

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

Röntgenkristallographische Untersuchung von Proteinen der Pterin-Biosynthese

Gerd Bader

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der
Technischen Universität München zu Erlangung
des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huber
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Die Dissertation wurde am 08.06.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Chemie am 09.07.2001 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von April 1997 bis Juni 2001 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich danken für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Anleitung durchzuführen, vor allem jedoch für die große Freiheit, die die Arbeit zu einer sehr angenehmen Erfahrung werden ließ.

Herrn Prof. Dr. Adelbert Bacher möchte ich für die gute und stets angenehme Zusammenarbeit sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Im weiteren gilt mein Dank all den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Bacher, die zu meiner Arbeit beigetragen haben, insbesondere Dr. Markus Fischer, Dr. Christoph Haussmann, Dr. Anja Herrmann, Susanne Schiffmann und Dr. Andreas Giessauf.

Bei Dr. Jens Kaiser, Dr. Andreas Bergner und Dr. Stefan Steinbacher möchte ich mich für die Hilfe bei allen kristallographischen und computertechnischen Problemen bedanken.

Frau Renate Rüller und Frau Gina Beckmann gilt mein Dank für ihre wertvolle Hilfe bei der Überwindung aller bürokratischer Hindernisse. Ein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle auch Herrn Werner Dersch für seine stete Hilfsbereitschaft und Kompetenz bei allen technischen Problemen

Allen Mitgliedern der Abteilung Strukturforschung möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken Dies gilt insbesondere für Stefan Gerhardt, Dr. Thomas Dams, Dr. Thorsten Lemm, Dr. Holger Dobbek, Dr. Oliver Einsle, Dr. Clemens Steegborn und Dr. Peter Hof.

Herrn Dr. Hans Bartunik und Gleb Bourenkov möchte ich für ihre Arbeit am DESY in Hamburg danken.

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2	EINLEITUNG.....	4
2.1	PTERINE.....	4
2.2	BIOSYNTHESE VON MOLYBDOPTERIN.....	4
2.3	BIOSYNTHESE VON TETRAHYDROBIOPTERIN	9
2.4	RÖNTGENSTRUKTURANALYSE VON PROTEINEN	12
2.4.1	<i>Überblick.....</i>	<i>12</i>
2.4.2	<i>Kristallisation.....</i>	<i>13</i>
2.4.3	<i>Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen.....</i>	<i>14</i>
2.4.4	<i>Berechnung der Elektronendichte</i>	<i>17</i>
2.4.5	<i>Lösung des Phasenproblems</i>	<i>17</i>
2.4.5.1	<i>Isomorpher Ersatz.....</i>	<i>18</i>
2.4.5.2	<i>Multiple anomale Dispersion.....</i>	<i>20</i>
2.4.5.3	<i>Molekularer Ersatz.....</i>	<i>22</i>
3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	24
3.1.1	<i>Sequenzanalyse und –vergleich.....</i>	<i>24</i>
3.1.2	<i>Konzentrierung von Proteinen</i>	<i>24</i>
3.1.3	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....</i>	<i>24</i>
3.2	KRISTALLOGRAPHISCHE METHODEN.....	25
3.2.1	<i>Kristallisation.....</i>	<i>25</i>
3.2.2	<i>Datensammlung.....</i>	<i>25</i>
3.2.3	<i>Datenauswertung</i>	<i>26</i>
3.2.4	<i>Phasierung</i>	<i>26</i>
3.2.5	<i>Modellbau und Verfeinerung.....</i>	<i>27</i>
3.2.6	<i>Modellanalyse und graphische Darstellung.....</i>	<i>27</i>
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	28

4.1	MOAB AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i>	28
4.1.1	<i>Klonierung, Reinigung und Expression</i>	28
4.1.2	<i>Kristallisation</i>	29
4.1.3	<i>Datensammlung</i>	30
4.1.4	<i>Strukturlösung</i>	33
	<i>Strukturbeschreibung</i>	33
4.1.5.1	Struktur des Monomers.....	33
4.1.5.2	Struktur des Hexamers.....	34
4.1.6	<i>Diskussion</i>	35
4.1.6.1	Vergleich zu MogA	35
4.1.6.2	Das aktive Zentrum.....	39
4.1.6.3	Weitere homologe Strukturen.....	40
4.1.6.4	Funktion von MoaB.....	42
4.2	MOAC AUS <i>AQUIFEX AEOLICUS</i>	44
4.2.1	<i>Klonierung, Expression und Reinigung</i>	44
4.2.2	<i>Kristallisation und Datensammlung</i>	44
4.2.3	<i>Strukturlösung</i>	46
4.2.4	<i>Strukturbeschreibung</i>	47
4.2.4.1	Struktur des Monomers.....	47
4.2.4.2	Struktur des Hexamers.....	49
4.2.5	<i>Diskussion</i>	51
4.2.5.1	Die C-terminale Domäne	51
4.2.5.2	Das aktive Zentrum.....	53
4.2.5.3	Funktion von MoaC.....	54
4.3	GTP CYCLOHYDROLASE I.....	56
4.3.1	<i>humane GTP Cyclohydrolase I</i>	56
4.3.1.1	Expression und Reinigung.....	56
4.3.1.2	Kristallisation	57
4.3.1.3	Datensammlung und Auswertung.....	58
4.3.1.4	Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung	58
4.3.1.5	Strukturbeschreibung.....	59
4.3.1.6	Zinkbindung	61

4.3.2	<i>E. coli</i> GTP Cyclohydrolase I.....	62
4.3.2.1	Datensammlung und Auswertung.....	62
4.3.2.2	Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung	63
4.3.2.3	Strukturbeschreibung.....	63
4.3.3	<i>Diskussion</i>	65
4.4	GFRP	68
4.4.1	<i>Klonierung, Expression und Reinigung</i>	68
4.4.2	<i>Kristallisation und Datensammlung</i>	68
4.4.3	<i>Multipler isomorpher Ersatz</i>	69
4.4.4	<i>Modellbau und Verfeinerung</i>	69
4.4.5	<i>Strukturbeschreibung</i>	71
4.4.6	<i>Biochemische Untersuchung der Komplexbildung</i>	75
4.4.7	<i>Verwandte Strukturen</i>	77
5	ABKÜRZUNGEN	78
6	LITERATURVERZEICHNIS	78

1 Zusammenfassung

Molybdoenzyme spielen eine wichtige Rolle im Kohlenstoff- Schwefel- und Stickstoffmetabolismus der meisten Organismen. Mit Ausnahme der Nitrogenasen enthalten alle Molybdoenzyme im aktiven Zentrum den Molybdän-Kofaktor. Der organische Teil dieses Kofaktors ist Molybdopterin, ein trizyklisches 6-Alkylpterin. Die Biosynthese von Molybdopterin ist bislang wenig verstanden. Vermutlich wird GTP von den Proteinen des *moa*-Operons zu Molybdopterin umgesetzt. Einzig bekannte Zwischenstufe ist hierbei der Precursor Z, ein 6-Alkylpterin dem noch die Dithiolenfunktion des Molybdopterins fehlt.

Ziel dieser Arbeit war die röntgenkristallographische Untersuchung von Proteinen des *moa*-Operons um ein besseres Verständnis der Molybdopterin Biosynthese zu erlangen.

MoaB

Die dreidimensionale Struktur von MoaB aus *Escherichia coli* konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Multiple Anomale Dispersion (MAD) an einem selenomethioninmarkierten Kristall gelöst werden. Das hierfür nötige Protein wurden vom Arbeitskreis von Prof. Bacher (TU München) zur Verfügung gestellt.

MoaB bildet ein Hexamer mit $\alpha/\beta/\alpha$ -Struktur und zeigt große Ähnlichkeit zu MogA aus *E. coli*, einem Protein das ebenfalls an der Molybdän-Kofaktor-Biosynthese beteiligt ist. Da es bisher nicht gelang, Komplexe von MoaB zu kristallisieren und keinerlei biochemische Daten zur Funktion vorliegen, ist diese noch unbekannt. Der Vergleich zu MogA läßt jedoch vermuten, daß MoaB Pterine bindet, die als Zwischenstufen der Molybdän-Kofaktor Biosynthese auftreten.

MoaC

MoaC synthetisiert vermutlich den Precursor Z aus einer bislang unbekanntem Vorstufe. Die Struktur von MoaC aus *Aquifex aeolicus* konnte durch Molekularen Ersatz mit *E. coli* MoaC als Suchmodell gelöst werden. Auch *A. aeolicus* MoaC bildet ein Hexamer, ist jedoch

signifikant größer als das *E. coli*-Protein. Die zusätzliche Domäne von *A. aeolicus* MoaC zeigt große Ähnlichkeit zu MoaB, was vermuten läßt, daß MoaB und MoaC in *A. aeolicus* ein Fusionsprotein bilden. Die genaue Funktion von MoaC und die Aufgabe der zusätzlichen Domäne konnte jedoch bislang nicht geklärt werden.

GTP Cyclohydrolase I

GTP Cyclohydrolase I katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Synthese von Tetrahydrobiopterin aus GTP. Gemeinsam mit Dr. Günter Auerbach konnte die Struktur von humaner GTP Cyclohydrolase I gelöst werden und in der schon bekannten Struktur des *E. coli*-Proteins ein bislang nicht entdecktes Zinkion im aktiven Zentrum nachgewiesen werden. Dies ermöglicht ein besseres Verständnis des komplexen Reaktionsmechanismus von GTP Cyclohydrolase I.

GFRP

In Säugern wird die Aktivität von GTP Cyclohydrolase I durch das GTP cyclohydrolase I Feedback Regulatory Protein, GFRP, reguliert. Gemeinsam mit Dr. Thorsten Lemm konnte die Struktur von GFRP aus Ratte gelöst werden. Zudem wurde ein Modell für die Komplexbildung mit GTP Cyclohydrolase aufgestellt.

Veröffentlichungen, die Teile dieser Arbeit beinhalten bzw. beinhalten werden:

Auerbach, G., Herrmann, A., Bracher, A., Bader, G., Gütlich, M., Fischer, M., Neukamm, M., Garrido-Franco, M., Richardson, J., Nar, H., Huber, R., & Bacher, A. (2000). Zinc plays a key role in human and bacterial GTP cyclohydrolase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13567-13572.

Bader, G., Schiffmann, S., Hermann, A., Fischer, M., Gütlich, M., Auerbach, G., Ploom, T., Bacher, A. & Lemm, T. Crystal structure of rat GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein, GFRP. *Manuskript submitted zu J. Mol. Biol.*

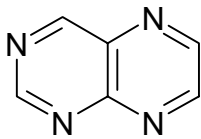
Bader, G., Gomez-Ortiz, M., Haussmann, C., Giessauf, A., Bacher, A., Huber, R. & Fischer, M. Crystal structure of the Molybdenum Cofactor biosynthesis protein MoaB from *Escherichia coli*. *Manuskript in Vorbereitung.*

Bader, G., Gerhardt, S., Fischer, M., Bacher, A., & Huber, R. Crystal structure of MoaC from *Aquifex aeolicus*. *Manuskript in Vorbereitung.*

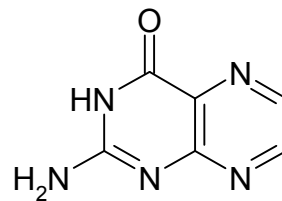
2 Einleitung

2.1 Pterine

Pteridin ist ein bicyclisches Ringsystem, das den Grundkörper einer Gruppe weit verbreiteter Naturstoffe bildet, die vor allem in Augen und Flügeln von Insekten, sowie der Haut von Fischen, Amphibien und Reptilien vorkommen. Die vom Pteridin abgeleiteten Verbindungen werden als Pterine bezeichnet. Die Stammverbindung der natürlichen Pterine ist das 2-Amino-4(3H)-Pteridinon oder Pterin.



Pterin



Pteridin

Vom Pterin leiten sich unter anderem die wichtigen Kofaktoren Molybdopterin, Tetrahydrobiopterin (BH₄), Tetrahydrofolsäure (THF), sowie das dem Riboflavin zugrunde liegende Lumazin sowie ab.

2.2 Biosynthese von Molybdopterin

Molybdoenzyme spielen eine entscheidende Rolle im Kohlenstoff-, Schwefel- und Stickstoffmetabolismus in den meisten Organismen. Bis zum heutigen Tage besteht bei allen Molybdoenzymen, mit der einzigen Ausnahme der Nitrogenasen, das aktive Zentrum aus dem

Molybdän-Kofaktor (MoCF). Dieser besteht aus Molybdopterin (MPT), einem trizyklischen 6-Alkylpterin, das über eine Dithiolen-Gruppe in seiner 4-atomigen Seitenkette ein einzelnes Molybdänatom komplexiert. MPT zeigt in Eukaryonten und Prokaryonten zwar grundsätzlich die gleiche Struktur, in Bakterien wird jedoch noch zusätzliche Variabilität durch die Bindung eines weiteren Nucleotids (GMP, AMP, IMP oder CMP) an die Phosphatgruppe des MPT ermöglicht. So liegt in *E. coli* der Kofaktor als Molybdopterin-Guanidin-Dinucleotid (MGD) vor. In den letzten Jahren wurden einige Strukturen von Molybdopterin-haltigen Proteinen gelöst (Chan *et al.*, 1995) (Kisker *et al.*, 1997a) (Kisker *et al.*, 1997b; Romao *et al.*, 1995), die jeweils eine der bislang bekannten Familien der Molybdän-Kofaktor-haltigen Proteine repräsentieren. In Säugetieren wird der Molybdän-Kofaktor für die Aktivität der Proteine Xanthin-Oxidase, Aldehyd-Oxidase und Sulfit-Oxidase benötigt. Defekte in der Molybdän-Kofaktor-Biosynthese führen zu schwersten neurologischen Schäden, ähnlich denen, die auch bei isoliertem Sulfit-Oxidase-Mangel beobachtet werden, und zum Tod in früher Kindheit führen (Johnson & Wadman, 1995) (Scriver *et al.*, 1989) (Scriver *et al.*, 1995). Vor Kurzem wurden die ersten Gene, die an der humanen Molybdän-Kofaktor-Biosynthese beteiligt sind, gefunden und Mutationen in diesen Genen, die zu Molybdän-Kofaktor-Mangel führen, identifiziert (Reiss *et al.*, 1998a) (Reiss *et al.*, 1998b). Die Wege, die zur Bildung des Molybdän-Kofaktors und dessen Insertion in die entsprechenden Apo-Enzyme führen, sind bislang noch nicht vollständig verstanden. Große Fortschritte auf dem Weg zu einem Verständnis der beteiligten Prozesse konnte in der Vergangenheit durch die Untersuchung von Mutanten, die keine aktiven Molybdoenzyme produzieren konnten, gemacht werden. Diese Mutanten sind aus einem bislang nicht verstandenen Grund Chlorat-resistent und wurden daher ursprünglich als *chl*-Mutanten bezeichnet. Mit Hilfe dieser neuerdings als *mo*-Mutanten bezeichneten Mutanten konnten zahlreiche Gene identifiziert werden, die an der Bildung des Molybdän-Kofaktors beteiligt sind (Shanmugam *et al.*, 1992). Die Genprodukte von mindestens 5 verschiedenen Operons sind an der Biosynthese beteiligt: *moa*, *mob*, *mod*, *mog*

und *moe* (Rajagopalan, 1996; Rajagopalan, 1997). Das *mod*-Operon kodiert die Proteine ModA-E, ein *high affinity* ABC-Transporter, der für die Aufnahme von Molybdat verantwortlich ist (ModA-C) (Joshi *et al.*, 1996) (Hu *et al.*, 1997) (Lawson *et al.*, 1998), ein Protein mit bislang unbekannter Funktion, (ModD) sowie ModE, den entsprechenden molybdataabhängigen Repressor (Anderson *et al.*, 1997). Die Produkte des *mob*-Operons, MobA (teilweise auch als Protein FA bezeichnet (Palmer *et al.*, 1994) (Palmer *et al.*, 1998) und MobB (Eaves *et al.*, 1997) sind verantwortlich für die Addition eines Nucleotids an MPT in Bakterien (Johnson *et al.*, 1991). Von den *moe*-Genprodukten konnte für MoeB eine Funktion als Molybdopterin-Synthase-Sulfurylase nachgewiesen werden. MoeB überträgt unter Bildung eines C-terminalen Thiocarboxylats Schwefel auf den von MoaD gebildeten Teil der Molybdopterin-Synthase (Pitterle & Rajagopalan, 1993). Die physiologische Aufgabe von MoeA ist noch nicht geklärt, es wurde jedoch eine Rolle bei der Bildung einer aktivierten Molybdän-Species (möglicherweise Thiomolybdat) vorgeschlagen (Hasona *et al.*, 1998). Zudem wurde gezeigt, daß MoeA aus *Arthrobacter nicotinovorans* an Tubulin bindet (Menéndez *et al.*, 1997).

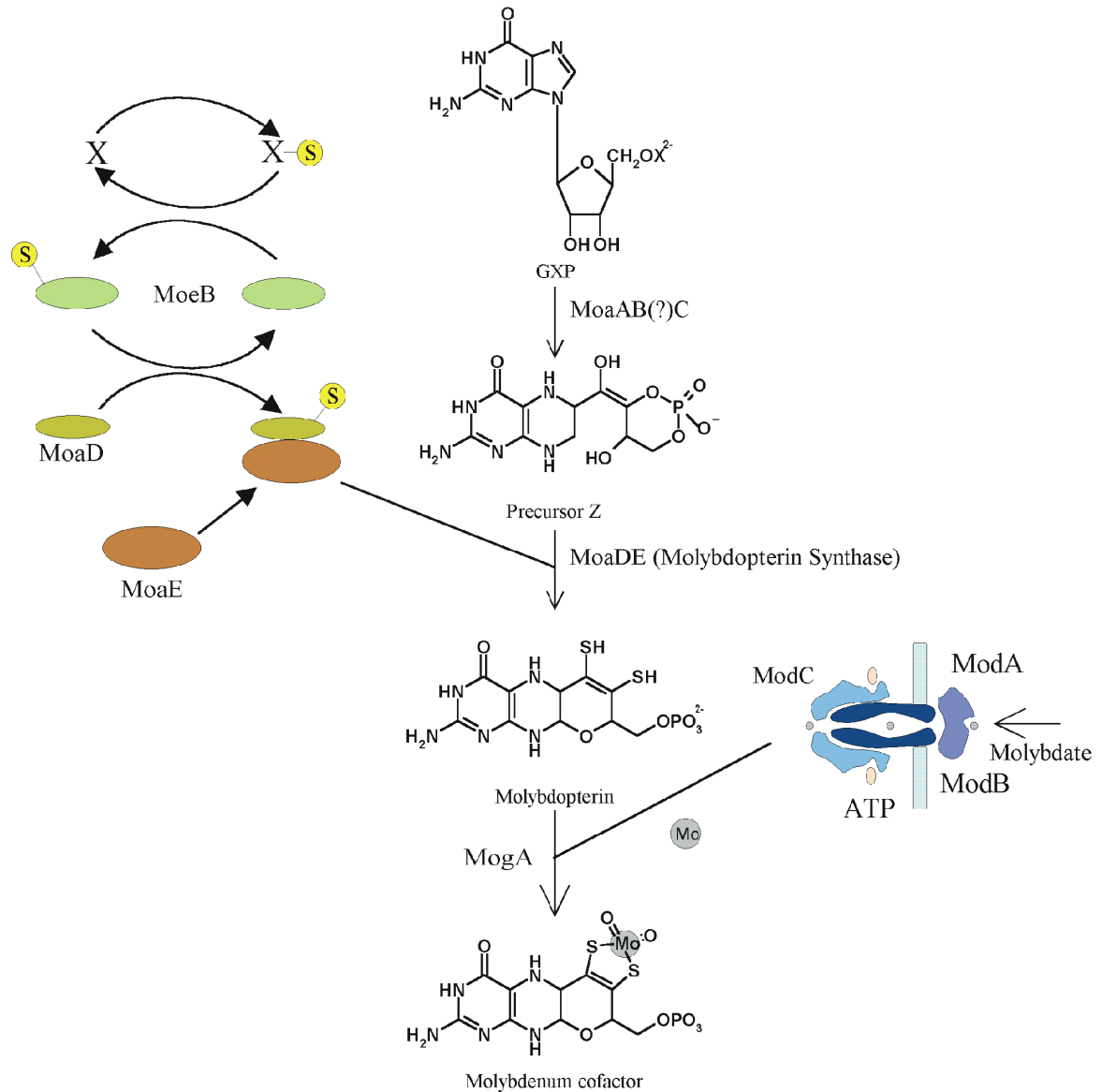


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Molybdän-Kofaktor Biosynthese in *E. coli*.

Aufgrund der Beobachtung, daß die Zugabe hoher Molybdatkonzentrationen zum Wachstumsmedium die Effekte von *mog*-Mutanten aufhebt, wurde für das *mog*-kodierte MogA eine Rolle als Molybdochelatase vorgeschlagen, die am Einbau von Molybdän in MPT beteiligt ist (Joshi et al., 1996). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit, in der auch die Kristallstruktur von MoaA aus *E. coli* vorgestellt wurde (Liu et al., 2000), konnte eine bislang nicht verstandene Rolle bei der Bildung von aktivem Molybdän-Kofaktor, die die Bindung von MPT an MogA beinhaltet, gezeigt werden. Die Bindung von MPT war jedoch in der

Röntgenstruktur trotz der hohen Auflösung von 1.45Å bzw. 1.6Å nicht zweifelsfrei zu erkennen. Auch die vorher erwartete Bindung von Molybdat an MogA konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Rolle der *moa*-Transcripte kann klar in zwei Schritte unterteilt werden. Im zweiten, derzeit vergleichsweise gut verstandenen Schritt, katalysiert Molybdopterin-Synthase (Rudolph *et al.*, 2001), ein Heterodimer aus MoaD und MoaE, die Umsetzung von Precursor Z zu MPT durch die Addition der Dithiolen-Schwefel an die Seitenkette der Zwischenstufe. Der erste Schritt des Biosyntheseweges, die Bildung von Precursor Z, ist jedoch weniger gut verstanden. Höchstwahrscheinlich dient GTP (oder ein anderes Guanidin-Derivat) als Substrat für MoaABC (Pitterle & Rajagopalan, 1993) (Rieder *et al.*, 1998) bei einer Reaktion, die sich deutlich von der Reaktion der CYH I unterscheidet (Wuebbens & Rajagopalan, 1995), wengleich für die Hefe *Pichia canadensis* andere Ergebnisse gefunden wurden (Irby *et al.* 1994). Der Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse konnte bislang nicht geklärt werden.

Durch die Analyse der *moa*-Sequenzen verschiedener *E. coli* Mutanten konnten Mutationen in *moaA*, *moaC*, *moaD* und *moaE* gefunden werden und somit die Beteiligung der entsprechenden Genprodukte in die Molybdopterin-Biosynthese bewiesen werden (Rivers *et al.*, 1993). MPT-defiziente Mutanten mit einer Mutation im *moaB*-Gen konnten bislang nicht identifiziert werden, was möglicherweise auf eine zu geringe Anzahl von untersuchten Mutanten zurückzuführen ist (Rajagopalan, 1996). MoaB weist eine erstaunlich hohe Homologie zu MogA auf (27.4 % Identität, 36.9 % Homologie). Außerdem zeigen MoaB/MogA eine deutlich Ähnlichkeit zu den eukaryontischen Proteinen Gephyrin (*Rattus norvegicus*), Cinnamon (*Drosophila melanogaster*) und Cnx1 (*Arabidopsis thaliana*). Es wurde gezeigt, daß Gephyrin notwendig für das Clustering von Glycin-Rezeptoren (Kirsch *et al.*, 1993) und GABA_A-Rezeptoren (Essrich *et al.*, 1998) ist, da es im Zentralen Nervensystem die Rezeptoren mit Tubulin verbindet. Außerdem wurde gezeigt, daß Gephyrin

in nichtneuronalem Gewebe notwendig für die Aktivität von Molybdoenzymen ist (Feng *et al.*, 1998) und darüber hinaus die Molybdopterin Biosynthese in Bakterien, Pflanzen und Säugerzellen rekonstituieren kann (Stallmeyer *et al.*, 1999). Gephyrin besteht aus einer N-terminalen Domäne homolog zu *E. coli* MoaB/MogA und einer C-terminalen Domäne, die dem *E. coli* Protein MoeA entspricht. Für beide Domänen konnte eine kooperative MPT-Bindung gezeigt werden. Das entsprechende Protein aus *Drosophila melanogaster*, Cinnamon, weist die gleiche Domänenstruktur auf und erfüllt auch die äquivalente Funktion in der Molybdopterin-Biosynthese (Kamdar *et al.*, 1994). Das Expressionsmuster von Cinnamon entspricht dem von Gephyrin im Zentralen Nervensystem von Ratten (Wittle & Kamdar, 1999). Das Protein Cnx1 aus *Arabidopsis thaliana* dient der selben Funktion, zeigt allerdings eine gegenüber Gephyrin und Cinnamon invertierte Anordnung seiner Domänen. Auch für Cnx1 konnte ein kooperatives Bindungsverhalten für MPT gezeigt werden (Schwarz *et al.*, 1997).

2.3 Biosynthese von Tetrahydrobiopterin

Tetrahydrobiopterin ist ein essentieller Kofaktor der Enzyme Phenylalanin Hydroxylase (PAH), Tyrosin Hydroxylase (TH) und Tryptophan Hydroxylase (TPH) (Nicol *et al.*, 1985). Außerdem dient BH₄ als Kofaktor in allen 3 Formen der Stickoxid-Synthasen (Marletta, 1994), sowie bei Glyceryl-Ether Monooxygenasen (Kaufmann *et al.*, 1990) und der Biosynthese von Neurotransmittern wie Serotonin und Catecholamin (Nicol *et al.*, 1985). Darüber hinaus wird für BH₄ noch eine Rolle bei der Zellproliferation (Tanaka *et al.*, 1989) sowie bei der Melanogenese (Schallreuter *et al.*, 1994) diskutiert.

Tetrahydrobiopterin-Defizienz führt zur sogenannten atypischen Phenylketonurie, die mit einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen verbunden ist (Scriver *et al.*, 1995). Zudem sind zahlreiche neuropsychiatrische Erkrankungen wie Parkinson (Curtius *et al.*, 1984), Alzheimer

und Depression (Blau *et al.*, 1993) (Thöny *et al.*, 2000) mit erniedrigten BH₄-Konzentrationen assoziiert.

Die Biosynthese von Tetrahydrobiopterin erfolgt in 3 Schritten. Im ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird Guanosin-5'-triphosphat (GTP) durch GTP Cyclohydrolase I (CYH I) zu 7,8-Dihydroneopterin-triphosphat umgesetzt. In einer komplexen Reaktion (Bracher *et al.*, 1999) wird der Imidazolring von GTP geöffnet, C-8 als Formiat eliminiert, die Ketogruppe durch eine Amadori-Umlagerung in C-2'-Stellung gebracht und schließlich der Pyrazinring wieder geschlossen. In einem zweiten, Zn- und Mg-abhängigen Schritt wandelt die 6-Pyruvoyl-tetrahydropterin-Synthase H₂NTP in 6-Pyruvoyl-triphosphat (6-PTP) um (Le Van *et al.*, 1988). Dabei wird die Triphosphat-Gruppe eliminiert, die Carbonylgruppen werden oxidiert und der Pterinring zur Tetrahydro-Form reduziert. Im letzten Schritt wird dann durch die Sepiapterin-Reduktase die Diketo-Seitenkette von 6-PTP zum Endprodukt des Biosyntheseweges, BH₄, reduziert.

Die Regulation der Biosynthese erfolgt in allen Organismen auf der Stufe der CYH I. In Säugetieren ist hierzu jedoch im Gegensatz zu bakteriellen Systemen ein weiteres Protein, GTP Cyclohydrolase I feedback regulatory protein, GFRP notwendig (Harada *et al.*, 1993; Milstien *et al.*, 1996). Dieses früher auch als p35 bezeichnete Protein vermittelt die feedback-Regulation der CYH I durch das Endprodukt des Biosyntheseweges, BH₄, mittels Bildung eines inhibitorischen Komplexes aus CYH I, GFRP und BH₄. Die Bindung von GTP und Phenylalanin an den GFRP/CYH I-Komplex aktiviert hingegen die BH₄-Biosynthese.

Bei den Reaktionen von PAH, TH und TPH wird BH₄ zu Tetrahydrobiopterin-4a-carbinolamin oxidiert. Die Regeneration des oxidierten Kofaktors erfolgt dann durch die Enzyme Pterin-4a-carbinolamin-Dehydratase (PCD) und Dihydropteridin-Reduktase (DHPR).

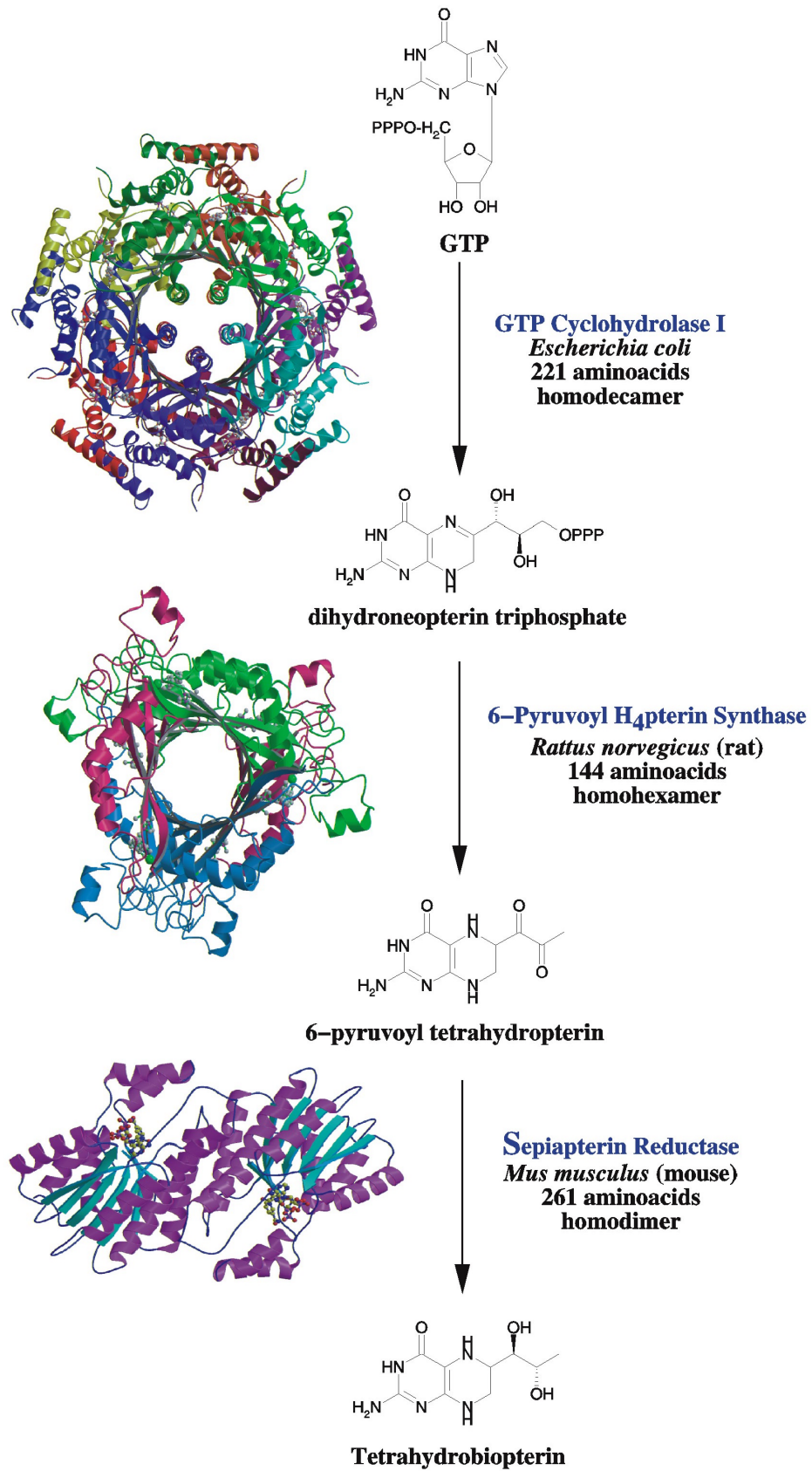


Abbildung 3: Biosynthese von Tetrahydrobiopterin (aus (Auerbach, 1997)).

Außer auf dem hier beschriebenen Weg kann BH_4 auch noch auf dem sogenannten *Salvage*-Biosyntheseweg erzeugt werden, indem Sepiapterin durch SR zu Dihydrobiopterin reduziert wird, welches wiederum durch Dihydrofolat-Reduktase zu BH_4 umgewandelt wird (Nicol et al., 1985). Der hier beschriebene *Salvage*-Biosyntheseweg ist jedoch nicht in der Lage, Defekte in der BH_4 -Synthese oder bei der Regeneration des Kofaktors zu kompensieren.

2.4 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

2.4.1 Überblick

Die Methode der Strukturaufklärung von Proteinen über die Röntgenkristallographie ist in verschiedenen Lehrbüchern ausführlich behandelt (Blundell & Johnson, 1976; Drenth, 1994; Stout & Jensen, 1989). Im folgenden werden die wichtigsten Grundprinzipien deshalb nur kurz dargestellt.

Das Grundproblem bei dem Versuch atomare Strukturen aufzulösen ist in der Tatsache zu finden, daß sie – anders als mikroskopische Strukturen – nur schwer der direkten Abbildung zugänglich sind, da man mit elektromagnetischen Wellen nur Strukturen deutlich oberhalb ihrer Wellenlänge visualisieren kann. Dies wird für die atomare Mikroskopie in der Elektronenmikroskopie verwendet. Unvorteilhafter Weise führt die Wechselwirkung von Elektronen mit Materie zur Zerstörung biologischer Proben und wirklich detaillierte ‚mikroskopische‘ Aufnahmen von Proteinen sind nur schwer zu erhalten. Man ist statt dessen auf die Ausnutzung von Interferenzeffekten von Röntgenstrahlung angewiesen, die Wellenlängen im Bereich der zu untersuchenden Strukturen besitzt. Die wichtigsten Röntgenquellen für die Proteinstrukturanalyse sind Drehanodengeneratoren, meist mit $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung (1.54182Å) und Synchrotrone mit Wellenlängen der Strahlung zwischen 0.9 und 1.8Å.

Zur Ausbildung von Interferenzeffekten ist eine dreidimensional periodische Anordnung des zu untersuchenden Objekts notwendig: ein Kristall. Eines der Grundprobleme der Proteinstrukturaufklärung mit Röntgenmethoden ist somit die Erzeugung eines Proteinkristalls.

2.4.2 Kristallisation

Die Kristallisation von Proteinen sollte unter möglichst physiologischen Bedingungen stattfinden. Weiterhin sollte das Protein in hochreiner Form vorliegen. Heutzutage sind verschiedene Methoden zur Erzeugung von Proteineinkristallen bekannt (McPherson, 1982), von denen der Dampfdiffusionsmethode die weitaus größte Bedeutung zukommt. Bei dieser Methode wird dem hochkonzentrierten Protein ein Fällungsmittel zugesetzt und diese Mischung über einem Reservoir mit höherer Konzentration des Fällungsmittels äquilibriert. Der Konzentrationsgradient zwischen Proteinlösung und Reservoir wird durch die Dampfphase ausgeglichen, was zu einem Aufkonzentrieren des Proteins bis zur Übersättigung führt und im Idealfall ein geordnetes Abscheiden des Proteins aus der Lösung, die Kristallisation desselben, zur Folge hat. Die Ausbildung eines Proteinkristalls ist jedoch stark von den Bedingungen wie pH-Wert, Salzkonzentration, Art des Fällungsmittels, Temperatur usw. abhängig und in keinster Weise vorhersagbar. Dieses vieldimensionale Problem wurde versucht durch faktorielle Ansätze zu lösen (Jancarik & Kim, 1991) (Carter & Carter, 1979), stellt aber auch heutzutage noch eines der Nadelöhre der Proteinkristallographie dar, da es rein empirisch, in günstigen Fällen halbempirisch, zu lösen ist.

Ein Kristall ist definitionsgemäß eine dreidimensional periodische Anordnung von Gitterbausteinen. Allgemein wird ein Kristall durch Translation der sogenannten *Elementarzelle* um ganzzahlige Vielfache der Elementarzellvektoren in alle drei Raumrichtungen aufgebaut. Die Elementarzelle wird durch Anwendung aller

Symmetrieeoperatoren der jeweiligen kristallographischen Raumgruppe auf die kleinste sich wiederholende Einheit, die *asymmetrische Einheit*, gebildet.

2.4.3 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen

Trifft Röntgenstrahlung auf Materie, regt ihr oszillierendes elektrisches Feld die Elektronen zur Schwingung mit gleicher Frequenz an. Die Elektronen wirken als oszillierende Dipole und senden Sekundärstrahlung mit der Frequenz der einfallenden Strahlung aus. Für freie Elektronen ist die Streustrahlung der Einfallenden gegenüber 180° phasenverschoben. Im Normalfall können Proteinelektronen durch freie Elektronen approximiert werden, der Fall der anomalen Streuung wird unter 2.4.5.2 behandelt.

Die durch periodische Wiederholung der Elementarzelle in alle drei Raumrichtungen auftretenden Translationsvektoren bilden in ihrer Gesamtheit das Kristallgitter. Dieses Gitter wird von sogenannten Netzebenen durchzogen, die verschiedene Gitterpunkte enthalten und durch ihre Schnittpunkte mit den Elementarzellachsen identifiziert werden, aus denen die MILLER'schen Indizes gebildet werden. Konstruktive Interferenz tritt nun nur auf, wenn der Gangunterschied zwischen den an einer Netzebenenschar gebeugten Wellen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist und somit die Interferenzbedingung erfüllt ist, welche sich in Form des BRAGG'schen Gesetzes formulieren läßt. Hierbei ist d der Abstand zwischen Netzebenenscharen, θ der Streuwinkel und λ die verwendete Wellenlänge.

$$\frac{2d \sin \theta}{\lambda} = n$$

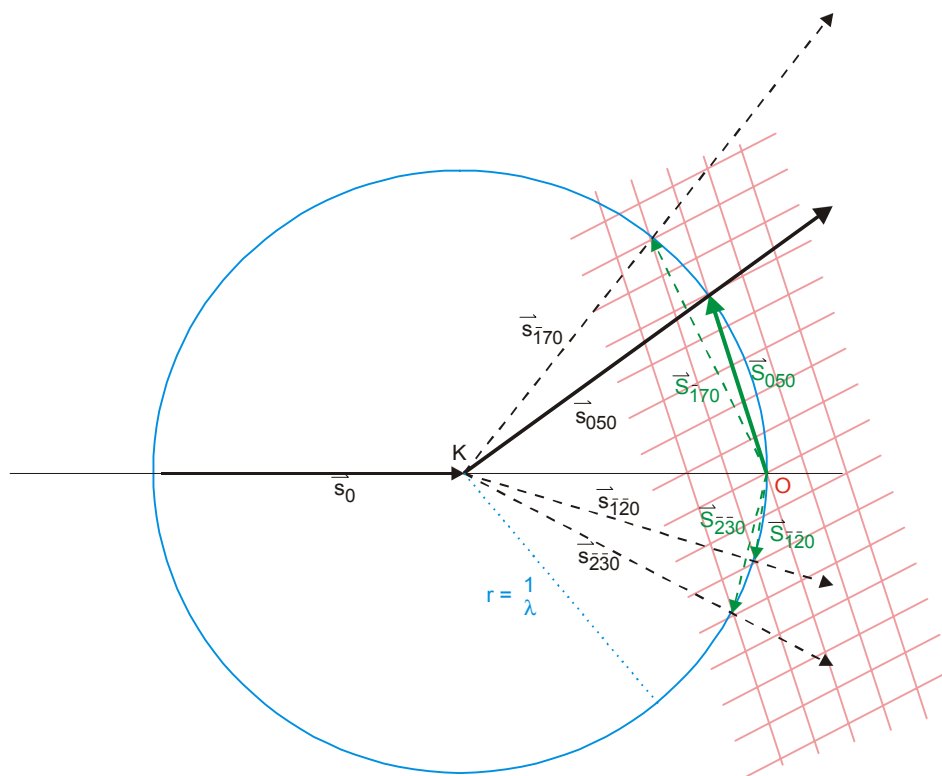


Abbildung 4: EWALD-Konstruktion (Ewald, 1921). Die Richtung des Primärstrahls (s_0) geht vom Drehpunkt des Kristalls (K) zum Ursprung (O) des reziproken Gitters (rosa), welches sich mit dem Kristall dreht. Um den Kristallursprung zeichnet man eine Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ (blau), die sogenannte EWALD-Kugel. Für alle Punkte des reziproken Gitters (hier 050 , $\bar{1}70$, $\bar{1}\bar{2}0$, $\bar{2}\bar{3}0$), welche auf der EWALD-Kugel liegen, sind die Reflexbedingungen entsprechend der BRAGG'schen Gleichung erfüllt. Die Vektoren vom Kristalldrehpunkt durch diese Punkte geben die Richtungen der vom Kristall bei diesem Drehwinkel ausgesandten Strahlen an.

Eine graphische Formulierung des BRAGG'schen Gesetzes ist in Abbildung 4 gezeigt. Hierzu ist die Einführung des sogenannten reziproken Gitters hilfreich. Das reziproke Gitter wird gebildet aus der Ansammlung der Normalenvektoren von Netzebenenscharen mit der Länge des reziproken Netzebenenabstandes.

Diese sogenannte EWALD-Konstruktion (Ewald, 1921) visualisiert die Erfüllung der Reflexionsbedingung. Die Reflexionsbedingung ist genau dann erfüllt, wenn ein reziproker Gitterpunkt die EWALD-Kugel (auf Englisch ‚*sphere of reflection*‘) mit dem Radius $1/\lambda$ durchquert. Die Richtung des gestreuten Strahles ist durch die Verbindung des Kristalldrehpunktes mit dem die Kugel durchquerenden reziproken Gitterpunkt gegeben. Deutlich wird, daß Gitter mit identischen Abmessungen auch Reflexe in identische Richtung abstrahlen. Wichtig für die Strukturbestimmung ist nun die Intensität der gestreuten Strahlen. Betrachtet man eine isolierte Elementarzelle, an der sich eine Welle bricht, so ergibt sich ein richtungsabhängiges, kontinuierliches Diffraktionsbild. Durch die periodische Anordnung des Kristalls können diese Sekundärwellen jedoch nur in bestimmte Richtungen konstruktiv interferieren. Für die komplexen Strukturformfaktoren, durch welche die gestreuten Strahlen beschrieben werden, ergibt sich folgende Gleichung:

$$\vec{F}(h, k, l) = \sum_j f_j e^{2\pi i \vec{r}_j \cdot (h, k, l)}$$

Die Summe erstreckt sich dabei über alle Atome j mit den fraktionellen Koordinaten \vec{r}_j in der Elementarzelle; f_j ist der Atomformfaktor, der die Richtungsabhängigkeit der Streuintensität an dem jeweiligen Atom repräsentiert und unter Annahme von kugelsymmetrischer Ladungsverteilung in Abwesenheit von anomaler Streuung nur von der Länge des Streuvektors (h, k, l) abhängig ist.

2.4.4 Berechnung der Elektronendichte

Die Elektronendichteverteilung in einem Kristall kann durch die Gesamtheit der Größen f_j und \bar{r}_j ausgedrückt werden, womit sie sich als inverse FOURIERtransformierte der Strukturformfaktoren ergibt:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{i\phi_{hkl}} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

Der Phasenwinkel ϕ_{hkl} , der den Gangunterschied eines Reflexes im Vergleich zu einer am Ursprung der Elementarzelle gestreuten Welle angibt, ist hierbei der direkten Messung nicht zugänglich, da aus den integrierten Reflexintensitäten lediglich die Strukturamplituden $|F_{hkl}|$ bestimmt werden können. Diese Unbestimmtheit wird in der Proteinkristallographie als das *Phasenproblem* bezeichnet.

2.4.5 Lösung des Phasenproblems

Zur Lösung des Phasenproblems kann eine Funktion herangezogen werden, die nicht von den Phasen selbst abhängt, die sogenannte PATTERSONsumimation:

$$P(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}|^2 \cos(2\pi[hu + kv + lw])$$

Es kann gezeigt werden, daß diese Funktion einer Darstellung der interatomaren Distanzvektoren entspricht. Notgedrungen entspricht damit die Symmetrie der PATTERSONdichte der der Elektronendichte ohne jegliche translatorische Symmetrieelemente, und unter Hinzufügung eines Inversionszentrums. In bestimmten Bereichen dieser Dichtekarte kommt es durch kristallographische Symmetrieelemente zu einer Häufung von Distanzvektoren. Diese Bereiche werden HARKER-Ebenen genannt.

Bei der großen Anzahl von Atomen in einer Proteinstruktur ist es unmöglich, aus der Anordnung der PATTERSON-Vektoren auf die Proteinstruktur zu schließen und so ein Modell zu generieren, aus dem initiale Phaseninformation abgeleitet werden kann. Man ist stattdessen darauf angewiesen, PATTERSON-Karten von Substrukturen zu interpretieren und daraus Phaseninformation für die Proteinstruktur abzuleiten (SIR, MIR: siehe 2.4.5.1, MAD: siehe 2.4.5.2) oder experimentelle PATTERSON-Dichten mit theoretischen zu vergleichen, um ein Modell zur Bestimmung der initialen Phaseninformation zu plazieren (MR: siehe 2.4.5.3).

2.4.5.1 Isomorpher Ersatz

Bei der Methode des isomorphen Ersatzes wird ein Datensatz eines Proteinkristalls („NATI“) und mindestens ein Datensatz eines sogenannten „isomorphen Derivates“ („DERI“) aufgenommen. Notwendige Eigenschaft eines verwendbaren Derivates ist vollständige Isomorphie der Proteinanordnung im Kristall und die geordnete Bindung von Schweratomen in diesem Kristall. In guter Näherung kann dann davon ausgegangen werden, daß die Differenzen in den bestimmten Strukturfaktoramplituden (ΔF) von DERI und NATI allein auf Differenzen in den Strukturen zurückzuführen sind, also auf die in dem DERI-Kristall zusätzlich vorhandenen Atome.

Eine aus diesen ΔF s berechnete PATTERSONdichte sollte also durch ein geeignetes Schweratommodell interpretierbar sein. Aufgrund der wesentlich geringeren Anzahl der Schweratome im Vergleich zu den Proteinatomen ist dies auch praktisch durchführbar. Durch Vergleich von Nativ-, Derivat- und Differenzstrukturfaktoramplituden mit den komplexen Strukturfaktoren aus dem Schweratommodell können initiale Phasenwinkel für die Proteinstrukturfaktoren bestimmt werden.

Dies ist in Abbildung 5 dargestellt. In manchen Fällen lassen sich so bereits mit einem Derivat hinreichend genaue Proteinphasen bestimmen, (*Single Isomorphous Replacement*, SIR) oft

sind jedoch mindestens zwei unabhängige Derivate nötig (*Multiple Isomorphous Replacement, MIR*).

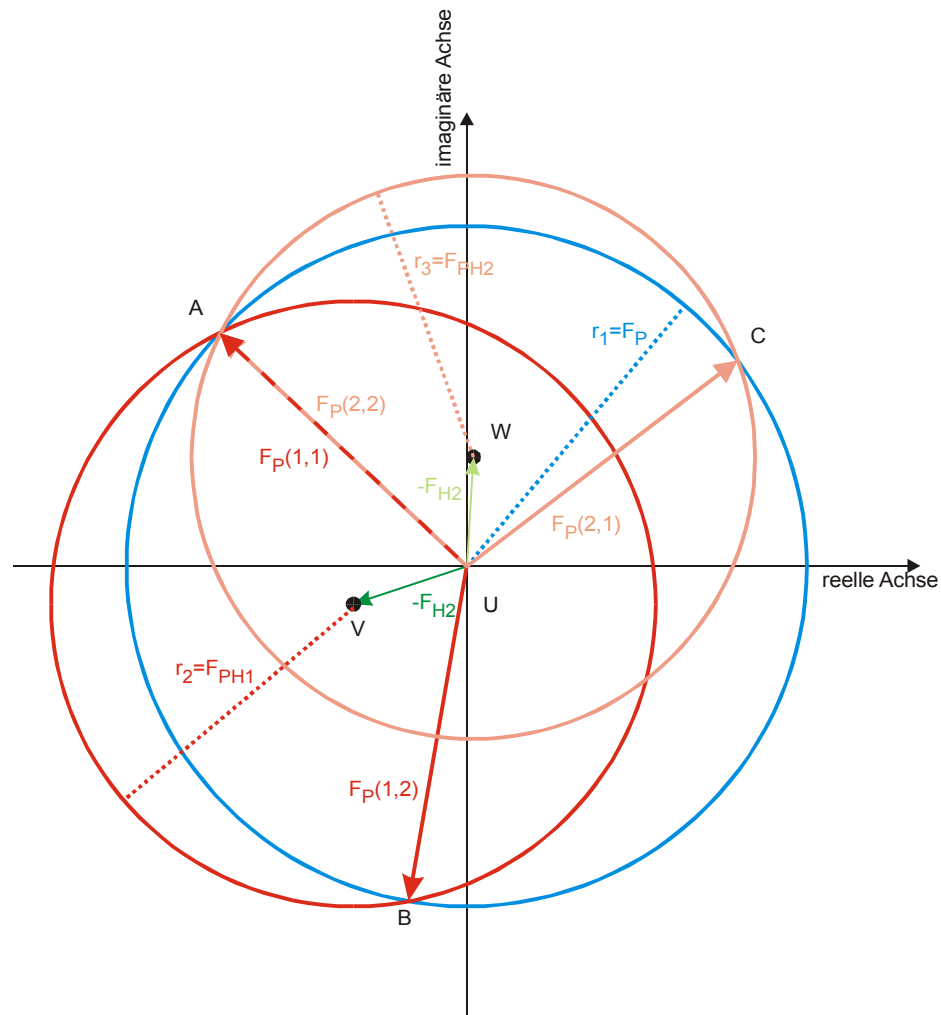


Abbildung 5: Harker-Konstruktion (Harker, 1956). Für jeden Reflex wird um den Ursprung ein Kreis mit dem Radius $|F_p|$ gezeichnet (blau). Um $-\bar{F}_{H1}$ versetzt wird ein weiterer Kreis mit dem Radius $|F_{PH1}|$ gezeichnet (rot). Die beiden Schnittpunkte A und B ergeben zwei Möglichkeiten für \bar{F}_p . Erst ein weiteres unabhängiges Derivat löst über eine ähnliche Konstruktion (orange) diese Doppeldeutigkeit auf. Am gemeinsamen Schnittpunkt (A) ergibt sich die Proteinphase eindeutig.

2.4.5.2 Multiple anomale Dispersion

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung von Proteinphasen nutzt das Phänomen der anomalen Streuung aus. Wie unter 2.4.3 erwähnt, werden die Diffraktionsphänomene normalerweise durch Streuung an freien Elektronen beschrieben, wobei die gestreute Welle der einfallenden gegenüber um 180° phasenverschoben ist. In der Nähe einer Absorptionskante eines Elementes gilt diese Näherung nicht mehr, und der Atomformfaktor ist nicht mehr länger eine reelle, sondern eine komplexwertige Zahl. In Abbildung 6 ist dieser Sachverhalt exemplarisch an einem Strukturfaktorpaar dargestellt.

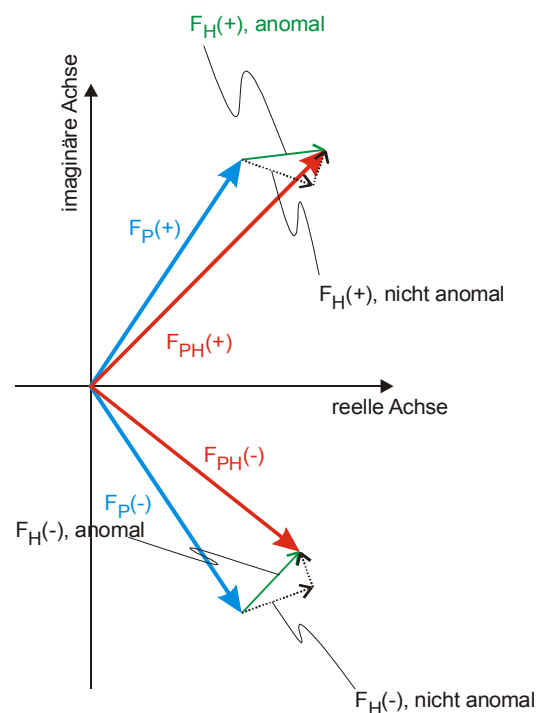


Abbildung 6: Ursache der Verletzung des FRIEDEL'schen Gesetzes bei anomaler Streuung.

Im Falle der elastischen Streuung wären $F_{PH}(+)$ und $F_{PH}(-)$ identisch. Das Streuen in der Nähe einer Absorptionskante führt jedoch zu einer Phasenverschiebung, ausgedrückt durch $i f''$ für den Schweratomformfaktor, der den BIJVOET-Paaren verschiedene Länge und unterschiedlichen Phasenbetrag verleiht.

Weil dadurch bedingt F_{hkl} und F_{-h-k-l} weder betragsmäßig noch in ihren Phasenwinkeln identisch sind, kann aus den PATTERNSDichte errechnet werden, aus der sich ein Modell der Substruktur aller bei einer bestimmten Wellenlänge anomal streuenden Atome erstellen läßt.

Analog zum MIR-Fall können nun durch eine HARKER-Konstruktion initiale Proteinphasen-

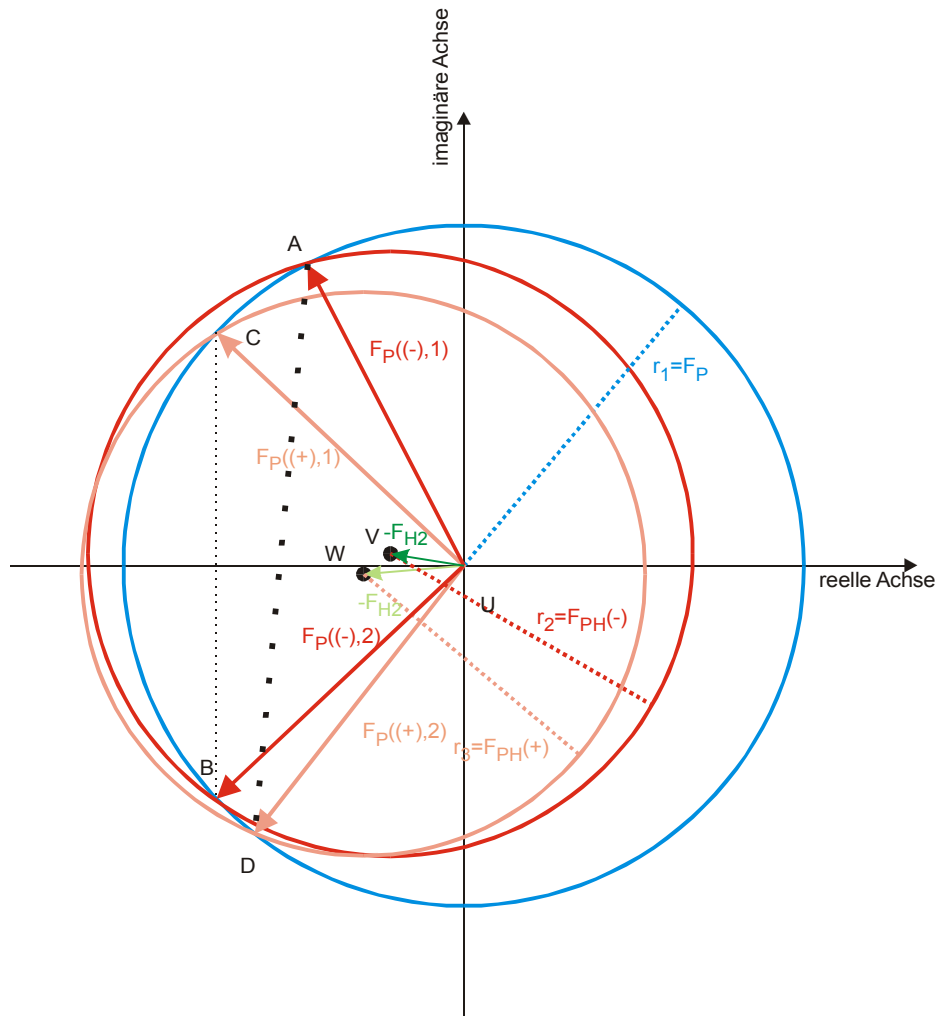


Abbildung 7: HARKER-Konstruktion für den MAD-Fall. Analog zum MIR-Fall wird ein Kreis mit Radius F_p um den Ursprung gezeichnet. Um $-F_H(-)$ versetzt, zeichnet man den Kreis $F_{PH}(-)$ und erhält an den Schnittpunkten zwei Möglichkeiten für $F_p(-)$. Die Ambiguität wird aufgelöst, wenn man um $-F_H(+)$ versetzt den Kreis $F_{PH}(+)$ zur Konstruktion von zwei Möglichen $F_p(+)$ zeichnet. Das bezüglich der x-Achse spiegelsymmetrische Paar von möglichen F_p gibt die korrekte Proteinphase für diesen Reflex.

winkel bestimmt werden.

2.4.5.3 Molekularer Ersatz

Bei der Methode des Molekularen Ersatzes („*Molecular Replacement*“, MR) (Huber, 1965; Rossmann & Blow, 1962) wird die notwendige Phaseninformation dadurch erhalten, daß ein hinreichend ähnliches Atommodell einer bekannten Kristallstruktur in einer *PATTERSON*-Suche eingesetzt wird. Aus den Koordinaten des bekannten Suchmodells können, nach Positionierung in der zu lösenden Struktur, die Strukturfaktoramplituden F_{calc} und die Phasen ϕ_{calc} berechnet werden. Mit den Modellphasen und den experimentell erhaltenen Strukturfaktoramplituden F_{obs} wird eine Elektronendichtekarte (*PATTERSON*-Dichten) $P(x,y,z)$ für die zu bestimmende Kristallstruktur errechnet. Zur Positionierung des Suchmodells wird die *Pattersonfunktion* benutzt:

$$P(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}|^2 \cos(2\pi[hu + kv + lw])$$

Die *Pattersonfunktion* stellt einen Satz von intramolekularen Vektoren dar, deren Beträge und Richtungen den Abständen und Orientierungen zwischen den Atomen in der Einheitszelle entsprechen. Da sich im Normalfall Raumgruppe und Orientierung des Suchmodells in der Einheitszelle von der gesuchten Struktur unterscheiden, muß das bekannte Atommodell korrekt in der neu bestimmten Einheitszelle der unbekanntes Struktur plaziert werden. Dieses sechsdimensionale Suchproblem läßt sich in je drei Rotations- und drei Translationsvariablen zerlegen. Die beiden Sätze an *PATTERSON*-Vektoren aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden F_{obs} und aus den berechneten F_{calc} der Modellatomkoordinaten werden in einer Produktfunktion korreliert, wobei der eine Vektorensatz in einer Rotationsfunktion in kleinen Winkelschritten um alle drei Achsen gegen den anderen gedreht wird. Dabei werden die Vektoren innerhalb des Moleküls (Selbstvektoren) zur Deckung gebracht. Nach der korrekten Orientierung erfolgt die Positionierung durch eine anschließende Translationsfunktion in allen

drei Raumrichtungen der Einheitszelle, wobei die Kreuzvektoren zwischen den verschiedenen Molekülen herangezogen werden.

3 Material und Methoden

Soweit nicht ausdrücklich anders erwähnt, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Aldrich (Steinheim), Fluka (Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Häen (Seelze) oder Sigma (Deisenhofen) mit dem Reinheitsgrad p. a. bezogen.

3.1 Proteinchemische Methoden

3.1.1 Sequenzanalyse und –vergleich

Proteinsequenzen wurden aus der EMBL Datenbank (www.ebi.ac.uk) und aus der Swissprot Datenbank (expasy.hcuge.ch, jetzt www.expasy.ch) erhalten. Sequenzen wurden mit dem GCG Programmpaket (GCG, 1998) analysiert.

3.1.2 Konzentrierung von Proteinen

Die Aufkonzentrierung von Proteinen erfolgte durch Ultrafiltration in Zentrifugationskonzentratoren des Typs Centriprep und Centricon (Milipore) an YM 5, YM 10 oder YM30 Membranen durch Zentrifugation bei 3000-7500×g.

3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Aliquot der aufkonzentrierten Probe mit dem jeweiligen Puffer verdünnt und die Absorption bei 280 nm bestimmt. Mit Hilfe des jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} , der nach Gill und van Hippel (Gill & van Hippel, 1989) berechnet wurde, der Absorption und der Masse des Proteins wurde nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz die Konzentration berechnet.

3.2 Kristallographische Methoden

3.2.1 Kristallisation

Die Kristallisation im sitzenden Tropfen wurde entweder in mit transparenter Klebefolie verschlossenen CrysChem Platten (Charles Supper Company, Natick, Massachusetts) oder in gasdicht verschlossenen Polystyrol Dosen von 3 cm Höhe und 7.5 cm Durchmesser auf 1.5 cm hohen Kunststoffbänkchen durchgeführt. Die Kristallisation im hängenden Tropfen erfolgte in Linbro Zellkulturplatten (ICN) verschlossen mit ölabgedichteten, silanisierten Deckgläsern.

Zum Test einer größeren Zahl von Bedingungen wurde das Prinzip des *sparse matrix sampling* angewandt (Jancarik & Kim, 1991) (Carter & Carter, 1979). Es wurden jeweils 2 μL Proteinlösung der Konzentration 10 mg/mL gegen 500 μL Reservoirlösung äquilibriert. Weitere Versuche waren Rastersuchen von verschiedenen Präzipitanden (PEG 400, 1000, 4000, 8000, 12000, MPD, i-Propanol, AS, NaCl, LiSO_4 , PEGMME 550, PEGMME 2500) gegen verschiedene pH-Werte. Reduktionsmittel (DTT, DTE, GSH, β -ME), elektrostatische (verschiedene Verbindungen mit Amin- und/oder Säure-Funktionalität, verbrückt über verschieden lange Alkylreste) und kovalente Vernetzer (Glutaraldehyd, Formaldehyd) sowie divalente Metallionen wurden als Additive eingesetzt.

3.2.2 Datensammlung

Kristalle wurden zur Messung von Raumtemperaturdaten in silanierte Glaskapillaren von 0.7 mm Durchmesser gesaugt und mit Löschpapierstreifen oder dünn ausgezogenen Glaskapillaren vollständig vom Lösungsmittel befreit. Um ein Austrocknen zu verhindern wurden beide Seiten der Kapillare mit Reservoirlösung gefüllt und mit Dentalwachs (Richter&Hoffmann Harvard Dental GmbH) verschlossen. Die Kapillaren wurden auf einem Goniometerkopf fixiert und mit Drehwinkeln von $0.5\text{-}3^\circ$ auf der Drehanode (Rigaku RU-200, 50 kV, 100 mA) vermessen. Detektiert wurde mit einer MARresearch™ *imageplate*.

Zur Messung von *cryo*-Daten wurden die Kristalle in Schlaufen aus Zahnseide (Hampton Research) geangelt, in den jeweiligen Cryopuffer eingelegt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gemessen wurden die Kristalle am Max-Planck-Institut mit Kupfer-K α -Röntgenstrahlung ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) mit einer *Imageplate* (Marresearch, Hamburg), die auf einem Röntgendrehanodengenerator (Rigaku RU-200, Tokio, Japan; Leistung 50 kV, 100 mA) montiert war. Zudem wurden Datensätze von gefrorenen Kristallen in Stickstoffstrom bei -170°C an der *beamline* BW6 (Wiggler-Beamline mit Toroidspiegel) am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY) in Hamburg mit einem CCD-Detektor (Marresearch, Hamburg) gemessen.

3.2.3 Datenauswertung

Die Bestimmung der Kristallorientierung, der Raumgruppe und der Elementarzelle erfolgte mit zwei verschiedenen Programmpaketen. Je nach Datenqualität und Ort der Messung wurde entweder das HKL Programmpaket (Otwinowski & Minor, 1997) benutzt oder die Indizierung der Daten und die Bestimmung der Reflexintensitäten wurden mit MOSFLM (Leslie, 1991) durchgeführt. Die Datenreduktion erfolgte dann mit den Programmen SCALA und TRUNCATE (Collaborative Computational Project, 1994).

3.2.4 Phasierung

Die Bestimmung von Schweratomlagen bzw. Selenlagen erfolgte mit den Programmen SOLVE (Terwilliger & Berendzen, 1999), SHELXS oder PROTEIN (Steigemann, 1974). Die Verfeinerung der Schweratomparameter sowie Berechnungen von Proteinphasen wurden mit dem Programm SHARP (La Fortelle & Bricogne, 1997) durchgeführt. Proteinphasen wurden durch Dichtemodifikation (*solvens-flattening*) mit SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) verbessert.

Der Molekulare Ersatz wurde mit MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997) durchgeführt.

3.2.5 Modellbau und Verfeinerung

Atommodelle wurden mit dem Programm MAIN (Turk, 1992) in die Elektronendichtekarten eingepaßt. Hierbei wurde die Realraum-Verfeinerungsoption benutzt, um eine möglichst gute Anpassung an die Elektronendichte zu erhalten. Verfeinert wurde mit CNS (Brünger *et al.*, 1998) unter Anwendung des Maximum-Likelihood-Targets unter Berücksichtigung der experimentellen Hendrickson-Lattman-Koeffizienten gegen beobachtete Strukturfaktoren, wobei 5% als TEST-Satz zur Ermittlung des freien R-Faktors dienten. Es wurde eine Lösungsmittelkorrektur sowie eine globale, anisotrope B-Faktor Korrektur angewandt. Positionelle Verfeinerung und *simulated annealing* (SA) alternierten mit visueller Inspektion der Elektronendichte und manueller Intervention bis zu einem Absinken des R-Faktors auf 30%. Danach wurde Lösungsmittel automatisch mit CNS eingebaut. Individuelle B-Faktor Verfeinerung, SA und positionelle Verfeinerung ergaben schließlich die finalen Modelle.

3.2.6 Modellanalyse und graphische Darstellung

Die erstellten Modelle wurden mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) auf Datenkonsistenz überprüft und geometrisch analysiert. Überlagerungen und *least-square-fits* von Koordinaten wurden mit MAIN (Turk, 1992) und mit (Collaborative Computational Project, 1994) durchgeführt.

Die Darstellung von Modellen geschah mit den Programmen MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), BOBSCRIPT (Esnouf, 1997), und RASTER3D (Merritt & Murphy, 1994). Die graphische Darstellung von Sequenzvergleichen geschah mit dem Programm ALSRIPT (Barton, 1993)

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 MoaB aus *Escherichia coli*

4.1.1 Klonierung, Reinigung und Expression

Alle hier beschriebenen Arbeiten zur Klonierung, Reinigung und Expression wurden von Dr. Markus Fischer im Labor von Prof. Dr. Adelbert Bacher an der Technischen Universität München durchgeführt.

Das *moaB*-Gen wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion aus chromosomaler *E. coli*-DNA kloniert, in das Plasmid pNCO113 (Stüber *et al.*, 1990) ligiert und in den *E. coli*-Stamm M15[pREP4], der das Repressorplasmid pREP4 zur Überexpression des *lac*-Repressorproteins enthält, transformiert.

Da es im Verlauf der Arbeit notwendig wurde Selenomethionin-markiertes Protein zu erhalten, wurde das Plasmid pNCO-EC-moaB in *E. coli* B834 Zellen transformiert. Der Methionin-auxotrophe *E. coli*-Stamm B834 wurde in NMM/SeMet hochgezogen (Budisa *et al.*, 1995). Die Zellen wurden abzentrifugiert, in Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 7.8, 1 mM DTT und 0.02% NaN₃) resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Reinigung erfolgte in einer dreistufigen Prozedur bestehend aus Anionenaustausch-Chromatographie (Q Sepharose FF, Pharmacia), hydrophober Interaktionchromatographie (HA macroprep 40 µm, Biorad) und Gelpermeations-Chromatographie (Superdex 200, Pharmacia).

Der Selenomethionineinbau wurde durch Elektrospray-Massenspektroskopie überprüft.

4.1.2 Kristallisation

Kristalle von MoaB wurden durch die Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen in CrysChem-Kristallisationsplatten (Charles Supper Company, Natick, Massachusetts) erhalten. Hierzu wurden 5 μl MoaB (14.5 mg/ml in 25 mM Tris/HCL, pH 8.0, 100 mM NaCl) mit 1 μl Reservoirlösung (0.625 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.25 M Li_2SO_4 , 0.125 M Citrat, pH 5.6) gemischt. Die Kristalle wuchsen innerhalb von wenigen Tagen bei Raumtemperatur bis zu einer typischen Größe von $200 \times 300 \times 900 \mu\text{m}^3$ und gehörten zur Raumgruppe P321 ($a = b = 69.7 \text{ \AA}$, $c = 125.8 \text{ \AA}$), mit 2 MoaB-Untereinheiten pro asymmetrischer Einheit. Abbildung 8 zeigt einen typischen MoaB-Kristall, der unter dem Polarisationsmikroskop photographiert wurde.

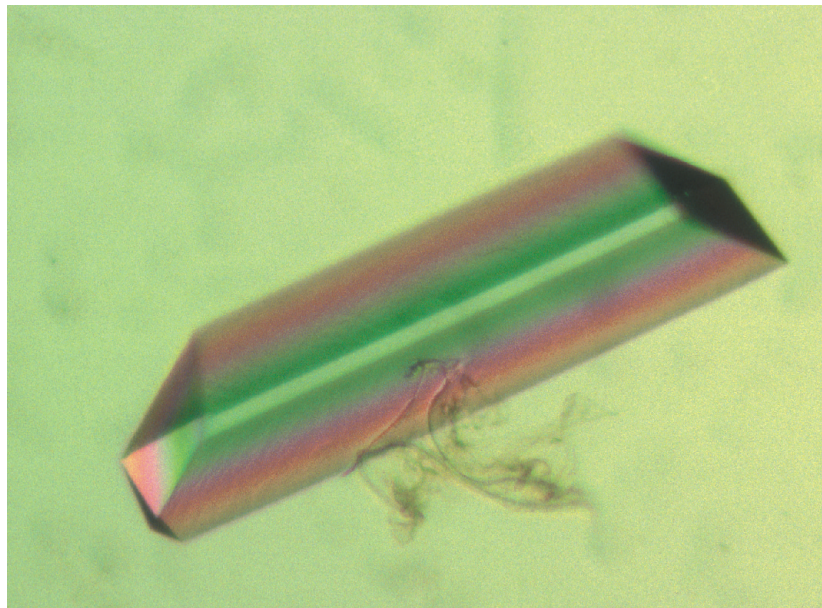


Abbildung 8: Typischer MoaB-Kristall, photographiert unter dem Polarisationsmikroskop. Die Länge des Kristalls beträgt ca. 1 mm.

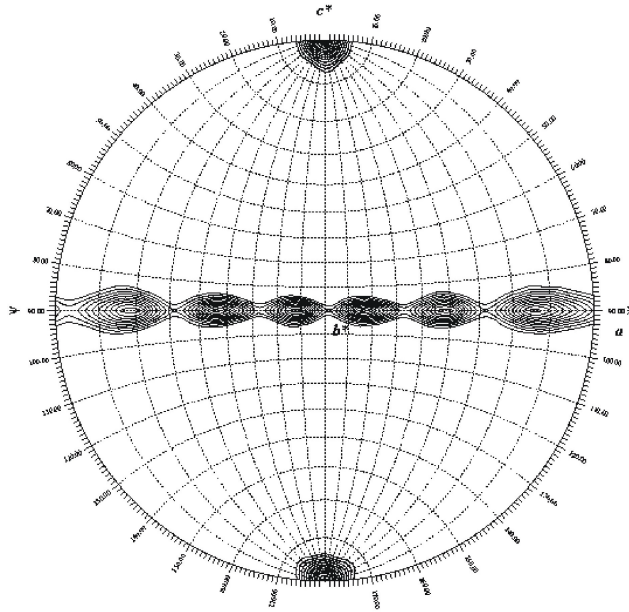


Abbildung 9: Selbstrotation eines in P321 ausgewerteten Datensatzes für die zweizählige Korrelation ($\kappa = 180^\circ$). Die zweizähligen nichtkristallographischen Achsen liegen senkrecht zur kristallographischen dreizähligen Achse.

4.1.3 Datensammlung

Für die MAD-Messungen in Hamburg wurden die Kristalle in einen Cryopuffer (0.625 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.25 M Li_2SO_4 , 0.125 M Citrat, pH 5.6 und 25% (w/v) Saccharose) überführt und im Stickstoffstrom schockgefroren. Die MAD-Datensätze wurden an der *beamline* BW6 am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY) in Hamburg mittels eines 135 mm MARCCD Detektors (MARresearch™, Hamburg) bei Wellenlängen von $\lambda_1 = 0.97920 \text{ \AA}$, $\lambda_2 = 0.97976 \text{ \AA}$ und $\lambda_3 = 1.20 \text{ \AA}$ aufgenommen.



Abbildung 10: Diffraktionsbild eines selenomethioninmarkierten MoaB-Kristalls aus *E. coli*, aufgenommen an der *beamline* BW6 am DESY (Hamburg).

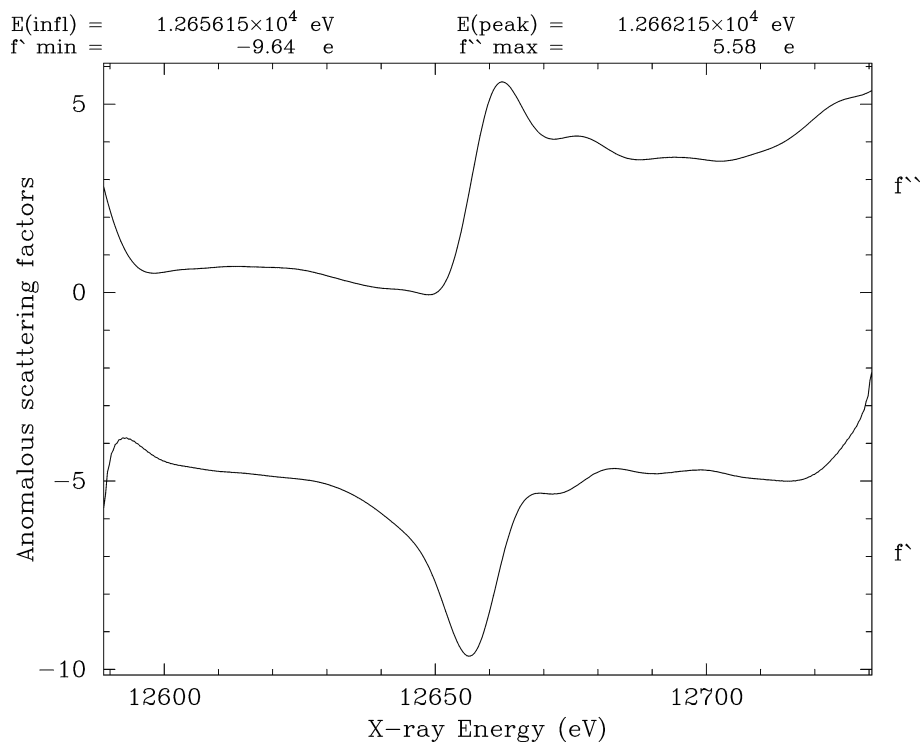


Abbildung 11: Scan der Absorptionskante eines selenomethioninhaltigen Kristalls am Synchrotron. Aufgetragen sind die f'' und f' -Beiträge gegen die Energie der Synchrotronstrahlung.

	Peak	Edge	Remote
Datensammlung			
Wellenlänge (Å)	0.97920	0.97976	1.20
Auflösung (Å)	2.1	2.1	2.1
Anzahl der Reflexe	276,109	276995	275,848
Unabhängige Reflexe	21651	21615	21683
Vollständigkeit (%)	99.3	98.1	98.3
R _{Sym} ¹ (%)	4.3	4.5	4.5
Phasierung			
Figure of merit			0.37
R _{cullis} ²	0.35	0.38	-
Verfeinerung			
R _{cryst} (R _{free} ³) (%)	-	-	20.45 (25.05)
Rmsd Bindungen (Å)	-	-	0.010
Rmsd Winkel (deg.)	-	-	1.47
Ramachandran plot quality			
Bevorzugt	-	-	89.9
Erlaubt	-	-	9.9
Mit Einschränkungen erlaubt	-	-	0.3
Zahl der Proteinatome	-	-	2598
Zahl der Solvensmoleküle	-	-	237
¹ $R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i I(\text{hkl})_i - \langle I(\text{hkl}) \rangle }{\sum_{\text{hkl}} \sum_i \langle I(\text{hkl}) \rangle}$ ² $R_c = \frac{\sum_{\text{hkl}} (F_{\text{PH}}(\text{hkl}) + F_{\text{P}}(\text{hkl}) - F_{\text{Hcalc}}(\text{hkl}))}{\sum_{\text{hkl}} (F_{\text{PH}}(\text{hkl}) + F_{\text{P}}(\text{hkl}))}$ ³ Für 5 % der Reflexe			

Tabelle 1: Statistiken zu Datensammlung, Phasierung und Verfeinerung von MoaB aus *Escherichia coli*.

4.1.4 Strukturlösung

Da erste Versuche mit der Methode des Multiplen Isomorphen Ersatzes (MIR) die Strukturlösung herbeizuführen scheiterten, wurden selenomethioninhaltiges Protein hergestellt und MAD-Messungen durchgeführt (s. o.). Die Positionen aller 4 in der asymmetrischen Einheit vorhandenen Selenomethionine konnten mit Hilfe des Programms SOLVE (Terwilliger & Berendzen, 1999) identifiziert werden. Die Phasierung mit SHARP (La Fortelle & Bricogne, 1997) und die anschließende Dichtemodifikation mit SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) führten zu einer Elektronendichtekarte von außerordentlicher Qualität, so daß der sofortige Einbau des kompletten Modells mit MAIN (Turk, 1992) möglich war. Mit CNS (Brünger et al., 1998) konnte das Modell bis zu einem $R_{\text{crist}} = 20.4\%$ ($R_{\text{free}} = 25.0\%$) verfeinert werden.

4.1.5 Strukturbeschreibung

4.1.5.1 Struktur des Monomers

Die Struktur des MoaB Monomers besteht aus einer $\alpha/\beta/\alpha$ -Faltung mit einem zentralen, vornehmlich parallelen 6-strängigen β -Faltblatt ($\beta 1 - \beta 6$) das von 2 α -Helices auf der einen, sowie 4 α -Helices und einer 3_{10} -Helix auf der anderen Seite umgeben ist. Der einzige antiparallele Strang des Faltblatts, $\beta 5$, liegt nahe des einen Endes des Faltblatts. Die Helix $\alpha 4$ (Rest 99 – 113) und die 3_{10} -Helix bilden eine lange, annähernd durchgängige, aber stark abgknickte Helix. Auf der anderen Seite des Faltblatts bilden die Reste 139 – 154 die Helix $\alpha 7$, eine durchgängige Helix, die am Isoleucin 150 gebogen und etwas aufgewunden ist.

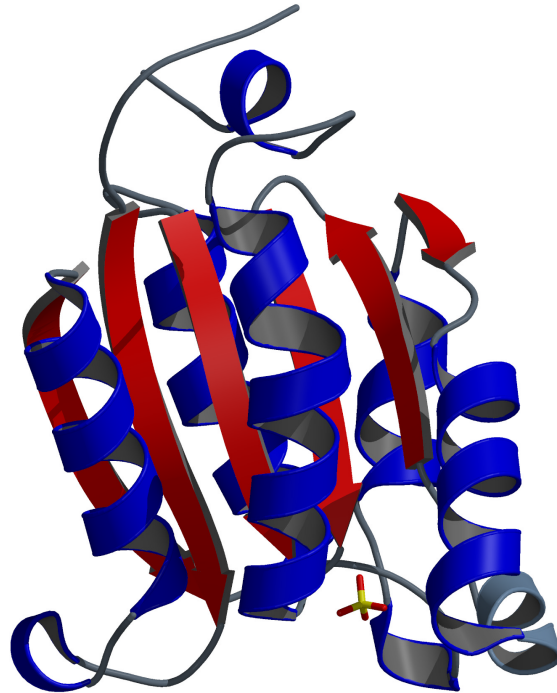


Abbildung 12: Struktur eines MoaB-Monomers. Die Faltblätter sind rot und die α -Helices blau dargestellt, die 3_{10} -Helix hellblau.

4.1.5.2 Struktur des Hexamers

Analytische Ultrazentrifugation und Gelfiltrationsexperimente deuten darauf hin, daß MoaB in Lösung als Hexamer vorliegt. Die Kristallstruktur bestätigt, daß MoaB tatsächlich ein Hexamer mit 3_2 -Symmetrie bildet, das am besten als ein Dimer von Trimeren beschrieben werden kann. Das Trimer wird von Resten gebildet, die sich in Helix α_4 , der darauffolgenden 3_{10} -Helix, dem *loop* von Pro 160 – His 166 und dem Anfang der Helix α_6 befinden. Die Kontaktfläche zwischen 2 Monomeren innerhalb des Trimers ist ungefähr 1480 \AA^2 groß, was ca. 18 % der gesamten Oberfläche eines Monomers ausmacht. Das Hexamer wird aus den Trimeren hauptsächlich durch die Wechselwirkung von Helix α_4 mit der gegenläufig orientierten Helix α_4 einer anderen Untereinheit, sowie den Resten Pro-92 und Leu-93 im

loop zwischen $\alpha 4$ und $\beta 3$ aufgebaut. Diese Kontaktfläche ist nur 970 \AA^2 (dies entspricht 11.8 % der Monomer-Oberfläche) groß, was die Beschreibung als Dimer von Trimeren rechtfertigt.

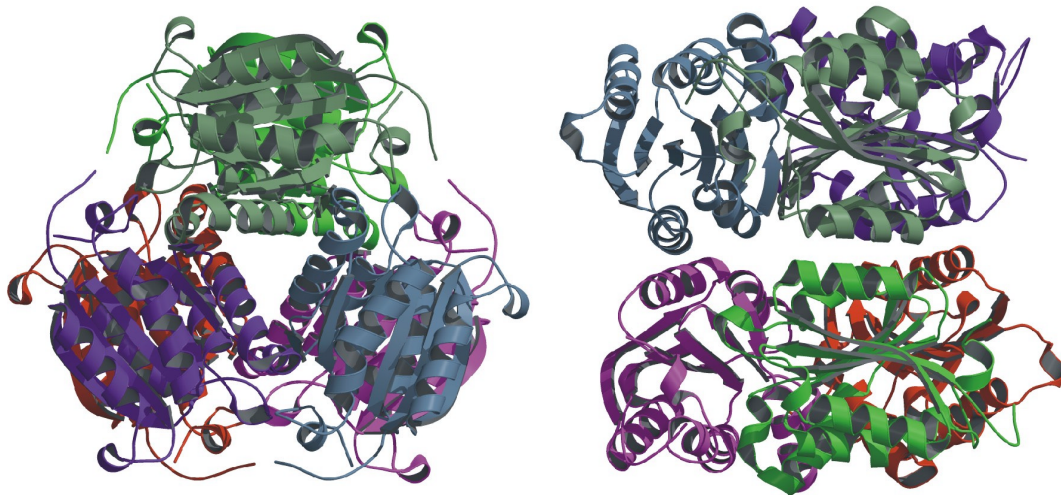


Abbildung 13: Struktur des MoaB-Hexamers. Links mit Blickwinkel entlang der dreizähligen Achse, rechts mit Blickrichtung senkrecht zur dreizähligen Achse.

4.1.6 Diskussion

4.1.6.1 Vergleich zu MogA

Es gibt einige Proteine, die signifikante Homologien zu MoaB aufweisen (Abbildung 14). Dies sind unter anderem MogA aus *E. coli* (27.4 % Identität, 36.9 % Homologie), Gephyrin aus Ratte (30.4 % Identität, 41.8 % Homologie), Cinnamon aus *Drosophila melanogaster* (30.1 % Identität, 41.4 % Homologie) und Cnx1 aus *Arabidopsis thaliana* (35.9 % Identität, 45.7 % Homologie), wobei Gephyrin, Cinnamon und Cnx1 deutlich größer als MoaB sind und jeweils nur eine ihrer beiden Domänen homolog zu MoaB ist. Die andere Domäne zeigt in all diesen Fällen deutliche Homologie zu MoeA aus *E. coli*.

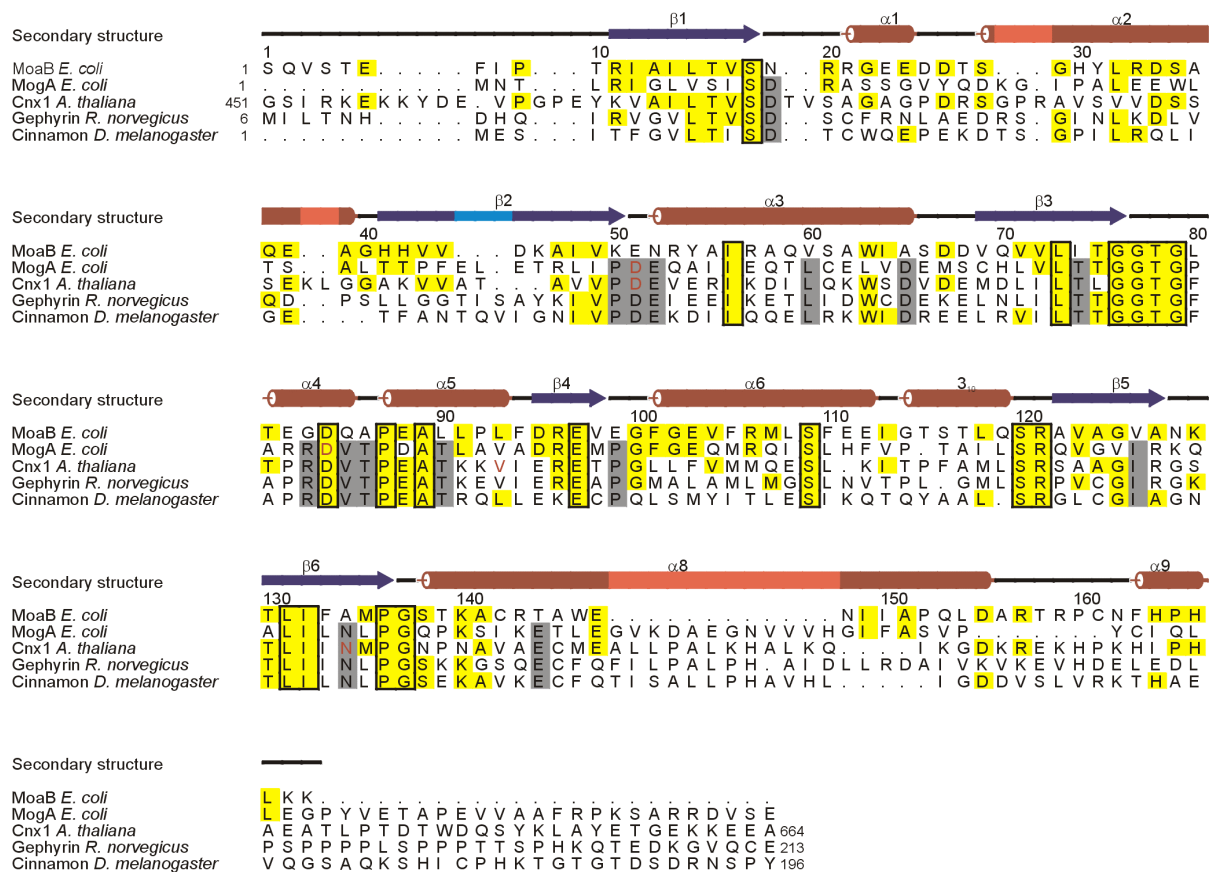


Abbildung 14: Sequenzalignment verschiedener zu MoaB aus *E. coli* homologer Proteine. Da Cnx1, Gephyrin und Cinnamon deutlich größer als MoaB sind, wurden nur die homologen Bereiche abgebildet. Reste, die identisch im Vergleich zu MoaB sind wurden gelb unterlegt. Reste, die in allen Sequenzen außer MoaB konserviert sind wurden grau unterlegt. Reste, die für die Funktion der entsprechenden Proteine notwendig sind, wurden rot eingefärbt.

Das für Proteine aus der Molybdän-Kofaktor-Biosynthese typische Sequenzmuster 1 (Prosite Zugangsnummer PS01078; <http://www.expasy.ch/prosite/>), VVLITGGTG im Fall von MoaB ist in all diesen Sequenzen konserviert.

Bei MogA wurde eine Funktion als Molydochelatase vermutet, da *mogA*-defiziente Mutanten auf Nährmedium mit hohem Molybdäthalt überleben (Joshi et al., 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, daß MogA Molybdopterin bindet (Pitterle & Rajagopalan, 1993). Die Kristallstruktur von MogA (Liu et al., 2000) und begleitende biochemische Untersuchungen identifizierten einige Aminosäuren (rot eingefärbt in Abbildung 14), die für

die Molybdopterinbindung, sowie die Biosynthese des Molybdän-Kofaktors notwendig sind. Es konnte jedoch weder die Bindung von Molybdät nachgewiesen werden, noch gelang es, die exakte biochemische Funktion von MogA zu klären. Wie Abbildung 15 bzw. Abbildung 16 deutlich zeigt sind Topologie und Struktur von MoaB und MogA bemerkenswert ähnlich. Topologisch ist der einzige deutliche Unterschied zwischen den beiden Monomerstrukturen die Insertion von 2 β -Strängen vor der C-terminalen Helix.

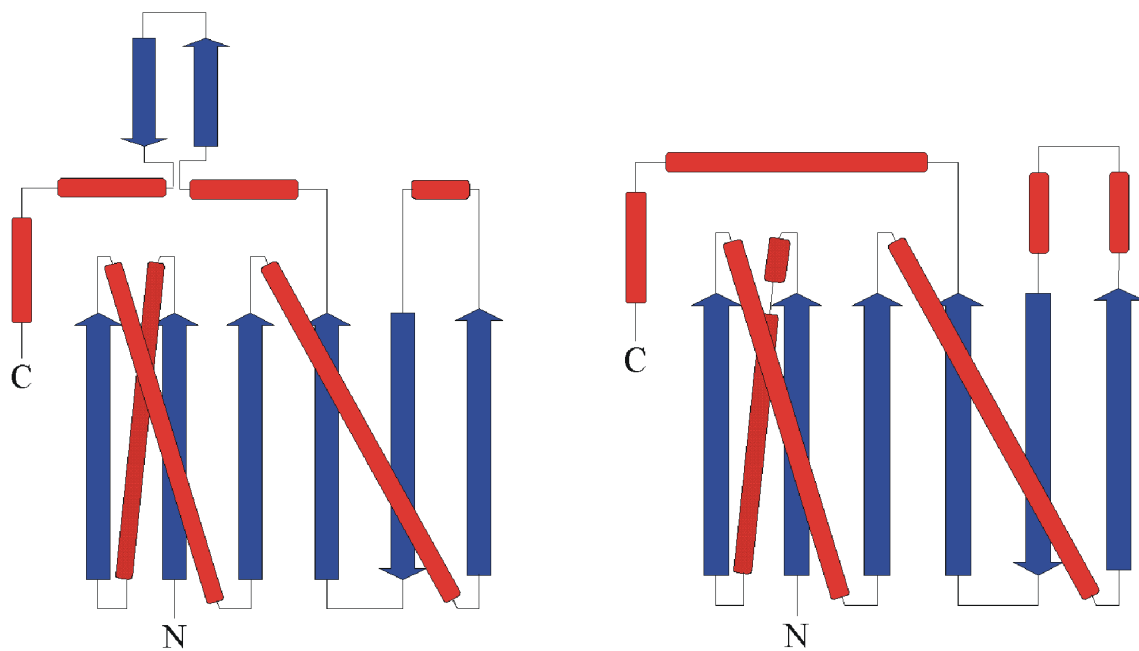


Abbildung 15: Topologiediagramme von MogA (links) und MoaB (rechts). Helices sind rot, Faltblätter blau dargestellt.

Bei einer Überlagerung der beiden Strukturen können 149 Reste mit einer rms-Abweichung von 1.8 Å überlagert werden. Der N-terminale Teil der beiden Monomere ist beinahe identisch während sich die C-terminalen Teile deutlicher unterscheiden. In der MoaB-Struktur ist $\alpha 7$ eine lange, leicht geknickte Helix, die auch so in der MogA-Struktur vorliegt, jedoch mit dem entscheidenden Unterschied, daß an der Position des Knicks eine Insertion von 12

Resten vorliegt. Diese Reste bilden ein zweisträngiges β -Faltblatt, das senkrecht von der Helix absteht.

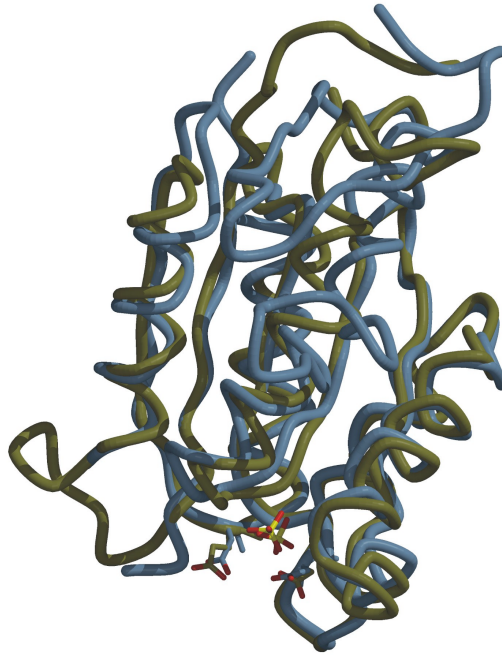


Abbildung 16: Überlagerung der Monomere von MoaB (braun) und MogA (blau).

Beide Proteine bauen auf ähnliche Weise Trimere auf, wobei die meisten Aminosäuren innerhalb der Kontaktflächen identisch oder konservativ substituiert sind. Im Gegensatz zu MogA, das in Lösung als Trimer vorliegt, bildet MoaB ein Hexamer, das am Besten als Dimer von Trimeren beschrieben werden kann. Obwohl die Teile von MoaB, die die Kontaktflächen im Hexamer bilden, sehr ähnlich wie die entsprechenden Teile in MogA sind, zeigt eine genauere Untersuchung einige entscheidende Unterschiede. So ist Ala 58 durch das deutlich größere Gln 64 ersetzt. Zudem ist Ser 66 durch Glu 64 ersetzt, das aufgrund geringfügiger Unterschiede der Gesamtstruktur direkt in die potentielle Kontaktfläche zeigt

und somit die Bildung eines MogA-Hexamers verhindert, da es dort mit Gln 56 kollidieren würde.

4.1.6.2 Das aktive Zentrum

In der MogA-Struktur konnten 2 Reste, Asp 49 und Asp 82 identifiziert werden, die in den meisten homologen Proteinen konserviert sind und für die katalytische Funktion notwendig sind. Die Mutation eines dieser Reste in *E. coli* führte zum Verlust der Fähigkeit zur Molybdopterin Biosynthese. Außerdem inhibierten diese Mutanten einen Apo-Nitratreduktase Rekonstitutions-*Assay*, was einer verstärkten Molybdopterinbindung dieser Mutanten zugeschrieben wurde. In MoaB entsprechen diesen Resten Glu 51 und Asp 84, die sich an fast identischen Positionen befinden.

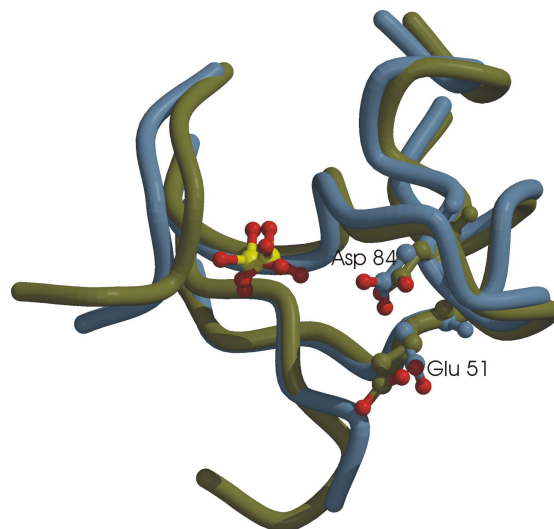


Abbildung 17: Überlagerung des vermuteten aktiven Zentrum von MogA (blau) mit MoaB (braun). Die Numerierung entspricht der MoaB-Sequenz. Die konservierten Sulfationen sind gelb und rot eingefärbt.

In der MogA-Struktur wurde in der Nähe dieser Reste und des konservierten TXGGTG-Motivs ein Sulfation in die Dichte eingebaut. Zusätzliche Elektronendichte, die mit diesem Sulfation verbunden war, wurde einer möglichen Bindung geringer Restmengen von Molybdopterin zugeschrieben. Interessanterweise befindet sich in der MoaB-Struktur an der fast identischen Position ebenfalls ein Sulfation (Abbildung 17).

In einer biochemischen Untersuchung konnten durch die Chloratresistenz Molybdopterin-defizienter Mutanten einige Aminosäurereste gefunden werden, die für die Funktion der Cnx1 G-Domäne aus *Arabidopsis thaliana* notwendig sind (Kuper *et al.*, 2000). Diese Domäne ist homolog zu *E. coli* MoaB und MogA in denen diese Reste konserviert sind. Es konnte gezeigt werden, daß die G-Domäne Molybdopterin bindet, für die Insertion von Molybdän in Molybdopterin notwendig ist und daß sie zudem den gebildeten Molybdän-Kofaktor stabilisiert. Die Mutanten D515N und D515H (MoaB: Glu 51, MogA: Asp 49) führten zu einer unveränderten Molybdopterinbindung, was möglicherweise für die Beteiligung dieses Restes bei der Insertion von Molybdän in Molybdopterin spricht. Die Mutanten V557G (MoaB: Leu 93, MogA Val91) und N597L (MoaB: Ala 134, MogA: Asn 131) zeigten eine verminderte Molybdopterinbindung und eine geringere Stabilisierung des Molybdän-Kofaktors. Da diese Reste die Wechselwirkung zwischen Sekundärstrukturelementen vermitteln, wurde vermutet, daß diese Mutationen zu einer Verzerrung der Substratbindungstasche führen. Die Rolle von Asp 548 (MoaB: Asp 84, MogA: 82) wurde leider nicht untersucht.

4.1.6.3 Weitere homologe Strukturen

Die Suche nach homologen Proteinstrukturen mit DALI zeigt wie erwartet, daß *E. coli* MogA die höchste Homologie zu MoaB aufweist. Bei einem *Z-score* von 19.8 wurden 149 Reste mit einer rms-Abweichung von 1.8 Å überlagert. Eine Überraschung war jedoch die nächsthomologe Struktur, die Lumazinsynthase aus *Saccharomyces cerevisiae* (PDB-Eintrag

2DI0). Hier können bei einem Z-score von 8.6 115 Reste mit einer rms-Abweichung von 2.7 \AA^2 überlagert werden, obwohl keinerlei signifikante Sequenzhomologie zu erkennen ist.

Die Lumazinsynthase ist eines der Schlüsselenzyme der Riboflavinbiosynthese. Sie katalysiert die Kondensation von 5-Amino-6-ribitylamino-2,4-(1H,3H)-pyrimidindion und 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Das Produkt der Reaktion, Lumazin, enthält ein Pterin-Ringsystem und weist somit deutliche strukturelle Ähnlichkeiten zu Molybdopterin bzw. Precursor Z auf. Die Kristallstruktur der Lumazinsynthase aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde kürzlich (Meining *et al.*, 2000) im Komplex mit einem Analogons des Übergangszustands, 5-(6-D-Ribitylamino-2,4-dihydroxypyrimidine-5-yl)-1-pentyl-phosphonsäure, gelöst.

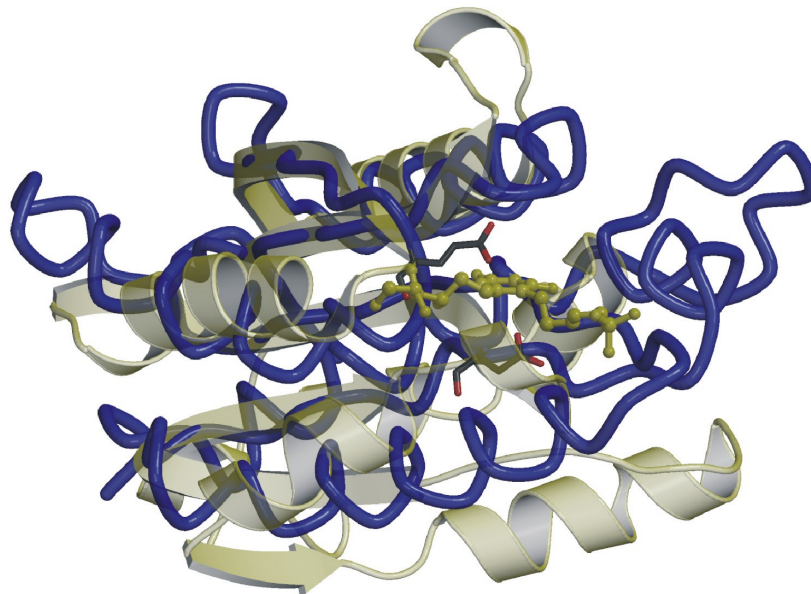


Abbildung 18: Überlagerung von MoaB aus *E. coli* (gelb) und Lumazinsynthase aus *S. cerevisiae* (blau). Das Übergangszustandsanalogon 5-(6-D-Ribitylamino-2,4-dihydroxypyrimidine-

5-yl)-1-pentyl-phosphonsäure ist gelb dargestellt. Oberhalb und unterhalb des Pyrimidinrings befinden sich Glu 51 und Asp 84 von MoaB (grau/rot)

Überlagert man die Strukturen so stellt man überraschenderweise fest, daß sich das vermutete aktive Zentrum von MoaB/MogA an der selben Stelle befindet wie die Bindungstasche der Lumazinsynthase. Wie Abbildung 18 zeigt, kommt bei einer Überlagerung der Lumazinsynthase-Inhibitor im vermuteten aktiven Zentrum von MoaB genau zwischen Glu 51 und Asp 84 zu liegen. Dabei liegen die Carboxylgruppen der beiden Aminosäuren genau oberhalb bzw. unterhalb des Pyrimidinrings des Inhibitors. An genau derselben Stelle würde auch das Pterinringsystem des Lumazins liegen.

4.1.6.4 Funktion von MoaB

Die Funktion von MoaB bleibt bis auf weiteres ungeklärt. Zwar sprechen die Lokalisierung des *moaB*-Gens im *moa*-Operon, das Vorkommen des Molybdän-Kofaktor Biosynthese-Sequenzmotivs 1 (s.o.) und die ausgeprägte Homologie zu MogA stark für eine Beteiligung an der Molybdän-Kofaktor-Biosynthese. Es gibt bislang jedoch noch keine klaren Hinweise worin diese Rolle bestehen könnte. Da bisher keine molybdopterindefizienten Mutanten mit einem Defekt des *moaB*-Gens gefunden wurden, muß vermutet werden, daß diese Rollen nicht essentiell für die Kofaktor-Biosynthese ist. In Anbetracht der Labilität der bei der Biosynthese notwendigerweise vorkommenden Zwischenstufen ist es daher naheliegend, zu vermuten, daß die Rolle von MoaB in der Bindung und Stabilisierung von instabilen Zwischenprodukten liegt. In diesem Fall würde MoaB dann die Effizienz der Kofaktor-Biosynthese steigern.

Um eine solche Hypothese überprüfen zu können wäre allerdings ein gut funktionierendes *in vitro*-System für kinetische Untersuchungen der einzelnen Reaktionsschritte der Molybdopterin Biosynthese notwendig. Dies scheitert aber zum gegenwärtigen Zeitpunkt

schon alleine an der Tatsache, daß MoaA, das Enzym das höchstwahrscheinlich den ersten Schritt der Molybdopterin Biosynthese katalysiert, (noch) nicht zugänglich ist.

4.2 MoaC aus *Aquifex aeolicus*

4.2.1 Klonierung, Expression und Reinigung

Alle hier beschriebenen Arbeiten zur Klonierung, Reinigung und Expression wurden von Dr. Markus Fischer im Arbeitskreis von Professor Dr. Adelbert Bacher an der Technischen Universität München durchgeführt.

Das *moaC*-Gen wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion aus chromosomaler *Aquifex aeolicus*-DNA kloniert, in das Plasmid pNCO113 (Stüber et al., 1990) ligiert und in den *E. coli*-Stamm M15[pREP4], der das Repressorplasmid pREP4 zur Überexpression des *lac*-Repressorproteins enthält, transformiert. Die Reinigung erfolgte in einem dreistufigen Prozeß bestehend aus einer Hitze-fällung (20 min bei 80°C) gefolgt von einer Ionenaustausch-chromatographie (Q Sepharose FF, Pharmacia Biotech, Freiburg) und einer Gelfiltration (Superdex 200, Pharmacia, Freiburg).

4.2.2 Kristallisation und Datensammlung

Kristalle von MoaC wurden durch die Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen in CrysChem Kristallisationsplatten erhalten. Hierzu wurden 3 µl Proteinlösung (10 mg/ml in 100 mM Phosphat, pH 7.5) mit 3 µl Reservoirlösung (35 % MPD, 100 mM Citrat, pH 5.2) gemischt. Die Kristalle wuchsen innerhalb von wenigen Tagen bei Raumtemperatur zu dünnen Nadeln oder Platten mit einer typischen Größe von ca. $1000 \times 100 \times 30 \mu\text{m}^3$ heran. Die Messung der Kristalle am Synchrotron (*beamline* BW6, DESY, Hamburg) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 1.05 \text{ \AA}$ ergab die Raumgruppe $P2_1$ ($a = 71.86 \text{ \AA}$, $b = 121.89 \text{ \AA}$, $c = 115.34 \text{ \AA}$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 107.44^\circ$) mit 6 Monomeren pro asymmetrischer Einheit.

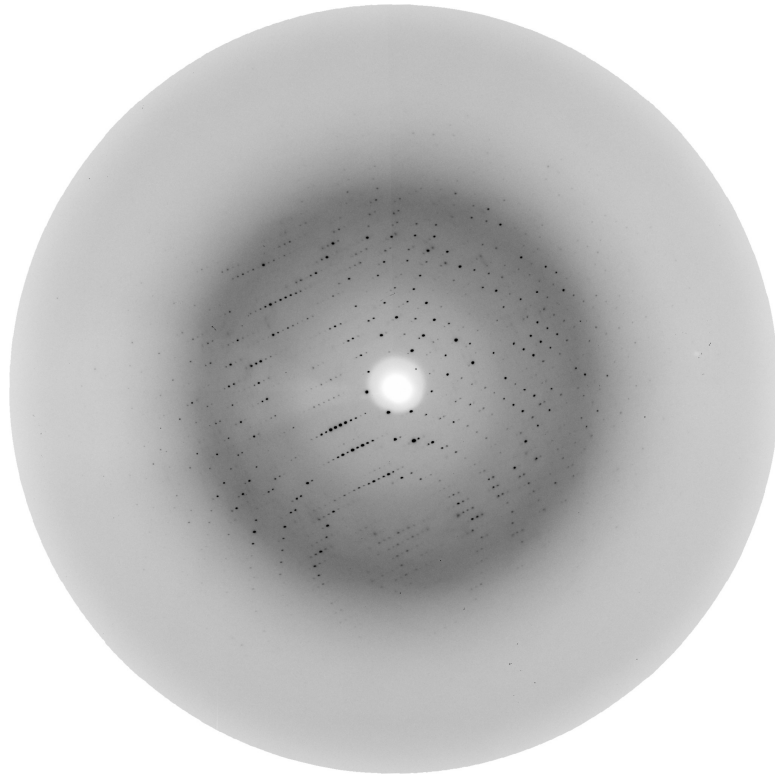


Abbildung 19: Diffraktionsbild eines MoaC-Kristalls, aufgenommen an der *beamline* BW6 am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY) in Hamburg.

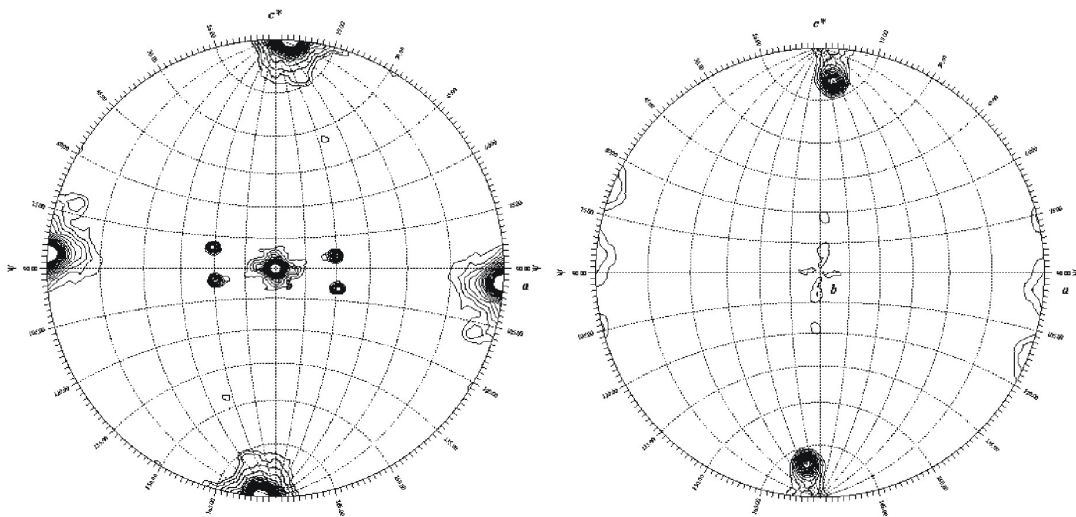


Abbildung 20: Selbstrotationsfunktionen eines in $P2_1$ ausgewerteten Datensatzes von MoaC. Links die zweizählige Korrelation ($\kappa = 180^\circ$), rechts die dreizählige Korrelation ($\kappa = 120^\circ$). Es ist deutlich die 32-Symmetrie des Hexamers zu erkennen.

Datensammlung

Auflösungsbereich (Å)	20-2.2
Gemessene Reflexe	1162200
Unabhängige Reflexe	96150
R_{merge}^1	0.065
Vollständigkeit (%) (letzte Schale)	100 (100)

Verfeinerung

Auflösungsbereich (Å)	15-2.2
R_{cryst}^2	0.204
R_{free}^3	0.247
Nicht-Wasserstoffatome	11797
Wassermoleküle	983
Rmsd Bindungslängen (Å)	0.010
Rmsd Bindungswinkel (°)	1.54
Rmsd zwischen Monomeren (Å)	0.19
Mittlerer B-Faktor (Å ²)	46.0

$$^1 R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I(\text{hkl})_i - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_i \langle I(\text{hkl}) \rangle}$$

$$^2 R_c = \frac{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{PH}}(\text{hkl})| + |F_{\text{P}}(\text{hkl})| - |F_{\text{Hcalc}}(\text{hkl})|)}{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{PH}}(\text{hkl})| + |F_{\text{P}}(\text{hkl})|)}$$

³ Für 5 % der Reflexe

Tabelle 2: Statistiken für Datensammlung und Verfeinerung von MoaC aus *A. aeolicus*

4.2.3 Strukturlösung

Da der N-terminale Teil von MoaC aus *Aquifex aeolicus* homolog zu MoaC aus *E. coli* ist (siehe Abbildung 21), konnte die Struktur durch die Methode des molekularen Ersatzes gelöst werden. Mit einem verkürzten Polyalanin-Modell von *E. coli* MoaC als Suchmodell konnte mit Hilfe des Programms MOLREP eine klare Lösung gefunden werden. Durch mehrere Zyklen von Modellbau mit MAIN (Turk, 1992) und Verfeinerung mit CNS (Brünger et al., 1998) konnten die Reste 6-251 in das Modell eingebaut werden. Die 5 N-terminalen Reste sowie die 3 C-terminalen Reste waren in der Elektronendichtekarte nicht zu sehen.

4.2.4 Strukturbeschreibung

4.2.4.1 Struktur des Monomers

MoaC aus *Aquifex aeolicus* bildet, entsprechend den Ergebnissen aus der analytischen Ultrazentrifugation und der Gelfiltration ebenso wie das homologe, jedoch signifikant kleinere MoaC aus *E. coli* ein Hexamer.

Das Monomer bildet ein schmales, langgestrecktes Molekül von $60 \times 30 \times 25 \text{ \AA}^3$, das deutlich in 2 Domänen unterteilt ist. Die N-terminale Domäne besteht aus den Resten 5-136, die C-terminale Domäne wird von den Resten 144 – 251 gebildet. Dazwischen befindet sich eine aus 6 Aminosäuren bestehende, flexible *linker*-Region. Die N-terminale Domäne zeigt deutliche Sequenzhomologie zu MoaC aus *E. coli* (40.3 % Identität, 54.1 % Homologie innerhalb der einander entsprechenden Bereiche).

Die N-terminale Domäne besteht aus einer α/β -Faltung mit einem 4-strängigen antiparallelen β -Faltblatt mit 2 langen ($\alpha 2$ und $\alpha 4$) und 2 kurzen ($\alpha 1$ und $\alpha 3$) α -Helices, die alle auf der selben Seite des Falblatts liegen. Vernachlässigt man die beiden kurzen α -Helices, so kann die Struktur mit 2 ineinander verschachtelte β - α - β -Einheiten beschrieben werden. Die erste Einheit besteht hierbei aus $\beta 1$, $\alpha 2$ und $\beta 3$, die zweite aus $\beta 2$, $\alpha 4$ und $\beta 4$. Entsprechend der Klassifizierung der SCOP-Datenbank (Murzin *et al.*, 1995) gehört die N-terminale Domäne zur Ferredoxin-ähnlichen Familie. Die beiden kurzen Helices $\alpha 1$ und $\alpha 3$ sind jedoch nicht typischerweise in dieser Faltungs-Familie enthalten.

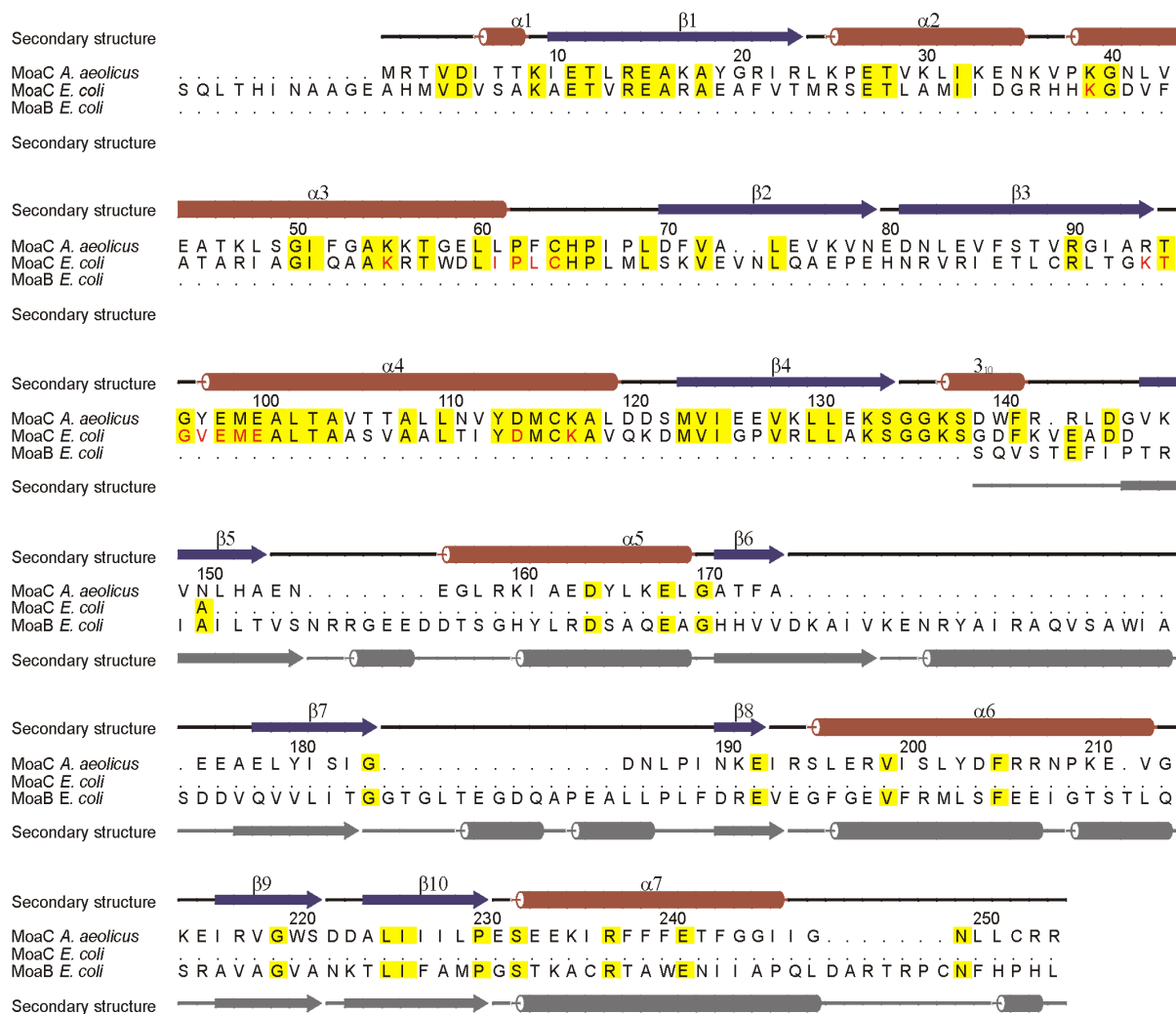


Abbildung 21: Strukturbasiertes Sequenzalignement von MoaC aus *A. aeolicus*, MoaC aus *E. coli* und MoaB aus *E. coli*. Reste, die identisch zu MoaC aus *A. aeolicus* sind, wurden gelb unterlegt. Reste, die das aktive Zentrum vom MoaC aus *E. coli* bilden, wurden rot eingefärbt. Die Sekundärstrukturelemente von MoaC aus *A. aeolicus* sind rot (Helices) bzw. blau (Faltblätter) dargestellt, die Sekundärstrukturelemente von MoaB grau.

Die C-terminale Domäne wird von den Resten 144 bis 251 gebildet und besteht aus einem sechssträngigen, vorwiegend parallelen β -Faltblatt und 5 α -Helices, die alle auf einer Seite des Faltblatts angeordnet sind.

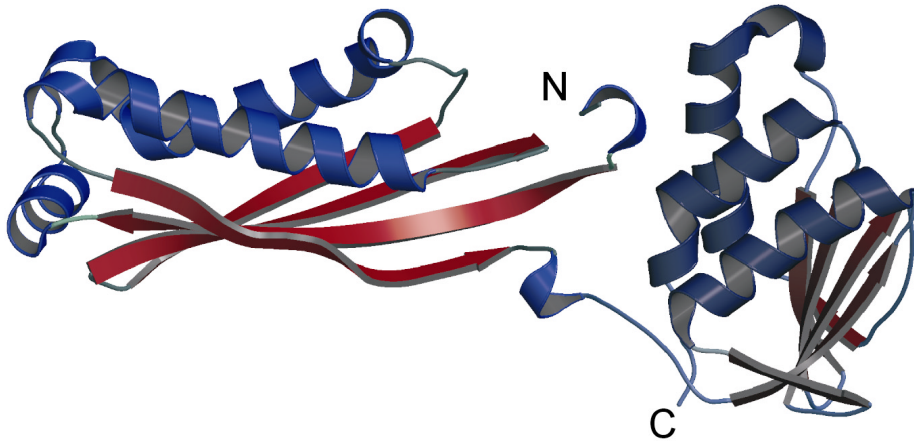


Abbildung 22: Struktur eines *A. aeolicus* MoaC-Monomers. Die Faltblätter sind rot und die Helices blau dargestellt.

4.2.4.2 Struktur des Hexamers

MoaC aus *Aquifex aeolicus* bildet im Kristall ein Hexamer mit 3₂-Symmetrie, dies bestätigt die Ergebnisse von analytischer Ultrazentrifugation und Gelfiltration. Im Hexamer bilden die C-terminalen Domänen jeweils ein Trimer ähnlich dem Trimer von MogA bzw. einem Trimer innerhalb des MoaB-Hexamers. Der Kontakt wird hier durch die Trimerisierung der Helices $\alpha 7$ vermittelt, die in einer dreizähligen Anordnung einen hydrophoben Kern bilden. Zudem tragen noch Reste im darauffolgenden *loop* und der 3_{10} -Helix zur Kontaktfläche bei.

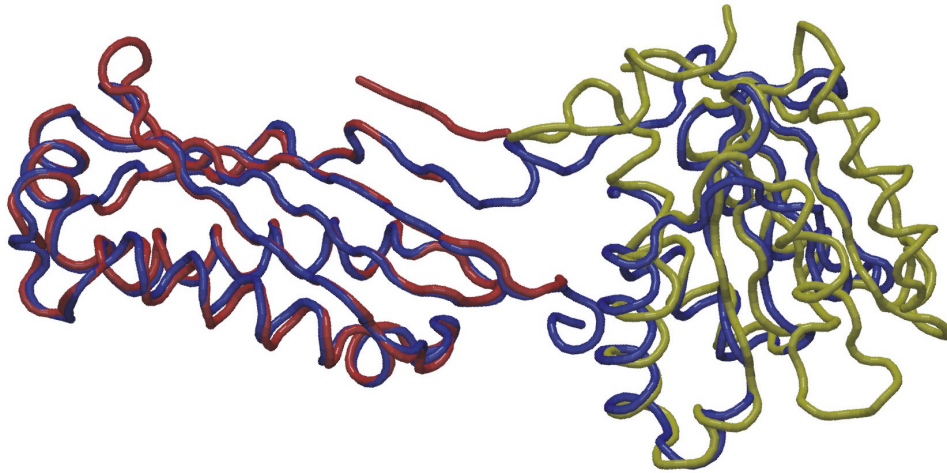


Abbildung 23: Überlagerung von *A. aeolicus* MoaC (blau) mit MoaC aus *E. coli* (rot) und MoaB aus *E. coli* (gelb).

Das zentrale Hexamer, das von den N-terminalen Domänen aufgebaut wird, entspricht weitgehend dem Hexamer in MoaC aus *E. coli*. In diesem zentralen Hexamer, das aus einem Trimer von Dimeren aufgebaut ist, steht jedes der Monomere im Kontakt mit allen anderen Monomeren, wobei jedoch der Hauptteil der Wechselwirkungen in den Dimeren und nur ein geringerer Teil im Trimer erfolgt. Das Dimer bildet durch die antiparallele Wechselwirkung der β 4-Stränge ein achtsträngiges Faltblatt mit konvexer Oberfläche unter dem die Helices angeordnet sind. Die Dimerkontakte werden hier durch Reste in α 2, α 3, α 4 und β 4 vermittelt. Durch die Hexamerisierung werden ca. 30.5 % der zugänglichen Oberfläche eines Monomers bedeckt.

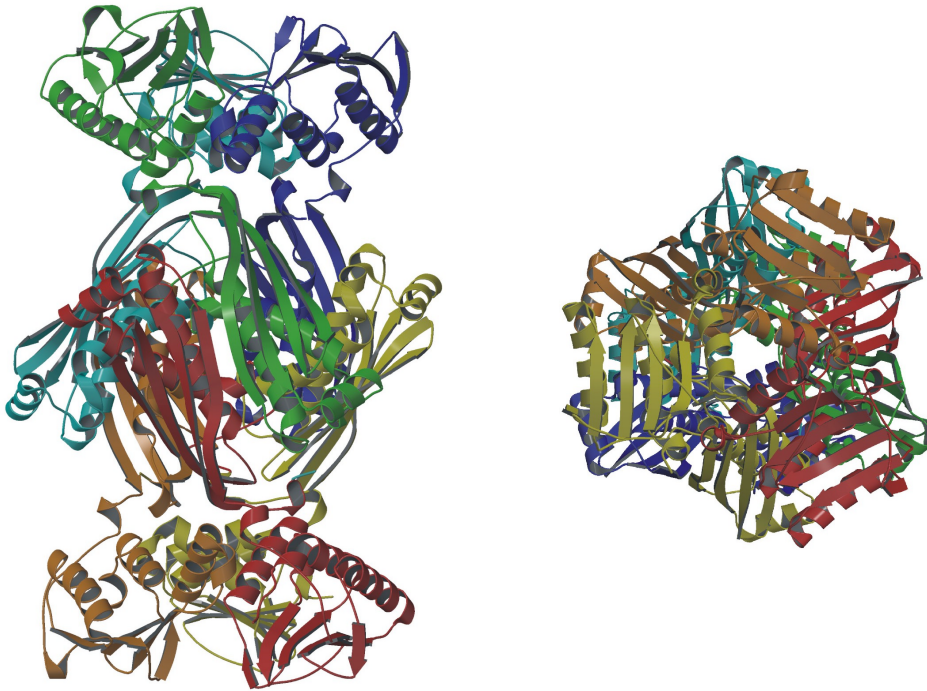


Abbildung 24: Struktur des 32-symmetrischen Hexamers von MoaC aus *A. aeolicus*. Links der Blick entlang der zweizähligen Achse, rechts der Blick entlang der dreizähligen Achse. Die einzelnen Monomere sind jeweils unterschiedlich eingefärbt.

4.2.5 Diskussion

Durch die Analyse der Sequenzen von MoaC-Proteinen aus verschiedenen Organismen, sowie durch die Struktur von *E. coli* MoaC und die biochemische Charakterisierung verschiedener Mutanten konnte auf die mögliche Lage des aktiven Zentrums geschlossen werden (Wuebbens *et al.*, 2000). Die Reste, die in *E. coli* MoaC vermutlich das aktive Zentrum bilden, sind in Abbildung 21 rot eingefärbt. Diese Reste sind in MoaC aus *Aquifex aeolicus* weitgehend identisch, es liegen nur wenige konservative Substitutionen vor.

4.2.5.1 Die C-terminale Domäne

Die Funktion der C-terminalen Domäne ist unklar. Das von den Domänen aufgebaute Trimer ähnelt stark den Trimeren von *E. coli* MoaB und MogA, wobei die Ähnlichkeit zum MoaB deutlich stärker ausgeprägt ist. Eine Überlagerung der C-terminalen Domäne mit DALI (Holm & Sander, 1995) ergibt für MoaB einen Z-score von 12.3. Dabei werden 106 Reste mit

4.2.5.2 Das aktive Zentrum

MoaC aus *E. coli*, und somit aus Hexamer der N-terminalen Domänen in MoaC aus *A. aeolicus*, kann am Besten als ein Trimer von Dimeren beschrieben werden. Das Dimer bildet dabei eine Kopf-Schwanz-Assoziation. Die Reste, die das aktive Zentrum bilden (rot eingefärbt in Abbildung 21), befinden sich an beiden Enden des Dimers. Somit gibt es in jedem Dimer zwei aktive Zentren – je eines an jedem Ende – die von Resten aus beiden Monomeren gebildet werden. Zudem scheint noch die Seitenkette eines konservierten Lysins (*E. coli*: Lys 51, *A. aeolicus*: Lys 39) aus einem dritten Monomer an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt zu sein.

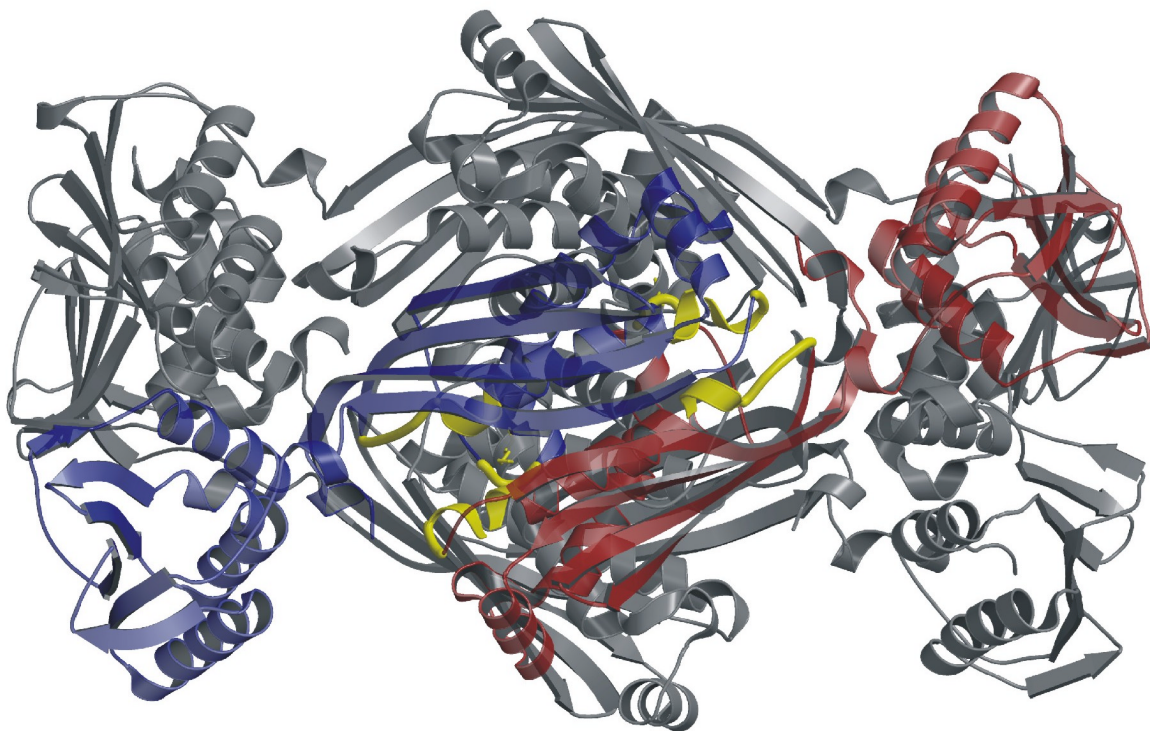


Abbildung 26: *A. aeolicus* Hexamer. Zwei Monomere sind rot bzw. blau eingefärbt. Die aktiven Zentren liegen auf beiden Seiten der Kontaktfläche zwischen den beiden N-terminalen Domänen des Dimers. Die Reste, die vermutlich das aktive Zentrum bilden, sind hier gelb eingefärbt.

Abbildung 26 zeigt die Lage der aktiven Zentren im *A. aeolicus* MoaC. Zwei Monomere, die eines der beschriebenen Dimere bilden, sind rot bzw. blau eingefärbt. Die Reste, die das aktive Zentrum bilden, sind gelb dargestellt. Sie befinden sich an beiden Enden des Dimers in der Nähe der C-terminalen Domänen.

4.2.5.3 Funktion von MoaC

Die N-terminale Domäne von *A. aeolicus* ist sehr homolog zu MoaC aus *E. coli*. Daher entspricht das zentrale Hexamer, das aus den N-terminalen Domänen aufgebaut ist, *E. coli* MoaC. Die Reste, die das vermutete aktive Zentrum bilden, sind, bis auf geringfügige Unterschiede, identisch. Daher ist davon auszugehen, daß das *A. aeolicus* Hexamer wie *E. coli* MoaC ein bislang noch unbekanntes Substrat zu Precursor Z umsetzt.

Die Funktion der C-terminalen Domäne – falls diese überhaupt eine Funktion hat - ist jedoch unklar. Bislang gibt es keine biochemischen Daten, ob die Molybdopterin-Biosynthese ohne diese Domäne noch funktioniert. Die signifikante Strukturhomologie zwischen der C-terminalen Domäne und *E. coli* MoaB deutet darauf hin, daß es sich bei *A. aeolicus* MoaC um ein Fusionsprotein aus MoaC und einem MoaB-Analogen handelt, zumal keines der *A. aeolicus*-Gene als MoaB annotiert wurde. Die anderen in *E. coli* an der Molybdän-Kofaktor-Biosynthese beteiligten Gene, z. B. MogA, sind hingegen auch in *A. aeolicus* vorhanden. Dies würde auch auf den ersten Blick plausibel erscheinen, falls MoaB wirklich, wie unter 4.1.6.4 spekuliert wurde, instabile Zwischenprodukte der Biosynthese bindet und stabilisiert. In diesem Fall könnte die Bildung eines Fusionsproteins ein beträchtlicher Vorteil sein. Betrachtet man die C-terminale Domäne wirklich als MoaB-Äquivalent, so stellt sich jedoch wiederum die Frage nach der Relevanz dieses Proteins, da die in MoaB/MogA konservierten (und in MogA für die Funktion essentiellen) Reste in der C-terminalen Domäne gar nicht vorhanden sind. Eine mögliche Erklärung für dieses Problem bieten Untersuchungen

an der Cnx1 G-Domäne (Kuper et al., 2000), die homolog zu MoaB/MogA ist (siehe Abbildung 14). Hier wurden für eine Domäne drei verschiedene Funktionen nachgewiesen: die Bindung von Molybdopterin, die Insertion von Molybdän in Molybdopterin und die Stabilisierung des gebildeten Molybdän-Kofaktors. Es wäre also durchaus denkbar, daß in der C-terminalen Domäne, wie auch in MoaB bislang nicht identifizierte Bindungsstellen zur Stabilisierung instabiler Zwischenprodukte vorhanden sind.

4.3 GTP Cyclohydrolase I

4.3.1 humane GTP Cyclohydrolase I

Die hier beschriebenen Arbeiten an der humanen GTP Cyclohydrolase I wurden gemeinsam mit Dr. Günter Auerbach durchgeführt.

4.3.1.1 Expression und Reinigung

Humane GTP Cyclohydrolase I (hCYH) wurde von Anja Hermann und Susanne Schiffmann im Arbeitskreis von Professor Dr. Adelbert Bacher an der Technischen Universität München kloniert, exprimiert und gereinigt. hCYH zeigt eine hohe Sequenzhomologie zur bereits bekannten GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli* (37.9 % Identität, 47.9 % Homologie; siehe Abbildung 27), unterscheidet sich von dieser jedoch durch einen N-terminalen Überhang von 31 Aminosäuren. Bei der Expression der hCYH wurde festgestellt, daß diese nicht stabil war, es kam immer zur Spaltung an sieben Arginin-Resten im N-terminalen Bereich des Proteins. Um das Protein zu stabilisieren, wurde der Versuch unternommen, die Proteolyse durch Mutation der Arginin-Reste zu Glutamin zu verhindern. Nachdem sukzessive alle sieben Arginin-Reste ausgetauscht wurden, konnte ein stabiles, gut lösliches Protein gereinigt werden, das ähnlich aktiv war, wie frisch gereinigtes Wildtyp-Enzym. Kristallisationsversuche, die mit dieser Siebenfach-Mutante durchgeführt wurden, führten jedoch nicht zu Kristallen, möglicherweise aufgrund der sterischen Behinderung durch den im Vergleich zur eCYH längeren N-terminus. Es wurde daher die Deletionsmutante $\Delta 42$ -hCYH, bei der die 41 N-terminalen Reste deletiert sind, exprimiert. Diese Mutante war stabil, gut löslich und zeigte die gleiche Aktivität, wie die zuvor gereinigte Siebenfach-Mutante. Die $\Delta 42$ -hCYH wurde in *E. coli* M15[pGB]-Zellen exprimiert und in einem dreistufigen Prozeß aus Ionenaustauschchromatographie, Ammoniumsulfatfällung und hydrophober Interaktionschromatographie gereinigt. In keinem der verwendeten Puffer war hierbei EDTA enthalten.

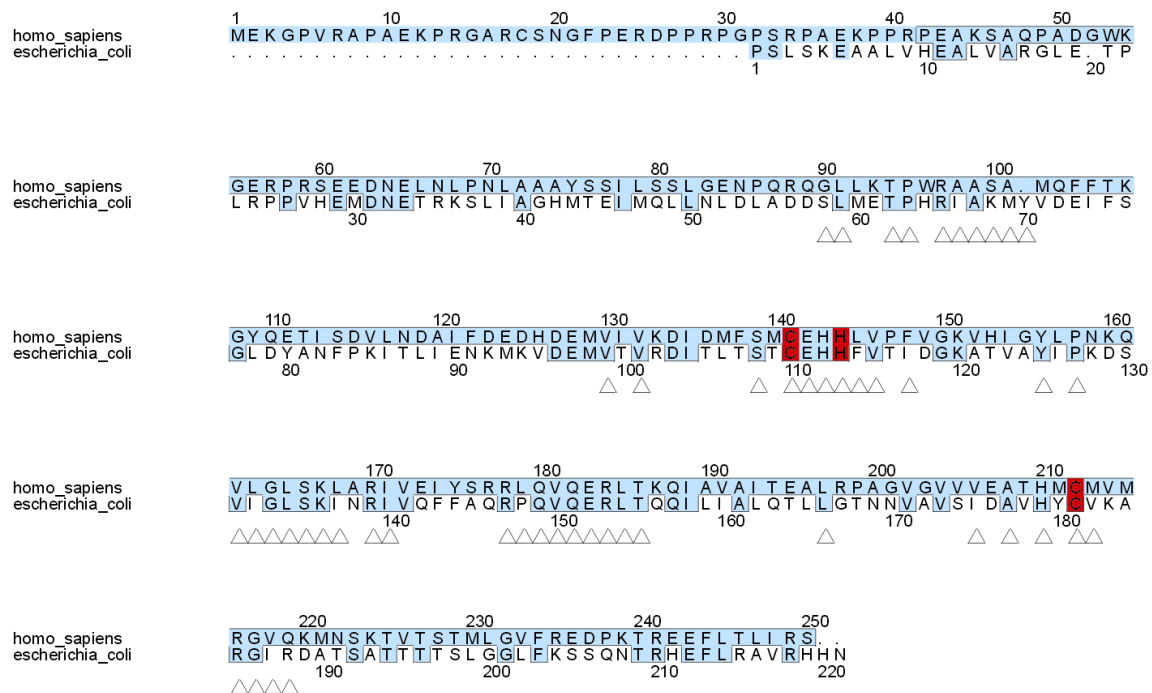


Abbildung 27: Sequenzalignment von humaner und *E. coli* GTP Cyclohydrolase I. Die rot unterlegten Reste sind für die Bindung des Zinkions verantwortlich. Reste innerhalb eines Radius von 10 Å sind mit Δ markiert

4.3.1.2 Kristallisation

Zur Kristallisation wurden 5 µl der aufkonzentrierten Proteinlösung (4.6 mg/ml in 100 mM Kaliumphosphat pH 7.5, 2 mM DTT und 0.02% NaN₃) mit 5 µl des Kristallisationspuffers (1 M Ammoniumsulfat pH 7.5, 3.2 % Isopropanol, 2 mM DTT) versetzt und im sitzenden Tropfen nach der Dampfdiffusionsmethode bei Raumtemperatur kristallisiert. Die Kristalle wuchsen innerhalb weniger Tage bis zu einer Größe von 700 µm³ und gehörten zur Raumgruppe P6₅22 mit Gitterkonstanten von $a = b = 115.1 \text{ \AA}$, $c = 387.3 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$. Der Solvensgehalt betrug bei 5 Monomeren in der asymmetrischen Einheit 60 %, entsprechend einem Matthews-Koeffizienten von $V_M = 3.04 \text{ \AA}^3/\text{Da}$.

4.3.1.3 Datensammlung und Auswertung

Die Kristalle streuten auf der Drehanode leider nur unzureichend, daher war eine Messung mit Synchrotronstrahlung an der *beamline* BW6 (DESY, HASYLAB, Hamburg; $\lambda = 1.07 \text{ \AA}$) mit einem MarResearch™ *Imageplate*-System notwendig. Leider ist es trotz intensiver Bemühungen nicht gelungen, *cryo*-Bedingungen für die hCYH-Kristalle zu finden. Deshalb wurden unter Verwendung von Synchrotronstrahlung neun Kristalle bei Raumtemperatur gemessen. Leider war hierbei die Isomorphie der verwendeten Kristalle nicht optimal, typischerweise lag die isomorphe Differenz zwischen den einzelnen Datensätzen bei 15-18 % in allen Auflösungsschalen. Dennoch konnte ein bis 3.1 \AA mit 84.5 % (letzte Schale: 41.9 %) hinreichend kompletter Datensatz aus den einzelnen Messungen kombiniert werden (Tabelle 3).

4.3.1.4 Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung

Die Struktur von $\Delta 42$ -hCYH konnte mit Hilfe von Patterson-Suchmethoden gelöst werden. Die Berechnungen wurden mit dem Programm MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997) in einem Auflösungsbereich von 20-4.0 \AA mit einem Pentamer der eCYH durchgeführt. Der R-Faktor der höchsten Lösung lag bei 47.8 % bei einem Korrelationskoeffizienten von 0.435. Die korrekte hCYH-Sequenz wurde mit MAIN (Turk, 1992) in die Dichte eingebaut und mit dem Programm CNS (Brünger et al., 1998) verfeinert. Das atomare Modell konnte in iterativen Zyklen von Modellbau und Verfeinerung bis zu einem R-Faktor von 20.4 % ($R_{\text{free}} = 29.8 \%$) verfeinert werden (Auerbach *et al.*, 2000). Das endgültige Modell beinhaltet die Reste 55-250 der Wildtyp-hCYH-Sequenz. Die 14 N-terminalen Reste 42-54 von $\Delta 42$ -hCYH waren fehlgeordnet und in der Elektronendichte daher nicht zu erkennen. Der für eine Struktur dieser Art sehr hohe mittlere B-Faktor von 88.7 \AA^2 ist dadurch zu erklären, daß die

sich durch die Verwendung mehrerer Kristalle geringer Isomorphie ergebenden Fehler im B-Faktor aufgefangen werden.

Datensammlung

Auflösungsbereich (Å)	20-3.1
Gemessene Reflexe	276,838
Unabhängige Reflexe	25,288
R_{merge}^1	0.165
Vollständigkeit (%) (äußerste Schale)	84.5/41.9

Verfeinerung

Auflösungsbereich (Å)	20.0-3.1
R_{cryst}^2	0.204
R_{free}^3	0.298
Anzahl der Nicht-Wasserstoff-Atome	7,735
Rmsd Bindungslängen (Å)	0.011
Rmsd Bindungswinkel (°)	1.62
Rmsd zwischen Monomeren (Å)	0.50
Mittlerer B-Faktor (Å ²)	88.68

$$^1 R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I(\text{hkl})_i - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_i \langle I(\text{hkl}) \rangle}$$

$$^2 R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{PH}}(\text{hkl})| + |F_{\text{P}}(\text{hkl})| - |F_{\text{Hcalc}}(\text{hkl})|)}{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{PH}}(\text{hkl})| + |F_{\text{P}}(\text{hkl})|)}$$

³ Für 5 % der Reflexe

Tabelle 3: Statistiken für Datensammlung und Verfeinerung der humanen GTP Cyclohydrolase I

4.3.1.5 Strukturbeschreibung

Wie aufgrund der Sequenzhomologie zur bereits bekannten eCYH-Struktur (Nar *et al.*, 1995b) zu erwarten war, sind die Strukturen von hCYH und eCYH sehr ähnlich. Die Monomer beider Proteine sind topologisch identisch und können mit einer rms-Abweichung von 1.25 Å² über alle Atome überlagert werden (Abbildung 28). Fünf Monomere assoziieren entlang ihrer viersträngigen β -Faltblätter zu einer zwanzigsträngigen, antiparallelen β -barrel-Struktur mit einem Durchmesser von ca. 35 Å. Innerhalb des Pentamers bilden sich weitere

Wechselwirkungen zwischen zwei *loop*-Regionen eines Monomers, die mit dem vorhergehenden Monomer interagieren. Das β -barrel wird mit den C-terminalen Helices jedes Monomers gefüllt, welche ein paralleles Helix-Bündel mit einem Durchmesser von ca. 15 Å ausbilden. Das biologisch relevante Dekamer wird durch die Kopf-Kopf-Assoziation von zwei Pentameren gebildet. Dadurch entsteht ein $65 \times 65 \times 100$ Å³ großes Partikel mit perfekter D₅-Symmetrie.

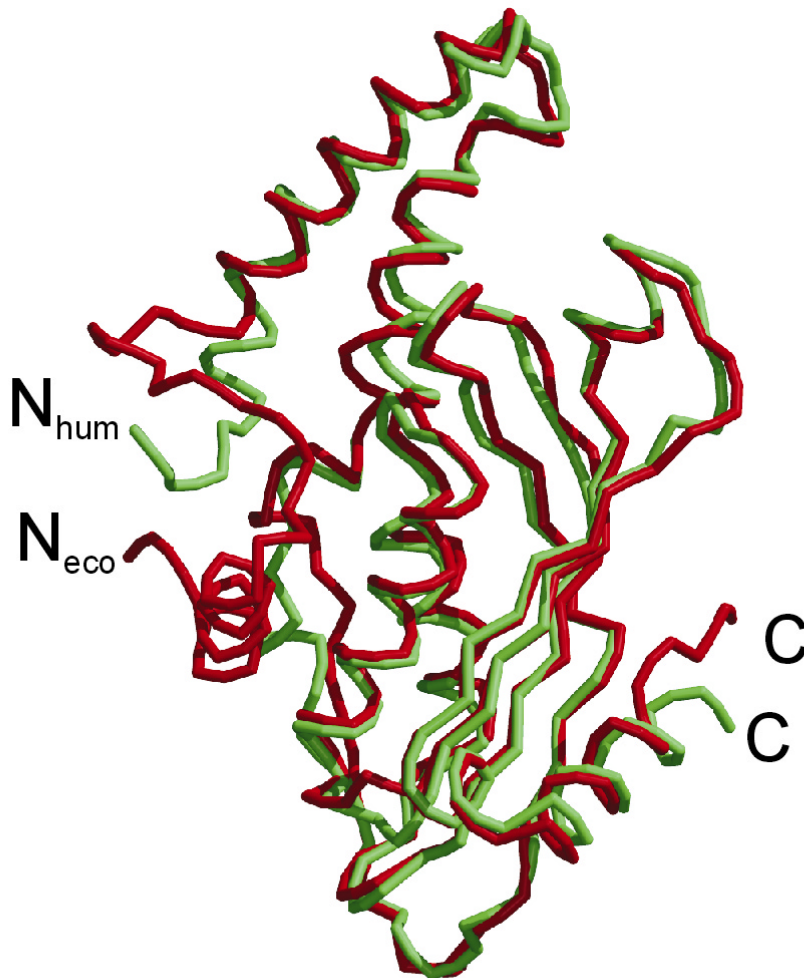


Abbildung 28: Überlagerung der Monomere von humaner (grün) und *E. coli* GTP Cyclohydrolase I (rot).

4.3.1.6 Zinkbindung

Bei der Verfeinerung der Struktur wurde überraschenderweise im Gegensatz zur bislang bekannten *E. coli*-Struktur Elektronendichte für ein Metallion im aktiven Zentrum des Proteins gefunden. Aufgrund der Koordination durch Histidin 144 und die Cysteine 141 und 212 wurde vermutet, daß es sich hierbei um ein Zinkion handelt. Diese Vermutung konnte durch Atomabsorptions-Spektroskopie bestätigt werden, wobei ein Zinkion pro Monomer nachgewiesen werden konnte. Die vierte Position in der tetraedrischen Koordinationssphäre des Zinks wird von einem Isopropanol-Molekül aus dem Kristallisationspuffer besetzt. Da die Bindungslängen zum Zink aufgrund der niedrigen Auflösung und der schlechten Datenqualität nicht *unrestrained* verfeinert werden konnten wurden diese auf Literaturwerte fixiert (Alberts *et al.*, 1998).

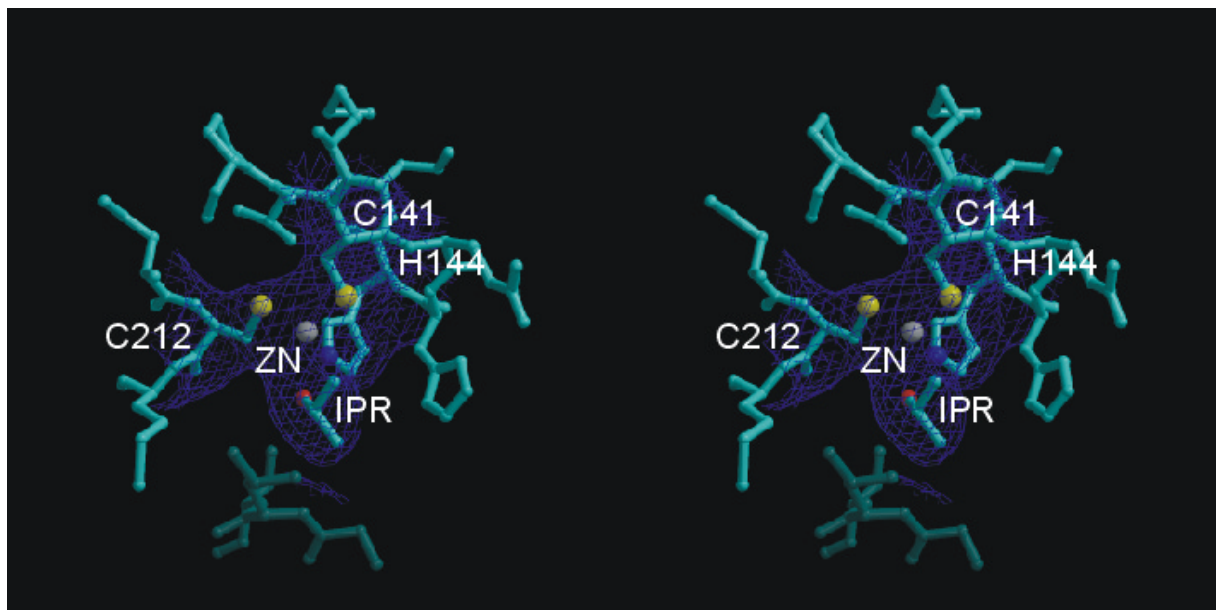


Abbildung 29: Stereoabbildung des aktiven Zentrums der humanen GTP Cyclohydrolase I. An das Zink (ZN) ist ein Isopropanol (IPR) aus dem Kristallisationspuffer gebunden.

Da die Bindung eines Zinkions im aktiven Zentrum erhebliche Auswirkungen auf die Bewertung des bisher aufgrund von Untersuchungen an eCYH vorgeschlagen Mechanismus hätte, wurde beschlossen, auch das *E. coli*-Protein nochmals unter besonderer Berücksichtigung einer möglichen Metallbindung zu untersuchen. Das bei früheren kristallographischen Untersuchung verwendete Protein war immer mit Puffern aufgereinigt worden, denen als Proteaseinhibitor EDTA zugesetzt worden war.

4.3.2 *E. coli* GTP Cyclohydrolase I

Die eCYH wurde ebenfalls im Arbeitskreis von Professor Dr. A. Bacher von Andreas Bracher gereinigt, wie in der Literatur beschrieben (Bracher *et al.*, 1998), wobei in keinem der Puffer EDTA verwendet wurde. Zur Kristallisation wurde eCYH (6 mg/ml in 10 mM Kaliumphosphat pH 7.0 und 0.02 % NaN_3) mit Kristallisationspuffer (6 % PEG 6000, 150 mM KCl, 100 mM MOPS pH 7.0) im Verhältnis 3:1 gemischt und nach der Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen bei Raumtemperatur kristallisiert. Die Kristalle wuchsen innerhalb von ca. 2 Wochen bis zu einer Größe von ca. $900 \times 600 \times 300 \mu\text{m}^3$ und gehörten zur Raumgruppe $C222_1$ mit Gitterkonstanten von $a = 227.7 \text{ \AA}$, $b = 314.2 \text{ \AA}$, $c = 132.6 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.

4.3.2.1 Datensammlung und Auswertung

Ein Datensatz der eCYH konnte bei Raumtemperatur mit einem auf einen Drehanodengenerator montierten MarResearch™ *imageplate*-System bis zu einer Auflösung von 2.8 \AA gemessen werden. Bei einer Vollständigkeit von 90.2 % (letzte Schale: 44.3 %) wurde ein R_{merge} von 12 % erreicht (Tabelle 4).

4.3.2.2 Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung

Die Struktur wurde durch Patterson-Suchmethoden mit dem Programm MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997) gelöst. Durch zyklische Mittelung und Modellbau in MAIN (Turk, 1992), sowie Verfeinerung mit CNS (Brünger et al., 1998) konnte das Modell bis zu einem R_{cryst} von 20.2 % ($R_{\text{free}} = 25.1$) verfeinert werden.

Datensammlung

Auflösungsbereich (Å)	20-2.8
Gemessene Reflexe	572,885
Unabhängige Reflexe	107,321
R_{merge}^1	0.12
Vollständigkeit (%) (letzte Schale)	90.2 (44.3)

Verfeinerung

Auflösungsbereich (Å)	15-2.8
R_{cryst}^2	0.202
R_{free}^3	0.251
Nicht-Wasserstoffatome	25,965
Rmsd Bindungslängen (Å)	0.011
Rmsd Bindungswinkel (°)	1.47
Rmsd zwischen Monomeren (Å)	0.19
Mittlerer B-Faktor (Å ²)	44.0

¹ $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I(\text{hkl})_i - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_i \langle I(\text{hkl}) \rangle}$

² $R_c = \frac{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{PH}}(\text{hkl})| + |F_{\text{P}}(\text{hkl})| - F_{\text{Hcalc}}(\text{hkl}))}{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{PH}}(\text{hkl})| + |F_{\text{P}}(\text{hkl})|)}$

³ Für 5 % der Reflexe

Tabelle 4: Statistiken für Datensammlung und Verfeinerung der *E. coli* GTP Cyclohydrolase I.

4.3.2.3 Strukturbeschreibung

Wie nun bereits erwartet konnte auch im aktiven Zentrum von eCYH ein Zinkion gefunden werden. Hierbei war das Zinkion von Histidin 114 sowie den Cysteinen 110 und 181 koordiniert. Diese Reste waren bereits in früheren biochemischen Untersuchungen mit

(weitgehend) zinkfreiem Protein als essentiell für die katalytische Aktivität identifiziert worden (Bracher et al., 1998). Die vierte Koordinationsstelle am Zink wird hier von einem Wassermolekül besetzt (Abbildung 30).

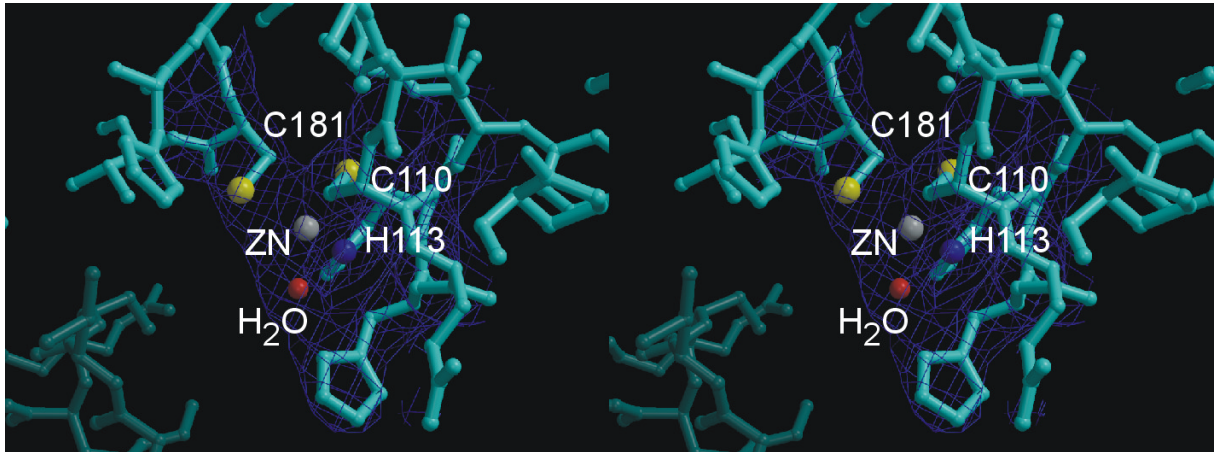


Abbildung 31: Aktives Zentrum der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli*

Die Disulfidbrücke, die bei den bisherigen kristallographischen Untersuchungen zwischen den Cysteinen 110 und 181 beobachtet wurde (Nar et al., 1995b), (Nar *et al.*, 1995a), muß unter Berücksichtigung dieser neuen Ergebnisse als ein Oxidations-Artefakt im weitgehend zinkfreien Enzym betrachtet werden. Abbildung 32 zeigt die strukturelle Veränderungen, die sich durch die Zinkbindung ergeben. Auffällig ist außer der nicht mehr vorhandenen Disulfidbrücke vor allem die unterschiedliche Orientierung von Histidin 112, das in der zinkhaltigen Form eine Wasserstoffbrücke zu dem an das Zinkion gebundene Wasser bildet.

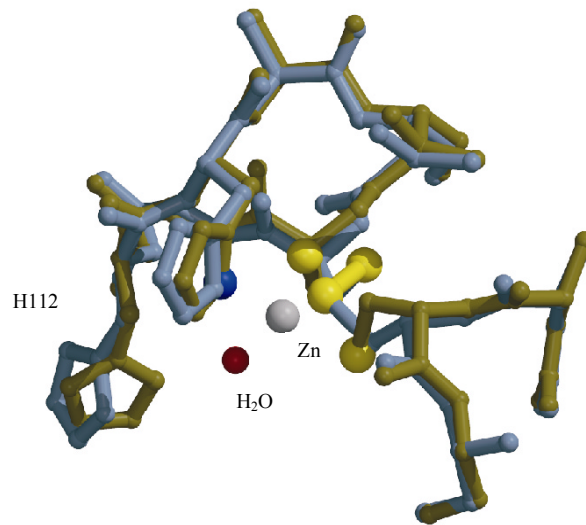


Abbildung 32: Strukturelle Veränderungen durch die Zink-Bindung in *E. coli* GTP Cyclohydrolase I: Grau ist die zinkfreie Struktur, braun die zinkhaltige Struktur eingefärbt.

4.3.3 Diskussion

Für eCYH, die unter Verwendung von EDTA-haltigen Puffern aufgereinigt wurde, konnte bisher eine spezifische Aktivität von ca. $20 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bestimmt werden (Schmid, 1992). Protein, das ohne Zusatz von EDTA aufgereinigt wurde, zeigte hingegen eine spezifische Aktivität von $96 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Bracher et al., 1998).

Aufgrund der nun nachgewiesenen, essentiellen Rolle des Zinkions im aktiven Zentrum von CYH müssen die bisher vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen (Nar et al., 1995a) (Bracher et al., 1998) dementsprechend modifiziert werden. Das Zinkion kann einen Wasserliganden aktivieren, indem es dessen Azidität erhöht. So wird ein Nucleophil in der Nähe des Imidazolrings des gebundenen Substrats erzeugt. Der zinkgebundene Hydroxyl-Ligand könnte am C8-Atom des GTP angreifen, wobei Histidin 179 (*E. coli* Sequenz) als Protonen-

Donor für N-7 des Substrats dienen könnte. Da jedoch eCYH-Mutanten ohne dieses Histidin die Ringöffnung katalysieren, erscheint auch eine Protonierung durch ein vom Zink aktiviertes Wassermolekül am N-7 möglich. Wie bereits früher vorgeschlagen (Nar et al., 1995a), könnte eine Protonierung des Sauerstoffatoms im Furanosering durch Histidin 113 (143 in hCYH) die Öffnung des Imidazolrings unterstützen, durch die vorübergehende Bildung einer Schiff-Base aus dem N-Glycosid. Die Bildung des N-glycosidischen Produkts, 2-Amino-5-formylamino-6-ribofuranosylamino-4(3*H*)-pyrimidon-5'-triphosphat, wurde durch Untersuchungen an Histidin 179 Mutanten von eCYH nachgewiesen (Bracher et al., 1998). Die anschließende Spaltung der Formamid-Bindung ähnelt der Reaktion, die von Zink-Proteasen katalysiert wird. Das Zinkion könnte gleichzeitig die Formamid Carbonyl-Bindung polarisieren und ein Wassermolekül für den nucleophilen Angriff aktivieren. Im Unterschied zum anfänglichen Angriff am Imidazolring ist für diesen Schritt eine Säurekatalyse durch Histidin 179 zwingend notwendig.

Ob Zink an der nachfolgende Amadori-Umlagerung beteiligt ist, bleibt bislang unbekannt. Es sollte jedoch eine starke Base notwendig sein, um ein Proton vom C-2' des Substrats zu abstrahieren und ein Hydroxyl-Ion, das durch das Zink (das hierbei wieder als Lewis-Säure wirkt) erzeugt wird, könnte möglicherweise diesen Zweck erfüllen.

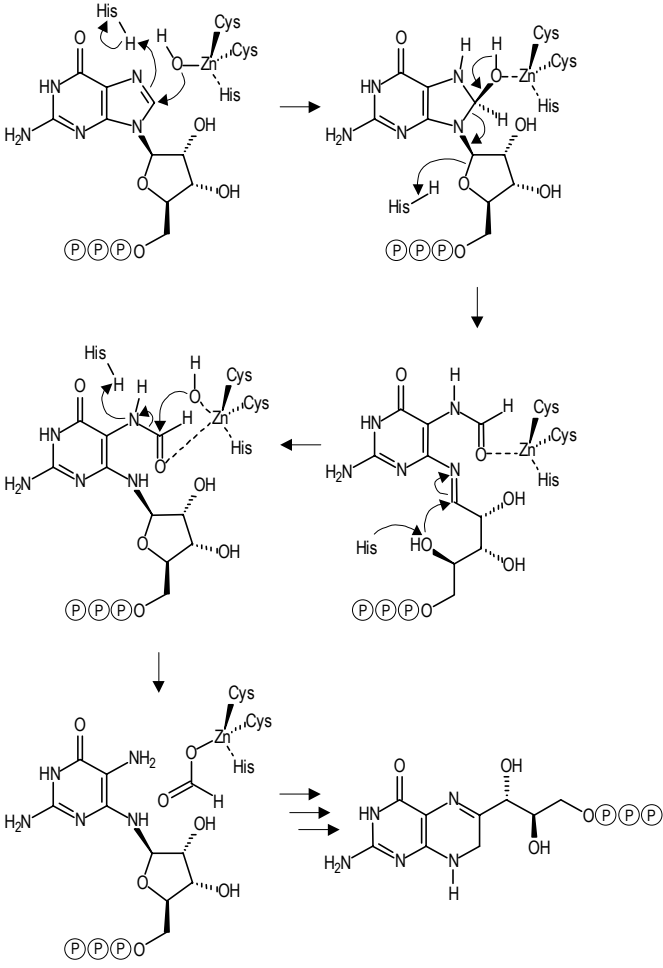


Abbildung 33: Reaktionsmechanismus der GTP Cyclohydrolase I

4.4 GFRP

Die hier beschriebenen Arbeiten an GFRP wurden gemeinsam mit Dr. Thorsten Lemm am Max-Planck-Institut für Biochemie in der Abteilung von Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt.

4.4.1 Klonierung, Expression und Reinigung

GFRP aus Ratte wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Adelbert Bacher an der Technischen Universität München durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) von Anja Herrmann und Susanne Schiffmann kloniert und in *E. coli* XL1 exprimiert. Rekombinantes GFRP wurde in einer dreistufigen Reinigung isoliert, deren erster Schritt Hitzepräzipitation bei 72 °C war. Der nächste Schritt war eine Anionen-Austauschchromatographie an Q-Sepharose. Die Säule wurde mit 50 mM Tris/HCl Puffer (pH 7.4) äquilibriert und durch einen linearen Gradienten von 0 bis 500 mM NaCl im selben Puffer eluiert. Letzter Reinigungsschritt war eine Gelfiltrationschromatographie mit 100 mM Kaliumphosphat pH 7.4. Alle verwendeten Puffer enthielten 2 mM DTE.

4.4.2 Kristallisation und Datensammlung

GFRP wurde im Batch-Verfahren kristallisiert. Das rekombinante Protein wurde im Gelfiltrationspuffer auf ca. 5 mg/ml aufkonzentriert und bildete bei 4 °C spontan über Nacht nadelförmige Kristalle von maximal $0.1 \times 0.1 \times 1.0 \text{ mm}^3$. Daten bis 2.6 Å Auflösung wurden bei Raumtemperatur mit einer auf einem Drehanodengenerator montierten MARresearch™ *imageplate* aufgenommen. Die Daten wurden mit DENZO und CCP4 ausgewertet. Die Kristalle gehörten bei Zellkonstanten von $a = 106.8 \text{ Å}$, $b = 110.1 \text{ Å}$, $c = 38.7 \text{ Å}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ zur Raumgruppe $P2_12_12$ und enthielten ein Pentamer in der asymmetrischen Einheit. Die Einzelheiten der Datenauswertung sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Eine zweite Kristallform (Raumgruppe $I2_13$ bei Achsen von 146.6 Å), die Daten bis 3.0 Å lieferte, wurde

durch die Dampfdiffusionsmethode mit 2 M Na/K-phosphat, 0.2 M Ammoniumsulfat und 0.2 M HEPES pH 7.0 erhalten.

4.4.3 Multipler isomorpher Ersatz

Zur Phasierung wurden systematisch Schweratomverbindungen getestet. Dazu wurden die Kristalle längere Zeit in den schweratomhaltigen Kristallisationspuffer eingelegt. Die Interpretation der Derivatdatensätzen durch *Differenz-Patterson-Methoden* wurde mit dem PROTEIN (Steigemann, 1974) Programmpaket durchgeführt und ergab die in Tabelle 5 näher beschriebenen Derivate. Die Schweratomlagen wurden mit SHARP (La Fortelle & Bricogne, 1997) verfeinert, die daraus resultierende Elektronendichte wurde durch Dichtemodifikation mit SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) weiter verbessert.

4.4.4 Modellbau und Verfeinerung

Die dichtemodifizierte MIR-Elektronendichte wurde zur Interpretation der Elektronendichte verwendet. Modellbau und zyklische Mittelung über die fünfzählige nichtkristallographische Symmetrie des Pentamers wurde mit MAIN durchgeführt, das eingebaute Modell wurde mit CNS verfeinert. Durch iterative Zyklen von Modellbau und Verfeinerung wurde das Modell vervollständigt und bis zu einem R-Faktor von 16.3 % ($R_{\text{free}} = 21.1\%$) verfeinert. Die Verfeinerungsstatistik ist in Tabelle 5 zusammengefaßt. Ramachandranplots des Proteinmodells zeigen eine Resteverteilung von 92.1 % innerhalb der Kernbereiche und 7.9 % innerhalb der erlaubten Bereiche, außerhalb der erlaubten Bereiche befinden sich keine Reste. Die zweite Kristallform wurde mit dem verfeinerten Modell der ersten Kristallform durch Molekularen Ersatz mit dem Programm MOLREP gelöst und wie beschrieben bis zu einem R-Faktor von 21.7 % ($R_{\text{free}} = 26.5\%$) verfeinert.

	NAT1	Thiomersal	KAu(CN) ₂	K ₂ Pt(NO ₂) ₂ (NH ₃) ₂
Datensammlung				
Auflösung Å	2.6	2.7	2.8	2.8
Vollständigkeit	97.7	93.2	93.1	99.8
Anzahl der Reflexe	154398	99236	82213	106804
unabhängige Reflexe	14719	13106	11856	13107
R _{sym} ¹ (%)	11.8	12.8	7.6	17.9
Phasierung				
R _{iso} ² (%)	-	21.7	17.9	18.1
R _C ³ (%)	-	0.74	0.80	0.87
Phasing power	-	1.38	1.16	0.50
No. of sites	-	5	2	1
Verfeinerung				
Anzahl der Proteinatome			3340	
Anzahl der Solvensmoleküle			255	
Anzahl der Reflexe			14070	
R.m.s.d Bindungslängen(Å)			0.007	
R.m.s.d Bindungswinkel (°)			1.38	
R.m.s.d. zwischen den Monomeren C _α (Å)			0.32	
Mittlerer B-Faktor (Å ²)			22.03	
R-Faktor			16.1	
R _{free} ⁴			21.4	

$$^1 R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i \langle I(hkl) \rangle}$$

$$^2 R_{\text{iso}} = \frac{\sum_{hkl} |F_{\text{PH}}(hkl) - F_{\text{P}}(hkl)|}{\sum_{hkl} F_{\text{P}}(hkl)}$$

$$^3 R_{\text{C}} = \frac{\sum_{hkl} ||F_{\text{PH}}(hkl)| + |F_{\text{P}}(hkl)| - F_{\text{Hcalc}}(hkl)|}{\sum_{hkl} ||F_{\text{PH}}(hkl)| + |F_{\text{P}}(hkl)||}$$

⁴ Für 5 % der Reflexe

Tabelle 5: Statistik von Datensammlung , Phasierung und Verfeinerung von GFRP aus Ratte.

4.4.5 Strukturbeschreibung

GFRP bildet ein Pentamer aus identischen um eine fünfzählige Achse angeordneten Untereinheiten (Abbildung 34). Die Modelle aller Untereinheiten bestehen aus der vollständigen Sequenz des Ratten-Proteins, wobei das N-terminale Methionin posttranslational abgespalten wurde. Das Monomer faltet zu einer α/β -Struktur mit einem dominierenden sechssträngigen antiparallelen Faltblatt. Zwischen den Strängen $\beta 2$ und $\beta 3$ befindet sich die kurze Helix $\alpha 1$, bestehend aus den Resten 25-30, und zwischen den Strängen $\beta 4$ und $\beta 5$ eine längere Helix $\alpha 2$, gebildet von den Resten 52-60. Beide Helices befinden sich auf der gleichen Seite des β -Faltblatts. Die Faltblätter der Monomere bilden im Pentamer eine propellerähnliche Struktur, wobei Helix $\alpha 2$ jeweils in der Kontaktfläche zwischen den Faltblättern liegt. Durch das Pentamer wird eine diskussähnliche Scheibe mit einer konvexen und einer konkaven Seite und Dimensionen von ungefähr $50 \times 50 \times 20 \text{ \AA}^3$ gebildet. An dem *loop*, der die Stränge $\beta 1$ und $\beta 2$ verbindet, wurde ein gebundenes Metallion gefunden. Dieses wird von den Hauptketten-Carbonylen von Glutamin 8, Arginin 10 und Valin 13, sowie dem Hydroxyl-Sauerstoff von Threonin 7 gebunden. Die Bindungslängen betragen hierbei 2.8 \AA (Glutamin 8), 2.9 \AA (Arginin 10 und Valin 13) und 3.0 \AA (Threonin 7). Es konnte nie eindeutig geklärt werden, um was für ein Metall es sich hierbei handelt, da jedoch weder durch Atomabsorptions-Spektroskopie noch durch Röntgenfluoreszenz irgendein Metallatom nachgewiesen werden konnte, wurde es als Kaliumion aus dem Reinigungs- bzw. Kristallisationspuffer in das Modell eingebaut. Zwischen den Faltblattsträngen $\beta 3$ und $\beta 4$ bilden die Reste 37 – 44 einen langen, vom Protein abstehenden *loop*, der jedoch in der Elektronendichte wohldefiniert war.

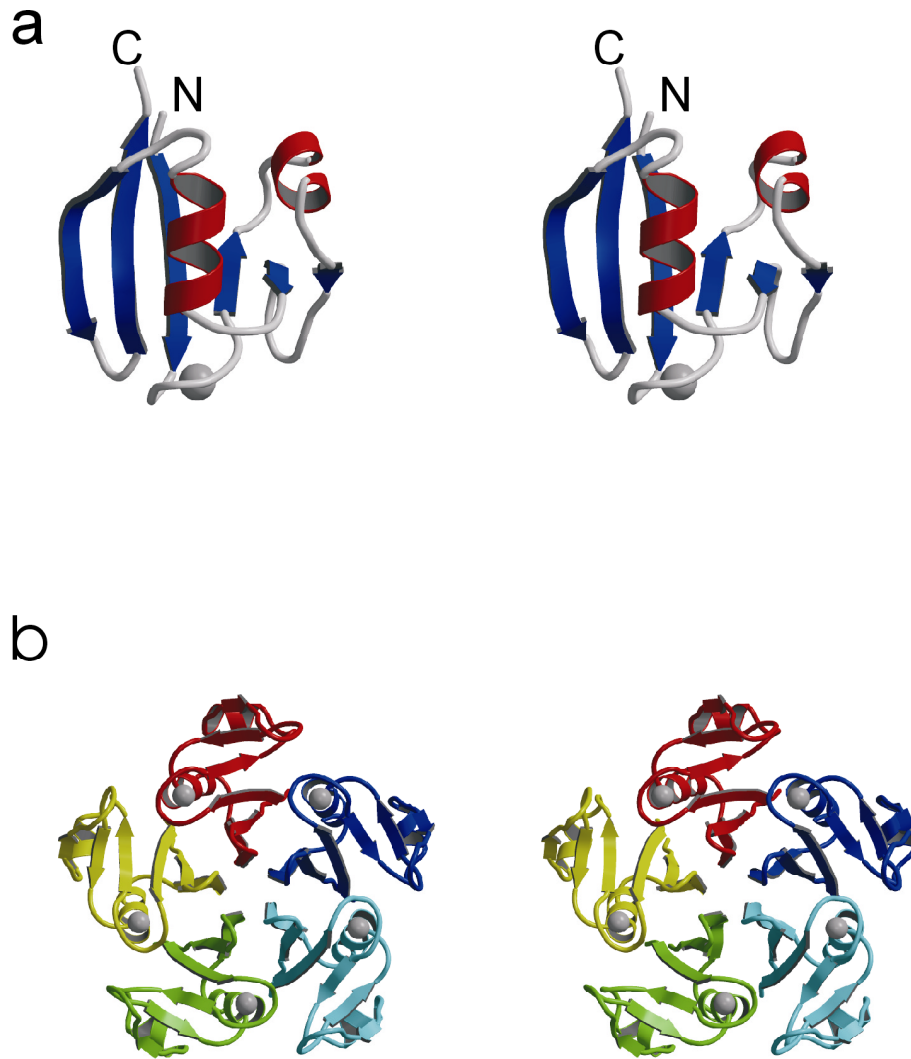


Abbildung 34: Stereoabbildungen des GFRP Monomers (a) und des Pentamers (b). Die vermuteten Kaliumionen sind als graue Kugeln dargestellt.

Durch die Bildung des Pentamers werden 34.5 % der Oberfläche eines Monomers bedeckt, wobei die Kontaktflächen aus einem Gemisch von hydrophilen und hydrophoben Resten gebildet werden. Der innerste Faltblattstrang in der propellerartigen Struktur, β_5 , kontaktiert den entsprechenden Faltblattstrang des benachbarten Monomers und die Helix α_2 wechselwirkt mit dem *loop*, der den Faltblattstrang β_2 mit der Helix α_1 verbindet, sowie mit dem C-terminalen Histidin 81.

Komplexbildung mit GTP Cyclohydrolase I

Die bekannten GFRP-Sequenzen aus Ratte, Mensch und Maus sind äußerst homolog (Mensch: 94 % Identität zur Sequenz aus Ratte, siehe Abbildung 35), was darauf schließen läßt, daß die Wechselwirkung mit GTP Cyclohydrolase I in diesen Spezies identisch ist.

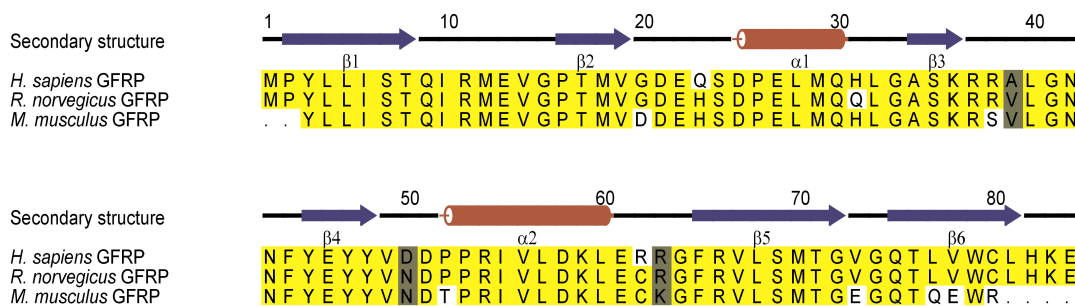


Abbildung 35: Sequenzalignment von GFRP aus Mensch, Ratte und Maus. Identische Reste sind gelb unterlegt, konservativ substituierte Reste sind grau unterlegt.

GFRP aus Ratte reguliert humane GTP Cyclohydrolase I in der gleichen Größenordnung, wie eine N-terminal um 41 Aminosäuren verkürzte Mutante des selben Proteins. Ein Vergleich der elektrostatischen Potentiale an der Oberfläche von GFRP aus Ratte mit den Oberflächenpotentialen der N-terminal verkürzten humanen GTP Cyclohydrolase I gestattet es, darüber zu spekulieren, auf welcher Seite des GFRP-Pentamers die Bindung an GTP Cyclohydrolase I erfolgt. Die Kontaktfläche der humanen GTP Cyclohydrolase I ist überwiegend positiv geladen (Abbildung 36). Die konvexe Seite des GFRP-Pentamers weist auch zum größten Teil positive Ladungen auf, während die konkave Oberfläche neutrales bis negatives Oberflächenpotential zeigt. Es erscheint daher wahrscheinlich, daß GFRP mit der konkaven Seite an die humane GTP Cyclohydrolase I bindet. *Docking*-Experimente mit FTDOCK (Gabb *et al.*, 1997), bei denen versucht wurde, GFRP aus Ratte an ein aus den Reste 57-250 bestehendes Modell der humanen GTP Cyclohydrolase I zu *docken*, führten zu

einem Modell mit dem erwarteten Bindungsmodus (Abbildung 37). In diesem Modell bindet der abstehende *loop* zwischen den Faltblattsträngen $\beta 3$ und $\beta 4$ jeweils in die Spalte, die von zwei benachbarten GTP Cyclohydrolase I- Monomeren gebildet wird. Die drei nichtkonservativen Aminosäuresubstitutionen in der Rattensequenz, verglichen zur humanen Sequenz, sind nicht Teil dieser vermuteten Kontaktfläche, was wiederum darauf hindeutet, daß der Regulationsmechanismus in Ratte und Mensch identisch ist.

Dieses initiale *docking*-Modell konnte aufgrund der für Probleme dieser Art ungewöhnlich großen Anzahl der Atome und der daraus resultierenden programmtechnischen Limitierungen nicht weiter verfeinert werden (üblich wäre eine weitere Verfeinerung mit MULTIDOCK ((Moont *et al.*, 1999)). Da das resultierende Modell jedoch nicht auf der Ebene einzelner Aminosäuren diskutiert werden soll, sondern nur die Orientierung des GFRP-Pentamers bei der Komplexbildung erklärt, ist es für diese Zwecke ausreichend. Das in einem *loop* gebundene Metallion im GFRP liegt innerhalb der vorgeschlagenen Kontaktfläche. Die Funktion dieses Metallions ist jedoch, falls es diese überhaupt gibt, bislang ungeklärt. Kinetische Untersuchungen der Regulation der GTP Cyclohydrolase I haben bislang keinerlei Abhängigkeit von irgendeinem Metallion gezeigt. Die Mutation von Threonin 7, dem einzigen Rest, der über seine Seitenkette an das Metall bindet, zu einem Alanin führte zu einem vollkommenen Verlust der Proteinexpression. Dies könnte auf eine strukturelle Rolle oder auf eine Beteiligung bei der Proteinfaltung hindeuten.

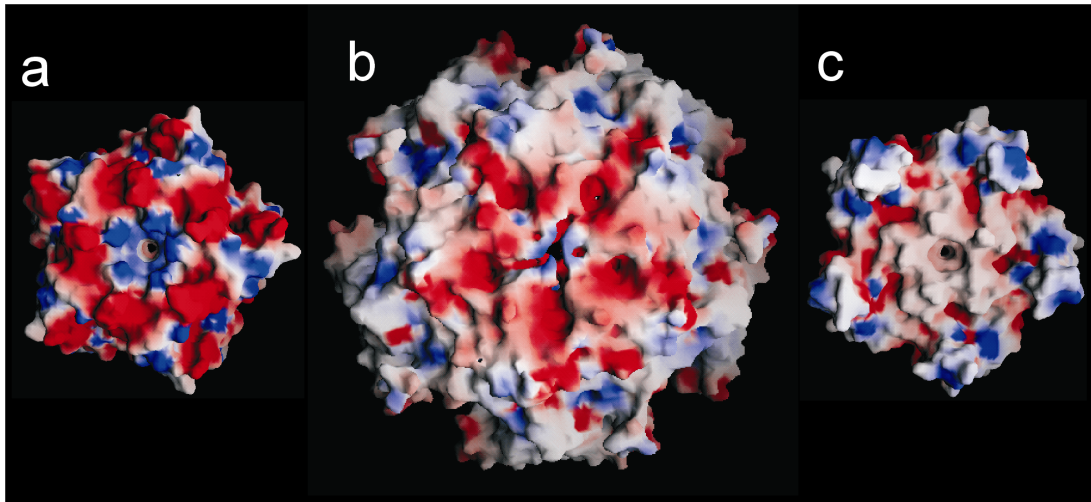


Abbildung 36: Elektrostatische Potentiale an der konvexen Oberfläche der GFRP-Pentamers (a), an der Oberfläche der humanen GTP Cyclohydrolase I (b) und an der konkaven Oberfläche des GFRP Pentamers (c).

4.4.6 Biochemische Untersuchung der Komplexbildung

Um mögliche biochemische Unterschiede der Proteine aus Ratte und Mensch zu berücksichtigen, wurde im Labor von Prof. Bacher die Sequenz aus Ratte zur humanen Sequenz mutiert. Zudem wurde, um den vorgeschlagenen Komplexbindungsmodus zu verifizieren, Calmodulin-Binding-Peptide (CBP), das 21 Aminosäuren lange C-terminale Fragment der *myosin light-chain kinase* über einen 15 Aminosäuren langen *linker* an den N-terminus des humanisierten GFRP kloniert. Während der Aufreinigung des Fusionsproteins wurden die 19 N-terminalen Aminosäuren abgespalten und es blieb ein 19 Aminosäuren langes CBP-*linker*-Fragment am N-terminus des humanisierten GFRP erhalten. Da die N-termini der Monomere aus der oberen, konvexen Seite der GFRP-Monomers hervorstehen, ist zu erwarten, daß das CBP-*linker*-Fragment eine mögliche Bindung an die humane GTP Cyclohydrolase I mit dieser Seite des Pentamers verhindern sollte.

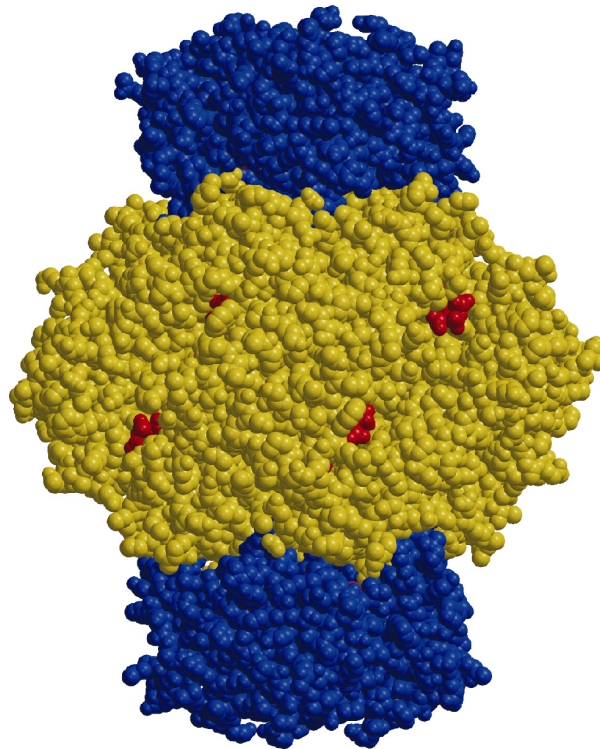


Abbildung 37: Model des Komplexes von humaner GTP Cyclohydrolase I (gelb) mit 2 GFRP-Pentameren (blau). Die GTP Bindungsstellen der Cyclohydrolase sind rot eingefärbt.

Kinetische Untersuchungen an humaner GTP Cyclohydrolase I im Komplex mit GFRP aus Ratte oder dem humanisierten CBP-GFRP-Fusionsprotein zeigten, daß beide Proteine humane GTP Cyclohydrolase I in der gleichen Größenordnung regulieren. Bei der Zugabe von BH_4 zu einer Mischung der jeweiligen Proteine mit GTP fiel die spezifische Aktivität der humanen GTP Cyclohydrolase I von $135 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ auf $3 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bei GFRP aus Ratte und von $85 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ auf $7 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ beim humanisierten CBP-GFRP-Fusionsprotein.

Um sicherzustellen, daß das CBP-Fragment durch die Abspaltung der N-terminalen 19 Aminosäuren nicht möglicherweise zu klein geworden ist, um die Komplexbildung zu verhindern, wurde auch noch Hisactophilin aus *Dictyostelium discoideum* an den N-terminus des humanisierten GFRP kloniert. Kinetische Untersuchungen zeigten, daß die

regulatorischen Eigenschaften des Hisactophilin-GFRP Fusionsproteins in der gleichen Größenordnung lagen, wie die des CBP-GFRP Fusionsproteins. Somit wurden die oben beschriebenen Ergebnisse bestätigt.

Wie Abbildung 37 zeigt liegen die rot gekennzeichneten Substratbindungsstellen der humanen GTP Cyclohydrolase I ungefähr 30 Å entfernt von der vermuteten GFRP-Bindungsstelle. Zudem sind die Bindungsstellen von Phenylalanin, eines weiteren Effektors der regulatorischen Eigenschaften, bislang unbekannt. Daher ist der genaue Mechanismus, durch den die Regulation der GTP Cyclohydrolase I erfolgt, bislang noch ungeklärt und erfordert weitere Untersuchungen. Zwar sind in der Kristallstruktur der humanen GTP Cyclohydrolase I die ersten 56 Reste des nativen Proteins nicht zu sehen, da jedoch die $\Delta 42$ -Mutante auch durch GFRP reguliert wird, könnten lediglich noch die Reste 42 – 56 eine Rolle bei der Regulation spielen. Dies wurde jedoch bislang nicht untersucht.

4.4.7 Verwandte Strukturen

Ein Suche nach verwandten Strukturen mit DALI (Holm & Sander, 1995) ergab keine biochemisch relevanten homologen Strukturen. Nur 3 Strukturen mit einem *Z-score* größer als 3 wurden gefunden. Homologste Struktur war mit einem Wert von 3.8 ist YciH aus *E. coli* (PDB-Zugangsnummer 1D1R), vermutlich ein Translationsinitiationsfaktor.

5 Abkürzungen

CYH I	GTP Cyclohydrolase I
DTT	1,4-Dithiothreitol
eCYH	<i>E. coli</i> GTP Cyclohydrolase I
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
hCYH	humane GTP Cyclohydrolase I
H ₂ NTP	7,8-Dihydroneopterin-triphosphat
MAD	Multiple anomale Dispersion
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MIR	Multipler isomorpher Ersatz
MoCF	Molybdän-Kofaktor
MOPS	N-(Morpholino)-3-propansulfonsäure
MPT	Molybdopterin
NaN ₃	Natriumazid
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentii Hydrogenii
PTPS	6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase
rms	Mittleres Abweichungsquadrat
SR	Sepiapterin-Reduktase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

6 Literaturverzeichnis

- Abrahams, J. & Leslie, A. (1996). Methods used in the structure determination of mitochondrial F₁ ATPase. *Acta Cryst* **D53**, 30-42.
- Alberts, I. L., Nadassy, K. & Wodak, S. J. (1998). Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. *Protein Sci* **7**, 1700-1716.
- Anderson, L. A., Palmer, T., Price, N. C., Bornemann, S., Boxer, D. H. & Pau, R. N. (1997). Characterisation of the molybdenum-responsive ModE regulatory protein and its binding to the promoter region of the *modABCD* (molybdenum transport) operon in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **246**, 119-126.
- Auerbach, G. (1997). Röntgenstrukturanalyse der Enzyme des Tetrahydrobiopterin-Biosynthesewegs und hyperthermophiler Enzyme aus *Thermotoga maritima*. Dissertation, Technische Universität München.
- Auerbach, G., Herrmann, A., Bracher, A., Bader, G., Gütlich, M., Fischer, M., Neukamm, M., Nar, H., Garrido-Franco, M., Richardson, J., Huber, R. & Bacher, A. (2000). Zinc plays a Key Role in human and bacterial GTP Cyclohydrolase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(25), 13567-13572.
- Barton, G. J. (1993). ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments. *Protein Eng.* **6**, 37-40.
- Blau, N., Thöny, B., Heizmann, C. & Dhondt, J. (1993). Tetrahydrobiopterin deficiency: from phenotype to genotype. *Pteridines* **4**, 1-10.
- Blundell, T. & Johnson, L. (1976). *Protein Crystallography*, Academic Press, London.
- Bracher, A., Eisenreich, W., Schramek, N., Ritz, H., Götze, E., Hermann, A., Gütlich, M. & Bacher, A. (1998). Biosynthesis of Pteridines. NMR studies on the reaction mechanisms of GTP Cyclohydrolase I, Pyruvoyltetrahydropterin Synthase and Sepiapterin Reductase. *J. Biol. Chem.* **273**, 28132-28141.
- Bracher, A., Fischer, M., Eisenreich, W., Ritz, H., Schramek, N., P, B., Gentili, P., Huber, R., Nar, H., Auerbach, G. & Bacher, A. (1999). Histidine 179 mutants of GTP cyclohydrolase I catalyze the formation of 2-amino-5-formylamino-6-ribofuranosylamino-4(3H)-pyrimidone triphosphate. *J. Biol. Chem.* **274**, 16727-16735.
- Brünger, A., Adams, P., Clore, G., DeLano, W., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N., Read, R., Rice, L., Simonson, T. & Warren, G.

- (1998). Crystallography & NMR System: A new software for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* **D54**(905-921).
- Budisa, N., Steipe, B., Demange, P., Eckerskorn, C., Kellermann, J. & Huber, R. (1995). High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine and ethionine in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **230**, 788-796.
- Carter, C. & Carter, C. (1979). Protein Crystallization using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.* **254**, 12219-12223.
- Chan, M., Mukund, S., Kletzin, A., Adams, M. & Rees, D. (1995). Structure of a hyperthermophilic tungstopterin enzyme, aldehyde ferredoxin oxidoreductase. *Science* **267**, 1463-1469.
- Collaborative Computational Project, N. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr* **D50**, 760-763.
- Curtius, H., Niederwieser, A., Levine, R. & Muldner, H. (1984). *Adv. Neurol.* **463-468**.
- Drenth, J. (1994). *Principles of protein X-ray crystallography*, Springer Verlag, New York.
- Eaves, D., Palmer, T. & Boxer, D. (1997). The product of the molybdenum cofactor gene *mobB* of *Escherichia coli* is a GTP-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **246**, 690-697.
- Esnouf, R. (1997). An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graph.* **15**, 112-113.
- Essrich, C., Lorez, M., Benson, J. A., Fritschy, J.-M. & Lüscher, B. (1998). Postsynaptic clustering of major GABA_A receptor subtypes requires the $\gamma 2$ subunit and gephyrin. *Nature Neurosci.* **1**(7), 563-571.
- Ewald, P. (1921). Das "reziproke Gitter" in der Strukturtheorie. *Z. Kristallogr* **56**, 491-500.
- Feng, G., Tintrup, H., Kirsch, J., Nichol, M. C., Kuhse, J., Betz, H. & Sanes, J. R. (1998). Dual Requirement for Gephyrin in Glycine Receptor Clustering and Molybdoenzyme Activity. *Science* **282**, 1321-1324.
- Gabb, H. A., Jackson, R. M. & Sternberg, M. J. E. (1997). Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *J. Mol. Biol.* **272**, 106-120.
- GCG. (1998). Wisconsin Package 10.0 edit. Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc. .

- Gill, S. & van Hippel, P. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data [published erratum appears in *ANAL. Biochem.* 1990 Sep, 189(2):283]. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Harada, T., Kagamiyama, H. & Hatakeyama, K. (1993). Feedback Regulatory mechanism for the control of GTP cyclohydrolase I activity. *Science* **260**, 1507-1510.
- Harker, D. (1956). The determination of the phases of the structure factors on non-centrosymmetric crystals by the method of double isomorphous replacement. *Acta Cryst.* **9**, 1-9.
- Hasona, A., Ray, R. M. & Shanmugam, K. (1998). Physiological and Genetic Analyses Leading to Identification of a Biochemical Role for the *moeA* (Molybdate Metabolism) Gene Product in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 1466-1472.
- Holm, L. & Sander, C. (1995). DALI: a network tool for protein structure comparison. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 478-480.
- Hu, Y., Rech, S., Gunsalus, R. P. & Rees, D. C. (1997). Crystal structure of the molybdate binding protein ModA. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 703-707.
- Huber, R. (1965). Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Cryst.* **A15**, 23-31.
- Jancarik, J. & Kim, S. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallisation of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411.
- Johnson, J. J. & Wadman, S. K. (1995). Molybdenum cofactor deficiency. In *The molecular and metabolic basis of inherited disease* (Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W. & Valle, D., eds.), pp. 2271-2283. McGraw-Hill, New York.
- Johnson, J. L., Indermaur, L. W. & Rajagopalan, K. (1991). Molybdenum Cofactor Biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**(19), 12140-12145.
- Joshi, M. S., Johnson, J. L. & Rajagopalan, K. (1996). Molybdenum Cofactor Biosynthesis in *Escherichia coli mod* and *mog* mutants. *J. Bacteriol.* **178**(14), 4310-4312.
- Kamdar, K. P., Shelton, M. E. & Finnerty, V. (1994). The *Drosophila* Molybdenum Cofactor Gene *cinnamon* Is Homologous to Three *Escherichia coli* Cofactor Proteins and to the Rat Protein Gephyrin. *Genetics* **137**, 791-801.
- Kaufmann, S., Pollock, R. J., Summer, G. K., Das, A. K. & Hahra, A. K. (1990). Dependence of an alkyl glycerol-ether monooxygenase activity upon tetrahydrobiopterins. *Biochim. Biophys. Acta* **1040**, 19-27.
- Kirsch, J., Wolters, I., Triller, A. & Betz, H. (1993). Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* **366**, 745-748.

- Kisker, C., Schindelin, H., Pacheco, A., Wehbi, W., Garrett, R., Rajagopalan, K., Enemark, J. & Rees, D. (1997a). Crystal structure of sulfite oxidase and identification of mutations responsible for sulfite oxidase deficiency. *Cell* **91**, 973-983.
- Kisker, C., Schindelin, H. & Rees, D. (1997b). Molybdenum-cofactor-containing enzymes: Structure and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 233-267.
- Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950.
- Kuper, J., Palmer, T., Mendel, R. & Schwarz, G. (2000). Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic protein Cnx1 from *Arabidopsis thaliana* define functions for molybdopterin binding, molybdenum insertion, and molybdenum cofactor stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6475-6480.
- La Fortelle, E. & Bricogne, G., Eds. (1997). Maximum -likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. Vol. 276. Methods Enzymol. Edited by Sweet, R. M. & Carter, C. W., Jr. New York: Academic Press.
- 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.
- Lawson, D. M., Williams, C. E., Mitchenall, L. A. & Pau, R. N. (1998). Ligand size is a major determinant of specificity in periplasmic oxyanion-binding proteins: the 1.2 Å resolution crystal structure of *Azotobacter vinelandii* ModA. *Structure* **6**, 1529-1539.
- Le Van, Q., Katzenmeier, G., Schwarzkopf, B., Schmid, C. & Bacher, A. (1988). Biosynthesis of biopterin: Studies on the mechanism of 6-pyruvoyl tetrahydropterine synthase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **151**(265-275).
- Leslie, A. (1991). . In *Crystallographic Computing 5* (Moras, D., Podjarni, A. & Thierry, J., eds.), Vol. 5, pp. 50-61. Oxford University Press, Oxford.
- Liu, M., Wuebbens, M., Rajagopalan, K. & Schindelin, H. (2000). Crystal Structure of the Gephyrin-related Molybdenum Cofactor Biosynthesis Protein MogA from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**, 1814-1822.
- Marletta, M. A. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**, 927-930.
- McPherson, A. (1982). *Preparation and analysis of protein crystals*, John Wiley & Sons, New York.

- Meining, W., Mörtl, S., Fischer, M., Cushman, M., Bacher, A. & Ladenstein, R. (2000). The Atomic Structure of Pentameric Lumazine Synthase from *Saccharomyces cerevisiae* at 1.85 Å Resolution Reveals the Binding Mode of a Phosphonate Intermediate Analogue. *J. Mol. Biol.* **299**, 181-197.
- Menéndez, C., Otto, A., Igloi, G., Nick, P., Brandsch, R., Schubach, B., Böttcher, B. & Brandsch, R. (1997). Molybdate-uptake genes and molybdopterin-biosynthesis genes on a bacterial plasmid. Characterization of MoeA as a filament-forming protein with adenosintriphosphate activity. *Eur. J. Biochem.* **250**, 524-531.
- Merritt, E. A. & Murphy, M. E. P. (1994). RASTER3D version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallogr.* **D50**, 869-873.
- Milstien, S., Jaffe, H., Kowlessur, D. & Bonner, T. (1996). Purification and cloning of the GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein, GFRP. *J. Biol. Chem.* **271**, 19743-19751.
- Moont, G., Gabb, H. & Sternberg, M. (1999). Use of pair potentials across protein interfaces in screening predicted docked complexes. *Proteins* **35**, 264-373.
- Murzin, A., Brenner, S., Hubbard, T. & Chothia, C. (1995). SCOP: a structural classification of protein database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* **247**, 536-540.
- Nar, H., Huber, R., Auerbach, G., Fischer, M., Hösl, C., Ritz, H., Bracher, A., Meining, W., Eberhardt, S. & Bacher, A. (1995a). Active site topology and reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 12120-12125.
- Nar, H., Huber, R., Meining, W., Schmid, C., Weinkauff, S. & Bacher, A. (1995b). Atomic structure of GTP cyclohydrolase I. *Structure* **3**, 459-466.
- Nicol, C. A., Smith, G. k. & Dutch, D. S. (1985). Biosynthesis and matabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 729-764.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* **276**, 307-326.
- Palmer, T., Goodfellow, I. P., Elisabeth, S. R., McEwan, A. G. & Boxer, D. H. (1998). Characterisation of the *mob* locus from *Rhodobacter sphaeroides* required for molybdenum cofactor biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1395**, 135-140.
- Palmer, T., Vasishta, A., Whitty, P. W. & Boxer, D. H. (1994). Isolation of protein FA, a product of the *mob* locus required for molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **222**, 687-692.

- Pitterle, D. & Rajagopalan, K. (1993). The Biosynthesis of Molybdopterin in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**(18), 13499-13505.
- Rajagopalan, K., Ed. (1996). Biosynthesis of the Molybdenum Cofactor. Vol. 1. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Edited by Neidhardt, F. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Rajagopalan, K. (1997). Biosynthesis and processing of the molybdenum cofactors. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 757-761.
- Reiss, J., Christensen, E., Kurlmann, G., Zobot, M.-T. & Dorche, C. (1998a). Genomic structure and mutational spectrum of the bicistronic *MOCSI* gene defective in molybdenum cofactor deficiency type A. *Hum. Genet.* **103**, 639-644.
- Reiss, J., Cohen, N., Dorche, C., Mandel, H., Mendel, R., Stallmeyer, B., Zobot, M.-T. & Dierks, T. (1998b). Mutations in a polycistronic nucleat gene associated with molybdenum cofactor deficiency. *Nat. Gen.* **20**, 51-53.
- Rieder, C., Eisenreich, W., O'Brien, J., Richter, G., Götze, E., Boyle, P., Blanchard, S., Bacher, A. & Simon, H. (1998). Rearrangement reactions in the biosynthesis of molybdopterin. An NMR study with $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labelled precursors. *Eur. J. Biochem.* **255**, 24-36.
- Rivers, S., McNairn, E., Blasco, F., Giordano, G. & Boxer, D. (1993). Molecular genetic analysis of the *moa* operon of *Escherichia coli* K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **8**, 1071-1081.
- Romao, M., Archer, M., Moura, I., LeGall, J., Engh, R., Schneider, M., Hof, P. & Huber, R. (1995). Crystal structure of the xanthine oxidase related aldehyde oxidoreductase from *D. gigas*. *Science* **270**, 1170-1176.
- Rossmann, M. & Blow, D. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.* **15**, 24-31.
- Rudolph, M., Wuebbens, M., Rajagopalan, K. & Schindelin, H. (2001). Crystal structure of molybdopterin synthase and its evolutionary relationship to ubiquitin activation. *Nature Struct. Biol.* **8**, 42-46.
- Schallreuter, K., Wood, J., Pittelkow, M., Gütlich, M., Lemke, K., Rodl, W., Swanson, N., Hitzemann, K. & Ziegler, I. (1994). Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* **263**, 1444-1446.
- Schmid, C. (1992). Klonierung und Kristallisation der GTP Cyclohydrolase I aus *E. coli*. Dissertation, Technische Universität München.

- Schwarz, G., Boxer, D. H. & Mendel, R. R. (1997). Molybdenum Cofactor Biosynthesis The plant protein Cnx1 binds molybdopterin with high affinity. *J. Biol. Chem.* **272**, 26811-26814.
- Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W. & Valle, D., Eds. (1995). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill.
- Scriver, C., Kaufmann, S. & Woo, S., Eds. (1989). *The hyperphenylalaninaemias*. Edited by Scriver, S. & Beaudet, A.
- Shanmugam, K., Stewart, V., Gunsalus, R., Boxer, D., Cole, J., Chippaux, M., DeMoss, J., Giordano, G., Lin, E. & Rajagopalan, K. (1992). *Mol. Microbiol.* **6**, 3452-3454.
- Stallmeyer, B., Schwarz, G., Schulze, J., Nerlich, A., Reiss, J., Kirasch, J. & Mendel, R. (1999). The neurotransmitter receptor-anchoring protein gephyrin reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in bacteria, plants, and mammalian cells. *Proc. Natl. Sci. USA* **96**, 1333-1338.
- Steigemann, W. (1974). *Die Entwicklung und Anwendung von Rechenverfahren und Rechenprogrammen zur Strukturanalyse von Proteinen*. PhD Thesis, Technische Universität München.
- Stout, G. & Jensen, L. (1989). *X-ray structure determination*, John Wiley, New York.
- Stüber, D., Matile, H. & Garotta, G., Eds. (1990). System for high level production in *E.coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure function analysis. Vol. IV. Immunological Methods. Edited by Lefkovits, I. & Pernis, B. New York: Academic Press.
- Tanaka, K., Kaufmann, S. & Milstien, S. (1989). Tetrahydrobiopterin, the cofactor for aromatic amino acid hydroxylases, is synthesized by and regulates proliferation of erythroid cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5864-5867.
- Terwilliger, T. & Berendzen, J. (1999). Automated structure solution for MIR and MAD. *Acta Cryst.* **D55**, 849-861.
- Thöny, B., Auerbach, G. & Blau, N. (2000). Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem. J.* **347**, 1-16.
- Turk, D. (1992). *Development and usage of a molecular graphics programm*. PhD Thesis, Technische Universität München.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022-1025.

- Wittle, A. & Kamdar, K. (1999). The *Drosophila cinnamon* gene is functionally homologous to *Arabidopsis cnx1* and has a similar expression pattern to the mammalian gephyrin gene. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 672-680.
- Wuebbens, M., Liu, M., Rajagopalan, K. & Schindelin, H. (2000). Insights into molybdenum cofactor deficiency provided by the crystal structure of the molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaC. *Structure* **8**, 709-718.
- Wuebbens, M. & Rajagopalan, K. (1995). Investigation of the Early Steps of Molybdopterin Biosynthesis in *Escherichia coli* through the Use of *in Vivo* Labeling Studies. *J. Biol. Chem.* **270**, 1082-1087.