheren Studien war bereits gezeigt worden, dass der Austausch des Asp89 gegen Alanin, Cystein und Asparagin zu einem starken Aktivitätsverlust des Enzyms führt [Kittendorf et al., 2001; Romier et al., 1996b]. Nun wurde die Aktivität verschiedener TGT(D264)-Enzyme, in denen das Aspartat gegen Alanin, Asparagin, Glutamat, Glutamin, Histidin oder Lysin ausgetauscht wurde, in einem radioaktiven *assay* bestimmt. Dabei wird die Einbaurate von radioaktiv markiertem Guanin in die *wobble* Position der $tRNA^{Tyr}$ (im Austausch gegen das

natürliche Guanin in der $tRNA^{Tyr}$) gegen die Zeit gemessen. Die kinetischen Parameter wurden sowohl mit Guanin als auch mit $tRNA^{Tyr}$ als Substrat bestimmt. Der Austausch der Asp264-Seitenkette gegen die Aminosäuren Alanin, Asparagin, Glutamin, Lysin oder Histidin führte zu einem sehr starken Aktivitätsverlust des Enzyms. Nur die TGT(D264E) zeigte eine signifikante Aktivität (Tab. 6). Das mutierte Enzym besitzt jedoch im Vergleich zur Wildtyp-TGT eine leicht verringerte Affinität gegenüber den beiden Substraten Guanin und $tRNA^{Tyr}$, was sich in entsprechend erhöhten K_M-Werten widerspiegelt. Die katalytische Aktivität (k_{kat}) ist um eine Zehnerpotenz erniedrigt. Die katalytische Effizienz (k_{kat}/K_M) der TGT(D264E) ist im Vergleich zum Wildtyp etwa um das 30-fache reduziert.
Weiterhin wurde die Asp89-Seitenkette in der *E. coli* Wildtyp-TGT gegen ein Glutamat ausgetauscht. Die resultierenden Veränderungen der katalytischen Effizienz unterscheiden sich für die beiden Substrate Guanin und $tRNA^{Tyr}$ deutlich. Während sie sich, bezogen auf die $tRNA^{Tyr}$ nur um ein Drittel erniedrigt, sinkt sie für das Substrat Guanin etwa um den Faktor 50.

	K_m [µM]	k_{kat} [10^{-4} s^{-1}]	k_{kat}/K_m [10^{-4} s^{-1} $µM^{-1}$]	rel k_{kat}/K_m [10^{-4} s^{-1} $µM^{-1}$]
tRNA				
TGT(wt)	0,12	12,1	101	1
TGT(D89E)	0,11	7,1	65	0,65
TGT(D264E)	0,46	1,4	3,0	0,03
Guanin				
TGT(wt)	0,1	12,1	121	1
TGT(D89E)	2,61	5,9	2,3	0,02
TGT(D264E)	0,3	1,3	4,3	0,04

Tab. 6: Kinetische Parameter der *E. coli* TGT(D89E) und TGT(D264E) unter Verwendung der Substrate $tRNA^{Tyr}$ bzw. Guanin.

Die kinetischen Studien belegen, dass sowohl das Asp264 als auch das Asp89 bei der Katalyse eine wichtige Rolle spielen. Nur die TGT(D264E) und die TGT(D89E) weisen noch eine signifikante Aktivität auf, die jedoch im Vergleich zur Wildtyp-TGT deutlich erniedrigt ist. Folglich ist die Anwesenheit der Carboxylgruppen an Position 89 und 264 im aktiven Zentrum für die katalytische Reaktion essentiell.
Der assoziative Mechanismus verläuft in zwei Schritten. Die $tRNA^{Tyr}$ repräsentiert den ersten Schritt der katalytischen Reaktion, während das Guanin die Katalyse im zweiten Schritt im Wesentlichen beeinflusst. Daher können die kinetischen Parameter der Substrate $tRNA^{Tyr}$ und Guanin getrennt voneinander betrachtet werden.

In Bezug auf die $tRNA^{Tyr}$ resultiert die Erniedrigung der katalytischen Effizienz der TGT(D264E) im Vergleich zur TGT(D89E) hauptsächlich aus einer deutlich verringerten katalytischen Aktivität. Daraus lässt sich ableiten, dass die TGT(D89E) die Ausbildung des kovalenten Intermediats kaum beeinflusst, während in der TGT(D264E) der kovalente Komplex wesentlich langsamer gebildet wird. In Bezug auf das Guanin ist die katalytische Effizienz in den beiden mutierten TGT-Enzymen stark erniedrigt. Im Falle der TGT(D264E) liegen die kinetischen Parameter in der gleichen Größenordnung wie für das Substrat $tRNA^{Tyr}$. Daher ist in der TGT(D264E) nicht nur der erste Schritt, die Bildung des kovalenten Intermediats, sondern auch der zweite Schritt, die Spaltung des Komplexes durch Guanin weniger effizient. In der TGT(D89E) hingegen ist die niedrige katalytische Effizienz vor allem auf die signifikant verringerte Bindungsaffinität von Guanin zurückzuführen. Das Guanin wird durch das Glutamat im Vergleich zum Aspartat weniger gut in der Bindetasche fixiert. Dadurch wird die Deprotonierung des Guanins weniger effizient. Das Proton wird vermutlich auf das Asp/Glu89 übertragen. Weiterhin sollte erwähnt werden, dass die Aminosäuren Aspartat bzw. Glutamat aufgrund ihrer unterschiedlichen pK_a-Werte (Aspartat: 3,9; Glutamat: 4,3) ebenfalls den Protonentransfer beeinflussen.
Diese Ergebnisse bestätigen, dass das Asp264 als katalytisches Nukleophil fungiert. Das Asp89 hingegen ist an der Bindung des Substrats nach dem Basenaustausch und vermutlich an der Deprotonierung des $preQ_1$ beteiligt.

3.2.1.2 *band-shift*-Experimente

In *band-shift*-Experimenten unter milden, denaturierenden Bedingungen wurde untersucht, ob die verschiedenen TGT(D264)-Enzyme, in denen das Aspartat gegen Alanin, Asparagin, Glutamat, Glutamin, Histidin oder Lysin ausgetauscht wurde, in der Lage sind, einen kovalenten Komplex mit der $tRNA^{Tyr}$ zu bilden (Abb. 23) [Kittendorf et al., 2003]. Dazu wurde eine Minihelix der $tRNA^{Tyr}$ verwendet, die nur aus einem verlängerten Antikodonstamm und dem zugehörigen Schleifenbereich der $tRNA^{Tyr}$ besteht. Dieses minimale RNA-Substrat wird von der TGT spezifisch erkannt. Die apo-TGT besitzt unter denaturierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von 44 kDa, der kovalente TGT-RNA-Komplex eine Größe von 50 kDa. Im SDS-Gel ist zu erkennen, dass nur die Wildtyp-TGT und die TGT(D264E) einen kovalenten Komplex mit dem RNA-Substrat bilden. Alle anderen TGT(D264)-Enzyme, in denen das Aspartat gegen Alanin, Asparagin, Glutamin, Histidin oder Lysin ausgetauscht wurde, können kein kovalentes Intermediat mit dem RNA-Substrat ausbilden.
Die Ergebnisse aus dem *band-shift*-Experiment korrelieren mit den kinetischen Daten. Beide Untersuchungen bestätigen, dass nur die TGT(D264E) eine signifikante Aktivität besitzt. Im Gegensatz zur Wildtyp-TGT ist bei der TGT(D264E) die Bande des kovalenten Komplexes

zwischen dem Glu280 und dem RNA-Substrat in Bezug auf die apo-TGT verstärkt. Dies zeigt, dass das Guanin, das bei der Bildung des kovalenten Intermediats freigesetzt wurde, nicht so leicht wieder in das RNA-Substrat eingebaut werden kann. Der kovalente Komplex besitzt eine größere Stabilität als das kovalente Intermediat im Wildtyp. Dies konnte bereits aus den kinetischen Studien abgeleitet werden.

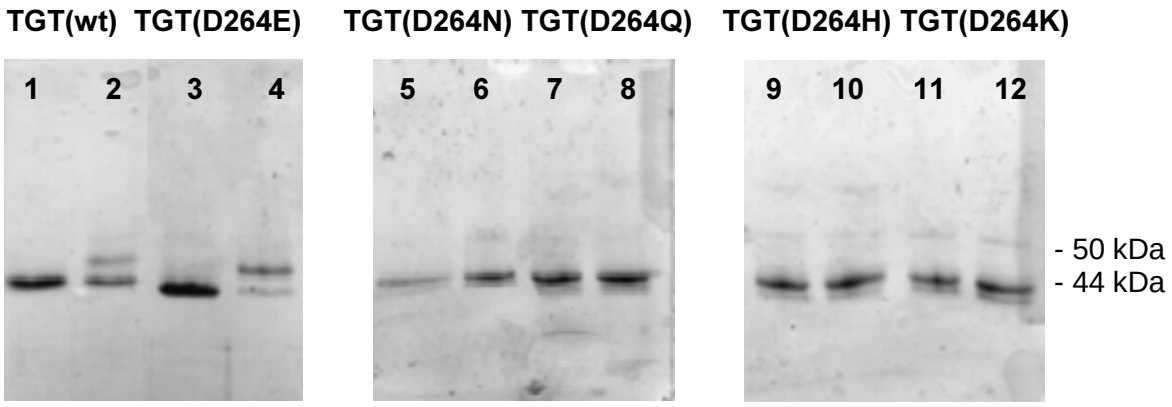


Abb. 23: Verhalten der Wildtyp-TGT und verschiedener TGT(D264)-Enzyme, in denen das Aspartat gegen Alanin, Asparagin, Glutamat, Glutamin, Histidin oder Lysin ausgetauscht wurde, im *band-shift*-Experiment in Anwesenheit von RNA-Substrat. Auf Bahnen mit ungeraden Ziffern wurde nur TGT und auf Bahnen mit geraden Ziffern TGT und tRNA-Minihelix aufgetragen. Die unteren Banden entsprechen der apo-TGT, die oberen Banden der TGT im kovalenten Komplex mit der tRNA-Minihelix. Bahn 1 und 2: TGT(wt), Bahn 3 und 4: TGT(D264E), Bahn 5 und 6: TGT(D264N), Bahn 7 und 8: TGT(D264Q), Bahn 9 und 10: TGT(D264H), Bahn 11 und 12: TGT(D264K).

In einem weiteren Experiment wurde die Stabilität des kovalenten Komplexes zwischen dem RNA-Substrat und der TGT(wt), der TGT(D89E) bzw. der TGT(D264E) untersucht. Nach einstündiger Inkubation der TGT mit RNA-Substrat zur Herstellung des kovalenten Komplexes (Bahn 2) wurden dem Ansatz jeweils die Substrate Guanin, $preQ_1$ bzw. Hydroxylamin im Überschluß zugegeben (Abb. 24). Der TGT-RNA-Komplex wird durch Zugabe von Guanin nur teilweise gespalten (Bahn 3). Dieses Substrat ist nicht in der Lage, den kovalenten Komplex quantitativ zu eliminieren, da das freigesetzte Guanin wieder in das RNA-Substrat eingebaut werden kann. Die Reaktion ist reversibel. Durch Zugabe von $preQ_1$ wird der kovalente Komplex im Falle der Wildtyp-TGT und der TGT(D89E) vollständig gespalten (Bahn 4: I, II) und das $preQ_1$ in einer irreversiblen Reaktion in die tRNA eingefügt. Die quantitative Spaltung des kovalenten Komplexes ist bei der TGT(D264E) hingegen nicht möglich (Bahn 4: III). Die sekundären Amine an Position 9 der Substrate Guanin und $preQ_1$ müssen vor dem nukleophilen Angriff am 1´-Kohlenstoffatom der Ribose deprotoniert

werden. Bei der Wildtyp-TGT, der TGT(D89E) und der TGT(D264E) wird der TGT-RNA-Komplex durch Hydroxylamin vollständig gespalten (Bahn 5). Für den nukleophilen Angriff an der Ribose und die Elimination des kovalenten Intermediats ist in diesem Fall keine Deprotonierung erforderlich.

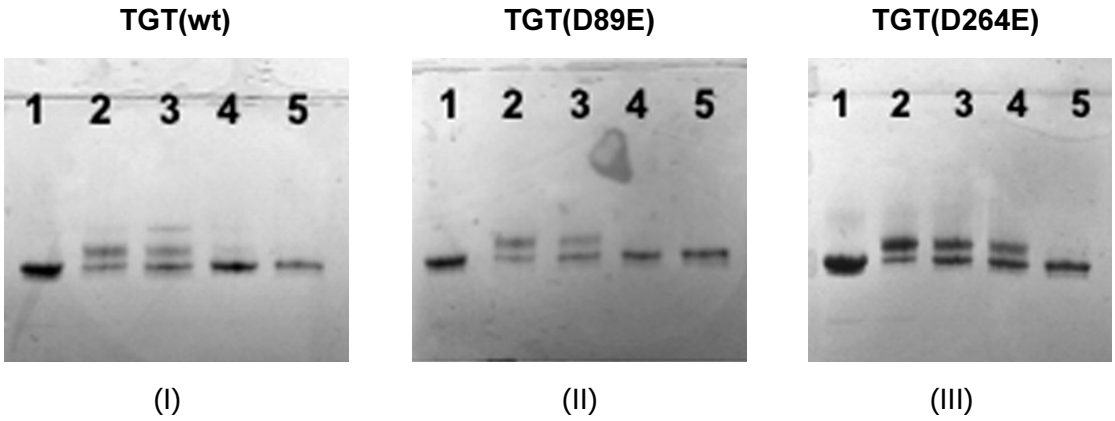


Abb. 24: Spaltung des kovalenten TGT-RNA-Komplexes durch Zugabe von Guanin, $preQ_1$ oder Hydroxylamin. Bahn 1: TGT, Bahn 2: TGT und tRNA-Minihelix, Bahn 3: TGT, tRNA-Minihelix und Guanin, Bahn 4: TGT, tRNA-Minihelix und $preQ_1$, Bahn 5: TGT, tRNA-Minihelix und Hydroxylamin. (I): TGT(wt). (II): TGT(D89E). (III): TGT(D264E).

Die TGT(wt) und TGT(D89E) verhalten sich in diesen *band-shift*-Experimenten verhältnismäßig ähnlich. Bei der TGT(D264E) hingegen weist das kovalente Intermediat eine deutlich größere Stabilität auf. Offensichtlich erschwert die im Vergleich zum Asp264 längere Seitenkette von Glu264 die korrekte Positionierung des 1´-Kohlenstoffatoms der Ribose für den nukleophilen Angriff, was die katalytische Aktivität deutlich beeinflusst. Die TGT(D89E) verändert nicht die Stabilität des kovalenten Intermediats zwischen der Asp264-Seitenkette und dem RNA-Substrat. Der Protonentransfer vom $preQ_1$ auf die Seitenkette ist durch den Austausch des Asp89 gegen ein Glutamat kaum erschwert. Dies sind weitere Hinweise auf die Funktion des Asp264 als katalytisches Nukleophil.

3.2.2 Kristallographische Studie der *Z. mobilis* TGT(D280E)

Nach der biochemischen Charakterisierung der *E. coli* TGT(D264E) erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine strukturelle Analyse der *Z. mobilis* TGT(D280E).

Die Kristallstruktur der TGT(D280E) wurde mit einer Auflösung von 1,7 Å im Komplex mit dem Subtrat $preQ_1$ gelöst. Um die strukturellen Veränderungen in der Bindetasche der TGT(D280E) besser detektieren zu können, diente die Wildtyp-TGT im Komplex mit $preQ_1$ als Referenzstruktur. Die Kristallstruktur der Wildtyp-TGT wurde am Institut für

Pharmazeutische Chemie in Marburg bestimmt [Brenk, persönliche Mitteilung] Analog zur Kristallstruktur der TGT(D280E) wurde auch für den Wildtyp die Qualität des Modells mit Hilfe der Elektronendichtekarte visuell im Programm O überprüft [Jones et al., 1991]. Die Minimierung und die Verfeinerung der Temperaturfaktoren erfolgten für beide Kristallstrukturen mit dem Programm SHELXL [Sheldrick & Schneider, 1997]. Für die *Z.mobilis* TGT(D280E) ist die Statistik der Datensammlung und Verfeinerung in Tab. 7 zusammengefasst.

Datensammlung	
Zellkonstanten (Å)	a = 91,3
	b = 64,9
	c = 70,2
Raumgruppe	C2
Auflösung (Å)	10 - 1,70 (1,73 - 1,70)
Zahl der gemessenen Reflexe	155496
Zahl der unabhängigen Reflexe	42492
Redundanz	3,7 (3,6)
Vollständigkeit der Daten (%)	94,5 (90,6)
I/σ	24,3 (6,1)
R_{sym}* (%)	6,7 (25,3)

Zahlen in Klammern beziehen sich auf die äußerste Schale.

*$R_{sym} = [\Sigma_h \Sigma_i | I_i(h) - \langle I(h)\rangle | / \Sigma_h \Sigma_i I(h)] \times 100$, wobei I(h) die gemessene Intensität und <I(h)> die durchschnittliche Intensität ist.

Verfeinerung	
R_{cryst}[a] (%)	15,9
R_{free}[b] (%)	20,6
rmsd Bindungslängen (Å)	0,008
rmsd Bindungswinkel (°)	0,027
Anzahl der Atome	
Protein	2845
$preQ_1$	14
Wasser	338
Ramachandran Diagramm	
besonders bevorzugt (%)	95,9
zusätzlich erlaubt (%)	3,8
allgemein erlaubt (%)	0,3
verboten (%)	0,0

Zahlen in Klammern beziehen sich auf die äußerste Schale.

[a]$R_{cryst} = \Sigma_{hkl} | F_o - F_c | / \Sigma_{hkl} | F_o |$

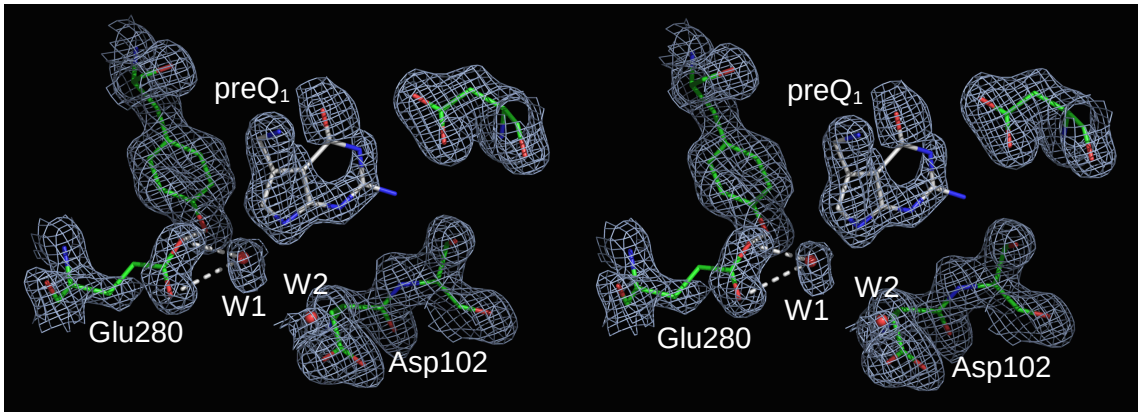
[b]Der R_{free}-Faktor wurde aus einer zufälligen Anzahl von Reflexen aus 5 % der Daten berechnet.

Tab. 7: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung der *Z. mobilis* TGT(D280E).

Die Kristallstruktur der TGT(D280E) weist nur geringfügige Unterschiede zur Wildtyp-Struktur auf (Abb. 25). Im aktiven Zentrum der TGT(D280E) befindet sich die Carboxylatgruppe der Glu280-Seitenkette im Vergleich der Carboxylatgruppe der Asp280-Seitenkette in der Wildtyp-TGT an nahezu identischer Position. Dadurch weist die TGT(D280E) eine signifikante enzymatische Aktivität auf, die im Vergleich zur Wildtyp-TGT nur um den Faktor 30 erniedrigt ist. Die Glu280-Seitenkette ist in der Kristallstruktur, aufgrund fehlender Elektronendichte am C_γ-Atom, schlechter definiert als die Asp280-Seitenkette im Wildtyp. Das Substrat $preQ_1$ wurde in die positive F_o-F_c-Dichte in die Bindetasche der TGT(D280E)-Kristallstruktur eingepasst und nimmt eine ähnliche Orientierung wie das $preQ_1$ in der

Wildtyp-Struktur ein. Der Ligand ist im Bereich der exocyclischen Aminogruppe und dem Carbonyl-Kohlenstoffatom am Sechsring-Heteozyklus nicht gut in der Elektronendichte definiert. In der Wildtyp-TGT bilden zwei Wassermoleküle ein geordnetes Wasserstoff-brückennetzwerk zwischen den Asp280- und Asp102-Seitenketten und dem Stickstoffatom an Position 9 des Substrats $preQ_1$, die in der verfeinerten Struktur der TGT(D280E) nicht an den gleichen Positionen in der Bindetasche zu finden sind. Die hydrophilen Interaktionen zwischen den katalytischen Resten und dem Liganden können in der TGT(D280E) nicht in gleicher Weise ausgebildet werden. Die Glu280-Seitenkette bindet lediglich an das benachbarte Wassermolekül W1.

TGT(D280E)



TGT(wt)

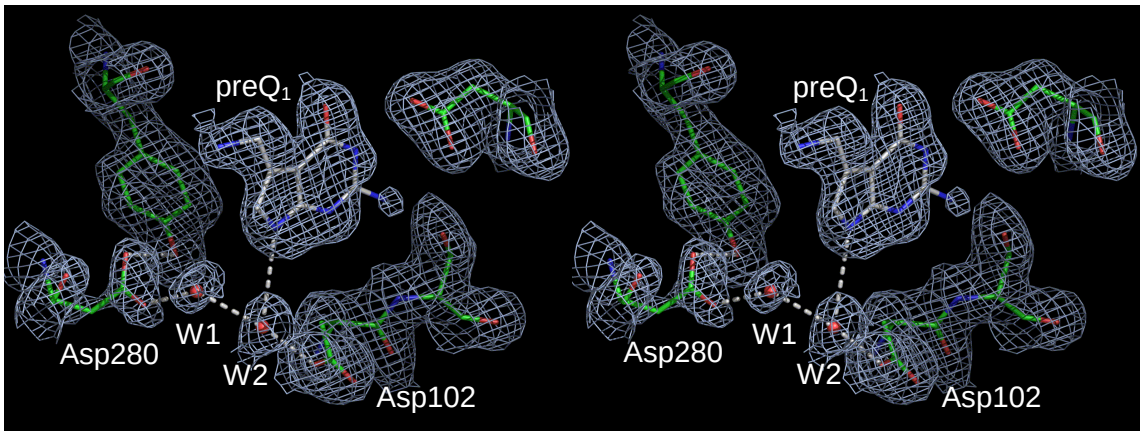


Abb. 25: Stereobild des Stabmodells der aktiven Zentren der TGT(D280E) und der TGT(wt) im Komplex mit $preQ_1$. Das Substrat (weiß) und die benachbarten Aminosäurereste (grün) sind von $2F_o$-F_c-Elektronendichte umgeben. Die Dichte ist auf ein σ-Level von 1,2 konturiert. Wasserstoffbrückenbindungen sind als rote, gestrichelte Linien und Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt. (I) Das aktive Zentrum der *Z. mobilis* TGT(D280E). (II) Das aktive Zentrum der *Z. mobilis* TGT(wt). Die Koordinaten der Wildtyp-Struktur wurden von Dr. Ruth Brenk (nicht veröffentlicht) erhalten.

Die Wildtyp-TGT und die TGT(D280E) unterscheiden sich in ihren Kristallstrukturen kaum im Hinblick auf die durchschnittlichen Temperaturfaktoren (Tab. 8). Auffällig ist jedoch, dass die Glu280-Seitenkette, das Substrat $preQ_1$ und die beiden Wassermoleküle W1 und W2 in der Bindetasche der TGT(D280E) signifikant höhere B-Faktoren im Vergleich zur Wildtyp-TGT aufweisen. Deshalb besitzen diese Reste vermutlich eine erhöhte Restmobilität im aktiven Zentrum der Kristallstruktur. Dadurch ist der nukleophile Angriff des Stickstoffatoms an Position 9 von $preQ_1$ auf das 1´-Kohlenstoffatom der Ribose im kovalenten Intermediat in der TGT(D280E) weniger effizient.
Die Ergebnisse der strukturellen Analyse korrelieren sehr gut mit den biochemischen Daten der *E. coli* TGT(D264E). Der Ligand ist aufgrund fehlender Elektronendichte weniger gut in der Bindetasche fixiert, was auf eine verringerte Bindungsaffinität zur TGT(D280E) hindeutet. Die erhöhte Flexibilität der Aminosäurereste und des Liganden sowie das unterbrochene Wasserstoffbrückennetzwerk im aktiven Zentrum der TGT(D280E) bieten eine Erklärung für die reduzierte katalytische Aktivität des mutierten Enzyms.

Durchschnittliche B-Faktoren [Å^2]		
	TGT(wt)	**TGT(D280E)**
Protein	23,7	21,4
Wasser	37,5	31,7
Asp/Glu280	31,0	40,6
$preQ_1$	25,8	43,3
Wasser 1	34,7	54,1
Wasser 2	35,3	51,4

Tab. 8: Durchschnittliche Temperaturfaktoren der *Z. mobilis* TGT(wt) und TGT(D280E).

Eine Überlagerung der Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT(D280E) mit der TGT-RNA-Komplexstruktur und der Wildtyp-TGT ergab, dass die Glu280-Seitenkette der TGT(D280E) verglichen mit der Asp280-Seitenkette in der Komplexstruktur eine sehr ähnliche Position im aktiven Zentrum einnimmt (Abb. 26). In beiden Kristallstrukturen ist das Carbonyl-Sauerstoffatom durch eine Wasserstoffbrückenbindung an die benachbarte Hydroxylgruppe der Tyr258-Seitenkette gebunden, um das Carboxylation für den nukleophilen Angriff am 1´-Kohlenstoffatom der Ribose in der tRNA ideal in der Bindetasche zu positionieren. Die Carboxylatgruppe der Glu280-Seitenkette ist im Vergleich zum Asp280, vermutlich aufgrund der um eine Methylengruppe verlängerten Seitenkette sowie der unterschiedlichen Anordnung der Hauptketten, um etwa 1 Å in der Bindetasche verschoben. Diese räumliche Verschiebung zusammen mit der erhöhten Restmobilität der Glu280-Seitenkette erschwert

sowohl zunächst die Komplexbildung zwischen der TGT und dem RNA-Substrat als auch im Folgenden den nukleophilen Angriff des preQ$_1$ zum Zerfall des kovalenten Intermediats. Dadurch besitzt die TGT(D264E) im Vergleich zur TGT(D89E) zwar eine reduzierte, aber immer noch signifikante katalytische Aktivität. Erwähnenswert ist, dass, unabhängig von Kittendorf et al. [2003], auch von Xie et al. [2003] eine biochemische Charakterisierung der *Z. mobilis* TGT(D280E) vorgenommen wurde. Im denaturierenden *band-shift*-Experiment bildet das RNA-Substrat keinen kovalenten Komplex mit der TGT. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Befunden von Kittendorf et al. [2003]. Die Kristallstruktur der TGT(D280E) zeigt jedoch zweifelsfrei, dass dieses Enzym in der Lage sein sollte, ein kovalentes Intermediat zu bilden und eine signifikante enzymatische Aktivität aufweisen sollte.

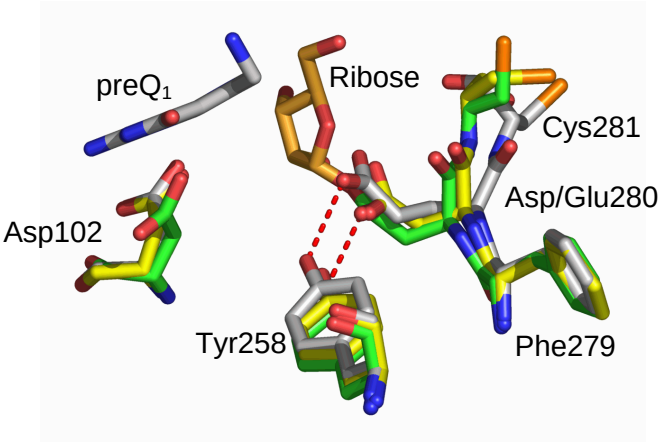


Abb. 26: Überlagerung der Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT(D280E) (weiß) im Komplex mit preQ$_1$ mit der *Z. mobilis* TGT-RNA-Komplexstruktur (grün) und der Wildtyp-TGT (gelb). Die Aminosäurereste sind als Stabmodell dargestellt. Die Asp280-Seitenkette der Komplexstruktur bildet ein kovalentes Intermediat zur Ribose (orange) an Position 34 des RNA-Substrats.

3.2.3 Relative katalytische Aktivität der *Z. mobilis* TGT(D280E)

Die Rolle des Asp280 im aktiven Zentrum der TGT konnte anhand der biochemischen Charakterisierung verschiedener *E. coli* TGT(D264)-Enzyme, in denen das Aspartat gegen Alanin, Asparagin, Glutamat, Glutamin, Histidin oder Lysin ausgetauscht wurde, und aus den strukturellen Veränderungen im aktiven Zentrum der *Z. mobilis* TGT(D280E) abgeleitet werden. Eine strukturelle Interpretation der biochemischen Daten ist jedoch nur möglich, wenn die kinetischen Parameter der TGT-Enzyme der beiden Spezies miteinander vergleichbar sind. Deshalb wurde auch die *Z. mobilis* TGT(D280E) enzymatisch

charakterisiert. Der k_{kat}-Wert beträgt im Falle der Wildtyp-TGT 1,35 [1/min] und im Falle der TGT(D280E) 5,7 x 10^{-3} [1/min]. Daraus ergibt sich ein 236-fach niedrigerer k_{kat}-Wert für die TGT(D280E) im Vergleich zum Wildtyp. Der gleiche Trend wurde für die *E. coli* TGT beobachtet, jedoch unterscheiden sich die k_{kat}-Werte der *E. coli* TGT(D264E) und der *E. coli* Wildtyp-TGT nur um eine Zehnerpotenz. Trotz der Differenz in den relativen katalytischen Aktivitäten zeigt sich, dass das Glutamat, im Gegensatz zum Aspartat an gleicher Position, in der mutierten TGT beider Prokaryonten nicht optimal in der Bindetasche fixiert ist, um den Basenaustausch mit maximaler Geschwindigkeit zu katalysieren. Der relative k_{kat}-Wert der *Z. mobilis* TGT(D280E) repräsentiert die Funktion des Asp280 deutlich besser als der Faktor, der für die *E. coli* TGT(D264E) ermittelt wurde, und verdeutlicht die Auswirkungen der ausgeprägten Mobilität des Glu280 im aktiven Zentrum der Bindetasche.

3.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) katalysiert den Austausch der Base Guanin gegen preQ$_1$ an Position 34 der Antikodonschleife bestimmter tRNAs über einen assoziativen Mechanismus. Dabei bildet die tRNA ein kovalentes Intermediat mit dem Asp280 im aktiven Zentrum.

In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. G. Garcia in der Abteilung Medizinische Chemie der Universität Michigan, USA wurde die Funktion des Asp280 untersucht. In biochemischen Studien mit der *E. coli* TGT wurde das Asp264 (entspricht Asp280 in *Z. mobilis*) gegen verschiedene Aminosäurereste ausgetauscht. Die *E. coli* TGT(D264E) ist das einzige Enzym, das eine signifikante spezifische Aktivität aufweist und in der Lage ist, einen kovalenten Komplex mit dem RNA-Substrat zu bilden. Die Anwesenheit einer Carboxylatgruppe an Position 264 ist für den Ablauf der katalytischen Reaktion essentiell. Die Geschwindigkeit der Bildung und Spaltung des Intermediats ist jedoch im Vergleich zum Wildtyp weniger effizient. Dadurch ist der kovalente Komplex im Vergleich zur Wildtyp-TGT in der *E. coli* TGT(D264E) wesentlich stabiler. In dieser Arbeit wurde die Kristallstuktur der *Z. mobilis* TGT(D280E) im Komplex mit preQ$_1$ mit einer Auflösung von 1,7 Å bestimmt und in Konsens mit den biochemischen Daten interpretiert. Im aktiven Zentrum der TGT(D280E) befindet sich das Glutamat nahezu an der gleichen Position wie das Aspartat in der Wildtyp-TGT. Die Glu280-Seitenkette besitzt jedoch eine sehr ausgeprägte Restmobilität. Das Wasserbrückennetzwerk zwischen dem katalytischen Nukleophil, dem Asp102 und dem Substrat ist im Gegensatz zur Wildtyp-Struktur nicht vergleichbar definiert. Die Kristallstruktur der TGT(D280E) liefert eine Erklärung für die signifikante, jedoch reduzierte katalytische Aktivität der *E. coli* TGT(D264E). Während der katalytischen Reaktion ist nicht nur die primäre Komplexbildung zwischen der Carboxylatgruppe des Restes an Position 280 der TGT und dem RNA-Substrat, sondern auch der anschließende nukleophile Angriff des Stickstoffatoms an Position 9 im preQ$_1$ auf das 1´-Kohlenstoffatom des kovalenten Intermediats weniger effizient.

Diese kinetischen und strukturellen Untersuchungen haben gezeigt, dass auch das Asp102 eine wichtige Funktion besitzt. Eventuell fungiert es in der TGT-Reaktion als generelle Säure-Base. In den Kristallstrukturen der Wildtyp-TGT und TGT(D280E) ist die Asp102-Seitenkette über Wasserstoffbrücken mit dem Asn70 verbunden und von der Bindetasche weggedreht (Abb. 26). Die Bindung des RNA-Substrats an die TGT induziert die Verschiebung zweier Schleifen, welche die Aminosäuren 69 - 74 und 103 - 117 umfassen. Folglich muss die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Asp102 und dem Asn70 aufgebrochen werden. Eine zusätzliche repulsive Wirkung durch das Phosphatrückgrat der RNA führt dazu, dass die Asp102-Seitenkette zur Bindetasche gedreht wird und damit

optimal für einen Protonentransfer positioniert ist. Ihre Carboxylatgruppe bildet eine Wasserstoffbrücke zur exocyclischen Aminogruppe des Guanins bzw. des $preQ_1$ aus. Im protonierten Zustand könnte die Seitenkette eine zweite Wasserstoffbrücke zum 3´-Stickstoffatom des Substrats ausbilden, wodurch die Asp102-Seitenkette in dieser Konformation zusätzlich stabilisiert wird. Eventuell wird der pK_a-Wert der Asp102-Seitenkette durch die Anwesenheit der tRNA erhöht, so dass der Protonentransfer erleichtert wird. Es sei jedoch angemerkt, dass der Abstand von 3,8 Å zwischen dem Stickstoffatom an Position 9 des $preQ_1$ und dem Seitenketten-Carboxylat von Asp102 in der bestimmten Kristallstruktur für eine direkte Protonenübertragung etwas zu groß erscheint.

In weiteren Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, ob tatsächlich ein Protonentransfer zwischen dem Substrat und der Asp102-Seitenkette stattfindet und wie diese Übertragung erfolgt. Hilfreich wäre eine Kristallstruktur der TGT mit einer Auflösung besser als 1,0 Å, um eine bessere Aussage über den Protonierungszustand am Asp102 treffen zu können. Ideal wäre es, mehrere TGT-tRNA-Komplexstrukturen in Abhängigkeit vom Stadium der katalytischen Reaktion zu bestimmen. Alternativ könnte der pK_a-Wert des Asp102 durch die FT-Infrarotspektroskopie bestimmt oder durch NMR eine Aussage über den Protonierungszustand erhalten werden.

3.4 Material und Methoden

Das radioaktiv markierte [8-^{3}H]-Guanin (0,5 mCi/ml) wurde von der Firma Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig) bezogen. Für alle weiteren Reagenzien gelten die in Kapitel 2.4 aufgeführten Angaben.

3.4.1 Präparation der *Z. mobilis* TGT(D280E)

Von Jeffrey D. Kittendorf aus der Arbeitsgruppe von Dr. George A. Garcia am Institut für medizinische Chemie der Universität Michigan (USA) wurde durch PCR (*polymerase chain reaction*) die Mutation D280E in die Sequenz des *Z. mobilis tgt*-Gens eingefügt und das Plasmid hptTGT(D280E) zur rekombinanten Produktion der TGT(D280E) verwendet.
Die Proteinexpression, die Herstellung des Rohextrakts, die Aufreinigung und die Kristallisation erfolgte analog zu der von Romier beschriebenen Methode [Romier et al., 1996c; Romier et al., 1996a].

Für die Aufreinigung des Proteins wurden folgende Puffer verwendet:

Protease-Inhibitor-Stammlösung: 1 Tablette Complete™ (EDTA-frei) in 2 ml Wasser gelöst
Aufschlusspuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 1,2 ml Protease Inhibitor-Stammlösung
Puffer A: 10 mM Tris/HCl pH 7,8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT
Puffer B: Puffer A + 1 M NaCl
Puffer C: Puffer A + 1 M $(NH_4)_2SO_4$
Hochsalz-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 M NaCl

3.4.1.1 Expression der *Z. mobilis tgt*(D280E)

Das Plasmid hptTGT(D280E) wurde in den *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS transformiert (Kapitel 4.4.1.7). Die transformierten Zellen wurden auf Selektions-Agar-Platten, die 100 mg/ml Ampicillin und 50 mg/ml Chloramphenicol enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Ein Klon wurde von der Platte in 5 ml LB-Medium transferiert, das die oben genannten Antibiotika in gleicher Konzentration enthielt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C angezogen. Die gewonnene Vorkultur wurde in einer 1:500 Verdünnung zu 4 l autoklaviertem Kulturmedium gleicher Zusammensetzung zugegeben und die Hauptkultur bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,8 bei 600 nm mit 250 U/min im Erlenmeyerkolben geschüttelt. Die Proteinproduktion wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG

induziert. Nach einer weiteren Inkubationsperiode von 24 h bei 15°C wurden die Zellen durch Zentrifugation (Beckmann JA-10-Rotor, 10 min, 4000 U/min, 4°C) geerntet und bei -20°C tiefgefroren.

3.4.1.2 Zellaufschluss

Das Zellpellet wurde unter Erwärmen bei milder Temperatur aufgetaut und mit 30 ml Aufschlusspuffer versetzt. Durch die Behandlung mit Ultraschall (Branson Sonifier 250, dreimal 2 min, *duty cycle*: 70 %, *output control*: 4) wurden die Zellen auf Eis im Puffer suspendiert und die Zellwand zerstört. Die im Überstand vorhandene TGT wurde von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (Beckmann JA-25,50-Rotor, 60 min, 25000 U/min, 4°C) abgetrennt.

3.4.1.3 Aufreinigung mittels Säulenchromatographie

Der Rohextrakt wurde in zwei Teile geteilt und jeweils getrennt über Anionenaustausch-chromatographie (Q-Sepharose, XK26) an einer FPLC-Anlage (Äkta™, Amersham Pharmacia Biosciences) gereinigt, um ein Überladen der Säule zu vermeiden. Die mit Puffer A äquilibrierte Säule wurde mit der Proteinlösung beladen und anschließend gewaschen. Die Elution der TGT(D280E) erfolgte in einem dreistufigen Gradienten gegen Puffer B bei etwa 300 mM NaCl. Dabei betrug die Flussrate 3 ml/min. Durch SDS-Gelelektrophorese wurden die gesammelten Fraktionen auf Reinheit und Gehalt an TGT überprüft und anschließend vereinigt. Für den zweiten chromatographischen Reinigungsschritt über die Hydrophobe Säule (Phenyl-Sepharose, XK16) wurde der Proteinlösung Ammoniumsulfat in einer Endkonzentration von 1 M zugegeben. Die Säule wurde vor dem Beladen mit der Proteinlösung gegen Puffer C äquilibriert. Nach dem Waschen der Säule wurde das Protein in einem linearen Gradienten gegen Puffer A mit einer Flussrate von 2 ml/min bei einer $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration von 500 mM von der Säule eluiert. Die gereinigten TGT-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und die Proteinlösung mit Centricon YM 30 auf eine Konzentration von ungefähr 3,5 mg/ml (Kapitel 3.4.1.5) eingeengt. Im letzten Reinigungsschritt wurden Mikrokristalle der TGT(D280E) aufgrund eines reversen Einsalzeffektes erhalten. Das Konzentrat wurde mit Hilfe einer Spritze in 15 ml Dialysekassetten (Slide-A-Lyzer™, Pierce, Niederlande) gefüllt und gegen 5 l Puffer A bei 4°C über Nacht dialysiert. Dabei bildeten sich nadelförmige Mikrokristalle. Diese wurden durch Zentrifugation (Heraeus Minifuge 2, 4000 U/min, 10 min, 4°C) abgetrennt und im Hochsalzpuffer auf eine Konzentration von etwa 25 mg/ml (Kapitel 3.4.1.5) gelöst. Die

Proteinlösung wurde in 100 µl Aliquots eingeteilt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.
Aus 4 l Kultur wurde ungefähr 70 mg Protein der *Z. mobilis* TGT(D280E) erhalten.

3.4.1.4 Gehaltsbestimmung

Der Proteingehalt der TGT(D280E) wurde analog zum Wildtyp mit Hilfe eines Absorptionskoeffizienten, der aus der Aminosäuresequenz der *Z. mobilis* TGT berechnet wurde, photometrisch bei 280 nm (Bio-Rad SmartSpec™ 3000) bestimmt [Cantor & Schimmel, 1980]:

1 mg/ml *Z. mobilis* TGT(D280E) ≅ 0,778 A_{280}

3.4.2 Röntgenstrukturanalyse der *Z. mobilis* TGT(D280E) im Komplex mit preQ$_1$

3.4.2.1 Kristallisation der *Z. mobilis* TGT(D280E)

Die Kristallisation der TGT(D280E) erfolgte analog dem von Romier beschriebenen Verfahren für die Wildtyp-TGT [Romier et al., 1996a].

Für die Kristallisation wurden folgende Lösungen angesetzt:

Reservoirlösung 1 für Impfkristalle:
100 mM Tris pH 8,5, 13 % (w/v) PEG 8000, 10 % DMSO, 1 mM DTT
Reservoirlösung 2 für *macroseeding*:
100 mM Tris pH 8,5, 5 % (w/v) PEG 8000, 10 % DMSO, 1 mM DTT

Für die Kristallisation wurde die Proteinlösung mit Hochsalzpuffer auf eine Konzentration von 16 mg/ml verdünnt. Im ersten Schritt wurden Impfkristalle gezüchtet. Nach der Zentrifugation (Universal 16R, 60 min, 14000 U/min, 4°C) wurde die Kristallisation nach der Methode des hängenden Tropfens in einer 24-*well* Platte bei 22°C angesetzt. Auf dem Deckgläschen wurden je 2 µl Proteinlösung mit je 2 µl Reservoirlösung 1 vermischt, über die Vertiefung, die 1 ml der Reservoirlösung 1 enthielt, gelegt und mit Silikonfett (Bayer-Silikon, Roth) luftdicht verschlossen. Nach 1 Woche wurden plättchenförmige Kristalle erhalten, die jedoch noch zu klein waren, um sie für die Röntgenstrukturanalyse zu verwenden. Deshalb wurde im zweiten Schritt die Methode des *macroseeding* angewendet. Dazu wurde eine zweite Kristallisationsplatte nach der Methode des hängenden Tropfens angesetzt. Der

Kristallisationstropfen setzte sich aus 2 µl Proteinlösung und 2 µl Reservoirlösung 2 zusammen, in den mit Hilfe eines *Cryoloops* (Hampton Research, USA) Impfkristalle überführt wurden. Das Deckgläschen wurde anschließend auf eine Vertiefung der Platte, die mit 1 ml Reservoirlösung 2 befüllt war, aufgesetzt. Nach 2 Wochen waren die Kristalle auf eine Größe von 0,6 x 0,6 x 0,2 mm^3 gewachsen.

3.4.2.2 *Soaking* der Kristalle mit $preQ_1$

Um die Kristallstruktur der TGT(D280E) im Komplex mit $preQ_1$ zu erhalten, wurden die gezüchteten Kristalle bei 22°C über Nacht mit dem Substrat *gesoakt*. Dazu wurde der Ligand in (100 %igem) DMSO gelöst und 1:10 (v/v) mit der Reservoirlösung 2 auf eine Konzentration von etwa 50 mM verdünnt. Kristalle, die für die Röntgenstrukturanalyse geeignet waren, wurden in 5 µl dieser Lösung überführt und nach der Methode des hängenden Tropfens über 1 ml Reservoirlösung 2 aufbewahrt.

3.4.3 Sammlung des Datensatzes

Die Bestimmung der Kristallstruktur erfolgte an dem im Institut vorhandenen Röntgengerät unter Tieftemperaturbedingungen von -170°C (Kapitel 2.4.4). Die Kristalle wurden mit einem *Cryoloop* (Hampton Research, USA) aufgenommen, dieser auf den Goniometerkopf befestigt und im gekühlten Stickstoffstrom schockgefroren. Als Kälteschutzpuffer diente eine Pufferlösung aus 50 mM HEPES pH 7,5, 16 % PEG 8000 und 30 % Glycerol, in die der Kristall vorher für wenige Minuten transferiert wurde. Die Datensammlung erfolgte über einen Winkelbereich von 180° mit einem Rotationswinkel von je 0,5° bei einem Detektorabstand von 100 mm. Der Startwinkel wurde mit Hilfe der Strategie-Funktion im HKL2000-Paket bestimmt.
Die Reflexe des nativen Datensatzes wurden mit XDISP und DENZO indiziert und prozessiert [Otwinowski & Minor, 1996]. Die vorprozessierten Daten wurden anschließend mit SCALEPACK skaliert [Otwinowski & Minor, 1996]. Diese Programme sind im HKL2000-Paket implementiert.

3.4.4 Verfeinerung des Datensatzes

Zur Bestimmung der Struktur der TGT(D280E) wurde als Startmodell die Kristallstruktur der apo-TGT (Zugriffscode der PDB: 1PUD) [Romier et al., 1996a] verwendet. Durch *difference-*

Fourier Transformation mit dem Programm CNS wurde ein erstes Strukturmodell der TGT(D280E) erstellt [Brünger et al., 1998]. Dabei wurden 5 % der Reflexe zur Berechnung des freien R-Faktors wurden willkürlich ausgewählt. Die Struktur der TGT(D280E) wurde in einer *rigid-body*-Minimierung in 40 Zyklen als starre Einheit rotiert und translatiert, bis die Strukturdaten des Startmodells optimal mit den Reflexdaten übereinstimmten. Dabei erfolgte im ersten Minimierungsschritt eine isotrope, anschließend eine anisotrope Skalierungskorrektur. In der folgenden *simulated-annealing*-Verfeinerung mit einer Starttemperatur von 3000 K wurde das Modell in mehreren Zyklen minimiert.
Die Koordinaten des Liganden $preQ_1$ wurden von Dr. Ruth Brenk zur Verfügung gestellt und die Parameter- und Topologie-Daten mit Hilfe der *Hetero-compound Information Centre – Uppsala (HIC-up)*-Datenbank [Kleywegt & Jones, 1998] erzeugt. Die Einpassung des Liganden und der Wassermoleküle sowie die Korrektur des Proteinmodells erfolgte im Programm O zunächst mit den in CNS berechneten $3F_o$-$2F_c$- und F_o-F_c-Elektronendichtekarten [Jones et al., 1991]. Eine weitere Verfeinerung der Bindungslängen und -winkel sowie der Temperaturfaktoren erfolgte anschließend mit dem Programm SHELXL unter Verwendung der *sigma A*-gewichteten Elektronendichtekarte $2F_o$-F_c und F_o-F_c [Sheldrick & Schneider, 1997]. Die Struktur wurde in mehreren Zyklen verfeinert, bis in der F_o-F_c-Elektronendichte keine signifikanten Extrema mehr vorhanden waren. Die Kristallstruktur wurde mit Hilfe des Programms PROCHECK auf ihre Qualität untersucht, in dem das Ramachandran Diagramm und andere statistische Parameter berechnet wurden [Laskowski et al., 1993]. Die Strukturdaten der TGT(D280E) wurden in der PDB unter dem Zugriffscode 1PXG abgelegt.

3.4.5 Bestimmung der relativen spezifischen Aktivität

3.4.5.1 Enzymassay

Die Bestimmung der katalytischen Aktivität der TGT(D280E) und der Wildtyp-TGT erfolgte nach Curnow et al. [1993].
Die TGT katalysiert nicht nur den Austausch von Guanin gegen $preQ_1$ an Position 34 der tRNA-Antikodonschleife, sondern ersetzt auch diese Base gegen freies Guanin im Reaktionsansatz [Okada & Nishimura, 1979]. Wird radioaktiv markiertes Guanin bereitgestellt, so wird dieses Substrat in die tRNA eingebaut. Im Laufe der Zeit nimmt die Radioaktivität der tRNA zu. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurde ein Reaktionspuffer mit einer Zusammensetzung von 100 mM HEPES pH 7,3 und 20 mM $MgCl_2$ verwendet. Die Messung der spezifischen Aktivität erfolgte mit den beiden Substraten [8-^{3}H]-

Guanin und *E. coli* $tRNA^{Tyr}$ bei einer Konzentration von jeweils 20 µM, bei der die TGT die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht hat. Für den Reaktionsansatz wurden 38 µl [8-^{3}H]-Guanin zusammen mit der *E. coli* $tRNA^{Tyr}$ für 20 min bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe der TGT, die in 38 µl Reaktionspuffer enthalten war, wurde die Katalyse gestartet. Die Endkonzentration der TGT betrug im Falle des Wildtyps 150 nM, die der TGT(D280E) 1500 nM. Die Verwendung unterschiedlicher Enzymkonzentrationen wurde später bei der Berechnung des k_{kat} berücksichtigt. Nach dem Start der Reaktion erfolgte bei der Wildtyp-TGT die Entnahme von 15 µl-Aliquots nach 5, 15, 30 und 60 min. Im Falle der TGT(D280E) wurden grössere Zeitintervalle (30, 60, 90 und 120 min) gewählt. Die dem Reaktionsansatz entnommene Lösung wurde auf GF/C-Filterplättchen (Whatman) pipettiert und die Reaktion sofort durch Eintauchen in 10 %ige (w/v) Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. Dabei wurde die tRNA auf dem Filterpapier präzipitiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Filterplättchen zweimal mit 5 %iger TCA-lösung und anschließend zweimal mit Ethanol für jeweils 20 min gewaschen. Die Trocknung der Filterpapiere erfolgte bei 60°C über einen Zeitraum von 30 min. Nach Zugabe von 4 ml Szintillationscocktail (Roth) wurde die experimentelle Zählrate der Radioaktivität (dpm) am Flüssigszintillationszähler quantifiziert.

3.4.5.2 Auswertung der kinetischen Daten

Anhand der folgenden Beziehung erfolgte die Umrechnung der experimentellen Zählrate der Radioaktivität in die Stoffmenge n_{Guanin} [mol], die in die tRNA eingebaut wurde. Dafür wurde der Umrechnungsfaktor 2,22 x 10^{12} von Curie [Ci] in die theoretische Zählrate der Radioaktivität [dpm] benutzt.

$$n_{Guanin}\,[mol] = \frac{x\,[dpm]}{2{,}22 \times 10^{12}\,[dpm/Ci] \times a\,[Ci/mol]}$$

x = experimentelle Zählrate der Radioaktivität [dpm]
a = spezifische Aktivität des [8-^{3}H]-Guanins [Ci/mol]

Die Stoffmenge wurde in die Einheit [pmol] umgerechnet und im Programm GraFit 4.09 [Leatherbarrow, 1999] gegen die Reaktionszeit t [min] aufgetragen. Die maximale Geschwindigkeit der Enzymreaktion v_{max} [pmol/min] wurde aus der Steigung der Regressionsgeraden bestimmt.
Entsprechend einer Annahme der vereinfachten Michaelis-Menten-Gleichung [Cleland, 1963] wurde der k_{kat} für die Wildtyp-TGT und die TGT(D280E) berechnet:

$$k_{kat}\ [1/min] = \frac{v_{max}\ [pmol/min]}{\text{Enzymkonzentration [pmol]}}$$

Die relative katalytische Aktivität ergab sich aus dem Verhältnis der k_{kat}-Werte von Wildtyp-TGT und TGT(D280E).

4 Die archaebakterielle tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT)

4.1 Einleitung

4.1.1 Die Archaea *Archaeglobus fulgidus*, *Aeropyrum pernix* und *Pyrococcus horikoshii*

Die Spezies *A. fulgidus*, *A. pernix* und *P. horikoshii* gehören zur Domäne der Archaea. Archaebakterien haben einige Merkmale mit eubakteriellen und eukaryontischen Organismen gemeinsam, grenzen sich insgesamt jedoch deutlich von den Spezies der anderen beiden Domänen ab.

Die archaebakteriellen Organismen sehen den Eubakterien morphologisch recht ähnlich. Sie verwenden ähnliche metabolische Prozesse zur Aufrechterhaltung ihrer Lebensfunktionen und werden aufgrund ihrer Cytologie auch als Prokaryonten bezeichnet. Die Zellwand archaebakterieller Spezies ist im Vergleich zu Eubakterien jedoch völlig anders aufgebaut. Beispielweise fehlt der für die Bakterienzellwand charakteristische Baustein Murein in ihrer Zellmembran. Die Archaebakterien haben auch einige Merkmale mit den eukaryontischen Organismen gemeinsam, von denen sie sich insbesondere im Transkriptions- und Translationsprozess kaum unterscheiden [Gaasterland, 1999]. Seit der Entdeckung der Archaea im Jahre 1977 wurde ihre zelluläre Struktur und ihre Physiologie gründlich erforscht [Woese & Fox, 1977]. Durch die Einzigartigkeit ihrer ribosomalen RNA-Sequenzen grenzen sie sich deutlich von den Eubakterien und Eukaryonten ab. Sie werden deshalb als eine eigenständige, dritte Domäne angesehen [Gaasterland, 1999]. Nach der Neudefinition der Phylogenie werden die Lebewesen auf der Erde heutzutage in die drei Domänen Archaea, Eubakterien und Eukaryonten eingeteilt [Woese et al., 1990]. Weiterhin werden die Spezies der Domäne Archaea aufgrund ihrer andersartigen ribosomalen RNA in die zwei Reiche der Euryarchaeotae (Methanbakterien, Halophile und Schwefelreduzierende Thermophile) und der Crenarchaeotae (meist Schwefelabhängige Thermophile) gegliedert [Gaasterland, 1999].

Die meisten Spezies der Domäne Archaea besiedeln extreme Lebensräume [Hough & Danson, 1999]. Sie besitzen die Fähigkeit, in einer Umgebung zu leben, an denen beispielsweise hohe Temperaturen (Thermophile) oder hohe Salzkonzentrationen (Halophile) vorzufinden sind [Stetter, 1999]. Die Archaea *A. fulgidus*, *A. pernix* und *P. horikoshii* gehören zu den hyperthermophilen Organismen, die sich an sehr heißen Standorten bei Temperaturen zwischen 80 und 106°C optimal vermehren können. Hyperthermophile Organismen waren vermutlich unter den ersten Lebensformen auf der

Erde [Danson & Hough, 1998]. Die primitiven Organismen haben sich im Laufe ihrer Evolution kaum verändert. Es wird vermutet, dass sich aus den hyperthermophilen Lebewesen die mesophilen Organismen entwickelten. Aus diesem Grund wurden sie im Stammbaum in der Nähe des Ursprungs angesiedelt.

Die hyperthermophilen Spezies *A. fulgidus*, *A. pernix* und *P. horikoshii* sind in mariner Umgebung zu finden. Die stäbchenförmige Spezies *A. fulgidus* vermehrt sich bei einer Temperatur von etwa 83°C besonders gut [Klenk et al., 1997; Stetter, 1988]. Der fakultativ anaerobe Organismus gewinnt seine Energie durch Reduktion von Sulfationen zu Schwefelwasserstoff. Als Reduktionsmittel dient elementarer Wasserstoff. Als Energie- und Kohlenstoffquelle können wahlweise organische Verbindungen oder niedermolekulare Substanzen wie Wasserstoff, Thiosulfat oder Kohlendioxid verwendet werden. Der stäbchenförmige Organismus *P. horikoshii* erreicht seine maximale Stoffwechselaktivität bei ungefähr 98°C [Gonzalez et al., 1998]. Das obligatorisch anaerobe Archaebakterium deckt seinen Energiebedarf durch Fermentation von Peptiden, Aminosäuren, Zucker, Kohlendioxid und Wasserstoff. Die kugelförmige Spezies *A. pernix* vervielfältigt sich bei einer Temperatur von etwa 95°C [Sako et al., 1996]. Im Gegensatz zu *A. fulgidus* und *P. horikoshii*, die zu den Euryarchaeotae zählen, gehört diese Spezies dem Reich der Crenarchaeotae an. Die Genome der drei Archaea *A. fulgidus* [Klenk et al., 1997], *A. pernix* [Kawarabayasi et al., 1999] und *P. horikoshii* [Kawarabayasi et al., 1998] wurden bereits vollständig sequenziert. Jedes Genom umfasst eine Größe von etwa 2 Megabasen und enthält schätzungsweise über 2000 Protein-kodierende Sequenzen, die ungefähr 90 % des Genoms ausmachen.

Spezies	***A. fulgidus***	***A. pernix***	***P. horikoshii***
Gattung	Archaeoglobus	Aeropyrum	Pyrococcus
Ordnung	Archaeoglobales	Desulfurococcales	Thermococcales
Reich	Euryarchaeotae	Crenarchaeotae	Euryarchaeotae
Vorkommen	marin	marin	marin
Phenotyp	hyperthermophil	hyperthermophil	hyperthermophil
Morphologie	irreguläre Stäbchen	kugelförmig	irreguläre Stäbchen
Atmosphäre	fakultativ anaerob	aerob	anaerob
Wachstum	83°C (60 - 95°C)	90°C (70 - 100°C)	98°C (85 - 105°C)
Genom (Basen)	2178400	1669695	1738505
Proteine	2436 (92,2 %)	2694 (89,1 %)	2061 (91,3 %)
tRNA-Spezies	46	47	46

Tab. 9: Eigenschaften der hyperthermophilen Spezies *A. fulgidus*, *A. pernix* und *P. horikoshii.*

4.1.2 Eigenschaften der Proteine hyperthermophiler Organismen

In den letzten Jahren stieg nicht nur die Zahl der Protein-kodierenden Gensequenzen, die aus den Genomen hyperthermophiler Organismen isoliert wurden, sondern auch die Zahl der veröffentlichten Proteinstrukturen dieser Spezies in der Protein-Datenbank (PDB) [Berman et al., 2000]. Dadurch können die Eigenschaften der Proteine hyperthermophiler Organismen analysiert werden, die sich von denen der mesophilen Lebewesen in der Regel deutlich unterscheiden [Kumar & Nussinov, 2001]. Dazu müssen eine Reihe unterschiedlicher Aspekte betrachtet werden. Ein Vergleich der Primärsequenzen thermophiler Proteine mit mesophilen Orthologen zeigt, dass die durchschnittliche Größe der Proteine deutlich geringer ist. Dies wird meistens durch eine Verkürzung der Schleifenbereiche erreicht. Bei den Enzymen hyperthermophiler Organismen bewirkt die dichtere Packung allerdings auch eine Verringerung der Flexibilität, die beim Ablauf der Katalyse eine wichtige Rolle spielen kann. Der Entropieverlust des Enzyms wird durch eine stärkere Bindung im Inneren des Proteins ausgeglichen. Im Vergleich zu den mesophilen Orthologen sind in den hyperthermophilen Spezies ein erhöhter Anteil verzweigter, unpolarer Aminosäuren im Inneren des Protein zu finden, wodurch die hydrophoben Kontakte verstärkt werden. Auf der Oberfläche sind hingegen mehr polare Aminosäurereste lokalisiert. Weiterhin wird das Enzym durch kleinere und weniger zugängliche Bindetaschen vor Denaturierung durch Hitze geschützt [Danson & Hough, 1998]. Neben den Proteinen müssen auch die anderen Bestandteile in der Zelle den extrem hohen Temperaturen standhalten können. Modifikationen der Nukleotide in tRNAs tragen vermutlich zur Stabilisierung ihrer Tertiärstruktur bei [McCloskey et al., 2001].

4.1.3 Funktion der archaebakteriellen TGT

Aus den Domänen Archaea, Eubakterien und Eukaryonten sind heutzutage mehr als 80 Modifikationen in tRNAs identifiziert worden, davon alleine 24 in Archaea [McCloskey et al., 2001]. Die posttranskriptionelle Modifikation der tRNAs beeinflusst nicht nur die Spezifität im Translationsprozess durch Veränderung des Antikodons, sondern stabilisiert auch die Tertiärstruktur der gefalteten tRNA. Von den insgesamt 24 modifizierten Basen in Archaea kommen vier ausschließlich in dieser Domäne vor, darunter auch die modifizierte Base Archaeosin. Aus dem Biosyntheseweg der Base Archaeosin ist bisher nur ein einziger Schritt bekannt. Die modifizierte Base 7-Cyano-7-deazaguanin ($preQ_0$), die vermutlich aus Guanosintriphosphat entsteht, wird durch das Enzym tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) gegen Guanin in der tRNA ausgetauscht [Watanabe et al., 1997]. Anschließend erfolgt die

Transformation zur (hitzeinstabilen) Base Archaeosin. Diese wird ausschießlich an Position 15 in der Dihydrouridinschleife (D-Schleife) der meisten tRNAs eingebaut [Gregson et al., 1993]. Die eubakterielle TGT hingegen katalysiert den Austausch des Basenanalogons 7-Aminomethyl-7-deazaguanin ($preQ_1$) gegen Guanin an Position 34 der Antikodonschleife. Nur in vier bestimmten tRNAs, welche die Antikodonsequenz GUN (N = beliebige Base) enthalten, wird das Guanin durch die modifizierte Base ersetzt und in weiteren Schritten zu tRNA-Queuin umgewandelt [Okada & Nishimura, 1979]. In Eukaryonten wird die hypermodifizierte Base Queuin direkt von der TGT in die tRNA eingebaut [Garcia & Goodenough-Lashua, 1998]. In allen drei Domänen ist die Anwesenheit von Guanin an der *wobble* Position für die Katalyse der Reaktion essentiell. Im Gegensatz zu den Eubakterien und Eukaryonten ist über die Funktion der Base Archaeosin bisher sehr wenig bekannt. Aus der Tertiärstruktur der tRNAs ist jedoch ersichtlich, dass die Base Guanin 15 mit Cytosin 48 in der T-Schleife Wasserstoffbrücken bildet und mit der Purinbase 59 π-π-Wechselwirkungen eingeht, so dass die modifizierte Base in hyperthermophilen Organismen möglicherweise zur Stabilisierung der tRNA-Tertiärstruktur beitragen könnte. Durch die ausgeprägten Wechselwirkungen mit den anderen Schleifenbereichen der tRNA ist die Base Guanin an Position 15 im Inneren der tRNA verborgen. Der Austausch von Guanin gegen $preQ_0$ erfordert daher eine Auffaltung der tRNA-Tertiärstruktur und eine starke Konfomationsänderung im Bereich der D-Schleife.

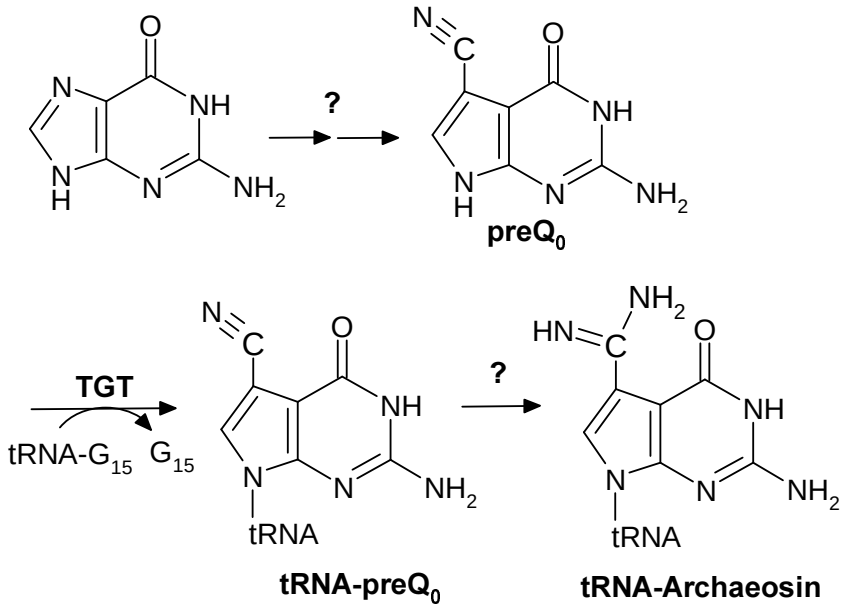


Abb. 27: Biosyntheseweg der modifizierten Base Archaeosin in archaebakteriellen tRNAs. Die TGT katalysiert den Basenaustausch von Guanin an Position 15 gegen die modifizierte Base $preQ_0$.

Die TGT-Enzyme aus den unterschiedlichen Domänen akzeptieren neben ihren natürlichen Basensubstraten jeweils auch Guanin als Substrat. Aufgrund des Aufbaus ihres aktiven Zentrums besitzt die eukaryontische TGT die geringste Substratspezifität. Sie katalysiert nicht nur den Einbau von Queuin in die tRNA, sondern auch den Austausch gegen die kleineren Basen $preQ_0$ und $preQ_1$ [Romier et al., 1997]. Die eubakterielle TGT hat in ihrer Bindetasche genügend Platz, um die Aminomethylgruppe des $preQ_1$ und die Nitrilgruppe des $preQ_0$ zu binden. Die höchste Substratspezifität weist die archaebakterielle TGT auf, die lediglich ihr physiologisches Substrat $preQ_0$ erkennt [Bai et al., 2000]. Ein weiteres Merkmal grenzt die archaebakterielle TGT von der eubakteriellen TGT deutlich ab. Die Aminosäuresequenz der archaebakteriellen TGT ist im Vergleich zu ihrem eubakteriellen Orthologen signifikant verlängert. Die N-terminale Region besitzt eine hohe Sequenzhomologie zur eubakteriellen TGT, der C-Terminus hingegen ist nur in archaebakteriellen TGT-Enzymen zu finden und ist, je nach Spezies, unterschiedlich lang [Romier et al., 1997].
Durch Aufklärung der Kristallstruktur eines der TGT-Enzyme aus den Archaea *A. fulgidus*, *A. pernix* oder *P. horikoshii* sollte ein Einblick in die Substratspezifität und das Strukturmotiv der C-terminalen Domäne erhalten werden. Durch eine *de novo*-Strukturbestimmung sollte vor allem das neuartige Faltungsmuster der C-terminalen Domäne aufgeklärt werden, das für die Bindung der tRNA an die TGT verantwortlich ist.

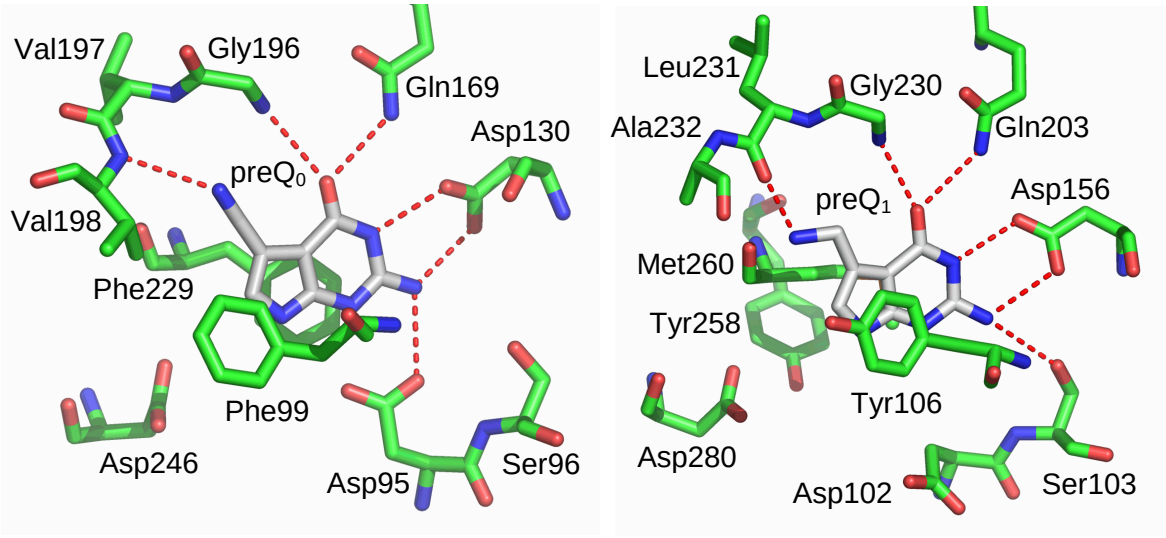
4.1.4 TGT aus *P. horikoshii*

Im Verlauf dieser Arbeit wurde von einer anderen Arbeitsgruppe die Kristallstruktur der tRNA-Guanin Transglykosylase von *P. horikoshii* mit einer Auflösung von 2,2 Å und im Komplex mit Guanin und $preQ_0$ mit einer Auflösung von 2,3 bzw. 2,5 Å bestimmt [Ishitani et al., 2002]. Ein Jahr später folgte die Struktur der *P. horikoshii* TGT im Komplex mit tRNA mit einer Auflösung von 3,3 Å [Ishitani et al., 2003].

4.1.4.1 Kristallstruktur der TGT im Komplex mit $preQ_0$

Die Kristallstruktur der dimeren TGT aus der archaebakteriellen Spezies *P. horikoshii* besteht aus einer N-terminalen Domäne (Aminosäure 6 - 360), die eine $(ß/\alpha)_8$-Fassstruktur repräsentiert und in ihrer C-terminalen Region ein Zink-Ion in einem konservierten Strukturmotiv bindet (Abb. 29). In der katalytischen Domäne ist der Bindungsmodus des $preQ_0$ zum $preQ_1$ in der *Z. mobilis* TGT sehr ähnlich (Abb. 28). Die Aminosäuren Asp95, Asp130, Gln169 und Gly196 entsprechen den eubakteriellen TGT-Resten Asp102, Asp156,

Gln203 und Gly230 (Nummerierung: *Z. mobilis* TGT) und bilden die gleichen Wasserstoffbrückenbindungen zum Substrat aus. Das Substrat wird ebenfalls durch π-π-Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der hydrophoben Aminosäuren Phe99 und Phe229 (Tyr106 und Met260 in der *Z. mobilis* TGT) gebunden. Durch die Aminosäuren Val197 und Val198 (Leu231 und Ala 232 in der *Z. mobilis* TGT) ist die Hauptkette im Vergleich zur *Z. mobilis* TGT anders orientiert. Die NH-Gruppe des Val198 zeigt als Wasserstoffbrücken-Donor in die Bindetasche und bindet an die Nitrilgruppe des $preQ_0$. Die Carbonylgruppe des Leu231 in *Z. mobilis* hingegen bildet als Wasserstoffbrücken-Akzeptor eine polare Interaktion mit der Aminomethylgruppe des $preQ_1$ aus. Dies führt zu einer Diskriminierung von $preQ_0$ gegenüber $preQ_1$ in der *P. horikoshii* TGT.

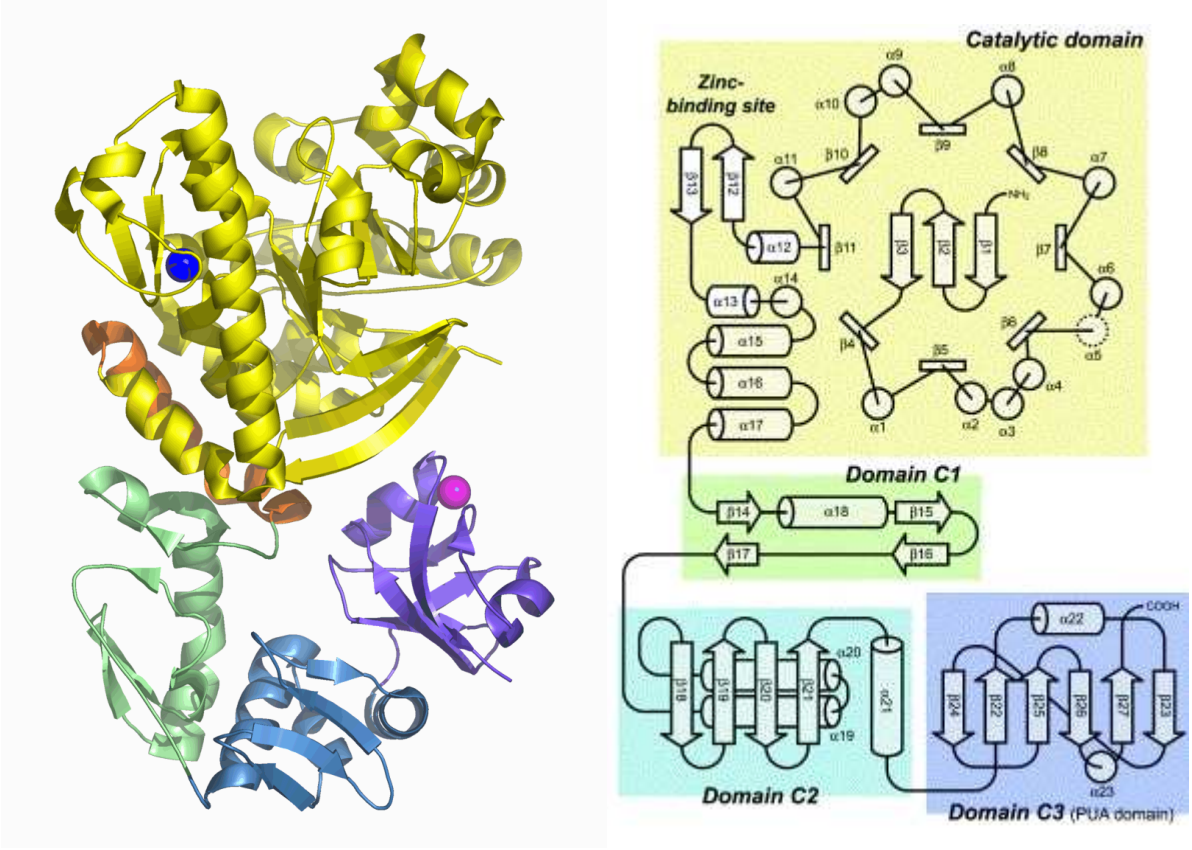


(I) (II)

Abb. 28: Aktives Zentrum der *P. horikoshii* TGT im Komplex mit $preQ_0$ (I) und der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit $preQ_1$ (II). Die Substrate sind als Stabmodell in weiß, die benachbarten Aminosäuren des aktiven Zentrums in grün dargestellt. Die roten, gestrichelten Linien kennzeichnen Wasserstoffbrückenbindungen, die zwischen dem Substrat und dem Protein ausgebildet werden.

Eine in Archaea spezifische α-Helix (α17) verbindet die katalytische Domäne mit dem C-terminalen Bereich (Abb. 29), der an der tRNA-Bindung beteiligt ist. Der C-terminale Bereich gliedert sich in drei Domänen, die ein neuartiges Faltungsmuster aufweisen. Die Domäne C1 (Aminosäure 361 - 431), die an der Ausbildung des Dimers beteiligt ist, besteht aus je zwei antiparallelen ß-Strängen und einer integrierten, längeren α-Helix. Die Domäne C2 (Aminosäure 432 - 503) ist aus einem viersträngigen, antiparallelen ß-Faltblatt geformt, das von zwei α-Helices flankiert wird. Eine dritte α-Helix verknüpft die Domäne C2 mit der

Domäne C3 (Aminosäure 504 - 582), die im Wesentlichen aus einem siebensträngigen ß-Faltblatt besteht. In den beiden letzteren Domänen befinden sich konservierte, basische Reste auf der Oberfläche des ß-Faltblattes.



(I) (II)

Abb. 29: Bandmodell der Kristallstruktur (I) und Topologieschema (II) einer Untereinheit der homodimeren *P. horikoshii* TGT. (I) Die katalytische Domäne ist in gelb, die Domänen C1, C2 und C3 sind in hellgrün, hellblau und violett gefärbt. Die α-Helix in orange repräsentiert die archaespezifische Helix der katalytischen Domäne. Das Zink-Ion ist als blaue Kugel, das Magnesiumion in violett dargestellt. (II) α-Helices sind als Kreise oder Zylinder, ß-Stränge als Rechtecke oder Pfeile dargestellt.

4.1.4.2 Kristallstruktur der TGT im Komplex mit tRNA

In einer asymmetrischen Einheit der Kristallstruktur der *P. horikoshii* TGT im Komplex mit tRNA sind das dimere TGT-Enzym und zwei tRNA-Moleküle enthalten [Ishitani et al., 2003]. Jedes tRNA-Substrat bindet an beide Untereinheiten der archaebakteriellen TGT. Die C-terminale Domäne erkennt spezifisch den Akzeptorstamm der L-förmigen tRNA, die N-terminale Domäne der benachbarten Unterheit des Proteins bindet an die D-Schleife sowie

die Variable Schleife. Die Base Guanin an Position 15, die gegen die modifizierte Base $preQ_0$ ausgetauscht wird, liegt im Kernbereich der L-förmigen tRNA. Um die Bindung des Guanins G15 an das aktive Zentrum der TGT zu ermöglichen, wird die Tertiärstruktur der tRNA partiell zerstört. Durch Aufbrechen der Basenpaarungen im Stamm der D-Schleife werden die ungepaarten Nukleotide aus dem Kernbereich der tRNA ausgestülpt. Gleichzeitig formen einige freie Basen der D-Schleife und der Variablen Schleife neue Paare und bilden eine doppelhelikale Struktur. Diese DV-Helix, die zwischen der katalytischen und C-terminalen Domäne positioniert ist, stabilisiert die TGT-gebundene Konformation der tRNA, die als λ-Form bezeichnet wird. Die Domäne C2 bindet an den Akzeptorstamm im Kernbereich der tRNA und stabilisiert durch Interaktion mit den basischen Resten in der ß18-ß19-Haarnadelschleife der TGT die λ-Form der tRNA. Die basischen und aromatischen Aminosäuren der Domäne C3 umschließen das 5´-Ende des Akzeptorstamms, einschließlich des CCA-Terminus der tRNA. Durch die basischen Aminosäurereste in den letzten beiden C-terminalen Domänen werden die Nukleotide von Position 1 bis zum *wobble* Guanin in der tRNA „abgezählt“. Dadurch kann die archaebakterielle TGT die Basen A14 und U16 in der D-Schleife der tRNA am Rande des $(ß/\alpha)_8$-Fasses so positionieren, dass das Nukleotid G15 spezifisch erkannt und an das aktive Zentrum der katalytischen Domäne gebunden wird.

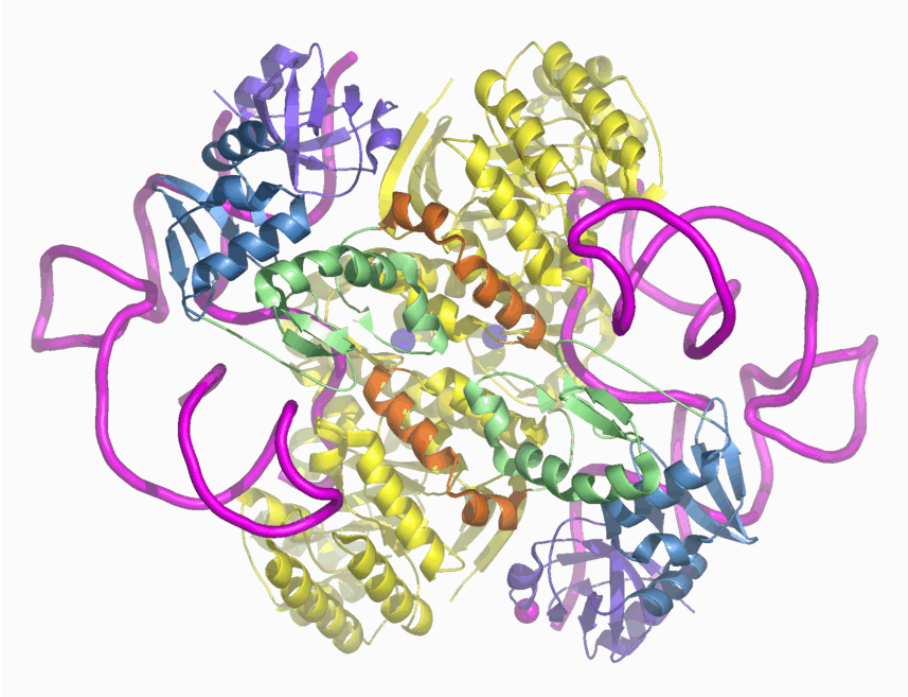


Abb. 30: Kristallstuktur der dimeren *P. horikoshii* TGT im Komplex mit tRNA. Die Kolorierung erfolgte analog zu Abb. 29. Die zwei tRNA-Moleküle sind als Bandmodell in violett dargestellt. Die tRNA flankiert die katalytische Domäne und die C-terminale Domäne der benachbarten Untereinheit.

4.2 Ergebnisse und Diskussion

4.2.1 Vergleich der TGTasen

Die archaebakteriellen tRNA-Guanin Transglykosylasen (TGT) sind aus zwei Domänen aufgebaut. Die N-terminale, katalytische Domäne repräsentiert eine $(ß/\alpha)_8$-Fassstruktur, besitzt also das gleiche Faltungsmuster wie die eubakteriellen TGT-Enzyme [Romier et al., 1997]. Diese bestehen nur aus der katalytischen Domäne und modifizieren bestimmte tRNAs im Bereich der Antikodonschleife. Im Gegensatz zu den eubakteriellen TGT-Enzymen modifizieren die archaebakteriellen TGT-Enzyme die Base Guanin in der D-Schleife der meisten tRNAs, die in der Tertiärstruktur der tRNA im Kernbereich zu finden ist [Gregson et al., 1993]. Für die Basenaustauschreaktion ist eine starke Auffaltung der tRNA-Struktur erforderlich. Das *wobble* Guanin in der D-Schleife wird in der N-terminalen Domäne an das aktive Zentrum gebunden, während die zusätzliche archaespezifische C-terminale Domäne für die spezifische Erkennung der tRNA-Tertiärstruktur verantwortlich ist [Ishitani et al., 2003]. Auffällig ist, dass sich die verschiedenen Spezies in der Länge ihrer C-terminalen Domänen signifikant unterscheiden. Bei der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT ist der C-Terminus mit einer Größe von 16,5 kDa bzw. 18,8 kDa relativ kurz, die C-terminale Domäne der *P. horikoshii* TGT hingegen weist eine Größe von 27,3 kDa auf (Tab. 10).

	Länge der TGT Enzyme [kDa (Aminosäuren)]		
	insgesamt	N-terminus	C-terminus
***Z. mobilis* TGT**	43,5 (382)	43,5 (382)	
***A. fulgidus* TGT**	54,8 (481)	38,3 (338)	16,5 (143)
***A. pernix* TGT**	57,4 (512)	38,6 (337)	18,8 (175)
***P. horikoshii* TGT**	66,6 (582)	39,4 (344)	27,2 (238)

Tab. 10: Länge der archaebakteriellen TGT der Spezies *A. fulgidus*, *A. pernix* und *P. horikoshii*. Diese Enzyme bestehen aus einer N-terminalen Domäne und eine C-terminalen Domäne, die sich in ihrer Länge signifikant voneinander unterscheiden. Die eubakterielle *Z. mobilis* TGT besitzt diesen C-terminalen Bereich nicht.

Mit Hilfe des Programms T-Coffee [Notredame et al., 2000] wurde die Primärstruktur der N-terminalen Domäne der TGT aus den hyperthermophilen Spezies *A. fulgidus*, *A. pernix* und *P. horikoshii* an die Aminosäuresequenz der *Z. mobilis* TGT angepasst. Die katalytischen Domänen der Archaebakterien sind um etwa 40 Aminosäuren verkürzt. Aus früheren Studien ist bereits bekannt, dass die Proteine hyperthermophiler Organismen im Vergleich zu ihren

mesophilen Orthologen dichter gepackt sind, um sich den extrem hohen Temperaturen in ihrem Lebensraum besser anpassen zu können [Stetter, 1999]. In allen drei archaebakteriellen TGT-Enzymen fehlt das dreisträngige, antiparallele ß-Faltblatt, das in der *Z. mobilis* TGT zwischen den Stängen ß6 und ß10 des Fasses integiert ist (Abb. 17) und in der TGT-tRNA-Komplexstruktur das 3`-Ende der Antikodonschleife spezifisch erkennt (Abb. 20). Im Allgemeinen ist die Tertiärstruktur der N-terminalen Domäne der archaebakteriellen TGT-Enzyme zum Strukturmotiv der *Z. mobilis* TGT sehr ähnlich, jedoch ist die Sequenzidentität mit etwa 25 % verhältnismäßig gering (Tab. 11). Eine signifikant höhere Identität von etwa 45 - 50 % besitzen die archaebakteriellen TGT-Enzyme in ihrer N-terminalen Domäne untereinander. In ihren C-terminalen Domänen hingegen weisen sie eine außerordentlich niedrige Sequenzidentität von 10 - 20 % auf. Die C-terminale Domäne besitzt keine signifikante Sequenz- und Strukturhomologie zu anderen Proteinstrukturen und enthält daher ein neuartiges Faltungmuster [Ishitani et al., 2002; Romier et al., 1997].

	Sequenzidentitäten [%]						
	***Z. mobilis* TGT**	***P. horikoshii* TGT**			***A. pernix* TGT**		
	N-term	gesamt	N-term	C-term	gesamt	N-term	C-term
***A. fulgidus* TGT**	23,8	36,6	52,7	20,3	37,6	44,1	22,4
***A. pernix* TGT**	26,4	34,4	46,9	10,3			
***P. horikoshii* TGT**	24,6						

Tab. 11: Sequenzidentitäten der archaebakteriellen TGT-Enzyme zur *Z. mobilis* TGT sowie der TGT-Enzyme untereinander. Die Berechnung der Sequenzidentitäten der Proteine (gesamt) sowie der N-terminalen (N-term) und C-terminalen (C-term) Domänen erfolgte anhand des Sequenzalignments, das von dem Programm T-Coffee erstellt wurde.

Zu Beginn dieser Arbeit war von keinem archaebakteriellen TGT-Enzym die Tertiärstruktur bekannt. Um einen Einblick in das neuartige Faltungsmuster des C-Terminus und eine Vorstellung über den Bindungsmodus der tRNA an die TGT zu erhalten, sollte der Versuch unternommen werden, die Kristallstruktur der *A. fulgidus*, *A. pernix* und/oder *P. horikoshii* TGT zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden die kodierenden Sequenzen der Zielgene aus den chromosomalen DNAs der hyperthermophilen Organismen amplifiziert, kloniert und überexprimiert. Die resultierenden TGT-Enzyme wurden gereinigt und Kristallisations-versuche durchgeführt.

4.2.2 Expressionssysteme und Reinigungsverfahren

Aus chromosomaler DNA wurden die kodierenden Sequenzen der *A. fulgidus*, *A. pernix* und *P. horikoshii* TGT sowie die C-terminalen Domänen der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT mittels PCR amplifiziert. Die resultierende doppelsträngige DNA wurde in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Durch ein Mutageneseverfahren wurde darüber hinaus die C-terminale Domäne der *A. fulgidus* TGT entfernt, so dass das resultierende Plasmid nur noch für die N-terminale Domäne kodierte. Tab. 12 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte. Die Eigenschaften der verschiedenen Vektoren sind in Anhang C aufgeführt.

	pET21a	**mod pGEX-6P-1**	**pET28b**	**pTYB12**
A. fulgidus TGT	+	+	+	+
A. pernix TGT	+	+	+	+
P. horikoshii TGT	+	+	+	+
A. fulgidus TGT C-terminus	+	+		
A. pernix TGT C-terminus	+	+		
A. fulgidus TGT N-terminus	+			

Tab. 12: Überblick über die verschiedenen Konstrukte, die in dieser Arbeit erstellt wurden. Für die Klonierung wurden die Vektoren pTYB12, pET21a, pET28b und ein modifizierter pGEX-6P-1-Vektor verwendet.

Nach der Expression der TGT-Enzyme aus den einzelnen Vektoren können die Proteine auf unterschiedliche Weise gereinigt werden (Tab. 13). Die Proteine, die mit Hilfe der Vektoren pTYB12, pET28b oder pGEX-6P-1 produziert werden, besitzen an ihrem N-Terminus einen *tag* (bestehend aus einer spezifischen Aminosäuresequenz oder einem Proteinanteil), der dann je nach System durch Zugabe von DTT, Thrombin oder PreScission-Protease™ abgespalten werden kann. Die Fusionsproteine werden in der Regel über verschiedene affinitätschromatographische Verfahren gereinigt. Diese Methode bietet, im Vergleich zum Reinigungsverfahren ohne *tag*, den Vorteil, dass nach 1 - 2 Reinigungsschritten das Zielprotein in hoher Reinheit erhalten werden kann. Sämtliche Vektoren tragen die Informationen für unterschiedliche Antibiotikaresistenzen.

Vektor	Antibiotika-resistenz	*tag*	Lage des *tag*	Abspaltung des *tag*	Reinigungs-verfahren
pTYB12	Amp	Intein-*tag* (55 kDa)	N-terminus	DTT	Affinitätschromato-graphie über Chitin
pET28b	Kan	His-*tag* (2 kDa)	N-terminus	Thrombin	Affinitätschromato-graphie über die Ni^{2+}-Säule
pET21a	Amp	-	-	-	Ionenaustauscher, hydrophobe Säule, Gelfitration
pGEX -6P-1	Amp	GST-*tag* (26 kDa)	N-terminus	PreScission Protease™	Affinitätschromato-graphie über Glutathione Sepharose 4B

Tab. 13: Übersicht über die verschiedenen Expressionssysteme und Reinigungsverfahren.

Die Überexpressionsplasmide, in denen jeweils das *A. fulgidus*, *A. pernix* oder *P. horikoshii tgt*-Gen einkloniert war, wurden in *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert. Wie sich zeigte, erfolgte in diesem Bakterienstamm jedoch nur eine geringe Produktion der TGT-Enzyme. Deshalb wurde die Produktion der Proteine in speziellen BL21(DE3)CodonPlus-Stämmen durchgeführt. Diese enthalten zusätzliche Kopien für bestimmte, normalerweise unterrepräsentierte tRNAs, die für eine effiziente Translation von heterologen Proteinen in manchen Fällen jedoch in größerer Konzentration benötigt werden. Die BL21(DE3)CodonPlus-RP Zellen stellen eine große Anzahl tRNAs zur Verfügung, welche die Arginin-Kodons AGA und AGG, das Isoleucin-Kodon AUA und das Leucin-Kodon CUA erkennen (welche in *E. coli*-Genen eher selten auftreten). Zusätzliche Kopien der tRNAs, welche die in *E. coli* seltenen Arginin-Kodons AGA und AGG sowie das Prolin-Kodon CCC identifizieren, stehen im BL21(DE3)CodonPlus-RIL Stamm bereit. Die Expression der *tgt*-Gene aus *A. fulgidus* und *A. pernix* erfolgte schließlich in BL21(DE3)CodonPlus-RP, die Expression der *P. horikoshii tgt* in BL21(DE3)CodonPlus-RIL. Durch Behandlung der Bakterienzellen mit Ultraschall konnte die Zellwand nur teilweise aufgebrochen werden. Erst die Verwendung einer *French Press* mit einem Druck von 1200 psi ermöglichte die vollständige Lyse der *E. coli* Zellen. Um die Löslichkeit der produzierten Proteine zu verbessern, wurde die Temperatur während der *tgt*-Expression nach Zugabe von IPTG von 37°C auf 15°C gesenkt. Weiterhin wurde der pH-Wert der für den Zellaufschluss verwendeten Puffer optimiert.

Folgende Puffer wurden letztendlich verwendet:

50 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA und 1 mM DTT

50 mM HEPES pH 7,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA und 1 mM DTT

In Abhängigkeit von der Art des verwendeten Expressionsvektors unterschieden sich die TGT-Enzyme deutlich in ihrer Löslichkeit im Rohextrakt sowie in der Menge des produzierten Proteins (Abb. 31).

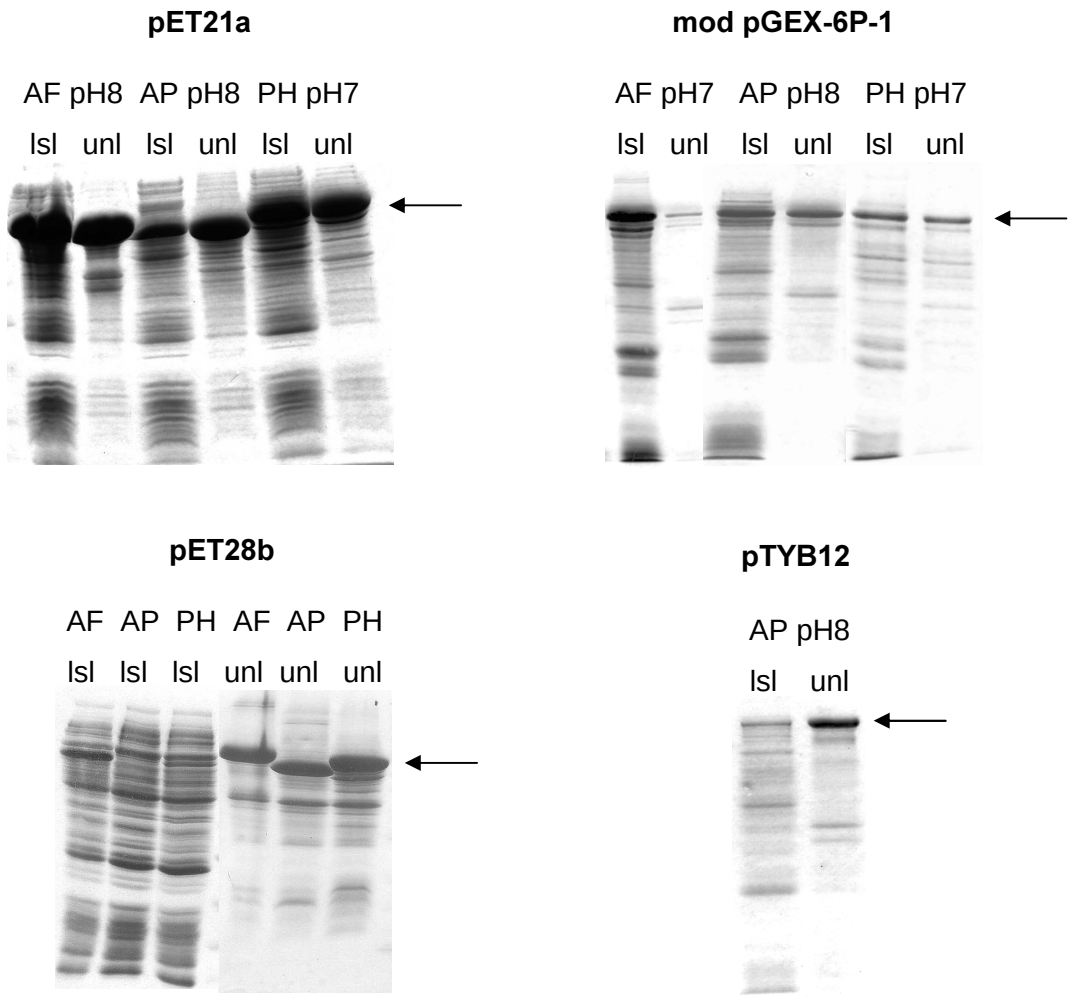


Abb. 31: Expressionsrate und Löslichkeit der *A. fulgidus* (AF), *A. pernix* (AP) und *P. horikoshii* (PH) TGT in Abhängigkeit vom verwendeten Vektor bei der Proteinproduktion. Die *tgt*-Expression erfolgte bei einer Temperatur von 15°C, der Aufschluss an der *French Press* in einem Tris-Puffer pH 8 oder HEPES-Puffer pH 7. Nach Zentrifugation wurde das lösliche Protein im Rohextrakt (lsl) und die unlöslichen Zellbestandteile (unl) auf das SDS-Proteingel aufgetragen.

Da die mit einem *tag* versehenen Proteine aus einem Zellrohextrakt affinitätschromatographisch sehr schnell und effizient aufgereinigt werden können, wurde zunächst versucht, die archaebakteriellen TGT-Proteine mit Hilfe der Vektoren pTYB12, pET28b bzw. pGEX-6P-1 in Form entsprechender Fusionsproteine zu produzieren. Jedes der genannten Systeme führte jedoch zu Problemen, die ihren Einsatz letztlich ineffizient oder gar unmöglich machten.

Mit Hilfe des Vektors pTYB12 wird ein chimäres Protein hergestellt, bei dem das Zielprotein an seinem N-Terminus mit einem Intein fusioniert ist. Das Intein-Fusionsprotein der *A. pernix* TGT wurde jedoch trotz des Einsatzes von BL21(DE3)CodonPlus-Stämmen nur in äußerst geringen Mengen hergestellt. Nach dem Zellaufschluss war die Reinigung des Fusionsproteins aufgrund der geringen Mengen an löslichem Protein im Rohextrakt nicht möglich. Der *tag* bindet spezifisch an eine Chitinsäule. Nach affinitätschromatographischer Aufreinigung kann der Inteinanteil durch Zugabe von 50 mM DTT bei 4 - 23°C abgespalten werden.

Der pET28b-Vektor führt zur Produktion eines Zielproteins, welches am N-Terminus mit einem *tag* aus Polyhistidinresten versehen ist. Trotz guter Expressionsraten waren die TGT-Fusionproteine aus den Spezies *A. fulgidus*, *A. pernix* und *P. horikoshii* nur zum geringen Teil im Überstand des Aufschlusspuffers löslich, so dass dieses Reinigungsverfahren nicht weiter verfolgt wurde. Dieser ermöglicht die Aufreinigung über eine Ni-Chelat-Affinitätchromatographiesäule.

Mit Hilfe des modifizierten pGEX-6P-1-Vektors wird ein Zielprotein produziert, das am N-Terminus mit der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* fusioniert ist. Dies ermöglicht die effiziente affinitätschromatographische Aufreiniung über eine Glutathion-Sepharose-Säule. Der GST-Anteil kann im Anschluss durch die äußerst spezifische PreScission-Protease™ vom Zielprotein abgespalten werden. Trotz der vergleichsweise mäßigen Expressionsrate im Falle der archaebakteriellen *tgt*-Gene überzeugte das System durch die gute Löslichkeit der resultierenden Fusionsproteine im Rohextrakt. Dieses Reinigungsverfahren konnte jedoch nicht angewendet werden, weil offensichtlich die Glutathion-Bindestelle im GST-Anteil durch die Fusionierung maskiert und folglich nicht zugänglich war, so dass sämtliche Versuche, das Protein affinitätschromatographisch aufzureinigen, fehlschlugen. Darüber hinaus bildeten die Fusionsproteine aus den Organismen *A. pernix* und *P. horikoshii* nach wenigen Tagen ein Präzipitat. Da die Aufreinigung der TGT-Enzyme über keines der genannten affinitätschromatographischen Verfahren möglich war, wurden die Proteine ohne *tag* mit Hilfe des pET21a-Vektors hergestellt und anschließend „klassisch" aufgereinigt. Neben der hervorragenden Expressionsrate durch dieses System zeigten die Proteine aus allen drei archaebakteriellen Organismen im Rohextrakt sehr gute Löslichkeit. Die Reinigung der *A. pernix* TGT erwies

sich jedoch als äußerst problematisch, weil das Proteine wenige Tage nach dem Zellaufschluss ein Präzipitat bildete. Da im Verlauf der vorliegenden Arbeit die Kristallstruktur der *P. horikoshii* TGT publiziert wurde, wurde die Aufreinigung dieses Enzyms nicht weiter verfolgt [Ishitani et al., 2001]. Die Aufklärung der Kristallstruktur der *A. fulgidus* TGT erschien jedoch nach wie vor sehr interessant. Die C-terminale Domäne unterscheidet sich in ihrer Länge signifikant von der C-terminalen Domäne der *P. horikoshii* TGT. Aus dem Homologiemodell (Kapitel 4.2.6) geht hervor, dass die C-terminale Domäne der *A. fulgidus* TGT zumindest in Teilbereichen ein anderes Faltungsmuster aufweist. Deshalb konzentrierten sich die Bemühungen auf die Etablierung eines Reinigungsverfahrens für die *A. fulgidus* TGT. Dieses Protein war darüber hinaus von allen drei TGT-Enzymen im Rohextrakt am besten löslich.

4.2.3 Die *A. fulgidus* TGT

4.2.3.1 Proteinreinigung

Für die *A. fulgidus* TGT wurde ein fünfstufiges Reinigungsverfahren entwickelt, mit dessen Hilfe mehrere Milligramm Protein für Kristallisationsversuche erhalten wurden. Die Expression des *A. fulgidus tgt*-Gens erfolgte wie bereits erwähnt durch den Überexpressionsvektor pET21a in dem *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus-RP in einem Volumen von sechs Liter Kulturmedium. Der Zellaufschluss wurde mittels einer *French Press* durchgeführt. Der erste Reinigungsschritt bestand im Erhitzen des Rohextrakts auf eine Temperatur von 70°C. Das TGT-Enzym der hyperthermophilen *A. fulgidus* war bei dieser Temperator völlig stabil, während die Mehrzahl der *E. coli* eigenen Proteine denaturierten und präzipitierten. Ein ähnlicher Reinigungsschritt war bereits bei der tRNA-Guanin Transglykosylase aus dem hyperthermophilen Archaebakterium *M. jannaschii* [Bai et al., 2000] angewendet worden. Auf diese Weise konnten bereits die meisten unerwünschten Proteine entfernt werden. Durch Anionenaustauschchromatographie mittels einer Q-Sepharose-Säule erfolgte im Anschluss die Abtrennung stark negativ geladener Makromoleküle, in erster Linie von DNA und RNA. Nach diesem Reinigungsschritt war durch SDS-PAGE noch eine deutliche Proteinkontamination mit einem Molekulargewicht von etwa 30 kDa detektierbar, die durch die Hydrophobe Säule beseitigt wurde. Die anschließende Aufreinigung mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie erfolgte bei sehr niedriger Flussrate. Dadurch konnte das unerwünschte Protein mit einer Größe von etwa 42 kDa bereits teilweise von der TGT abgetrennt werden. Die *A. fulgidus* TGT wurde nach einem Volumen von etwa 190 ml Puffer von der Säule eluiert und liegt daher mit hoher Wahrscheinlichkeit als

Monomer in Lösung vor. Eine nahezu vollständige Abtrennung der 42 kDa großen Proteinkontamination wurde durch Einsatz einer MonoQ-Säule, einem Anionenaustauscher mit sehr hoher Trennleistung, erreicht. Um das Überladen der kleinen Säule zu vermeiden und einen guten Trenneffekt zu erzielen, wurde die Proteinlösung in drei Fraktionen geteilt, welche jeweis einzeln auf die MonoQ-Säule aufgetragen wurden.
Nach der Dialyse wurde die Absorption mittels einer UV-spektroskopischen Messung bestimmt und der Proteingehalt nach einem von Bio-Rad entwickelten Verfahren berechnet [Bio-Rad]. Die Proteinkonzentration wurde auch mit Hilfe der Bradford-Methode bzw. des Absorptionskoeffizienten, der aus der Aminosäuresequenz der *A. fulgidus* TGT (im denaturierten Zustand) abgeleitet wurde, berechnet. Die Werte waren jedoch signifikant erhöht und wichen von der Proteinkonzentration, die mit der Methode von Bio-Rad bestimmt wurde, stark ab. Die weitere Gehaltsbestimmung erfolgte nach der Methode von Bio-Rad.

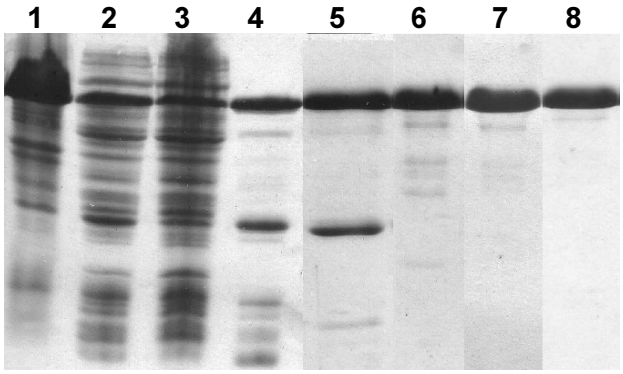


Abb. 32: SDS-Proteingele von einer Präparation der *A. fulgidus* TGT. Bahn 1: unlösliche Fraktion nach Zellaufschluss; Bahn 2: Rohextrakt; Bahn 3: unlösliche Fraktion nach Erhitzen des Rohextrakts auf 70°C; Bahn 4: Überstand nach Erhitzen; Bahn 5: gereinigte Fraktion nach der Anionenaustauschchromatographie; Bahn 6: gereinigte Fraktion nach der Hydrophoben Säule; Bahn 7: gereinigte Fraktion nach der Gelfiltrationssäule; Bahn 8: gereinigte Fraktion nach der MonoQ-Säule.

4.2.3.2 Kristallisation

Nach Erstellung und Optimierung des Reinigungsverfahrens wurde eine Vielzahl von Versuchen unternommen, das gereinigte Protein zu kristallisieren. Für erste Screeningversuche dienten verschiedene kommerziell erhältliche *Kits* von Hampton Research und Jena Biosciences sowie *Screens*, die von Therese Bergfors entwickelt wurden [Bergfors, 1999]. Aus dem Kristallisationsscreen von Hampton Research wurden 1 - 2

Monate nach Ansetzen des Kristallisationstropfens sehr dünne nadelförmige Proteinkristalle unter folgender Bedingung erhalten (Abb. 34 I):

Crystal Lite Screen Nr. 25 (22°C): 0,1 M Imidazol pH 6,5, 0,5 M NaAc

Diese Reservoirlösung diente als Startpunkt für weitere Kristallisationsversuche. Die Kristalle konnten jedoch durch Variation verschiedener Parameter wie beispielsweise pH-Wert, Proteinkonzentration oder Konzentration und Art des verwendeten Puffers nicht reproduziert werden. Die erhaltenen Kristalle aus dem Kristallisationsscreen dienten als Impfkristalle für die *streak seeding*-Methode. Dabei wurden die nadelförmigen Kristalle mit einem dicken Haar berührt und die abgelösten Kristallisationskeime in neue, äquilibrierte Kristallisationstropfen überführt. Leider konnte auch mit diesem Verfahren keine neuen Kristalle gezüchtet werden.

Da keine Kristalle mit der apo-TGT erhalten werden konnten, wurde die Kokristallisation mit dem in Abb. 33 gezeigten RNA-Molekül versucht. Aus kinetischen Studien mit der *P. horikoshii* TGT wurde eine Minihelix aus der $tRNA^{Val}$ abgeleitet, die als minimales Substrat von dieser TGT erkannt wird [Watanabe et al., 2001]. Eine konstruierte Grundstruktur, die aus dem D-Arm und dem Akzeptorstamm der tRNA besteht, besitzt keine Bindungsaffinität zur archaebakteriellen TGT. Durch Einführung verschiedener Basen zwischen die gepaarten Nukleotide im Stamm wurden einige der konstruierten RNA-Fragmente durch das Enzym gebunden. Dies zeigt, dass nicht nur die Sekundärstruktur des RNA-Substrats erkannt wird, sondern auch dessen Tertiärstruktur für die Bindung wichtig ist. Aus den verschiedenen RNA-Konstrukten wurde das folgende RNA-Substrat ausgewählt:

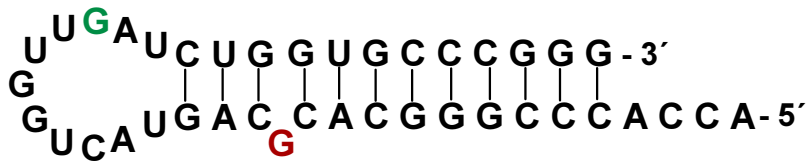


Abb. 33: Schematische Darstellung des RNA-Substrats, das für die Kokristallisationsversuche mit der *A. fulgidus* TGT verwendet wurde.

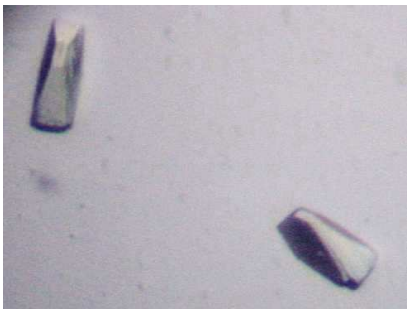
Die Minihelix wird ohne das in roter Farbe gekennzeichete Nukleotid nicht von der TGT erkannt. Am 3´-Ende des RNA-Substrats müssen genau 14 Nukleotide vor dem *wobble* Guanin an Position 15 (grün) inseriert sein, um als Substrat für die TGT dienen zu können. Durch die Einführung des Guanins zwischen den Nukleotiden 25 und 26 (rot) bindet das RNA-Substrat im Vergleich zur kompletten $tRNA^{Val}$ mit nur 6,5-fach niedrigerer Bindungsaffinität an das TGT-Enzym. Für Kokristallisationsversuche wurde dieses Konstrukt

gewählt, da es die höchste Bindungsaffinität besitzt, jedoch nur äußerst langsam von dem archaebakteriellen Enzym umgesetzt wird. Durch die geringere Geschwindigkeit bei der Katalyse sollte das RNA-Substrat länger an der TGT gebunden bleiben, um die Chancen für eine erfolgreiche Kokristallisation zu erhöhen. Dazu wurden jeweils 48 Kristallisationsbedingungen bei 4°C und 22°C unter Verwendung der Reservoirlösungen aus dem speziell für den Einsatz von Nukleinsäuren konzipierten *Natrix Screen* getestet. Das RNA-Substrat wurde durch Erhitzen auf eine Temperatur von 90°C denaturiert, um eventuell falsch gepaarte Nukleotidbasen aufzutrennen und um, durch langsames Abkühlen, die Einnahme des richtigen Faltungszustandes zu ermöglichen. Der Proteinlösung wurde die RNA-Lösung und $MgCl_2$ mit einer Endkonzentration von 5 mM hinzugefügt. Die Magnesium-Ionen unterstützen die Anlagerung der negativ geladenen Phosphatgruppen der RNA an die Proteinoberfläche. Aus dem Kokristallisationsansatz der *A. fulgidus* TGT mit dem RNA-Substrat wuchsen nach 2 - 3 Monaten unter folgender Bedingung Einkristalle (Abb. 34 II):

Natrix Screen Nr. 38 (4°C): 0,05 M HEPES pH 7,0, 0,2 M NH_4Ac, 0,15 M MgAc, 5 % PEG 4000

Die Einkristalle aus dem Kokristallisationsansatz konnten leider nicht reproduziert werden. Ebenso scheiterten die Versuche, durch die Methode des *microseeding* neue Kristalle zu züchten. Die Einkristalle besitzen jedoch eine ausreichende Größe, um sie für die Röntgenstrukturanalyse zu verwenden. An dem im Hause vorhandenen Röntgengenerator wurde getestet, ob der Kristall Röntgenstrahlen beugen kann. Der Kristall wurde im Röntgenstrahl für 5 Minuten belichtet. Auf dem Beugungsbild waren Reflexe im unteren Auflösungsbereich zu erkennen, so dass es sich bei diesen Kristallen eindeutig um Proteinkristalle handelte. Der Kristall zeugte jedoch von geringer Qualität und war für weitere Beugungsexperimente nicht geeignet.

(I)



(II)

Abb. 34: Kristalle der *A. fulgidus* TGT. (I) Nadelförmige Kristalle der apo-TGT. (II) Kristalle der TGT aus dem Kokristallisationsansatz mit RNA-Substrat.

4.2.4 Die N-terminale Domäne der *A. fulgidus* TGT

4.2.4.1 Proteinreinigung

Die Tatsache, dass aus beiden Kristallisationsansätzen der *A. fulgidus* TGT erst nach mehreren Monaten Kristalle wuchsen, führte zu dem Verdacht, dass es sich bei dem kristallisierten Protein um ein Abbauprodukt des 55 kDa großen TGT-Enzyms handelte. Dies würde erklären, weshalb die erhaltenen Kristalle nicht reproduzierbar waren. Diese Annahme wurde folgendermaßen bestätigt. Die Nadeln aus dem *Crystal Lite Screen* Nr. 25 (Kr1) und ein Einkristall aus dem *Natrix Screen* Nr. 38 (Kr2) wurden jeweils in einem Puffer gelöst, die Proteinlösungen auf ein SDS-Gel aufgetragen und durch Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 35 I). Auf dem Gel waren in den Bahnen sowohl das intakte archaebakterielle TGT-Enzym mit einem Molekulargewicht von etwa 55 kDa als auch Banden bei etwa 14 kDa, 36 kDa und 42 kDa zu erkennen. Die genauen Massen der deutlich sichtbaren Abbauprodukte auf dem SDS-Proteingel wurden anschließend aus der Probe Kr2 durch MALDI-TOF bestimmt (Abb. 35 II).

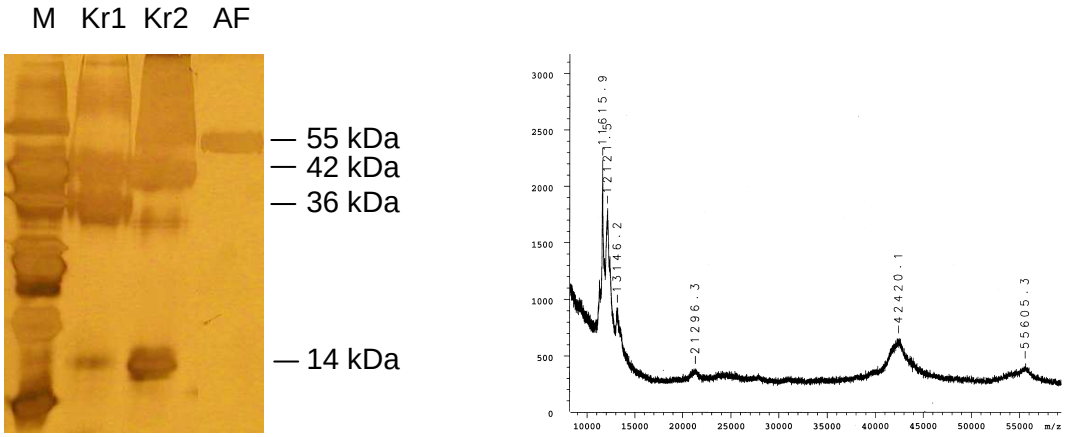


Abb. 35: Abbauprodukte der *A. fulgidus* TGT (AF). (I) Die Kristalle aus den *Screens* wurden jeweils in einem Puffer solubilisiert und die Proteinlösungen (Kr1 und Kr2) auf ein SDS-Proteingel aufgetragen. Das Proteingel wurde mit einer Silberlösung angefärbt. Als Referenz wurde ein Standard-Marker (M) aufgetragen. Die stärkste Proteinbande ist bei einem Molekulargewicht von etwa 42 kDa zu erkennen. (II) Bestimmung des Molekulargewichts der Abbauprodukte der *A. fulgidus* TGT aus der Probe Kr2 mittels MALDI-TOF. Das Spektrum bestätigt die Ergebnisse aus dem SDS-Proteingel.

Es wurde angenommen, dass das 42 kDa große Fragment aus der N-terminalen Domäne der *A. fulgidus* TGT besteht. Eventuell waren die erhaltenen Kristalle aus diesem

Abbauprodukt entstanden. Die Größe dieses Abbauprodukts von 42 kDa entspricht recht genau der katalytischen $(ß/\alpha)_8$-Fassdomäne des Enzyms und zusätzlich der sich daran anschließenden archaespezifischen α-Helix (α17 in Abb. 29), die bei archaebakteriellen TGT-Enzymen den Übergang von der N- zur C-terminalen Domäne ausbildet.

Um der Frage nachzugehen, ob es sich bei dem kristallisierten Abbauprodukt um eben dieses Fragment der *A. fulgidus* TGT handelte, wurde aus dem *A. fulgidus tgt*-Gen, das in dem Vektor pET21a einkloniert war, durch ein Mutageneseverfahren die Gensequenz, die für die 126 C-terminalen Aminosäuren kodiert, entfernt. Mit Hilfe des resultierenden Überexpressionsplasmids wurde in *E. coli* Rosetta^{TM}(DE3)pLysS Zellen das TGT-Fragment produziert. Dieser Bakterienstamm stellt zusätzliche tRNAs für die Expression des Zielgens zur Verfügung und vereinigt die Eigenschaften der Stämme BL21CodonPlus(DE3)-RP und BL21CodonPlus(DE3)-RIL. Nach der Lyse der Zellwand mittels Ultraschall war die N-terminale Domäne im Rohextrakt sehr gut löslich. Erwähnenswert ist, dass ein anderes Konstrukt der N-terminalen Domäne der *A. fulgidus* TGT, dem die archaespezifische Helix fehlt und ein Molekulargewicht von 36 kDa umfasst, im Überstand des Rohextrakts vollständig unlöslich war. Die Aufreinigung der 42 kDa großen N-terminalen Domäne erfolgte über eine Anionenaustauschersäule, eine Hydrophobe Säule und eine Gelfiltrationssäule. Eine Proteinkontamination, die nach diesen Reinigungsschritten auf einem SDS-Gel im Bereich von 25 kDa noch sichtbar war, wurde schließlich durch einen weiteren Lauf über die Hydrophobe Säule entfernt. Nach Dialyse wurde der Proteingehalt nach der Methode von Bio-Rad bestimmt. Im Vergleich zur Reinigung der kompletten *A. fulgidus* TGT war die Ausbeute mit 10 mg pro Liter Kultur sehr hoch.

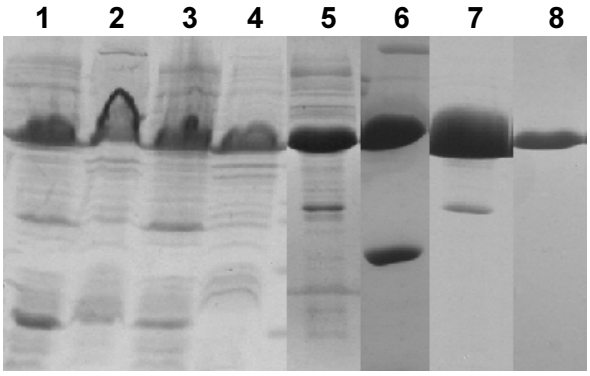


Abb. 36: SDS-Proteingele von einer Präparation der N-terminalen Domäne der *A. fulgidus* TGT. Bahn 1: unlösliche Fraktion nach Zellaufschluss; Bahn 2: Rohextrakt; Bahn 3: gereinigte Fraktion nach der Anionenaustauschchromatographie; Bahn 4: gereinigte Fraktion nach der Hydrophoben Säule; Bahn 5: gereinigte Fraktion nach der Gelfiltrationssäule; Bahn 6: gereinigte Fraktion nach der zweiten Hydrophoben Säule.

4.2.4.2 Kristallisation

Für die Kristallisation wurden unterschiedliche Bedingungen getestet. Aus dem Kristallisationsscreen wurden verschiedene geeignete Kristallisationsbedingungen erhalten. Erwähnenswert sind die ovalförmigen, stark verwachsenen Kristalle, die unter den folgenden Bedingungen erhalten wurden:

Natrix Screen Nr. 22 (4/ 22°C): 0,05 M Na-cacodylate pH 6,5, 0,08 M MgAc, 15 % PEG 400

Während die Kristalle bei 4°C sehr klein waren, besaßen die Kristalle, die bei 22°C gewachsen waren, eine für die Röntgenstrukturanalyse ausreichende Größe. Ein Kristall wurde 5 Minuten im Röntgenstrahl belichtet. Auf dem Beugungsbild waren nur Reflexe im unteren Auflösungsbereich erkennbar. In einem weiteren Kristallisationsversuch konnten diese Kristalle allerdings nicht reproduziert werden.

Abb. 37: Kristalle der 42 kDa großen N-terminalen Domäne der *A. fulgidus* TGT.

4.2.5 Die C-terminalen Domänen der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT

Die Kristallstrukturen der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT konnten nicht bestimmt werden, da die Proteine nicht in kristalliner Form erhältlich waren. Aus der Primärstruktur der Enzyme ist jedoch bekannt, dass sie aus zwei Domänen bestehen. Die C-terminale Domäne der TGT weist, im Gegensatz zur N-terminalen Domäne ein neuartiges Faltungsmuster auf. Deshalb wurden die C-terminalen Domänen aus diesen Enzymen isoliert, um ihre Kristallstrukturen bestimmen zu können. Die Position zwischen der N- und der C-terminalen Domäne wurde aus einem Sequenzalignment abgeleitet, in dem die Aminosäuresequenzen der *A. fulgidus*, *A. pernix* TGT und der eubakteriellen *Z. mobilis* TGT miteinander verglichen wurden. Die *Z.*

mobilis TGT besitzt im Gegensatz zur archaebakteriellen TGT keine C-terminale Domäne. Die beiden Domänen der archaebakteriellen TGT-Enzyme wurden an der Position voneinander getrennt, an dem die N-terminale Domäne der *Z. mobilis* TGT endet. Die Gensequenzen der C-terminalen Domänen wurden aus den *tgt*-Genen der archaebakteriellen Organismen durch PCR amplifiziert. Anschließend wurden die *tgt*-Fragmente in den Vektor pET21a und den modifizierten pGEX-6P-1-Vektor kloniert. Die Produktion der C-terminalen Domänen der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT mit einer Größe von 16 kDa bzw. 20 kDa erfolgte im Rosetta™(DE3)pLysS Stamm. Im Vergleich zum Expressionssystem des pET21a-Vektors wurden die beiden TGT-Enzyme als Fusionsproteine in größeren Mengen hergestellt und waren im Rohextrakt wesentlich besser löslich. Vermutlich unterstützt der N-terminale *tag* die Faltung der C-terminalen Domänen der *A. fulgidus* bzw. *A. pernix* TGT. Eine Reinigung des Proteins über die Glutathion-Sepharose war möglich, da die Domäne spezifisch an das Säulenmaterial gebunden wurde. Allerdings blieb die C-terminale Domäne aufgrund ihrer ausgeprägten Hydrophobizität nach der Abspaltung des *tag* größtenteils an der Glutathion-Sepharose gebunden. Deshalb wurde die C-terminale Domäne der *A. fulgidus* bzw. *A. pernix* TGT nach dem „klassischen“ säulenchromato-graphischen Verfahren gereinigt. Zuerst erfolgte die Reinigung der C-terminalen Domäne unter Verwendung der Hydrophoben Säule und der Gelfiltrationssäule. Danach wurde der *tag* durch Zugabe von PreScission-Protease™ abgespalten. Der GST-Proteinanteil sollte prinzipiell erst nach der Reinigung über die Gelfiltrationssäule abgespalten werden. Aufgrund der hohen Hydrophobizität der C-terminalen Domäne (ohne *tag*) verblieb mehr als 80 % der gesamten Proteinmenge auf der Gelfiltrationssäule. Der *tag* und das nicht gespaltene Fusionsprotein wurden anschließend durch einen Kationenaustauscher von der C-terminalen Domäne abgetrennt. Die so erhaltene Präparation zeigte jedoch noch deutliche Verunreinigungen und war folglich für Kristallisationsversuche nicht einsetzbar. Die Ausbeute betrug lediglich etwa 3 mg aus neun Liter Kulturmedium.

Da die C-terminale Domäne der *A. fulgidus* bzw. *A. pernix* TGT nach diesem Reinigungs-protokoll nicht in ausreichender Reinheit erhalten werden konnte, sollte bei einer Optimierung des Reinigungsverfahrens die affinitätschromatographische Reinigung mit der „klassischen“ Säulenchromatographie kombiniert werden. Zuerst wird das Fusionsprotein an die Glutathion-Sepharose gebunden. Nach dem Waschen wird das Fusionsprotein anschließend durch Zugabe von reduziertem Glutathion von der Säule eluiert. Die weitere Aufreinigung erfolgt unter Verwendung der Hydrophoben Säule und der Gelfiltrationssäule. Zuletzt wird der *tag* von dem GST-Proteinanteil abgespalten und die C-terminale Domäne mit Hilfe der Kationenaustauschersäule von dem verbliebenen Fusionsprotein und der Glutathion-S-Transferase abgetrennt.

4.2.6 Homologiemodelle der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT

Da die Kristallstrukturen der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT in dieser Arbeit nicht bestimmt werden konnten, wurde von diesen Enzymen mit Hilfe des Programms MODELLER [Sali & Blundell, 1993] Homologiemodelle erstellt. Die Kristallstruktur der *P. horikoshii* TGT diente als Modellstruktur. Die Aminosäuresequenzen der *A. fulgidus*, *A. pernix* und *P. horikoshii* TGT wurden mit Hilfe des Programms T-Coffee [Notredame et al., 2000] untereinander ausgerichtet (Anhang A), die Qualität des Sequenzalignments überprüft und anschließend die Homologiemodelle berechnet.

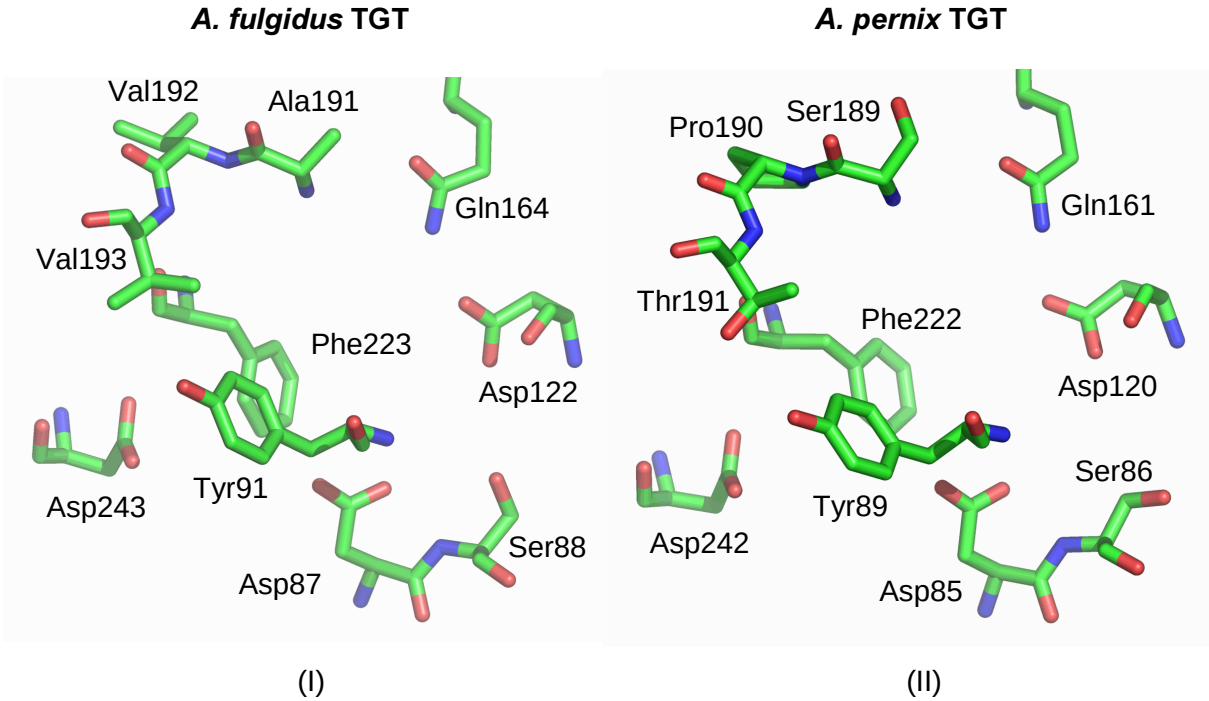


Abb. 38: Homologiemodell des aktives Zentrums der *A. fulgidus* TGT (I) und *A. pernix* TGT (II). Die Aminosäurereste in der Bindetasche sind als Stabmodell in grün dargestellt.

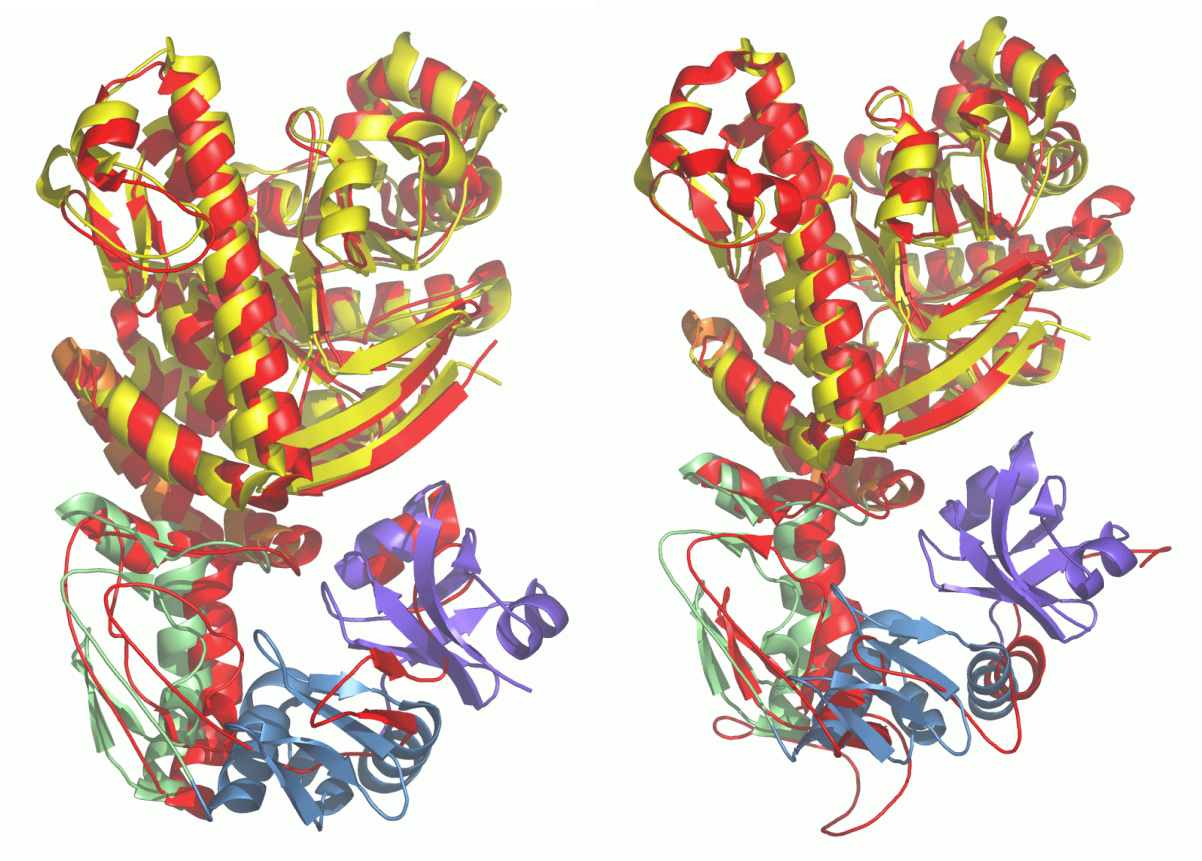
In der Kristallstruktur der *P. horikoshii* TGT befindet sich in der N-terminalen Domäne das aktive Zentrum (Kapitel 4.1.4.1). Die Aminosäurereste in der Bindetasche sind zu den Resten im aktiven Zentrum der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT weitgehend konserviert (Abb. 38). Deshalb wird vermutet, dass das Substrat preQ$_0$ in den aktiven Zentren der archaebakteriellen TGT-Enzyme den gleichen Bindungsmodus einnimmt. Die Aminosäuren Gly196, Val197 und Val198 der *P. horikoshii* TGT entsprechen den Aminosäuren Ala191, Val192 und Val193 in der *A. fulgidus* TGT. In der *A. pernix* TGT hingegen sind diese Reste gegen Ser189, Pro190 und Thr191 ausgetauscht. Trotz der unterschiedlichen Primärstruktur nehmen die Hauptketten mit großer Wahrscheinlichkeit die gleiche Konformation im aktiven

Zentrum ein. Dadurch wird, analog zur *P. horikoshii* TGT, die Nitrilgruppe des $preQ_0$ von der NH-Gruppe des Val193 in der *A. fulgidus* TGT bzw. des Thr191 in der *A. pernix* TGT spezifisch erkannt. Das Asp95 und Asp246 in der *P. horikoshii* TGT entsprechen in der *A. fulgidus* dem Asp87 und Asp243 bzw. in der *A. pernix* TGT dem Asp85 und Asp242. In der eubakteriellen *Z. mobilis* TGT wurde das Asp280 (entspricht dem Asp246 in *P. horikoshii*) als katalytisches Nukleophil identifiziert (Kapitel 3.1.3). Das Asp102 (entspricht dem Asp95 in *P. horikoshii*) ist vermutlich an der Protonenübertragung beteiligt. Seine Funktion wird gegenwärtig diskutiert. Es ist anzunehmen, dass diese Aspartatreste in allen drei archaebakteriellen TGT-Enzymen die gleiche Funktion wie in der *Z. mobilis* TGT besitzen.

Die in Archaea spezifische Helix liegt zwischen der N-terminalen und C-terminalen Domäne und ist in allen drei archaebakteriellen TGT-Enzymen vorhanden. Die C-terminale Domäne ist in den verschiedenen Spezies unterschiedlich lang. Die *P. horikoshii* TGT besitzt von den drei Organismen den längsten C-terminalen Bereich (Tab. 10). Diese besteht aus drei Domänen, von denen vor allem C2 und C3 an der tRNA-Bindung beteiligt sind. Die C-terminalen Domänen der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT sind signifikant kürzer. Sie entsprechen im Homologiemodell größtenteils der Domäne C1 in der *P. horikoshii* TGT (Abb. 39). In der *A. fulgidus* TGT kann die Konformation von mindestens 10 Aminosäureresten, die innerhalb der Domäne C1 liegen, nicht zuverlässig vorhergesagt werden. In der *A. pernix* TGT sind dies sogar etwa 30 Aminosäurereste. Die Domäne C2 und C3 in der *P. horikoshii* TGT sind in den beiden anderen archaebakteriellen TGT-Enzymen nur teilweise vorhanden. Dieser Bereich kann von MODELLER nicht zuverlässig vorhergesagt werden. Dabei handelt es sich um die letzten 40 - 50 Aminosäurereste der *A. fulgidus* bzw. *A. pernix* TGT. Folglich besitzen diese Organismen wenigstens in Teilbereichen ein neuartiges Strukturmotiv in der C-terminalen Domäne.

Die Kristallstruktur der *P. horikoshii* TGT wurde auch im Komplex mit tRNA bestimmt, in der ein tRNA-Molekül an beide Untereinheiten des dimeren Enzyms bindet. Der Bindungsmodus im Bereich der N-terminalen Domäne sollte bei allen drei TGT-Enzymen sehr ähnlich sein. In der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT fehlen jedoch Bereiche der Domänen C2 und C3, die an den Akzeptorstamm und die DV-Helix binden. Weiterhin wurde die in der *P. horikoshii* TGT vorhandene ß18-ß19-Haarnadelschleife, welche die λ-Form der tRNA stabilisiert, in der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT nicht modelliert. In der *A. fulgidus* TGT kann die tRNA nicht von zwei Untereinheiten des Proteins gebunden werden. Gelfiltrationsexperimente zeigten, dass die *A. fulgidus* TGT im Gegensatz zur *P. horikoshii* TGT in Lösung als Monomer vorliegt.

Die Kristallstruktur der *P. horikoshii* TGT gibt interessante Einblicke in das Strukturmotiv der C-terminalen Domäne und ihren Bindungsmodus an die tRNA. Aus den Homologiemodellen der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT kann keine Aussage darüber getroffen werden wie die tRNA an die C-terminalen Domänen dieser Enzyme gebunden wird.



(I) (II)

Abb. 39: Überlagerung der Kristallstuktur der *P. horikoshii* TGT mit dem Homologiemodell der *A. fulgidus* TGT (I) bzw. *A. pernix* TGT (II). Die katalytische Domäne der *P. horikoshii* TGT ist in gelb, die archaespezifische Helix in orange und die C-terminalen Domänen C1, C2 und C3 in hellgrün, hellblau und violett gefärbt. Das Homologiemodell der *A. fulgidus* bzw. *A. pernix* TGT ist in roter Farbe dargestellt.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die archaebakterielle tRNA-Guanin Transglykosylase (TGT) katalysiert den Austausch der Base Guanin gegen die modifizierte Base $preQ_0$ an Position 15 in der D-Schleife der meisten tRNAs. Das $preQ_0$ wird anschließend zur hypermodifizierten Base Archaeosin umgewandelt. Die genaue Funktion dieser Base ist noch nicht bekannt. Die Modifikation könnte jedoch zur Stabilisierung der tertiären Struktur der tRNAs beitragen. Die archaebakteriellen tRNA-Guanin Transglykosylasen bestehen aus zwei Domänen. Die N-terminale Domäne repräsentiert im Wesentlichen eine $(ß/\alpha)_8$-Fassstruktur. Am C-terminalen Ende des Fasses befindet sich das aktive Zentrum der TGT. Die archaebakteriellen Organismen besitzen eine archaespezifische C-terminale Domäne, die für die tRNA-Bindung verantwortlich ist. In dieser Eigenschaft grenzen sie sich deutlich von ihren eubakteriellen und eukaryontischen Orthologen ab.

Auch innerhalb der Domäne Archaea unterscheiden sich die archaebakteriellen TGT-Enzyme deutlich voneinander. In den hyperthermophilen Spezies *A. fulgidus*, *A. pernix* und *P. horikoshii* sind die C-terminalen Domänen unterschiedlich lang. Um einen Einblick in das neuartige Faltungsmuster der C-terminalen Domäne der TGT zu erhalten, wurden die *tgt*-Gene aus diesen Spezies amplifiziert und in den Vektor pET21a kloniert. Nach der Expression der *tgt*-Gene in *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus waren die resultierenden TGT-Enzyme im Rohextrakt sehr gut löslich. Die *A. pernix* TGT jedoch denaturierte bereits wenige Tage nach dem Zellaufschluss. Für die *A. fulgidus* TGT hingegen konnte ein Reinigungsverfahren etabliert werden. In Kristallisationsansätzen wurden Kristalle der *A. fulgidus* TGT erhalten, die jedoch nicht reproduzierbar waren. Wie sich zeigte, handelte es sich bei diesen Kristallen um ein 42 kDa großes Abbauprodukt der *A. fulgidus* TGT, das der N-terminalen Domäne zugewiesen wurde. Um dies zu bestätigen, wurde die kodierende Sequenz der N-terminalen Domäne kloniert und überexprimiert. Das resultierende Protein wurde erfolgreich in hoher Ausbeute gereinigt und kristallisiert. Parallel wurden auch die C-terminalen Domänen der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT aus den kompletten *tgt*-Genen amplifiziert. Die C-terminalen Domänen wurde gereinigt, konnten jedoch aufgrund der geringen Ausbeute und ihrer Tendenz zur Aggregatbildung nicht kristallisiert werden. Die Kristallstrukturen der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT bzw. ihre N- und C-terminalen Domänen konnten in dieser Arbeit nicht bestimmt werden, da keine reproduzierbaren, diffraktionsfähigen Kristalle erhalten werden konnten.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Kristallstuktur der *P. horikoshii* TGT im Komplex mit tRNA veröffentlicht. Die C-terminalen Domänen der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT unterscheiden sich jedoch signifikant von der Größe der C-terminalen Domäne der *P. horikoshii* TGT.

Weiterhin liegt die *A. fulgidus* TGT im Gegensatz zur dimeren *P. horikoshii* TGT in Lösung als Monomer vor. Die Homologiemodelle der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT zeigen, dass die C-Termini überwiegend aus der Domäne C1 der *P. horikoshii* TGT bestehen. In Teilbereichen kann das Strukturmotiv der C-terminalen Domäne der beiden Enzyme nicht vorhergesagt werden. Die Domäne C2 und C3, die in der *P. horikoshii* TGT an den Akzeptorstamm der tRNA bindet und die λ-Form der tRNA stabilisiert, sind in den anderen beiden TGT-Enzymen nur rudimentär vorhanden. Dadurch kann keine Vorhersage über den Bindungsmodus der tRNA an die *A. fulgidus* bzw. *A. pernix* TGT abgeleitet werden. Auch in der Tertiärstruktur ihrer C-terminalen Domänen müssen sie sich teilweise signifikant von der *P. horikoshii* TGT unterscheiden.

Deshalb sollten weitere Versuche unternommen werden, die Kristallstruktur der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT, auch im Komplex mit tRNA, aufzuklären. Das Reinigungsprotokoll für die *A. fulgidus* TGT wurde bereits etabliert und liefert reines Protein in hoher Ausbeute. Dadurch könnten weitere Kristallisationsversuche in einem *high-throughput Screening* getestet werden. Dabei sollte auch die Kokristallisation mit dem Substrat $preQ_0$ und tRNA erfolgen. Weiterhin könnte in einem radioaktiven *assay*, analog zur *Z. mobilis* TGT [Curnow et al., 1993] oder *P. horikoshii* TGT [Watanabe et al., 2001], nicht nur die Aktivität der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT bestimmt werden, sondern auch ihre Stabilität unter hohen Temperaturen getestet werden. Besonders für die *A. pernix* TGT wäre eine Aktivitätsmessung sinnvoll, um zu klären, ob dieses Enzym im *E. coli* Expressionsstamm richtig gefaltet wird.

Die Kristallstrukturen der *A. fulgidus*, *A. pernix* und *P. horikoshii* TGT könnten interessante Erkenntnisse über die strukturellen Eigenheiten dieser Enzyme im Bereich der C-terminalen Domäne erhalten werden. Die Aufklärung der Tertiärstruktur mehrerer TGT-Enzyme aus der Domäne Archaea könnte einen ersten Hinweise liefern, warum sie die gleiche katalytische Funktion besitzen, jedoch unterschiedliche Strukturmotive aufweisen.

4.4 Material und Methoden

Die DNA-Primer für die Klonierung und Mutagenese wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Zur Plasmid-Präparation wurden die *Kits* von Qiagen (Hilden) verwendet. Die Restriktionsendonucleasen wurden von New England Biolabs (Frankfurt) und das Enzym *Dpn* I von Stratagene geliefert. Die meisten Enzyme und Materialien für die Klonierung und Mutagenese wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Die Vektoren stammten von Novagen (Schwalbach), Amersham Pharmacia Biosciences (Uppsala, Schweden) und New England Biolabs (Frankfurt). Von den Firmen Stratagene und Novagen wurden die Bakterienstämme bezogen. Für alle weiteren Reagenzien gelten die in Kapitel 2.4 und 3.4 aufgeführten Angaben.

4.4.1 Biochemische Methoden

Für den Umgang mit Nukleinsäuren wurden die verwendeten Reagenzien und Gebrauchsmaterialen autoklaviert (30 min, 121°C, 1,3 bar), um eventuell vorhandene Nukleasen zu inaktivieren. Glasgeräte wurden mit trockener Hitze (3 h, 200°C) sterilisiert.

4.4.1.1 Amplifikation von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA mittels PCR

Die kodierenden Sequenzen der Zielgene wurden durch PCR (*polymerase chain reaction*) aus chromosomaler DNA oder Plasmid-DNA isoliert und amplifiziert [Saiki et al., 1988]. Für jeden PCR-Ansatz werden zwei Oligonukleotide (Primer) benötigt, deren Nukleotidsequenz zu der zu isolierenden Sequenz des Zielgens komplementär ist und die spezifische Erkennungssequenz für den Verdau mit Restriktionsendonukleasen beinhaltet.

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50 µl:

Templat-DNA	1 µl
Puffer (10-fach)	5 µl
Primer *forward*	1 µl
Primer *backward*	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
DNA-Polymerase	1 µl
aqua bidest.	40 µl

Die Endkonzentration der chromosomalen DNA im PCR-Ansatz betrug zwischen 100 ng und 700 ng, während der Gehalt der Plasmid-DNA in einem Bereich von 5 bis 30 ng variiert wurde. Da die chromosomale DNA durch häufiges Auftauen und Einfrieren leicht degradiert, wurden Aliquots von wenigen µl bei -20°C gelagert. Für die PCR wurde eine Primerkonzentration von 100 pmol/µl eingesetzt. Für die Amplifikation der DNA wurde die *Pfu*- und die *Taq*-Polymerase in einem Mischungsverhältnis 1:10 verwendet.
Im Thermocycler (Biozym MiniCycler™) wurde die Templat-DNA nach dem folgenden Protokoll amplifiziert:

5 min - 93°C
1 min - 93°C
1 min - 45 bis 55°C } 25 Zyklen
3 min - 68°C
5 min - 68°C

Die DNA-Stränge wurden durch Hitzedenaturierung bei 93°C in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Die Primer lagerten sich bei einer Temperatur im Bereich von 45°C bis 55°C an ihre Zielsequenz in der Templat-DNA an. Die spezifische Erkennung der zur Primersequenz komplementären DNA-Stränge nimmt mit steigender Temperatur zu. Deshalb wurde bei einer erfolglosen DNA-Replikation die *annealing*-Temperatur im nächsten Reaktionsansatz gesenkt. Die hitzestabilen DNA-Polymerasen initiieren bei einer Temperatur von 68°C die DNA-Amplifikation. Die *Pfu*-Polymerase besitzt eine *proofreading*-Aktivität, wodurch die Wahrscheinlichkeit für die Einführung falscher Basen während der Amplifikation signifikant reduziert wird. Die Hitzedenaturierung, die Anlagerung der Primer und die Amplifikation erfolgte in mehreren Zyklen.
Nach erfolgreicher Amplifikation wurde der PCR-Ansatz mit Hilfe des *PCR-Purification Kit* (Qiagen) gereinigt. Die Lösung wurde über Anionenaustauschersäulen gegeben, die im PCR-Ansatz vorhandenen Primer, Nukleotide, Polymerasen und Salze durch mehrere Waschschritte entfernt und die DNA mit 50 µl Wasser pH 8,0 (aqua bidest.) eluiert.

4.4.1.2 Mutagenese mittels PCR

Mit Hilfe der PCR können nicht nur Gensequenzen amplifiziert, sondern auch Mutationen in die Zielsequenz eingeführt werden. Durch Deletion wurde ein Teil der kodierenden Sequenz des Zielgens im Überexpressionsvektor entfernt. Dabei wurden die Reagenzien und das beigefügte Protokoll aus dem QuickChange™ *site-directed mutagenesis Kit* (Stratagen) verwendet. Für dieses Verfahren werden zwei Primer mit einer Schmelztemperatur von jeweils 78°C benötigt, die in ihrer Basensequenz zueinander komplementär sind und die

Zielmutation beinhalten. Prinzipiell verläuft der Vorgang der DNA-Replikation analog zu dem in Kapitel 4.4.1.1 beschriebenen Verfahren. Durch Anlagerung der synthetischen Mutantenprimer an die Templat-DNA und Amplifikation der Plasmid-DNA wird die neu synthetisierte DNA erzeugt.

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50 µl:

Templat-DNA	1 µl
Puffer (10-fach)	5 µl
Primer *forward*	1 µl
Primer *backward*	1 µl
dNTPs (100 mM)	1 µl
Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl
aqua bidest.	40 µl

Die Templat-DNA wurde in einer Konzentration von 1 bis 20 ng eingesetzt. Die Primerkonzentration wurde auf 5 pmol/µl verdünnt.
Im Thermocycler (Biozym MiniCycler™) wurde die Templat-DNA nach dem folgenden Schema amplifiziert:

0,5 min - 95°C
0,5 min - 95°C
1 min - 55°C } 18 Zyklen
14 min - 72°C
5 min - 72°C

Bei erfolgreicher DNA-Replikation konnte im Agarosegel unter UV-Licht bei 280 nm eine breite Vektorbande detektiert werden. Die Plasmid-DNA aus dem PCR-Ansatz wurde nach dem Protokoll aus dem *PCR-Purification Kit* (Qiagen) gereinigt. Der Ausgangsstrang, der im Gegensatz zu den neu synthetisierten DNA-Plasmiden methyliert ist, wurde anschließend durch die Endonuklease *Dpn* I für 1 Stunde bei 37°C verdaut. Das Plasmid wurde in den Klonierungsstamm XL2-Blue (Stratagene) transformiert (Kapitel 4.4.1.7) und eine Minipräparation angefertigt (Kapitel 4.4.1.8). Der Erfolg der Mutagenese wurde durch DNA-Sequenzierung (Kapitel 4.4.1.10) überprüft.

4.4.1.3 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonucleasen

Um die Zielsequenz in einen Überexpressionsvektor integrieren zu können, wurden das Zielgen und der Vektor mit zwei verschiedenen Restriktionsendonucleasen verdaut. Diese

Enzyme erkennen spezifisch eine palindrome Gensequenz, die aus 4 - 8 Nukleotiden besteht. Durch die Spaltung der DNA entstehen häufig einzelsträngige 3´- und 5´-überhängende Enden.
Die DNA und der Vektor wurden getrennt bei 37°C für mindestens 4 h in einem Volumen von 15 µl mit Restriktionsenzymen behandelt:

DNA oder Vektor	x µl
Puffer des Restriktionsenzyms (10-fach)	1,5 µl
Restriktionsenzym I (20 U/µl)	1 µl
Restriktionsenzym II (20 U/µl)	1 µl
BSA (10-fach)	1,5 µl
aqua bidest.	15 – x µl

4.4.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden mit 25 % (v/v) Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 40 % Saccharose) versetzt und in die geformten Taschen im 1 %igen Agarosegel in TAE-Puffer (2 M Tris, 1 M Essigsäure und 0,1 M EDTA) eingefüllt [Sambrook et al., 1989]. Die entstandenen Fragmente aus dem Verdau wurden bei einer Spannung von 80 V elektrophoretisch voneinander getrennt. Bei präparativen Gelen wurde ein spezieller TAE-Puffer (MWG-Biotech, Ebersberg) verwendet, der einen Lichtschutzfaktor enthält, um die DNA bei der Detektion gegen die schädliche UV-Strahlung zu schützen. Nach Färben des Gels in Ethidiumbromid wurden die DNA-Banden unter der UV-Lampe sichtbar und die Fragmente mit der passenden Grösse bei einem UV-Licht von 360 nm ausgeschnitten. Die Größe der Fragmente konnte durch Vergleich mit den bekannten Fragmentgrößen der gespaltenen Lambda-DNA (Promega, Mannheim), die mit der Restriktionsendonuklease *Hind* III behandelt wurde, abgeschätzt werden. Die DNA wurde aus dem Gel mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) isoliert. Das Gel wurde in einem Hochsalzpuffer bei 50°C aufgelöst und mit Isopropanol versetzt. Die DNA wurde an Anionenaustauschersäulen gebunden, mit verschiedenen Puffern gewaschen und mit 50 µl Wasser pH 8,0 (aqua bidest.) eluiert.

4.4.1.5 Ligation

Die Verknüpfung des Zielgens mit dem Vektor erfolgte in einem molaren Verhältnis 1:1 bis 5:1 mit Hilfe der ATP-abhängigen T4-DNA-Ligase (New England Biolabs). In einem 40 µl Reaktionsansatz wurden die DNA-Fragmente mit 4 µl Ligasepuffer (10-fach) und 1 µl DNA-

Ligase versetzt und das fehlende Volumen durch Zugabe von Wasser (aqua bidest.) aufgefüllt. Das Gemisch wurde über Nacht bei 12°C im Schüttler bei 300 U/min inkubiert. Der Ansatz wurde vor der Transformation in *E. coli* Bakterien mindestens 48 h bei 4°C gelagert.

4.4.1.6 Kulturmedien

Die Transformation und rekombinante Expression erfolgte in Luria-Bertani-Medium:

Luria-Bertani-Medium: 10 g/l Bacto-Pepton
5 g/l Hefe-Extrakt
10 g/l NaCl

Zur Herstellung der festen Nährböden wurde dem Kulturmedium 20 g/l Agar zugegeben. Die Lösungen wurden im Autoklaven sterilisiert (30 min, 121°C, 1,3 bar).
In Abhängigkeit von dem verwendeten Bakterienstamm und Plasmid wurden die Nährböden und das Kulturmedium mit Antibiotika versetzt. Dazu wurden Antibiotika-Stammlösungen hergestellt, mit einem Filter von 0,22 µm Porengrösse sterilfiltriert und dem Nährmedium die geeigneten Antibiotika in einer Verdünnung von 1:1000 zugegeben.

Stammlösungen: Kanamycin: 50 mg/ml in aqua bidest.
Ampicillin: 100 mg/ml in aqua bidest.
Chloramphenicol: 50 mg/ml in 100 % Ethanol

4.4.1.7 Transformation

Ungefähr 20 ng Plasmid-DNA wurde in den *E. coli* Bakterienstamm XL2-Blue in einem Volumen von 20 - 100 µl transformiert [Sambrook et al., 1989]. Die Bakteriensuspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Dabei lagerte sich die Plasmid-DNA an die Bakterienzellwand an. Durch Hitzeschock bei 42°C für 35 s wurde die DNA in die Zellen transferiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 200 µl antibiotikafreiem Kulturmedium wurden die Zellen für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde auf Selektions-Agar-Platten mit Antibiotika, gegen die der Bakterienstamm resistent war, ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

4.4.1.8 Minipräparation der Plasmid-DNA

Die auf den Agarplatten gewachsenen Klone wurden in 5 ml LB-Medium, das die in der Transformation verwendeten Antibiotika enthielt, überführt und bei 37°C und 250 U/min über Nacht geschüttelt.
Die Isolation und Präparation der Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen erfolgte mit Hilfe des *QIAprep Miniprep Kit* (Qiagen) anhand des beigefügten Protokolls. Die Zellen wurden in RNase-haltiger Lösung resuspendiert und alkalisch lysiert. Die Proteine und die chromosomale DNA präzipitierten durch Neutralisation der alkalischen Lösung mit einem Hochsalzpuffer. Nach Zentrifugation (Eppendorf 5415C, 10 min, 14000 U/min) wurde die im Überstand befindliche Plasmid-DNA an kleine Anionenaustauschersäulen gebunden und durch mehrere Waschschritte von Nukleasen, Salzen und anderen Verunreinigungen befreit. Die Elution erfolgte mit 50 µl Wasser (aqua bidest.) bei einem pH-Wert von 8,0. Die Lösung der Plasmid-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.
Die isolierte und gereinigte Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen behandelt, um zu überprüfen, ob das Zielgen erfolgreich in den Vektor kloniert wurde. Nach dem Verdau von etwa 500 ng Plasmid-DNA erfolgte analog zu der in Kapitel 4.4.1.4 beschriebenen Methode die elektrophoretische Auftrennung über ein 1 %iges Agarosegel bei einer konstanten Spannung von 100 V über einen Zeitraum von 1,5 h. Nach Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA waren die DNA-Fragmente unter dem UV-Licht bei 280 nm sichtbar. Die Größe der Fragmente wurde mit Hilfe der bekannten Fragmentgrößen der gespaltenen Lambda-DNA abgeschätzt.

4.4.1.9 Maxipräparation der Plasmid-DNA

Mehrere µg Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des *QIAprep Maxiprep Kit* aus den *E. coli* Zellen isoliert. Nach der Transformation (Kapitel 4.4.1.7) wurde der Bakterienstamm, der die gewünschte Plasmid-DNA enthielt, in einer Übernachtkultur mit Antibiotika angezogen. Anschließend wurden die Bakterien in 100 ml Kulturmedium für 12 h unter Schütteln bei 300 U/min inkubiert. Die Bakterienzellen wurden abzentrifugiert (Heraeus Minifuge 2, 15 min, 4000 U/min, 4°C) und im RNase-haltigen Puffer resuspendiert. Die Zellwand wurde durch alkalische Lyse aufgebrochen. Nach Neutralisation und Inkubation auf Eis für 20 min wurden die denaturierten Bestandteile durch Zentrifugation (Beckmann JA-25,50-Rotor, 45 min, 12000 U/min, 4°C) abgetrennt. Die mit Puffer äquilibrierte Anionenaustauschersäule wurde mit dem Überstand beladen, gewaschen und die DNA eluiert. Durch Zugabe von Isopropanol präzipitierte die DNA, die nach Zentrifugation (Eppendorf 5415C, 30 min, 14000 U/min, 4°C) vom Überstand vorsichtig abgetrennt wurde. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol

gewaschen und erneut durch Zentrifugation präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in Wasser (aqua bidest.) gelöst.

4.4.1.10 DNA-Sequenzierung

Durch DNA-Sequenzierung wurde überprüft, ob das klonierte Zielgen unerwünschte Mutationen aufwies und ob die Mutagenese erfolgreich war. Die Sequenzierung wurde von Genterprise (Mainz) oder von MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt.

4.4.1.11 Gehaltsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch (Bio-Rad SmartSpec™ 3000) bei 260 nm und 280 nm nach der empirischen Formel für doppelsträngige DNA [Sambrook et al., 1989]:

DNA (µg/ml) = A_{260} x 50 µg/ml x Verdünnungsfaktor

Aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm, der einen Wert > 1,8 aufweisen sollte, wurde die Reinheit der DNA-Präparation ermittelt.

4.4.1.12 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden mit Hilfe der eindimensionalen SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt [Lämmli, 1970; Sambrook et al., 1989]. Die Proteinlösung wurde mit dem Protein-Ladepuffer im Verhältnis 1:1 gemischt, bei 100°C für 5 min denaturiert und in die Taschen des 15 %igen SDS-Gels eingefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung im Lämmli-Puffer erfolgte im Sammelgel bei einer Spannung von 80 V, zur Auftrennung der Proteine im Trenngel wurde die Spannung auf maximal 160 V erhöht. Als Standard-Marker diente ein definiertes Gemisch aus Proteinen mit einer Größe zwischen 14 kDa und 66 kDa (Sigma-Aldrich, Seelze). Zur Detektion der Proteinbanden wurde das SDS-Gel mindestens 15 min in Coomassie-Lösung getränkt und anschließend mit der Entfärbelösung solange entfärbt, bis sich die Proteinbanden gut vom Hintergrund abhoben.

Sammelgel (10 %ig): 2,1 ml 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamidlösung; 1,55 ml 1,5 M Tris pH 8,8; 0,45 ml aqua bidest.; 30 µl 10 % (v/v) SDS; 30 µl 10 % Ammoniumpersulfat; 2 µl TEMED

Trenngel (15 %ig):	0,44 ml 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamidlösung; 0,4 ml 0,5 M Tris pH 6,8; 1,2 ml aqua bidest.; 25 µl 10 % Ammoniumpersulfat; 1,5 µl TEMED
Protein-Ladepuffer:	50 mM Tris pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin; 100 mM DTT; 20 µg/ml Bromphenolblau
Lämmli-Puffer:	250 mM Tris; 2,5 M Glycin; 1 % (w/v) SDS
Färbelösung:	40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,1 % (w/v) Coomassie™ Brilliant Blue R250
Entfärbelösung:	50 % (v/v) Methanol; 12 % (v/v) Essigsäure

4.4.1.13 Silberfärbung von Proteingelen

Zur Detektion von schwachen Banden wurden die Proteingele mit einer Silberlösung angefärbt [Merril et al., 1981]. Das SDS-Gel wurde mindestens 60 min in den Fixierer gelegt. Nach zweimaligem Waschen zuerst mit 50 %igem Ethanol, dann mit 30 %igem Ethanol wurde das Proteingel 60 s mit der Reduktionslösung behandelt. Diese Lösung wurde durch dreimaliges Waschen in aqua bidest. für je 20 s entfernt und anschließend in der Silberlösung über einen Zeitraum von 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschen mit aqua bidest. wurden die Proteinbanden im Entwickler sichtbar gemacht. Der Entwicklungsprozess wurde durch Zugabe von Entfärbelösung (Kapitel 4.4.1.12) gestoppt.

Fixierer:	50 % (v/v) Methanol; 12 % (v/v) Essigsäure
Reduktionslösung:	0,8 mM $Na_2S_2O_3$
Silberlösung:	0,2 % $AgNO_3$; 0,026 % CH_2O
Entwickler:	0,6 % Na_2CO_3; 0,0185 % CH_2O; 16 µM $Na_2S_2O_3$

4.4.2 Klonierung der archaebakteriellen *tgt*-Gene

Die chromosomale DNA der Archaebakterien *Archaeglobus fulgidus*, *Aeropyrum pernix* und *Pyrococcus horikoshii* wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

4.4.2.1 Primer

Die archaebakteriellen *tgt*-Gene wurden mittels PCR (Kapitel 4.4.1.1) aus der chromosomalen DNA der verschiedenen Organismen isoliert. Dazu wurden folgende Primer verwendet:

A. fulgidus TGT *forward*	5´- GGC CAT ATG CAG AGG TTC GAG ATT CTC GAT AAG -3´
A. fulgidus TGT *backward*	5´- GGC GTC GAC TTA GGA TAC AAC ATT CAG CTC ACC GTT -3´
A. pernix TGT *forward*	5´- GGC CAT ATG TTT GAG ATT AGG GAT GTC GAT CTG -3´
A. pernix TGT *backward*	5´- GGC GTC GAC TTA GGA TAC AAC ATT CAG CTC ACC GTT -3´
P. horikoshii TGT *forward*	5´- GGC CAT ATG AGC CGG GGT GAT AAA ATG CTC -3´
P. horikoshii TGT *backward*	5´- GGC GTC GAC TTA CTC AAC ACC TTT CCT TAC CTT GAC -3´

Die für die C-terminalen Domänen der TGT-Enzyme kodierenden DNA-Abschnitte aus den verschiedenen Organismen wurden mittels PCR (Kapitel 4.4.1.1) amplifiziert. Als DNA-Templat diente jeweils das komplette *tgt*-Gen, das im Überexpressionsplasmid pET21a enthalten war. Im Reaktionsansatz wurde der *forward*-Primer (C-terminus) mit dem *backward*-Primer, der zur Amplifikation des *tgt*-Gens verwendet wurde, kombiniert.

A. fulgidus TGT *forward* C-terminus	5´- GGC CAT ATG AAC ATG CTG GCT GGA TGG AGG CAG GGT -3´
A. pernix TGT *forward* C-terminus	5´- GGC CAT ATG TCA ACG GCG AGG GTT ATG GCC AGG ATG -3´

Die unterstrichene Nukleotidsequenz kennzeichnet die palindrome Erkennungssequenz der Restriktionsendonukleasen. Die doppelsträngige DNA wird im Bereich des *forward*-Primers von der Endonuklease *Nde* I und im Bereich des *backward*-Primers von *Sal* I gespalten.

Die N-terminale Domäne der *A. fulgidus* TGT mit einer Größe von 42 kDa wurde durch Mutagenese (Kapitel 4.4.1.2) erhalten. Als DNA-Templat diente die kodierende Gensequenz der *A. fulgidus* TGT im Vektor pET21a. Der für den C-terminalen Bereich kodierende Abschnitt des *tgt*-Gens wurde mit Hilfe von zwei synthetischen Primern entfernt.

A. fulgidus TGT *forward* N-terminus	5´- GAA AAG GCT GAC CCC AAA TGA GTC GAC AAG CTT GCG GCC -3´
A. fulgidus TGT *backward* N-terminus	5´- GGC CGC AAG CTT GTC GAC TCA TTT GGG GTC AGC CTT TTC -3´

4.4.2.2 Plasmide

Die kodierenden Gensequenzen der TGT-Enzyme und der C-terminalen Domänen wurden in die Vektoren pTYB12 (New England BioLabs) , pET21a (Novagen), pET28b (Novagen) und einem modifizierten pGEX-6P-1-Vektor (Amersham Pharmacia Biosciences) integriert (für nähere Informationen zu diesen Plasmiden: s. Anhang C und entsprechende Protokolle der Hersteller). Das Zielgen wurde zwischen die Erkennungssequenz der Endonuklease *Nde* I im N-terminalen Bereich, die das natürliche Startkodon ATG enthält und *Sal* I in der C-terminalen Region eingeführt. Durch die Verwendung des *backward*-Primers während der PCR befindet sich in den *tgt*-Genen am C-Terminus das Stoppkodon TAA.
Der kommerziell erhältliche pGEX-6P-1-Vektor wurde von Dr. Clemens Grimm modifiziert [Grimm, 2000b]. Durch die Einführung der spezifischen Erkennungssequenz *Nde* I, die normalerweise in diesem Vektor nicht vorhanden ist, konnte das Zielgen aus anderen Vektoren herausgeschnitten und in den Expressionsvektor integriert werden. Weiterhin ist in der Schnittstelle *Nde* I das Startkodon ATG enthalten. Nach der Expression des Proteins ist am N-Terminus die Glutathion-S-Transferase (GST) gebunden. Nach der Abspaltung des *tag* sind am Zielprotein nur drei zusätzliche Aminosäurenreste vorhanden.
Alle Plasmide wurden in den *E. coli* Klonierungsstamm XL2-Blue (Stratagene) transformiert. Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen angesetzt und bei -80°C gelagert.

4.4.2.3 Bakterienstämme

Die Plasmide mit den kodierenden Gensequenzen der *A. fulgidus* und *A. pernix tgt*-Gene wurden in den *E. coli* Stamm BL21(DE3)CodonPlus-PR transformiert. Für die Plasmide mit dem *P. horikoshii tgt*-Gen wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3)CodonPlus-RIL (Stratagene) verwendet. Außerdem erfolgte die Produktion der archaebakteriellen TGT auch im *E. coli* Stamm Rosetta^{TM}(DE3)LysS (Novagen). Alle Bakterienstämme sind gegen das Antibiotikum Chloramphenicol resistent.
Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen angesetzt und bei -80°C gelagert.

4.4.3 Reinigung der archaebakteriellen TGT

4.4.3.1 Präparation der *A. fulgidus* TGT

Für die *A. fulgidus* TGT wurde ein neues Reinigungsprotokoll etabliert. Die Expression des *A. fulgidus tgt*-Gens, das in den Überexpressionsvektor pET21a einkloniert wurde, erfolgte im *E. coli* Stamm BL21(DE3)CodonPlus-PR. Der Bakterienstamm wurde in einer Vorkultur bei Anwesenheit der Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol über Nacht bei 37°C angezogen. Die Zellsuspension wurde in einer 1:500-Verdünnung in 6,5 l des gleichen Mediums überführt und die Hauptkultur bei 37°C und 250 U/min geschüttelt. Bei einer optischen Dichte von 0,8 bei 600 nm wurde die Genexpression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach einer Inkubationsperiode von 20 h bei 15°C wurden die Zellen durch Zentrifugation (Beckmann JA-10-Rotor, 10 min, 4000 U/min, 4°C) gesammelt und bei -20°C tiefgefroren.
Nach dem Auftauen des Zellpellets wurden die Bakterien in 40 ml Pufferlösung, bestehend aus 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT und 2 ml Protease-Inhibitor-Stammlösung (1 Tablette Complete™ (EDTA-frei) in 2 ml Wasser) resuspendiert. Die Zellwand wurde an der *French Press* (Aminco French Press Cell Press, Maryland) durch Druck von maximal 1240 psi zum Platzen gebracht. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (Beckmann JA-25,50-Rotor, 60 min, 25000 U/min, 4°C) vom löslichen Rohextrakt abgetrennt und verworfen.

Für die Reinigung wurden folgende Puffer verwendet:

Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM DTT
Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 M NaCl, 1 mM DTT
Puffer C: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM DTT
Puffer D: 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM DTT

Im ersten Reinigungsschritt wurde der Rohextrakt für 5 min auf 70°C erhitzt. Die TGT des hyperthermophilen Archaebakteriums blieb dabei weitgehend in Lösung. Die denaturierten Proteine wurden abgetrennt und der Überstand über Nacht bei 4°C gegen das 200-fache Volumen Puffer A dialysiert. Die chromatographische Aufreinigung erfolgte an einer FPLC-Anlage (Äkta™, Amersham Pharmacia Biosciences). Die mit Puffer A äquilibrierte Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose, XK26) wurde mit der TGT-haltigen Lösung beladen. Nach dem Waschen wurde die TGT in einem dreistufigen Gradienten gegen Puffer B mit einer Flussrate von 3 ml/min bei ungefähr 400 mM NaCl von der Säule eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten TGT-Konzentration wurden vereinigt und mit NaCl versetzt bis

eine Endkonzentration von 1 M erreicht war. Die anschließende Reinigung über die mit Puffer B äquilibrierte Hydrophobe Säule (Phenyl-Sepharose, XK16) erfolgte mit einem linearen Gradienten gegen Puffer C, wobei die TGT erst bei 0 M NaCl von der Säule eluierte. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde mit einem SDS-Gel kontrolliert. Die Proteinlösung wurde mit Centricon YM 30 auf ein Volumen von weniger als 5 ml ankonzentriert und auf die Gelfiltrationssäule (HiLoad 26/60 Superdex 75 prep) aufgetragen. Die Trennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte mit dem Puffer A bei einer Flussrate von 0,8 ml/min. Die TGT wurde nach einem Volumen von 190 ml Puffer A von der Säule eluiert. Nach diesem Reinigungsschritt war auf dem SDS-Gel noch eine deutlich sichtbare Verunreinigung bei einer Grösse von 42 kDa vorhanden, die mit Hilfe eines weiteren Anionenaustauschers, der MonoQ-Säule (1 ml Säulenvolumen) weitgehend entfernt werden konnte. Die Proteinlösung wurde in drei Teile geteilt und einzeln über die mit Puffer A äquilibrierte Säule gereinigt, um ein Überladen der Säule zu vermeiden. Nach dem Auftragen wurde die TGT mit einem linearen Gradienten gegen Puffer B und einer Flussrate von 1 ml/min bei 400 mM NaCl von der Säule eluiert. Die Proteinlösung wurde zweimal gegen das 100-fache Volumen Puffer D dialysiert und anschließend mit Centricon YM 30 auf mindestens 12 mg/ml ankonzentriert.
Für die Gehaltsbestimmung wurde die Methode der UV-VIS-Spektroskopie (Bio-Rad SmartSpec™ 3000) gewählt, wobei die Absorption bei 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen wurde.
Die Berechnung der Konzentration der TGT erfolgte nach der empirischen Formel [Bio-Rad]:

$$\text{Protein (mg/ml)} = 1{,}55 \times (A_{280} - A_{320}) - 0{,}76 \times (A_{260} - A_{320})$$

Die Ausbeute betrug ungefähr 2 mg *A. fuldigus* TGT pro Liter Kultur.

4.4.3.2 Präparation der N-terminalen Domäne der *A. fulgidus* TGT

Die kodierende Gensequenz der N-terminalen Domäne der *A. fulgidus* TGT, die im Vektor pET21a beinhaltet war, wurde in den Bakterienstamm Rosetta™(DE3)pLysS transformiert. Die Expression erfolgte analog zu dem Verfahren in Kapitel 4.4.3.1. Die Zellen wurden in dem folgenden Puffer resuspendiert: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT und 2 ml Protease-Inhibitor-Stammlösung (1 Tablette Complete™ (EDTA-frei) in 2 ml Wasser). Anschließend wurden sie mit Ultraschall (Branson Sonifier 250, 6 x 30 s, *duty cycle*: 70 %, *output control*: 4) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (Beckmann JA-25,50-Rotor, 60 min, 25000 U/min, 4°C) wurde das Zellpellet verworfen und der Rohextrakt für die Reinigung verwendet.

Für die Proteinreinigung mittels Säulenchromatographie wurden folgende Puffer benötigt:

Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM DTT
Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 M NaCl, 1 mM DTT
Puffer C: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 M $(NH_4)_2SO_4$, 1 mM DTT
Puffer D: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM DTT
Puffer E: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 1 mM DTT

Unter Verwendung der Säulenchromatographie wurde das 42 kDa große Protein in vier Trennschritten an einer FPLC-Anlage (Äkta™, Amersham Pharmacia Biosciences) aufgereinigt. Der Rohextrakt wurde in zwei gleich große Volumina geteilt und einzeln auf die mit Puffer A äquilibrierte Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose, XK26) aufgetragen. Die Elution der TGT erfolgte in einem dreistufigen Gradienten gegen Puffer B bei einer NaCl-Konzentration von 420 mM. Die Flussrate betrug dabei 3 ml/min. Die saubersten TGT-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und mit $(NH_4)_2SO_4$ bis zu einer Endkonzentration von 1 M versetzt. Für den zweiten Reinigungsschritt wurde die mit Puffer C äquilibrierte Hydrophobe Säule (Phenyl-Sepharose, XK16) verwendet. Nach dem Auftragen der Proteinlösung und dem Waschen wurde die TGT mit einem linearen Gradienten gegen Puffer D und einer Flussrate von 3 ml/min bei etwa 500 mM $(NH_4)_2SO_4$ von der Säule eluiert. Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die vereinigten Fraktionen über Centricon YM 30 auf ein Volumen von weniger als 5 ml ankonzentriert und auf die Gelfiltrationssäule (HiLoad 26/60 Superdex 75 prep) aufgetragen, die vorher mit Puffer E gespült worden war. Die TGT wurde bei einem Volumen von 180 ml Puffer E von der Säule eluiert. Anschließend wurde die Proteinlösung nochmal mit der Phenyl-Sepharose analog zu dem im zweiten Schritt beschriebenen Verfahren gereinigt und die Fraktionen im Proteingel untersucht. Die Proteinlösung wurde in zwei Schritten gegen das 100-fache Volumen Puffer E dialysiert und mit Centricon YM 30 auf eine Proteinkonzentration von etwa 15 mg/ml ankonzentriert.
Die Konzentration der 42 kDa großen N-terminalen Domäne der *A. fulgidus* TGT wurde nach dem gleichen Verfahren wie in Kapitel 4.4.3.1 bestimmt. Aus 1 l Zellkultur konnten 10 mg reines Protein gewonnen werden.

4.4.3.3 Präparation der C-terminalen Domänen der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT

Für die Produktion der C-terminalen Domänen der *A. fulgidus* und *A. pernix* TGT wurde als Expressionssystem der modifizierte pGEX-6P-1-Vektor gewählt. Die rekombinante Plasmid-DNA wurde in Rosetta™(DE3)pLysS transformiert und das Fusionsprotein nach der gleichen Methode wie in Kapitel 4.4.3.1 aus einem Volumen von 9 l Zellkultur gewonnen. Das Fragment der TGT wurde in folgender Lösung resuspendiert: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 400

mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT und 2 ml Protease-Inhibitor-Stammlösung (1 Tablette Complete™ (EDTA-frei) in 2 ml Wasser). Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit Ultraschall (Branson Sonifier 250, 6 x 30 s, *duty cycle*: 70 %, *output control*: 4) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (Beckmann JA-25,50-Rotor, 60 min, 25000 U/min, 4°C) wurde der Überstand für die weitere Aufreinigung verwendet.

Für die Proteinreinigung wurden folgende Puffer verwendet:

Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 M NaCl, 1 mM DTT
Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM DTT
Puffer C: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 1 mM DTT
Puffer D: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM DTT
Puffer E: 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM DTT

Dem Rohextrakt wurde NaCl zugegeben, bis eine Konzentration von 1 M NaCl erreicht war. Danach wurde der Rohextrakt über die Hydrophobe Säule (Phenyl-Sepharose, XK16), die zuvor mit Puffer A gespült wurde, gereinigt. Das Protein wurde mit einem linearen Gradienten gegen Puffer B erst bei 0 M NaCl von der Säule eluiert. Teilweise wurde das Protein erst beim Spülen mit Wasser eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten Konzentration wurden über Centricon YM 10 auf ein Volumen von weniger als 5 ml ankonzentriert. Die Proteinlösung wurde anschließend auf der mit Puffer C äquilibrierten Gelfitrationssäule (HiLoad 26/60 Superdex 75 prep) bei einer Flussrate von 0,6 ml/min getrennt. Die Fraktionen mit den geringsten Verunreinigungen wurden vereinigt. Das Fusionsprotein wurde durch Zugabe von PreScission-Protease™ bei 4°C über Nacht gespalten. Die Proteinlösung, welche die TGT-Domäne enthielt, wurde gegen das 200-fache Volumen Puffer D in einem Dialyseschlauch mit einem *cutoff* von 6000 Da (Roth) dialysiert. Die Glutathion-S-Transferase und das nicht gespaltene Fusionsprotein wurden durch Reinigung der TGT-Domäne über die mit Puffer D äquilibrierte Kationenaustauschersäule (SP Sepharose, XK26) entfernt. Die Elution des TGT-Fragments erfolgte mit einem linearen Gradienten gegen Puffer A bei einer Flussrate von 2 ml/min. Nach SDS-Gelelektrophorese wurden die TGT-haltigen Fraktionen über Nacht bei 4°C im Dialyseschlauch (*cutoff* 6000 Da, Roth) zweimal gegen das 100-fache Volumen von Puffer E dialysiert. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte photometrisch (Bio-Rad SmartSpec™ 3000) bei 595 nm mit dem Bradford-Reagenz von Biorad. Aufgrund der geringen Ausbeute von weniger als 1 mg wurde auf das Ankonzentrieren der Proteinlösung und die anschließende Kristallisation der Domänen verzichtet.

4.4.4 Kristallisation der archaebakteriellen TGT

Alle Kristallisationsexperimente ohne Zusatz von RNA wurden sowohl bei 4°C als auch bei 22°C in einer 24-*well* Kristallisationsplatte (Hampton Research, USA) nach der Technik des sitzenden Tropfens durchgeführt. Dabei wurden die Vertiefungen mit jeweils 500 µl der Reservoirlösung befüllt. Je 2 µl der Reservoirlösung und 2 µl der Proteinlösung wurden auf dem schalenförmigen Einsatz über dem Reservoir vermischt. Die Tropfen wurden bei 22°C angesetzt und mit einem transparenten Klebeband (Hampton Research, USA) luftdicht versiegelt.

4.4.4.1 Kristallisation der *A. fulgidus* TGT

Die TGT aus dem Archaebakterium *A. fulgidus* wurde nicht für die Lagerung bei -20°C schockgefroren, sondern gleich nach der Reinigung für die Kristallisationsexperimente verwendet. Für erste Screeningversuche dienten die 196 Reservoirlösungen der kommerziell erhältlichen *Kits Crystal Screen*, *Crystal Screen II*, *Crystal Lite Screen* und *Natrix Screen* von Hampton Research, USA. Für diese Kristallisationsbedingungen wurde die Proteinlösung mit Dialysepuffer auf eine Konzentration von 12 mg/ml verdünnt. Für alle weiteren Kristallisationsversuche wurde eine Proteinkonzentration von 18 mg/ml eingesetzt. Weiterhin wurden die 24 Lösungen aus dem *JBScreen* Nr. 6 (Ammoniumsulfat-*Screen*), Nr. 9 (Alkohole und Salze als Präzipitanz) und Nr. 10 (Salze als Präzipitanz) sowie die Lösungen B4 - 6, C und D des *Screens* Nr. 8 (Alkohole als Präzipitanz) von Jena Biosciences hergestellt und getestet. Die Grundidee des *net charge Screens* basiert auf der Verwendung bestimmter Präzipitanzien in Abhängigkeit von der Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche [Bergfors, 1999]. Bei neutralen Pufferbedingungen (*zero net charge Screen*) wurden Polyethylenglykole mit unterschiedlichem Molekulargewicht als Präzipitanz in verschiedenen Konzentrationen zwischen 2,5 % und 30 % im Kristallisationsansatz verwendet. Jeweils 24 Reservoirlösungen mit Salz als Präzipitanz wurden bei pH 5,2 (*positiv net charge Screen*) und pH 9 (*negative net charge Screen*) angesetzt.

Für die Kokristallisation der *A. fulgidus* TGT mit RNA-Substrat wurden 48 Kristallisations-bedingungen bei jeweils 4°C und 22°C nach der Methode des hängenden Tropfens getestet. Dazu wurden die Reservoirlösungen aus dem speziell für den Einsatz von Nukleinsäuren konzipierten *Natrix Screen* (Hampton Research, USA) verwendet. Das hochreine und salzfreie Oligonukleotid wurde von der Firma Dharmacon Research, Inc. (Dallas, USA) bezogen. Vor dem Ansetzen der Kristallisationsplatten wurden die Deckgläschen mit AquaSil-Lösung in einer Verdünnung 1:100 (Hampton Research, USA) gewaschen, mit aqua bidest. gespült und bei 100°C getrocknet. Anschließend erfolgte die Sterilisation bei 180°C

im Trockenschrank über mehrere Stunden, um eventuell vorhandene RNasen zu entfernen. Die lyophilisierte RNA wurde in aqua bidest., das vorher im Autoklaven (30 min, 121°C, 1,3 bar) sterilisiert wurde, mit einer Konzentration von 6,51 mM gelöst und für 5 min bei 90°C erhitzt. Die RNA wurde mit der Proteinlösung in einem molaren Verhältnis von 1,5:1 gemischt und nach der Zugabe von $MgCl_2$ mit einer Endkonzentration von 5 mM für 5 min bei 30°C inkubiert. Die Proteinkonzentration betrug 12 mg/ml. In die Vertiefungen der Kristallisationsplatte wurden 500 µl Reservoirlösung gegeben. Auf dem sterilen, vorbehandelten Deckgläschen wurden 1 µl der Protein/RNA-Lösung mit 1 µl Reservoirlösung gemischt und auf den mit Silikonpaste eingefetteten Rand über dem Reservoir gesetzt.

4.4.4.2 Kristallisation der N-terminalen Domäne der *A. fulgidus* TGT

Die Proteinkonzentration wurde auf eine Konzentration von 15 mg/ml mit Dialysepuffer verdünnt. Für den Kristallisationsscreen wurden 196 verschiedenen Reservoirlösungen aus dem *Crystal Screen*, *Crystal Screen II*, *Crystal Lite Screen* und *Natrix Screen* (Hampton Research, USA) sowie dem *Crystallisation Basic Kit* (Sigma-Aldrich, Seelze) verwendet.

5 Die Domänen der S-Adenosylmethionin: tRNA-Ribosyltransferase/Isomerase

5.1 Das QueA-Enzym

5.1.1 Reaktionsmechanismus

Der Guaninbaustein des Guanosintriphosphats wird in eubakteriellen Organismen durch mehrere bislang nicht genauer charakterisierte Enzyme zur prämodifizierten Base $preQ_1$ umgesetzt (Kapitel 3.1.1.1) [Slany et al., 1994]. Anschließend wird $preQ_1$ durch die tRNA-Guanin Transglykosylase im Austausch gegen Guanin an Position 34 in die tRNA-Antikodonschleife eingebaut [Okada & Nishimura, 1979]. Der weitere Verlauf der Biosynthese verläuft auf Ebene der tRNA [Frey et al., 1988]. Die S-Adenosylmethionin: tRNA-Ribosyltransferase/Isomerase (QueA) katalysiert die Folgereaktion der tRNA-Guanin Transglykosylase, in dem sie ein aus S-Adenosylmethionin (SAM) stammendes Epoxycyclopentandiol auf das Stickstoffatom der exocyclischen Aminomethylgruppe des $preQ_1$ überträgt (Abb. 16). Dieses Protein ist bisher das einzig bekannte Enzym, das den Riboserest von SAM auf ein weiteres Substrat übertragen kann [Slany et al., 1993].
Durch NMR spektroskopische Untersuchungen mit [^{13}C]-SAM wurde folgender Reaktionsmechanismus postuliert (Abb. 40) [Kinzie et al., 2000]. Zuerst werden die Substrate tRNA-$preQ_1$ und SAM an das aktive Zentrum des QueA-Enzyms gebunden. Zu Beginn der Reaktion wird das Proton am 5´-Kohlenstoffatom des SAM auf eine basische Aminosäure übertragen. Das gebildete Schwefel-Ylid ist instabil (I). Deshalb kollabiert es zur Vinyl-Schwefel-Verbindung, wobei der Ribosering geöffnet und die Base Adenin abgespalten wird (II). Die Aminogruppe der tRNA-gebundenen Base $preQ_1$ greift nukleophil am 4´-Kohlenstoffatom in *trans*-Stellung zur 3´-Hydroxylgruppe des Diols (entspricht dem 1-Kohlenstoffatom im Nummerierungssystem des Epoxyqueuosins) an. Es entsteht erneut ein Schwefel-Ylid, das stereoselektiv am 1´-Kohlenstoffatom (entspricht dem 3-Kohlenstoffatom im Nummerierungssystem des Epoxyqueuosins) der Aldehydgruppe angreift (III). Dabei wird der Ribosering wieder geschlossen (IV). In einer intramolekularen S_N2-Reaktion greift das negativ geladene Sauerstoffatom am benachbarten Kohlenstoffatom an, gleichzeitig wird unter Abspaltung des Methionins das Epoxyqueuosin ausgebildet.

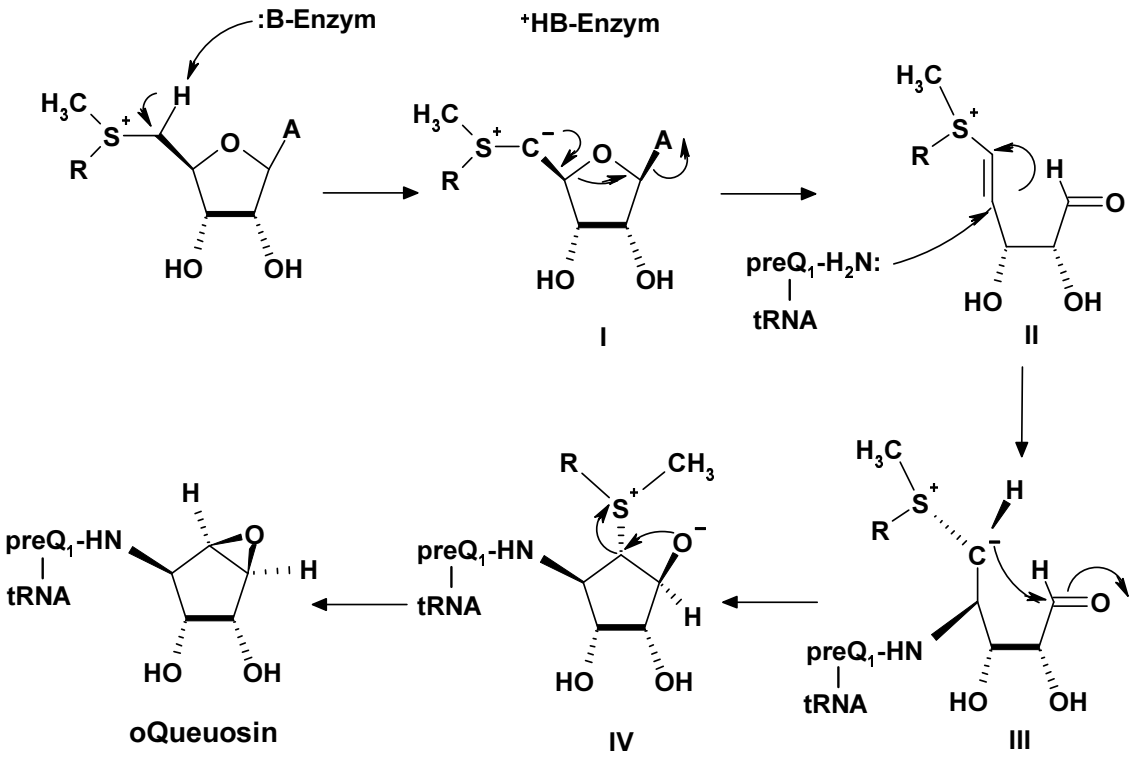


Abb. 40: Postulierter Reaktionsmechanismus des QueA-Enzyms.

Diese einzigartige und verhältnismäßig komplexe enzymatische Reaktion wurde in einer kürzlich veröffentlichen Studie näher untersucht [Van Lanen & Iwata-Reuyl, 2003a]. Vor der katalytischen Reaktion werden die Substrate tRNA-preQ$_1$ und SAM an das aktive Zentrum des QueA-Enzyms gebunden. Mit Hilfe der Suizid-Inhibitoren S-Adenosylhomocystein und Sinefungin (Substratanaloga des SAM) wurde gezeigt, dass die enzymatische Reaktion nach einem geordneten, sequentiellen Mechanismus verläuft. Zuerst bindet tRNA-preQ$_1$ an das QueA-Enzym, dann das SAM. Die Eliminiation der Produkte erfolgt in der Reihenfolge Adenin, Methionin und Epoxyqueuosin. Diese Resultate stimmen mit dem postulierten Enzymmechanismus für das QueA-Enzym überein. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass das SAM nur in Anwesenheit von Magnesium-Ionen an das QueA-Enzym bindet [Van Lanen et al., 2003b]. Bei einer Magnesium-Konzentration im millimolaren Bereich wird jedoch die Anlagerung des Substrats an das Protein verhindert.

5.1.2 Tertiärstruktur

In unserem Arbeitskreis war es Clemens Grimm gelungen, das rekombinant in *E. coli* produzierte QueA-Enzym von *Bacillus subtilis* zu kristallisieren [Grimm, 2000b]. Mit Hilfe von

Synchrotronstrahlung wurden MAD-Experimente mit Quecksilber-derivatisierten und Selenomethioninylhaltigen-Kristallen der *B. subtilis* QueA durchgeführt. Aus den kristallographischen Daten wurde ein erstes Modell der *B. subtilis* QueA mit einer Auflösung von 3,0 Å erstellt. Das monomere Enzym mit einer Größe von etwa 39,4 kDa besteht aus zwei, deutlich voneinander abgesetzten Domänen (Abb. 41 und 42).

Die kleinere Domäne faltet sich in eine fassartige Struktur aus sechs antiparallelen ß-Strängen. In diesem Strukturmotiv sind die Stränge $ß1_s$ - $ß3_s$ über eine 3_{10}-Helix mit den Strängen $ß4_s$ - $ß6_s$ verbunden. Am C-Terminus befindet sich die Helix $\alpha2_s$ und ein siebter Strang $ß7_s$, der antiparallel zum Strang $ß1_s$ verläuft. Die beiden Helices $\alpha1_s$ und $\alpha2_s$ verschließen die beiden Öffnungen der Fassstruktur. Die kleinere Domäne ist im Hinblick auf die Primärstruktur des Enzyms in eine zweite, größere Domäne inseriert.

Die größere Domäne enthält ein neuartiges, bisher unbekanntes Faltungsmuster. Ein viersträngiges ß-Faltblatt bildet, zusammen mit einer 3_{10}-Helix, die Kontaktfläche zur kleineren Domäne. Der vierte ß-Strang ist über seine C-terminale Seite mit dem Strang $ß1_s$ der kleineren Domäne verbunden. Die zweite Schleife zwischen den beiden Domänen ist in der Elektronendichte nicht geordnet. Das fassartige Strukturmotiv faltet vermutlich über den Strang $ß7_s$ in Richtung der größeren Domäne zurück. Dort liegen die Stränge $ß3_b$ und $ß4_b$ des viersträngigen ß-Faltblattes in direkter Verlängerung der beiden Stränge $ß5_b$ und $ß6_b$. Diese formen zusammen mit den Strängen $ß7_b$ - $ß11_b$ ein großes ß-Faltblatt, in dem die ersten vier ß-Stränge parallel und die letzten vier ß-Stränge antiparallel angeordnet sind. Das ß-Faltblatt ist von mehreren α-Helices umgeben. Die kristallographisch nicht aufgelösten N- und C-Termini des QueA-Enzyms liegen sicherlich im Bereich der größeren Domäne.

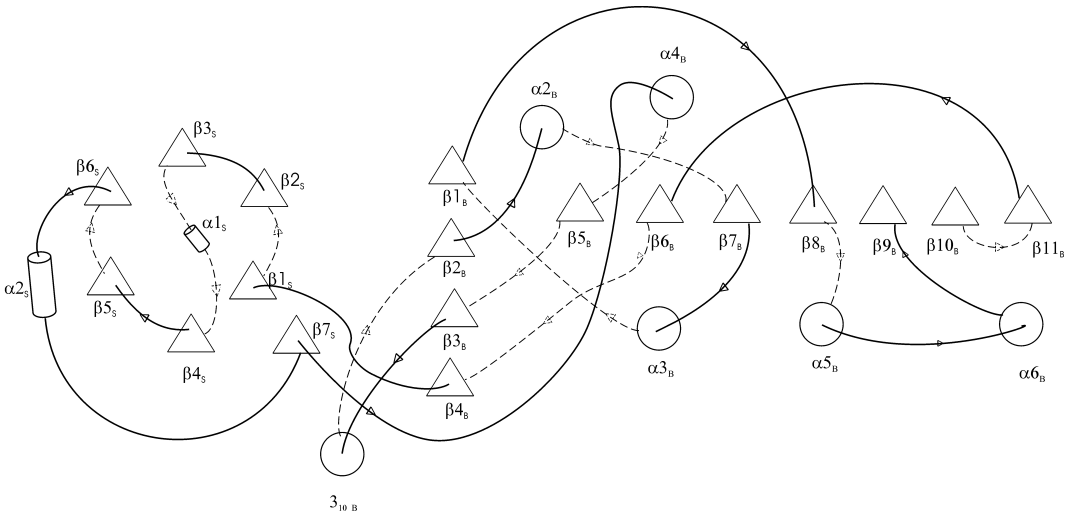


Abb. 41: Topologischer Aufbau der Sekundärstrukturelemente des QueA-Enzyms. α-Helices (Index S) sind als Kreise oder Zylinder, ß-Stränge (Index B) als Dreiecke dargestellt (Abb. entnommen aus der Dissertation von Dr. Clemens Grimm).

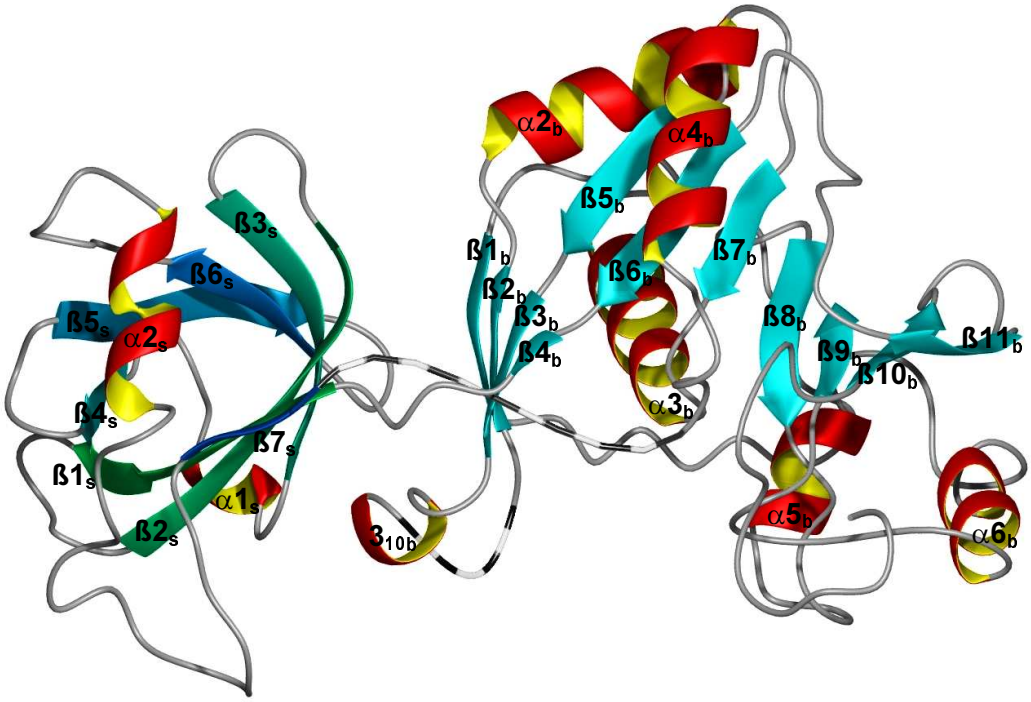


Abb. 42: Bandmodell der Kristallstruktur der *B. subtilis* QueA. Die kleinere Domäne (links) ist in die größere Domäne (rechts) integiert, die ein neuartiges Faltungsmuster aufweist (Abb. entnommen aus der Dissertation von Dr. Clemens Grimm).

Das Modell bietet einen ersten Einblick in das Faltungsmuster der *B. subtilis* QueA. Die Komplexstruktur mit den Substraten tRNA-preQ$_1$ und SAM ist noch nicht bekannt. Deshalb besteht keine genaue Vorstellung darüber, wie die tRNA an das QueA-Enzym bindet. RNA-Footprinting-Experimente haben jedoch gezeigt, dass vorwiegend die Antikodonschleife und Teile der Dihydrouridinschleife von der tRNA-preQ$_1$ spezifisch erkannt werden [Müller & Slany, 1995].

Um eine Vorstellung über die Bindestelle der tRNA-preQ$_1$ an das QueA-Enzym zu erhalten, wurden die elektrostatischen Eigenschaften des Proteins analysiert. Dabei fiel der ausgeprägte Dipolcharakter des Enzyms auf. Auf der Oberfläche der kleineren Domäne im Bereich der Stränge ß1$_s$ - ß3$_s$ und der Helix α1$_s$ befinden sich bevorzugt die Aminosäurereste Arginin und Lysin. Aus dem Sequenzalignment der *B. subtilis* QueA mit ihren eubakteriellen Orthologen ging hervor, dass diese Aminosäurereste nicht strikt konserviert sind. In dieser Region sind jedoch bevorzugt basische Reste vorhanden, die an der Kontaktfläche zwischen den Domänen liegen und der größeren Domäne zugewandt sind. Vermutlich wird das tRNA-preQ$_1$, insbesondere das negativ geladene Phosphatrückgrat des Antikodonstamms, dort an das QueA-Enzym gebunden. Im übrigen Teil der Fassstruktur (ß4$_s$ - ß6$_s$) der kleineren

Domäne sowie in den beiden ß-Faltblättern der größeren Domäne sind überwiegend saure Reste auf der Proteinoberfläche vorhanden. In der Kontaktfläche zwischen den beiden Domänen befinden sich viele konservierte Aminosäurereste auf der Seite der größeren Domäne. Das His209 und das His303 sind in allen Orthologen streng konserviert. Aufgrund ihrer Position im QueA-Enzym könnte eines der beiden Histidine als katalytisches Nukleophil fungieren. Diese Annahme ließe sich durch Aufklärung der Komplexstruktur aus tRNA-preQ$_1$ und Substrat oder kinetische Studien mit mutierten QueA-Enzymen bestätigen. In ersten Kokristallisationsansätzen mit RNA-Substrat wurden bereits Kokristalle erhalten. Die Kristalle sind jedoch sehr klein und für Röntgenbeugungsexperimente noch nicht geeignet. Die Bindung der modifizierten tRNA induziert wahrscheinlich strukturelle Umlagerungen im QueA-Enzym. In kinetischen Studien wurde bereits gezeigt, dass vor der Bindung des SAM an das aktive Zentrum die Anlagerung der tRNA-preQ$_1$ an das Enzym erfolgen muss.

5.1.3 Problemstellung

Mit Hilfe der Elektronendichtekarte konnte ein erstes Modell der *B. subtilis* QueA erstellt werden. Die beiden Domänen sind deutlich voneinander getrennt und über eine Art Gelenk miteinander verbunden. Durch die langgestreckte Anordnung der Stuktur und den hohen Anteil an Schleifenbereichen ist das QueA-Enzym sehr flexibel. Der mittlere B-Faktor des Modells beträgt 90,4 Å^2 und ist damit außergewöhnlich hoch. Durch die hohe Flexibilität des QueA-Enzyms ist in vielen Bereichen keine Elektronendichte vorhanden (Abb. 43). Dadurch konnten mehr als 50 Seitenketten nicht gebaut werden. Im Modell fehlt insbesondere die Schleife, die von der kleineren zur größeren Domäne führt. Weiterhin sind die Schleifenbereiche in der Nähe der 3$_{10}$-Helix sowie die N- und C-Termini des Proteins in der größeren Domäne nicht vorhanden. Während die Sekundärstrukturelemente relativ gut in der Elektronendichtekarte lokalisiert werden konnten, bestehen große Unsicherheiten in der Anordnung der Aminosäurereste in den Schleifenbereichen. Wegen der ausgeprägten Flexibilität der Struktur und der damit verbundenen schwachen Elektronendichte sind die R-Faktoren der verfeinerten Kristallstruktur sehr hoch. Der kristallographische R-Faktor des abschließenden Modells beträgt 38,9 %, der freie R-Faktor 46,1 %. Aufgrund der schlechten kristallographischen Parameter der Verfeinerung wird das Modell der *B. subtilis* QueA den Anforderungen einer zuverlässigen und vollständigen Kristallstruktur nicht gerecht und muss als vorläufiges Strukturmodell bezeichnet werden.

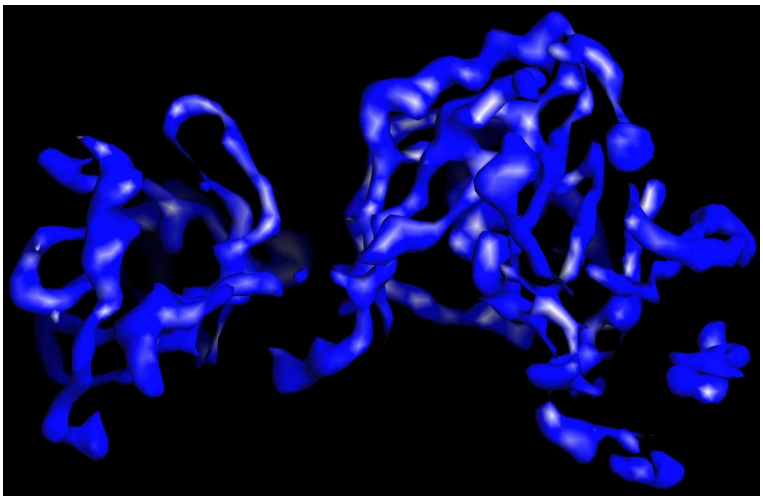


Abb. 43: Elektronendichtekarte der Kristallstruktur des QueA-Enzyms bei einer Auflösung von 3,0 Å, konturiert auf ein σ-Level von 1,8 (Abb. entnommen aus der Dissertation von Dr. Clemens Grimm).

Um die Qualität des Strukturmodells der *B. subtilis* QueA zu verbessern, sollte die Kristallstruktur zumindest in Teilbereichen verifiziert werden. Da die beiden Domänen deutlich voneinander abgegrenzt sind, wurden die beiden Domänen des QueA-Enzyms jeweils getrennt voneinander rekombinant in *E. coli* produziert und anschließend gereinigt.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

Das Kristallstrukturmodell der *B. subtilis* QueA zeigt, dass das Enzym in zwei, voneinander abgegrenzte Domänen gegliedert ist [Grimm, 2000b]. Die kleinere Domäne bildet eine fassartige Struktur, die größere Domäne enthält ein neuartiges, bisher unbekanntes Faltungsmuster. In das Strukturmodell der *B. subtilis* QueA konnten jedoch nicht alle 342 Aminosäurerreste des Proteins eingefügt werden. Aufgrund der hohen Flexibilität des Proteins sind einige Bereiche in der Elektronendichtekarte nicht definiert. Große Unsicherheiten bestehen vor allem in der Positionierung der Schleifenbereiche. Trotzdem kann die Grundstruktur und die topologische Gliederung des Modells als gesichert angesehen werden. Aufgrund der schlechten kristallographischen Daten aus der Verfeinerung und dem hohen durchschnittlichen B-Faktor entspricht das Strukturmodell jedoch gegenwärtig nicht den Anforderungen, die an eine verlässliche Kristallstruktur gestellt werden.

Um die Qualität der Kristallstruktur der *B. subtilis* QueA verbessern zu können, sollte das Strukturmodell zumindest in Teilbereichen verifiziert werden. Eine Möglichkeit wäre die Aufklärung der Kristallstruktur der *B. subtilis* QueA im Komplex mit RNA-Substrat. Bisher erhaltene Kokristalle sind jedoch nur schwer reproduzierbar und noch nicht von ausreichender Qualität, um sie für die Röntgenstrukturanalyse zu verwenden [Grimm, 2000b]. Deshalb wurde in dieser Arbeit mit den beiden voneinander getrennten Domänen der QueA Kristallisationsversuche durchgeführt. Die deutlich voneinander abgegrenzten Domänen besitzen eine relativ kleine Kontaktfläche, in der sich nur wenige hydrophobe Aminosäurereste befinden. Aus diesem Grund sollte die Tendenz zur Bildung von Aggregaten relativ gering sein. Um die Chance einer erfolgreichen Strukturaufklärung zu vergrößern, wurde neben der *B. subtilis* QueA auch mit der *E. coli* QueA gearbeitet.

5.2.1 Die kleinere Domäne der QueA

Die kodierenden Gensequenzen der kleineren Domäne der *B. subtilis* und *E. coli* QueA mit einem Molekulargewicht von 11,4 kDa wurden in den modifizierten Vektor pGEX-6P-1 (Anhang B und C) kloniert. Die entsprechenden GST-Fusionsproteine wurden rekombinant in *E. coli* produziert und waren im Rohextrakt sehr gut löslich. Nach der Reinigung über die Glutathion-Sepharose wurde der GST-*tag* durch Zugabe von PreScission-Protease™ abgespalten. Die kleineren Domänen der QueA waren in der Pufferlösung sehr stabil. Die anschließende Reinigung über Gelfiltration zeigte, dass sie keine Aggregate bildeten,

sondern in Lösung als Monomere vorlagen. Dieses Reinigungsverfahren lieferte sehr reines Protein in hoher Ausbeute.

Für die kleineren Domänen der *B. subtilis* und *E. coli* QueA wurden verschiedene Kristallisationsbedingungen getestet. Dabei wurden verschiedene *Kits* von Hampton Research verwendet. Die kleinere Domäne der *B. subtilis* QueA kristallisierte nach einer Woche unter folgenden Bedingungen:

Crystal Screen Nr. 6 (4°C): 0,1 M Tris pH 8,5, 0,2 M $MgCl_2$, 30 % PEG 4000
Crystal Screen Nr. 17 (4°C): 0,1 M Tris pH 8,5, 0,2 M Li_2SO_4, 30 % PEG 4000
Crystal Screen Nr. 22 (4°C): 0,1 M Tris pH 8,5, 0,2 M NaAc, 30 % PEG 4000

Die erhaltenen Kristalle sind sehr gut reproduzierbar, jedoch stark miteinander verwachsen (Abb. 44). Da das Wachstum der Kristalle nur in zwei Dimensionen erfolgt, sind sie sehr zerbrechlich. Sie besitzen in den beiden messbaren Dimensionen eine Größe von 0,6 mm x 0,6 mm. Die geringe mechanische Stabilität der Kristalle deutete darauf hin, dass es sich um Proteinkristalle handelte. Diese Annahme konnte durch Röntgenbeugungsexperimente bestätigt werden. Reflexe wurden bis zu einer Auflösung von etwa 6 Å beobachtet. Die Kristalle konnten jedoch aufgrund des schlechten Beugungsmusters nicht für die Strukturaufklärung verwendet werden. Durch Variation der Präzipitanz- oder Proteinkonzentration sowie des pH-Wertes wurde versucht, die Kristallqualität zu verbessern. Der Einfluss verschiedener Detergenzien und Additiva wurde systematisch getestet. Allerdings gelang es nicht, Einkristalle zu züchten oder die Plättchen in der dritten Dimension zu vergrößern.

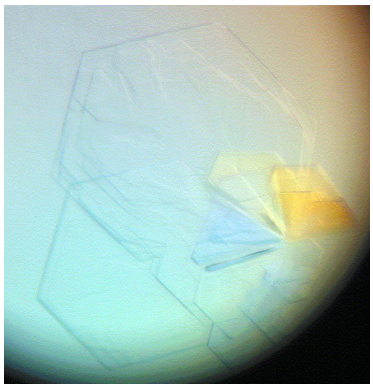


Abb. 44: Kristalle der kleineren Domäne (11,4 kDa) der *B. subtilis* QueA.

Das Kristallwachstum erfolgte bei der kleineren Domäne der *B. subtilis* QueA nur in zwei Dimensionen. Es wurde vermutet, dass flexible Bereiche in der Domäne die Ausbildung der Kristallkontakte behindert. Bei der Betrachtung des Strukturmodells fiel auf, dass der C-

Terminus der kleineren Domäne eine hohe Flexibilität aufweist. Der C-Terminus umfasst den Schleifenbereich nach der Helix $\alpha 2_s$ sowie den Strang $ß7_s$ (Abb. 42). Es sollte erwähnt werden, dass die Aminosäuren in dieser Region sehr schlecht in der experimentellen Dichte definiert sind. Um zu testen, ob der flexible Schleifenbereich die Ausbildung der Kristallkontakte behindert, wurden 14 Aminosäuren am C-Terminus durch *site-directed mutagenesis* entfernt (Abb. 45). Diese kleinere Domäne der QueA mit einem Molekulargewicht von 9,7 kDa wurde nach dem gleichen Verfahren produziert. Nach der Reinigung über die Glutathion-Sepharose wurde die kleinere Domäne (9,7 kDa) vom GST-*tag* entfernt. Das Protein war in Lösung stabil. Bei der anschließenden Reinigung über die Gelfiltrationssäule verblieben über 80 % des Proteins auf der Säule und konnten nicht eluiert werden. Beim Ankonzentrieren präzipitierte ein großer Teil des Proteins. Aufgrund der geringen Ausbeute konnten keine Kristallisationsbedingungen getestet werden. Ohne Reinigung über die Gelfiltrationssäule wurden zwar etwa 3 mg Protein erhalten, auf die Kristallisation wurde jedoch verzichtet, da die Proteinlösung nicht von ausreichender Reinheit war.

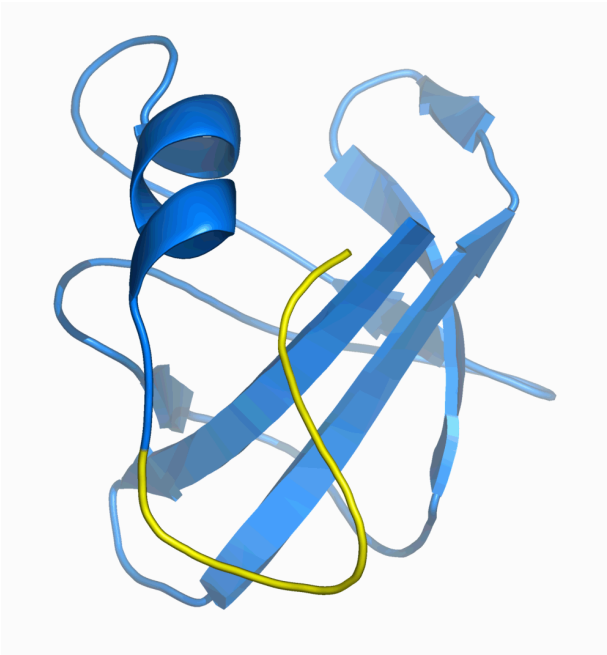


Abb. 45: Bandmodell der kleineren Domäne der *B. subtilis* QueA. Bei der kleineren Domäne mit einem Molekulargewicht von 9,7 kDa fehlt der C-Terminus, der in gelb dargestellt ist.

Die gute Stabilität der kleineren Domäne der QueA mit einer Größe von 11,4 kDa zeigt, dass das fassartige Strukturmotiv von der größeren Domäne der QueA weitgehend unabhängig und strukturell isoliert ist. Bei der Entfernung der 14 Aminosäuren am C-Terminus ist die Domäne jedoch nicht mehr stabil, obwohl im Schleifenbereich überwiegend hydrophile

Aminosäurereste vorhanden sind. Allerdings ist die Phe69-Seitenkette, die vor dem Entfernen der C-terminalen Schleife in das Inneren des Proteins orientiert war, nun zum Solvens exponiert. Eventuell bindet der Aromat an die im Schleifenbereich vorhandene Tyr153-Seitenkette (im Strukturmodell der *B. subtilis* QueA als Alanin gebaut). Neben der erhöhten Hydrophobizität könnte durch das Entfernen des C-Terminus auch die Stabilität der kleineren Domäne (9,7 kDa) beeinflusst worden sein. Am Ende der kleineren Domäne bildet der Strang $ß7_s$ über den Strang $ß1_s$ ein antiparalleles ß-Faltblatt mit der Fassstruktur aus. Dadurch wird eventuell die Schleife stabilisiert, so dass dieser Bereich wenigstens teilweise in der Elektronendichte lokalisiert werden konnte. Durch das Entfernen des C-Terminus könnte auch die Helix $\alpha 2_s$, die über ihre Seitenketten an die Fassstruktur gebunden ist, zu einer größeren Beweglichkeit befähigt sein.

5.2.2 Die größere Domäne der QueA

Auch die größere Domäne der *B. subtilis* QueA wurde rekombinant in *E. coli* produziert und für Kristallisationsexperimente eingesetzt. Dabei musste berücksichtigt werden, dass die kleinere Domäne in die größere Einheit der QueA inseriert ist. Durch Amplifikation der N- und C-terminalen Teile der größeren Domäne mittels PCR würden zwei DNA-Fragmente entstehen. Um dies zu vermeiden, wurde die Methode des *site-directed mutagenesis* gewählt. Durch Deletion wurde die kodierende Gensequenz der kleineren Domäne der QueA entfernt. Gleichzeitig wurde der N-Terminus mit dem C-Terminus der größeren Domäne verbunden.

Aus dem Strukturmodell der *B. subtilis* QueA kann zwar das Ende der N-terminalen Region der größeren Domäne lokalisiert werden, jedoch nicht der Anfang der C-terminalen Region. Im Modell fehlt die C-terminale Schleife zwischen der kleineren und der größeren Domäne (Aminosäurereste 161 - 183). Die fehlenden 14 Aminosäurenreste wurden mit dem Programm MOLOC [Gerber & Müller, 1995] (mit Hilfe der Elektronendichtekarte) in das Strukturmodell eingebaut und die beiden Domänen miteinander verbunden. Die Struktur wurde anschließend mit dem MAB-Kraftfeld minimiert. Dadurch konnte eine Vorstellung erhalten werden, wie die fehlenden Aminosäurerreste in der QueA angeordnet sein könnten. Durch Mutagenese wurde das Pro66 am N-Terminus mit dem Glu168 am C-Terminus der größeren Domäne verbunden. Gleichzeitig wurde die Gensequenz von 97 Aminosäureresten der kleineren Domäne entfernt. Im gleichen Schritt erfolgte der Austausch des Glu168 gegen ein Glycin, da diese Aminosäure bevorzugt in Schleifenregionen zu finden ist. Die größere Domäne der QueA besteht aus einem N-terminalen (Aminosäure 1 - 66) und einem C-terminalen Bereich (Aminosäure 168 - 342) und besitzt eine Größe von 28,1 kDa.

N T R V L P G(Q) T V Y S K

5´- C AAT ACC CGG GTA CTG CCT GGG ACA GTG TAT TCA AAA G -3´

Abb. 46: Aminosäure- und Nukleotidsequenz des *forward*-Primers. Die Aminosäurereste in grau gehören zum N-Terminus, die Reste in rot zum C-Terminus der größeren Domäne. Das Glu168 wurde gegen ein Glycin ausgetauscht.

Die Expression und die Aufreinigung über die Glutathion-Sepharose erfolgte analog zu dem beschriebenen Verfahren für die kleinere Domäne der QueA. Die größere Domäne war nach dem Entfernen des GST-*tag* in Lösung stabil. Bei der Reinigung über die Gelfiltrationssäule verblieb der größte Teil des Proteins jedoch auf der Säule, weshalb auf diesen Reinigungsschritt verzichtet werden musste. Nach Dialyse präzipitierte das Enzym teilweise beim Ankonzentrieren der Proteinlösung. Aufgrund der geringen Ausbeute bzw. der geringen Reinheit (ohne Gelfiltrationssäule) wurden keine Kristallisationsexperiment durchgeführt.

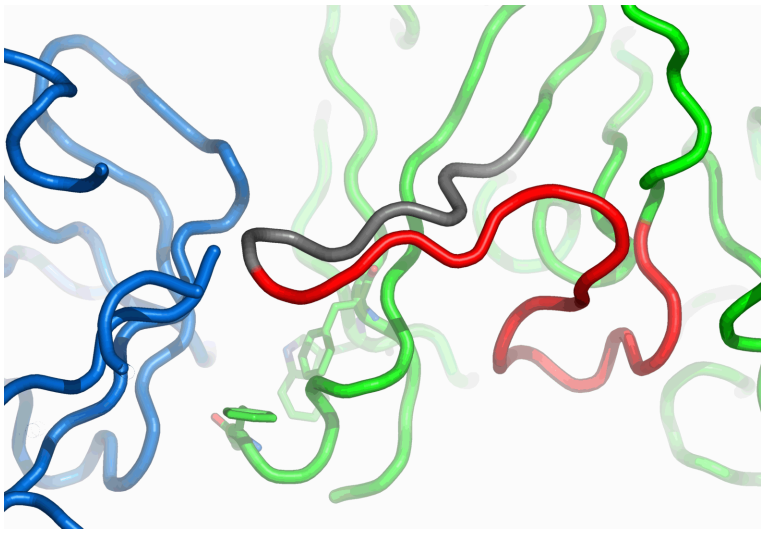


Abb. 47: Modell der beiden Domänen der *B. subtilis* QueA. In die größere Domäne der QueA (grün) wurden die fehlenden Aminosäurereste (rot) in das Strukturmodell eingefügt. Durch Mutagenese wurde die kleinere Domäne der QueA (blau) entfernt. Gleichzeitig wurde der N-Terminus (grau) mit dem C-Terminus (rot) der größeren Domäne verbunden. Die hydrophoben Aminosäuren in der Kontaktfläche zwischen den beiden Domänen sind als Stabmodell in grün dargestellt.

Die größere Domäne ist zwar während der Reinigung sehr stabil, jedoch präzipitiert das Protein beim Ankonzentrieren. Vermutlich werden in der konzentrierten Proteinlösung Aggregate gebildet. Durch die Trennung der Domänen sind auf der Seite der größeren Domäne drei aromatische Aminosäurereste an die Oberfläche exponiert. Die Phe201- und Phe228-Seitenketten liegen in der Schleife zwischen dem Strang ß2_b und ß3_b, welche die größte Kontaktfläche mit der kleineren Domäne der QueA ausbildet. Am C-Terminus des Strangs ß1_b ist die Trp277-Seitenkette zur kleineren Domäne orientiert. In der Kontaktfläche zwischen den beiden Domänen fehlen viele Aminosäurereste im Strukturmodell, so dass nicht genau analysiert werden kann, warum die größere Domäne sehr hydrophob ist. In der Schleife zwischen den Strängen ß2_b und ß3_b sind 14 Aminosäurereste im Strukturmodell der *B. subtilis* QueA nicht vorhanden. Weiterhin fehlen 11 Aminosäurereste im Schleifenbereich zwischen dem Strang ß7_s und der Helix $\alpha 4_b$. Die Primärstrukturanalyse zeigt, dass diese Regionen nicht sonderlich hydrophob sind. In dem Strukturmodell des QueA-Enzyms fällt auf, dass sich viele aromatische Seitenketten zur Oberfläche des Proteins orientieren. In der kleineren Domäne sind in der Helix $\alpha 2_s$ die Phe138- und Tyr139-Seitenketten, sowie die aromatische Seitenkette des Phe281 und des Tyr283 zum Solvens exponiert.

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

Durch Röntgenstrukturanalyse konnte ein erstes Kristallstrukturmodell der *B. subtilis* QueA erstellt werden [Grimm, 2000b]. Das Modell zeigt, dass das Enzym aus zwei Domänen besteht. Die größere Domäne weist ein neuartiges Faltungsmuster auf. Aufgrund der hohen Flexibilität des Proteins sind jedoch viele Bereiche in der Elektronendichte nur schlecht oder nicht definiert. Zwangläufig muss das Strukturmodell lückenhaft bleiben. Weiterhin bestehen Unsicherheiten in der exakten Positionierung der Schleifenbereiche.

Um die Qualität des Strukturmodells zu verbessern, sollte in dieser Arbeit die Kristallstruktur der beiden Domänen separat voneinander bestimmt werden. Die Domänen wurden durch Mutageneseverfahren erfolgreich voneinander getrennt, die Proteinfragmente in löslicher Form produziert und gereinigt. Aus einem breit angelegten *Screening* konnten gut reproduzierbare Proteinkristalle von der kleineren Domäne der *B. subtilis* QueA erhalten werden. Es wurde bereits versucht, die Kristallisationsbedingungen zu optimieren. Für Röntgenbeugungsexperimente sind die Kristalle jedoch noch nicht von ausreichender Qualität. Weiterhin könnten die Kristalle durch die Methode des *microseeding* oder des *streak seeding* verbessert werden. Da die kleinere Domäne sehr einfach zu reinigen ist, könnte diese auch aus anderen eubakteriellen Organismen für Kristallisationsversuche isoliert werden. Die größere Domäne dagegen ist sehr hydrophob und kaum in ausreichender Reinheit für die Kristallisation erhältlich. Durch die Mutation der hydrophoben Reste auf der Proteinoberfläche, insbesondere der aromatischen Aminosäurereste in der Kontaktfläche der beiden Domänen, könnte die Stabilität des Proteins verbessert und die Aggregatbildung vermindert werden.

Die Kristallstrukturbestimmung der beiden Domänen könnte einen bedeutenden Beitrag leisten, das vorliegende Strukturmodell zu verifizieren. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Geometrie der Schleifenbereiche der Domänen, beispielsweise durch die Kristallpackung, strukturell von dem vorliegenden Modell unterscheidet. Neben der Kristallisation der Domänen wurden bereits Kokristallisationsexperimente mit RNA als Substrat durchgeführt. Da bei der Bindung der tRNA an das QueA-Enzym größere strukturelle Umlagerungen zu erwarten sind, wird die Komplexstruktur eine andere Molekülgeometrie als die apo-Struktur aufweisen. Deshalb wäre es lohnend, beide Strukturbestimmungen parallel zu verfolgen. Durch ein verbessertes Strukturmodell könnten (nach Aufklärung der Komplexstruktur) die strukturellen Unterschiede zwischen dem apo-Enzym und der Komplexstruktur einfacher identifiziert werden und die vermutete konformative Umlagerung bei der tRNA-Bindung genauer gefasst werden.

Die Aufklärung der Kristallstruktur der QueA im Komplex mit tRNA und SAM ist auch in Hinblick auf die Entwicklung von Inhibitoren von großer Bedeutung. Das QueA-Enzym ist ein

attraktives *Target* für das Design von neuen Wirkstoffen zur Behandlung der Bakterienruhr, da das QueA-Enzym im gleichen Biosyntheseweg wie die tRNA-Guanin Transglykosylase zu finden ist. Für das rationale Wirkstoffdesign müsste jedoch der ternäre Komplex der QueA im Komplex mit tRNA und SAM aufgeklärt werden. Die kinetischen Studien haben gezeigt, dass das Substrat SAM nur in Anwesenheit der tRNA gebunden wird [Kinzie et al., 2000]. Die Kristallstruktur des ternären Komplexes bietet nicht nur die Möglichkeit, einen Einblicke in die Lage des aktiven Zentrums zu bekommen, sondern auch eine strukturelle Interpretation des Enzymmechanismus vorzunehmen.

5.4 Material und Methoden

Für alle verwendeten Reagenzien gelten die in Kapitel 2.4, 3.4 und 4.4 aufgeführten Angaben.

5.4.1 Klonierung

Die Klonierung erfolgte analog zu dem in Kapitel 4.4.1.1 beschriebenen Verfahren.
Die kodierende Region der kleineren Domäne der QueA wurde aus den *queA*-Genen von *B. subtilis* und *E. coli* (Anhang B), die in den modifizierten pGEX-6P-1-Vektor kloniert wurden (Anhang C), mittels PCR amplifiziert. Für die PCR wurden folgende Primer, die bereits vor Beginn dieser Arbeit vorhanden waren, verwendet:

B. subtilis QueA *forward* kleinere Domäne 11,4 kDa	5´- GGC <u>CAT ATG</u> GCG CGG TTA TTC GGC ACA AAA GAG GAT ACC -3´
B. subtilis QueA *backward* kleinere Domäne 11,4 kDa	5´- GGC <u>GGA TCC</u> GTA GCG TTT GTC ATC AGG CTG TTC -3´
E. coli QueA *forward* kleinere Domäne 11,4 kDa	5´- GGC <u>CAT ATG</u> GCG CGC CTG TTT GGG CGT AAA GCC AGC GGC -3´
E. coli QueA *backward* kleinere Domäne 11,4 kDa	5´- GGC <u>GGA TCC</u> ATA AAG TTC GCG GTC AGC GTC TTC GTC CGG -3´

Die unterstrichene Gensequenz kennzeichnet die palindrome Erkennungsequenz der Restriktionsendonukleasen. Die doppelsträngige DNA wird im Bereich des *forward*-Primers von der Endonuklease *Nde* I und im Bereich des *backward*-Primers von *BamH* I gespalten.
Die konstruierten kleineren Domänen der QueA aus *B. subtilis* (Aminosäurereste 67 - 166) und *E. coli* (Aminosäurereste 67 - 167) umfassen eine Größe von je 11,4 kDa.

5.4.2 Mutagenese

Die Mutagenese erfolgte analog zu dem in Kapitel 4.4.1.2 beschriebenen Verfahren.
Nach der Klonierung der *queA*-Fragmente in den modifizierten pGEX-6P-1-Vektor wurde festgestellt, dass die *backward*-Primer nach der Erkennungssequenz *BamH* I nicht die kodierende Sequenz des Stoppkodons enthalten, um die Transkription der Gene zu terminieren. Dies hätte zur Folge, dass sich nach der Überexpression der kleineren QueA-

Domäne zusätzliche, unerwünschte Aminosäurereste am C-Terminus des Proteins befinden, welche die Kristallisation behindern könnten. Das Stoppkodon wurde in die *queA*-Gene von *B. subtilis* und *E. coli* mittels PCR nach dem Verfahren der ortsgerichteten Mutagenese eingeführt. Zusätzlich wurde am C-Terminus der kleineren Domäne eine Aminosäure hinzugefügt. Nach dem Vergleich der Gensequenzen der Primer mit den *queA*-Genen wurde festgestellt, dass im verwendeten *backward*-Primer der *B. subtilis* QueA die kodierende Sequenz für eine Aminosäure fehlt und eine zusätzliche Mutation eingefügt wurde. Dies wurde bei der Konstruktion des *backward*-Primers berücksichtigt und korrigiert. Um die Anlagerung der Primer an die Zielsequenz zu ermöglichen, wurde bei der PCR die *annealing*-Temperatur von 55°C auf 45°C herabgesetzt.

B. subtilis QueA Stopp *forward* kleinere Domäne 11,4 kDa	5´- CTC CCT CCA TAT ATC AAA GAA CAG CTT GAT GAC AAA GAG CGC TAC CAG TAA GGA TCC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC -3´
B. subtilis QueA Stopp *backward* kleinere Domäne 11,4 kDa	5´- GAG TCG ACC CGG GAA TTC CGG GGA TCC TTA CTG GTA GCG CTC TTT GTC ATC AAG CTG TTC TTT GAT ATA TGG AGG GAG -3´
E. coli QueA Stopp *forward* kleinere Domäne 11,4 kDa	5´- CGG GAC GAA GAC GCT GAC CGC GAA CTT TAT CAA TAA GGA TCC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC -3´
E. coli QueA Stopp *backward* kleinere Domäne 11,4 kDa	5´- GAG TCG ACC CGG GAA TTC CGG GGA TCC TTA TTG ATA AAG TTC GCG GTC AGC GTC TTC GTC CCG -3´

Aus der kleineren Domäne der *B. subtilis* QueA (ohne Stoppkodon) wurde ein zweites Konstrukt (Aminosäurereste 67 - 153) mit einer Größe von 9,7 kDa angefertigt (Anhang B). Mit Hilfe des *site-directed mutagenesis* Verfahrens wurden 14 Aminosäuren am C-Terminus entfernt. Da die kodierende Sequenz der kleineren QueA-Domäne kein Stoppkodon enthielt, wurde in den *backward*-Primer das Stoppkodon eingefügt.

B. subtilis QueA Stopp *forward* kleinere Domäne 9,7 kDa	5´- CTT GGA GAG ATG CCG CTC TGA GGA TCC CCG GAA TTC CC -3´
B. subtilis QueA Stopp *backward* kleinere Domäne 9,7 kDa	5´- GG GAA TTC CGG GGA TCC TCA GAG CGG CAT CTC TCC AAG -3´

Die größere Domäne der *B. subtilis* QueA wurde mittels *site-directed mutagenesis* durch die Verwendung folgender Primer erhalten (Anhang B):

B. subtilis QueA *forward* größere Domäne	5´- C AAT ACC CGG GTA CTG CCT GGG ACA GTG TAT TCA AAA G -3´
B. subtilis QueA *backward* größere Domäne	5´- C TTT TGA ATA CAC TGT CCC AGG CAG TAC CCG GGT ATT G -3´

Da die kleinere Domäne im Hinblick auf die Primärstruktur in die größere Domäne im QueA-Enzym inseriert ist, wurde die Gensequenz von 97 Aminosäureresten, die zur kleineren Domäne der QueA gehören, durch Deletion aus dem *queA*-Gen entfernt. Dadurch wurde das Pro66 im N-Terminus mit dem Glu168 im C-Terminus der grösseren Domäne verbunden. Gleichzeitig erfolgte der Austausch des Glu168 gegen ein Glycin. Die größere Domäne der QueA besteht aus dem N-terminalen (Aminosäure 1 - 66) und dem C-terminalen Fragment (Aminosäure 168 - 342) und hat eine Größe von 28,1 kDa. Für die PCR wurde das *B. subtilis queA*-Gen, das in den Vektor pGEX-6P-1 integriert wurde, verwendet. Dort ist das *queA*-Gen zwischen der Erkennungsequenz der Restriktionsenzyme *BamH* I und *EcoR* I eingefügt.

Nach der Klonierung wurde die Gensequenz der konstruierten *queA*-Fragmente sequenziert. In den kleineren Domänen der *queA* waren keine Mutationen vorhanden. Die größere Domäne der *queA* konnte noch nicht erfolgreich sequenziert werden. Das Protein weist jedoch die korrekte Größe auf, so dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die konstruierte größere Domäne des QueA-Enzyms handelt.

5.4.3 Expression und Reinigung

Die Expression und Reinigung der Domänen der QueA aus *B. subtilis* und *E. coli* (mit Stoppkodon) erfolgte analog zu dem von Grimm beschriebenen Verfahren [Grimm et al., 2000c].

Die Plasmid-DNA, die das *queA*-Fragment beinhaltete, wurde in den *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS transformiert. Die Zellen wurden auf Ampicillin- und Chloramphenicol-haltigen Selektions-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Bakterien wurden in Kulturmedium, das die Antibiotika in gleicher Konzentration enthielt, überführt und über Nacht bei 37°C angezogen. Die entstandene Suspension wurde in einer 1:500-Verdünnung zu 1,6 l des gleichen Nährmediums zugegeben und für mehrere Stunden bei 37°C und 250 U/min geschüttelt. Bei einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM. Nach einer Inkubationsperiode von 6 h bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation (Beckmann JA-10-Rotor, 10 min, 4000 U/min, 4°C) geerntet und bei -20°C gelagert.

Für die Reinigung der Domänen wurden folgende Lösungen angesetzt:

Protease-Inhibitor-Stammlösung: 1 Tablette Complete™ (EDTA-frei) in 2 ml Wasser gelöst
Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT
Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT
Puffer C: 10 mM Tris/HCl pH 8,5, 50 mM NaCl, 1 mM DTT

Für die Reinigung der kleineren QueA-Domäne mit einem Molekulargewicht von 11,4 kDa wurde folgendes Reinigungsverfahren verwendet:
Das Zellpellet wurde in 10 ml Puffer A und 400 µl Protease-Inhibitor-Stammlösung resuspendiert und mit Ultraschall (Branson Sonifier 250, 6 x 30 s, *duty cycle:* 70 %, *output control:* 4) auf Eis aufgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (Beckmann JA-25,50-Rotor, 30 min, 25000 U/min, 4°C) entfernt. Die Domäne wurde durch Affinitätschromatographie gereinigt. Durch die Expression der für die kleinere QueA-Domäne kodierenden Sequenz durch den modifizierten Vektor pGEX-6P-1 befindet sich am N-Terminus des resultierenden Proteins ein GST-*tag*, der spezifisch an die Glutathion-Sepharose gebunden wird. In einem 50 ml großen *Falcon*-Röhrchen wurden 15 ml Glutathion-Sepharose 4B dreimal mit je 20 ml Puffer A gewaschen. Das Sepharose-Material wurde durch Zentrifugation (Heraeus Minifuge 2, 5 min, 3000 U/min, 4°C) sedimentiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde der Rohextrakt zur Glutathion-Sepharose zugegeben und unter leichtem Schütteln für 2 h bei 20°C inkubiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation abgetrennt. Das Sepharose-Material wurde weitere fünfmal mit Puffer A gewaschen. Anschließend wurden 5 ml Puffer A und mit 80 µl PreScission-Protease™ (2 U/µl) zugegeben. Die Suspension wurde unter leichtem Schütteln für mindestens 10 h bei 15°C inkubiert. Dabei erfolgte die Abtrennung des GST-*tag* von der QueA-Domäne, die sich danach in Lösung befand. Mit Hilfe eines SDS-Proteingels wurde die Vollständigkeit der Spaltung überprüft. War auf dem Gel noch eine deutlich sichtbare Bande von dem Fusionsprotein vorhanden, wurde weitere Protease zugesetzt und die Suspension über 24 h inkubiert. Die Glutathion-Sepharose wurde durch Zentrifugation sedimentiert und vom Überstand abgetrennt. Danach wurde die Glutathion-Sepharose weitere fünfmal mit jeweils 10 ml Puffer A gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und mit Centricon YM 10 auf ein Volumen von 5 ml ankonzentriert. Die konzentrierte Proteinlösung wurde auf die mit Puffer B äquilibrierte Gelfiltrationssäule (HiLoad 26/60 Superdex 75 prep) aufgetragen. Die Elution der kleineren QueA-Domäne mit einer Größe von 11,4 kDa erfolgte bei einem Volumen von 240 ml Puffer B. Die Flussrate betrug dabei 0,8 ml/min. Die Reinheit der QueA-Domäne wurde mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurde die Proteinlösung im Dialyseschlauch mit einem *cutoff* von 6000 Da (Roth) zweimal gegen das 100-fache Volumen von Puffer C dialysiert. Die dialysierte Lösung wurde anschließend mit Centricon YM 10 auf eine Konzentration von 20 - 25 mg/ml ankonzentriert.

Die Expression und die Reinigung der kleineren Domäne mit einer Größe von 9,1 kDa sowie der größeren Domäne der QueA erfolgte analog zu dem Verfahren für die kleinere Domäne (11,4 kDa). Auf die Reinigung über die Gelfiltrationssäule musste allerdings verzichtet werden. Aufgrund der hohen Hydrophobizität der beiden Domänen verblieben nach diesem Reinigungsschritt über 80 % des Proteins auf der Säule. Deshalb wurde die Proteinlösung nach der Reinigung über die Gluthation-Sepharose zweimal gegen das 100-fache Volumen des folgenden Puffers dialysiert: 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 200 mM NaCl und 1 mM DTT. Die Proteinlösung wurde anschließend mit Centricon YM 10 ankonzentriert.

5.4.4 Gehaltsbestimmung

Der Gehalt der QueA-Domänen wurde photometrisch bei 595 nm nach der Methode von Bradford bestimmt. Dabei wurde das kommerziell erhältliche Bradford-Reagenz von Bio-Rad (München) verwendet. Um eine Korrelation zwischen der Absorption und dem Proteingehalt zu ermitteln, wurde mit Hilfe von BSA-Lösungen in einer Konzentration zwischen 30 und 180 µg/ml eine Eichgerade erstellt.
Die Ausbeute für die kleinere Domäne der *B. subtilis* und *E. coli* QueA mit einer Größe von 11,4 kDa variierte zwischen 10 und 18 mg pro Liter Zellkultur.
Aus der Reinigung der kleineren Domäne der *B. subtilis* QueA mit einer Größe von 9,7 kDa wurden etwa 3 mg Protein (ohne Reinigung über die Gelfitrationssäule und vor dem Ankonzentrieren) erhalten.
Für die größere Domäne der *B. subtilis* QueA betrug der Proteingehalt (ohne Reinigung über die Gelfitrationssäule und vor dem Ankonzentrieren) ungefähr 10 mg aus 1 l Zellkultur.

5.4.5 Kristallisation

Für die Kristallisation der kleineren Domäne der *B. subtilis* und *E. coli* QueA wurden jeweils 196 verschiedene Kristallisationsbedingungen aus den *Kits Crystal Screen*, *Crystal Screen II*, *Crystal Lite Screen* und *Natrix Screen* (Hampton Research, USA) getestet. Dabei wurde die Kristallisation nach der Technik des sitzenden Tropfens bei jeweils 4°C und 16°C angesetzt. Die Vertiefungen der 24-*well* Kristallisationsplatte wurden mit je 500 µl Reservoirlösung befüllt. Auf dem schalenförmigen Einsatz über dem Reservoir wurden 2 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 15 mg/ml mit 2 µl Reservoirlösung vermischt. Die Platte wurde anschließend mit einem transparenten Klebeband verschlossen.

Um die erhaltenen Kristalle der kleineren Domäne der *B. subtilis* QueA verbessern zu können, wurden in den folgenden Kristallisationsansätzen verschiedene Parameter wie pH-Wert, Salz- und PEG-Konzentration sowie Molekulargewicht des Präzipitanz PEG variiert. Als Ausgangslösung für die Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen dienten folgende Reservoirlösungen:

Crystal Screen Nr. 6 (4°C): 0,1 M Tris pH 8,5, 0,2 M $MgCl_2$, 30 % PEG 4000
Crystal Screen Nr. 17 (4°C): 0,1 M Tris pH 8,5, 0,2 M Li_2SO_4, 30 % PEG 4000
Crystal Screen Nr. 22 (4°C): 0,1 M Tris pH 8,5, 0,2 M NaAc, 30 % PEG 4000

Weiterhin wurden die *Kits* des *Detergent-Screen* 1 - 3 und des *Additive-Screen* 1 - 3 (Hampton Research, USA) getestet. Dazu wurde folgende Reservoirlösung verwendet: 0,1 M Tris pH 8,5, 0,2 M Na_2SO_4 und 30 % PEG 4000. 4 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 15 mg/ml wurde mit 5 µl Reservoirlösung und 1 µl Detergenz bzw. Additiv vermischt. Die Platte wurde luftdicht versiegelt und der Kristallisationstropfen gegen 500 µl Reservoirlösung äquilibriert.

Die Kristallisation der kleineren Domäne mit einer Größe von 9,1 kDa sowie der größeren Domäne der QueA wurde nicht durchgeführt.

Anhang

A. Sequenzalignment der archaebakteriellen TGT-Enzyme

```
                          10        20        30        40        50        60
                           ,         ,         ,         ,         ,         ,
A. fulgidus TGT     ------MQRFEILDKDAMGRICRIETPHGRIETPTILPVINPNIPFIRAEEMKKFGAQAV
P. horikoshii TGT   MSRGDKMLKFEIKARDGAGRIGKLEVNGKKIETPAIMPVVNPKQMVVEPKELEKMGFEII
                          *  ***   *  ***   *     **** * ** **        *  * *

                          70        80        90       100       110       120
                           ,         ,         ,         ,         ,         ,
A. fulgidus TGT     ITNSYIIYRS--MREEALEKGVHGILETDMPVMTDSGSYQLMVYGDVEIKNAEIVEFQRH
P. horikoshii TGT   ITNSYIIYKDEELRRKALELGIHRMLDYNGIIEVDSGSFQLMKYGSIEVSNREIIEFQHR
                    ********     *  *** * *  *       **** *** **  *  * ** ***

                         130       140       150         160       170
                           ,         ,         ,         ,         ,
A. fulgidus TGT     IGSDIIVPLDIPTPPDADYATAESDLRITLEREREAKELLKGAENLLAVPVQGSTHPDLR
P. horikoshii TGT   IGVDIGTFLDIPTPPDAPREQAVKELEITLSRAREAEEI---KEIPMNATIQGSTYTDLR
                    ** **   *********    *   * *** * *** *     *       ****  ***

                     180       190       200       210       220       230
                      ,         ,         ,         ,         ,         ,
A. fulgidus TGT     RFAAGEARKIGGDIYPIGAVVPLMDAYRFRDLARVILEVRSAL-PVEPIHLFGCGHPMLF
P. horikoshii TGT   RYAARRLSSMNFEIHPIGGVVPLLESYRFRDVVDIVISSKMALRPDRPVHLFGAGHPIVF
                    * **         * *** ****   *****          ** *  * **** ***  *

                       240       250       260       270       280       290
                        ,         ,         ,         ,         ,         ,
A. fulgidus TGT     AMAVALGCDLFDSAAYALYAKDDRYLTVYGTKKLSELNYFPCKCPVCSNHDPEELRRMEK
P. horikoshii TGT   ALAVAMGVDLFDSASYALYAKDDRYMTPEGTKRLDELDYFPCSCPVCSKYTPQELREMPK
                    * *** * ****** ********** *  *** * ** **** *****   * *** * *

                     300       310       320       330       340       350
                      ,         ,         ,         ,         ,         ,
A. fulgidus TGT     NERERLIAEHNLYVSFQEIETIKQAIKENSLFELVEKRVRAHPNMLAGWRQVKHYWELLE
P. horikoshii TGT   EERTRLLALHNLWVIKEEIKRVKQAIKEGELWRLVDERARSHPKLYSAYKRLLEHYTFLE
                     ** ** * *** *   **   ******  *  **  * * **              **

                     360       370       380       390                 400
                      ,         ,         ,         ,                   ,
A. fulgidus TGT     KADPKMKRKFLYT-GIDSLYRPAVRRHVKAIKNVELPEEVLVSTDFGIYANIYLRPVFGP
P. horikoshii TGT   EFEPITKKSALFKISNESLRWPVVRRAKERAKSIN-----------ERFGELVEHPIFGR
                       *  *   *      **  * ***     *                     * **

                       410       420       430       440       450       460
                        ,         ,         ,         ,         ,         ,
A. fulgidus TGT     VPAEMLETYPAGHAEIPEEDVVEEEALKAASEALMEL--------------------MNS
P. horikoshii TGT   VSRYLSLTYPFAQSEAEDDFKIEKPTKEDAIKYVMAIAEYQFGEGASRAFDDAKVELSKT
                    *      ***    *       *      *    *

                       470       480       490       500       510       520
                        ,         ,         ,         ,         ,         ,
A. fulgidus TGT     HPEKRFKVYVSKV---------------WMKHLQNLPPNGELNVLS--------------
P. horikoshii TGT   GMPRQVKVNGKRLATVRADDGLLTLGIEGAKRLHRVLPYPRMRVVVNKEAEPFARKGKDV
                          **                      * *    *      *

                       530       540       550       560       570       580
                        ,         ,         ,         ,         ,         ,
A. fulgidus TGT     ---------------------------------------------------------
P. horikoshii TGT   FAKFVIFADPGIRPYDEVLVVNENDELLATGQALLSGREMIVFQYGRAVKVRKGVE
```

```
                                10        20        30        40        50        60
                                 '         '         '         '         '         '
A. pernix TGT        --------MFEIRDVDLAGRIGRIYTQHGVVETPAFFPVIDVYRQEVSVDEVRAAGFGQV
P. horikoshii TGT    MSRGDKMLKFEIKARDGAGRIGKLEVNGKKIETPAIMPVVNPKQMVVEPKELEKMGFEII
                                 ***   * *****         ****  **       *   *    **

                                70        80        90        100       110       120
                                 '         '         '         '         '         '
A. pernix TGT        ITNAYLLWKR--FGWEAAEKGVHRILGFPGVVMTDSGAYQILEYGGVELSQGEVVEYQKR
P. horikoshii TGT    ITNSYIIYKDEELRRKALELGIHRMLDYNGIIEVDSGSFQLMKYGSIEVSNREIIEFQHR
                     *** *   *       * * * ** *   *    ***  *   **  * *  *  * * *
                                130       140       150          160       170
                                 '         '         '            '         '
A. pernix TGT        LGSDIAVILDIPTG-DVGRREAEESVRETIRRALEARVMIEGDERIWVYPVQGGRYFDLV
P. horikoshii TGT    IGVDIGTFLDIPTPPDAPREQAVKELEITLSRAREAEEI---KEIPMNATIQGSTYTDLR
                      * **   *****  *  *  *      *  ** **       *       **  * **

                      180       190       200       210       220       230
                       '         '         '         '         '         '
A. pernix TGT        EESARVGGRLGFYRMYGIGSPTVFLERYMYHVVVEAVYRAKKHL-PWGRPVHLFGAGHPL
P. horikoshii TGT    RYAARRLSSMN-FEIHPIGGVVPLLESYRFRDVVDIVISSKMALRPD-RPVHLFGAGHPI
                        **            **     ** *    **  *   *  * *  ***********

                        240       250       260       270       280       290
                         '         '         '         '         '         '
A. pernix TGT        IFPYAVALGVDTFDSASYILYAREGRYITEYGVYRIEDLDYLPCSCPVCSRYTPQELREM
P. horikoshii TGT    VFALAVAMGVDLFDSASYALYAKDDRYMTPEGTKRLDELDYFPCSCPVCSKYTPQELREM
                      *  *** *** ****** ***   ** *  *  *   *** ******** *********

                        300       310       320       330       340       350
                         '         '         '         '         '         '
A. pernix TGT        DRVERTRLLALHNLYVISASMRRVKQAIREGRLWELLEETSRKHPSTARVMARMRRYIDA
P. horikoshii TGT    PKEERTRLLALHNLWVIKEEIKRVKQAIKEGELWRLVDERARSHPKLYSAYKRLLEHYTF
                        *********** **     ****** ** ** *  *  * **       *

                        360          370       380       390
                         '            '         '         '
A. pernix TGT        LEKGSARGRGVVRGVRAY-GLESLSNPRLSRFSSDAARLVEAMAEKWGGGKAVLKPLDPK
P. horikoshii TGT    LEEFEPITK---KSALFKISNESLRWPVVRRAKE-RAKSIN-------------------
                     **                   ***  *   *     *

                                      400       410       420       430
                                       '         '         '         '
A. pernix TGT        PEPGQCESMVGGGEWILFYQPFLGVFPVEACGAYPSLQIDYPQEGLPAEVIGDLASKIAS
P. horikoshii TGT    -----------ERFGELVEHPIFGRVSRYLSLTYPFAQSEAEDDFKIEKPTKEDAIK--Y
                                          *  *         **  *                *

                    440       450       460       470       480       490
                     '         '         '         '         '         '
A. pernix TGT        TVSI--------------------LRGRGFTVRLEYCGKV--------------EWQARA
P. horikoshii TGT    VMAIAEYQFGEGASRAFDDAKVELSKTGMPRQVKVNGKRLATVRADDGLLTLGIEGAKRL
                        *                                                  *   *

                    500       510             520       530       540       550
                     '         '               '         '         '         '
A. pernix TGT        VEALKTAAAGDLPTVEACG----------------------------------------
P. horikoshii TGT    HRVLPYPRMRVVV------NKEAEPFARKGKDVFAKFVIFADPGIRPYDEVLVVNENDEL

                          560       570       580
                           '         '         '
A. pernix TGT        -----------------------------
P. horikoshii TGT    LATGQALLSGREMIVFQYGRAVKVRKGVE
```

BAD AVG GOOD

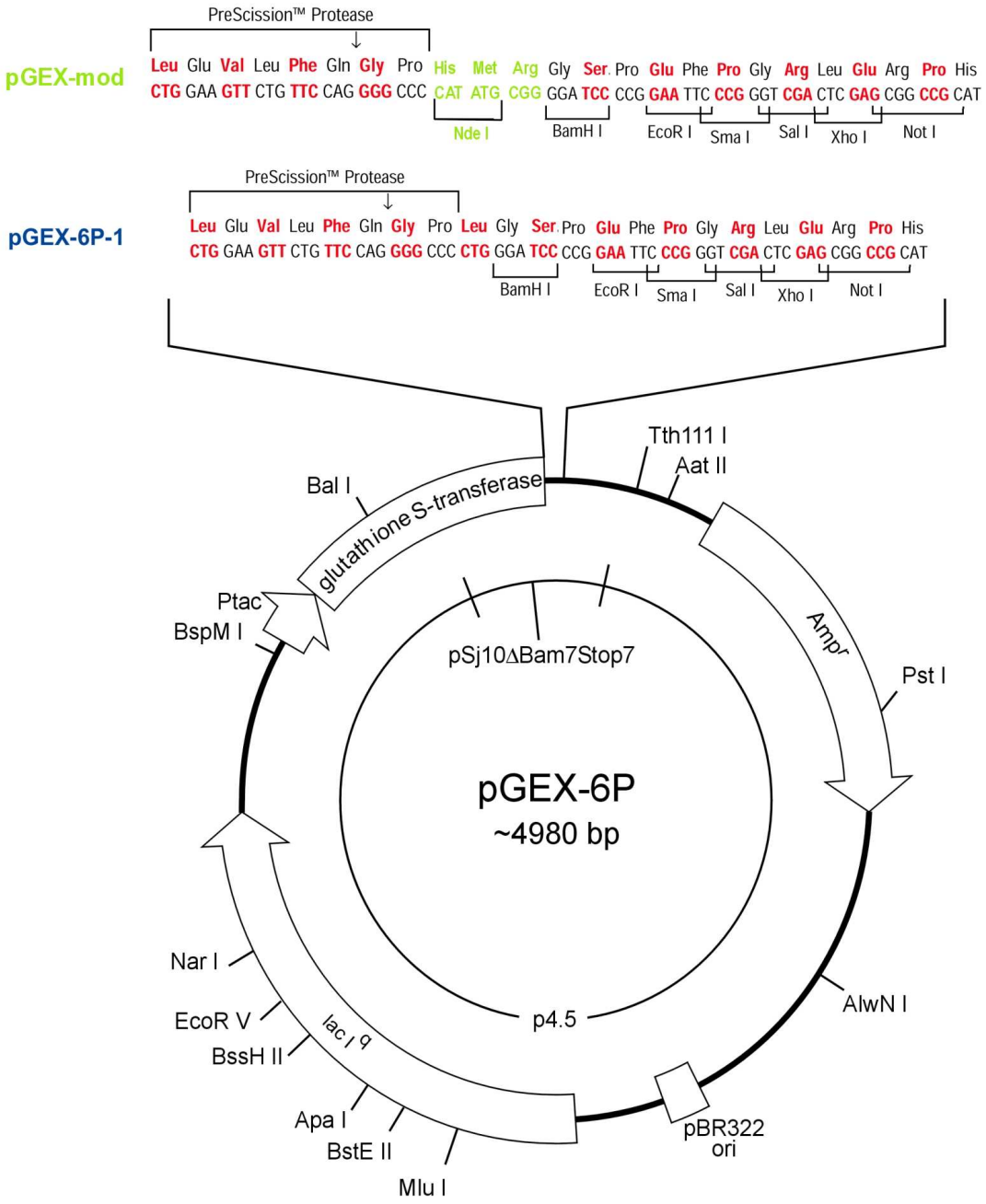
B. Sequenzalignment der QueA-Enzyme

```
                          10        20        30        40        50        60
                           ,         ,         ,         ,         ,         ,
B. subtilis QueA   MKVDLFDFELPERLIAQVPLEQRDASRLMVLDKHTGELTDSSFKHIISFFNEGDCLVLNN
E. coli QueA       MRVTDFSFELPESLIAHYPMPERSSCRLLSLDGPTGALTHGTFTDLLDKLNPGDLLVFNN
                   * *  * ***** ***  *   *   **  **  ** **   *       * ** ** **

                          70        80        90       100       110       120
                           ,         ,         ,         ,         ,         ,
B. subtilis QueA   TRVLPARLFGTKEDTGAKVELLLLKQETGDKWETLAKPAKRVKKGTVVTFGDGRLKAICT
E. coli QueA       TRVIPARLFGRKA-SGGKIEVLVERMLDDKRILAHIRASKAPKPGAELLLGDDE-SINAT
                   *** ****** *   * * * *                 *  * *     **      *

                         130       140       150       160        170
                           ,         ,         ,         ,          ,
B. subtilis QueA   EELEHGGR-KMEFQYDGIFYEVLESLGEMPLPPYIKEQLDDKER--YQTVYSKEIGSAAA
E. coli QueA       MTARHGALFEVEFNDERSVLDILNSIGHMPLPPYIDRPDEDADRELYQTVYSEKPGAVAA
                       **     **         * * * *******     *  *  ******   *  **

                    180       190       200       210       220       230
                     ,         ,         ,         ,         ,         ,
B. subtilis QueA   PTAGLHFTEEILQQLKDKGVQIEFITLHVGLGTFRPVSADEVEEHNMHAEFYQMSEETAA
E. coli QueA       PTAGLHFDEPLLEKLRAKGVEMAFVTLHVGAGTFQPVRVDTIEDHIMHSEYAEVPQDVVD
                   ******* *  *  *  ***   * ***** *** **  *  * * ** *

                    240       250       260        270       280       290
                     ,         ,         ,          ,         ,         ,
B. subtilis QueA   ALNKVRENGGRIISVGTTSTRTLETIA-GEHDGQFKASSGWTSIFIYPGYEFKAIDGMIT
E. coli QueA       AVLAAKARGNRVIAVGTTSVRSLESAAQAAKNDLIEPFFDDTQIFIYPGFQYKVVDALVT
                   *       * * * ***** * **  *               * ******   *  *   *

                     300       310       320       330       340
                      ,         ,         ,         ,         ,
B. subtilis QueA   NFHLPKSSLIMLVSALAGRENILRAYNHAVEEEYRFFSFGDAMLII------------
E. coli QueA       NFHLPESTLIMLVSAFAGYQHTMNAYKAAVEEKYRFFSYGDAMFITYNPQAINERVGE
                   ***** * ******* **      **  **** ***** **** *
```

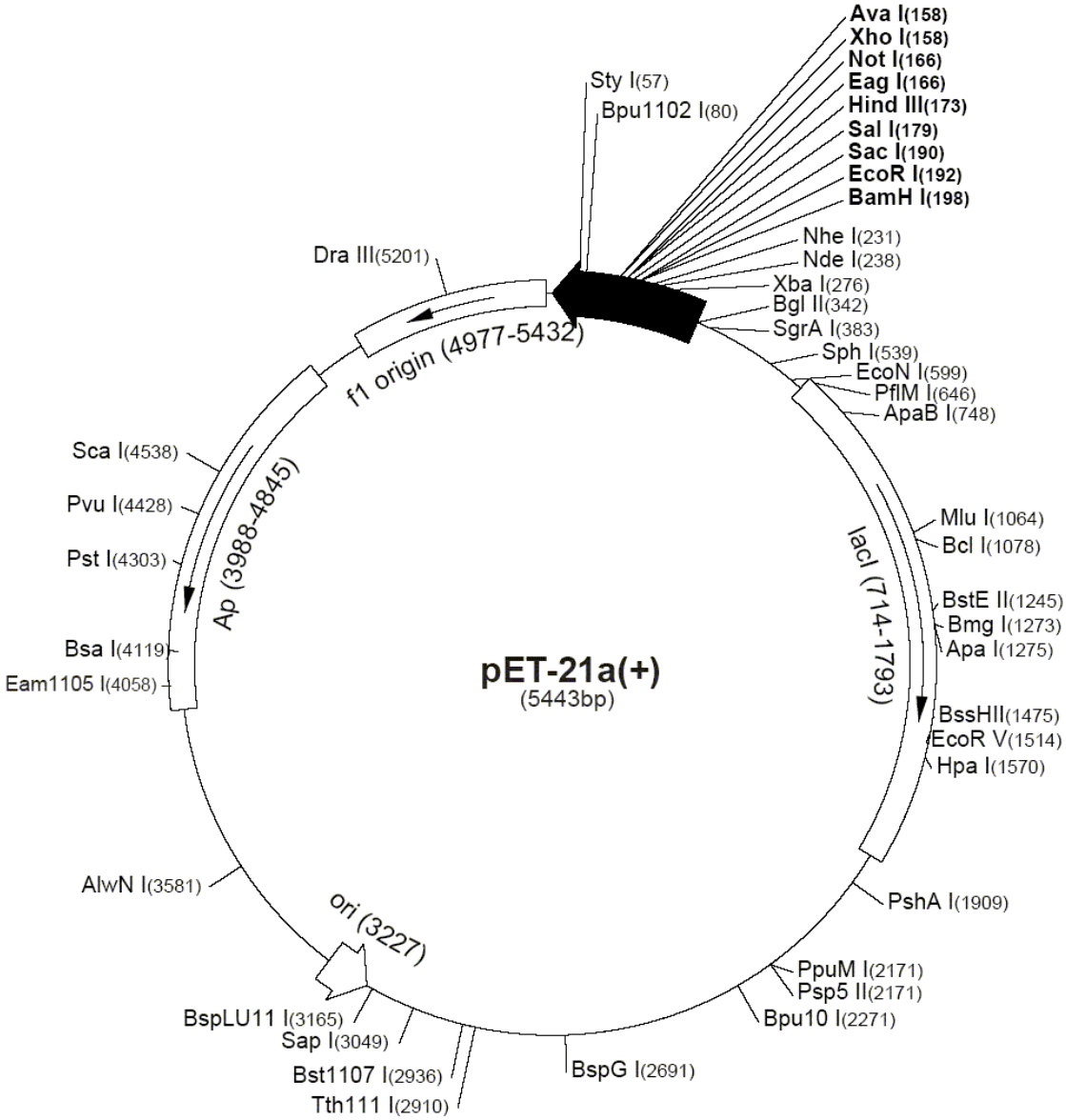
Die Aminosäuresequenz, die in gelb hervorgehoben ist, kennzeichnet das Konstrukt der größeren Domäne der *B. subtilis* QueA, das durch Mutageneseverfahren erhalten wurde. Die kleinere Domäne mit einem Molekulargewicht von 11,4 kDa umfasst die Aminosäure-sequenz, die in grün und lila dargestellt ist. Die kleinere Domäne der *B. subtilis* QueA mit einer Größe von 9,7 kDa wurde nach dem Entfernen von 14 Aminosäureresten (lila) erhalten.

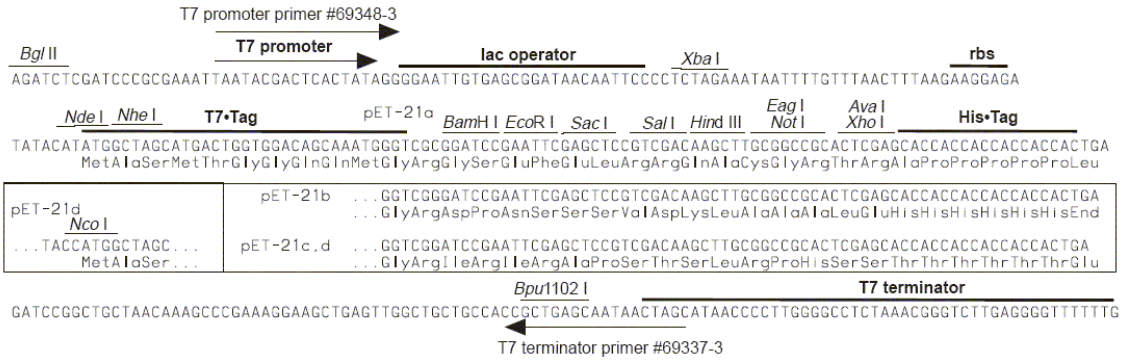
C. Überexpressionsvektoren

Modifizierter pGEX-6P-1-Vektor

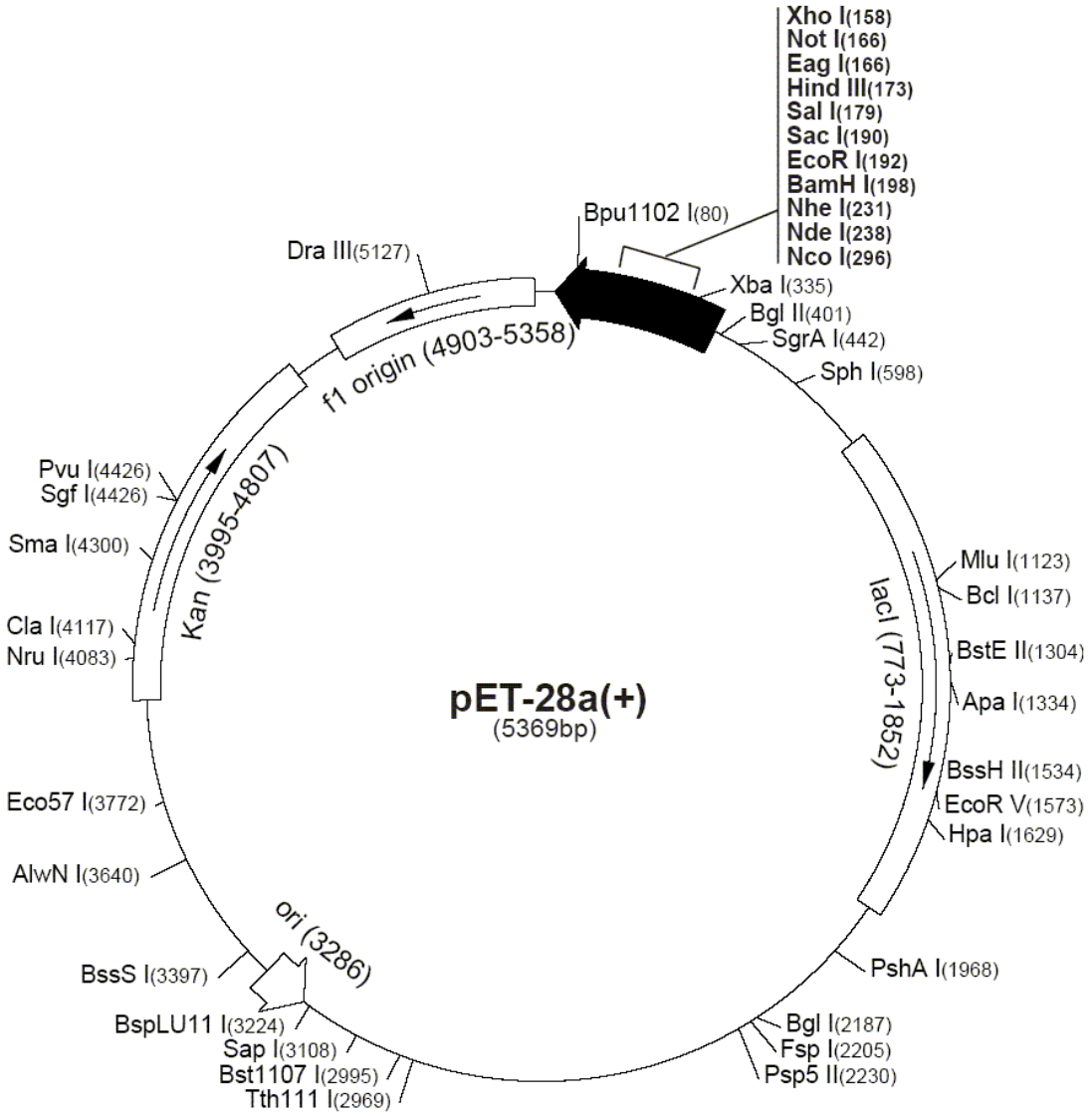


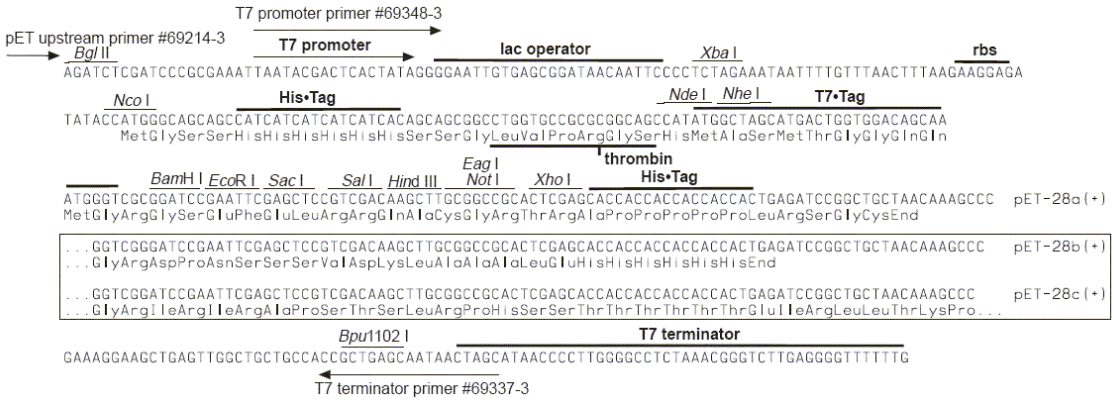
pET21a-Vektor



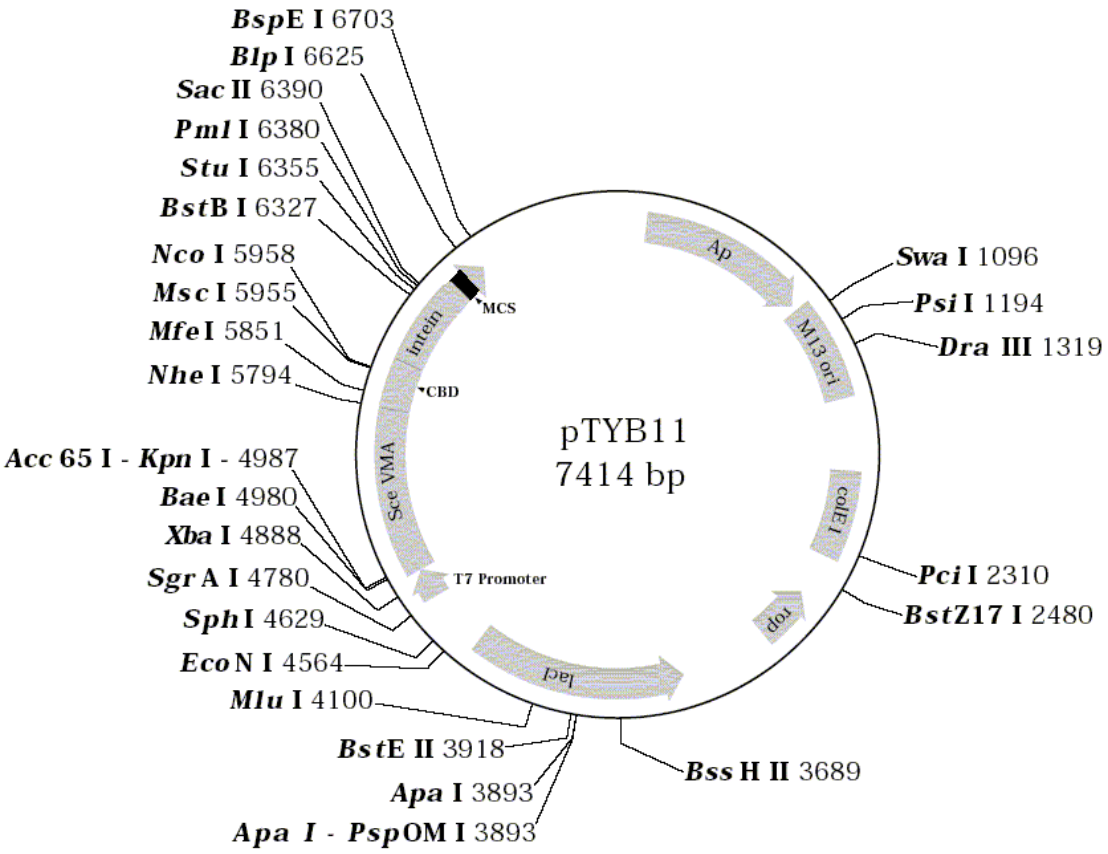


pET28b-Vektor





pTYB12-Vektor



pTYB12

Intein Forward Primer →

←Intein ▼

... Val Gln Asn Ala Gly His Met Thr Ser Ser Arg

(117 bp) 5´...GGA TCC CAG GTT GTT GTA CAG AAT GCT GGT CAT ATG ACT AGT TCG CGA

Bsm I *Nde* I *Spe* I *Nru* I

Val Asp Gly Gly Arg Glu Phe Leu Glu Pro Gly

GTC GAC GGC GGC CGC GAA TTC CTC GAG CCC GGG TGA CTG CAG...3´ (58 bp) ←T7 Terminator Reverse Primer

Sal I *Not* I *Eco* R I *Xho I* *Sma I* *Pst I*

Literaturverzeichnis

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287 (5461), 2185-2195.

Atkinson, P. W., Pinkerton, A. C. & O'Brochta, D. A. (2001). Genetic transformation systems in insects. *Annu Rev Entomol* 46, 317-346.

Auerbach, G., Herrmann, A., Gutlich, M., Fischer, M., Jacob, U., Bacher, A. & Huber, R. (1997). The 1.25 Å crystal structure of sepiapterin reductase reveals its binding mode to pterins and brain neurotransmitters. *Embo J* 16 (24), 7219-7230.

Bai, Y., Fox, D. T., Lacy, J. A., Van Lanen, S. G. & Iwata-Reuyl, D. (2000). Hypermodification of tRNA in Thermophilic archaea. Cloning, overexpression, and characterization of tRNA-guanine transglycosylase from *Methanococcus jannaschii*. *J Biol Chem* 275 (37), 28731-28738.

Bairoch, A. & Murzin, A. G. (1997). Sequences and topology: Predicting evolution. *Curr Opin Struct Biol* 7 (3), 367-368.

Bashford, D. (1997). Scientific computing in object-oriented parallel environments. In *Lecture Notes in Computer Science* (Ishikawa, Y., Oldehoeft, R. R., Reynders, J. V. W. & Marydell, T., eds.), Vol. 1343, pp. 233-240, Springer, Berlin.

Bates, G. (2003). Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet* 361 (9369), 1642-1644.

Benach, J., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R. & Ladenstein, R. (1998). The refined crystal structure of *Drosophila lebanonensis* alcohol dehydrogenase at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* 282 (2), 383-399.

Bergfors, T. M. (1999). *Protein crystallization techniques, strategies and tips: a laboratory manual*, International University Line, La Jolla, CA.

Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28 (1), 235-242.

Bhattacharya, S. K. & Sur, D. (2003). An evaluation of current shigellosis treatment. *Expert Opin Pharmacother* 4 (8), 1315-1320.

Bio-Rad. SmartSpec™ 3000 - Instruction manual.

Botella, J. A., Ulschmid, J., Gruenewald, C., Moehle, C., Kretzschmar, D., Becker, K. & Schneuwly, S. (2004). The *Drosophila* carbonyl reductase Sniffer prevents oxidative stress-induced neurodegeneration. *Curr Biol,* in Press.

Boyer, P. D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E. & Slater, E. C. (1977). Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Annu Rev Biochem* 46, 955-1026.

Brenk, R. (2002). Virtuelles Screening, strukturbasiertes Design und Kristallstrukturanalyse von Inhibitoren der tRNA-Guanin Transglykosylase, ein Target der Bakterienruhr. Doktorarbeit, Philipps-Universität, Marburg.

Breton, R., Housset, D., Mazza, C. & Fontecilla-Camps, J. C. (1996). The structure of a complex of human 17b-hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and $NADP^+$ identifies two principal targets for the design of inhibitors. *Structure* 4 (8), 905-915.

Brünger, A. T. (1992). The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355, 472-474.

Brünger, 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., et al. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D* 54, 905-921.

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

Chen, Z., Jiang, J. C., Lin, Z. G., Lee, W. R., Baker, M. E. & Chang, S. H. (1993). Site-specific mutagenesis of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: evidence for involvement of tyrosine-152 and lysine-156 in catalysis. *Biochemistry* 32 (13), 3342-3346.

Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 71 (2), 621S-629S.

Cleland, W. W. (1963). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochim Biophys Acta* 67, 104-137.

Connolly, M. L. (1983). Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. *Science* 221 (4612), 709-713.

Cowtan, K. D. & Zhang, K. Y. (1999). Density modification for macromolecular phase improvement. *Prog Biophys Mol Biol* 72 (3), 245-270.

Curnow, A. W. & Garcia, G. A. (1995). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli.* Minimal tRNA structure and sequence requirements for recognition. *J Biol Chem* 270 (29), 17264-17267.

Curnow, A. W., Kung, F. L., Koch, K. A. & Garcia, G. A. (1993). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: gross tRNA structural requirements for recognition. *Biochemistry* 32 (19), 5239-46.

Danson, M. J. & Hough, D. W. (1998). Structure, function and stability of enzymes from the Archaea. *Trends Microbiol* 6 (8), 307-314.

De Felice, F. G. & Ferreira, S. T. (2002). b-amyloid production, aggregation, and clearance as targets for therapy in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol* 22 (5-6), 545-563.

Dehio. (1998). Virulenzmechanismus des Ruhrerregers *S. flexneri*: Ein Paradigma der Pathogenitätsforschung. *Biospektrum* 3, 25-29.

DeLano, W. L. & Brünger, A. T. (1995). The direct rotation function: rotational patterson correlation search applied to molecular replacement. *Acta Crystallogr D* 51, 740-748.

Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62 (6), 649-671.

Durand, J. M., Bjork, G. R., Kuwae, A., Yoshikawa, M. & Sasakawa, C. (1997). The modified nucleoside 2-methylthio-N6-isopentenyladenosine in tRNA of *Shigella flexneri* is required for expression of virulence genes. *J Bacteriol* 179 (18), 5777-5782.

Durand, J. M., Dagberg, B., Uhlin, B. E. & Bjork, G. R. (2000). Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of *Shigella flexneri*: the expression of the virF gene. *Mol Microbiol* 35 (4), 924-935.

Durand, J. M., Okada, N., Tobe, T., Watarai, M., Fukuda, I., Suzuki, T., Nakata, N., Komatsu, K., Yoshikawa, M. & Sasakawa, C. (1994). vacC, a virulence-associated chromosomal

locus of *Shigella flexneri*, is homologous to *tgt*, a gene encoding tRNA-guanine transglycosylase (TGT) of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* 176 (15), 4627-4634.

Expasy. URL: http://www.expasy.org/cgi-bin.

Flybase. URL: http://flybase.bio.indiana.edu.

Frey, B., McCloskey, J., Kersten, W. & Kersten, H. (1988). New function of vitamin B12: cobamide-dependent reduction of epoxyqueuosine to queuosine in tRNAs of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 170 (5), 2078-2082.

Gaasterland, T. (1999). Archaeal genomics. *Curr Opin Microbiol* 2 (5), 542-547.

Garcia, G. & Goodenough-Lashua, D. M. (1998). Mechanism of RNA-modifying and -editing enzymes. In *Modification and Editing of RNA* (Grosjean, H. & Benne, R., eds.), pp. 135-168, ASM Press, Washington, DC.

Gerber, P. R. & Müller, K. (1995). MAB, a generally applicable molecular force field for structure modelling in medicinal chemistry. *J Comput Aided Mol Des* 9 (3), 251-268.

Ghosh, D., Pletnev, V. Z., Zhu, D. W., Wawrzak, Z., Duax, W. L., Pangborn, W., Labrie, F. & Lin, S. X. (1995). Structure of human estrogenic 17b-hydroxysteroid dehydrogenase at 2.20 Å resolution. *Structure* 3 (5), 503-513.

Ghosh, D., Sawicki, M., Pletnev, V., Erman, M., Ohno, S., Nakajin, S. & Duax, W. L. (2001). Porcine carbonyl reductase. structural basis for a functional monomer in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem* 276 (21), 18457-18463.

Ghosh, D., Weeks, C. M., Grochulski, P., Duax, W. L., Erman, M., Rimsay, R. L. & Orr, J. C. (1991). Three-dimensional structure of holo 3a,20b-hydroxysteroid dehydrogenase: a member of a short-chain dehydrogenase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (22), 10064-10068.

Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182 (2), 319-326.

Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B., Vitols, E., et al. (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302 (5651), 1727-1736.

Gish, W. & States, D. J. (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet* 3 (3), 266-272.

Gonzalez, J. M., Masuchi, Y., Robb, F. T., Ammerman, J. W., Maeder, D. L., Yanagibayashi, M., Tamaoka, J. & Kato, C. (1998). *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles* 2 (2), 123-130.

Gorman, A. M., McGowan, A., O'Neill, C. & Cotter, T. (1996). Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *J Neurol Sci* 139 Suppl, 45-52.

Gregson, J. M., Crain, P. F., Edmonds, C. G., Gupta, R., Hashizume, T., Phillipson, D. W. & McCloskey, J. A. (1993). Structure of the archaeal transfer RNA nucleoside G*-15 (2-amino-4,7-dihydro-4-oxo-7-beta-D-ribofuranosyl-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carboximidamide (archaeosine)). *J Biol Chem* 268 (14), 10076-10086.

Grimm, C. (2000b). Röntgenkristallographische Studien an Nukleotidkofaktor-bindenden Enzymen. Doktorarbeit, Philipps-Universität, Marburg.

Grimm, C., Klebe, G., Ficner, R. & Reuter, K. (2000c). Screening orthologs as an important variable in crystallization: preliminary X-ray diffraction studies of the tRNA-modifying enzyme S-adenosylmethionine: tRNA ribosyl transferase/isomerase. *Acta Crystallogr D* 56 (4), 484-488.

Grimm, C., Maser, E., Mobus, E., Klebe, G., Reuter, K. & Ficner, R. (2000a). The crystal structure of 3a-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni* shows a novel oligomerization pattern within the short-chain dehydrogenase/reductase family. *J. Biol. Chem.* 275 (52), 41333-41339.

Grosse-Kunstleve, R. W. & Adams, P. D. (2001). Patterson correlation methods: a review of molecular replacement with CNS. *Acta Crystallogr D* 57 (10), 1390-1396.

Hendrickson, W. A., Horton, J. R. & LeMaster, D. M. (1990). Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *Embo J* 9 (5), 1665-1672.

Hendrickson, W. A. & Ogata. (1997). MAD. In *Methods Enzymol* (Carter, R. W. & Sweet, R. M., eds.), Vol. 276A, pp. 494-523, Academic Press.

Holm, L. & Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J Mol Biol* 233 (1), 123-138.

Hough, D. W. & Danson, M. J. (1999). Extremozymes. *Curr Opin Chem Biol* 3 (1), 39-46.

Huang, X. & Miller, A. (1991). A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Advances in Applied Mathematics* 12, 337-357.

Hülsmeyer, M., Hecht, H. J., Niefind, K., Hofer, B., Eltis, L. D., Timmis, K. N. & Schomburg, D. (1998). Crystal structure of cis-biphenyl-2,3-dihydrodiol-2,3-dehydrogenase from a PCB degrader at 2.0 Å resolution. *Protein Sci* 7 (6), 1286-1293.

Hutchinson, E. G. & Thornton, J. M. (1996). Promotif - a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Sci* 5 (2), 212-220.

Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Kijimoto, T., Nameki, N., Watanabe, M., Kondo, H., Sekine, M., Okada, N., Nishimura, S., et al. (2002). Crystal structure of archaeosine tRNA-guanine transglycosylase. *J Mol Biol* 318 (3), 665-677.

Ishitani, R., Nureki, O., Nameki, N., Okada, N., Nishimura, S. & Yokoyama, S. (2003). Alternative tertiary structure of tRNA for recognition by a posttranscriptional modification enzyme. *Cell* 113 (3), 383-394.

Jones, S. & Thornton, J. M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1), 13-20.

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

Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J. & Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 34 (18), 6003-6013.

Kantardjieff, K. A. & Rupp, B. (2003). Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci* 12 (9), 1865-1871.

Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Yamazaki, S., Haikawa, Y., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., et al. (1999). Complete genome sequence of an

aerobic hyperthermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res* 6 (2), 83-101, 145-152.

Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, Y., Hino, Y., Yamamoto, S., Sekine, M., Baba, S., Kosugi, H., Hosoyama, A., et al. (1998). Complete sequence and gene organization of the genome of a hyperthermophilic archaebacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3 (supplement). *DNA Res* 5 (2), 147-155.

Kinzie, S. D., Thern, B. & Iwata-Reuyl, D. (2000). Mechanistic studies of the tRNA-modifying enzyme QueA: a chemical imperative for the use of AdoMet as a "ribosyl" donor. *Org Lett* 2 (9), 1307-1310.

Kissinger, C. R., Gehlhaar, D. K. & Fogel, D. B. (1999). Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. *Acta Crystallogr D* 55, 484-491.

Kittendorf, J. D., Barcomb, L. M., Nonekowski, S. T. & Garcia, G. A. (2001). tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: molecular mechanism and role of aspartate 89. *Biochemistry* 40 (47), 14123-14133.

Kittendorf, J. D., Sgraja, T., Reuter, K., Klebe, G. & Garcia, G. A. (2003). An essential role for aspartate 264 in catalysis by tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278 (43), 42369-42376.

Klenk, H. P., Clayton, R. A., Tomb, J. F., White, O., Nelson, K. E., Ketchum, K. A., Dodson, R. J., Gwinn, M., Hickey, E. K., Peterson, J. D., et al. (1997). The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* 390 (6658), 364-370.

Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1996). xdlMAPMAN and xdlDATAMAN - Programs for reformatting, analysis and manipulation of biomacromolecular electron-density maps and reflection data sets. *Acta Crystallogr D* 52, 826-828.

Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1998). Databases in protein crystallography. *Acta Crystallogr D* 54, 1119-1131.

Knight, R. (2001). Creutzfeldt-Jakob disease: a protein disease. *Proteomics* 1 (6), 763-766.

Kumar, S. & Nussinov, R. (2001). How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell Mol Life Sci* 58 (9), 1216-1233.

Lämmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-686.

Lamzin, V. S. & Wilson, K. S. (1993). Automated refinement of protein models. *Acta Crystallogr D* 49, 129-149.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B. & Nusbaum, C. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 (6822), 860-921.

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

Leatherbarrow, R. GraFit, 4.09 edit., Erithacus Software Limited, USA.

Lesk, A. M. (1995). NAD-binding domains of dehydrogenases. *Curr Opin Struct Biol* 5 (6), 775-783.

McCloskey, J. A., Graham, D. E., Zhou, S., Crain, P. F., Ibba, M., Konisky, J., Soll, D. & Olsen, G. J. (2001). Post-transcriptional modification in archaeal tRNAs: identities and phylogenetic relations of nucleotides from mesophilic and hyperthermophilic *Methanococcales*. *Nucleic Acids Res* 29 (22), 4699-4706.

McLachlan, A. D. (1982). Rapid comparison of protein structures. *Acta Crystallogr A* 38, 871-873.

Merril, C. R., Dunau, M. L. & Goldmann, D. (1981). A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 110 (1), 201-207.

Michaelis, M. L., Chen, Y., Hill, S., Reiff, E., Georg, G., Rice, A. & Audus, K. (2002). Amyloid peptide toxicity and microtubule-stabilizing drugs. *J Mol Neurosci* 19 (1-2), 101-105.

Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem* 19 (14), 1632-1662.

Mouradian, M. M. (2002). Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurology* 58 (2), 179-185.

Müller, S. O. & Slany, R. K. (1995). Structural analysis of the interaction of the tRNA modifying enzymes TGT and QueA with a substrate tRNA. *FEBS Lett* 361 (2-3), 259-264.

Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T. & Chothia, C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* 247 (4), 536-540.

Nakanishi, S., Ueda, T., Hori, H., Yamazaki, N., Okada, N. & Watanabe, K. (1994). A UGU sequence in the anticodon loop is a minimum requirement for recognition by *Escherichia coli* tRNA-guanine transglycosylase. *J Biol Chem* 269 (51), 32221-32225.

Navaza, J. (1994). AMoRe. *Acta Crystallogr A* 50, 157-163.

Nonekowski, S. T. & Garcia, G. A. (2001). tRNA recognition by tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: the role of U33 in U-G-U sequence recognition. *Rna* 7 (10), 1432-1441.

Notredame, Higgins & Heringa. (2000). T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Biol Chem* 302 (1), 205-217.

Okada, N. & Nishimura, S. (1979). Isolation and characterization of a guanine insertion enzyme, a specific tRNA transglycosylase, from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 254 (8), 3061-3066.

Oppermann, U. C., Filling, C., Berndt, K. D., Persson, B., Benach, J., Ladenstein, R. & Jörnvall, H. (1997). Active site directed mutagenesis of 3b,17b-hydroxysteroid dehydrogenase establishes differential effects on short-chain dehydrogenase/ reductase reactions. *Biochemistry* 36 (1), 34-40.

Otwinowski, Z. & Minor, W. (1996). Processing of X-ray data diffraction data collected in oscillation mode. In *Methods Enzymology* (Carter, R. W. & Sweet, R. M., eds.), Vol. 276, pp. 307-326, Academic Press.

Persson, B., Krook, M. & Jörnvall, H. (1991). Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur J Biochem* 200 (2), 537-543.

Powell, A. J., Read, J. A., Banfield, M. J., Gunn-Moore, F., Yan, S. D., Lustbader, J., Stern, A. R., Stern, D. M. & Brady, R. L. (2000). Recognition of structurally diverse substrates

by type II 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH II)/amyloid-b binding alcohol dehydrogenase (ABAD). *J Mol Biol* 303 (2), 311-327.

Pymol. URL: http://pymol.sourceforge.net.

Rafferty, J. B., Simon, J. W., Baldock, C., Artymiuk, P. J., Baker, P. J., Stuitje, A. R., Slabas, A. R. & Rice, D. W. (1995). Common themes in redox chemistry emerge from the X-ray structure of oilseed rape (*Brassica napus*) enoyl acyl carrier protein reductase. *Structure* 3 (9), 927-938.

Romier, C., Ficner, R., Reuter, K. & Suck, D. (1996c). Purification, crystallization, and preliminary x-ray diffraction studies of tRNA-guanine transglycosylase from *Zymomonas mobilis*. *Proteins* 24 (4), 516-519.

Romier , C., Ficner, R. & Suck, D. (1998). Structural Basis of Base Exchange by tRNA Guanine Transglycosylase. In *Modification and editing of RNA* (Benne, R., ed.), pp. 169-182, ASM Press, Washington, DC.

Romier, C., Meyer, J. E. & Suck, D. (1997). Slight sequence variations of a common fold explain the substrate specificities of tRNA-guanine transglycosylases from the three kingdoms. *FEBS Lett* 416 (1), 93-98.

Romier, C., Reuter, K., Suck, D. & Ficner, R. (1996a). Crystal structure of tRNA-guanine transglycosylase: RNA modification by base exchange. *Embo J* 15 (11), 2850-2857.

Romier, C., Reuter, K., Suck, D. & Ficner, R. (1996b). Mutagenesis and crystallographic studies of *Zymomonas mobilis* tRNA-guanine transglycosylase reveal aspartate 102 as the active site nucleophile. *Biochemistry* 35 (49), 15734-15739.

Rossmann, M. G. & Blow, D. M. (1962). *Acta Crystallogr A* 15, 24-51.

Rossmann, M. G., Liljas, A., Bränden, C.-I. & Banaszak, L. J. (1975). *Evolutionary and structural relationship among dehydrogenases*. The Enzymes (Boyer, P. D., Ed.), Academic Press, New York.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Ehrlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (4839), 487-491.

Sako, Y., Nomura, N., Uchida, A., Ishida, Y., Morii, H., Koga, Y., Hoaki, T. & Maruyama, T. (1996). *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic

archaeon growing at temperatures up to 100 degrees C. *Int J Syst Bacteriol* 46 (4), 1070-1077.

Sali, A. & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234 (3), 779-815.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - a laboratory manual*. 2nd edit, Cold Springer Harbor, New York.

Sansonetti, P. J. (2001). Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280 (3), G319-G323.

Sansonetti, P. J. & Phalipon, A. (1999). M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin Immunol* 11 (3), 193-203.

Schneider, T. R. & Sheldrick, G. M. (2002). Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D* 58, 1772-1779.

Schulz, J. B., Lindenau, J., Seyfried, J. & Dichgans, J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267 (16), 4904-4911.

Sciotti, M. A., Nakajin, S., Wermuth, B. & Baker, M. E. (2000). Mutation of threonine-241 to proline eliminates autocatalytic modification of human carbonyl reductase. *Biochem J* 350, 89-92.

Sheldrick, G. M. (2002). Macromolecular phasing with SHELXE. *Z Kristallographie* 217, 1-7.

Sheldrick, G. M. SHELXTL 6.13, edit., Bruker AXS.

Sheldrick, G. M. & Schneider, T. R. (1997). SHELXL. In *Methods Enzymology* (Carter, R. W. & Sweet, R. M., eds.), Vol. 277b, pp. 319-343, Academic Press.

Shulman, J. M., Shulman, L. M., Weiner, W. J. & Feany, M. B. (2003). From fruit fly to bedside: translating lessons from *Drosophila* models of neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurol* 16 (4), 443-449.

Slany, R. K., Bosl, M., Crain, P. F. & Kersten, H. (1993). A new function of S-adenosylmethionine: the ribosyl moiety of AdoMet is the precursor of the

cyclopentenediol moiety of the tRNA wobble base queuine. *Biochemistry* 32 (30), 7811-7817.

Slany, R. K., Bosl, M. & Kersten, H. (1994). Transfer and isomerization of the ribose moiety of AdoMet during the biosynthesis of queuosine tRNAs, a new unique reaction catalyzed by the QueA protein from *Escherichia coli*. *Biochimie* 76 (5), 389-393.

Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F. & Kowall, N. (1996). Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 382 (6587), 120-121.

Somers, W. S., Stahl, M. L. & Sullivan, F. X. (1998). GDP-fucose synthetase from *Escherichia coli*: structure of a unique member of the short-chain dehydrogenase/ reductase family that catalyzes two distinct reactions at the same active site. *Structure* 6 (12), 1601-1612.

Stetter, K. O. (1988). *Archaeglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov.: a new taxon of extremely thermophilic archaebacteria. *System Appl Microbiol* 10, 172-173.

Stetter, K. O. (1999). Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett* 452 (1-2), 22-25.

SYBYL. Molecular Modelling Software, 6.9 edit., Tripos Associates, Inc., St. Louis, MO.

Tanaka, N., Nonaka, T., Nakanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A. & Mitsui, Y. (1996b). Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 Å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/ reductase family. *Structure* 4 (1), 33-45.

Tanaka, N., Nonaka, T., Tanabe, T., Yoshimoto, T., Tsuru, D. & Mitsui, Y. (1996a). Crystal structures of the binary and ternary complexes of 7α-hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 35 (24), 7715-7730.

Terada, T., Sugihara, Y., Nakamura, K., Sato, R., Inazu, N. & Maeda, M. (2000). Cloning and bacterial expression of monomeric short-chain dehydrogenase/reductase (carbonyl reductase) from CHO-K1 cells. *Eur J Biochem* 267, 6849-6857.

Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J Appl Cryst* 30, 1022-1025.

Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L. & Clardy, J. (1993). Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J Mol Biol* 229 (1), 105-124.

Van Lanen, S. G. & Iwata-Reuyl, D. (2003a). Kinetic mechanism of the tRNA-modifying enzyme S-adenosylmethionine: tRNA ribosyltransferase/Isomerase (QueA). *Biochemistry* 42 (18), 5312-5320.

Van Lanen, S. G., Kinzie, S. D., Matthieu, S., Link, T., Culp, J. & Iwata-Reuyl, D. (2003b). tRNA modification by S-adenosylmethionine: tRNA ribosyltransferase/Isomerase. Assay development and characterization of the recombinant enzyme. *J Biol Chem* 278 (12), 10491-10499.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291 (5507), 1304-1351.

Voet, D. & Voet, J. G. (1992). *Biochemie*, 315-317 und 765-769, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

Watanabe, K., Sugawara, C., Ono, A., Fukuzumi, Y., Itakura, S., Yamazaki, M., Tashiro, H., Osoegawa, K., Soeda, E. & Nomura, T. (1998). Mapping of a novel human carbonyl reductase, CBR3, and ribosomal pseudogenes to human chromosome 21q22.2. *Genomics* 52 (1), 95-100.

Watanabe, M., Matsuo, M., Tanaka, S., Akimoto, H., Asahi, S., Nishimura, S., Katze, J. R., Hashizume, T., Crain, P. F., McCloskey, J. A., et al. (1997). Biosynthesis of archaeosine, a novel derivative of 7-deazaguanosine specific to archaeal tRNA, proceeds via a pathway involving base replacement on the tRNA polynucleotide chain. *J Biol Chem* 272 (32), 20146-20151.

Watanabe, M., Nameki, N., Matsuo-Takasaki, M., Nishimura, S. & Okada, N. (2001). tRNA recognition of tRNA-guanine transglycosylase from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus horikoshii*. *J Biol Chem* 276 (4), 2387-2394.

Wermuth, B., Bohren, K. M., Heinemann, G., von Wartburg, J. P. & Gabbay, K. H. (1988). Human carbonyl reductase. Nucleotide sequence analysis of a cDNA and amino acid sequence of the encoded protein. *J Biol Chem* 263 (31), 16185-16188.

Wikipedia. URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Drosophila.

Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5088-5090.

Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (12), 4576-4579.

Xie, W., Liu, X. & Huang, R. H. (2003). Chemical trapping and crystal structure of a catalytic tRNA guanine transglycosylase covalent intermediate. *Nat Struct Biol* 10 (10), 781-788.

Danksagung

- Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe und PD Dr. Klaus Reuter für die vielfältige und interessante Themenstellung, die ständige Diskussionsbereitschaft sowie die gewährte Freiheit zur eigenständigen Bearbeitung der Themen.
- Bei Dr. Andreas Heine bedanke ich mich für die gute Einführung in das Gebiet der Proteinkristallographie und die stete Hilfsbereitsschaft bei allen kristallographischen Fragestellungen.
- Jeffrey D. Kittendorf und Dr. George Garcia vom Pharmazeutischen Institut an der Universität Michigan, USA danke ich für die gute Zusammenarbeit bezüglich der Studien über die Funktion des Asp280 in der eubakteriellen TGT. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Ruth Brenk, die mir die Gelegenheit gegeben hat, das Projekt zu bearbeiten.
- Prof. Dr. Milton Stubbs danke ich, dass er das Projekt über das Sniffer-Protein an mich weitergegeben hat. Bei Prof. Dr. Katja Becker-Brandenburg bedanke ich mich für die Gelegenheit, die Kristallstruktur dieses Enzyms bestimmen zu können. Bei Julia Ulschmid bedanke ich mich für die gute Einführung in das Reinigungs- und Kristallisationsprotokoll des Sniffer-Proteins.
- Dr. Christoph Sotriffer danke ich für die Einführung in AutoDock und die Hilfestellung bei der Interpretation der Ergebnisse. Paul Czodrowski danke ich für die pK_a-Wert Berechnung, Dr. Andreas Evers für die Erstellung von Homologiemodellen sowie Dr. Ruth Brenk und Bernhard Stengl für die fachlichen Diskussionen bezüglich der TGT.
- Christian Sohn danke ich für die Betreuung des Röntgendiffraktometers und des Kristallisationslabors.
- Bei allen Mitgliedern des AK Klebe bedanke ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die fachlichen Diskussionen und die stete Hilfsbereitschaft. Meinen Dank geht auch an die Administratoren des Computerverbundes sowie die Assistenten des 1. Semesters.
- Meinen Eltern danke ich für die stete Fürsorge und die finanzielle Unterstützung während meines Studiums und meiner Doktorarbeit.
- Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Freund Daniel für die erholsamen Pausen und die Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Vorträge, Posterbeiträge und Publikationen hervorgegangen:

Vortrag:

- Sgraja, T., Ulschmid, K., Klebe, G., Reuter, K., Heine, A., *Crystal structure of the Sniffer protein of Drosophila melanogaster*. Vortrag präsentiert beim „Japanese-German Meeting“ im Sorat Hotel, Marburg (2003).

Posterbeiträge:

- Sgraja, T., Reuter, K., Klebe, G., *tRNA-guanine transglycosylase of hyperthermophilic archaea*. Poster präsentiert bei der Jahrestagung der DPhG, Frankfurt (2001).

- Sgraja, T., Klebe, G., Reuter, K., *tRNA-guanine transglycosylases of hyperthermophilic archaea and eubacteria*. Poster präsentiert auf der ICCBM9 Tagung, Jena (2002).

- Sgraja, T., Heine, A., Ulschmid, J., Reuter, K., Becker, K., Klebe, G., *The* Drosophila *carbonyl reductase Sniffer prevents oxidative stress-induced neurodegeneration*. Poster präsentiert auf der Jahrestagung der GDCh, Fachgruppe Medizinische Chemie, Fulda (2003).

Aufsätze:

- Kittendorf, J. D., Sgraja, T., Reuter, K., Klebe, G., Garcia, G. (2003). *An essential role for aspartate 264 in catalysis by tRNA-guanine transglycosylase form Escherichia coli*. *JBC* 278 (43), 42369-42376.

- Sgraja, T., Ulschmid, J., Becker, K., Schweuly, S., Klebe, G., Reuter, K., Heine, A., *Structural insights into the neuroprotective acting carbonyl reductase Sniffer of* Drosophila melanogaster. Veröffentlichung voraussichtlich in *JMB.*

Die Koordinaten der Kristallstrukturen der TGT(D280E) aus *Z. mobilis* im Komplex mit $preQ_1$ und des Sniffer-Proteins aus *D. melanogaster* im Komplex mit $NADP^+$ sind in der Protein-Datenbank unter den Zugriffcodes 1PXG und 1SNY abgelegt.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

"Röntgenkristallographische Studien von Nukleotidkofaktor-bindenden und tRNA-modifizierenden Enzymen"

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch in keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 19. Mai 2004 (Tanja Sgraja)

Lebenslauf

Name	Tanja Alexandra Sgraja
Geburtstag	26. Oktober 1974
Geburtsort	Schweinfurt
Sep. 1981 - Jul. 1985	Grundschule in Schweinfurt
Sep. 1985 - Jul. 1994	Olympia-Morata-Gymnasium in Schweinfurt
Jul. 1994	Abitur
Okt. 1994 - Apr. 1999	Studium der Pharmazie an der Bayer. Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
Mai 1999 - Okt. 1999	Pharmaziepraktikum in der Kronen-Apotheke in Schweinfurt
Nov. 1999 - Apr. 2000	Pharmaziepraktikum bei der Knoll AG in Ludwigshafen
Jul. 2000	Approbation zur Apothekerin
Okt. 2000 - Mai 2004	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Betreuung von Prof. Dr. G. Klebe und PD Dr. K. Reuter am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg
Okt. 2000 - Sep. 2003	Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Proteinfunktion auf atomarer Ebene“ der Philipps-Universität Marburg