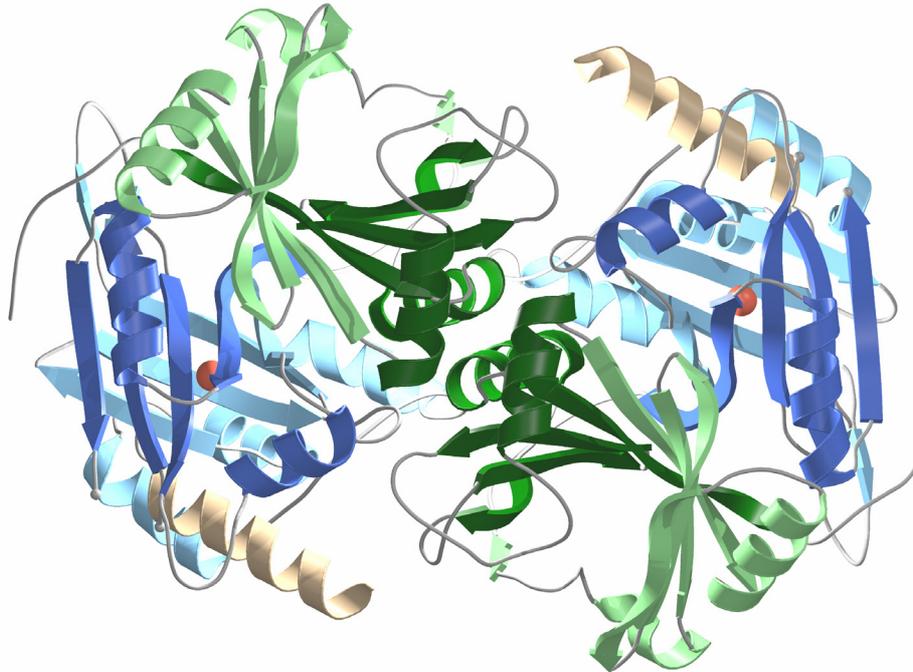


Biochemische und röntgenkristallographische Untersuchungen an pflanzlichen 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenasen



Röntgenstrukturanalyse der löslichen anorganischen Pyrophosphatase aus *Heliothis virescens*

Iris Maria Fritze
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung
D-82152 Martinsried

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

**Biochemische und röntgenkristallographische Untersuchungen an
pflanzlichen 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenasen**

**Röntgenstrukturanalyse der löslichen anorganischen
Pyrophosphatase aus *Heliothis virescens***

Iris Maria Fritze

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

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

Die Dissertation wurde am 18.09.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 03.11.2003 angenommen.

für Rolf († 2002)

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1999 bis Juli 2003 in der Abteilung Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich für die wissenschaftliche Freiheit und sein Interesse am Fortgang der Projekte bei der Anfertigung dieser Arbeit danken. Die Möglichkeit, die Dissertation in seinem Labor innerhalb einer großen Arbeitsgruppe mit hervorragenden wissenschaftlichen Arbeitsmöglichkeiten anzufertigen, war ein großes Privileg.

Bei den Herren Dr. Günter Auerbach, Dr. Klaus Stenzel und Dr. Jörg Freigang bedanke ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation mit Bayer CropScience durchführen zu können, für konstruktive Diskussionen und Unterstützung, sowie mehrere hundert Milligramm Protein, die durch Christian Krebs isoliert wurden.

Allen anderen Mitgliedern der „Bayer-Arbeitsgruppe“ gilt ebenfalls ein herzliches Dankeschön für die Zusammenarbeit; Stefanie Echt, Michael Koch, Dr. Lars Linden für die Einführung in das Thema und die Gepflogenheiten der Abteilung, sowie Dr. Stefan-Schnitte Gerhardt besonders für moralische Unterstützung (genau, et es wie et es, et kütt wie et kütt, ävver et hätt noch immer jot jejang).

Ich danke allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Strukturforschung für ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Besonders hervorheben möchte ich meine zahlreichen Laborkollegen Petra Birle, Dr. Matthias Bochtler, Dr. Nediljko Budisa, Dr. Rainer Friedrich, Dr. Pablo Fuentes-Prior, Dr. Peter Göttig, Dr. Michael Groll, Dr. Claudia Hartmann, Tatjana Krywcun, Dr. Ravishankar Ramachandran, Arne Ramsperger, Dr. John Lee Richardson, Dr. Hyun Kyu Song, Thomas Steiner, Dr. Tobias Ullrich und Traudl Wenger. Obwohl es des öfteren hoch herging, hat die gemeinsame Arbeit im Großraumlabor viel Spaß gemacht, ich vermisse sie jetzt schon, auch wenn unsere Meinungen über die richtige musikalische Untermalung doch manchmal ziemlich weit auseinanderlagen. Meinen Kollegen Dr. Hyunju Cha, Dr. Jeong-Sun Kim und Dr. Berta Martins danke ich für die angenehme Atmosphäre im Büro und viele anregende Gespräche. Ein herzliches Dankeschön gilt ebenfalls Werner Atzenhofer, Susi und Strolchi Susanne Stanitzek und Stefanie Bauer, Dr. Manuel Than und Otto Kyrieleis. Der wechselnden Zusammensetzung der Aramark-Gänger habe ich zwar keine neue Erkenntnis über „echte Männer“, jedoch noch mehr (falls das überhaupt möglich war) lustige Stunden zu verdanken. Ich wußte garnicht, welche Abgründe sich zeigen, wenn der Mund zwecks Nahrungsaufnahme geöffnet ist. Mein Dank gilt nicht nur in diesem Zusammenhang Christine Breitenlechner, Marianne Braun, Dr. Rupert-Hallo-ich-bin-der-Rupsi Lang, Dr. Klaus-i-Mausi Maskos, Dr. Stefan Riedl und Charlotte Ungewickell.

Den Herren Dr. Martin Augustin und Dr. Rainer Friedrich danke ich für die Einführung in die Benutzung kristallographischer Programme und besonders Dr. Stefan Steinbacher für unschätzbare Hilfe und großartige Unterstützung, sowie die zahlreichen Durchhalteparolen auch aus weiter Ferne. Schön, daß rheinische Frohnaturen und Batzis doch so gut miteinander auskommen können.

Unvergessen werden die vielen arbeitsreichen, aber auch schönen und aufheiternden Stunden am Institut, zuhause und in diversen Feuchtigkeitsbiotopen mit Mireia Comellas-Bigler und Daniela Jozic bleiben. Meine „Kolleginnen“, was werde ich bloß ohne Euch anfangen?

Allen auch namentlich ungenannten Arbeitskollegen und Freunden, die ich hier in Martinsried und München gewinnen durfte, gilt mein herzlicher Dank. Euch habe ich eine unvergeßliche Zeit unter weiß-blauem Himmel zu verdanken.

Danken möchte ich auch Renate Rüller, Gina Beckmann und Monika Bumann, den Sekretärinnen der Abteilung, sowie Monika Schneider für ihre immerwährend freundliche Hilfe bei vielen bürokratischen Angelegenheiten und manch nette Worte, und den Technikern Werner Dersch und Ottmar Paul für die tadellose Instandhaltung der technischen Ausrüstung und prompte Beseitigung auftretender Probleme.

Den Herren Dr. Marius Boicu und Dr. Karlheinz Mann danke ich für die durchgeführten DNA- bzw. Proteinsequenzierungen.

Gerne denke ich auch an die Zeit des Biologiestudiums in Bonn zurück. Ich danke allen, mit denen ich dort meine Zeit verbringen durfte und die mich in meiner Entscheidung für dieses Studium bestärkt und motiviert haben, besonders Simone Berneiser, Inge Fischer, Dr. Kathrin und Prof. Dr. Thomas Happe, Dr. Claudia Helmken, Dr. Alexander Prange, Dr. Andrea Reipert, Dr. Wolfgang Schiefer und Paulus Smuda.

Ich danke den „Kölner“ Freunden außerhalb des Labors Sonja, Sabine, Jörg, Petra, Christian und Tina für jahrelange Freundschaft, ermunternde Worte während mancher Durststrecke und Geduld, auch wenn ich mich zwischendurch wochenlang nicht gemeldet habe. Dies gilt auch für Axel, Guido, Michael und Stephan. Unserer gemeinsamen Zeit habe ich viel zu verdanken, was noch bis heute nachwirkt.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und den „Frisch“en für ihre liebevolle Unterstützung, Vertrauen, Ermunterung und den Rückhalt über all die langen Jahre, nicht nur während des Studiums und der Promotion. Ihr könnt mir nichts vormachen, Ihr wißt schon noch, wie ich aussehe.

I. ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1. 4-HYDROXYPHENYLPYRUVAT DIOXYGENASE	1
1.2. LÖSLICHE ANORGANISCHE PYROPHOSPHATASE	2
II. EINLEITUNG	4
2.1. DIOXYGENASEN	4
2.1.1. α -Ketosäure abhängige Oxygenasen	7
2.1.2. 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)	8
2.1.2.1. HPPD in Pflanzen	11
2.1.2.2. HPPD in tierischen Organismen	12
2.1.2.3. Inhibitoren der HPPD	13
2.1.2.4. Reaktionsmechanismus der HPPD	15
2.2. METALLOHYDROLASEN	15
2.2.1. Lösliche anorganische Pyrophosphatase von Typ I	18
2.2.2. Inhibitoren der löslichen anorganischen Pyrophosphatase	20
2.2.3. Lösliche anorganische Pyrophosphatase aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>E. coli</i>	21
2.2.3.1. Aktives Zentrum	22
2.2.3.2. Oligomerisierung	22
2.3. RÖNTGENSTRUKTURANALYSE VON PROTEINEN	24
2.3.1. Überblick	24
2.3.2. Kristallisation	25
2.3.3. Kristalle	26
2.3.4. Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen	28
2.3.5. Streuung an Atomen	30
2.3.6. Temperaturfaktor	31
2.3.7. Berechnung der Elektronendichte	32
2.3.8. Lösung des Phasenproblems	32
2.3.8.1. Molekularer Ersatz	33
2.3.8.2. Isomorpher Ersatz	34
2.3.8.3. Multiple Anomale Dispersion (MAD)	35
2.3.9. Bestimmung der Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit	37
III. MATERIAL UND METHODEN	38
3.1. MATERIAL	38
3.1.1. Chemikalien und Arbeitsgeräte	38
3.1.2. Säulenmaterial	39
3.1.3. Bakterienstämme	39
3.1.4. Plasmide	40
3.1.5. Oligonukleotide	40
3.1.6. Enzyme und Kits	42
3.1.7. Nährmedien	42
3.2. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	43
3.2.1. Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	43
3.2.1.1. Flüssigkulturen	43
3.2.1.2. Plattenkulturen	43
3.2.2. Anzucht von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	43
3.2.3. Herstellung kompetenter Bakterienzellen	44
3.2.4. Transformation von Bakterien mit Fremd-DNA	44
3.2.5. Transformation durch Elektroporation	45
3.2.6. Heterologe Expression rekombinanter Proteine in <i>Escherichia coli</i>	45
3.2.7. Herstellung von <i>Escherichia coli</i> Rohextrakten	46
3.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	46
3.3.1. DNA-Präparationen	46
3.3.1.1. Plasmid-DNA-Minipräparation durch QIAprep Spin Miniprep Kit	46
3.3.1.2. Midipräparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	47
3.3.1.3. Präparation genomischer DNA aus Cyanobakterien	48

3.3.2. Methoden zur Nukleinsäureanalyse	48
3.3.2.1. Agarosegelelektrophorese	48
3.3.2.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
3.3.2.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	50
3.3.2.4. Ethanol-fällung	50
3.3.3. Enzymatische Methoden	51
3.3.3.1. Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen	51
3.3.3.2. Behandlung mit alkalischer Phosphatase	51
3.3.3.3. Ligation	51
3.3.3.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	52
3.3.3.5. Cycle Sequencing	52
3.4. PROTEINCHEMISCHE METHODEN	53
3.4.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	53
3.4.1.1. Proteinbestimmung nach Bradford	53
3.4.1.2. Proteinbestimmung durch Absorptionsmessung	54
3.4.2. Ultrafiltration	54
3.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55
3.4.4. Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	56
3.4.5. Western-Blotting	56
3.4.6. Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen	57
3.4.7. N-terminale Proteinsequenzierung	57
3.4.8. Proteinpräparation	57
3.4.8.1. Reinigung rekombinanter HPPD über Metallchelatchromatographie	57
3.4.8.2. Abspaltung des N-terminalen His-Tags	58
3.4.8.3. Klonierung der HPPD als MBP-Fusionsprotein	58
3.4.8.4. Aufreinigung und Proteolyse des MBP-HPPD-Fusionsproteins	59
3.4.8.5. Rekombinante anorganische Pyrophosphatase aus <i>Heliothis virescens</i>	60
3.4.9. Aktivitätstest für HPPD	60
3.4.10. Sequenzvergleiche	61
3.5. KRISTALLOGRAPHISCHE METHODEN	61
3.5.1. Kristallisation	61
3.5.2. Datensammlung und Datenreduktion	61
3.5.3. Strukturlösung	62
3.5.4. Modellbau und Verfeinerung	63
3.5.5. Analyse von Atommodellen	64
3.5.6. Graphische Darstellungen	64
IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	65
4.1. KLONIERUNG, EXPRESSION UND REINIGUNG EU- UND PROKARYOTISCHER 4-HYDROXYPHENYLPYRUVAT DIOXYGENASEN	65
4.1.1. HPPD aus <i>Caenorhabditis elegans</i>	65
4.1.1.1. Isolierung und Klonierung des HPPD Gens aus <i>Caenorhabditis elegans</i>	65
4.1.1.2. Expression rekombinanter <i>ceHPPD</i> in <i>Escherichia coli</i>	65
4.1.1.3. Reinigung und Kristallisation des <i>ceHPPD</i> -MPB-Fusionsproteins	66
4.1.2. HPPD aus Cyanobakterien	67
4.1.2.1. Isolierung und Klonierung des HPPD Gens aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	67
4.1.2.2. Heterologe Expression der HPPD aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	68
4.1.3. Diskussion	69
4.2. UNTERSUCHUNGEN AN HPPD AUS <i>ZEA MAYS</i>	70
4.2.1. Klonierung und heterologe Expression der HPPD aus <i>Zea mays</i> in <i>Escherichia coli</i>	70
4.2.2. Reinigung der rekombinanten HPPD aus <i>Zea mays</i>	72
4.2.3. Kristallisation der <i>zmHPPD</i>	73
4.2.4. Datensammlung und Datenauswertung	75
4.2.5. Strukturlösung durch <i>Single Isomorphous Replacement</i> (SIR)	76
4.2.6. Modellbau und Verfeinerung	77
4.2.7. Qualität des Modells	79
4.2.8. Strukturbeschreibung der HPPD aus <i>Zea mays</i>	81
4.2.8.1. Dreidimensionale Topologie	81
4.2.8.2. Anordnung der Untereinheiten zum <i>zmHPPD</i> Dimer	83

4.2.8.3. Das aktive Zentrum und Bindung von Eisen	84
4.3. RÖNTGENSTRUKTURANALYSE DER HPPD AUS <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	87
4.3.1. Patterson-Suche	87
4.3.2. Modellbau und Verfeinerung	88
4.3.3. Qualität des Atommodells	89
4.3.4. Strukturbeschreibung der <i>atHPPD</i>	91
4.3.4.1. Der Aufbau des Monomers	91
4.3.4.2. Das aktive Zentrum	91
4.3.4.3. Das Dimer der <i>atHPPD</i>	92
4.3.5. Vergleich der <i>atHPPD</i> mit dem Enzym aus <i>Zea mays</i>	93
4.4. STRUKTURVERGLEICH DER PFLANZLICHEN HPPDS MIT DEM ENZYM AUS <i>P. FLUORESCENS</i>	95
4.4.1. Dreidimensionale Topologie	95
4.4.2. Oligomerisierung	99
4.4.3. Die Architektur der aktiven Zentren	101
4.4.4. Die C-terminale Helix – eine Schranke vor dem aktiven Zentrum	104
4.4.5. Modell der Substratbindung	106
4.4.6. Vergleich der pflanzlichen HPPDs mit anderen Dioxygenasestrukturen	107
4.5. RÖNTGENSTRUKTURANALYSE DER LÖSLICHEN ANORGANISCHEN PYROPHOSPHATASE AUS <i>HELIOTHIS VIRESCENS</i>	110
4.5.1. Kristallisation und Datensammlung	110
4.5.2. Patterson-Suche	112
4.5.3. Modellbau und Verfeinerung	113
4.5.4. Qualität des Atommodells	114
4.5.5. Strukturbeschreibung der <i>hvPPase</i>	115
4.5.5.1. Überblick	115
4.5.5.2. Das physiologische Dimer	117
4.5.5.3. Das aktive Zentrum	118
4.5.5.4. Bindung der bivalenten Metallionen	120
4.5.6. Vergleich mit dem Enzym aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>E. coli</i>	121
4.5.6.1. Der Aufbau der aktiven Zentren	124
V. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	127
VI. LITERATUR	129

I. ZUSAMMENFASSUNG

1.1. 4-HYDROXYPHENYLPYRUVAT DIOXYGENASE

Die 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) ist ein essentielles, ubiquitär verbreitetes Enzym, das eine wichtige Rolle beim Abbau aromatischer Aminosäuren spielt und in Pflanzen an der Prenylchinonsynthese beteiligt ist. Diese Dioxygenase zählt zu den mononuklearen, ein Nicht-Häm-Eisen enthaltenden Enzymen, deren Aktivität von einer α -Ketosäure als Cofaktor abhängig ist. In dieser Klasse stellt die HPPD jedoch einen eigenständigen Vertreter dar, weil sie im Unterschied zu weiteren α -Ketosäure abhängigen Enzymen beide Sauerstoffatome in ein einziges Substrat einbaut und der benötigte Cofaktor als integraler Bestandteil des Substrates vorliegt.

HPPD katalysiert die oxidative Decarboxylierung der Seitenkette von 4-Hydroxyphenylpyruvat, die von einer Hydroxylierung des aromatischen Rings und einer 1,2-Umlagerung der Carboxymethylgruppe begleitet wird. Das Reaktionsprodukt Homogentisat wird im Aminosäurekatabolismus weiter zu Fumarat und Acetoacetat abgebaut. Die durch den Enzymdefekt der HPPD verursachte Stoffwechselstörung in Säugern ist als Tyrosinämie von Typ III bekannt. In Pflanzen dient Homogentisat als Vorstufe für die Plastochinon- und Tocopherolsynthese. Diese Verbindungen fungieren als Elektronencarrier in der Photosynthese bzw. als membranassoziierte Antioxidationsmittel und integrale Membranbestandteile. Die Hemmung der HPPD führt zur Chlorose (Ausbleichen) der Pflanzen. Durch diese Eigenschaften ist die HPPD als Zielenzym für die Entwicklung neuer Herbizide und medizinischer Therapeutika von großer Bedeutung.

Ziel der Arbeit war daher, durch röntgenkristallographische Untersuchungen dieses Enzyms aus unterschiedlichen Organismen detaillierte Kenntnisse über seinen Aufbau und die Struktur des Reaktionszentrums zu erlangen. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit die HPPD Gene aus dem nicht N_2 -fixierenden Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Caenorhabditis elegans* und *Zea mays* kloniert. Die Enzyme aus *Synechocystis* und *C. elegans* konnten jedoch für die Kristallisation in nicht ausreichenden Mengen in löslicher Form exprimiert werden, bzw. wurden durch die Aufreinigung irreversibel inaktiviert. Die HPPD aus *Zea mays* (*zmHPPD*) wurde durch Optimierung der Expressionsbedingungen löslich überexprimiert und aufgereinigt. In faktoriellen *screening* Experimenten wurde eine einzige reproduzierbare Kristallisationsbedingung identifiziert. Ausgehend von diesen Kristallen wurde die Struktur der *zmHPPD* durch *Single Isomorphous Replacement* (SIR) gelöst. Das Atommodell konnte bei 2 Å bis zu einem kristallographischen R-Faktor von 27,5 % verfeinert

werden. Diese Struktur ermöglichte durch Patterson Suchmethoden die Kristallstruktur der HPPD aus *Arabidopsis thaliana* (*atHPPD*) bei 3 Å mit einem kristallographischen R-Faktor von 23,7 % zu verfeinern.

Damit wurden erstmals die Strukturen eukaryotischer, dimerer HPPDs beschrieben. Jedes Monomer wird aus zwei strukturellen Domänen aufgebaut, deren Faltungsmotive denen der 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase bzw. Catechol 1,2-Dioxygenase ähneln, obwohl diese Enzyme zur Klasse der extradiol ringspaltenden Dioxygenasen zählen. Wie anhand der Sequenzhomologie zu erwarten war, weist der dreidimensionale Aufbau der Monomere große Ähnlichkeit zu dem der HPPD aus *Pseudomonas fluorescens* auf. Im Unterschied zum bakteriellen Enzym sind jedoch andere Strukturbereiche an der Dimerisierung beteiligt. Auffallende Insertionen, besonders der N-terminalen Sequenz, die durch früher durchgeführte Sequenzvergleiche nicht klar als solche erkannt worden waren, sind in die Bildung der Dimerkontakte involviert. Die pflanzlichen Enzymstrukturen zeigen eindeutig, daß die C-terminale Helix als flexible Schranke den Zugang zum aktiven Zentrum regulieren kann, indem eine Rotation um Asn416 (*zmHPPD*) erfolgt. Die Architektur des aktiven Zentrums ist konserviert, was die sterischen Erfordernisse für die Katalyse der mehrere Schritte umfassenden Reaktion widerspiegelt. Das Eisenatom im aktiven Zentrum wird in HPPD über zwei Histidin- und einen Glutamatrest koordiniert, wobei in *zmHPPD* dessen oktaedrische Koordination nachgewiesen werden konnte.

Anhand der Bestimmung struktureller Unterschiede zwischen pro- und eukaryotischen Enzymen soll auf deren Basis das Design spezifischer Inhibitoren gegen pflanzliche HPPDs erfolgen, an dem gemeinsam mit Bayer CropScience gearbeitet wird.

1.2. LÖSLICHE ANORGANISCHE PYROPHOSPHATASE

Anorganisches Pyrophosphat (PP_i) wird bei vielen Biosynthesereaktionen freigesetzt. Dessen Hydrolyse durch lösliche anorganische Pyrophosphatase (PPase) treibt diese Reaktionen thermodynamisch an und macht sie irreversibel. Daher sind PPasen omnipräsent und zur Kontrolle der intrazellulären Pyrophosphatkonzentration überaus wichtig. Zusätzlich zu dieser Bedeutung stellen PPasen ein Modell für Phosphorylgruppen übertragende Enzyme mit einer komplexen, aber relativ gut verstandenen Abhängigkeit von Metallionenkonzentration und pH-Wert dar. Der Ablauf der durch PPase katalysierten Reaktion ist dank zahlreicher

Strukturuntersuchungen und der Aufstellung eines mechanistischen Modells aufgeklärt. Für die Entwicklung weiterer spezifischer Inhibitoren gegen PPase, die bisher vor allem als Fungizide und im Kampf gegen das Multiple Myelom und Osteoporose eingesetzt werden, ist die genaue Kenntnis des Aufbaus der aktiven Zentren weiterer eukaryotischer PPasen erforderlich.

Die PPase aus *Heliothis virescens* (*hvPPase*) konnte im Rahmen dieser Arbeit kristallisiert, das Atommodell bei einer Auflösung von 2,1 Å bis zu einem kristallographischen R-Faktor von 20,5 % verfeinert werden. *hvPPase* kristallisierte in der Raumgruppe C2, die Struktur wurde durch Molekularen Ersatz mit Hefe PPase als Suchmodell gelöst. Der Vergleich mit dem Hefe Enzym zeigt keine nennenswerten Konformationsänderungen des aktiven Zentrums, wie aufgrund der hohen Sequenzhomologie erwartet werden konnte. Der Nachweis von zwei im aktiven Zentrum gebundenen Mg^{2+} -Ionen bestätigt die bislang vorliegenden Untersuchungsergebnisse, daß ein Metall-PP_i-Komplex das Substrat darstellen muß und die Affinität zur Bindung dieser beiden Metallionen unterschiedlich ist.

Veröffentlichung, die Teile dieser Arbeit beinhalten wird:

Fritze, I. M., Linden, L., Freigang, J., Auerbach, G., Huber, R. & Steinbacher, S. The crystal structures of *Zea mays* and *Arabidopsis thaliana* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Zur Veröffentlichung eingereicht.

II. EINLEITUNG

2.1. DIOXYGENASEN

Sauerstoff-aktivierende Enzyme (Oxygenasen) katalysieren viele metabolisch wichtige Reaktionen und sind daher für pharmazeutische, medizinische und umwelttechnische Prozesse von großem Interesse. Diese Enzymgruppe umfaßt unterschiedliche Familien, die entweder ein (Monooxygenasen) oder zwei (Dioxygenasen) Sauerstoffatome in ihre Substrate einbauen. Die durch diese Enzyme katalysierten Reaktionen sind stereospezifisch und umfassen ein breites Spektrum von Substraten. Um den im Grundzustand nicht reaktiven molekularen Sauerstoff zu aktivieren, benötigen diese Enzyme Cofaktoren (Harayama et al., 1992) und müssen in der Lage sein, mit dem paramagnetischen molekularen Sauerstoff, der zwei freie Elektronen mit ungepaartem Spin besitzt, einen Komplex zu bilden, damit das Spin-Verbot einer Reaktion zwischen Triplett-Sauerstoff und Singulett-Kohlenstoff umgangen werden kann. Viele Oxygenasen nutzen als Cofaktoren Übergangsmetalle wie Mangan, Kobalt, Kupfer oder Eisen. Bei eisenhaltigen Dioxygenasen werden wiederum zwei Gruppen unterschieden, die Nicht-Häm-Eisen-, sowie die Häm-Enzyme. Weitere Oxygenasen nutzen als Alternative oder in Kombination mit Übergangsmetallen Flavine oder Pterine als Cofaktoren, da deren Semichinonformen die Spinumkehrung eines Elektrons bewirken (Gishla & Massey, 1989) und ein kovalent gebundenes Hydroperoxid-Intermediat bilden können.

Catechol- und Rieske Dioxygenasen von Mikroorganismen sind am Abbau von aromatischen Verbindungen beteiligt (Gibson, 1984); Lipooxygenasen katalysieren die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren zu Vorstufen der Leukotriene und Lipoxine (Nelson & Seitz, 1995) und wären daher als Angriffspunkte für entzündungshemmende Medikamente geeignet.

α -Ketosäure abhängige Oxygenasen werden u. a. für die Synthese von β -Lactam-Antibiotika und β -Lactamase Inhibitoren benötigt. Außerdem sind sie in tierischen Organismen an der posttranslationalen Modifikation von Aminosäuren in Kollagen und in Blutgerinnungsfaktoren, sowie am Abbau aromatischer Aminosäuren beteiligt (Kivirikko et al., 1989; Stenflo et al., 1989), während sie in Pflanzen einzelne Schritte in der Synthese von Phytohormonen (Giberellinsynthese), α -Tocopherolen und Plastochinon katalysieren.

Tabelle 1: Unterschiedliche Klassen mononuklearer Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen

Typ	benötigter Cofaktor	hauptsächliche Vorkommen	Funktion
Catechol Dioxygenasen extradiol spaltend intradiol spaltend	Fe(II), Catechol Fe(III)/Mn(II), Catechol	aerobe Bodenbakterien, einige Vertebraten	Abbau aromatischer Verbindungen, Abbau von Lignin, Terpenen und Tanninen
Lipoxygenasen	Fe(III)	pflanzliche und tierische Organismen, niedere Tiere und Pflanzen	Oxidation ungesättigter Fettsäuren, Leukotrien- und Lipoxinsynthese
Isopenicillin N Synthase	Fe(II), ACV	Mikroorganismen (<i>Anacystis nidulans</i>)	Synthese von Penicillin- und Cephalosporin- Vorstufen
α -Ketosäure-abhängige Oxygenasen	Fe(II), α -Ketosäure, Ascorbat	ubiquitär	Biosynthese biologisch relevanter Verbindungen
Rieske-Typ Dioxygenasen	Fe(II), Fe ₂ S ₂ -Cluster, NADH	Bodenbakterien	Abbau aromatischer Verbindungen
Pterin-abhängige Hydroxylasen	Fe(II), THP	Leber und Niere von Säugetieren	Abbau aromatischer Aminosäuren
Bleomycin (Glycopeptidantibiotikum)	Fe(II)	<i>Streptomyces verticillus</i>	Chemotherapeutikum, DNA-Abbau

Die Anzahl der bereits bekannten und vermutlichen Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen und verwandter Enzyme steigt ständig. So ist inzwischen bekannt, daß das Genom von *Arabidopsis thaliana* 64 *open reading frames* enthält, die für potentielle Fe(II)- und α -Ketoglutarat abhängige Dioxygenasen codieren (Prescott & Lloyd, 2000). Biochemische Charakterisierungen haben zusätzliche α -Ketoglutarat abhängige Dioxygenasen in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen einschließlich Viren nachgewiesen (Ericksson et al., 1999; Anzellotti & Ibrahim, 2000; Kahnert & Kertesz, 2000; Mukherji et al., 2001). Auch die Familie der Zwei-Eisen-Carboxylat-Oxygenasen wird immer größer (Josse et al., 2000; Moseley et al., 2000; Stenmark et al., 2001). Aber obwohl die Qualität der strukturellen Information über die aktiven Zentren der Oxygenasen immer umfangreicher wird, hat diese noch nicht dazu beigetragen, den genauen katalytischen Mechanismus dieser Enzyme aufzuklären.

Zu den bekannten Kristallstrukturen von Sauerstoff-aktivierenden Enzymen mit mononuklearem Nicht-Häm-Eisen gehören die Protocatechuat 3,4-Dioxygenase (intradiol

spaltende Catechol-Dioxygenase) (Ohlendorf et al., 1988; Ohlendorf et al., 1994), die 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase (extradiol spaltend) (Han et al., 1995; Senda et al., 1996), die Lipoxygenase aus Soja (Boyington et al., 1993; Minor et al., 1993), die Mn(II)-substituierte Isopenicillin N Synthase (Roach et al., 1995), die Naphthalen Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* (Kauppi et al., 1998) und die 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase aus *Pseudomonas fluorescens* (Serre et al., 1999). Mit Ausnahme der intradiol spaltenden Catechol-Dioxygenasen, die Fe(III) im aktiven Zentrum besitzen und dies über zwei Histidin- und zwei Tyrosinreste koordinieren (Ohlendorf et al., 1988; Orville et al., 1997; Vetting & Ohlendorf, 2000), sowie weniger extradiol spaltender Dioxygenasen, die Mn(II) binden, nutzen alle anderen Enzyme Fe(II) als Cofaktor. Bei diesen Enzymen wird das Metallatom durch zwei Histidin-Liganden und eine Carboxylatgruppe im aktiven Zentrum koordiniert. In den aktiven Zentren aller Oxygenasen ist mindestens eine Koordinationsstelle des Eisenatoms vakant oder durch ein Wassermolekül besetzt und steht so für die Bindung exogener Liganden wie Substrat, Cofaktor oder molekularen Sauerstoff zur Verfügung. Diese größere Variabilität der das Eisen koordinierenden Umgebung in Nicht-Häm-Eisen-Dioxygenasen steigert die Anzahl der möglichen Mechanismen, wie molekularer Sauerstoff zur Substratoxidation eingesetzt werden kann.

Durch die Flexibilität in der Koordinationsumgebung unterscheiden sich die Nicht-Häm-Eisen-Proteine deutlich von Häm-haltigen Enzymen, bei denen die einzige Koordinationsstelle für exogene Liganden unveränderlich nur für molekularen Sauerstoff, dessen Analoga oder Derivate zugänglich ist, weil der Eisen-Porphyrin Cofaktor kovalent an das Protein gebunden vorliegt. Die zur Reduktion des molekularen Sauerstoffs benötigten Elektronen werden für diese Enzyme in der Regel von den Reduktionsäquivalenten NADH oder NADPH über Elektronentransferproteine (Reduktasen) zur Verfügung gestellt.

Viele der Nicht-Häm-Eisen-Dioxygenasen katalysieren auch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen ihrer Aminosäureseitenketten. Vor allem wurden Hydroxylierungen nachgewiesen (Goodwill et al., 1998; Logan et al., 1998; Ellis et al., 1999; Baldwin et al., 2001; Liu et al., 2001). Die physiologische Bedeutung dieser Autohydroxylierung ist jedoch noch ungeklärt, eventuell schützen sich diese Enzyme dadurch vor größeren Schäden, wie sie durch unkontrollierte oxidative Reaktionen durch aktivierten Sauerstoff hervorgerufen werden könnten.

2.1.1. α -Ketosäure abhängige Oxygenasen

Die α -Ketosäure abhängigen Enzyme können von anderen Nicht-Häm-Eisen-Dioxygenasen unterschieden werden, weil sie für ihre Aktivität neben Fe(II) und molekularem Sauerstoff eine α -Ketosäure, normalerweise α -Ketoglutarat, als Cofaktor benötigen. Sie umfassen eine große Enzymklasse, die essentiell für viele metabolische Prozesse ist. Enzyme dieser Familie sind beteiligt an der posttranslationalen Modifikation von Kollagen, an der Hydroxylierung epidermaler Wachstumsfaktoren, an der Fettsäurebiosynthese, sowie am Pyrimidin-metabolismus. Die meisten dieser Enzyme sind Hydroxylasen und katalysieren die Oxidation einer nicht aktivierten C-H-Bindung, was zu hydroxylierten oder oxidativ zyklisierten Produkten führt. In beiden Fällen wird von der α -Ketosäure CO_2 abgespalten und die Ketofunktion mit einem der aus dem molekularen Sauerstoff stammenden Sauerstoffatom zu einer Carboxylatgruppe oxidiert. Das zweite Sauerstoffatom wird entweder zur Hydroxylierung des Substrates eingesetzt oder während der Zyklisierungsreaktion zu H_2O reduziert.

Neben Fe(II) und der α -Ketosäure ist auch Ascorbat für die volle Aktivität dieser Enzyme essentiell (De Carolis & De Luca, 1994). Dies ist ungewöhnlich, weil für die Reaktion kein exogenes Reduktionsmittel benötigt wird. Da Ascorbat jedoch auch in der Abwesenheit von Substrat oxidiert wird, dient es vermutlich zwei Aufgaben: Es schützt das Enzym vor oxidativer Autoinaktivierung und reduziert die inaktive Fe(III)- zur aktiven Fe(II)-Form. Der Austausch von Fe(II) gegen andere divalente Metallionen (Zn(II), Cu(II), Mn(II), Co(II), Mg(II) oder Ni(II)) führt zu komplettem Verlust der Enzymaktivität (Que & Ho, 1996).

Alle zu dieser Klasse zählenden Enzyme zeigen einen *jellyroll* Faltungstyp mit drei Eisenliganden, die nach dem konservierten Motiv His-X-Asp/Glu- X_n -His angeordnet sind. Die bestuntersuchten Enzyme dieser Gruppe sind Prolin 3-Hydroxylase, Clavaminat Synthase und Cephalosporin C Synthase (Que & Ho, 1996; Solomon et al., 2000; Clifton et al., 2001). Aufgrund der hohen Oxidationsempfindlichkeit von Eisen sollte davon ausgegangen werden, daß dessen Koordinationsstellen voll besetzt sind, um eine Reaktion mit molekularem Sauerstoff zu vermeiden, so daß in der Regel eine oktaedrische Koordination des Metallatoms zu erwarten sein sollte.

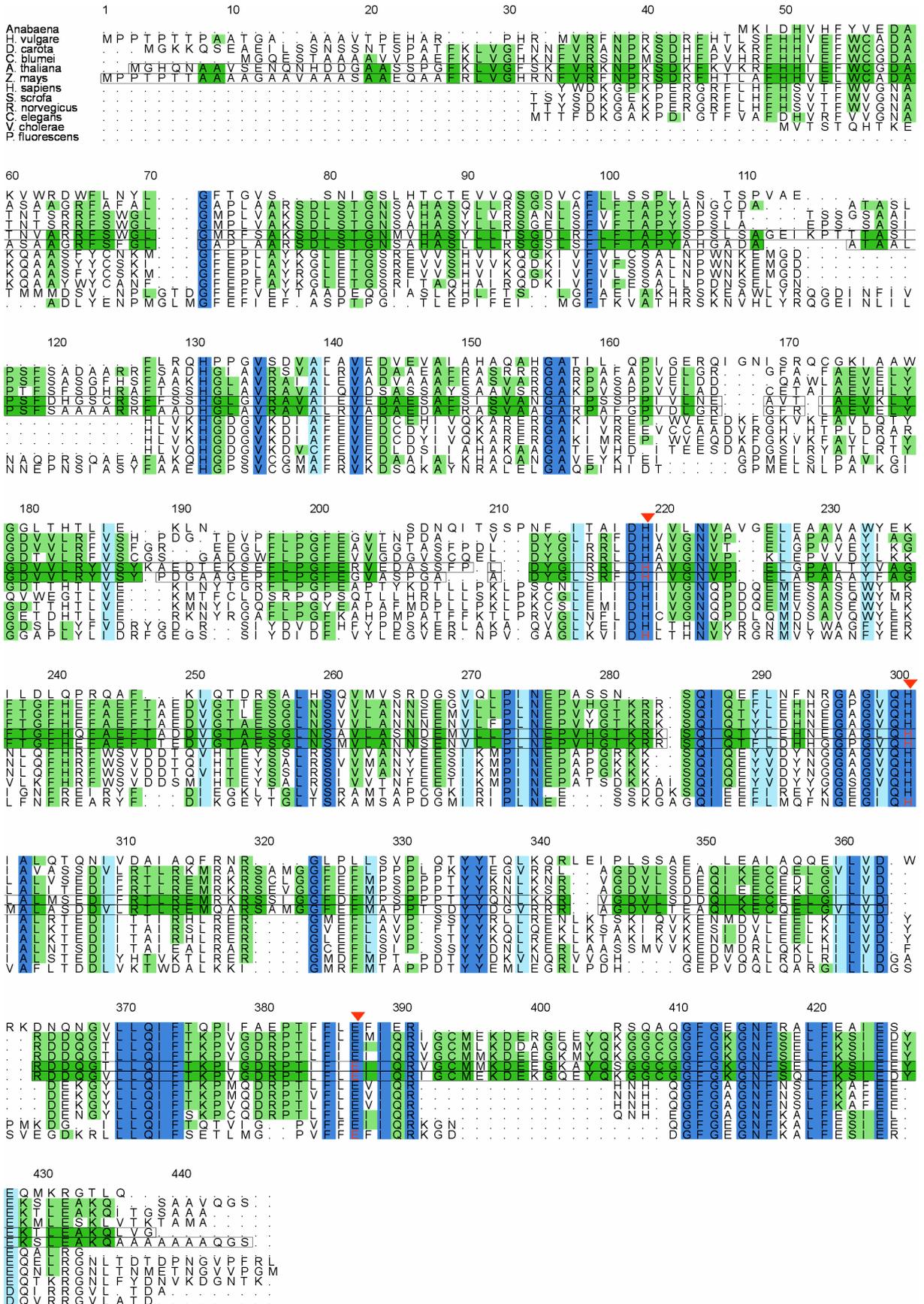
Der exakte Reaktionsmechanismus konnte anhand von Kristallstrukturen noch nicht nachvollzogen werden, allerdings wurden kinetische Untersuchungen und Reaktivitätsstudien durchgeführt (Hanuske-Abel & Gunzler, 1982; Chiou & Que, 1995), so daß ein Modell für den Reaktionsmechanismus aufgestellt werden konnte. Demnach ist der erste Reaktionsschritt

die bidentale Koordination der α -Ketosäure an Fe(II), dem die Bindung des Substrates und des molekularen Sauerstoffs folgt, der mit dem Metallatom ein Fe(III)-Superoxid bildet. Der nukleophile Angriff des gebundenen molekularen Sauerstoffs auf das C2-Atom der α -Ketosäure resultiert in deren Decarboxylierung und der Bildung eines Fe(II)-Peroxyderivats. Dieses könnte entweder direkt oder über ein hoch oxidiertes Fe(IV)-O(-II)-Intermediat mit dem Substrat reagieren, so daß es zu einer Carboxysäure oxygeniert würde, während das Enzym gleichzeitig wieder in seinen aktiven Ausgangszustand (Fe(II)) zurückkehren würde. Die Freisetzung von CO₂ ist der erste irreversible Schritt und treibt die Reaktion voran. Das Fe(IV)-O(-II)-Intermediat könnte ein Wasserstoffatom vom Substrat abstrahieren und dieses hydroxylieren oder durch Abstraktion eines zweiten Wasserstoffatoms ein ungesättigtes Produkt und H₂O erzeugen. Bei diesen Überlegungen zu einem möglichen Reaktionsmechanismus muß jedoch betont werden, daß bislang keines der postulierten Sauerstoffintermediate (Superoxid oder Fe(IV)-O(-II)) nachgewiesen werden konnte (Solomon et al., 2000).

2.1.2. 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)

4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (4-Hydroxyphenylpyruvat:Sauerstoff Oxidoreduktase, hydroxylierend, decarboxylierend; EC 1.13.11.27) (HPPD) ist ein mononukleares Nicht-Häm-Eisen Protein, das zur Klasse der α -Ketosäure abhängigen Oxygenasen zählt. Bei der HPPD liegt der benötigte Cofaktor bereits als Bestandteil des Substrates vor. Ein weiterer Unterschied zu den übrigen α -Ketosäure abhängigen Enzymen liegt darin, daß HPPD beide Sauerstoffatome in das Substrat einbaut, während andere Enzyme dieser Klasse den Cofaktor, in der Regel α -Ketoglutarat, oxidieren, der anschließend zu Succinat decarboxyliert wird.

Das Enzym katalysiert die Bildung von Homogentisat (2,5-Dihydroxyphenylacetat) aus 4-Hydroxyphenylpyruvat (HPP) (Pascal et al., 1985; Que & Ho, 1996; Crouch et al., 1997). Bei dieser komplexen Reaktion wird zunächst die Seitenkette der α -Ketosäure oxidativ decarboxyliert, woran sich eine Hydroxylierung des aromatischen Ringes und eine 1,2-Migration der Carboxymethylfunktion anschließt (Forbes & Hamilton, 1994).



Alle HPPDs aus eukaryotischen Organismen sind Homodimere aus 40-48 kDa großen Untereinheiten. Die bislang am besten charakterisierte HPPD aus *Pseudomonas* ist dagegen ein Homotetramer, dessen Monomere eine Masse von 41 kDa aufweisen (Rüetschi et al., 1992). Die Struktur der HPPD aus *P. fluorescens* wurde bereits aufgeklärt (Serre et al., 1999). Diese zeigt trotz der Zugehörigkeit des Enzyms zu den α -Ketosäure abhängigen Dioxygenasen den gleichen Faltungstyp wie eine Klasse der extradiol ringspaltenden Enzyme, zu denen u. a. die Catechol 2,3-Dioxygenase (Metapyrocatechase, MPC) zählt. Auch das Sequenzmotiv der das Fe(II) Atom koordinierenden Reste unterscheidet sich von dem anderer α -Ketosäure abhängigen Dioxygenasen (s. 2.1.1.).

2.1.2.1. HPPD in Pflanzen

In den meisten Organismen ist das Enzym am Abbau der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin beteiligt. Die durch die Tyrosinaminotransferase (EC 2.6.1.5) zu 4-Hydroxyphenylpyruvat desaminierte Aminosäure wird durch HPPD zu Homogentisinsäure umgesetzt, die weiter zu Fumarat und Acetoacetat abgebaut wird (Fernández-Cañón & Peñalva, 1995; Crouch et al., 1997).

In höheren Pflanzen, die HPPD wahrscheinlich ebenfalls zum Tyrosinabbau, jedoch nicht zur Synthese aromatischer Aminosäuren nutzen, dient Homogentisat als Substrat für die Plastochinon- und α -Tocopherol-Synthese. Diese Moleküle bilden die zwei Hauptklassen lipidlöslicher Chinonverbindungen in den Chloroplasten höherer Pflanzen. Plastochinon ist als Elektronencarrier zwischen Photosystem II und dem Cytochrom b_6/f Komplex, sowie als Elektronenquelle für NAD(P)H:Plastochinon Oxidoreduktasen essentiell (Berger et al., 1993), während α -Tocopherol Bestandteil des antioxidativen Systems ist und als Radikalfänger und strukturelle Membrankomponente fungiert (Liebler, 1993; Munné-Bosch & Alegre, 2002). Eine Anreicherung des α -Tocopherols kann vor allem in Chloroplastenmembranen beobachtet werden (Lichtenthaler et al., 1981; Soll et al., 1985).

Abb. 2: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenasen
Konservierte Aminosäuren sind dunkelblau, homologe Reste hellblau unterlegt. Die zwischen den HPPDs aus *Z. mays* und *A. thaliana* konservierten Reste sind dunkelgrün, die zu anderen Organismen konservierten Reste hellgrün unterlegt. Pfeile bezeichnen die an der Koordination des Fe(II) beteiligten Reste.

Interessanterweise konnte kürzlich nachgewiesen werden, daß das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 HPPD zur Synthese von Plastochinon nicht benötigt. Die Unterbrechung eines offenen Leserahmens, der für ein den pflanzlichen HPPDs homologes Protein codiert, verursacht zwar den kompletten Verlust von α -Tocopherol, hat aber weder Einfluß auf die Konzentration von Plastochinon, Carotenoiden und Chlorophyllen in der Zelle, noch auf die Photosyntheserate oder das Zellwachstum (Dähnhardt et al., 2002). Diese Ergebnisse unterstützen die Rolle der HPPD bei der Tocopherolsynthese, stehen aber in Widerspruch zu Mutationsexperimenten der HPPD von *Arabidopsis*, die das Enzym zur Synthese beider Verbindungsklassen benötigt (Norris et al., 1995; Norris et al., 1998). Dieser Unterschied zwischen einzelligen Cyanobakterien und höheren Pflanzen ist aufgrund der Endosymbiontentheorie bemerkenswert, die davon ausgeht, daß sich Chloroplasten und Cyanobakterien auf einen gemeinsamen Ursprung zurückführen lassen.

Trotz vieler Untersuchungen ist die Lokalisation der HPPD in der pflanzlichen Zelle immer noch nicht eindeutig geklärt. Löffelhardt und Kindl (1979) wiesen HPPD Aktivität in Thylakoidmembranen von *Lemna gibba* nach. Fiedler et al. (1982) lokalisierten Enzymaktivität sowohl in Spinatchloroplasten (Prenylchinonsynthese) als auch in Peroxisomen (Tyrosinabbau), so daß die Existenz unterschiedlicher Isoformen wahrscheinlich erschien. Im Gegensatz zu dieser Kompartimentierung zeigten Lenne et al. (1995) und Garcia et al. (1997), daß HPPD Aktivität auf das Cytosol beschränkt ist. Da die Prenylchinonsynthese in der Chloroplastenhülle erfolgt (Soll et al., 1985), wäre das Auftreten einer plastidären Isoform der HPPD naheliegend. Dies scheint jedoch inzwischen zumindest für *Arabidopsis* ausgeschlossen. Norris et al. wiesen 1998 nach, daß eine 17 bp Deletion im HPPD-Gen, das als *single copy* im Genom vorliegt (Garcia et al., 1999), zum Ausbleichen der Pflanzen führt. Damit wurde gezeigt, daß die im Cytosol lokalisierte HPPD sowohl am Tyrosinabbau, als auch an der Prenylchinonsynthese beteiligt sein muß.

2.1.2.2. HPPD in tierischen Organismen

Im Gegensatz zu Pflanzen sind Säugetiere nicht in der Lage, die zuvor beschriebenen Chinonverbindungen zu synthetisieren, benötigen aber ebenfalls α -Tocopherol (Vitamin E), das eine wichtige Rolle als membranassoziierter Radikalfänger spielt (Liebler, 1993). Trotzdem ist HPPD-Aktivität im Zusammenhang mit dem Abbau von Tyrosin und

Phenylalanin nachweisbar. Die höchste Enzymkonzentration liegt in Leber und etwas geringer in Niere vor (Awata et al., 1994; Forbes & Hamilton, 1994).

Menschen reagieren sehr empfindlich auf Defekte des Aminosäurekatabolismus. So ist der autosomal rezessiv vererbte Enzymdefekt der HPPD als Tyrosinämie Typ III bekannt, der jedoch relativ selten auftritt. Diese Krankheit zeichnet sich durch erhöhte Tyrosinkonzentration im Blut und verstärkte Exkretion von Tyrosin und Phenolverbindungen aus. Bei den Patienten tritt mentale Retardierung auf (Ellaway et al., 2001).

Im Fall der erblichen Erkrankung der Tyrosinämie Typ I, die sich durch reduzierte Fumarylacetoacetaseaktivität auszeichnet, führt die Hemmung der HPPD mit gleichzeitiger Tyrosin-armer Ernährung zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes. Weil der Tyrosinabbau und damit die Bildung von Homogentisat blockiert wird, wird die Akkumulation toxischer Verbindungen verhindert.

2.1.2.3. Inhibitoren der HPPD

Aufgrund der zentralen Rolle der HPPD im Stoffwechsel aromatischer Aminosäuren in Säugetieren und der Chinonsynthese in Pflanzen wurden in den vergangenen Jahren unterschiedliche Klassen von Inhibitoren entwickelt. Dabei kommen bisher vor allem Verbindungen zum Einsatz, die ein Triketon als Grundstruktur besitzen und damit vermutlich ein Reaktionsintermediat imitieren. Die Hemmung erfolgt kompetitiv durch Bindung an das Fe(II)-Atom im aktiven Zentrum (Schulz et al., 1993; Secor, 1994; Lee et al., 1998; Pallett et al., 1998). Lee et al. konnten 1997 zeigen, daß zur *in vitro* Hemmung des Enzyms als Minimalstruktur ein 2-Benzoyl-ethen-1-ol-Gerüst ausreichend ist.

Sulcotrion [2-(2-chloro-4-methansulfonylbenzoyl)-cyclohexan-1,3-dion] und Isoxaflutol [5-cyclopropyl-4-(4-trifluoromethyl-2-methansulfonylbenzoyl)isoxazol] werden als Herbizide eingesetzt (Lee et al., 1998; Pallett et al., 1998; Viviani et al., 1998). Sulcotrion kann als Mikado[®] für den Einsatz in Maiskulturen erworben werden, Mesotrion (Callisto[®]) wird in den letzten Jahren verstärkt gegen Sulfonylharnstoff-resistente Unkräuter eingesetzt (Mitchell et al., 1999). Isoxaflutol unterscheidet sich von den auf der Triketongrundstruktur basierenden Herbiziden Sulco- und Mesotrion jedoch durch den Isoxazolring. Diese Verbindung selbst hemmt HPPD nicht direkt, sondern als eigentlicher Inhibitor wirkt das Diketonitril-derivat, das durch Spaltung des Isoxazolringes entsteht. Neben diesen synthetisch hergestellten

Verbindungen wurden inzwischen auch Stoffwechselmetabolite anderer Organismen wie Flechten gefunden, die die Aktivität der HPPD hemmen (Romagni et al., 2000).

Die Hemmung der pflanzlichen HPPD beeinflusst auch die Aktivität der Phytoendesaturase, weil der für deren Aktivität nötige Cofaktor Plastochinon nicht mehr synthetisiert werden kann (Pallett et al., 1998). Dies führt zur Akkumulation des Carotenoidvorläufers Phytoen und zur Ausbleichung (Chlorose) der Pflanzen, weil der photosynthetische Apparat nicht länger durch Carotenoide stabilisiert werden kann und Chlorophyllmoleküle durch überschüssige Energie zerstört werden.

NTBC [2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexandion] wird bei Menschen zur Therapie von Tyrosinämie des Typs I eingesetzt, bei der ein Defekt der Fumarylacetoacetase vorliegt. Durch die Hemmung der HPPD wird der Abbau von Tyrosin und damit der Konzentrationsanstieg von Succinylacetoacetat, Succinylaceton und 5-Aminolävulinat verhindert, wodurch Nieren- und Leberschäden vermindert werden können (Ellis et al., 1995; Lock et al., 1998). Die Strukturformeln dieser gängigen HPPD Inhibitoren sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

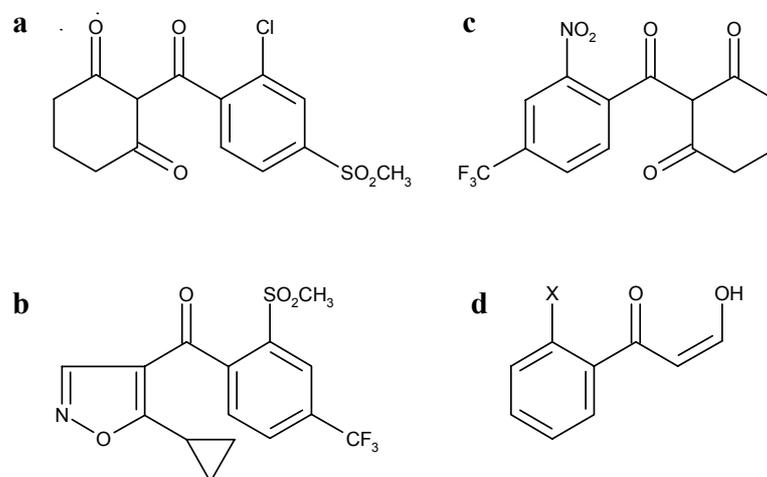


Abb. 3: Inhibitoren der 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase Dargestellt sind die Strukturformeln der Inhibitoren Sulcotrion (a), Isoxaflutol (b), NTBC (c) und der von Lee et al. (1997) bestimmten Minimalstruktur (d), die zur Hemmung des Enzyms notwendig ist.

2.1.2.4. Reaktionsmechanismus der HPPD

Trotz der medizinischen und agrarwirtschaftlichen Bedeutung der HPPD und der faszinierenden Chemie der von ihr katalysierten Reaktion wurden zwar bereits plausible Reaktionsmechanismen postuliert, allerdings noch keine einzelnen katalytischen Schritte nachgewiesen (Hamilton, 1971; Rundgren, 1982; Pascal et al., 1985), so daß die mechanistischen Details der Reaktion noch nicht aufgeklärt werden konnten. Kinetische Gleichgewichtsexperimente weisen auf einen geordneten bi bi Mechanismus hin, wobei HPP das als erstes bindende Substrat und CO₂ das erste dissoziierende Produkt ist (Rundgren, 1977). Für die Substraterkennung durch die pflanzlichen Enzyme ist die 4-Hydroxylgruppe notwendig (Johnson-Winters et al., 2003), während tierische HPPD Isoformen auch in der Lage sind, Phenylpyruvat oder α -Ketoisocaproat umzusetzen (Denum et al., 1982; Crouch et al., 2000). HPP wirkt als aktivierender Effektor für die Reaktion der HPPD mit molekularem Sauerstoff. Ein solcher Mechanismus wird auch für weitere Fe(II) abhängige Oxygenasen postuliert (Arciero et al., 1985; Harpel & Lipscomb, 1990; Brown et al., 1995; Shu et al., 1995; Roach et al., 1997; Solomon et al., 2000).

Die Umlagerung der decarboxylierten Seitenkette des oxidierten Substrates, die vermutlich über ein Arenoxid Intermediat verläuft, ist jedoch immer noch ein unverstandener Schritt der Reaktion, wobei diese Art der Substituentenmigration auch in anderen Oxygenasen, die aromatische Substrate umsetzen, beobachtet werden kann (Sono et al., 1996; Fitzpatrick, 1998). Allerdings ist die Verschiebung eines solch großen Substituenten, wie hier einer Acetogruppe, die während der Katalyse mit 100 %iger Effizienz durchgeführt wird, einzigartig für HPPD.

2.2. METALLOHYDROLASEN

Viele Reaktionsschritte des Metabolismus und der Signaltransduktion beinhalten die hydrolytische Spaltung von Peptid-, Anhydrid- oder Phosphatesterbindungen. Obwohl diese Bindungstypen thermodynamisch instabil gegenüber einer Hydrolyse sind, müssen *in vivo* signifikante kinetische Barrieren zu ihrer Spaltung überwunden werden. Die selektive Spaltung dieser Bindungen unter physiologischen Bedingungen wird daher durch Enzyme katalysiert, die ubiquitär verbreitet und essentiell für jeden lebenden Organismus sind. Hierzu

zählen neben Peptidasen auch Phosphohydrolasen, wie zum Beispiel die Fructose-1,6-Bisphosphatase, Phospholipase C, Nukleasen und anorganische Pyrophosphatase. Viele dieser Enzyme sind bereits detailliert untersucht worden, was gezeigt hat, daß sie eine Vielzahl unterschiedlicher Strukturen, funktioneller Gruppen und chemischer Mechanismen einsetzen, um die Hydrolyse ihrer Substrate zu beschleunigen (Jencks, 1969; Walsh, 1979; Fersht, 1985). Anorganische Pyrophosphatase gehört dabei wie Kinasen, ATPasen und Polymerasen zur Familie der Phosphorylgruppen transferierenden Enzyme, die eine der größten bekannten Enzymklassen darstellt.

Allein unter den Pyrophosphatasen müssen mehrere Klassen unterschieden werden. Neben den löslichen Enzymen besitzen Pflanzen, manche Eu- und Archaeobakterien sowie Protozoen membrangebundene, teilweise vakuoläre Pyrophosphatasen. Diese Organismen nutzen Pyrophosphat anstelle von oder zusätzlich zu ATP als Phosphorylgruppendonator und bauen gleichzeitig mit der Hydrolyse von Pyrophosphat einen Protonengradienten über der Vakuolenmembran auf. Funktion und Aufbau dieser Enzyme unterscheiden sich daher signifikant von den löslichen Enzymen (Baltscheffsky & Baltscheffsky, 1992; Rea & Poole, 1993; Baltscheffsky et al., 1999). Inzwischen wurde sogar ein weiterer Typ dieser Art Protonen-pumpender Pyrophosphatasen im Golgiapparat von Pflanzen nachgewiesen, der gleichzeitig K^+ -abhängig ist (Mitsuda et al., 2001).

Des Weiteren konnten membranassoziierte mitochondriale Pyrophosphatasen nachgewiesen werden (Mansurova, 1989), die eine Stellung zwischen den löslichen und den Protonen-pumpenden Pyrophosphatasen einnehmen. Diese sind durch nichtkatalytische Untereinheiten in der inneren Mitochondrienmembran verankert (Volk et al., 1983), jedoch nicht am Aufbau eines Protonengradienten beteiligt (Lundin et al., 1991). Ihre katalytischen Untereinheiten ähneln in Struktur und Funktion denen der löslichen Pyrophosphatasen.

Ein Sequenzvergleich löslicher anorganischer Pyrophosphatase (PPase) mit der Na^+, K^+ -ATPase (EC 3.7.3.17), die ebenfalls Phosphodiesterbindungen hydrolysiert, ergab, daß letztere ein zur Pyrophosphatase homologes Peptid besitzt, in dem drei Aminosäurereste konserviert sind (Scheiner-Bobis & Schreiber, 1999). Diese entsprechen Glu48, Pro50 und Lys56 des aktiven Zentrums der löslichen anorganischen Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae* und sind in ATPase Bestandteil der ATP-Bindungsstelle.

PPasen selbst müssen wiederum in zwei nicht homologe Familien (Typ I und Typ II) eingeteilt werden, die bis auf die Anordnung der Liganden und der an ihrer Koordination beteiligten Aminosäurereste keinerlei Sequenz- und Strukturähnlichkeit aufweisen. Damit können diese beiden Klassen als Beispiel für die konvergente Evolution gleicher

Enzymfunktionen angesehen werden. Zu den bestuntersuchten PPasen des Typs I gehören die Enzyme aus *Escherichia coli* und *S. cerevisiae*.

PPasen des Typs II wurden hingegen erstmals 1998 beschrieben (Shintani et al., 1998; Young et al., 1998), die Kristallstrukturen der Enzyme aus *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* und *Streptococcus gordonii* wurden bereits veröffentlicht (Ahn et al., 2001; Merkel et al., 2001).

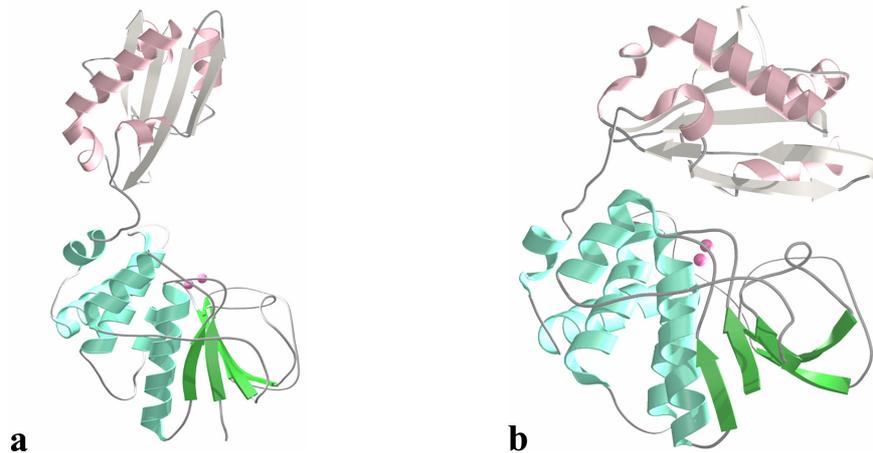


Abb. 4: Ribbondarstellung löslicher anorganischer Pyrophosphatasen des Typs II Dargestellt sind die monomeren Untereinheiten der PPasen aus *B. subtilis* (a) und *S. gordonii* (b). Die Struktur aus *B. subtilis* ist in geöffneter, die aus *S. gordonii* in geschlossener Konformation abgebildet. In der Kontaktfläche zwischen N-terminaler (türkis-grün) und C-terminaler (rosa-weiß) Domäne sind die für die Katalyse nötigen Mn(II) Ionen koordinativ gebunden, sie sind als pinkfarbene Kugeln dargestellt.

Diese Enzyme liegen als Homodimere vor, deren Untereinheiten (ca. 33 kDa) im Vergleich zu den PPasen von Typ I in zwei Domänen gegliedert und deren aktive Zentren an der Kontaktfläche zwischen diesen Domänen lokalisiert sind. Während das Enzym ohne Substrat in „geöffneter“, flexibler Konformation vorliegt, induziert Substratbindung eine Konformationsänderung zu einer „geschlossenen“ Form (Ahn et al., 2001). Die Aktivität dieser Enzyme liegt um das zeh- bis zwanzigfache höher als die der PPasen von Typ I (Tono & Kornberg, 1967; Kuhn & Ward, 1998). Die Ähnlichkeit im Aufbau des aktiven Zentrums läßt allerdings den Schluß zu, daß der Reaktionsmechanismus analog dem der Enzyme von Typ I erfolgt. Allerdings ist die Aktivität der PPasen des Typs II von ihrem Oligomerisierungszustand abhängig. Im Gegensatz zu PPasen von Typ I, die sowohl als Monomere, wie auch als Multimere vergleichbare Aktivität zeigen, steigt die Aktivität der Enzyme von Typ II mit ihrer Dimerisierung um das 40fache an (Parfenyev et al., 2001).

Dieser Unterschied wird vermutlich durch die Zwei-Domänen-Struktur bedingt, weil diese eine erhöhte Flexibilität des aktiven Zentrums verursacht, die im Monomer größer ist.

2.2.1. Lösliche anorganische Pyrophosphatase von Typ I

Bereits 1928 wurde in tierischem Gewebe ein Enzym entdeckt, das Pyrophosphat zu anorganischem Phosphat hydrolysiert (Kay, 1928). Diese in allen Organismen verbreitete lösliche anorganische Pyrophosphatase (Pyrophosphat Phosphohydrolase; EC 3.6.1.1) katalysiert die Hydrolyse von Phosphoanhydridbindungen ohne Entstehung eines kovalent gebundenen Intermediats und ist essentiell für den Erhalt des intrazellulären Phosphatspiegels, weil das Enzym die Pyrophosphatkonzentration im Bereich weniger Mikromolar kontrolliert. Eine weitere Funktion liegt in der Spaltung des bei der Synthese von Nucleinsäuren, Proteinen, Lipiden und Polysacchariden, sowie bei der DNA-Replikation und Transkription freiwerdenden Pyrophosphats, was diese Reaktionen beschleunigt (Stetten, 1960) und irreversibel macht (Kornberg, 1962). Auch die β -Oxidation von Fettsäuren wird indirekt durch den Abbau von Pyrophosphat angetrieben.

Dessen Hydrolyse wird dabei im Vergleich zur nicht katalysierten Hydrolyse in Wasser um den Faktor 10^{10} beschleunigt (Baykov et al., 1999). Das Verhältnis von K_{cat} zu K_m beträgt $3,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Baykov et al., 2000) und liegt damit höher als bei allen von Fersht (1999) aufgelisteten höchst effizienten Enzymen.

Zur Katalyse benötigen alle PPasen divalente Metallcofaktoren, wobei Mg^{2+} bei PPasen von Typ I bzw. Mn^{2+} bei Enzymen von Typ II den natürlichen Aktivator darstellt. Doch auch mit den nicht physiologischen Cofaktoren Zn^{2+} , Mn^{2+} und Co^{2+} kann hydrolytische Aktivität der Enzyme von Typ I nachgewiesen werden (Welsh et al., 1983). Allerdings verliert das Enzym in diesem Fall seine absolute Substratspezifität und hydrolysiert sowohl Polyphosphate (Höhne & Heitmann, 1974), als auch Nucleosidtri- und -diphosphate (Schlesinger & Coon, 1960; Kunitz, 1961). Für die PPase aus *Rhodospseudomonas palustris* wurde sogar nachgewiesen, daß die höchste Aktivitätsrate mit Ca^{2+} erzielt wird (Schwarm et al., 1986).

Physikalische Charakterisierungen von PPasen mit unterschiedlichen Übergangsmetallionen und hochaufgelöste Röntgenstrukturen zeigten, daß diese Enzyme mehrere Ionenbindungsstellen besitzen, die relativ nah zusammen liegen. Um die Proteinstabilität zu gewährleisten, ist jedoch nur ein Ion pro Monomer nötig (Hansen et al., 1999).

Zwei der Bindungsstellen sind mit hoher Affinität bereits vor der Substratbindung besetzt, die Besetzung zweier weiterer Bindungsstellen erfolgt im Komplex mit dem Substrat (Banerjee & Cooperman, 1983; Knight et al., 1984; Welsh & Cooperman, 1984; Heikinheimo et al., 1996). Diese divalenten Metallionen erfüllen während der Katalyse mehrere Aufgaben. Sie neutralisieren die Substratnettoladung als Bestandteil des Substratkomplexes bzw. regulieren durch die gemeinsame Koordination mit positiv geladenen Seitenketten des Proteins den pK_a Wert des Pyrophosphats. Außerdem aktivieren sie ein Wassermolekül durch Senkung seines pK_a Wertes für einen nukleophilen Angriff und dienen der elektrostatischen Stabilisierung der Ladungen im Übergangszustand.

Als Reaktionsmechanismus wird ein S_N2 -Mechanismus postuliert (Gonzalez & Cooperman, 1986), wobei der Enzym-Substrat-Komplex während des katalytischen Zyklus eine Isomerisierung durchläuft (Heikinheimo et al., 2001). Die Spaltung erfolgt durch den nukleophilen Angriff eines Hydroxylions (O_{nu}) auf die der abgehenden Phosphatgruppe (P1) benachbarte Phosphatgruppe (P2), die mit allen vier Metallionen interagiert (*inline attack*). Der dadurch entstehende trigonal-bipyramidale Übergangszustand wird durch die Metallionen und positiv geladene Seitenketten des Enzyms stabilisiert und P1 durch Protonierung mittels eines zweiten Wassermoleküls aktiviert, was zur Schwächung der P-O-Bindung führt. Gleichzeitig wird das Phosphoratom der angegriffenen Phosphatgruppe um ca. 1 Å in Richtung des Hydroxylions verschoben, was ausreicht, um die Bindung zu spalten (Harutyunyan et al., 1996; Heikinheimo et al., 1996; Pohjanjoki et al., 1998).

Über die PPase aus *E. coli* wurden Ergebnisse veröffentlicht, die zeigen, daß während der Katalyse strukturelle Verlagerungen stattfinden und zwischen den Untereinheiten positive Kooperativität besteht (Avaeva et al., 1997; Avaeva et al., 1998), was sich vermutlich aufgrund der großen Ähnlichkeit der Tertiärstrukturen, im katalytischen Muster, im Aufbau der aktiven Zentren und trotz der Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften auf das Enzym aus *S. cerevisiae* übertragen läßt. Zwei Metallionen binden wie im Hefeenzym in Abwesenheit des Substrats. Drei Ionen scheinen zur Bildung eines katalytisch kompetenten Komplexes auszureichen, so daß $MgPP_i$ als Substrat angesehen wird (Baykov et al., 1996). Belogurov et al. (2000) wiesen durch kinetische Experimente nach, daß auch in Hefe $MgPP_i$ schneller hydrolysiert wird als Mg_2PP_i . Durch die Substratbindung kommt es zu Konformationsänderungen von Resten des aktiven Zentrums, was sich auf entfernte Molekülbereiche auswirkt (Samygina et al., 2001). Die Autoren sehen das Metallion in M1 als nötig für den Strukturerthalt des aktiven Zentrums und für die korrekte Orientierung des Nukleophils, aber nicht als Aktivator zu dessen Erzeugung an, weil die tatsächliche Ladung

des Ions durch dessen Koordination an drei Carboxylgruppen minimiert wird. Die Erzeugung des Nukleophils wird hauptsächlich durch das Metallion in M2 vermittelt. Die Metallionen in M1 und M2 dienen jedoch auch der korrekten Orientierung des Substrats und der reaktiven Gruppen des Proteins. In M3 bindet das Metallion als Bestandteil des Substrats, erhöht dessen Elektrophilität und ist an seiner korrekten Orientierung beteiligt. Die Funktion des Ions in M4 dagegen bleibt weiter unklar, da es für die Substrathydrolyse nicht nötig ist, sondern diese sogar hemmt (Avaeva et al., 1996; Baykov et al., 1996; Rodina et al., 2001). Dieses Ion, welches in einer Struktur aus Hefe, allerdings nicht im Enzym aus *E. coli* gefunden wurde, scheint die Dissoziation von P1 nach der Hydrolyse zu erschweren, so daß es für die PP_i-Synthese von Bedeutung sein könnte (Baykov & Shestakov, 1992; Samygina et al., 2001).

Bis heute sind mehr als 200 pro- und eukaryotische Gensequenzen von PPasen in Datenbanken hinterlegt, deren Aminosäuresequenzen jedoch nur gering konserviert sind. Aufgrund der Sequenzunterschiede können die PPasen von Typ I in drei Unterfamilien (prokaryotische, pflanzliche und tierische/pilzliche Enzyme) eingeteilt werden. Interessant ist hierbei, daß die pflanzlichen Enzyme den prokaryotischen PPasen ähnlicher sind als den weiteren eukaryotischen Enzymen. Allerdings liegt in allen Sequenzen ein Cluster streng konservierter polarer oder geladener Reste vor. Dabei handelt es sich um 17 Aminosäuren, von denen 13 funktionell wichtige Aminosäurereste des aktiven Zentrums sind (Sivula et al., 1999). Trotz der geringen Sequenzhomologien stimmen die Strukturen der Proteine überein. In den vergangenen Jahren wurden die Strukturen der PPasen aus *S. cerevisiae*, *E. coli*, *T. thermophilus* und *S. acidocaldarius* veröffentlicht (Oganessyan et al., 1994; Teplyakov et al., 1994; Kankare et al., 1996; Leppänen et al., 1999). Außerdem sind mehr als 15 Strukturen von PPasen mit unterschiedlichen Liganden, Reaktionsprodukt und -analogon SO₄²⁻, ein durch F⁻ inhibierter Substratkomplex, Ca²⁺-komplexierte PPase, sowie unterschiedliche Mutanten untersucht worden (Kankare et al., 1996b; Avaeva et al., 1997; Tuominen et al., 1998; Heikinheimo et al., 2001; Samygina et al., 2001).

Alle bisher untersuchten Proteine des Typs I aus eukaryotischen Organismen liegen als Dimere, alle prokaryotischen PPasen als Hexamere vor.

2.2.2. Inhibitoren der löslichen anorganischen Pyrophosphatase

Die zentrale Rolle im Stoffwechsel macht PPasen zu einem Zielenzym für medizinische Therapeutika und im Pflanzenschutz. In der Therapie von Osteoporose (Golden, 1998) und in

der Onkologie (Desikan et al., 1999) werden vor allem Bisphosphonate (Pamidronat[®], Alendronat[®] und Clodronat[®]) eingesetzt. Dabei handelt es sich um Substratanaloga, bei denen das Sauerstoffatom der Anhydridbindung zwischen beiden Phosphoratomen gegen ein Kohlenstoffatom ausgetauscht wurde. Diese Verbindungen hemmen PPasen aus Säugern stark, wirken allerdings nicht gegen bakterielle und mitochondriale PPasen (Smirnova et al., 1986; Unguryte et al., 1989). F⁻ hemmt durch Stabilisierung des Übergangszustandes ebenfalls eukaryotische PPasen (Baykov et al., 1992), da es das angreifende Nukleophil (O_{nu}) ersetzt (Pohjanjoki et al., 2001) und die Isomerisierung des Enzym-Substratkomplexes verhindert. Prokaryotische PPasen sind dagegen gegenüber F⁻ weniger empfindlich (Oliva et al., 2000).

Als natürliche Inhibitoren der PPasen von Typ I wirken neben Phosphat auch Polyphosphate (Baykov et al., 1999; Bonting et al., 1999), Ca²⁺ (Moe & Butler, 1972; Visser et al., 1998) und mit Ca²⁺ komplexiertes Pyrophosphat. Die Calciumkonzentration muß zur Inhibition jedoch im mikromolaren Bereich (10⁻⁵ M) und damit deutlich höher liegen, als dies normalerweise im physiologischen Bereich (10⁻⁷ bis 10⁻⁶ M) der Fall ist. Dies könnte eine Verbindung zu Prozessen der Signaltransduktion darstellen, bei denen ein Anstieg der Ca²⁺-Konzentration auf etwa 10⁻⁵ M beobachtet wird. Die Pyrophosphatkonzentration in der Zelle könnte demnach durch Ca²⁺-vermittelte Regulation der PPasen kontrolliert werden. PPasen von Typ II sind dagegen in der Lage, CaPP_i zu hydrolysieren (Parfenyev et al., 2001).

2.2.3. Lösliche anorganische Pyrophosphatase aus *S. cerevisiae* und *E. coli*

Die am besten untersuchten PPasen des Typs I sind die Enzyme aus *E. coli* und *S. cerevisiae*. Obwohl die Sequenzhomologie beider PPasen nur ca. 25 % beträgt, ist der Kernstrukturbereich konserviert. Dieser besteht aus fünf β -Strängen (β 1 und β 4 bis β 7) und zwei α -Helices (Heikinheimo et al., 1996) und folgt dem Oligonukleotidbindungsmotiv (OB-fold) (Murzin, 1996). Diese fünf β -Stränge bilden ein verdrehtes β -Barrel, welches oben durch α -Helix A, unten durch den *loop* zwischen β 5 und β 6 abgeschlossen wird und in dem das aktive Zentrum liegt.

Die PPase aus *S. cerevisiae* besitzt im Vergleich zum bakteriellen Enzym ein zusätzliches β -Faltblatt aus weiteren vier β -Strängen (β 9, β -4, β -3 und β 2). Dieses ist durch den β -Strang β 3 in direktem Kontakt zum Barrel orientiert und bildet keine separate Domäne. Dieser Unterschied wird durch die C- und N-terminalen Verlängerungen in der Aminosäuresequenz

des Hefeenzym bedingt. Durch den 111 Aminosäuren umfassenden Größenunterschied besitzt die PPase aus *S. cerevisiae* auch einen größeren hydrophoben Kernbereich als das bakterielle Enzym.

2.2.3.1. Aktives Zentrum

Das aktive Zentrum beider Enzyme liegt als eine etwa 20 Å umfassende Ausbuchtung im β -Barrel und wird in beiden PPasen von 20 größtenteils polaren Aminosäuren gebildet, von denen 13 konserviert und notwendig für die Aktivität des Enzyms sind. Der hydrophobe Grund der Tasche wird durch die Reste Tyr93/55 (*S. cerevisiae/E. coli*), Lys154/104 und Tyr192/141 aufgebaut und von den positiv geladenen Resten Lys56/29, Arg78/43 und Lys193/142 umgeben. Gegenüber diesem positiv geladenen Kluster liegen Reste mit negativ geladenen Seitenketten, Glu48/20, Glu58/31, Asp115/65, Asp117/67, Asp120/70, Asp147/97 und Asp152/102. Fünf dieser Reste sind an der Koordination der Metallionen beteiligt, die für Substratbindung und -hydrolyse benötigt werden. Asp115/65, Asp120/70 und Asp152/102 koordinieren Mn^{2+} an der Stelle M1, die verbleibenden drei Koordinationsstellen sind von Wassermolekülen besetzt, so daß das Metallion oktaedrisch koordiniert wird. Die Koordination des zweiten Mn^{2+} -Ion an Stelle M2 wird durch Asp120/70 und fünf Wassermoleküle vermittelt. Die Bindung von Mn^{2+} in *S. cerevisiae* an den Stellen M3 (Glu58) und M4 (Asp147 und Asp152) erfolgt zusammen mit dem Substrat (Harutyunyan et al., 1996; Heikinheimo et al., 1996; Harutyunyan et al., 1997).

2.2.3.2. Oligomerisierung

Die oligomere Organisation des bakteriellen Enzyms und der PPase aus Hefe unterscheiden sich deutlich. Während das Hefeenzym ein Dimer (32 kDa/Monomer) bildet, liegt das prokaryotische Enzym als Homohexamer (20 kDa/Monomer) vor und wird als Dimer aus Trimeren beschrieben (Kankare et al., 1994; Oganessyan et al., 1994). Diese Organisation stabilisiert das kleinere bakterielle Enzym durch die Abschirmung eines größeren Teils der Oberfläche gegenüber dem Lösungsmittel (Teplyakov et al., 1994; Salminen et al., 1996) und erhöht dessen Substratbindungsrate (Velichko et al., 1998). Während die Intermonomerkontakte durch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt werden, sind die Intertrimerkontakte unterschiedlicher Natur. Dazu zählen ionische und hydrophobe

Wechselwirkungen, die von C-terminalen Resten der α -Helix A vermittelt werden, was gleichzeitig das aktive Zentrum stabilisiert. Wasserstoffbrückenbindungen, sowie die Einlagerung eines Mg^{2+} -Ions an der Trimer-Trimer Kontaktfläche stabilisieren das Hexamer (Harutyunyan et al., 1996b; Kankare et al., 1996; Kankare et al., 1996b; Harutyunyan et al., 1997; Velichko et al., 1998; Efimova et al., 1999).

Das Dimer der PPase aus *S. cerevisiae* wird hauptsächlich durch *stacking* von Seitenketten aromatischer Aminosäuren gebildet und durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Daran beteiligt sind die Reste Arg51 und Arg51', Trp52 und Trp52', His87 und His87', Arg277', Gly125 und Glu126, Trp279 und Trp279'. Die Art der Kontakte erinnert dabei an das *base stacking* von DNA (Heikinheimo et al., 1996).

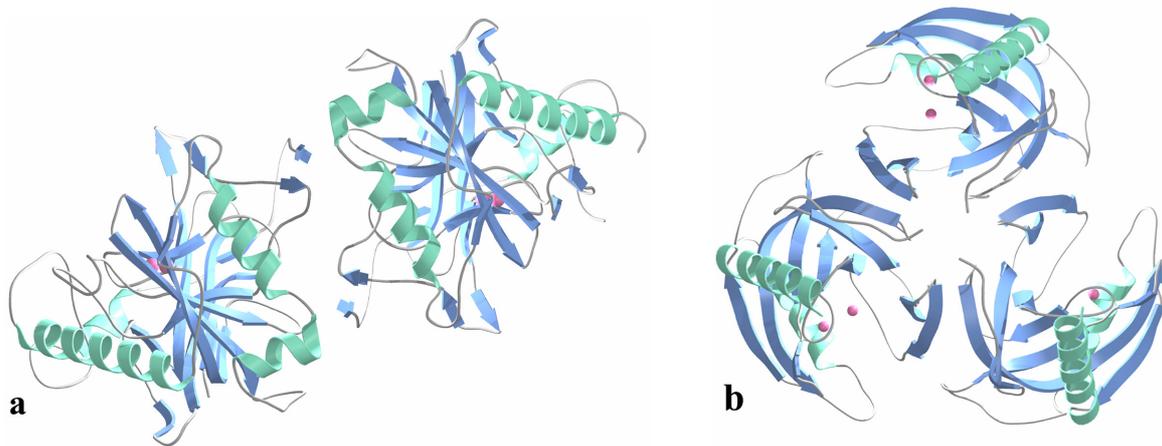


Abb. 5: Ribbondarstellung der oligomeren Organisation löslicher anorganischer PPasen des Typs I
Abgebildet ist das Dimer der PPase aus *S. cerevisiae* im Komplex mit Mn(II) (a) sowie das Trimer der PPase aus *E. coli* im Komplex mit Mg(II) (b). β -Faltblätter sind blau, α -Helices türkis dargestellt. Die Positionen der Ionen sind durch pinkfarbene Kugeln gekennzeichnet.

Die Dimerisierung des Enzyms vermittelt eine stabilere Koordination der Metallcofaktoren und des Substrats, während andererseits gleichzeitig durch Bindung der Ionen, des Produkts oder von Substratanaloga die Interaktionen zwischen den Untereinheiten verstärkt werden.

Die Mutation von in *S. cerevisiae* an der Dimerisierung beteiligten Resten hat gezeigt, daß Trp52 den größten Beitrag zur Stabilisierung des Dimers leistet, während Arg51 durch die geladene Seitenkette zusätzlich eine wichtige Rolle für den Erhalt der Gesamtstruktur spielt. Mg^{2+} stimuliert die Bildung des Dimers. Aufgrund der zentralen Position von His87 und His87' im Zentrum der Kontaktfläche, die durch eine Wasserstoffbrücke verbunden sind,

hängt die Stabilität des Dimers auch vom pH-Wert des Lösungsmittels ab (Salminen et al., 2002).

2.3. RÖNTGENSTRUKTURANALYSE VON PROTEINEN

2.3.1. Überblick

In der Zelle bilden Proteine neben Nukleinsäuren eine funktionell heterogene Klasse von Makromolekülen. Die Aufklärung ihrer dreidimensionalen Strukturen bietet die Möglichkeit, biochemische Prozesse auf molekularer Ebene nachzuvollziehen. Da die erreichbare Auflösung mikroskopischer Techniken jedoch durch die Wellenlänge limitiert ist, wird zur Auflösung atomarer Distanzen Strahlung im spektralen Bereich der Röntgenstrahlung eingesetzt. Linsen, wie sie in der Lichtmikroskopie zur Erzeugung von Bildern eines Objekts verwendet werden, sind für Röntgenstrahlung nicht verfügbar. Statt dessen werden Interferenzeffekte genutzt, die durch die Beugung von Röntgenstrahlen an einer dreidimensionalen periodischen Anordnung, einem Kristall, entstehen.

Um die Struktur bei atomarer Auflösung zu bestimmen, kommen bislang hauptsächlich zwei Methoden zur Anwendung, die Diffraktion von Röntgenstrahlung an Kristallen und die Kernresonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR). Da sich bei der Methode der NMR die zu untersuchenden Proteine in Lösung befinden, können neben der Aussage über ihre Struktur auch Informationen über ihre Dynamik erhalten werden. Allerdings ist diese Methode auf Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von bis zu etwa 35 kDa beschränkt, so daß zur Strukturanalyse höhermolekularer Proteine hauptsächlich die Röntgenstrukturanalyse eingesetzt werden muß.

Während bereits 1840 Proteinkristalle dokumentiert wurden (Hünefeld, 1840), wurde das erste Diffraktionsbild eines Proteinkristalls erst im Jahr 1934 aufgenommen (Bernal & Crowford, 1934). Es dauerte bis 1960, die ersten Strukturen von Proteinen, Myoglobin (Kendrew et al., 1960) und Hämoglobin (Perutz et al., 1960) zu lösen. Seither wurde eine zunehmend größere Zahl von Proteinkristallstrukturen veröffentlicht, was vor allem auf die Entwicklung leistungsfähigerer Rechner und Programme, sowie neue molekularbiologische Methoden zurückzuführen ist. Mitte Juli 2003 waren in der Proteindatenbank von Brookhaven

21838 Proteinstrukturen hinterlegt, von denen nur 15 % durch NMR, aber 85 % durch Röntgenstrukturanalyse und andere Methoden bestimmt worden waren.

Die Röntgenkristallographie beeinflusst wiederum molekularbiologische Arbeiten, indem sie geeignete Positionen für Mutagenese aufzeigt und ermöglicht das gezielte Design von biologisch aktiven Kleinmolekülen, was vor allem für die Entwicklung neuer Pharmazeutika, Insektizide, Pestizide und Herbizide von Interesse ist.

Die zur Lösung einer Proteinstruktur nötigen Schritte umfassen im allgemeinen (a) die Isolierung und Reinigung des zu untersuchenden Proteins, (b) die Kristallisation des homogenen Materials, (c) die Datensammlung und -auswertung, (d) die Lösung des Phasenproblems, (e) die Berechnung der Elektronendichteverteilung, (f) die Erstellung eines Strukturmodells und (g) die Verfeinerung der Modellparameter.

Im Folgenden soll eine kurze Einführung in die Grundprinzipien der Röntgenstrukturanalyse gegeben werden. Für eine detaillierte Einführung in die Thematik sei auf die folgenden Lehrbücher verwiesen: Blundell & Johnson (1976), Stout & Jensen (1989) und Drenth (1994).

2.3.2. Kristallisation

Grundvoraussetzung zur Bestimmung von Strukturen mittels Röntgenkristallographie ist die Erzeugung von geeigneten Proteinkristallen (McPherson, 1990). Dazu ist eine Reihe geeigneter Methoden beschrieben, von denen der Dampfdiffusion im allgemeinen die größte Bedeutung zukommt. Die konzentrierte Proteinlösung wird mit einem Fällungsmittel (Präzipitans) versetzt und in einem abgeschlossenen System oberhalb eines Reservoirs dieses Fällungsmittels mit höherer Konzentration angebracht. Der Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Lösungen führt dazu, daß Wasser mittels Dampfdiffusion aus dem Tropfen der Proteinlösung in das Reservoir übertritt, so daß die Konzentration des Fällungsmittels sowie des Proteins im Tropfen gleichmäßig bis in den Bereich der Übersättigung zunimmt. Sind bestimmte Konzentrationen erreicht, erzwingen diese intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkungen, im günstigsten Fall die Anordnung zum Kristallisationskeim (aneinander gelagerte Proteinmoleküle). An diesen Keimen kann ein definiertes Kristallwachstum erfolgen, indem sich weitere Moleküle geordnet anlagern. Geeignete Fällungsmittel sind anorganische Salze, organische Lösungsmittel oder Polyethylenglykole mit unterschiedlicher Molekularmasse. Neben der Art des Fällungsmittels, seiner Konzentration, sowie der Proteinkonzentration und -reinheit ist das

Wachstum von Proteinkristallen auch von anderen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert und Salzkonzentration abhängig. Dadurch stellt die Kristallisation ein vieldimensionales Problem dar, welches nicht analytisch, sondern nur experimentell für jedes Protein gelöst werden kann. Zum Testen einer größeren Anzahl von Bedingungen folgt man den Prinzipien des *sparse matrix sampling* (Carter & Carter, 1979; Jancarik & Kim, 1991). Sind aussichtsreiche Kristallisationsbedingungen gefunden, können diese in systematischen Versuchsreihen verfeinert werden.

2.3.3. Kristalle

Kristalle sind anisotrope, homogene Körper, die aus einer regelmäßigen dreidimensionalen Anordnung von Atomen bestehen und deren kleinste Einheit die sogenannte Elementar- oder Einheitszelle ist. Diese wird durch die Länge ihrer Achsen a , b und c , und der durch sie eingeschlossenen Winkel α , β und γ eindeutig definiert. Durch Translation um die Einheitsvektoren \vec{a} , \vec{b} und \vec{c} können die Bausteine des Kristalls ineinander überführt werden. Neben der Translation können Kristalle weitere Symmetrieelemente wie Spiegelebenen, Drehachsen, Inversionszentren, Gleitspiegelebenen und Schraubenachsen aufweisen.

Die Elementarzelle stellt ein mathematisches System dar, mit dessen Hilfe der Kristall in identische Komponenten eingeteilt wird, so daß nur wenige Parameter nötig sind, um die Anordnung der Atome im Kristall zu beschreiben. Um die Struktur des Kristalls zu bestimmen ist es also ausreichend, die Struktur der Elementarzelle zu beschreiben. Je kleiner das Molekül ist, umso kleiner kann die Elementarzelle sein, aber umso mehr Zellen liegen in einem Kristall gegebener Größe vor. Damit kann die in der Regel höhere Intensität der Diffraktion von Kristallen kleinerer Moleküle erklärt werden.

Jede Elementarzelle des Kristalls kann durch einen Punkt ersetzt werden, so daß ein Gitter aus Punkten entsteht, das sich in allen drei Richtungen wiederholt, wie es für den Inhalt der Elementarzelle im Kristall gilt. In den Kristall können Gitterebenen so gelegt werden, daß sie verschiedene Punkte des Kristallgitters enthalten. Wenn man annimmt, daß die Achsen der Elementarzelle parallel zu den Kristallachsen verlaufen, schneiden die Gitterebenen die Achsen der Elementarzelle in $x=a/h$, $y=b/k$ und $z=c/l$ (Friedrich et al., 1912). Die ganzzahligen Variablen h , k und l werden als Miller-Indizes bezeichnet. Weist das Kristallgitter eine Symmetrie auf, liegt jedes Teilchen entsprechend der jeweiligen Symmetrieelemente

mehrmals in der Elementarzelle vor. Die Elementarzelle enthält dann mehrere asymmetrische Einheiten.

Aus diesem kleinsten Teil der Elementarzelle, der asymmetrischen Einheit, kann durch Anwendung der Symmetrieoperationen Drehung, Spiegelung und Inversion die gesamte Elementarzelle aufgebaut werden. Aus den möglichen Kombinationen der Symmetrieoperationen ergeben sich 32 Punktgruppen. Durch die zusätzliche Translationssymmetrie in Kristallen (14 Bravaisgitter) entstehen aus den 32 Punktgruppen die 230 kristallographischen Raumgruppen in sieben Kristallsystemen (triklin, monoklin, orthorhombisch, tetragonal, trigonal, hexagonal und kubisch). Weil Spiegelebenen und Inversionszentren in biologischen Makromolekülen aufgrund der Chiralität ihrer Bausteine jedoch nicht möglich sind, reduziert sich die Anzahl der möglichen Raumgruppen auf 65 „biologische“ Raumgruppen.

Moleküle, die über eine kristallographische Symmetrie verwandt sind, sind identisch und weisen auch eine identische kristallographische Umgebung auf. Auf der anderen Seite muß die Anzahl der asymmetrischen Einheiten nicht mit der Zahl der Moleküle pro Elementarzelle übereinstimmen. Folglich können auch mehrere Moleküle pro asymmetrischer Einheit vorliegen. Ist dies der Fall, sind die Moleküle nicht identisch und für sie gilt eine nicht-kristallographische Symmetrie (*non crystallographic symmetry, ncs*). Diese Theorie bezieht sich jedoch auf einen perfekten Kristall, wobei allerdings gerade Makromoleküle keine perfekten Kristalle bilden. Die Elementarzellen und ihr Inhalt sind nicht absolut identisch, weil die kleinen Blöcke im Gesamtverband geringfügig gegeneinander verkippt und verschoben sind, wodurch die ideale Periodizität gestört wird. Diese Verkipfung wird als Mosaikbreite bezeichnet und kann etwa $0,1^\circ$ bis mehrere Grad betragen. Interferenz der gebeugten Röntgenstrahlung findet nur innerhalb dieser Blöcke statt.

Proteinen ist es durch ihre polyvalente Oberfläche möglich, unterschiedliche Anordnungen mit nur geringen energetischen Unterschieden einzunehmen, so daß die komplett reguläre ideale Ausrichtung der Moleküle im Kristall unwahrscheinlich ist. Dies äußert sich in einem makroskopischen Polymorphismus von Kristallformen und in der Existenz unterschiedlicher Elementarzellen gleicher Proteine. Diese Nicht-Isomorphie von Proteinkristallen stellt daher auch ein Problem bei der Phasenbestimmung mit der Methode des Isomorphen Ersatzes (s. 2.3.8.2.) dar.

Im Vergleich zu Kristallen kleinerer Moleküle ist für Proteinkristalle eine lockerere Packung der Moleküle charakteristisch, die durch den hohen Solvensgehalt der Kristalle (30 bis 70 %) verursacht wird. Die Kristalle werden deshalb meist nur durch wenige Kristallkontakte

zusammengehalten. Die Proteine sind im Kristall von einer Solvatationshülle umgeben, die teilweise geordnet ist, während die Kanäle, die durch die lockere Packung der Proteine entstehen, mit dem Kristallisationspuffer gefüllt sind. Diese Lösungsmittelkanäle können dazu genutzt werden, Substrate, Inhibitoren oder Schweratomverbindungen in den Kristall einzubringen.

2.3.4. Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen

Trifft Röntgenstrahlung auf einen Kristall, regt ihr oszillierendes elektrisches Feld die Elektronen der Atomhüllen zu Schwingungen an, die in fester Phasenbeziehung zur anregenden Welle stehen. Die Elektronen wirken als oszillierende Dipole und emittieren ihrerseits Sekundärstrahlung gleicher Frequenz, die allerdings gegenüber der einfallenden Strahlung um 180° phasenverschoben ist (elastische/kohärente Streuung oder Thomson-Streuung) (Thomson, 1903). Die einzelnen Strahlen interferieren miteinander, so daß es in Abhängigkeit ihrer Phasendifferenz zur Auslöschung (destruktive Interferenz) oder Verstärkung (konstruktive Interferenz) kommt. So ergibt sich ein charakteristisches Interferenzbild, wenn Röntgenstrahlung auf ein geordnetes, kristallines System trifft. Das Reflexmuster wird dabei durch die Gittersymmetrie, die Intensität der einzelnen Reflexe durch die Anordnung der Streuzentren in der Elementarzelle bestimmt, wodurch man Informationen über die Elektronendichteverteilung im Kristall erhält.

Bragg konnte 1913 zeigen, daß sich die von einem Kristall gestreute Strahlung so verhält, als ob sie an den Gitterebenen reflektiert worden wäre. Ein unter dem Einfallswinkel θ einfallender Röntgenstrahl der Wellenlänge λ wird an Netzebenen mit Abstand d zueinander gestreut. Erfüllt der Einfallswinkel die Bragg'sche Gleichung, so ist der Gangunterschied ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge. Es tritt konstruktive Interferenz auf, die als Reflex detektiert werden kann.

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin\theta_{hkl}$$

- n: Reflexordnung ($n = 1, 2, 3, \dots$)
- d: Abstand der Netzebenenscharen in Å
- θ : Winkel zwischen einfallendem Strahl und Netzebenenschar
- λ : Wellenlänge der eingestreuerten Strahlung

Bei allen übrigen Gangunterschieden führt die Vielzahl der Gitterebenen zu einer vollständigen Auslöschung der gestreuten Strahlung.

Wenn Röntgenstrahlung auf einen Kristall trifft, wird also nur dann kohärente Beugung auftreten, wenn das Bragg'sche Gesetz erfüllt ist. Bei monochromatischer Röntgenstrahlung und einer bestimmten Orientierung des Kristalls erfüllen nur wenige Bragg-Reflexe diese Bedingung. Aus diesem Grund wird der Kristall über einen gewissen Bereich gedreht, so daß mehr gestreute Strahlen die Reflektionsbedingung erfüllen. Zusätzlich kann ein Streuvektor \vec{S} konstruiert werden, der senkrecht auf der „reflektierenden“ Gitterebene steht und dessen Länge durch

$$|\vec{S}| = \frac{2 \sin \theta_{hkl}}{\lambda}$$

gegeben ist. Aus den Abständen der Gitterebenen d_{hkl} des Kristallgitters läßt sich ein reziprokes Gitter konstruieren. In diesem liegt der Punkt P (hkl) im Abstand $1/d_{hkl}$ vom Ursprung in einer Richtung, die orthogonal zu den jeweiligen Gitterebenen ist. Die Achse a^* des reziproken Gitters steht dann senkrecht auf der (100) Ebene des Kristallgitters, in der dessen a -Achse verläuft. Jedem Satz von Kristallgitterebenen, die durch die Miller-Indizes h , k und l charakterisiert sind, also jedem Reflex (hkl), entspricht ein Punkt (hkl) des reziproken Gitters. Die Endpunkte der Vektoren $\vec{S}(hkl)$ fallen also mit den Gitterpunkten des reziproken Gitters zusammen. Daher kann mit Hilfe des reziproken Gitters die Richtung der gebeugten Strahlen bestimmt werden.

Die Ewald-Konstruktion (Ewald, 1921) überträgt die Bragg'schen Reflektionsbedingungen in den reziproken Raum. Um den Kristall an der Stelle K wird eine Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ gelegt. Der Durchstoßpunkt O des ungestreuten Röntgenstrahls durch die Ewaldkugel definiert den Nullpunkt des reziproken Gitters. Ein Gitterpunkt P des reziproken Gitters, der auf der Oberfläche der Ewald-Kugel liegt, erfüllt die Bragg'sche Reflektionsbedingung, so daß der Reflex detektiert werden kann. Wenn der Kristall gedreht wird, dreht sich mit ihm das Kristall- und damit auch sein reziprokes Gitter, so daß nacheinander verschiedene Punkte des reziproken Gitters mit der Kugeloberfläche zusammenfallen.

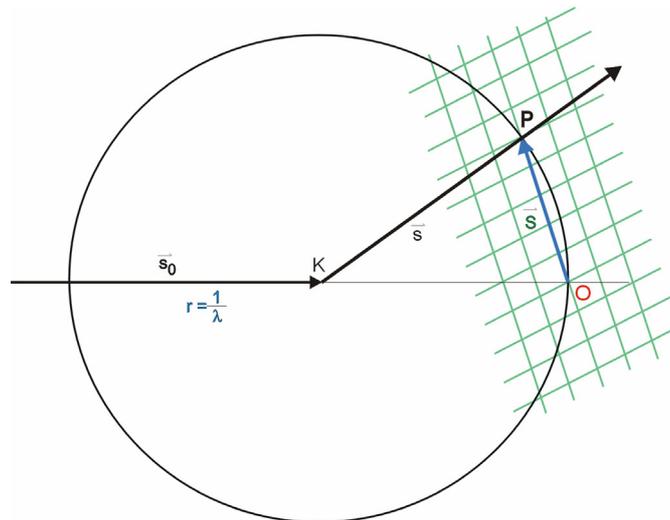


Abb. 6: Ewald-Konstruktion (Ewald, 1921) Die Richtung des Primärstrahles s_0 geht vom Drehpunkt des Kristalles K zum Ursprung O des reziproken Gitters. Um den Kristall wird eine Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ gezeichnet. Der gebeugte Strahl wird durch den Vektor s und ein reziproker Gittervektor durch den Vektor S repräsentiert.

2.3.5. Streuung an Atomen

Ein Röntgenstrahl wird an der Elektronenwolke eines Atoms in Abhängigkeit von der Anzahl der Elektronen und ihrer Position in der Elektronenwolke gestreut. Hierbei ist $\phi(\vec{r})$ die Elektronendichte am Ort \vec{r} der Elektronenwolke. Der atomare Formfaktor ist damit definiert als

$$f = \int \phi(\vec{r}) \exp[2\pi i \vec{r} \cdot \vec{S}] d\vec{r}$$

wobei über den gesamten Raum integriert wird.

Durch die Annahme, daß die Elektronenwolke eines Atoms kugelsymmetrisch ist, hängt der atomare Formfaktor nicht von der Richtung des Streuvektors \vec{S} , sondern nur von dessen Länge ab. Der Betrag des Streuvektors hängt wiederum vom Streuwinkel θ ab, so daß ein Zusammenhang zwischen atomarem Formfaktor und Winkel besteht. Je größer der Streuwinkel, d. h. je höher die Auflösung, desto geringer ist die Intensität der Reflexe.

In der Elementarzelle mit n Atomen berechnet sich deren gesamte Streuung als Summe der atomaren Formfaktoren multipliziert mit dem jeweiligen Phasenwinkel des betrachteten Atoms. Diese wird als Strukturfaktor bezeichnet:

$$\vec{F}(\vec{S}) = \sum_{j=1}^n f_j \exp[2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{S}]$$

2.3.6. Temperaturfaktor

Die Größe der Elektronenwolke eines Atoms ist temperaturunabhängig, allerdings schwingen die Atome statistisch um ihre Gleichgewichtsposition. Röntgenstrahlen treffen also in aufeinanderfolgenden Elementarzellen nicht auf identische Atome an exakt den gleichen Positionen. Daher muß der atomare Formfaktor der Atome mit einem temperaturabhängigen Korrekturfaktor T_{iso} multipliziert werden. Im einfachen Fall der isotropen Bewegung ist die Komponente für jeden Reflex (hkl) gleich und der Korrekturfaktor ergibt sich aus

$$T(iso) = \exp\left[-B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}\right]$$

Der Temperaturfaktor B ist mit der mittleren quadratischen Auslenkung der Atomschwingung verknüpft

$$B = 8\pi^2 \cdot \overline{u^2}$$

Ein Temperaturfaktor von $B = 30 \text{ \AA}^2$ würde also einer mittleren quadratischen Auslenkung $\overline{u^2}$ der atomaren Schwingung von $0,62 \text{ \AA}$ um eine Gleichgewichtsposition entsprechen.

Proteinstrukturen sind also nicht vollkommen starr, sondern flexibel, was zu einem gewissen Grad der Unordnung im Kristall führt. Durch diese Fehlordnung im kristallinen Gitter beugen Proteinkristalle Röntgenstrahlung nur bis zu einem bestimmten Winkel θ_{max} , d. h. die Intensität des Beugungsbildes nimmt ab diesem Winkel stark ab.

Der entsprechende Abstand der Gitterebenen d_{\min} ergibt sich aus dem Bragg'schen Gesetz und wird als Auflösung einer Kristallstruktur bezeichnet:

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta_{\max}}$$

2.3.7. Berechnung der Elektronendichte

Weil Röntgenstrahlen an der Atomhülle der Atome gebeugt werden, ergeben sich aus der Strukturanalyse nicht sofort die genauen Atompositionen, sondern die dreidimensionale Verteilung der Elektronen der Atome (Elektronendichteverteilung). Diese Elektronendichteverteilung ρ an jedem Punkt (x,y,z) in einem Kristall läßt sich aus der Strukturfaktoramplitude $F(h,k,l)$, die proportional zur Quadratwurzel der gemessenen Intensität I für den Reflex (h,k,l) ist, sowie der entsprechenden Phase ϕ_{hkl} und dem Volumen der Elementarzelle durch inverse Fourier-Transformation berechnen:

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

Der Gangunterschied ϕ_{hkl} eines Reflexes ist allerdings einer direkten Messung nicht zugänglich, weil aus den integrierten Reflexintensitäten nur die Strukturfaktoramplituden $|F_{hkl}|$ bestimmt werden können. Dies wird in der Proteinkristallographie als Phasenproblem bezeichnet.

2.3.8. Lösung des Phasenproblems

Im Unterschied zur direkten Bestimmung der Strukturfaktoramplitude aus den gemessenen Reflexintensitäten gibt es keine Möglichkeit, die zur Strukturanalyse benötigten Phasenwinkel experimentell zu ermitteln. Deshalb wurden in der Röntgenstrukturanalyse vier Methoden entwickelt, um diese Phaseninformation zu erhalten.

1. Methode des Molekularen Ersatzes (*Molecular Replacement*, MR) (Hoppe, 1957a; Hoppe, 1957b; Rossmann & Blow, 1962; Huber, 1965), bei der die Phaseninformation aus einer ausreichend ähnlichen Kristallstruktur erhalten wird.

2. Methode des Isomorphen Ersatzes (*Multiple Isomorphous Replacement*, MIR oder *Single Isomorphous Replacement*, SIR) (Green et al., 1954), bei der Schwermetallatomderivate des Proteins im Kristall erzeugt werden.
3. Methode der Multiplen Anomalen Dispersion (MAD) (Hendrickson, 1991), bei der Diffraktionsdaten eines Kristalls bei verschiedenen Wellenlängen gemessen werden. Dazu müssen Atome mit ausreichendem anomalen Streubeitrag (z.B. Hg oder Se) in das Protein eingebracht werden. Die Messung der Beugungsdaten erfordert genau einstellbare Wellenlängen (z.B. Synchrotronstrahlung).
4. Direkte Methoden (Hauptmann & Karle, 1953), die bei der Phasenbestimmung von Kleinmolekülstrukturen angewandt werden, allerdings noch nicht auf Proteinstrukturen übertragbar sind.

2.3.8.1. Molekularer Ersatz

Bei der Methode des Molekularen Ersatzes (*Molecular Replacement*, MR) kann man die notwendige Phaseninformation durch eine Patterson-Suche erhalten, bei der ein Atommodell einer bereits bekannten Kristallstruktur eingesetzt wird, sofern dies eine ausreichende Ähnlichkeit zu dem zu untersuchenden Protein aufweist. 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} kann eine Elektronendichtekarte (Patterson-Dichte) $P(x,y,z)$ für die zu bestimmende Kristallstruktur berechnet werden. Zur Positionierung des Suchmodells wird die Patterson-Funktion eingesetzt:

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

Diese stellt einen Satz von interatomaren Vektoren dar, deren Beträge und Richtungen den Abständen und Orientierungen zwischen den Atomen in der Elementarzelle entsprechen. Da sich in der Regel Raumgruppe und Orientierung des Suchmodells in der Elementarzelle von der zu untersuchenden Struktur unterscheiden, muß das Suchmodell korrekt in der neu bestimmten Elementarzelle der unbekannt Struktur positioniert werden. Dieses sechsdimensionale Suchproblem läßt sich in jeweils drei Rotations- und Translationsvariable

zerlegen. Die beiden Sätze von Patterson-Vektoren aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden F_{obs} und aus den berechneten F_{calc} der Modellatomkoordinaten werden in einer Produktfunktion korreliert. Dabei wird der eine Vektorensatz in einer Rotationsfunktion in kleinen Winkelschritten um alle drei Achsen gegen den zweiten Satz gedreht, so daß die Vektoren innerhalb des Moleküls (Selbstvektoren) zur Deckung gebracht werden. Nach der korrekten Orientierung erfolgt die Positionierung durch eine anschließende Translation in allen drei Raumrichtungen der Elementarzelle, wozu die Kreuzvektoren zwischen den verschiedenen Molekülen eingesetzt werden. Durch Fourier-Transformation lassen sich anschließend die Phasen berechnen.

Als Faustregel gilt, daß diese Methode funktioniert, wenn die Homologie der Aminosäuresequenzen der beiden Proteine hoch und die r.m.s. Abweichung der $\text{C}\alpha$ Positionen der zwei Strukturen $\leq 1 \text{ \AA}$ ist.

2.3.8.2. Isomorpher Ersatz

Bei der Methode des Isomorphen Ersatzes werden ein Datensatz eines Proteinkristalls (NATI) und in der Regel mehrere Datensätze unabhängiger isomorpher Schweratom-Derivate (DERI) der Kristalle aufgenommen. Die dazu verwendeten Derivat-Kristalle müssen dabei eine möglichst gute Kristallisomorphie, sowie die geordnete Bindung der Schweratome aufweisen. In Näherung wird angenommen, daß die Differenzen der Strukturfaktoramplituden (ΔF) von DERI und NATI auf die Differenzen der Strukturen, d. h. also die zusätzlichen Schweratome, zurückzuführen sind. Eine aus ΔF berechnete Patterson-Synthese sollte also nur die interatomaren Distanzvektoren der Schweratome beinhalten und deshalb durch ein geeignetes Schweratommodell interpretierbar sein, vorausgesetzt, die Anzahl der gebundenen Schweratome ist nicht zu hoch.

Durch Vergleich zwischen Nativ-, Derivat- und Differenzstrukturfaktoramplituden mit den komplexen Struktur Faktoren aus dem Schweratommodell können initiale Phasenwinkel für die Proteinstruktur Faktoren bestimmt werden. In manchen Fällen lassen sich bereits mit einem Derivat ausreichend genaue Proteinphasen bestimmen (*Single Isomorphous Replacement*, SIR). Meistens sind jedoch mindestens zwei unabhängige Schweratom-Derivate nötig (*Multiple Isomorphous Replacement*, MIR).

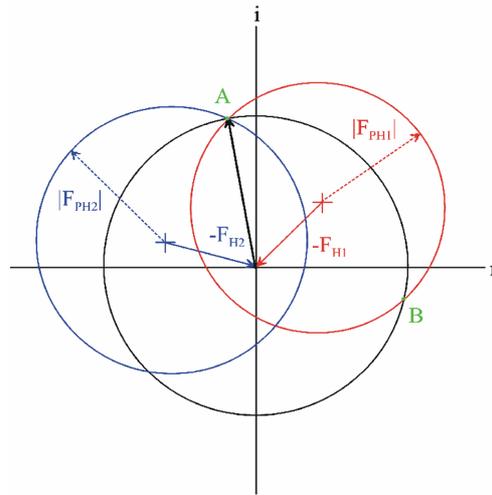


Abb. 7: Harkerkonstruktion (Harker, 1956) Der schwarze Kreis mit Radius FP schneidet im Falle eines Derivates (FPH1) dessen Kreis (rot) an zwei Punkten A und B, so daß der Phasenwinkel nicht eindeutig bestimmt werden kann. Erst ein weiteres Derivat (FPH2) (blau) hebt diese Unbestimmbarkeit auf. Es ergibt sich ein Schnittpunkt (A) für alle drei Kreise, der einen eindeutigen Phasenwinkel markiert.

2.3.8.3. Multiple Anomale Dispersion (MAD)

Bei der Bestimmung von Proteinphasen durch Multiple Anomale Dispersion (MAD) wird der anomale Streubeitrag von Schweratomen in Proteinkristallen ausgenutzt. Dazu wird Röntgenstrahlung mit variabler Wellenlänge (Synchrotronstrahlung) an der spezifischen Absorptionskante der Schweratome verwendet. In der Nähe dieser Absorptionskante des Elementes findet keine elastische Streuung der Elektronen statt. Wechselwirkung der Synchrotronstrahlung mit dem Atomkern, durch Ionisation eines Elektrons aus der K-Schale, bedingt eine Phasenverschiebung (anomale Streuung oder Dispersion), die sich von der Phasenverschiebung elastischer Streuung (180°) unterscheidet. Der Atomformfaktor ist damit nicht mehr länger eine reelle, sondern eine komplexwertige Zahl. Dieses bedingt, daß die Friedel-Paare F_{hkl} und F_{-h-k-l} (Reflexe mit identischen Strukturformfaktoramplituden und Phasenwinkeln mit umgekehrten Vorzeichen) weder betragsmäßig noch im Betrag ihres Phasenwinkels identisch sind. Die Strukturformfaktoren F_{hkl} und F_{-h-k-l} sind also keine komplexkonjugierten Zahlen mehr. (s. Abb. 8). Dadurch kann aus den Amplitudendifferenzen (Bijvoet-Differenzen) dieser Reflexe eine Patterson-Dichte errechnet werden, aus der sich ein Modell der Substruktur aller bei einer bestimmten Wellenlänge anomal streuenden Atome erstellen läßt.

2.3.9. Bestimmung der Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit

Nach Matthews (Matthews, 1968) kann die Bestimmung der Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit ohne Kenntnis der Kristalldichte vorgenommen werden. Dabei wird die statistische Beziehung zwischen der Molmasse eines Proteins und dem Elementarzellvolumen ausgenutzt. Der Packungsparameter V_M beschreibt das Kristallvolumen pro Proteinmasse und liegt im allgemeinen zwischen Werten von 1,8 und $4,5 \text{ \AA}^3/\text{Da}$. Das Maximum der Verteilung liegt bei etwa $2,4 \text{ \AA}^3/\text{Da}$. Proteine mit höherer Molmasse sowie Membranproteine besitzen häufig aufgrund ihrer weniger dichten Packung einen größeren Packungsparameter.

$$V_M = \frac{V_{EZ}}{M_r \cdot z \cdot n}$$

V_{EZ} : Elementarzellvolumen in \AA^3

M_r : Molekularmasse in Da

z : Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit

n : Zähligkeit der allgemeinen Punktlage

Bei Kenntnis von V_M kann der Solvensgehalt berechnet werden. Dieser liegt bei Proteinkristallen meist zwischen 30 und 70 %.

$$\chi = \left(1 - \frac{1,23}{V_M}\right) \cdot 100$$

χ : Solvensgehalt in %

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1. MATERIAL

3.1.1. Chemikalien und Arbeitsgeräte

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien von den Firmen Aldrich, Biomol, BioRad, Clontech, Difco, Fluka, Invitrogen, Merck, National Diagnostics, Pharmacia, Qiagen, Roche, Roth, Serva, Sigma und Stratagene eingesetzt. Der Reinheitsgrad entsprach dabei mindestens *pro analysi*.

Die benutzten Geräte und Materialien stammten von folgenden Firmen:

Amersham pharmacia biotech, Freiburg	FPLC-Chromatographiesystem SMART- Chromatographiesystem ÄKTA- Chromatographiesystem Flachbrettschreiber
Amicon, Beverly, MA, USA	Centricon- und Centriprep-Ultrafiltrationsröhrchen
Bachofer, Reutlingen	Vacuum Concentrator
Beckmann, München	DU 7500 Spektrophotometer Kühlzentrifuge J2-21 mit den Rotoren JA-10, JA-20 Kühlzentrifuge J-6M/E Kühlzentrifuge Avanti J-25
Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Spannungsquelle 1420A Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell
Charles Supper Co., Natick, MA, USA	MVD/24 Kristallisationsplatte
Eppendorf Gerätebau, Hamburg	Original Eppendorf Reaktionsgefäße Zentrifuge 5415C
Harvard-Dental GmbH, Berlin	Dentalwachs
Fa. G. Heinemann, Schäßbisch Gmünd	Branson Sonifier Modell 250
Heraeus Christ, Osterode	Minifuge 2
Huber Diffraktionstechnik, Rimsting	Goniometerkopf
Infors AG, Bottmingen, Schweiz	Schüttelinkubator RKF-125
MarResearch, Hamburg	Imageplate Detektor
Mettler Toledo, Gießen	GB2002 und PC4400 Laborwaagen
Millipore GmbH, Eschborn	PVDF-Membran Sterilfilter als Spritzenaufsätze Millex-HA Sterilfilter
Perkin-Elmer, Weiterstadt	Spektralphotometer Lambda 17 UV/VIS
Radiometer Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark	PHM 82 Standard pH-Meter
Rigaku RU200, Tokio, Japan	Drehanodengenerator

Sarstedt, Nürnberg	Halb-Mikro-Küvetten
Sartorius AG, Göttingen	Laborwaage LC 2200 S BP211D Feinwaage
Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterrode	Kühlzentrifuge 2K15
Stratagene, Heidelberg	Robocycler Gradient 96 Elektroporator 1000 Eagle EyeII
Whatman Limited, Maidstone, Großbritannien	1MM- und 3MM-Chromatographiepapiere

3.1.2. Säulenmaterial

Amylose-Affinitätsmatrix	zur Aufreinigung von an <i>maltose binding protein</i> gekoppelten Proteinen (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)
TALON™ Non-Nickel-IMAC	zur Aufreinigung Histidin-markierter Proteine (Clontech, PaloAlto, CA, USA)
Resource Q	Anionenaustauscher (Amersham Biosciences, Freiburg)

3.1.3. Bakterienstämme

Escherichia coli Klonierungsstämme:

DH5 α	Stratagene GmbH, Heidelberg (Hanahan, 1983) <i>TetrD (mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]a</i>
TOP10	Invitrogen, Karlsruhe <i>F' mcrA $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 $\Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$</i>

Escherichia coli Expressionsstämme:

Alle Expressionsstämme wurden ursprünglich von Novagen INC., Madison, WI, USA bezogen.

BL21(DE3)	<i>F' dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal (DE3)</i>
HMS174(DE3)	<i>F' recA1 hsdR(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) Rif^R (DE3)</i>
AD494(DE3)	<i>Δara-leu7967 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR Δmal F3 F'[lac⁺(lacI^q)pro] trxB::kan (DE3)</i>

Alle Bakterienstämme sind Derivate des *E. coli* K12 Stammes. DE3-Stämme sind λ DE3 lysogen, sie tragen das Gen für die T7 RNA Polymerase unter Kontrolle des *lacUV5* Promotors. Daher sind sie zur kontrollierten Expression von Genen unter der Regulation des T7 Promotors geeignet. Die Herstellung transformationskompetenter Zellen erfolgte wie unter 3.2.3. beschrieben. Die kompetenten Zellen wurden bei -80° C gelagert.

Synechocystis sp. PCC 6803

Hierbei handelt es sich um ein einzelliges, photoautotrophes, zur N_2 -Fixierung nicht befähigtes Gram-negatives Cyanobakterium, das sich durch binäre Spaltung vermehrt.

3.1.4. Plasmide

pUC18	Klonierungsvektor mit <i>lac</i> -Promotor; Ap ^r (Yanisch-Perron et al., 1985)
pPCR Script Amp	Klonierungsvektor (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
pMAL TM -c2X	Vektor zur Klonierung und Expression von Genen als <i>maltose binding protein</i> -Fusionsprotein in <i>E. coli</i> (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)
pET14b	Vektor zur heterologen Proteinexpression in <i>E. coli</i> (Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA (Studier et al., 1990))
pCR [®] 2.1-TOPO	Klonierungsvektor mit <i>lac</i> -Promotor; Ap ^r , Km ^r (Invitrogen, Karlsruhe)

3.1.5. Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden durch die Firma TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert und in der Polymerase Kettenreaktion (PCR) eingesetzt, um die Gene für 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenasen aus *Zea mays*, *Caenorhabditis elegans* und *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu amplifizieren und in die entsprechenden Expressionsvektoren zu ligieren. Die jeweiligen Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, die zu den jeweiligen Genen komplementären Bereiche sind fett gedruckt.

Linker3*NdeI*

5'-GGAATTCCATATGGCATCAGCAGCGGAGCAAGCGGC-3'

MaisNBamHI

5'-CGCGGATCCGCCGCCGTGGCGGCGGCATCAGCAGCG-3'

Corn3BamHI

5'-CGGGATCCTATTGCTTGGCTTCAAGGGACTTCTC-3'

Linker2blunt

5'-GCATCAGCAGCGGAGCAAGCG-3'

Corn3XbaI

5'-GCTCTAGATTGCTTGGCTTCAAGGGACTTC-3'

Linker2

5'-GGAATTCCATATGGCATCAGCAGCGGAGCAAGCGGCGTTCCGCCTCGTGGGCCACC
GCAACTTCGTCCGCTTCAAC-3'

CaenoF1

5'-ATGACTACATTGACAAAGGAGCA-3'

CaenoR1

5'-TACTTAGTATTTCCATCCTTAACATTATCATAG-3'

CaenoFNdeI

5'-GGAATTCCATATGACTACATTGACAAAGG-3'

CaenoR*BglII*

5'-GAAGATCTTACTTAGTATTTCCATCCTTAACATTATCATAG-3'

CaenoRSaI

5'-ACGCGTCTGACTTACTTAGTATTTCCATCCTTAACATTATCATAG-3'

SynNNdeI

5'-GGAATTCCATATGGAAATTCGACTATCTTCA-3'

SynRBamHI2

5'-CCGGATCCTTATGGCACTTCTAACTGTTTT-3'

Die folgenden Oligonukleotide wurden zur Überprüfung der klonierten DNA-Sequenzen mittels Cycle-Sequencing (s. 3.3.3.5.) eingesetzt.

T7 Promotor Primer	5'-TAATACGACTCACTAT-3'
T7 Terminator Primer	5'-GTTTTCCCAGTCACGACGT-3'
T3 Promotor Primer	5'-CAATTAACCCTCACT-3'
<i>malE</i> Primer	5'-GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC-3'

3.1.6. Enzyme und Kits

Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs, Novagen, Roche und Stratagene bezogen. Die Kits zur Präparation und Reinigung von Plasmid DNA stammten von Qiagen. Zur Klonierung von PCR Produkten wurden Kits der Firmen Stratagene und Invitrogen benutzt.

3.1.7. Nährmedien

LB-Medium: 10 g Trypton
10 g NaCl
5 g Hefeextrakt
pH 7,0 mit NaOH eingestellt
ad 1000 ml mit ddH₂O

SOC-Medium: 2 ml 20 % (w/v) Glucose
ad 100 ml mit SOB-Medium

SOB-Medium: 20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl
10 ml 1 M MgCl₂
10 ml 1 M MgSO₄
ad 1000 ml mit ddH₂O

BG11-Medium:	Bestandteile	Endkonzentration
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,25 mM
	K ₂ HPO ₃ * 2 H ₂ O	0,18 mM
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,30 mM
	Na ₂ CO ₃	0,19 mM
	Na ₂ EDTA	2,7 µM
	Ammoniumeisencitrat (28% Fe)	30 µM
	H ₃ BO ₃	46,3 µM
	MnCl ₂ * 2 H ₂ O	9,2 µM
	ZnSO ₃ * 7 H ₂ O	0,8 µM
	Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	1,6 µM
	CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,3 µM
	CoSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 µM

3.2. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1. Anzucht von *Escherichia coli*

3.2.1.1. Flüssigkulturen

Autoklaviertes LB-Medium (Luria-Bertani Medium) wurde mit einer einzelnen Kolonie einer Plattenkultur oder bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 mit dem entsprechenden Volumen einer Flüssigvorkultur beimpft. Die Flüssigkulturen wurden, soweit nicht anders beschrieben, bei 37°C und 200-250 rpm im Schüttler inkubiert. Antibiotika zur Selektion plasmidtragender *E. coli* Zellen wurden nach Autoklavieren und Abkühlen des Mediums zugegeben. Dazu wurden folgende Endkonzentrationen im Medium eingestellt:

Ampicillin:	100 µg/ml
Carbenicillin:	100 µg/ml
Kanamycin:	15 µg/ml
Chloramphenicol:	34 µg/ml

3.2.1.2. Plattenkulturen

LB-Medium wurde mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf etwa 60°C wurde das erforderliche Antibiotikum zugegeben und je 30-35 ml in sterile Petrischalen gegossen. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4°C.

Zum Ausplattieren von Kulturen wurden 100-200 µl einer Flüssigkultur auf LB-Agar ausgestrichen. Die Anzucht der Kolonien erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37°C.

3.2.2. Anzucht von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Die Cyanobakterien wurden in BG11-Mineralmedium (Castenholz, 1988) als Flüssigkulturen angezogen. Die Anzucht der Zellen erfolgte unter nicht optimalen Bedingungen als 200 ml Flüssigkulturen in BG11-Mineralmedium bei RT und Tageslicht.

3.2.3. Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung transformationskompetenter Bakterien für die Hitzeschock-Methode erfolgte nach Hanahan (1983). 50 ml LB-Medium wurden mit 0,5 ml einer entsprechenden Vorkultur beimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C geschüttelt, dann 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend abzentrifugiert (5 min, 4000 x g, 4°C). Das Bakterienpellet wurde vorsichtig in 20 ml kalten TFB I (*Transforming buffer*) resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert, erneut abzentrifugiert und in 2 ml TFB II aufgenommen. Die Suspension wurde in Aliquots von je 100 µl nochmals 15 min auf Eis inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C.

TFB I: 30 mM Kaliumacetat/Essigsäure, pH 5,8
 10 mM CaCl₂
 100 mM RbCl
 50 mM MnCl₂
 15 % Glycerin (v/v)

TFB II: 10 mM PIPES/KOH, pH 6,5
 10 mM RbCl
 15 mM CaCl₂
 15 % Glycerin (v/v)

Beide Puffer wurden vor Gebrauch sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

3.2.4. Transformation von Bakterien mit Fremd-DNA

100 µl transformationskompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA versetzt. Dieser Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, dann 30 sec bei 42°C hitzeschockbehandelt und anschließend für weitere 2 min in ein Eisbad überführt. Nach Zugabe von 250 µl LB- bzw. SOC- oder SOB-Medium wurden die Zellen 30 min bei 37°C inkubiert, um die jeweilige Antibiotikaresistenz auszubilden. Die Kulturen wurden auf LB-Agarplatten, die das zur Selektion erforderliche Antibiotikum enthielten, ausplattiert oder direkt zum Animpfen von Expressionskulturen verwendet. Die Platten wurden ü.N. bei 37°C bebrütet.

3.2.5. Transformation durch Elektroporation

50 µl elektrokompente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in einer auf Eis gekühlten Elektroporationsküvette mit 1 µl Ligationsansatz oder Plasmid-DNA versetzt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 1600 V. Anschließend wurden die Zellen in LB-Medium aufgenommen und auf Agar-Platten ausgestrichen.

3.2.6. Heterologe Expression rekombinanter Proteine in *Escherichia coli*

Die Expression erfolgte zunächst im 1 l Maßstab in LB-Medium mit der entsprechenden Antibiotikumkonzentration. 50 ml LB-Medium wurden mit transformierten *E. coli* Zellen beimpft und ü.N. bei 37°C geschüttelt. Die Vorkulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 zum Animpfen in 1 l LB-Medium überführt und bei RT bis 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6–0,8 in einem Schüttler inkubiert. Die Induktion der Expression des rekombinanten Proteins erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG.

Optimale Expressionsbedingungen für die *Z. mays* 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase bzw. das Fusionsprotein aus 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase aus *Caenorhabditis elegans* und *maltose binding protein* wurden durch folgende Änderungen des Expressionsprotokolls erreicht:

Die Transformationsansätze wurden nicht ausplattiert, sondern sofort zum Animpfen von 50 bzw. 10 ml LB-Flüssigmedium eingesetzt und ü.N. bei 37°C im Schüttler inkubiert. Ausgehend von dieser Vorkultur wurde 1 l bzw. 100 ml LB-Medium mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 2 bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde auf RT abgekühlt und ihr pH-Wert mit HCl (37%) auf pH 5 abgesenkt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte mit 0,75 % (w/v) α-Lactose, die Expression über einen Zeitraum von 24 Stunden bei RT.

Die Zellen wurden geerntet, in Aufschlußpuffer aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Aufschlußpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

3.2.7. Herstellung von *Escherichia coli* Rohextrakten

Der Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte in einem Rosettengefäß unter Eiskühlung durch Ultraschall (MacroTip, 2 x 10 min auf Stufe 3 bei 50 % Puls-Zyklus). Die Trennung von Cytoplasma und unlöslicher Membranfraktion erfolgte durch Zentrifugation (30 min, 20000 rpm, 4°C). Das Pellet der Membranfraktion wurde in Denaturierungspuffer resuspendiert und 20 min bei 20000 rpm abzentrifugiert. Aliquots der löslichen und unlöslichen Fraktionen wurden zur Beurteilung des Expressionsniveaus auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Denaturierungspuffer: 6 M Harnstoff
 2 % (w/v) SDS
 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

3.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.3.1. DNA-Präparationen

3.3.1.1. Plasmid-DNA-Minipräparation durch QIAprep Spin Miniprep Kit

Bei dieser nach Birnboim und Doly (1979) modifizierten Methode zur Präparation von Plasmid-DNA wird die alkalische Lyse der Bakterienzellen mit der Aufreinigung der Plasmid-DNA durch Anionenaustauschchromatographie kombiniert. Diese erfolgt über die Bindung der Plasmid-DNA an eine Kieselgelmembran, während Proteine und genomische DNA durch Kaliumacetat gefällt werden.

Zellen aus 3 ml einer ü.N. gewachsenen Bakterienkultur wurden durch Zentrifugation geerntet (14000 rpm, 30 sec). Das Zellpellet wurde in 250 µl Lösung P1 resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 250 µl Lösung P2 und mehrmaliges Invertieren. Nach maximal fünfminütiger Inkubation bei RT wurden 350 µl Lösung N3 zugesetzt, die Lösung durch Invertieren gemischt und sofort zentrifugiert (14000 rpm, 10 min), um denaturierte Proteine und Nukleinsäuren zu sedimentieren. Der klare Überstand wurde auf eine Säule aufgetragen, die anschließend in einem 2 ml Gefäß 60 sec zentrifugiert wurde. Der Durchfluß wurde verworfen, die Säule zunächst mit 500 µl Lösung PB, dann mit 750 µl Lösung PE gewaschen. Um die Säule komplett zu trocknen, wurde nach dem Entfernen des

Durchflusses die Säule ein zweites Mal zentrifugiert (14000 rpm, 60 sec). Die an die Kieselgelmembran gebundene DNA wurde für 1 min bei RT mit ddH₂O eluiert und die DNA-haltige Lösung durch Zentrifugation (14000 rpm, 60 sec) in ein Reaktionsgefäß überführt.

P1: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A

P2: 200 mM NaOH
1 % SDS

N3, PB, PE: keine Herstellerangaben

3.3.1.2. Midipräparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Reinigung von Plasmid-DNA im Maßstab bis 100 µg wurde der Plasmid Midi Kit (Qiagen) verwendet. Die Methode beruht auf den gleichen Prinzipien wie unter 3.3.1.1. beschrieben. 100 ml Bakterienkultur wurden abzentrifugiert (4000 x g, 10 min, 4°C) und das Pellet in 4 ml P1 resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch 4 ml P2, der Ansatz wurde gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml P3 und Durchmischung wurden präzipitiertes Protein sowie genomische DNA abzentrifugiert (20000 x g, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde filtriert und auf eine mit QBT äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 2 x 10 ml QC gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml QF eluiert. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA mit 2-Propanol.

P1, P2: s. 3.3.1.1.

P3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

OBT: 750 mM NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % Isopropanol
0,15 % Triton X-100

QC: 1 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % Isopropanol

QF: 1,25 M NaCl
50 mM Tris/HCl, pH 8,5
15 % Isopropanol

3.3.1.3. Präparation genomischer DNA aus Cyanobakterien

Die Präparation genomischer DNA aus Cyanobakterien erfolgte nach einem Rezept von Smoker und Barnum (1988).

50 ml einer Flüssigkultur mit einem Chlorophyllgehalt von ca. 30 µg/ml wurden abgeerntet (5000 rpm, 15 min). Das Pellet wurde in 25 ml Puffer A gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 2 ml Puffer B resuspendiert, anschließend wurde das Volumen mit Puffer B auf 4 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden für 60 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von 4 ml Puffer C erfolgte eine 30minütige Inkubation bei 37°C, anschließend wurden 0,6 g Proteinase K zugefügt und weitere 30 min bei 50°C inkubiert.

Das Lysat wurde dreimal mit 6 ml Phenol (pH 7,2) und zweimal mit 6 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe des einfachen Volumens Isopropanol gefällt (30 min, -20°C). Das durch Zentrifugation (15000 rpm, 15 min) geerntete Pellet wurde mit 6 ml 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in der Speedvac getrocknet. Die DNA wurde in 200 µl H₂O resuspendiert, ihre Konzentration und Qualität durch Agarosegelelektrophorese bestimmt.

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 5 mM EDTA, pH 8,0
 5 mM NaCl

Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 50 mM EDTA, pH 8,0
 15 mg/ml Lysozym

Puffer C: 30 mM Tris/HCl, pH 8,0
 10 mM EDTA, pH 8,0
 2 % (w/v) Sarkosyl
 10 mg/ml Ribonuklease A

3.3.2. Methoden zur Nukleinsäureanalyse

3.3.2.1. Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden in Abhängigkeit von deren Größe Flachbettgelelektrophoresen mit 0,7–1 %igen Agarosegelen durchgeführt.

Agarose wurde in TAE-Laufpuffer bis zur ihrer vollständigen Auflösung gekocht. Die gelöste Agarose wurde mit H₂O wieder auf das Ausgangsvolumen gebracht und nach Abkühlen der Lösung auf 50-60°C Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,5 % zugesetzt. Die Agarose wurde in Gelkammern gegossen, mittels eines Kammes Taschen zur Aufnahme der DNA-Proben erzeugt und das Gel nach dem Erstarren mit TAE-Laufpuffer überschichtet.

Die aufzutrennenden Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen Probenpuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 90 Volt. Die Lage der DNA-Banden im Gel konnte durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=254$ nm) aufgrund der Fluoreszenz der in die DNA interkalierten Ethidiumbromidmoleküle sichtbar gemacht werden. Die Größen der DNA-Fragmente sowie ihre Konzentration wurden durch Vergleich mit einem Molekulargewichtslängenstandard bestimmt.

TAE: 40 mM Tris/HCl, pH 8,0
 20 mM Essigsäure
 1 mM EDTA

Probenpuffer (6x): 30 % (v/v) Glycerin
 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
 0,25 % (w/v) Xylencyanol

3.3.2.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das Qiaquick Gel Extraction Kit von Qiagen eingesetzt. Die Methode beruht auf der selektiven Adsorption von DNA an Glasperlen. Vogelstein und Gillespie (1979) beschrieben diese Bindung von Nukleinsäuren an Kieselgel- oder Glaspartikel. Eine DNA-haltige Lösung wurde elektrophoretisch aufgetrennt und das jeweilige DNA-Fragment enthaltende Agarosestück aus dem Gel ausgeschnitten. Das Agarosestück wurde im dreifachen Volumen seines Gewichtes Puffer QX1 aufgenommen und bei 50°C bis zur vollständigen Auflösung der Agarose inkubiert. Die Suspension wurde auf eine Qiaquick Spin Säule aufgetragen und zentrifugiert (1 min, 14000 rpm), um die DNA an die Säule zu binden. Als Waschschrte wurden erst 750 µl QX1, danach 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und abzentrifugiert. Zur Entfernung von Resten des Puffers PE wurde dieser verworfen und die Säule erneut zentrifugiert. Die DNA

wurde in einem Volumen von 20-50 μl ddH₂O durch einen weiteren Zentrifugationsschritt eluiert und ihre Qualität durch eine erneute Elektrophorese (s. 3.3.2.1.) überprüft.

QX1: 3 M NaI

4 M NaClO₄

10 mM Na₂SO₃

10 mM Tris/HCl, pH 7,0

PE: keine Herstellerangaben

3.3.2.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA-Mengen wurden anhand ihrer Bandenstärke und des Molekulargewichtes im Agarosegel unter UV-Licht abgeschätzt. Dazu konnte auch die Bandenstärke des entsprechenden molekularen Markers herangezogen werden. Zur genauen Bestimmung wurde eine Verdünnung unter UV-Licht bei $\lambda = 260$ nm gemessen. Hierbei entspricht $A_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger oder 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA. Durch Bestimmung des Quotienten A_{260}/A_{280} kann der Reinheitsgrad der DNA bestimmt werden. Bei reinen DNA-Präparationen liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0.

3.3.2.4. Ethanolfällung

Zur Konzentrierung oder zum Pufferwechsel wurden gelöste Nukleinsäuren durch Zugabe von 1/10 des Probenvolumens 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und des 2,5fachen Volumens abs. Ethanol gefällt (-20°C, 30 min) und durch Zentrifugation (20000 rpm, 20 min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend getrocknet. Die gefällte DNA wurde in sterilem ddH₂O oder dem entsprechenden Puffer der nachfolgenden Reaktion resuspendiert.

3.3.3. Enzymatische Methoden

3.3.3.1. Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur Charakterisierung von DNA durch Restriktionsanalyse und zur Konstruktion von Plasmiden wurden Restriktionsverdau durchgeföhrt. Dabei wurden bei der Einstellung der optimalen Reaktionsbedingungen die Empfehlungen des Herstellers berücksichtigt. Plasmid-DNA wurde mit 1-5 U Enzym/ μg DNA 1-2 Stunden restringiert. Die Restriktion der DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft (s. 3.3.2.1.).

Schlossen sich an die Restriktion weitere enzymatische Reaktionen an, wurde das Enzym, wenn möglich, durch Erhitzen auf 65°C inaktiviert oder mittels des QIAquick Kits (Qiagen) bzw. durch Auftrennung des Restriktionsansatzes in einem Agarosegel entfernt.

3.3.3.2. Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Zur Erzeugung rekombinanter Plasmide wurde Vektor-DNA durch Restriktionsendonukleasen linearisiert und anschließend mit thermosensitiver alkalischer Phosphatase inkubiert. Die Dephosphorylierung am 5'-Ende des linearisierten Vektors verhindert dessen Religation ohne vorherige Aufnahme eines Inserts. Die restringierte DNA wurde mit 0,2 U *shrimp* alkalischer Phosphatase pro μg Plasmid-DNA für 30 min bei 37°C inkubiert, das Enzym anschließend durch 20minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Um das Enzym und ungeschnittene Anteile des Vektors aus dem Ansatz zu entfernen, wurde dieser auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und der linearisierte Vektor aus dem Gel eluiert.

3.3.3.3. Ligation

Die kovalente Verbindung von DNA-Fragmenten wird als Ligation bezeichnet und von der T4-DNA-Ligase katalysiert. Diese bildet eine Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphat-, sowie einer 3'-OH-Gruppe unterschiedlicher DNA-Enden aus. Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden in Ligationspuffer mit T4-DNA-Ligase inkubiert. Das Mengenverhältnis Vektor zu Insert betrug 1:3. Die Ligation erfolgte ü.N. bei 16°C. Handelte es sich um eine *blunt end* Ligation, wurde der Ansatz bei 12°C inkubiert.

Der Ligationsansatz wurde für die Transformation kompetenter Bakterienzellen eingesetzt.

3.3.3.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR beruht auf einem von Mullis 1983 entwickelten Verfahren, bei dem mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (z.B. *Taq*- oder *Pwo*-Polymerase) spezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden können (Mullis & Faloona, 1987). Ein Gemisch aus Template-DNA, zwei als Primern eingesetzten Oligonukleotiden, Nukleotiden und Polymerase wird einer Reaktionsfolge unterworfen, in deren Verlauf durch Änderung der Inkubationszeiten und Temperaturen verschiedene Reaktionen an der DNA induziert werden. Die PCR-Ansätze bestanden aus folgenden Komponenten:

0,1 – 0,5 µg Template-DNA
je 50 pmol Primer
je 10 µM dNTPs
PCR-Polymerase-Puffer
H₂O
2 U Polymerase
in einem Gesamtvolumen von 50 µl

Die PCR erfolgte nach einem einleitenden Denaturierungsschritt von 4 min bei 94°C über 30 bis 35 Zyklen mit folgendem Programm:

45 sec	94°C	(Denaturierung)
45 sec	50-70°C	(Annealing)
4 min	72°C	(Elongation)

Daran schloß sich eine terminale Extensionsphase von 7 min bei 72°C an.

Die PCR-Ansätze wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt, um die Amplifikation zu überprüfen, überschüssige Desoxynukleotide, Polymerase sowie Primer abzutrennen und die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel zu eluieren.

3.3.3.5. Cycle Sequencing

Diese Methode kombiniert die DNA-Sequenzierung des Didesoxyverfahrens nach Sanger et al. (1977) mit einer PCR (s. 3.3.3.4.). Als Enzym muß daher eine thermostabile Polymerase eingesetzt werden. Weil zeitgleich mit der Sequenzierung eine Amplifizierung der DNA

stattfindet, sind die für die Reaktion benötigten DNA-Mengen deutlich geringer als bei einer herkömmlichen PCR, so daß 1 µg DNA ausreichend ist.

Das Plasmid-DNA-Template wurde mit 3,2 pmol Sequenzierprimer und dem Big Dye Terminator Mix (Roche) versetzt. Dieser enthält optimierte Konzentrationen an dNTPs, sowie mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide und Polymerase. Durch die Sequenzierungsreaktion (30 Zyklen: 96°C für 30 sec / 50°C für 30 sec / 60°C für 4 min) werden verschieden lange DNA-Fragmente amplifiziert, die jeweils mit einem fluoreszenzmarkierten ddNTP enden.

Die weitere Aufreinigung der Sequenzieransätze, die mit der Detektion der Fluoreszenzsignale gekoppelte Polyacrylamid-Gelelektrophorese und deren Auswertung wurden von Dr. Marius Boicu am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Nach Beendigung des Sequenzierungs-Service am Max-Planck-Institut für Biochemie wurde die Sequenzierungsreaktion bei der Firma MWG Biotech nach Einsendung der jeweiligen Template-DNA in Auftrag gegeben.

3.4. PROTEINCHEMISCHE METHODEN

3.4.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.4.1.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) ermittelt. 200 µl Bradfordreagenz wurden mit 1-50 µl Proteinlösung versetzt und mit ddH₂O auf 1 ml aufgefüllt. Die Proben wurden 5 min bei RT inkubiert und anschließend ihre Extinktion bei 595 nm bestimmt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Eichkurve mit BSA in den Konzentrationen von 0,1 bis 15 µg/ml im Absorptionsbereich von 0 bis 1,2 erstellt.

3.4.1.2. Proteinbestimmung durch Absorptionsmessung

Die Proteinkonzentration einer reinen Proteinlösung läßt sich durch ihre Absorption bei $\lambda=280$ nm bestimmen. Dafür muß allerdings die Aminosäurezusammensetzung des Proteins bekannt sein. Aus der Anzahl der bei 280 nm absorbierenden Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein läßt sich der theoretische molare Extinktionskoeffizient des Proteins nach Gill und Hippel (1989) berechnen:

$$\epsilon_{280} = \epsilon_{\text{Trp}} \times n_{\text{Trp}} + \epsilon_{\text{Tyr}} \times n_{\text{Tyr}} + \epsilon_{\text{Cys}} \times n_{\text{Cys}}$$

Hierbei ist ϵ_x der jeweilige molare Absorptionskoeffizient der Aminosäure x bei $\lambda=280$ nm und n_x die Anzahl der entsprechenden Aminosäuren im Protein. Über das Lambert-Beersche Gesetz

$$c[\text{mg/ml}] = A_{280} \times M_r / \epsilon_{280} \cdot d$$

kann die Proteinkonzentration berechnet werden, wobei d für die Schichtdicke der Küvette in cm steht. Aus diesem Grund ist diese Methode nur für vollständig gereinigte Proteine einsetzbar.

3.4.2. Ultrafiltration

Eine Methode zur Einengung und Aufkonzentration von Proteinlösungen ist die Ultrafiltration durch Membranen. Es wurden Membranen aus Polysulfonether (Biomax, Millipore) mit definierten Ausschlußgrößen von 10 und 30 kDa verwendet. Kleine Volumina konnten durch Zentrifugation in Ultrafree 15 Ultrafiltrationseinheiten eingeengt werden. Die Polysulfonethermembranen dieser Filter sind senkrecht angeordnet, so daß bei der Zentrifugation eine tangentielle Anströmung der Membran erfolgt. Die Verluste durch Adsorption von Protein an die Membranoberfläche werden dadurch minimiert.

Durch mehrmaliges Auffüllen mit Puffer und wiederholtes Einengen der Lösung können auf diese Weise Proteinlösungen gleichzeitig entsalzt und umgepuffert werden.

3.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die durch SDS stark negativ geladenen Proteine werden unter denaturierenden Bedingungen in einem vernetzten Polyacrylamidgel durch ein elektrisches Feld in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt. Dabei ist die Beweglichkeit der Proteine eine lineare Funktion ihres Molekulargewichts. Dieser Zusammenhang kann zur Bestimmung der relativen Molekülmasse der Proteine genutzt werden.

Es wurden Minigelte der Größe 8,5 x 9 cm verwendet, die in einer Apparatur zu je acht Gelen gegossen wurden. In der Regel kamen 12 %ige Trenngel zum Einsatz.

Trenngel: 12 % Acrylamid (30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid)
 0,8 % SDS
 0,375 M Tris/HCl, pH 8,8
 0,1 % APS
 0,5 % TEMED

Sammelgel: 5,0 % Acrylamid (30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid)
 0,8 % SDS
 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8
 0,05 % APS
 0,25 % TEMED

Die aufzutrennenden Proteine wurden mit Probenpuffer vermischt, drei Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend auf das mit Laufpuffer überschichtete Gel aufgetragen. Zur Molekulargewichtsbestimmung der Proteine wurde ein SDS-PAGE-Größenstandard mit aufgetrennt.

2x Probenpuffer: 63 mM Tris/HCl, pH 6,8
 0,05 % Bromphenolblau
 4 % SDS
 10 % Glycerin
 375 mM DTT

Laufpuffer: 0,025 M Tris
 0,192 M Glycin
 0,1 % SDS

3.4.4. Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Die Gele wurden in der Färbelösung kurz erhitzt und 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte durch Einlegen und Inkubation in Entfärber bei RT.

Färbelösung: 50 % Ethanol (v/v)
 10 % Essigsäure (v/v)
 0,1 % Coomassie R 250 (w/v)

Entfärber: 30 % Ethanol (v/v)
 7 % Essigsäure (v/v)

3.4.5. Western-Blotting

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mittels Semi-Dry-Blot-Verfahren auf Polyvinylidendifluoridmembranen (Millipore, Immobilon PVDF, Porengröße 0,45 µm) transferiert, um sie für die N-terminale Sequenzierung zugänglich zu machen. Die hydrophobe Membran wurde mit Methanol benetzt und anschließend 5 min in Transferpuffer eingelegt. Auf die Anode wurde ein Stapel in Transferpuffer getränktes 3 MM Papier (Whatman), die PVDF-Membran, das Polyacrylamid-Gel und ein zweiter Stapel durchtränktes 3 MM Papier gelegt. Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten wurden vor Starten des Blotvorgangs entfernt. Der Aufbau wurde durch die Kathode abgeschlossen.

Der Transfer erfolgte in einer Blotkammer (BioRad Trans Blot Cell) über 4 h mit 0,8 mA/cm² Gel. Nach Abschluß des Blotvorgangs wurde die Membran mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, der Hintergrund entfärbt und anschließend die Membran getrocknet.

Transferpuffer: 20 % Methanol (v/v)
 48 mM Tris/HCl, pH 8,3
 39 mM Glycin
 0,0037 % SDS (w/v)

3.4.6. Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen

PVDF-Membranen wurden 10 min in Färbelösung (s. 3.4.4.) gefärbt und in speziellem PVDF-Entfärber entfärbt. Dieser enthält Methanol anstelle von Ethanol, da letzteres die N-terminale Sequenzierung von Proteinen stört.

PVDF-Entfärber: 50 % Methanol (v/v)
 10 % Essigsäure (v/v)

3.4.7. N-terminale Proteinsequenzierung

Proteine wurden über den automatisierten Edman-Abbau (Edman & Henschen, 1975) sequenziert. Dabei wird die jeweils N-terminale Aminosäure nach Reaktion mit Phenylisothiocyanat (PITC) als Phenylthiohydantoin-Derivat abgespalten und kann nach einer HPLC-Auftrennung durch den Vergleich mit einem Standard-Aminosäuregemisch identifiziert werden.

Zur Sequenzierung eines Proteins aus einem heterogenen Gemisch wurde dieses mittels SDS-PAGE aufgetrennt, durch einen Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert, mit Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt und danach die entsprechende Bande des Proteins aus der Membran ausgeschnitten.

Die Proteinsequenzierung wurde von Dr. Karlheinz Mann am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried auf einem Applied Biosystems Sequenzierer 470A durchgeführt.

3.4.8. Proteinpräparation

3.4.8.1. Reinigung rekombinanter HPPD über Metallchelatchromatographie

Rekombinante HPPD wurde mittels ihres durch Expression in pET14b erzeugten N-terminalen His-Tags (6x Histidinmarkierung) durch Metallchelatchromatographie über eine mit Co^{2+} beladene Talonsäule (Clontech, Palo Alto, CA, USA) aufgereinigt.

Die Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen, Zelltrümmer abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand auf die Säule aufgetragen, die zuvor in Aufschlußpuffer äquilibriert worden war.

Anschließend wurde die Säule mit fünf Säulenvolumen Aufschlußpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution der rekombinanten HPPD erfolgte

durch einen linearen Gradienten mit Elutionspuffer. Das Protein wurde über Ultrafiltration (s. 3.4.2.) eingengt und in 10 mM Hepes/NaOH pH 7,0 umgepuffert.

Aufschlußpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,0
500 mM Imidazol

3.4.8.2. Abspaltung des N-terminalen His-Tags

Die Abspaltung des His-Tags von rekombinanter HPPD erfolgte durch Inkubation mit Thrombin (Novagen, Madison, WI, USA). Die Proteinlösung wurde 16 h bei 4°C mit 0,5 U Thrombin/mg Protein nach Angaben des Herstellers inkubiert. Danach wurde der abgespaltene His-Tag und das Enzym durch Ionenaustauschchromatographie über eine Resource Q Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) abgetrennt. Zuvor wurde die Säule mit zehn Säulenvolumen Puffer A äquilibriert, danach der Proteinansatz (50-120 mg HPPD in 10 mM Hepes/NaOH, pH 7,0) aufgetragen und ungebundenes Protein durch Waschen mit vier Säulenvolumina Puffer A entfernt. Die Auftrennung des Ansatzes erfolgte durch einen linearen Gradienten von Null bis 300 mM NaCl. Aliquots der gesammelten Fraktion wurden durch SDS-PAGE (s. 3.4.3.) aufgetrennt, die HPPD-haltigen Fraktionen vereinigt und in 10 mM Hepes/NaOH, pH 7,0 umgepuffert (s. 3.4.2.). Das Protein wurde für die Kristallisation (s. 3.5.1.) eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Puffer A: 50 mM Hepes/NaOH, pH 7,0

3.4.8.3. Klonierung der HPPD als MBP-Fusionsprotein

Aufgrund der sowohl unter Standardexpressionsbedingungen (LB-Medium, Induktion mit 1 M IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,8, Expression bei 37°C) als auch unter stringenten Bedingungen (s. 3.2.6.) schlechten Löslichkeit der HPPD bei Expression in *E. coli* wurde das Protein aus *Z. mays* und *C. elegans* als MBP-Fusionsprotein (*maltose binding protein*-Fusionsprotein) exprimiert. Der dafür verwendete Expressionsvektor pMALTM-c2X enthält auf der 5'-Seite des Polylinkers eine Erkennungssequenz für die Protease Faktor Xa. Dort kann das Fusionsprotein nach seiner Aufreinigung durch spezifische Proteolyse gespalten und durch einen weiteren Chromatographieschritt von MBP getrennt werden. Zur analytischen

Spaltung des Fusionsproteins wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen (Konzentrationsverhältnis Protein:Protease, Temperatur, Reaktionsdauer) getestet und die Proben mittels SDS-PAGE analysiert, um die optimalen Proteolysebedingungen für präparative Spaltungen zu bestimmen.

Da die auf diese Art gewonnene HPPD in Form des Fusionsproteins zwar aktiv, nach der Proteolyse durch Faktor Xa und anschließender Ionenaustauschchromatographie jedoch irreversibel inaktiviert war und gleichzeitig durch N-terminale Verlängerung des HPPD-pET14b-Konstruktes ein Konstrukt vorlag, mit dem unter stringenten Expressionsbedingungen (s. 3.2.6.) ein Teil der HPPD aus *Z. mays* löslich in *E. coli* exprimiert werden konnte, wurde auf die weitere Expression in Form eines Fusionsproteins verzichtet.

3.4.8.4. Aufreinigung und Proteolyse des MBP-HPPD-Fusionsproteins

Rekombinante HPPD wurde mittels ihrer durch Expression in pMALTM-c2X erzeugten N-terminalen MBP-Fusion durch Affinitätschromatographie an einer Amylosematrix aufgereinigt.

Die Zellen wurden nach erfolgter Expression durch Zentrifugation sedimentiert, in Aufschlußpuffer aufgenommen und durch Ultraschall aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand auf die Säule aufgetragen, die zuvor in Aufschlußpuffer äquilibriert worden war. Anschließend wurde die Säule mit fünf Säulenvolumen Aufschlußpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution des MBP-HPPD-Fusionsproteins erfolgte durch einen linearen Maltosegradienten.

Das solchermaßen aufgereinigte Fusionsprotein wurde in Faktor Xa-Spaltungspuffer umgepuffert, auf 1 mg/ml konzentriert und mit Faktor Xa (0,3 µg/20 µg Fusionsprotein) inkubiert. Die Abspaltung des MBP erfolgte über einen Zeitraum von 13 h bei RT. Danach erfolgte ein erneuter Pufferwechsel zu 20 mM Hepes/NaOH, pH 7,5. Der Reaktionsansatz wurde auf eine äquilibrierte Resource Q Säule aufgetragen, die Trennung von HPPD und MBP erfolgte in einem linearen Gradienten von Null bis 500 mM NaCl in 20 mM Hepes/NaOH, pH 7,5.

Aufschlußpuffer:	100 mM Hepes/NaOH, pH 7,5
	150 mM NaCl
Elutionspuffer:	100 mM Hepes/NaOH, pH 7,5
	150 mM NaCl
	250 mM Maltose
Faktor Xa-Spaltungspuffer:	500 mM Tris/HCl, pH 8,0
	1 M NaCl
	50 mM CaCl ₂

3.4.8.5. Rekombinante anorganische Pyrophosphatase aus *Heliothis virescens*

Die lösliche anorganische Pyrophosphatase aus *Heliothis virescens* (*hvPPase*) wurde in der Abteilung Molekulare Wirkstoff-Forschung im Landwirtschaftszentrum der Bayer CropScience in Monheim kloniert, exprimiert und aufgereinigt. Das gereinigte Enzym lag mit einer Konzentration von 10,6 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 3 mM MgCl₂ vor und wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Günter Auerbach zur Verfügung gestellt.

3.4.9. Aktivitätstest für HPPD

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte modifiziert nach Lindstedt und Rundgren (1982) durch einen photometrischen Test.

Bei einer Wellenlänge von 308 nm wird die Abnahme der Enolform von 4-Hydroxyphenylpyruvat (HPP) gemessen. Da in wäßrigen Lösungen HPP zum überwiegenden Teil in der Ketoform vorliegt, muß das Gleichgewicht zunächst in Richtung der Enolform verschoben werden. Dies geschieht durch Zugabe von Boratpuffer, KH₂PO₄ beschleunigt die Einstellung des Gleichgewichts. Unter den gewählten Bedingungen liegt HPP zu 25 % in der Enolform vor. Der Testansatz benötigt vor der Messung ca. 5-10 min zur Einstellung des Keto-Enolgleichgewichts. Die HPPD Aktivität wurde über 15 min bei 25°C bestimmt.

Testansatz:	900 µl 0,8 M KH ₂ PO ₄
	0,4 M H ₃ BO ₃
	0,2 M Tris/HCl, pH 7,5
	5,7 mM Ascorbinsäure
	1200 U Katalase
	250 µM HPP

der HPPD wurde an der Beamline BW6 (Deutsches Elektronen Synchrotron, DESY, Hamburg) aufgenommen. Es wurde Synchrotronstrahlung mit der Wellenlänge $\lambda = 1,050 \text{ \AA}$ verwendet.

Die Kristalle der löslichen anorganischen Pyrophosphatase aus *H. virescens* (*hvPPase*) wurden zunächst in silikonisierten Glaskapillaren montiert und die den Kristall umgebende Mutterlauge vorsichtig entfernt. Um ein Austrocknen des Kristalls zu verhindern, wurde ober- und unterhalb des Kristalls in der Kapillare etwas Kristallisationspuffer belassen und diese von beiden Seiten mit Dentalwachs (Harvard Dental GmbH, Berlin) verschlossen. Es war jedoch nicht möglich, mit solcherart montierten Kristallen vollständige Datensätze aufzunehmen, da die Kristalle im Verlauf der Messung irreversibel zerstört wurden. Aus diesem Grund erfolgten die weiteren Messungen ebenfalls unter *Cryobedingungen*. Dem Kristallisationspuffer der *hvPPase* wurden dazu 10 % Glycerin zugegeben, um die Bildung von Eisingen zu verhindern.

Die montierten Kristalle wurden auf dem Goniometerkopf fixiert, zentriert und der Abstand zwischen Kristall und *Image Plate* je nach Auflösungsgrenze des Kristalls bestimmt. Die Datensammlung im Haus erfolgte mit Graphit-gefilterter Cu-K α -Strahlung (L \rightarrow K Übergang, $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) bei 100 K auf einer MAR345 *Image Plate* (MarResearch), die auf Rigaku-Drehanoden-Röntgeneratoren installiert war.

Zur Bestimmung der Kristallorientierung, Raumgruppe, Elementarzellenparameter sowie zur Integration der Reflexintensitäten wurden die Programme MOSFLM v6.01 und v6.11 (Leslie, 1991) oder DENZO (Otwinowski & Minor, 1997) eingesetzt. Die Datenreduktion wurde mit den Programmen SCALA (CCP4, 1994) oder SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) durchgeführt.

3.5.3. Strukturlösung

Die SIR-Daten des Hg-Schweratomderivates eines *zmHPPD*-Kristalls wurden mit dem HKL *package* (Otwinowski & Minor, 1997) ausgewertet. Identifizierung und Verfeinerung der Schweratompositionen und Differenz Patterson Funktionen wurden mit den Programmen SHELXS (Sheldrick, 1990) und MLPHARE (CCP4, 1994) durchgeführt.

Die Kristallstruktur der HPPD aus *A. thaliana* wurde durch Patterson Suchmethoden (MR) (Hoppe, 1957b; Rossman & Blow, 1962; Huber, 1965) mit dem Programm MOLREP des

CCP4 Programmpaketes gelöst. Als Suchmodell diente die zuvor gelöste Struktur der HPPD aus *Z. mays* (Referenz diese Arbeit).

Die Kristallstruktur der *hvPPase* wurde durch MR gelöst. Die Lage des Proteinmoleküls in der asymmetrischen Einheit wurde mit dem Programm AMoRe (Navaza, 1994) bestimmt. Als Suchmodell dienten die Koordinaten der anorganischen Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Swaminathan et al., 1998; PDB Eintrag 1HUK).

3.5.4. Modellbau und Verfeinerung

Die atomaren Modelle wurden auf einer *Graphic*-Workstation der Firma SILICON GRAPHICS mit dem Programm MAIN (Turk, 1996) in die Elektronendichte eingepaßt. Die Verfeinerung der Modellparameter wurde mit dem Programm CNS (Brünger et al., 1998) durchgeführt. Als Zielfunktion wurde der kristallographische *R*-Faktor minimiert, wobei geometrische Parameter (Engh & Huber, 1991) berücksichtigt wurden, da die Zahl der Observablen im Verhältnis zur Anzahl der verfeinerten Parameter in der Proteinkristallographie im allgemeinen nicht ausreichend überbestimmt ist. Das Gewichtsverhältnis zwischen kristallographischem und geometrischem Term wurde dabei zu Beginn der Verfeinerung bestimmt und mit fortschreitender Qualität des Modells schrittweise erhöht. Um ein objektives Kriterium für den Erfolg der Verfeinerungsrechnungen zu haben, wurden 5 % der Reflexe zufällig ausgewählt und als Testset nicht in die Verfeinerung einbezogen (Brünger, 1992). Der so berechnete freie *R*-Faktor (R_{free}), der im Durchschnitt ca. 5 % höher als der kristallographische Arbeits-*R*-Faktor liegt, warnt dabei vor einer Überanpassung des Atommodells an die Daten. Auf positionelle Verfeinerung und *simulated annealing* folgte eine visuelle Inspektion der Elektronendichte und manuelles Einpassen der Aminosäurereste bis zu einem Absinken des *R*-Faktors auf 30 %. Danach wurden Wassermoleküle automatisiert mit CNS eingebaut und auch deren Positionen verfeinert und manuell überprüft. Im Anschluss an die Koordinatenverfeinerung wurden individuelle Temperaturfaktoren verfeinert. Dabei wurden Einschränkungen für direkt verknüpfte Atome und für über einen Winkel verknüpfte Atome definiert, für Haupt- und Seitenketten jeweils getrennt. Die Zielwerte der Standardabweichungen betragen dabei $1,5\sigma$ (Hauptkette) bzw. $2,0\sigma$ (Seitenkette) für benachbarte und $2,0\sigma$ (Hauptkette) bzw. $2,5\sigma$ (Seitenkette) für über Winkel verknüpfte Atome.

Bei Vorliegen von nicht-kristallographischer Symmetrie (*ncs*) wurden Einschränkungen der Positionen und Temperaturfaktoren für lokal symmetrieäquivalente Atome berücksichtigt.

3.5.5. Analyse von Atommodellen

Die Molekülgeometrien der verfeinerten Modelle wurden mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) analysiert. Überlagerungen und *least square fits* von Koordinaten wurden mit TOP3D (CCP4, 1994) durchgeführt. Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Programm STRIDE (Frishman & Argos, 1995) zugeordnet.

3.5.6. Graphische Darstellungen

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme BOBSCRIPT (Esnouf, 1997), MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und RASTER3D (Merritt & Bacon, 1997) benutzt. Oberflächen wurden mit dem Programm GRASP (Nicholls et al., 1993) berechnet und dargestellt.

Das Programm ALSRIPT (Barton, 1993) wurde zur Darstellung von Sequenzvergleichen eingesetzt.

Die Bilder wurden mit den Programmen PHOTOSHOP (Adobe Systems Inc., USA), CorelDRAW (Corel Corporation Limited, 1998) und XV (J. Bradley, Pennsylvania, USA) bearbeitet oder konvertiert.

IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1. KLONIERUNG, EXPRESSION UND REINIGUNG EU- UND PROKARYOTISCHER 4-HYDROXYPHENYLPYRUVAT DIOXYGENASEN

4.1.1. HPPD aus *Caenorhabditis elegans*

4.1.1.1. Isolierung und Klonierung des HPPD Gens aus *Caenorhabditis elegans*

Zu Beginn der Arbeit wurde das Gen der 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase aus *Caenorhabditis elegans* kloniert und in *E. coli* als heterologes Protein (*ceHPPD*), bestehend aus 393 Aminosäuren, exprimiert.

Zur Isolation des Gens wurde eine cDNA-Bank (Lambda cDNA library Nematode) der Firma Stratagene eingesetzt. Ausgehend von der bereits bekannten DNA Sequenz (Genbank Accession Nr. Z50016 (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) wurden die Oligonukleotidprimer CaenoF1 und CaenoR1 definiert und das Gen über PCR amplifiziert (s. Abb. 10).

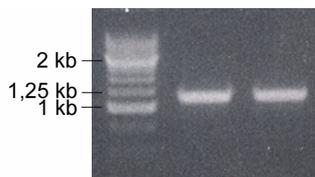


Abb. 10: 1 %iges Agarosegel des durch PCR amplifizierten *ceHPPD* Gens
Spur 1: 250 bp Marker
Spur 2 und 3: PCR-Produkt

Die amplifizierte DNA der erwarteten Größe (1182 bp) wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten, eluiert (s. 3.3.2.2.) und in den *blunt end* Klonierungsvektor pCR[®]2.1-TOPO ligiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in *E. coli* DH5 α transformiert und zur Blau-Weiß-Selektion positiver Klone auf LB/X-gal-Platten ausgestrichen. Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse untersucht.

4.1.1.2. Expression rekombinanter *ceHPPD* in *Escherichia coli*

Positive Klone wurden als Template für eine weitere PCR mit den Primern CaenoF*Nde*I und CaenoR*Bg*II eingesetzt, die amplifizierte DNA mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Bg*II verdaut und in den Expressionsvektor pET14b ligiert (s. 3.3.3.3.), um das Protein in *E. coli* zu exprimieren. Kompetente *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden mit den Konstrukten transformiert, die Zellen auf LB-Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die heterologe Überexpression der *ceHPPD* erfolgte wie unter 3.2.6. beschrieben. Es war jedoch unter keiner der getesteten Bedingungen und mit weiteren Zellstämmen (HMS174(DE3), AD494(DE3)) möglich, in löslicher Form vorliegendes Protein zu exprimieren. Der Anteil an löslich exprimierter *ceHPPD* konnte auch durch direkte Überführung der Transformationsansätze in das Expressionsmedium nicht gesteigert werden. Aus diesem Grund wurde das HPPD Gen aus *C. elegans* in den Vektor pMALTM-C2 kloniert. Dieser Vektor enthält das Gen für das in *E. coli* lösliche *maltose binding protein* (MBP) aus *E. coli* und ermöglicht die Expression des jeweils gewünschten Proteins als C-terminales Fusionsprotein (Maina et al., 1988).

Ausgehend vom Konstrukt des *ceHPPD* Gens in pET14b wurde die DNA durch PCR mit den Oligonukleotidprimern CaenoF1 und CaenoRSaII amplifiziert und in den Vektor pMALTM-C2 ligiert.

Transformation und Überexpression der *ceHPPD* als MBP-Fusionsprotein erfolgte unter stringenter Bedingungen (s. 3.2.6.) in 100 ml einer *E. coli* BL21(DE3) Zellkultur. Die erreichbare Ausbeute betrug etwa 1-2 mg lösliches Fusionsprotein pro 100 ml Bakterienkultur.

4.1.1.3. Reinigung und Kristallisation des *ceHPPD*-MPB-Fusionsproteins

Die Zellpellets wurden in Aufschlusspuffer (100 mM Hepes, pH 7,5 und 150 mM NaCl) aufgenommen, mit Ultraschall aufgeschlossen und der Überstand abzentrifugiert. Die spezifische Aktivität des *ceHPPD*-Fusionsproteins im Cytoplasmarextrakt lag bei ca. 10 nmol/mg Gesamtprotein pro Minute.

Durch Affinitätschromatographie an einer Amylosematrix und Elution durch einen ansteigenden Maltosegradienten konnte das Fusionsprotein bis zu etwa 95 % aufgereinigt werden (s. Abb. 11). Die enzymatische Aktivität des auf diese Art gereinigten Fusionsproteins lag bei ca. 20 nmol/mg Protein.

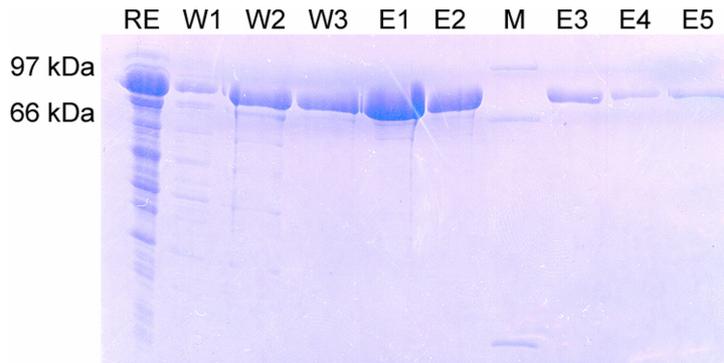


Abb. 11: Reinigung des *ceHPPD*-MBP-Fusionsproteins

RE: Zellrohextrakt

W1-W3: Waschfraktionen

E1-E5: Elution mit Maltose

M: Molekularstandard

Die links angegebenen Molekulargewichte beziehen sich auf die Proteine des Molekulargewichtstandards.

Das N-terminale MBP wurde durch Verdau mit Faktor Xa abgespalten. Zur Trennung der beiden Proteine, weiterer Verunreinigungen und Entfernung der Protease wurde eine Ionenaustauschchromatographie über eine Resource Q Säule durchgeführt.

MBP und *ceHPPD* eluierten in zwei getrennten Peaks, wobei der MBP-Peak HPPD-Kontaminationen aufwies. Die Ausbeute von an Resource Q gereinigter *ceHPPD* betrug ca. 500 µg aus 100 ml Expressionskultur.

Nach diesem zweiten Aufreinigungsschritt konnte in der *ceHPPD* Fraktion keinerlei enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Deren Rekonstitution durch Zugabe von Fe(II)-Salzen, wie dies an HPPD aus *A. thaliana* durchgeführt werden konnte (Linden, 2000), war hier nicht möglich.

Es konnte keine Bedingung gefunden werden, die es erlaubt hätte, die *ceHPPD* als Fusionsprotein mit MBP zu kristallisieren.

4.1.2. HPPD aus Cyanobakterien

4.1.2.1. Isolierung und Klonierung des HPPD Gens aus *Synechocystis* sp. PCC 6803

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde versucht, durch den Wechsel zu einem prokaryotischen Organismus das zur Kristallisation notwendige lösliche Material einer 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase zu erhalten. Aufgrund der Endosymbiontentheorie, die besagt, daß sich Cyanobakterien und Chloroplasten höherer Pflanzen auf einen gemeinsamen Ursprung zurückführen lassen und der immer noch nicht eindeutig geklärten Kompartimentierung der HPPD in höheren Pflanzen, sollte die HPPD eines Cyanobakteriums kloniert, gereinigt und kristallisiert werden. Zu diesem Zeitpunkt waren die Untersuchungsergebnisse von Dähnhardt et al. (2002), die nachwiesen, daß die HPPD in *Synechocystis* sp. PCC 6803 für die Plastochinonsynthese nicht erforderlich ist, noch nicht veröffentlicht.

Zellen des Stammes *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurden wie unter 3.2.2. beschrieben in BG11-Medium angezogen und die Gesamt-DNA der Bakterien isoliert (s. 3.3.1.3.). Mittels der genspezifischen Oligonukleotidprimer SynN*Nde*I und SynR*Bam*HI2 wurde in einer modifizierten PCR (Elongationszeit 2 min und 30 sec) das Gen der prokaryotischen HPPD amplifiziert.

Abb. 12 zeigt das amplifizierte Gen der HPPD aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 mit der erwarteten Größe von 1019 bp. Die amplifizierte DNA wurde aus dem Agarosegel eluiert und in den *blunt end* Klonierungsvektor pPCR Script Amp ligiert.

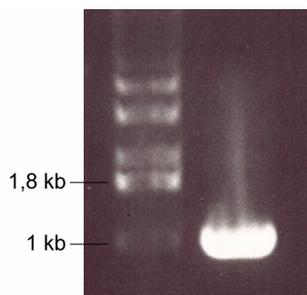


Abb. 12: 1 %iges Agarosegel der Amplifikation des HPPD Gens aus *Synechocystis* sp. PCC 6803

1: Marker

2: PCR-Produkt (1019 bp)

Die Plasmid-DNA wurde in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen transformiert und die Zellen auf LB-Medium ausplattiert. Positive Klone konnten durch Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden. Deren Plasmid-DNA wurde aus 3 ml LB-Kulturen isoliert und durch Restriktionsverdau auf das erwartete Fragmentierungsmuster überprüft.

4.1.2.2. Heterologe Expression der HPPD aus *Synechocystis* sp. PCC 6803

Zur nachfolgenden heterologen Expression in *E. coli* wurde das Gen der HPPD mit den Endonukleasen *Bam*HI und *Nde*I aus dem pPCR Script Amp Konstrukt herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pET14b kloniert. Die Überexpression des Proteins (*s*HPPD) erfolgte gemäß 3.2.6. in 1 Liter Expressionskulturen. Die anschließende SDS-PAGE Analyse zeigte, daß auch das heterolog in *E. coli* exprimierte prokaryotische Protein nur ein mäßiges Expressionsniveau hatte und zudem komplett in unlöslicher Form in den Zellen vorlag. Ein Enzymtest ergab keine spezifischen Enzymaktivitäten, bezogen auf den Gesamtproteingehalt in der Cytoplasmafraktion. Variation der Expressionsbedingungen und der eingesetzten Zellstämme führte zu keinerlei Steigerung der Proteinausbeute. Aus diesem Grund war auch dieses Protein nicht in Kristallisationsexperimenten einsetzbar.

4.1.3. Diskussion

Um biochemische und kristallographische Charakterisierungen an 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase als potentiell Zielenzym für Inhibitoren vornehmen zu können, sind große Mengen (>100 mg) von gereinigtem, aktivem Protein erforderlich. Diese Mengen sind nur rekombinant durch heterologe Überexpression des Enzyms zu gewinnen. Die Expression der HPPD-Gene aus *C. elegans* und *Synechocystis* sp. PCC 6803 in einem bakteriellen System erwies sich als problematisch. Beide rekombinanten Enzyme lagen bei der Expression unter dem T7-Promotor des pET14b-Vektors in BL21(DE3) nahezu komplett in unlöslicher Form vor. Auch die Variation der Expressionsbedingungen durch direkte Überführung der Transformationsansätze in 1 Liter LB-Medium steigerte die Ausbeute an löslichem Protein nicht. Auf eine Aufreinigung dieser HPPDs mit His-Tag wurde daher verzichtet.

So mußten neue Klonierungsstrategien und Expressionsbedingungen getestet werden, um die erforderliche Menge rekombinanten Proteins zu erlangen.

Als neue Klonierungsstrategie wurde exemplarisch an *ceHPPD* versucht, die Ausbeute löslichen Proteins durch die Fusion an *maltose binding protein* (MBP) zu erhöhen. Dabei handelt es sich um ein aus *E. coli* stammendes Protein, das in dessen Zellstämmen mit guter Löslichkeit exprimiert werden kann und in einer Fusion mit dem gewünschten Protein dessen Löslichkeit im Cytoplasma deutlich erhöht (Maina et al., 1988). Diese Strategie erwies sich als erfolgreich, es konnten ca. 1-2 mg löslichen Fusionsproteins/100 ml Bakterienkultur aufgereinigt werden.

Versuche, die *ceHPPD* als Fusionsprotein mit MBP zu kristallisieren schlugen fehl, weil das Protein entweder sofort ausfiel bzw. auch über den Zeitraum einiger Monate keinerlei Kristallisationskeime gebildet wurden. Da es selbst schwierig war, eine einzelne geeignete Kristallisationsbedingung für die pflanzlichen HPPDs, die ohne MBP-Fusion kloniert wurden (s. 4.2.3.; Linden, 2000) zu identifizieren, erschwert die Fusion an ein zweites Protein anderer Eigenschaften die Kristallisation der HPPD vermutlich erheblich. Ein weiteres Problem stellt in diesem Fall der Klonierung der fehlende Linker zwischen beiden Proteinen dar, da die *ceHPPD* in die *XmnI/SalI*-Schnittstellen des Vektors ligiert werden mußte. Normalerweise begünstigt eine eingeschränkte Flexibilität die Kristallisation eines Proteins. Vermutlich werden in diesem Fall jedoch beide Proteine durch die direkte Fusion des C-Terminus von MBP an den N-Terminus der *ceHPPD* daran gehindert, in diesen Bereichen ihre natürliche Konformation einzunehmen, was wiederum zu einer erhöhten Flexibilität führt. Die daraus folgende wahrscheinlich hohe Beweglichkeit der beiden Proteine relativ zueinander führt zu

Fehlerrordnungen in den Kristallen bzw. dazu, daß ein kontrolliert geordnetes Kristallwachstum nicht stattfinden kann.

Aus diesem Grund wurde das sich N-terminal befindende MBP durch Inkubation mit Faktor Xa abgespalten und die *ceHPPD* durch Anionenaustauschchromatographie von MBP und Protease getrennt. Durch diesen Reinigungsschritt kam es zu großen Ausbeuteverlusten, außerdem war im enzymhaltigen Eluat keine Aktivität der HPPD mehr nachweisbar. Das Enzym ließ sich durch Inkubation mit Ascorbat und Fe(II)-Salzen nicht reaktivieren, was auf seine vollständige Denaturierung hinweist.

Versuche, die Löslichkeit dieser Enzyme in heterologen Expressionssystemen zu verbessern, machen die Herstellung weiterer Konstrukte erforderlich, was das Testen anderer Vektorsysteme bzw. die Expression in einem eukaryotischen System einschließen würde. Ein weiterer möglicher Ansatz wäre durch Sequenz- und Strukturvergleiche der durch diese Arbeit auf drei erhöhte Anzahl von HPPD-Strukturen, an der Oberfläche lokalisierte Aminosäuren zu mutieren und dadurch eine Löslichkeitssteigerung des Proteins zu erreichen.

4.2. UNTERSUCHUNGEN AN HPPD AUS ZEA MAYS

4.2.1. Klonierung und heterologe Expression der HPPD aus *Zea mays* in *Escherichia coli*

Zu einem späteren Zeitpunkt im Verlauf dieser Arbeit wurde versucht, die von Linden (2000) durchgeführte heterologe Überexpression der HPPD aus *Z. mays* in *E. coli* zu reproduzieren. Dazu wurde das Plasmidkonstrukt Mais 4-HPPD in pET14b eingesetzt. Es konnte jedoch keinerlei Expression in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Auch der Wechsel zu anderen *E. coli* Stämmen und eine weitere Absenkung der Expressionstemperatur auf 16°C verbesserte die Löslichkeit des Proteins nicht.

Anhand der in Patent PCT/US97/11295 (Maxwell et al., 1997) dargestellten Aminosäuresequenz der Mais 4-HPPD fand das Programm PSORT (Nakai & Kanehisa, 1992) im N-terminalen Bereich eine einer Signalsequenz ähnliche Aminosäureabfolge. Aus diesem Grund wurde ausgehend vom Konstrukt Mais 4-HPPD in pET14b als Template (Linden, 2000) ein am N-Terminus um 16 Aminosäuren verlängertes Konstrukt hergestellt. Die so verlängerte Sequenz entspricht dem von Linden (2000) durch Isolierung des nativen Proteins aus Maiskeimlingen bestimmten N-Terminus. Als Primer für die unter 3.3.3.4. beschriebene

PCR wurden die Oligonukleotide Linker2 und CornC3*Bam*HI eingesetzt. Durch die in den Primern enthaltenen Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Bam*HI konnte das amplifizierte Gensegment in pET14b kloniert werden. Die Aminosäuresequenz des erhaltenen Genfragments der Mais HPPD (*zmHPPD*) ist in Abb. 13 dargestellt.

```
ASAAEQAAFRLVGHRNFVRFNPRSDRFHTLAFHHVELWCADAASAAGRFSFGLGAPLAARSD
LSTGNSAHASLLLRSGSLSFLFTAPYAHGADAATAALPSFSAAAARRFAADHGLAVRAVALR
VADAEDAFRASVAAGARPAFGPVDLGRGFRLAEVELYGDVVLRYVSYPDGAAGEPFLPGFEG
VASPGAADYGLSRFDHIVGNVPELAPAAAYFAGFTGFHEFAEFTTEDVGTAEGLNSMVLAN
NSENVLPLNEPVHGTRRSQIQTFLDHHGGPGVQHMALASDDVLRRTLREMQARSAMGGFEF
MAPPTSDYDGVRRRAGDVLTEAQIKECQELGVLVDRDDQGVLLQIFTKPVGDRPTLFLEII
QRIGCMEKDEKKGQEQKGGCGGFGKGNFSQLFKSIEDYEKSLEAKQ
```

Abb. 13: Aminosäuresequenz der 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase aus *Z. mays* kloniert in pET14b. Abgebildet ist die durch die Primer Linker2 und CornC3*Bam*HI N-terminal verlängerte Sequenz der 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase aus *Z. mays*. Als Template diente das Konstrukt Mais 4-HPPD in pET14b von Linden (2000), das mit Phe34 (fett gedruckt, Numerierung laut Maxwell et al., (1997)) beginnt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Expressionsbedingung für rekombinante *zmHPPD* etabliert. Diese erfolgte gemäß 3.2.6. in 1 Liter Expressionskulturen in *E. coli* BL21(DE3) unter stringenten Bedingungen (Induktion mit 0,75 % (w/v) α -Lactose bei einer OD₆₀₀ von 2, bei pH 5 und RT sowie einer Expressionsdauer von 24 Stunden). Eine SDS-PAGE Analyse zeigte, daß dieses Konstrukt der *zmHPPD* aus 418 Aminosäuren ein verbessertes Expressionsniveau hatte und ein geringer Anteil der Gesamtexpression in der löslichen Cytoplasmafraktion vorlag (s. Abb. 15).

Die verbesserte Expressionsrate ist vermutlich hauptsächlich auf den Einsatz von α -Lactose als Induktionsmittel zurückzuführen. Diese wird während der Inkubation im Gegensatz zu IPTG von den Zellen langsamer aufgenommen und verstoffwechselt, so daß der Expressionsdruck für die Zellen im Laufe der Zeit nachläßt. Auch durch die im Vergleich zu gängigen Expressionsprotokollen zeitlich sehr spät erfolgende Induktion bei OD₆₀₀ von 2, wenn sich die Zellen nicht mehr in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, und durch die starke Ansäuerung des Mediums, reduziert sich die Expressionsrate, wodurch jedoch gleichzeitig eine Löslichkeitssteigerung der heterologen Proteine erzielt werden kann.

4.2.2. Reinigung der rekombinanten HPPD aus *Zea mays*

Die Aufreinigung des Proteins erfolgte wie unter 3.4.8.1. beschrieben mittels des N-terminalen His-Tags über Co^{2+} -Talon-Affinitätschromatographie (Clontech, Palo Alto, CA, USA) in 50 mM Tris, pH 7 und 500 mM Imidazol. Die Ausbeute betrug ca. 10 mg lösliches Protein/l Bakterienkultur. Bei der Affinitätschromatographie eluierte *zm*HPPD in einem Peak. Wurde das Protein in geringer Menge einer SDS-PAGE unterworfen, zeigte sich in den ersten Eluatfraktionen eine Doppelbande bei einer Masse von knapp 45 kDa. Die Banden unterhalb wurden für Verunreinigungen und C-terminale Abbauprodukte gehalten, weil die N-terminale Sequenzierung eine identische Aminosäureabfolge wie die der größeren Bande ergab. Das heterolog exprimierte Protein wird demnach bereits in den Zellen oder während der Aufreinigung proteolytisch abgebaut. Die Abbaufragmente bleiben vermutlich fest aneinander gebunden und werden nur unter denaturierenden Bedingungen, wie der SDS-PAGE, voneinander getrennt. Würden die Abbauprodukte leicht assoziiert vorliegen, sollten sie im Verlauf der weiteren Proteinreinigung, nach Abspaltung des His-Tags und erneuter Chromatographie, vom intakten Protein abgetrennt werden. Eine solche Abtrennung der Verunreinigungen war jedoch weder durch Gelfiltrationschromatographie unter nicht denaturierenden Bedingungen, noch unter Einsatz gering konzentrierter Detergentien möglich.

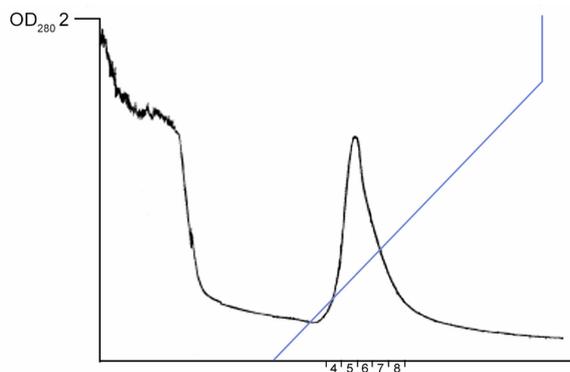


Abb. 14: Chromatogramm der Reinigung rekombinanter *zm*HPPD über Co^{2+} -Talon-Affinitätschromatographie

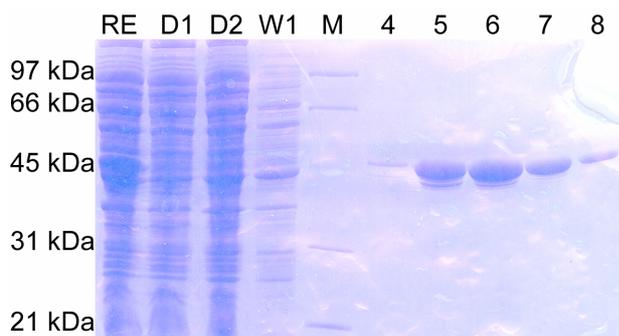


Abb. 15: SDS-PAGE Analyse der Reinigung rekombinanter *zm*HPPD aus *E. coli*
 RE: Zellrohextrakt
 D1/D2: Durchlauf Säule bei Beginn bzw. am Ende der Säulenbeladung
 W1: Waschfraktion
 M: Molekulargroßenstandard (Größenangaben links)
 4-8: Elution mit Imidazolgradient

Mittels des unter 3.4.9. beschriebenen Aktivitätstests konnte Aktivität des rekombinanten Enzyms nachgewiesen werden. Diese betrug ca. 60 nmol/mg Protein und Minute.

Der N-terminale His-Tag wurde mit Thrombin abgespalten und eine weitere Chromatographie über eine Resource Q Säule durchgeführt (s. 3.4.8.2.), um His-Tag und Thrombin aus dem Ansatz zu entfernen.

Das aufgereinigte Protein wurde sowohl mit, als auch ohne His-Tag über Ultrafiltration bis zu einer Konzentration von 65 mg/ml eingengt und dabei gleichzeitig in 10 mM Hepes, pH 7 umgepuffert (s. 3.4.2.).

4.2.3. Kristallisation der *zmHPPD*

Die gereinigte *zmHPPD* wurde sowohl mit als auch ohne His-Tag in 10 mM Hepes, pH 7 in *screening* Experimenten unter Verwendung der *sitting drop* Methode (s. 3.5.1.) eingesetzt.

Das Protein ohne His-Tag kristallisierte nach acht Tagen in Form verwachsener Quader mit Kantenlängen von ca. 0,3 x 0,4 x 0,5 mm³ in einer aus 372 getesteten Kristallisationsbedingungen. Die Kristallisationstropfen setzten sich aus 2,5 µl Proteinlösung (5 mg/ml) und 2,5 µl Präzipitanslösung (0,1 M n-(2-Acetamido)iminodiessigsäure, pH 6,5; 12 % (w/v) PEG 6000; 0,1 M MgCl₂) zusammen. In nachfolgenden Röntgenbeugungsexperimenten erwiesen sich diese Kristalle jedoch als nicht streuend. Weitere Kristallisationsversuche zur Reproduktion und Verbesserung der Streuleistung dieser Kristalle schlugen fehl, die Kristalle konnten nicht reproduziert werden.

Das Protein mit His-Tag kristallisierte nach einem Tag in Form kleiner Nadeln in einer aus 372 getesteten Kristallisationsbedingungen. Die Kristallisationstropfen setzten sich aus 2,5 µl Proteinlösung (15 mg/ml) und 2,5 µl Präzipitanslösung (0,1 M Hepes, pH 7,5; 70 % (v/v) MPD) zusammen. Versuche zur Optimierung der Parameter führten zunächst zu keiner definierten Kristallisationsbedingung. Durch Variation der MPD-Konzentration im Bereich von 40 – 80 %, des pH-Werts zwischen 6 und 8,5, Variation der Puffersubstanzen und Zugabe von Additiven wuchsen im Verlauf einer Woche Kristalle, die jedoch nur die Form eindimensionaler Platten erreichten und sich in Röntgenbeugungsexperimenten als nicht streuend erwiesen.

Zur weiteren Optimierung wurde die Präzipitanskonzentration variiert und die Präzipitantien gegen niedermolekulare Polyethylenglykole ausgetauscht. Durch Austausch der Puffersubstanzen bei gleichzeitiger Variation des pH-Wertes und Variation des Tropfenverhältnisses konnte eine weitere Kristallisationsbedingung bestimmt werden:

0,1 M Cacodylat, pH 6,5; 40 % (v/v) MPD; 7 % PEG 8000

Die aus dieser Bedingung wachsenden Kristalle konnten durch Zugabe von Dichlormethan als Additiv verbessert werden. Eine 70 %ige Verdünnung der Präzipitanslösung wurde mit der Proteinlösung im Verhältnis 2:3 versetzt und den Tropfen je 0,8 μl 0,025 % (v/v) Dichlormethan zugegeben. Einzelne Kristalle wuchsen innerhalb von etwa drei Wochen bis zu einer Größe von ca. $0,2 \times 0,1 \times 0,5 \text{ mm}^3$.

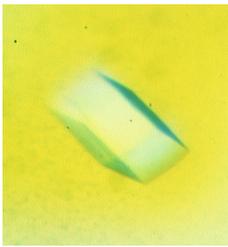


Abb. 16: Kristall der rekombinanten *zmHPPD* Die Kantenlängen des Kristalls betragen etwa $0,2 \times 0,1 \times 0,5 \text{ mm}^3$. Die Kristalle wuchsen innerhalb von etwa drei Wochen aus einer 70 %igen Verdünnung von 0,1 M Cacodylat, pH 6,5; 40 % (v/v) MPD; 7 % PEG 8000 mit Dichlormethan als Additiv.

Die Kristalle zeigten ein ausreichendes Streuvermögen, das jedoch stark anisotrope Eigenschaften aufwies. Weitere Kristallisationsexperimente zur Verbesserung der Kristalleigenschaften konnten diese Anisotropie nicht reduzieren. Die Kristallisation des Proteins war stark von der Reinheit des Proteins abhängig, die trotz der einfachen Reinigungsmethode von Präparation zu Präparation stark schwankte. Auch die Reproduktion des geeigneten Kristallisationspuffers erwies sich aufgrund seiner hohen MPD-Konzentration und dessen Verdünnung im Tropfen als schwierig. Die Keimbildung blieb auch unter der etablierten Bedingung ein kritischer Punkt. Teilweise bildete sich bereits kurz nach dem Pipettieren des Kristallisationstropfens Präzipitat. In der Regel befanden sich bereits am folgenden Tag hunderte Nadeln im Tropfen, die nicht mehr weiterwuchsen, da der größte Teil des Proteins bereits kristallisiert vorlag. Kristalle mit mehr als 0,1 mm Kantenlänge bildeten sich sehr selten. Zur Erzeugung größerer Kristalle war auch das Animpfen frischer Kristallisationstropfen ungeeignet, da alle Versuche von *macro-* und *micro seeding* zur sofortigen Präzipitation des Proteins im neuen Tropfen führten. Wahrscheinlich liegen die Keimbildungs- und Kristallisationskonzentrationen nur wenig unterhalb der Präzipitationsgrenze des Proteins.

Die Entwicklung neuer selektiver Inhibitoren steht im Pflanzenschutz bei der Bekämpfung von meist monokotylen „Unkräutern“ im Mittelpunkt des Interesses. Die Röntgenstrukturanalyse von Inhibitor-komplexen der pflanzlichen HPPDs würde eine weitergehende Charakterisierung der Architektur des aktiven Zentrums ermöglichen. Jedoch

war es bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, solche Komplexstrukturen zu lösen. Durch Kokristallisationsversuche der *zmHPPD* mit unterschiedlichen Inhibitoren, die von Bayer CropScience zu Verfügung gestellt wurden, konnte keine einzige Kristallisationsbedingung identifiziert werden. Auch *soaking* Experimente waren nicht erfolgreich, da sich die Kristalle entweder als zu instabil und nachfolgend nicht mehr streuend erwiesen oder weil auch nach mehrstündiger Inkubation keine Dichte eines gebundenen Inhibitors identifiziert werden konnte.

4.2.4. Datensammlung und Datenauswertung

Ein erster nativer Datensatz (NATI) von *zmHPPD* Kristallen mit einer Auflösung von 2,9 Å wurde mit Graphit-monochromatisierter Cu-K α -Strahlung ($\lambda = 1,5418$ Å) auf einer *Image Plate* der Firma MarResearch, die auf einem Rigaku-Drehanoden-Röntgengenerator installiert war, gemessen. Die Datensammlung erfolgte am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. Dazu wurden die Kristalle in Schlaufen aus Nylon aufgenommen und im Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren. Ein Pufferwechsel war nicht nötig, da sich die Kristallisationsbedingung aufgrund der MPD- und PEG-Konzentration als *cryotauglich* erwies und die Mutterlauge der Kristalle als *Cryoprotektans* ausreichend war. Die Aufnahmen wurden über einen Messbereich von 100° mit einem Drehwinkel von 0,5° durchgeführt.

Zum Erzielen einer höheren Auflösung wurde eine zweite Messung nativer *zmHPPD* Kristalle an der Beamline BW6 (Deutsches Elektronen Synchrotron, DESY, Hamburg) durchgeführt. Die Datensammlung am Synchrotron erfolgte bei 100 K auf einem CCD-Detektor (MarResearch, Hamburg). Die Kristalle wurden in gefrorenem Zustand montiert und die Diffraktionsbilder bei der Wellenlänge $\lambda = 1,050$ Å aufgenommen. Der Drehwinkel je Aufnahme betrug 0,3° über einen Messbereich von 90°. Die Kristalle streuten bis zu einer maximalen Auflösung von 1,81 Å. Eine Diffraktionsaufnahme eines nativen *zmHPPD* Kristalls, aufgenommen mit einem CCD-Detektor, ist in Abb. 17 dargestellt.

Zur Bestimmung der Kristallorientierung, Raumgruppe, Elementarzellenparameter sowie zur Integration der Reflexintensitäten wurden die Programme MOSFLM v6.10 (Leslie, 1998) bzw. DENZO (Otwinowski & Minor, 1997) eingesetzt. Die Datenreduktion wurde mit den Programmen SCALA (CCP4, 1994) bzw. SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) durchgeführt.

Das Verhältnis von Zellvolumen zu molekularer Masse $V_m = 2,41 \text{ \AA}^3/\text{Dalton}$ zeigte das Vorliegen zweier *zmHPPD* Dimere in der asymmetrischen Einheit bei einem Solvensgehalt von 49 % an.

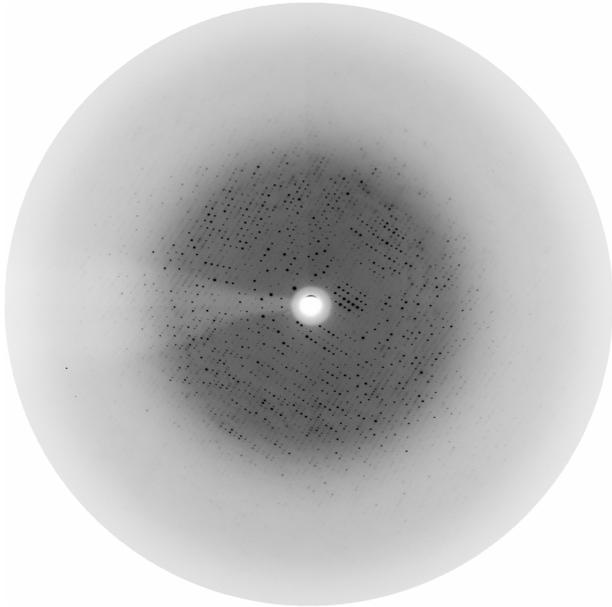


Abb. 17: Beugungsbild einer Rotationsaufnahme der nativen *zmHPPD* Die Auflösung am Detektorrand beträgt $1,81 \text{ \AA}$, der Plattenabstand 118 mm , die Rotation $0,3^\circ$ und die Wellenlänge $1,05 \text{ \AA}$.

4.2.5. Strukturlösung durch *Single Isomorphous Replacement* (SIR)

Die Lage der Proteinmoleküle in der asymmetrischen Einheit konnte über Pattersonsuche (*Molecular Replacement*) mit dem Programm AMoRe (Navaza, 1994) und den Koordinaten der 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase aus *P. fluorescens* (PDB Eintrag 1CJX (Serre et al., 1999)) nicht bestimmt werden.

Um Derivate der *zmHPPD* zu erhalten, wurden native Kristalle (NATI) mit verschiedenen Schweratomlösungen inkubiert. Durch Einlegen der Kristalle in 1 mM Thiomersal (Natriumethylmercuriothiobenzoat, $\text{C}_2\text{H}_5\text{-HgS-C}_6\text{H}_4\text{COONa}$) über einen Zeitraum von 12 Stunden konnte ein Schweratomderivat (DERI) erhalten werden. Bei der anschließenden Berechnung der Differenz-Patterson-Funktion zwischen NATI und DERI wurden die Schweratompositionen von sechs Hg-Atomen aus DERI mit dem Programm SHELXS (Sheldrick, 1990) eindeutig identifiziert. Jeweils drei der Quecksilberpositionen konnten einem Dimer zugeordnet und die nicht-kristallographischen Symmetrieoperatoren abgeleitet werden, die die beiden Dimere ineinander überführen.

Die Verfeinerung der Schweratomparameter und die Berechnung der Phasen erfolgte mit dem Programm MLPHARE (Otwinowski, 1991) unter Einbeziehung isomorpher und anomaler

Streubeiträge im Auflösungsbereich bis 3 Å. Phasen aus dem *Single Isomorphous Replacement* hatten nach Einbeziehung anomaler Streubeiträge einen *mean figure of merit* von 0,23. Die Überprüfung der Differenz-Fourier-Dichte zeigte eine nicht ausreichend gut interpretierbare Elektronendichtekarte, da die Molekül Grenzen nicht definiert waren. Die Phasen konnten durch *solvent flattening* und Dichtemodifizierung mit dem Programm DM (Cowtan, 1994) verbessert werden. Die Positionen der Quecksilberatome und partielle Proteinmodelle wurden zur Identifizierung der nicht-kristallographischen Symmetrieeoperatoren eingesetzt, die mit dem Programm IMP (Kleywegt & Jones, 1994) verfeinert wurden. Der Raum eines Dimers wurde mit Proteinfragmenten ausgefüllt, die Lösungsmittelgrenze ohne Überlappung mit symmetrieverwandten Molekülen oder dem zweiten Dimer in der asymmetrischen Einheit gebildet. Das Programm MAMA (Kleywegt & Jones, 1996) wurde eingesetzt, um um den so mit Atomen aufgefüllten Bereich eine Maske zu berechnen und darin enthaltene Hohlräume aufzufüllen. Die Mittelung der Elektronendichte über die nicht-kristallographische Symmetrie erfolgte mit dem Programm AVE (Kleywegt & Jones, 1994).

4.2.6. Modellbau und Verfeinerung

Die vierfach gemittelte SIR-Dichte wurde im Bereich von 34,1 bis 3 Å berechnet und ließ eine Anzahl längerer β -Stränge und α -Helices erkennen. Das atomare Modell wurde zunächst für ca. 350 Aminosäuren als Polyalanin in die Dichte gebaut. Die Zuordnung von Teilen der Aminosäuresequenz gelang durch Vergleich mit der Tertiärstruktur der HPPD aus *P. fluorescens*. Das erste Modell umfaßte 358 Reste von Arg40 bis Asp398. Der Aufbau des Dimers erfolgte über die zweizählige kristallographische Symmetrie, anschließend wurde das zweite Dimer mit Hilfe der *ncs*-Operatoren aufgebaut und manuell im Programm MAIN (Turk, 1992; Turk, 1996) in die Elektronendichte eingepaßt. Mit dem höher aufgelösten nativen Datensatz wurde eine *rigid body* Verfeinerung durchgeführt. Die weitere Verfeinerung erfolgte bei einer Auflösung von 2 Å mit CNS (Brünger et al., 1998), wobei die nicht-kristallographische Symmetrie durch *ncs-restraints* auf die Abweichung *ncs*-verwandter Moleküle berücksichtigt wurde. Die initialen R-Faktoren betragen 58,5 % bzw. 55,3 % (R_{free}), wobei der freie R-Faktor mit 5 % der Reflexe berechnet wurde.

Tabelle 2 zeigt die Statistik der SIR-Datensammlung des Hg-Derivats (DERI) und des nativen Datensatzes (NATI).

Tabelle 2: Datenprozessierungsstatistik der *zm*HPPD

DATENSAMMLUNG	NATI	DERI (Hg)
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten [Å, °]		
a	89,0	89,0
b	110,9	111,3
c	174,8	174,6
α=β=γ	90	90
Einheitszellvolumen [Å ³]	1723319,5	1722535,2
V _m [Å ³ /Da]	2,41	2,41
Wassergehalt [%]	49	49
Anzahl der Monomere pro asymmetrischer Einheit	4	4
begrenzende Auflösung [Å]	2,0	3,0
gemessene Reflexe	377176	136536
unabhängige Reflexe	115602	33799
Multiplizität	3,26	4,04
I/σ	16,69 (1,71)	12,31 (4,21)
Vollständigkeit der Daten [%]	98,6 (96,2)	95,6 (88,9)
R _{merge}	8,2 (49,3)	11,2 (24,4)

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum (I - \langle I \rangle)}{\sum I}$$

Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der jeweils äußersten Auflösungsschale (2,07 - 2,0 Å (NATI) bzw. 3,11 – 3,0 Å (DERI)).

Jedem Verfeinerungsschritt folgte ein manuelles Überbauen des Modells mit dem Programm MAIN (Turk, 1992), bei dem auch die automatisch positionierten Solvensmoleküle überprüft, bei Bedarf entfernt oder weitere Moleküle eingefügt wurden. Die finalen Verfeinerungsschritte schlossen anisotrope B-Faktorverfeinerung ein.

Tabelle 3: Phasierungsstatistik des DERI-Datensatzes

Anzahl der Schweratompositionen	6
<i>Phasing Power</i> (centric/acentric)	1,04 / 0,78
Isomorphe Differenz	24,1
<i>Mean figure of merit</i>	0,23

4.2.7. Qualität des Modells

In der verbesserten Elektronendichtekarte war nach Dichtemodifikation (*solvent flattening*) die Orientierung der meisten Aminosäuren aller vier Monomere sichtbar. Es konnten 388 der 418 Aminosäuren von Monomer A, 392 von Monomer B, 386 von Monomer C und 393 von Monomer D der *zmHPPD* in die Dichte eingebaut werden. Außerdem konnte die Position der vier katalytischen Eisenatome, sowie von 847 Wassermolekülen bestimmt werden. Abschließend wurde das *zmHPPD* Atommodell bis zu einem R-Faktor von 27,5 % (freier R-Faktor 32,4 %) bei einer maximalen Auflösung von 2 Å verfeinert. Für die Reste Glu249 bis Glu255, sowie die ersten 16 bis 19 N-terminalen und die letzten drei bis vier C-terminalen Aminosäurereste zeigte sich auch in diesem Stadium der Verfeinerung keine interpretierbare Dichte in allen vier Monomeren. Das Fehlen der Dichte der N-terminalen Reste bis Asn33 ist in diesem Zusammenhang besonders bemerkenswert, da die von Linden (2000) isolierte cDNA der *zmHPPD* ebenfalls erst mit Phe34 beginnt. Die Qualität der vierfach gemittelten Dichte im Bereich der Reste Lys397 bis Glu403 eines *loops* in jedem der vier Monomere war nicht ausreichend, um die genaue Lage der Aminosäuren zu bestimmen. Außerdem waren die Seitenketten der Aminosäuren Lys414, sowie Phe417, Phe421, Ile424, Glu425, Lys429 und Leu431 der C-terminalen Helix in der $2F_o - F_c$ Dichte einzelner Monomere teilweise nicht definiert.

Die Überprüfung der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette des *zmHPPD* Modells ergab, daß sich 89,1 % aller Aminosäuren (ausgenommen Prolin und Glycin) in dem am meisten bevorzugten Bereich und 10,5 % im zusätzlich erlaubten Bereich befinden. Sechs der Aminosäuren zeigen eine Bindungsgeometrie, die in den weitläufig erlaubten, aber keine, die in den verbotenen Bereich der Ramachandranstatistik (Ramachandran & Sasisekharan, 1968) fällt. In Abb. 18 ist die Ramachandranstatistik aller Aminosäuren des finalen *zmHPPD* Modells dargestellt. Die Qualität des verfeinerten Modells wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) überprüft. Die Verfeinerungsstatistik des endgültigen Modells ist in Tabelle 4 zusammengefaßt.

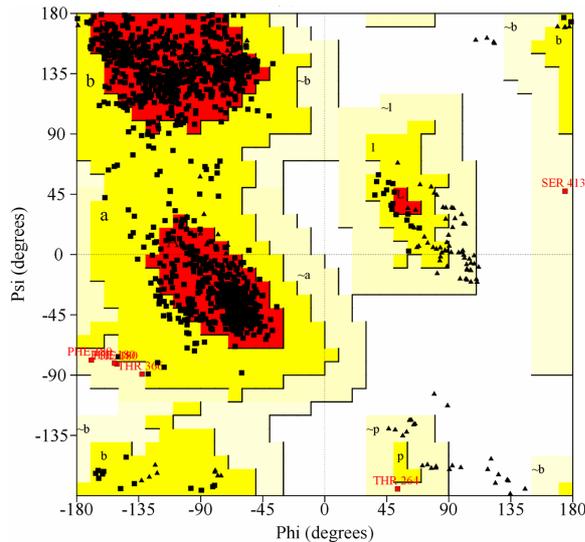


Abb. 18: Ramachandran-Plot des finalen *zmHPPD* Modells Dargestellt sind die dihedralen Hauptkettenwinkel Phi und Psi des finalen *zmHPPD* Modells. Die für L-Aminosäuren erlaubten Bereiche sind gelb, die günstigsten Regionen rot gekennzeichnet. Weiße Flächen definieren sterisch verbotene Bereiche. Von den insgesamt 1534 Resten sind 1298 weder Glycin (dargestellt als Dreiecke) noch Prolin.

Tabelle 4: Verfeinerungstatistik für *zmHPPD*

VERFEINERUNG	
Auflösungsbereich	19,84-2,0
verwendete Reflexe	115214
Reflexe im Arbeitsset	109404
Reflexe im Testset	5810
R-Faktor [%]	27,5
R _{free} [%]	32,4
r.m.s.-Abweichungen von Idealwerten der	
Bindungslängen [Å]	0,010
Bindungswinkel [°]	1,81
Mittlerer B-Faktor [Å ²]	
Hauptkettenatome	40,03
Seitenkettenatome	41,29
Solvensmoleküle	48,91
Metallatome	60,53
Anzahl der Reste in der asymmetrischen Einheit	
Proteinatome (ohne Wasserstoff)	11813
Solvensmoleküle	847
Metallatome	4
(Φ, Ψ)-Winkelverteilung im	
bevorzugten Bereich [%]	89,1
zusätzlich erlaubten Bereich [%]	10,5

$$R = \frac{\sum (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|)}{\sum |F_{\text{obs}}|}$$

R_{free} wurde mit 5 % zufällig ausgewählter Reflexe berechnet, die von der Verfeinerung ausgeschlossen wurden.

4.2.8. Strukturbeschreibung der HPPD aus *Zea mays*

4.2.8.1. Dreidimensionale Topologie

Die asymmetrische Einheit der zur Raumgruppe $P2_12_12_1$ gehörenden Kristalle der *zmHPPD* enthält vier Moleküle der Polypeptidkette (Monomere A bis D) mit einem Molekulargewicht von je 44,8 kDa, die zu je zwei Dimeren zusammengelagert sind. Die Dimere können durch *ncs*-Operatoren ineinander überführt werden und sind strukturell identisch, was an der Überlagerung ihrer 769 C α Atome deutlich wird, die r.m.s. Abweichungen von 0,26 Å ergibt. Das Monomer der *zmHPPD* weist ein α/β -Faltungsmuster auf, dessen Kernbereich aus parallelen und antiparallelen β -Strängen besteht, die von α -Helices umgeben sind und zwei strukturelle Domänen, ein N- und C-terminales β -Barrel, aufbauen.

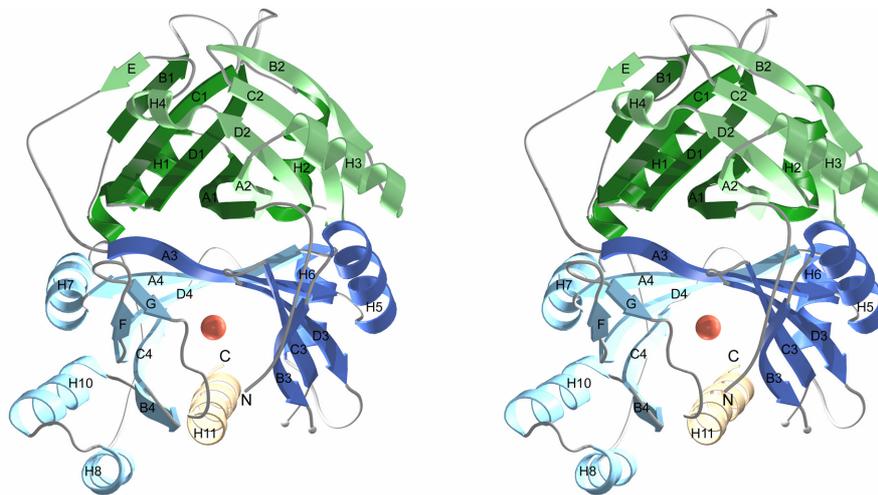


Abb. 19: Stereobild des *zmHPPD* Monomers Dargestellt ist das Monomer der *zmHPPD* in Ribbonpräsentation. Es besteht aus zwei Domänen, die aus geöffneten β -Barreln (grün und blau) gebildet werden. Beide Domänen werden aus je zwei fast identischen Modulen (hell- und dunkelgrün bzw. hell- und dunkelblau) aufgebaut. Die Position des katalytischen Eisenatoms in der C-terminalen Domäne ist durch eine rote Kugel gekennzeichnet. Die flexible C-terminale Helix H11 ist hellbraun dargestellt.

Die kleinere N-terminale Domäne, die keine katalytische Funktion hat, wird von den Resten Arg36 bis Asp211 gebildet und besteht aus den α -Helices H1 bis H4, sowie neun β -Strängen A1 bis D1, A2 bis D2 und E. Das β -Barrel ist weiter geöffnet als das C-terminale und dadurch für das umgebende Lösungsmittel besser zugänglich.

Das katalytische Fe(II) Atom wird von den Aminosäuren His219, His301 und Glu387 der C-terminalen Domäne (Reste Tyr212 bis Glu432) koordiniert, die aus den α -Helices H5 bis H11 und dem β -Barrel aus den Strängen A3 bis D3, A4 bis D4, sowie F und G aufgebaut

wird. Dieses Barrel, das eine wannenartige Form aufweist, wird durch die C-terminale Helix H11 gegenüber der Umgebung hermetisch abgeschlossen. Wie am Alignment (s. Abb. 27) deutlich sichtbar ist, befinden sich die meisten der konservierten Reste in der C-terminalen Domäne und gehören der Gruppe von Aminosäuren an, die das aktive Zentrum aufbaut.

Die Barrel beider Domänen sind über eine unechte zweizählige Achse gegeneinander gepackt, so daß sie im Zentrum des Monomers ein ausgedehntes β -sandwich bilden. Dieser Bereich wird von insgesamt 10 α -Helices flankiert, wobei Helix H2, ähnlich Helix H11 in der C-terminalen Domäne, die Öffnung des N-terminalen Barrels teilweise verschließt.

Jede Domäne besteht aus zwei topologisch identischen Modulen, die aus vier β -Strängen in der Abfolge A-D-C-B mit *up-up-down-up* Topologie gebildet werden. Beide Module bauen ein antiparalleles Faltblatt zwischen ihren β -Strängen A1 und A2 auf, was zum insgesamt achtsträngigen β -Barrel führt. Die β -Stränge A und B jedes Moduls werden durch eine α -Helix (H1, H3, H5 und H7) miteinander verbunden. Das Verbindungsstück zwischen den Modulen 2 und 3, gleichzeitig zwischen N- und C-terminaler Domäne, enthält zusätzlich Helix H4 und den kurzen β -Strang E, der antiparallel zu B1 am äußeren Randbereich von Modul 1 verläuft. Die Module 3 und 4 werden durch α -Helix H6 verbunden. Das C-terminale Modul 4 weist größere Abweichungen in der Sekundärstrukturabfolge auf. Diese werden durch die Insertion der Helices H8 und H10 vor β -Strang B4 und durch ein kleines Faltblatt aus den Strängen F und G verursacht. Dieses Faltblatt verbindet das C-terminale Barrel mit Helix H11 und ragt wie ein etwa 17 Å langer *hairpin* aus dem Protein in das umgebende Solvens hervor. Es wird aus den Aminosäureresten Cys394 bis Gly408 gebildet und ist mit Ausnahme der Aminosäuren Asp398 bis Glu403 in der *loop* Region durch die $2F_o - F_c$ Dichte eindeutig definiert. Es ist an keinerlei Kontakten zum übrigen oder zu symmetrieverwandten Molekülen beteiligt. Die ihn aufbauenden Aminosäuren weisen ein konserviertes I(V)GCMxKDE(D)xGxxYGxGGC-Motiv auf, kommen ausschließlich in den Sequenzen der bisher bekannten pflanzlichen HPPDs vor und sind im Alignment im Vergleich zu anderen eukaryotischen und bakteriellen Enzymen als C-terminale Insertion von ca. 15 Aminosäuren zu erkennen (s. Abb. 2). Dieser Bereich wird durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys394 und Cys409 stabilisiert, die in der Dichte der Monomere A und C zu erkennen ist.

Der Vergleich aller vier Module zeigt, daß ihrem Aufbau ein generelles $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ -Abfolgemuster zugrunde liegt, wobei sich bei der zweiten α -Helix Abweichungen ergeben, weil diese gleichzeitig die Modul-verbindende Sequenz darstellt.

4.2.8.2. Anordnung der Untereinheiten zum *zmHPPD* Dimer

Das enzymatisch aktive Dimer der *zmHPPD* wird durch zwei Untereinheiten über die zweizählige Achse aufgebaut. Durch diese Anordnung wird ein Bereich von 1544 Å² der Monomeroberfläche vom Lösungsmittel abgeschirmt. An der Dimerisierung sind vor allem Interaktionen zwischen den N-terminalen Domänen beteiligt, Kontakte zwischen den C-terminalen Domänen bestehen nicht. Wechselwirkungen zwischen N- und C-Terminus machen dagegen nur einen kleinen Teil der Dimerisierungsfläche aus.

Im Zentrum der Kontaktfläche liegen die Helices H1 und H2, die jeweils der korrespondierenden Helix des zweiten Monomers gegenüberliegen. Dabei sind die beiden Helices H1 relativ zur zweizähligen Achse um etwa 20° verkippt, während die Helices H2 rechtwinklig zu dieser verlaufen. Weitere an der Dimerisierung beteiligte Bereiche der N-terminalen Domäne sind die *loops* zwischen Ser81 und Gly83, sowie zwischen Ala103 und Gly108. Der letztgenannte Sequenzbereich bildet gleichzeitig eine Begrenzung zur C-terminalen Helix H11 des benachbarten Monomers.

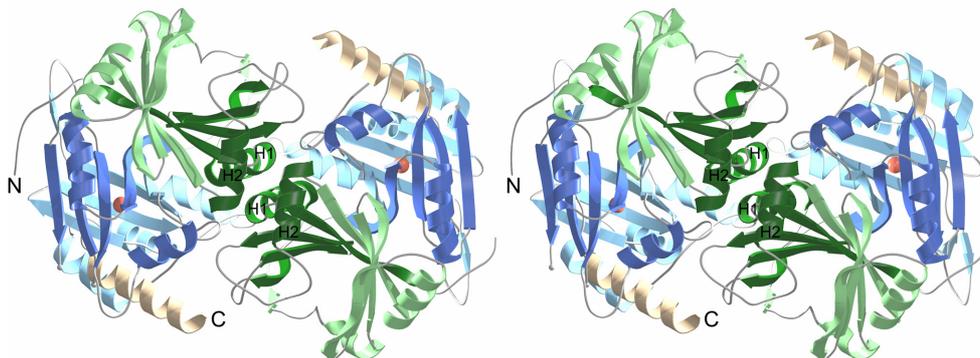


Abb. 20: Ribbondarstellung des *zmHPPD* Dimers Der Blick verläuft entlang der zweizähligen Symmetrieachse. Die N-terminale Domäne ist blau, die C-terminale Domäne grün, das katalytische Eisenatom rot dargestellt. Das Zentrum der Kontaktfläche wird von den Helices H1 und H2 gebildet.

Die Reste der C-terminalen Domäne, die zur Dimerisierung beitragen, befinden sich ausnahmslos in Sekundärstruktur-verbindenden Bereichen. Hierzu zählen die *loops* zwischen Ser320 und Gly324, sowie zwischen Gly379 und Pro382, die teilweise Kontakte zur benachbarten Helix H1 ausbilden. Der *loop* zwischen Asp292 und Gly295 kontaktiert wie derjenige zwischen Ser320 und Gly324 den N-terminalen Bereich zwischen Ala103 und Gly108.

Die Kontakte zwischen den Untereinheiten werden größtenteils durch hydrophile Wechselwirkungen vermittelt, woran die Seitenketten der Reste Asp58, Arg65, Tyr105,

Asp380 und Arg381 beteiligt sind. Diese Reste sind in den Sequenzen der pflanzlichen HPPDs streng konserviert. Zusätzlich sind die nichtkonservierten Aminosäurereste Ser61, das auch ein Asparaginrest sein kann, und His107, welches teilweise gegen Asparagin oder Prolin ausgetauscht ist, beteiligt.

Ein auffallender hydrophober Kontakt wird durch *stacking* von Phe68 zwischen beiden Monomeren hergestellt. Ein aromatischer Aminosäurerest ist an dieser Position in allen pflanzlichen Enzymen konserviert. Zusätzlich wird die Kontaktfläche durch eine weitere hydrophobe Wechselwirkung zwischen der Seitenkette von Met322, die in die aus den nicht konservierten Resten Pro73 und Ala210 des benachbarten Monomers gebildete kleine Tasche ragt, stabilisiert.

4.2.8.3. Das aktive Zentrum und Bindung von Eisen

Das aktive Zentrum des Enzyms befindet sich in einer tiefen Tasche innerhalb des achtsträngigen C-terminalen β -Barrels, die einen Bereich von etwa 8 bis 14 Å einschließt und vornehmlich von hydrophoben (Ile220, Val221, Phe246, Leu258, Val262, Pro273, Leu274, Ala303, Leu304, Leu370, Ile373, Phe374, Phe385, Leu386, Ile388, Ile389, Phe412, Phe417, Leu420 und Phe421) und einigen polaren Resten (Asp218, Ser260, Asn275, Gln286, Gln300, Met302, Glu372, Arg391 und Lys414) gebildet wird. Mit Ausnahme von Phe412 und den ihm benachbarten Glycinresten 411 und 413 befinden sich alle Aminosäurereste auf Sekundärstrukturelementen. Von diesen Resten sind mit Ausnahme von Ile220, Val221, Phe246, Val262, Leu274, Met302, Leu304, Leu386 und Ile388 alle übrigen in den bisher bekannten HPPD Sequenzen strikt konserviert.

Die Aminosäurereste Gln286 und Gln300 haben keinen Einfluß auf den hauptsächlich hydrophoben Charakter des aktiven Zentrums. Sie sind etwa 13,9 Å und 6,6 Å vom katalytischen Eisenatom entfernt und könnten an der Substratbindung und dessen korrekter Orientierung beteiligt sein. Weitere polare Seitenketten, die in einem Radius von etwa fünf bis acht Å um das Eisenatom orientiert sind, stammen von den Aminosäureresten Asn275 und Gln372.

Der Grund des Barrels wird durch Wasserstoff- bzw. Salzbrücken zwischen den konservierten Resten Asp218 und His219, Asp218 und Arg391, Glu387 und Gln372, sowie Arg391 und Gly411 abgeschlossen und stabilisiert. Dadurch wird der Zugang des Substrates beschränkt und kann nur durch den unter der C-terminalen Helix liegenden Bereich erfolgen (s. Abb. 21).

Der Zugangsbereich weist die Form einer Rinne auf, deren Seitenwände größtenteils von den Seitenketten der hydrophoben und apolaren Reste Leu80, Thr289, Pro377, Val378, Pro382 und Phe385 gebildet werden.

Die Seitenketten einiger Aminosäurereste (Arg283, Ile424, Glu428, Leu431, Glu432), die teilweise am Aufbau der C-terminalen Helix beteiligt sind, sind ebenfalls zu dieser Rinne hin orientiert. Die Helix schirmt die Zugangsrinne vom Lösungsmittel ab, so daß das aktive Zentrum mit Ausnahme der das Eisenatom koordinierenden Wassermoleküle nur wenige Lösungsmittelmoleküle aufweist.

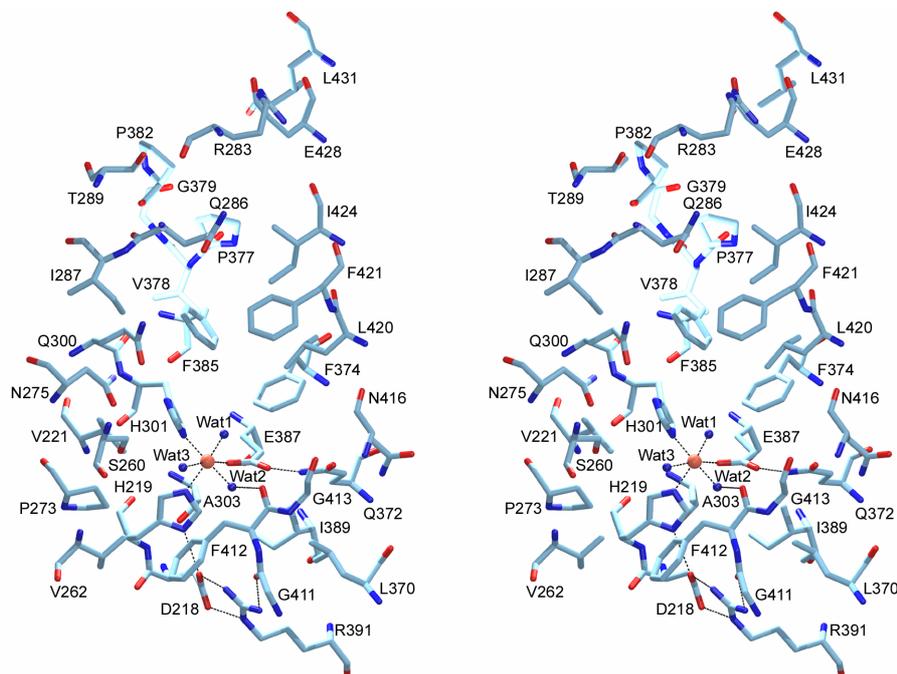


Abb. 21: Das aktive Zentrum der *zmHPPD* mit dessen Zugangsbereich Dargestellt sind die Reste des aktiven Zentrums in einem Umkreis von etwa 14 Å Durchmesser um das katalytische Eisenatom (rot), sowie die den Zugangsbereich bildenden Aminosäuren. Ile220, Leu274, Met302, Leu304, Ile373, Leu386, Ile388 und Lys414 sind zur besseren Übersicht nicht dargestellt. Ebenso fehlt Phe417, dessen Seitenkette in allen vier Monomeren der asymmetrischen Einheit ungeordnet ist.

Das Eisenatom wird durch die Seitenketten von His219 ($N^{\epsilon 2}$), His301 ($N^{\epsilon 2}$) und Glu387 ($O^{\epsilon 1}$) koordiniert, die sich auf den β -Strängen A3, A4 bzw. D4 befinden. Die Temperaturfaktoren aller vier Eisenatome der *zmHPPD* liegen zwischen 40 und 76 Å² und sind nur in Monomer C mit den Temperaturfaktoren der das Metallion ligierenden Atome vergleichbar, was darauf hinweist, daß die Positionen in den Monomeren A, B und D nicht vollständig durch Eisen besetzt sind.

Die Oxidation des für die Enzymaktivität nötigen Fe^{2+} wegen der unter aeroben Bedingungen erfolgten Aufreinigung und Kristallisation kann anhand dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Sowohl die Struktur der bakteriellen HPPD aus *P. fluorescens* (Serre et al., 1999) als auch die der 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase aus *Pseudomonas* sp. (Uragami et al., 2001) wurden in inaktiver Form mit Fe^{3+} im aktiven Zentrum gelöst. Die Aktivität dieser Enzyme konnte allerdings ebenso wie die der hier untersuchten *zm*HPPD durch Zugabe von Ascorbat wieder hergestellt werden.

Nach dem Einpassen der Eisenatome war immer noch positive F_o-F_c Dichte rund um die Metallionen in einem Abstand von 1,7 bis 2,4 Å erkennbar. Diese wurde in den Monomeren B, C und D als drei Wassermoleküle (Wat1, Wat2 und Wat3) identifiziert, in Monomer A sind nur zwei Wassermoleküle durch die $2F_o-F_c$ Elektronendichte an den Positionen Wat1 und Wat3 definiert. Wat2 wird in den Monomeren B, C und D durch eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff von Phe412 stabilisiert.

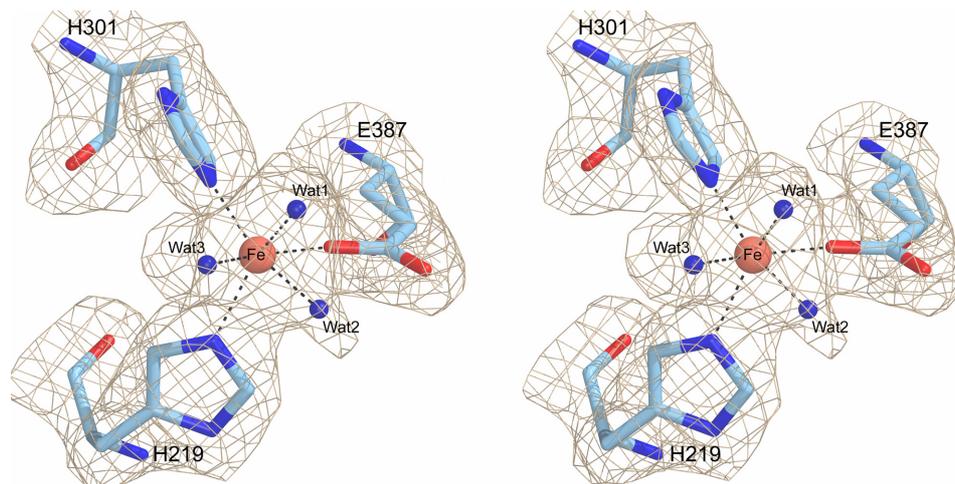


Abb. 22: Darstellung der Eisen-Koordination im aktiven Zentrum der *zm*HPPD Das katalytische Eisenatom der HPPD wird oktaedrisch durch drei Aminosäurereste (His219, His301 und Glu387) sowie drei Wassermoleküle koordiniert. Die $2F_o-F_c$ Elektronendichte ist bei 1σ konturiert.

Die Abstände der drei Wassermoleküle zum Eisenatom wurden während der Verfeinerungszyklen auf 2,1 Å fixiert, um ihre Verschiebung zu van der Waals Abständen zu vermeiden, was zu ihrer Lokalisation außerhalb der korrespondierenden Dichte geführt hätte. Der gewählte Abstand von 2,1 Å stimmt mit den durchschnittlichen Fe-N- und Fe-H₂O-Abständen von 1,95-2,22 bzw. 2,06-2,22 Å überein, wie sie von Harding (1999) für hexakoordinierte Fe-Cluster bestimmt wurden.

Durch diese Anordnung der sechs Liganden in den Monomeren B, C und D erfolgt die Koordination der Eisenatome oktaedrisch. Die quadratische Grundfläche des Oktaeders wird durch die N^{ε2}-Atome von His219 und His301, sowie zwei Wassermoleküle (Wat1 und Wat2) aufgespannt, während die beiden Spitzen durch das O^{ε1}-Atom von Glu387 und Wat3 gebildet werden.

4.3. RÖNTGENSTRUKTURANALYSE DER HPPD AUS ARABIDOPSIS THALIANA

Die Struktur der 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* (*atHPPD*) konnte mit Hilfe der Patterson-Suchmethode (MR) gelöst werden. Der prozessierte Datensatz der *atHPPD* stammte von Linden (2000), der anhand der Reflexe den Kristallen die Raumgruppe P4₂2 zugeordnet hatte. Die endgültige Aussage über die tatsächliche Raumgruppe mußten die unterschiedlichen Lösungen aus der Patterson-Suche ergeben, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Unterscheidung der Schraubenachsen getroffen werden konnte.

4.3.1. Patterson-Suche

Als Suchmodell diente die Kristallstruktur der HPPD aus *Z. mays* (Referenz diese Arbeit). Die Orientierung und Positionierung von einem Monomer erfolgte zunächst getrennt in den möglichen Raumgruppen P4₁22, P4₂22, P4₃22, P4₂12, P4₁2₁2, P4₂2₁2, und P4₃2₁2 mit dem Programm MOLREP (CCP4, 1994), wozu Daten im Auflösungsbereich von 16,8 bis 5 Å herangezogen wurden.

Eine eindeutige Charakterisierung der korrekten Raumgruppe P4₁2₁2 ergaben die klar abgehobenen Lösungen in der Rotations- und einer anschließenden Translationsuche. Ein erstes Monomer wurde mit einem Korrelationswert von 0,219 und einem R-Faktor von 50 % positioniert. Das zweite Molekül konnte nachfolgend in der asymmetrischen Einheit mit einem Korrelationswert von 0,466 und einem R-Faktor von 35,7 % platziert werden.

Diese beiden Moleküle der asymmetrischen Einheit bauen jeweils über die zweizählige Achse ein Dimer auf. Die Überprüfung der Kristallpackung bestätigt die korrekte Zuordnung der Raumgruppe P4₁2₁2.

4.3.2. Modellbau und Verfeinerung

Die *atHPPD* Kristallstruktur wurde mit dem Programm CNS unter Verwendung der Parameter von Engh und Huber verfeinert (Engh & Huber, 1991). Die anschließende Verfeinerung mit *simulated annealing* bei 2000 K ergab einen ersten kristallographischen Arbeits-R-Faktor von 47,75 % und einen freien R-Faktor von 46,93 %. Der freie R-Faktor wurde mit 5 % der Reflexe berechnet. Die bis zu einer Auflösung von 3 Å berechnete $2F_o-F_c$ Elektronendichte war von ausreichender Qualität, um die Reste Val33 bis Phe428 manuell in die Dichte von Monomer A bzw. Val33 bis Thr437 in die Dichte von Monomer B einzubauen. Die Elektronendichte der 32 N-terminalen und 17 bzw. acht C-terminalen Aminosäuren, sowie der Reste Leu107 bis Thr116, Ala194 bis Glu201, Asp211 bis Phe215 beider Monomere und Glu252 bis Glu262 in Monomer A als auch Ala255 bis Glu262 in Monomer B wurde auch in späteren Verfeinerungs- und Bauzyklen nicht interpretierbar, so daß das finale *atHPPD* Atommodell 362 bzw. 374 Aminosäuren pro Monomer enthält.

Im späteren Verlauf der Verfeinerung wurde pro *atHPPD* Molekül ein Eisenion in die klar erkennbare F_o-F_c Differenzdichte eingebaut. Iterative Zyklen von manuellem Modellbau und Verfeinerung der Daten im Auflösungsbereich von 16 bis 3 Å, *ncs-restraints*, sowie eine individuelle B-Faktor-Verfeinerung führten zu einem kristallographischen R-Faktor von 23,7 % und einem freien R-Faktor von 31,2 %.

Das Verhältnis von Zellvolumen zu molekularer Masse V_m beträgt $2,16 \text{ \AA}^3/\text{Dalton}$ für zwei *atHPPD* Moleküle pro asymmetrischer Einheit, was einem Solvensgehalt von 43 % entspricht, und liegt damit im für Proteine typischen Rahmen (Matthews, 1968). An diesem Wert wird deutlich, daß die Kristalle der *atHPPD* im Vergleich zu denen der *zmHPPD* enger gepackt sind, was eine Erklärung für die anisotroperen Streueigenschaften der *Z. mays* Kristalle darstellen könnte. Auch die Temperaturfaktoren, die in der *atHPPD* Struktur durchschnittlich nur halb so hoch wie die der *zmHPPD* liegen, spiegeln diese Unterschiede wider. In beiden Kristalltypen verhindert jedoch die Konformation des *hairpin* artigen Strukturbereichs eine engere Packung der Monomere in der asymmetrischen Einheit.

Tabelle 5: Datenprozessierungsstatistik der *at*HPPD

ergänzt nach Linden (2000)

DATENSAMMLUNG	
Raumgruppe	P4 ₁ 2 ₁ 2
Zellkonstanten [Å, °]	
a	95,2
b	95,2
c	185,8
$\alpha=\beta=\gamma$	90
Einheitszellvolumen [Å ³]	1683912,8
V _m [Å ³ /Da]	2,16
Wassergehalt [%]	43
Anzahl der Monomere pro asymmetrischer Einheit	2
begrenzende Auflösung [Å]	3,0
gemessene Reflexe	67542
unabhängige Reflexe	16577
Vollständigkeit der Daten [%]	82,0 (76,4)
R _{merge}	11,2 (42,3)
Multiplizität	2,3
$R_{\text{merge}} = \frac{\sum (I - \langle I \rangle)}{\sum I}$	
Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der äußersten Auflösungsschale (3,14 – 3,0 Å).	

4.3.3. Qualität des Atommodells

Das final verfeinerte *at*HPPD Atommodell besteht aus zwei HPPD Molekülen. Neben den zuvor aufgeführten Resten fehlen einige an der Proteinoberfläche lokalisierte Seitenketten, die sich vor allem auf der der Dimerisierungsfläche abgewandten Seite des Moleküls befinden. Abgesehen davon zeigt eine Verifizierung der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette im *at*HPPD Atommodell, daß sich 81,7 % aller Aminosäuren (ausgenommen Glycin und Prolin) in dem am meisten bevorzugten Bereich, 17,7 % im zusätzlich erlaubten, weniger als 0,7 % im weitläufig erlaubten und keine der Aminosäuren im verbotenen Bereich der Ramachandranstatistik befinden. In Abb. 23 ist die Ramachandranstatistik aller 719 Aminosäuren des bis 3 Å verfeinerten *at*HPPD Atommodells dargestellt.

Eine detaillierte Verfeinerungsstatistik des *at*HPPD Atommodells ist in Tabelle 6 zusammengefaßt.

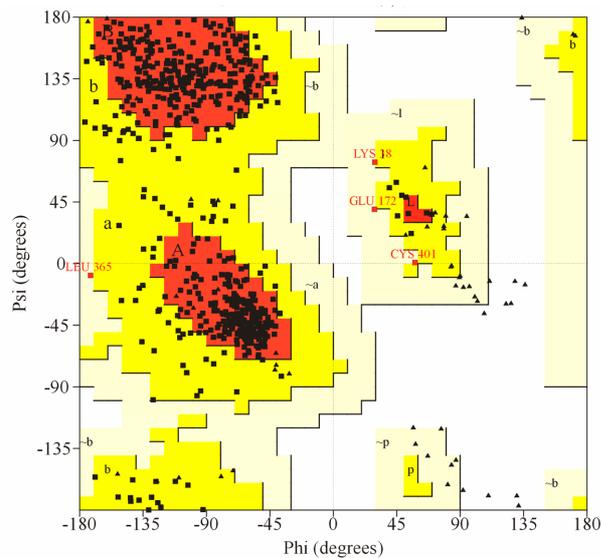


Abb. 23: Ramachandran-Plot der α tHPPD
 Dargestellt sind die dihedralen Hauptkettenwinkel Psi und Phi des finalen α tHPPD Modells. Die für L-Aminosäuren erlaubten Bereiche sind gelb markiert, wobei die sterisch günstigsten Regionen rot gekennzeichnet sind. Weiße Flächen entsprechen verbotenen Bereichen. Von den insgesamt 719 Resten sind 616 weder Glycin (dargestellt als Dreiecke) noch Prolin.

Tabelle 6: Verfeinerungsstatistik des α tHPPD Atommodells

VERFEINERUNG	
Auflösungsbereich [\AA]	16,83 – 3,0
verwendete Reflexe	16966
Reflexe im Arbeitsset	16137
Reflexe im Testset	829
R-Faktor [%]	23,7
R_{free} [%]	31,2
r.m.s. Abweichungen von Idealwerten der	
Bindungslängen [\AA]	0,08
Bindungswinkel [$^{\circ}$]	1,43
mittlerer B-Faktor [\AA^2]	
Hauptkettenatome	21,84
Seitenkettenatome	21,82
Metallatome	28,16
Anzahl der Reste in der asymmetrischen Einheit	
Proteinatome (ohne Wasserstoff)	5743
Metallatome	2
(Φ, Ψ) -Winkelverteilung im	
bevorzugten Bereich [%]	81,7
zusätzlich erlaubten Bereich [%]	17,7
$R = \frac{\sum (F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})}{\sum F_{\text{obs}} }$	
R_{free} wurde mit 5 % der Daten berechnet, die von der Verfeinerung ausgeschlossen wurden.	

4.3.4. Strukturbeschreibung der *atHPPD*

4.3.4.1. Der Aufbau des Monomers

Die asymmetrische Einheit der zur Raumgruppe $P4_12_12$ gehörenden Kristalle der *atHPPD* enthält ein Dimer. Da dieses Dimer ebenfalls wie das der *zmHPPD* über die zweizählige Achse aufgebaut wird, bestätigt dies die Vermutung, daß diese Anordnung der Monomere den physiologisch aktiven Zustand widerspiegelt. In beiden pflanzlichen Enzymen liegen keine Gitterkontakte vor, die auf eine höhere oligomere Organisation im Kristall hinweisen würden. Wie das Enzym aus *Z. mays* zeigt auch die *atHPPD* die charakteristische Faltung. Sie wird ebenfalls aus einem N- und C-terminalen Barrel (Val33 bis Asp218 bzw. Tyr219 bis Thr437) aus neun bzw. acht β -Strängen, die von zehn α -Helices umgeben sind, aufgebaut. Beide Barrel bestehen jeweils aus zwei Modulen, die in der Abfolge der Sekundärstrukturen mit der Struktur der *zmHPPD* übereinstimmen (s. Abb. 27). In diesem Enzym ragt die *hairpin* ähnliche Struktur, die das C-terminale Barrel mit Helix H11 verbindet, ebenfalls aus dem globulären Protein hervor. In *atHPPD* wird dieser Bereich von den Resten Cys401 bis Gly415 gebildet. Auch hier sind die Aminosäuren im *loop* Bereich nicht durch Elektronendichte definiert, doch auch in der *atHPPD* wird dieser Strukturbereich, der die kurzen β -Faltblätter F und G enthält, durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys401 und Cys416 stabilisiert.

Die Lage der C-terminalen Helix konnte nicht in jedem Molekül, sondern nur in Monomer B anhand der $2F_o - F_c$ Dichte nachgewiesen werden, während sie in Monomer A komplett fehlgeordnet ist. Diese Helix, die in *zmHPPD* das aktive Zentrum beinhaltende C-terminale β -Barrel von der Umgebung abschließt, ist in Monomer B der *atHPPD* weit geöffnet.

Die zwei in der asymmetrischen Einheit liegenden Monomere A und B sind demnach strukturell weniger identisch, als dies für die beiden Dimere der *zmHPPD* der Fall ist, so daß ihre Überlagerung eine größere r.m.s. Abweichung von 0,63 Å für 359 C α Atome ergibt.

4.3.4.2. Das aktive Zentrum

Das aktive Zentrum am Grund des C-terminalen Barrels wird von den konservierten Resten Asp225, Ala227, Val228, Pro280, Asn282, Glu307, Leu309, Ala310, Leu311, Leu377, Glu379, Ile380, Phe381, Phe392, Ile393, Ile395, Ile396, Arg398, Gly418, Phe419 und Gly420 aufgebaut und umfaßt einen Bereich von etwa acht bis 14 Å Durchmesser. Wie in *zmHPPD*

wird das C-terminale Barrel durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken zwischen Arg398 und Asp225, Asp225 und His226, Arg398 und Gly418, sowie Glu394 und Gln379 stabilisiert. Die Koordination des katalytischen Eisenions erfolgt durch His226, His308 und Glu394, die Distanzen vom Eisenatom zu den es koordinierenden Proteinatomen liegen zwischen 2,16 und 2,6 Å. In dieser Struktur liegen die Temperaturfaktoren der Eisenatome mit 24 bzw. 32 Å² im gleichen Bereich wie die der sie koordinierenden Proteinatome, was auf eine vollständige Besetzung der aktiven Zentren im Kristall hinweist.

Aufgrund der schlechteren Qualität der Dichte können keine genauen Angaben über weitere Liganden gemacht werden. Die Bindungsgeometrie des katalytischen Eisenatoms der *atHPPD* kann daher am besten als unvollständiger, verzerrter Tetraeder beschrieben werden.

Sowohl in der $F_o - F_c$ -, als auch der $2F_o - F_c$ Dichte und der berechneten *omit map* von Monomer B ist jedoch erkennbar, daß an der Position der Spitze des Tetraeders ein exogener Ligand gebunden hat. Dessen korrespondierende Dichte liegt gegenüber Glu394, zwischen dem Eisenatom und den Seitenketten von Glu252, Ser267 und Asn282, wodurch die Position, die in der *zmHPPD* Struktur durch Wat3 besetzt ist, belegt ist. Anhand der Datenqualität konnte dieser Ligand jedoch nicht identifiziert werden. Diese Dichte könnte vier oder fünf leichte Atome wie Kohlenstoff, Stickstoff oder Sauerstoff enthalten, da sie durch Wassermoleküle nicht vollständig besetzt werden kann, es könnte sich dabei um ein Puffermolekül handeln. Der Abstand zum Eisenion beträgt etwa 4,6 Å, das Molekül kann also nicht als direkter Ligand des Eisens angesehen werden. Dagegen beträgt der Abstand der Dichte zu den Seitenketten von Glu252 und Asn282 ca. 3 Å. Eventuell sind diese Reste an der Koordination dieses unidentifizierbaren Moleküls beteiligt.

Durch dieses Molekül ist das C α Atom von Phe424 im Vergleich zur Position des entsprechenden Atoms aus *zmHPPD* (Phe417) um 1,6 Å verschoben, was zur Positionsverlagerung der C-terminalen Helix in diesem Molekül führt. Die Lage der Helix weicht gegenüber der Lage von H11 aus *zmHPPD* um einen Winkel von ca. 60° ab, wodurch das aktive Zentrum nicht mehr von der Umgebung abgeschirmt wird, sondern frei zugänglich ist.

4.3.4.3. Das Dimer der *atHPPD*

Das physiologisch aktive Dimer der *atHPPD* wird über die zweizählige Achse aufgebaut. An den Kontakten zwischen den Monomeren sind die Reste Asp56, Thr58, Asn59, Val60, Arg62,

Arg63, Phe64, Trp66, Ala101, Ser104, Arg129, Ser133, Leu137, Leu217, Glu302, Asp333, Asp387 und Arg388 beteiligt. Diese befinden sich auf den Helices H1 und H2, die das Zentrum der Kontaktfläche bilden, zwischen den Sekundärstrukturelementen D1 und H2, C4 und D4, sowie auf Helix H6 und zwischen H7 und H8. Die beteiligten Reste sind im Alignment (s. Abb. 27) hervorgehoben.

Die Kontakte zwischen den Monomeren werden hauptsächlich durch Wasserstoffbrücken vermittelt. Auch in diesem Enzym wird das Dimer durch *stacking* einer aromatischen Aminosäure stabilisiert; Trp66 entspricht im Alignment und in der Überlagerung beider pflanzlichen Enzyme der Position von Phe68 aus *zmHPPD*. Wie in *zmHPPD* wird der Hauptanteil der Dimerisierung über N-terminal-N-terminale Kontakte vermittelt.

Durch die Dimerisierung wird eine Fläche von 1355 \AA^2 pro Monomer von der Umgebung abgeschirmt.

4.3.5. Vergleich der *atHPPD* mit dem Enzym aus *Zea mays*

Wie ausgehend von der hohen Sequenzhomologie beider pflanzlichen Enzyme, deren Aminosäureidentität 66 % beträgt, zu erwarten ist, ist der dreidimensionale Aufbau ihrer monomeren Untereinheiten und deren Anordnung zum Dimer sehr ähnlich. Die Überlagerung beider pflanzlichen Dimere ergibt r.m.s Abweichungen von 1 \AA für 695 C α Atome.

Aufgrund des identischen Aufbaus der Dimere scheint dieser universell für eukaryotische HPPDs zu sein, deren dimere Organisation bereits durch biochemische Charakterisierungen bestimmt wurde und mit dieser Arbeit erstmals auf struktureller Basis bestätigt wird.

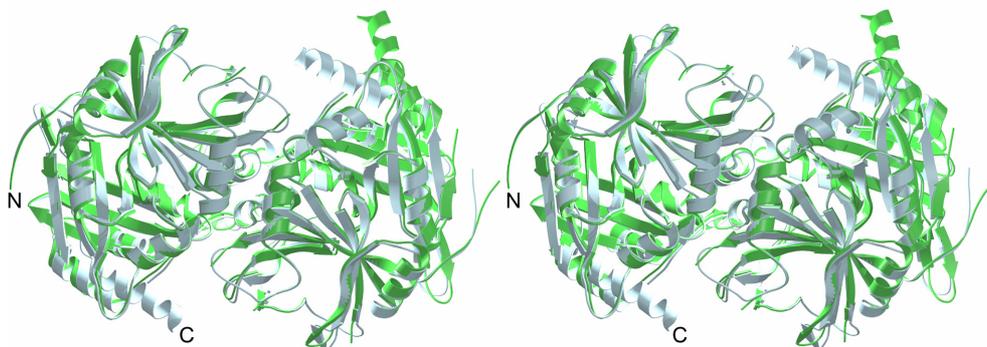


Abb. 24: Überlagerung der pflanzlichen HPPD Dimere Ribbondarstellung der Überlagerung der *zmHPPD* (blau) und *atHPPD* (grün). Der Blick verläuft entlang der zweizähligen Symmetrieachse.

Größere Unterschiede in der Struktur der monomeren Untereinheiten liegen in der Lokalisation der Aminosäurereste Ala244 bis Thr247 von *Z. mays* und den entsprechenden Resten Ala251 bis Thr254 aus *A. thaliana*. Der Verlauf der sich anschließenden Reste dieses *loops* konnte aufgrund fehlender Elektronendichte in diesem Bereich nicht bestimmt werden. Eine weitere Abweichung betrifft den durch die Reste Gly280 bis Arg283 (*zmHPPD*) bzw. Gly287 bis Arg290 (*atHPPD*) aufgebauten *loop* zwischen D3 und H6, der sich sowohl in Nachbarschaft zum zuvor erwähnten, teilweise undefinierten *loop*, als auch zur C-terminalen Helix befindet. Die Position der C α Atome in diesem Bereich weicht um durchschnittlich 3,2 Å voneinander ab. Zusätzlich weist die *atHPPD* im *loop* zwischen β -Strang D1 und α -Helix H2 eine zusätzliche Insertion von sechs Aminosäuren auf (s. Abb. 27), die sich am äußeren Endbereich des Dimerkontakts befindet, jedoch in der Elektronendichte ungeordnet erscheint. Der auffallendste Unterschied zwischen den beiden pflanzlichen Strukturen liegt jedoch in der Lokalisation der C-terminalen Helix H11. Im Enzym aus *Z. mays* ist diese Helix in jedem Monomer geschlossen und schirmt so das C-terminale Barrel mit dem aktiven Zentrum vom umgebenden Solvens ab, während sie in *atHPPD* Monomer B weit geöffnet ist, was sich auf die Bindung des unidentifizierbaren Liganden im aktiven Zentrum zurückführen lässt.

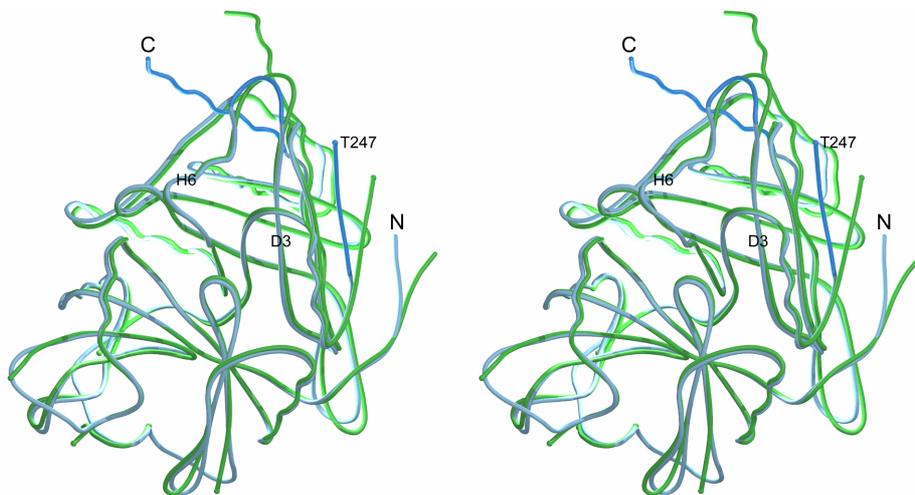


Abb. 25: HPPD-Monomere aus *Z. mays* und *A. thaliana* Dargestellt ist die Überlagerung je eines Monomers der *zmHPPD* (blau) und *atHPPD* (grün). Die Bereiche der größten Abweichungen zwischen beiden Strukturen sind an der *zmHPPD* Struktur durch ein dunkleres Blau hervorgehoben. Diese betreffen vor allem die Reste N-terminal von Thr247, den *loop* zwischen D3 und H6, sowie die Position der C-terminalen Helix.

4.4. STRUKTURVERGLEICH DER PFLANZLICHEN HPPDS MIT DEM ENZYM AUS *P. FLUORESCENS*

4.4.1. Dreidimensionale Topologie

Das Monomer der bakteriellen HPPD aus *P. fluorescens* zeigt im Vergleich zu den pflanzlichen Enzymen einen fast identischen strukturellen Aufbau. Die Anzahl der identischen meist apolaren oder hydrophoben Reste, auch in der in geringerem Maß konservierten N-terminalen Domäne, erscheint zusammen mit dem hoch konservierten Muster des C-Terminus ausreichend, um die konservierte Faltung dieser Dioxygenasen zu bewirken. Die Überlagerung der C α Atome der HPPD Monomere von *Z. mays* und *P. fluorescens* bzw. *A. thaliana* und *P. fluorescens* ergibt jedoch in beiden Fällen für 264 bzw. 242 C α Atome r.m.s. Abweichungen von etwa 1,5 Å.

Dies spiegelt nicht nur die geringere Sequenzidentität von knapp 30 % zwischen den Enzymen wider, sondern auch einige markante strukturelle Unterschiede. Diese sind in der Überlagerung der monomeren Strukturen der drei HPPDs in Abb. 26 dargestellt. Diese Unterschiede betreffen vor allem den unterschiedlichen Oligomerisierungsmodus (s. 4.4.2.) und Insertionen oder Deletionen in den Primärstrukturen, die sich auf die Tertiärstruktur auswirken.

In der N-terminalen Domäne sind dies die Extension der eukaryotischen HPPDs, sowie die Bereiche von Ser81 bis Ala86 und Ala106 bis Ser120 (*Z. mays* Numerierung). Der längere N-Terminus der pflanzlichen Enzyme, der in keinem der Monomere durch Dichte vollständig definiert ist, sondern erst mit Phe34 beginnt, was mit dem 5'-Ende der von Linden (2000) isolierten cDNA übereinstimmt, hat Auswirkungen auf den Aufbau des C-terminalen Barrels. In den pflanzlichen Dioxygenasen ist β -Strang B4 gegenüber dem bakteriellen Strang um vier Aminosäuren verkürzt, so daß der B4 mit C4 verbindende *loop* nicht so weit aus der Struktur herausragt, wie das in *pfHPPD* der Fall ist. Würde sich in diesem Bereich in den pflanzlichen Enzymen ein längerer *loop* befinden, würde dieser die Anordnung und den Verlauf der N-terminalen Aminosäurekette stören.

Anhand der Struktur ist jedoch die Notwendigkeit des verlängerten Aminoterminus nicht nachvollziehbar. Dieser Teil der Sequenz enthält keinerlei Sekundärstrukturelemente, die an der Stabilisierung anderer Reste beteiligt sein könnten und ist auch nicht an der Bildung von Intermonomerkontakten beteiligt.

Eventuell ist der verlängerte N-Terminus der pflanzlichen Enzyme für die korrekte Kompartimentierung des Enzyms in der Zelle verantwortlich. Diese Vermutung wird durch Untersuchungsergebnisse der Sequenz mit dem Programm PSORT (Nakai & Kanehisa, 1992) unterstützt, das im N-Terminus der von Maxwell et al. (1997) veröffentlichten *zmHPPD* Sequenz eine Sequenz identifiziert, die Ähnlichkeit zu N-terminalen Signalsequenzen anderer Proteine aufweist. Für das Vorkommen einer solchen Signalsequenz spricht die Tatsache, daß das mit Phe34 beginnende Konstrukt, das dem nativ aufgereinigten Protein aus *Z. mays* entspricht (Linden, 2000), nur komplett unlöslich in den Zellen vorlag, während das N-terminal um die Aminosäuren Ala18 bis Asn33 verlängerte Konstrukt löslich exprimiert werden konnte. Eventuell sind diese Aminosäuren für die korrekte Faltung des Proteins notwendig.

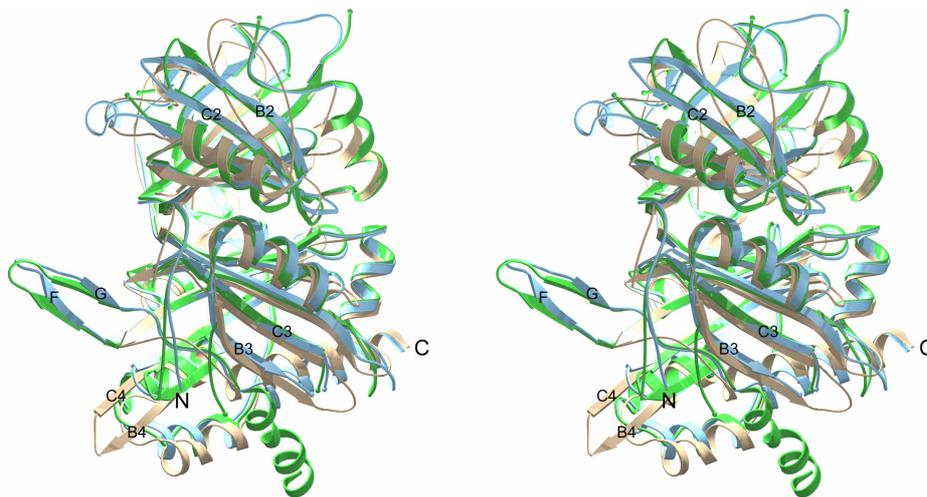


Abb. 26: Überlagerung pflanzlicher und bakterieller 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenasen
Stereodarstellung der Überlagerung je einer Untereinheit der dimer (*Z. mays* blau, *A. thaliana* grün) und tetramer (*P. fluorescens* beige) organisierten HPPDs.

Trotz vieler Untersuchungen, die sich jedoch teilweise widersprechen, ist die Lokalisation der HPPD in der pflanzlichen Zelle immer noch nicht eindeutig geklärt. Es wurde Enzymaktivität sowohl in Thylakoidmembranen (Löffelhardt & Kindl, 1979), in Chloroplasten und Peroxisomen (Fiedler et al., 1982), als auch ausschließlich im Cytosol (Lenne et al., 1995; Garcia et al., 1997) nachgewiesen. Für das Auftreten von Isoformen würde sprechen, daß Aminosäurekatabolismus und die Biosynthese der Prenylchinone in verschiedenen Zellkompartimenten ablaufen. Allerdings konnten Norris et al. (1998) zeigen, daß zumindestens in *Arabidopsis* keine Isoformen existieren, sondern daß in diesem Organismus das cytosolische Enzym an beiden Stoffwechselwegen beteiligt sein muß.

Die größere Insertion von 15 (Ala106 bis Ser120 in *Z. mays*) bzw. 21 (Ser104 bis Asp124 in *A. thaliana*) Aminosäuren verursacht eine deutliche Verschiebung der β -Stränge B2 und C2 und des sie verbindenden *loops* im Vergleich zur bakteriellen Struktur, in der B2 fehlt und C2 deutlich kürzer ist. Diese Region bildet in *pfHPPD* einen wichtigen Kontaktbereich für die Tetramerisierung.

Ein weiterer Strukturbereich der Moleküloberfläche, der im bakteriellen Enzym an der Oligomerisierung beteiligt ist, zeigt kleinere Abweichungen in der Lage der Hauptkettenatome und weist außerdem eine Deletion von zwei Resten nach Pro225 und eine Insertion von zwei Resten nach Thr281 (*Z. mays*) auf. Es weichen also nicht nur Sequenzbereiche, die an der Dimerisierung der pflanzlichen Enzyme beteiligt sind, von denen der bakteriellen Struktur ab, sondern auch die die Tetramerisierung der bakteriellen HPPD vermittelnden Bereiche verlaufen in den pflanzlichen Strukturen anders.

Die die N- mit der C-terminalen Domäne verbindende Region (Gly203 bis Ala210 (*Z. mays*)) zeigt einen abgewandelten Verlauf, in dem die Positionen der C α Atome teilweise um bis zu sieben Å voneinander abweichen, und weist eine Deletion von zwei Aminosäuren auf, was dazu führt, daß dieser Bereich in Richtung des Dimerkontakts verschoben ist. Das Gegenstück von Helix H4 der N-terminalen Domäne von *pfHPPD* schließt in der *zmHPPD* Struktur direkt an D2 an und ist im Vergleich zur bakteriellen Helix relativ ungeordnet. In *atHPPD* ist dieser Bereich komplett ungeordnet, so daß für diese Struktur keine Aussage über den Verlauf dieser Helix gemacht werden kann.

Einer der auffallendsten Strukturunterschiede ist jedoch das wie ein *hairpin* aus dem Protein hervorstehende Strukturelement, das vom C-terminalen Barrel in die C-terminale Helix überleitet. Die es bildenden Reste liegen in einer 15 Aminosäuren langen Insertion, die selbst unter den eukaryotischen Enzymen auf die pflanzlichen HPPDs beschränkt ist (s. Abb. 2). Das durch die kurzen β -Stränge F und G aufgebaute kleine Faltblatt fehlt in der bakteriellen Struktur völlig. Daher liegt die Vermutung nahe, daß diese Reste eine spezielle Funktion erfüllen, zumal dieses Strukturelement durch eine Disulfidbrücke zwischen konservierten Resten stabilisiert wird. Anhand der hier durchgeführten Strukturanalyse ist die Funktion dieses Bereichs jedoch nicht erklärbar. Auch durch den Sequenzvergleich wird nicht ersichtlich, wozu Pflanzen diesen *hairpin* benötigen, da alle weiteren bisher bekannten HPPDs auch ohne diese Insertion aktiv sind.

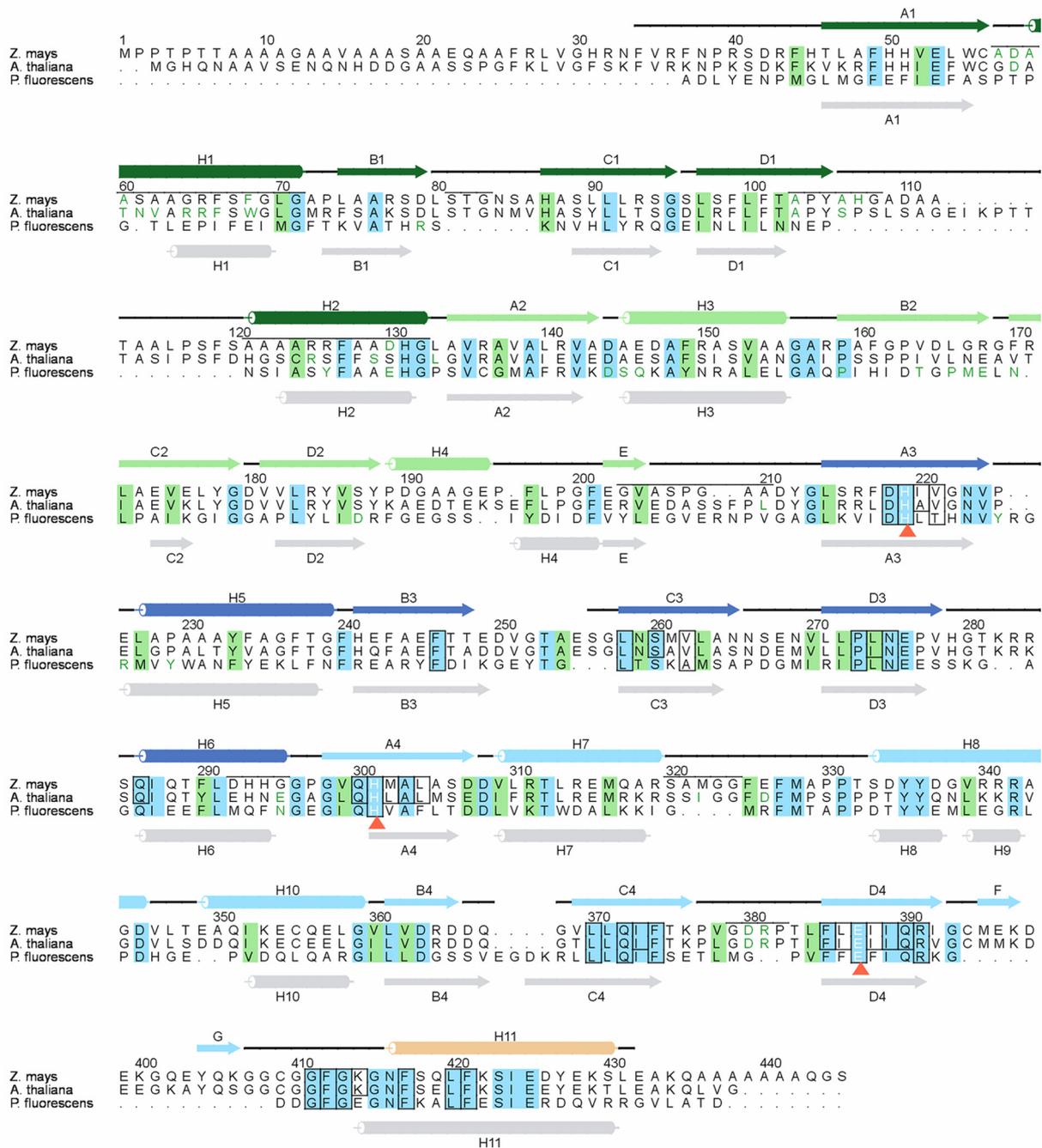


Abb. 27: Sekundärstruktur-basiertes Alignment der HPPDs aus *Z. mays*, *A. thaliana* und *P. fluorescens*
 Die Numerierung bezieht sich auf die Sequenz der *zmHPPD* und folgt den Angaben von Maxwell et al. (1997). Sekundärstrukturen sind durch den identischen Farbcode gekennzeichnet wie in Abb. 19 dargestellt, die Numerierung erfolgte entsprechend derjenigen von Serre et al. (1999). Die Sekundärstrukturen der *pfHPPD* sind in hellgrau unter den Sequenzen abgebildet. Schwarze Linien kennzeichnen *loop* Regionen, fehlgeordnete Reste der *zmHPPD* sind durch Fehlen der entsprechenden Linien angezeigt. Die die Dimerisierung vermittelnden Strukturbereiche sind durch eine schwarze Linie direkt oberhalb der *Z. mays* Sequenz markiert. Reste, die direkt an Intermonomerkontakten beteiligt sind, sind in grün hervorgehoben. Streng konservierte Reste sind blau, konservierte Austausche von Aminosäuren hellgrün unterlegt. Die das aktive Zentrum aufbauenden Reste sind durch eine Box markiert, die Eisen-koordinierenden Aminosäuren durch einen roten Pfeil gekennzeichnet.

Durch Mutationen in diesem Bereich oder dessen Deletion könnte untersucht werden, ob diese Aminosäuren zum Aktivitätserhalt der HPPD notwendig sind oder ob sie aufgrund ihrer Exposition zum Solvens eventuell an der Wechselwirkung mit anderen Proteinen beteiligt sein könnten.

Die C-terminale Helix der bakteriellen Monomere liegt näher an der zum aktiven Zentrum führenden Rinne und schließt damit das C-terminale Barrel noch enger ab, als dies in der Struktur der *zmHPPD* der Fall ist.

4.4.2. Oligomerisierung

Im Gegensatz zur bakteriellen tetrameren Struktur liegen die in dieser Arbeit untersuchten pflanzlichen HPPDs als Dimere vor. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate früherer biochemischer Charakterisierungen der oligomeren Organisation eukaryotischer HPPDs (Wada et al., 1975; Lindblad et al., 1977; Roche et al., 1982; Endo et al., 1992; Rüetschi et al., 1993; Lenne et al., 1995; Garcia et al., 1997).

Das bakterielle Tetramer hat die Form eines Quaders und die Zusammenlagerung der vier Untereinheiten wird hauptsächlich durch N-terminal-N-terminale Kontakte zu je zwei benachbarten Monomeren vermittelt, während die C-terminale Domäne jeweils nur mit der C-terminalen Domäne einer benachbarten Untereinheit in Kontakt steht (Serre et al., 1999). Dieser Aufbau enthält drei Dimere mit C2 Symmetrie, aber nur diejenigen, die entlang der langen Achse des Quaders aufgebaut werden, schirmen einen Großteil der Moleküloberfläche vom Solvens ab. An der Tetramerisierung sind ausschließlich Sekundärstrukturen verbindende *loops* und hauptsächlich nicht konservierte Reste beteiligt. Dazu zählt auch Tyr167 im *loop* zwischen A3 und H5, das durch *stacking* den Kontaktbereich stabilisiert und in allen tierischen und den meisten pflanzlichen HPPD-Sequenzen gegen ein Prolin ausgetauscht ist.

Auch in den pflanzlichen HPPDs stabilisiert eine aromatische Aminosäure durch *stacking* den Kontaktbereich des Dimers. Phe68 (*Z. mays*) und Trp66 (*A. thaliana*) sind jedoch auf Helix H1 und damit in Modul 1 lokalisiert und nicht zwischen β -Strang A3 und Helix H5 in Modul 3 wie in *pfHPPD*.

Interessanterweise entspricht die Zusammenlagerung der pflanzlichen Monomere zum Dimer jedoch nicht den beiden möglichen Dimeren, wie sie anhand der 222 Punktsymmetrie aus der

bakteriellen Struktur hätten abgeleitet werden können. Stattdessen erfolgt die Dimerisierung nahezu orthogonal zur bakteriellen Struktur (s. Abb. 28).

An der Dimerisierung sind in den pflanzlichen Enzymen beide Domänen beteiligt, wobei auch hier die N-terminal-N-terminalen Kontakte überwiegen und die C-terminale Domäne ausschließlich zur benachbarten N-terminalen Domäne Kontakte ausbildet. Zwischen den C-terminalen Domänen finden keine Wechselwirkungen statt. Allerdings werden im Gegensatz zum bakteriellen Enzym, das pro Monomer 2600 \AA^2 vom Solvens abschirmt, deutlich kleinere Bereiche von 1544 \AA^2 (*zmHPPD*) bzw. 1355 \AA^2 (*atHPPD*) der Oberfläche unzugänglich gemacht. Selbst die aus der 222 Punktsymmetrie ableitbaren beiden möglichen Dimere der *pfHPPD* würden einen jeweils größeren Oberflächenbereich von der Umgebung abschirmen, als dies durch den hier nachgewiesenen Dimerisierungsmodus der pflanzlichen Dioxygenasen der Fall ist.

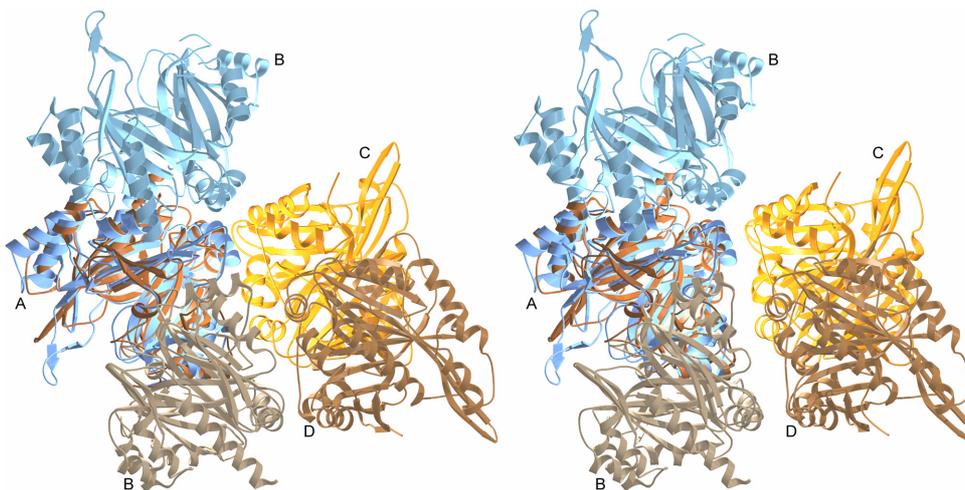


Abb. 28: Überlagerung des *zmHPPD* Dimers mit dem bakteriellen Tetramer der *pfHPPD*. Dargestellt sind die Unterschiede in der Quartärstruktur beider Enzyme. Die *zmHPPD* (blau) dimerisiert relativ zum bakteriellen tetrameren Enzym (braun-orange) in einer fast orthogonalen Ebene.

Im Gegensatz zur bakteriellen Struktur sind in den pflanzlichen Enzymen jedoch auch Sekundärstrukturelemente an der Dimerisierung beteiligt. Die Helices H1 (Ala57 bis Gly71) und H2 (Ala121 bis Gly132) liegen im Zentrum der Kontaktfläche. Beide befinden sich im Vergleich zur *pfHPPD* in identischer Orientierung zu den übrigen Strukturelementen und müssen daher durch den abgeänderten Dimerisierungsmodus, wie er in den pflanzlichen Enzymen vorliegt, nicht stabilisiert werden.

Es ist auffallend, daß die größten Unterschiede zwischen pflanzlichen HPPDs und der bakteriellen Struktur im Zusammenhang mit der Oligomerisierung stehen. Dies war jedoch

bereits durch Vergleich der Primärsequenz zu erwarten, weil keiner der an der Tetramerisierung der *pf*HPPD beteiligten Reste zum Cluster der konservierten Aminosäuren zählt. Die Abweichungen betreffen vor allem den N-terminalen Bereich von Helix H1, die Region zwischen Asp79 und His87, sowie zwischen Ala103 und Gly108, wobei die beiden letztgenannten Aminosäurebereiche Insertionen der pflanzlichen Enzymsequenzen sind. Zusätzlich weicht die Lokalisation der Reste Gly202 bis Ala210 zwischen den β -Strängen E und A3 deutlich von derjenigen der entsprechenden bakteriellen Aminosäuren ab.

Differenzen der C-terminalen Domäne beinhalten die Insertion von Ala321 bis Gly324 und den Bereich um Asp380. Als Konsequenz aus der großen Insertion von Tyr105 bis Ser120 ist das β -Faltblatt um Gly169, im Vergleich zum topologisch entsprechenden Rest Met109 aus *pf*HPPD, um 6,3 Å verschoben.

Die hohe Homologie der an der Dimerisierung beteiligten Regionen beider pflanzlichen Enzyme spricht dafür, daß der Aufbau des katalytisch aktiven Dimers, wie es in dieser Arbeit für *zm*HPPD und *at*HPPD nachgewiesen wurde, allen pflanzlichen HPPD-Strukturen gemeinsam ist. Die einzige große Differenz zwischen beiden pflanzlichen Sequenzen ist die Insertion von sechs Aminosäuren in der Sequenz von *at*HPPD nach Ala112 (*Z. mays*), was jedoch keinerlei Einfluß auf den Dimerisierungsmodus ausübt.

Die Tertiärstruktur selbst liefert keinen Hinweis für die Notwendigkeit der Dimerisierung, da jedes Monomer ein identisches Faltungsmuster und den gleichen Aufbau eines kompletten aktiven Zentrums besitzt, so daß auch die Monomere katalytisch aktiv sein könnten.

Die Vermutung von Serre et al. (1999), daß die zusätzlichen Aminosäurereste der eukaryotischen Enzyme an der Bildung einer vergrößerten Intermonomerkontaktfläche beteiligt seien, um das durch die Dimerisierung entstandene Stabilitätsdefizit auszugleichen, konnte durch die hier gezeigten Strukturen widerlegt werden. Diese zusätzlichen Reste gehören hauptsächlich zum verlängerten N-Terminus bzw. zur *hairpin* artigen Struktur der C-terminalen Domäne. Beide Bereiche sind weder an der Monomer-Monomer-Kontaktfläche lokalisiert, noch würden sie eine Tetramerisierung verhindern, wie sie im prokaryotischen Enzym vorliegt.

4.4.3. Die Architektur der aktiven Zentren

Das aktive Zentrum, dessen Überlagerung in Abb. 29 dargestellt ist, befindet sich in allen drei Enzymen im C-terminalen β -Barrel. Alle Substratbindungstaschen weisen eine identische

Größe von etwa acht bis 14 Å Durchmesser auf, obwohl die prokaryotische C-terminale Helix das aktive Zentrum enger abschließt und dadurch die Rigidität des Eisen-koordinierenden Barrels verstärkt. Dies unterstützt die Annahme, daß auch die Helix eine wichtige Rolle während der Katalyse spielt. In der Struktur der *zmHPPD* mit einer Auflösung von 2 Å ist das katalytische Eisenatom durch drei Proteinliganden und drei Wassermoleküle oktaedrisch koordiniert. In *atHPPD* konnten nicht alle Liganden durch die begrenzende Auflösung von 3 Å identifiziert werden, obwohl im aktiven Zentrum neben His226, His308 und Glu394 eine klar erkennbare zusätzliche Elektronendichte in der Nähe des Eisenatoms vorlag. Diese konnte jedoch nicht durch ein Wassermolekül besetzt werden. Daher muß die Koordinationssphäre in diesem Enzym als unvollständiger, verzerrter Tetraeder beschrieben werden.

Diese Geometrie des aktiven Zentrums der HPPD ist derjenigen der strukturell verwandten extradiol spaltenden Catechol 2,3-Dioxygenase (Metapyrocatechase, MPC) (Kita et al., 1999) und 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase (DHBD) (Han et al., 1995; Senda et al., 1996; Uragami et al., 2001) sehr ähnlich, obwohl zumindest die DHBD ein frei zugängliches aktives Zentrum aufweist. Alle Dioxygenasen setzen zwei Histidine und einen Glutamatrest als Eisenliganden ein.

Die von Serre et al. (1999) veröffentlichte Struktur der *pfHPPD* bei einer Auflösung von 2,4 Å zeigt einen größeren Liganden im aktiven Zentrum, der als monodentat koordiniertes Acetat identifiziert wurde. In den Strukturen der extradiol spaltenden Dioxygenasen konnten im aktiven Zentrum Aceton bzw. t-Butanol nachgewiesen werden. Diese Moleküle stammen aus den jeweiligen Kristallisationspuffern. Aus diesem Grund wird die Koordinationsumgebung der katalytischen Ionen aller dieser Enzyme als verzerrter Tetraeder bzw. im Fall von DHBD als quadratisch pyramidal beschrieben. Dabei sind allerdings weder Aceton noch t-Butanol nah genug am Eisenatom orientiert, um als direkte Liganden gelten zu können.

Der Substratkomplex der *pfHPPD* wurde auf der Basis des 2,3-Dihydroxybiphenyl Komplexes der inaktiven oxidierten DHBD (Senda et al., 1996) gemodelt (Serre et al., 1999). Die Koordinationssphäre gleicht der des tetraedrischen Sauerstoff-Catechol 2,3-Dioxygenase Komplexes (Uragami et al., 2001).

Das aktive Zentrum wird in beiden pflanzlichen HPPDs und dem bakteriellen Enzym aus völlig konservierten Aminosäureresten aufgebaut, die sich, abgesehen von den Resten der C-terminalen Helix, positionell kaum voneinander unterscheiden. Anders als Phe332 in *pfHPPD* ist jedoch Phe412 in *zmHPPD* und Phe419 in *atHPPD* durch die Elektronendichte gut

definiert und nicht flexibel. Statt dessen stabilisiert der Carbonylsauerstoff von Phe412 sogar Wat2 im aktiven Zentrum der *zmHPPD*.

Die Koordination des katalytischen Eisenions stimmt in *pfHPPD* und *atHPPD* überein, beide Bindungsgeometrien können als verzerrte Tetraeder beschrieben werden, während im Gegensatz dazu das Eisenion in *zmHPPD* oktaedrisch koordiniert wird.

Sowohl in der bakteriellen Struktur als auch in *atHPPD* liegt ein Molekül im aktiven Zentrum vor, das in *pfHPPD* als aus dem Puffer stammendes Acetatmolekül, in der *atHPPD* jedoch nicht genauer identifiziert werden konnte. Im aktiven Zentrum der *atHPPD* liegt dieses Molekül jedoch etwa 4 Å vom katalytischen Eisenion entfernt, kann also nicht wie das Acetatmolekül in *pfHPPD* als dessen direkter Ligand bezeichnet werden.

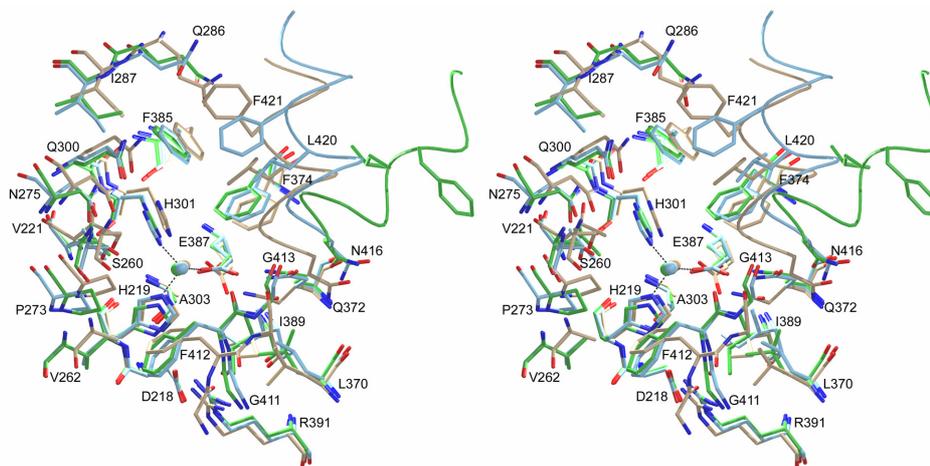


Abb. 29: Aufbau der aktiven Zentren eu- und prokaryotischer 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenasen
Dargestellt ist eine Überlagerung der aktiven Zentren beider pflanzlichen (*Z. mays* in blau, *A. thaliana* in grün) HPPDs mit dem Enzym aus *P. fluorescens* (beige) in einem Umkreis von ca. 14 Å um das katalytische Eisenatom (Farbcode entspricht dem der Aminosäuren). Zur besseren Übersicht sind die Reste Ile220, Leu274, Met302, Leu304, Ile373, Leu386, Ile388 und Lys414 (*Z. mays* Numerierung) nicht dargestellt. Der Verlauf der C-terminalen Helices ist als Spiralen hervorgehoben.

Ein auffallendes Merkmal aller aktiven Zentren dieser Dioxygenasen ist ihr hoher Gehalt an Phenylalaninresten. Diese Reste könnten einen Schutzmechanismus darstellen, wie er bereits in weiteren Oxygenasen beobachtet wurde, in denen Autohydroxylierungen nachgewiesen werden konnten (Goodwill et al., 1998; Logan et al., 1998; Ellis et al., 1999; Baldwin et al., 2001; Liu et al., 2001). Es ist denkbar, daß sich die Enzyme durch Hydroxylierung aromatischer Seitenketten gegen unkontrollierte oxidative Reaktionen schützen, wie sie durch aktivierten Sauerstoff hervorgerufen werden könnten.

4.4.4. Die C-terminale Helix – eine Schranke vor dem aktiven Zentrum

Ein bemerkenswerter Unterschied der HPPD Strukturen ist die C-terminale Helix H11, die das aktive Zentrum beinhaltende β -Barrel vom umgebenden Lösungsmittel abschirmt. Das C α Rückgrat dieser Helix konnte in allen vier Monomeren der *zm*HPPD, sowie in Monomer B der *at*HPPD eindeutig durch die 2F_o-F_c Dichte lokalisiert werden. Aufgrund ihrer Lokalisation und anderer Merkmale wie der Nicht-Beteiligung der Helix an Intermonomerkontakten, weder im bakteriellen Tetramer, noch im pflanzlichen Dimer, und der höheren B-Faktoren der sie aufbauenden Reste im Vergleich zum rigiden C-terminalen β -Barrel, kann postuliert werden, daß sich die Helix aus dem Barrel herausbewegen muß, um den Substratzugang zum aktiven Zentrum zu ermöglichen. Ein solchermaßen flexibler Verschluß des β -Barrels würde den Zutritt des Substrates erleichtern und vermutlich Konformationsänderungen während der Substratbindung und Katalyse bewirken, so daß die Helix einer beweglichen Wand gleichen würde, die sich dem Reaktionsgeschehen anpassen kann.

Die in dieser Arbeit untersuchten Strukturen der zwei *zm*HPPD-Dimere und der zwei *at*HPPD-Monomere zeigen bezüglich dieser Helix einen markanten Unterschied. Während in allen vier *zm*HPPD Molekülen das aktive Zentrum gegenüber dem Solvens durch H11 abgeschirmt ist, ist diese Helix in Monomer B der *at*HPPD ausgeschwenkt, so daß das aktive Zentrum weit geöffnet ist. In Monomer A ist sie dagegen komplett ungeordnet.

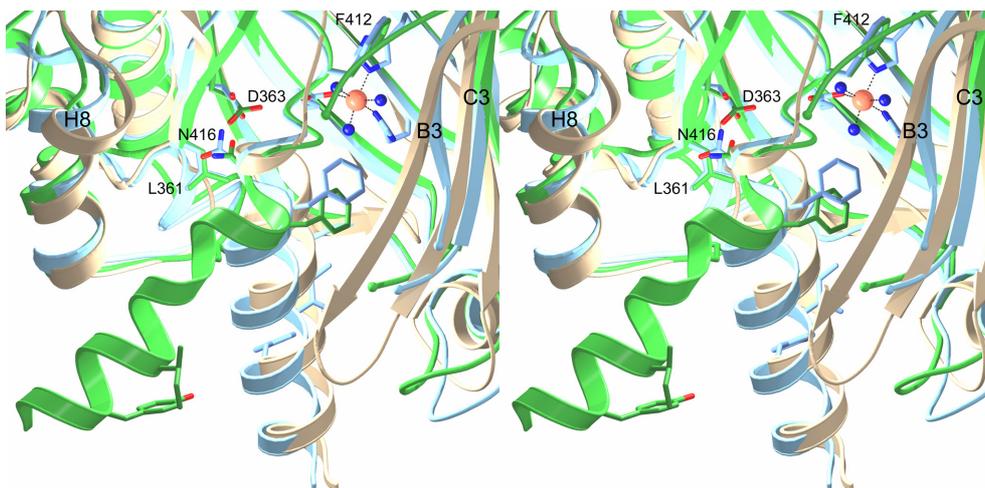


Abb. 30: Die Schranke vor dem aktiven Zentrum Dargestellt ist die Überlagerung des Eingangsbereichs zum aktiven Zentrum der HPPDs aus *Z. mays* (blau), *A. thaliana* (grün) und *P. fluorescens* (beige). Der hoch konservierte Rest Asn416 bildet ein Scharnier, um das Helix H11 rotiert, um den Zugang zum aktiven Zentrum zu öffnen, während die starren Seitenketten von Leu361 und Asp363 Asn416 fixieren. Der Bereich um Helix H8 erscheint starr, wohingegen der die β -Stränge B3 und C3 verbindende *loop* flexibel ist und sich wahrscheinlich der Bewegung der C-terminalen Helix anpassen kann.

Diese Bewegung kann am besten als Rotation der Helix um etwa 60° um die C α Position von Asn416/423 (*zmHPPD/atHPPD*) beschrieben werden. Dieser Aminosäurerest fungiert dabei als fester Drehpunkt. Seine Seitenkette wird durch diejenigen von Leu361/368 und Asp363/370, die sich auf dem gegenüberliegenden β -Strang B4 befinden, fixiert und steht senkrecht zu diesem Faltblatt aus Modul 4. Dieses Faltblatt ist streng konserviert und kann mit der starren Vertiefung eines Gelenks verglichen werden. Die Rotation um die C α Position von Asn416/423 resultiert in einer Verlagerung der gesamten nachfolgenden Helix, die mit Phe417/424 beginnt, allerdings ohne deren Sekundärstruktur weiter zu beeinflussen.

Auf einer Seite des Zugangs zum aktiven Zentrum bildet Helix H8 zusammen mit den vorangehenden Resten eine feste Begrenzung, an die Helix H11 sowohl in geöffnetem (Thr332 bis Gly338) als auch in geschlossenem (Met328 bis Pro331) Zustand anschließt. Die andere Seite wird von einem flexibleren Teil der Struktur flankiert, die den *loop* zwischen den β -Strängen B3 und C3 einbezieht. Dieser Bereich ist in beiden pflanzlichen Strukturen (Glu249 bis Glu255 in *zmHPPD*, Glu252 bis Glu262 in *atHPPD*) teilweise ungeordnet. In der bakteriellen Struktur ist dieser Sequenzbereich um drei Aminosäuren verkürzt (s. Abb. 27), komplett geordnet und fixiert Helix H11 an ihrer das Barrel abschließenden Position.

Es fällt auf, daß die Sequenzbereiche in der Umgebung des Scharniers um Asn416 und die gegenüberliegende Vertiefung um Leu361 und Leu363 in allen HPPDs streng konserviert sind, woraus geschlossen werden kann, daß dieser Mechanismus einer beweglichen Schranke, der an den in diesem Bereich unterschiedlichen Strukturen der beiden pflanzlichen Enzyme dargestellt werden konnte, für alle HPPDs gültig sein könnte.

Die N-terminal vor diesem Gelenk verlaufende Region von Cys409 bis Phe412 ist in *zmHPPD* und *atHPPD* fast identisch, weicht aber leicht von den Positionen der Hauptkettenatome der bakteriellen Struktur ab, was vermutlich durch die 15 Aminosäuren lange Insertion des FG-Faltblattes der beiden pflanzlichen Enzyme bedingt wird. Dieser wie ein *hairpin* aus dem Protein hervorstehende Strukturbereich ist in direkter Nachbarschaft des katalytischen Eisenatoms lokalisiert. Aufgrund dieser Nähe erscheint eine spezielle Funktion dieses *loops* wahrscheinlich, zumal der Carbonylsauerstoff von Phe412 mit einem der Eisenliganden (Wat2) eine stabilisierende Wasserstoffbrücke bildet.

Obwohl außer den das Eisen in *atHPPD* koordinierenden Aminosäureresten keine weiteren Liganden bei einer Auflösung von 3 Å bestimmt werden konnten, läßt die fast identische Position des Phe412 aus *zmHPPD* entsprechenden Restes Phe419 vermuten, daß eine ähnliche

Interaktion mit der Koordinationssphäre des Eisenatoms auch in der geöffneten Konformation vorliegt.

In geschlossener Konformation zeigen ausschließlich Seitenketten hydrophober Reste (Phe412, Phe417, Leu420, Ile424 und Tyr427) in Richtung des aktiven Zentrums.

4.4.5. Modell der Substratbindung

Die die Substratbindungstasche aufbauende Oberfläche ist hauptsächlich hydrophob, was ungewollte Interaktionen zwischen molekularem Sauerstoff und Aminosäuren verhindert. Die in *zmHPPD* nachgewiesene oktaedrische Koordination des Eisenatoms läßt sich mit dem von Serre et al. (1999) vorgeschlagenen Modell der Substratbindung in Einklang bringen. Es erscheint wahrscheinlich, daß während der Substratbindung Reste in direkter Umgebung und auch in weiterer Entfernung lokalisierte Aminosäuren kleinere Konformationsänderungen durchführen müssen.

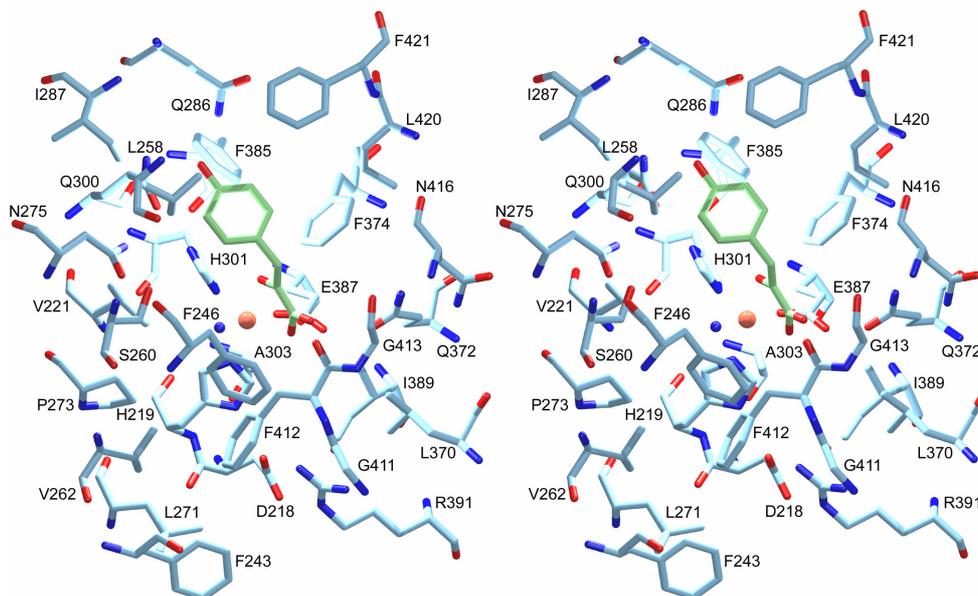


Abb. 31: Möglicher Substratkomplex Modell der möglichen Substratbindung von 4-Hydroxyphenylpyruvat (grün) im aktiven Zentrum der *zmHPPD*. Durch Bindung des Substrats würden die beiden Wassermoleküle Wat1 und Wat2 verdrängt. Das Modell wurde manuell erzeugt.

Wat1 und Wat2, die 2,9 Å voneinander entfernt sind, würden durch O8 und O9 von 4-Hydroxyphenylpyruvat (HPP) ersetzt. Dessen Hydroxylgruppe, die zur Substraterkennung unerlässlich ist (Johnson-Winters et al., 2003) könnte zur Stabilisierung der

Substratorientierung Wasserstoffbrücken zu Gln286 und Gln300 bilden. In diesem Fall müßte sich allerdings Phe412 verlagern, da sein Carbonylsauerstoff zu nah am terminalen Carbonylsauerstoff des Substrates lokalisiert wäre.

Der nach der HPP-Bindung erfolgende nukleophile Angriff des Sauerstoffs, der zu einem komplett oxidierten Substrat führen soll, erfordert sowohl den Zugang des Sauerstoffs als auch seine Lokalisation in geeigneter Position relativ zum Substrat. Die Position von Wat3 in einer hydrophoben Tasche, die von den Resten Val221, Val262, Leu271, Pro273 und dem Hydroxyphenylrest des Substrates gebildet wird, könnte durch molekularen Sauerstoff besetzt werden, abgeschirmt von der geladenen Seitenkette des Arg391 durch die Seitenkette von Phe412 und unzugänglich für das Solvens.

Dieser Aspekt der Reaktion wirft jedoch die Frage auf, wie molekularer Sauerstoff in das aktive Zentrum eintreten kann, wenn HPP bereits gebunden hat. Diese geordnete Reihenfolge der Substratbindung wurde durch Rundgren (1977) und Johnson-Winters et al. (2003) nachgewiesen. Der Zugang des molekularen Sauerstoffs zum aktiven Zentrum könnte entlang der *hairpin* artigen Struktur erfolgen, zwischen den Resten Phe243, Phe246, Leu271, Val272, Pro273 und Phe412, die einen Kanal von etwa vier bis fünf Angström Durchmesser aufbauen, der zur Moleküloberfläche hin geöffnet ist.

Serre et al. (1999) postulierten eine Interaktion des Substrates mit den auf der C-terminalen Helix lokalisierten Aminosäureresten Phe337, Leu340 und Ile344. Solche Wechselwirkungen erscheinen in der *zmHPPD* Struktur nicht möglich, da die entsprechenden Reste Phe417, Ile420 und Ile424 zu weit von der Substratbindungsstelle entfernt sind. Eine entsprechende Ausrichtung der Helix, wie sie aufgrund deren Flexibilität möglich erschiene, würde eine Verschiebung von etwa 2,5 Å in Richtung des C-terminalen Barrels erforderlich machen. Eine solche Verschiebung könnte die in der *zmHPPD* Struktur ungeordnete Seitenkette von Phe417 in eine Position bringen, in der es möglich wäre, den aromatischen Ring des Substrates durch *stacking* zu stabilisieren. Dagegen würde keine Notwendigkeit für die Verschiebung von Asn275 und His301 bestehen. Zur Aufklärung der Substratbindung und der Details des katalytischen Mechanismus sind Bindungsstudien unterschiedlicher Liganden unbedingt erforderlich.

4.4.6. Vergleich der pflanzlichen HPPDs mit anderen Dioxygenasestrukturen

Vergleicht man die dreidimensionalen Strukturen der pflanzlichen HPPDs mit denen anderer Dioxygenasen fällt auf, daß ihre Tertiärstrukturen große Ähnlichkeiten zur Faltung der DHBD

(Han et al., 1995; Uragami et al., 2001) und MPC (Kita et al., 1999) aufweisen. Diese beiden Enzyme zählen zur Klasse der extradiol spaltenden Dioxygenasen. DHBD katalysiert die Umwandlung von 2,3-Dihydroxybiphenyl zu 2-Hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoat, während MPC Catechol zu 2-Hydroxymuconatsemialdehyd umsetzt. Im Gegensatz dazu katalysiert die HPPD keine Spaltung des aromatischen Ringes, sondern eine komplexere Reaktion, die die Decarboxylierung und Dioxygenierung, sowie eine Verschiebung der Substratseitenkette beinhaltet. Trotz dieser mechanistischen Unterschiede in der katalysierten Reaktion ähnelt die HPPD in einigen Merkmalen den zuvor genannten Dioxygenasen. Dazu gehört die Spezifität für ein aromatisches Substrat, die Erfordernis eines Nicht-Häm-Eisen-Atoms und die Abhängigkeit der Aktivität vom Oligomerisierungszustand.

Beide extradiol spaltenden Dioxygenasen werden durch die wiederholte Abfolge von $\beta\alpha\beta\beta$ -Modulen aufgebaut, was sich nur durch das Fehlen der letzten α -Helix jeden Moduls vom Sekundärstrukturmuster der HPPDs unterscheidet. Die in HPPD zusätzlich auftretenden Helices H2, H4 und H6 verbinden Module 1 und 2, 2 und 3 bzw. 3 und 4 miteinander. Außerdem ist Helix H2 an der Dimerisierung der pflanzlichen Enzyme beteiligt. Auch der die Helices H8 und H10 bildende Strukturbereich hat in den extradiol spaltenden Enzymen keine Entsprechung. Obwohl alle drei Enzyme aus wiederholten Faltungsmotiven aufgebaut sind, die vermuten lassen, daß sie sich auf dieselbe Art durch Genduplikation und wegen der über die gesamte Primärsequenz verteilten konservierten Aminosäuren aus einem gemeinsamen Ursprung entwickelt haben, unterscheiden sie sich doch in einigen Merkmalen sehr deutlich voneinander.

Die Überlagerung der Monomere von *zm*HPPD mit DHBD bzw. MPC ergibt r.m.s. Abweichungen von 1,61 bzw. 1,81 Å für 150 bzw. 149 C α Atome. Ein sekundärstrukturbasiertes Alignment der drei Enzyme zeigt, daß nur 16 % der Reste identisch sind. Die meisten dieser wenigen über die gesamte Primärsequenz verteilten konservierten Reste sind hauptsächlich an der Eisenkoordination beteiligt bzw. befinden sich im Sequenzbereich zwischen N- und C-terminaler Domäne, so daß deren Orientierung zueinander trotz der großen Sequenzunterschiede in allen drei Enzymen übereinstimmt.

Die r.m.s. Abweichungen der N-terminalen Domänen, die in allen drei Enzymen nicht an der Katalyse beteiligt sind, liegen mit 1,6 Å geringfügig höher als die der C-terminalen Domänen, die um 1,5 Å (MPC) bzw. 1,38 Å (DHBD) voneinander abweichen. Dieser Unterschied könnte auf die Beteiligung der N-terminalen Domänen an der Dimerisierung der pflanzlichen HPPDs bzw. der Oktamerisierung der DHBD und der Tetramerisierung der MPC

zurückzuführen sein, durch deren Reste in allen Enzymen der größte Teil der Intermonomerkontakte vermittelt wird. Dieses Merkmal wurde bereits durch einen Vergleich zwischen der bakteriellen und den pflanzlichen HPPDs gezeigt, bei dem an der Oligomerisierung beteiligte Sequenzbereiche diejenigen sind, die sich am deutlichsten in den Strukturen unterscheiden.

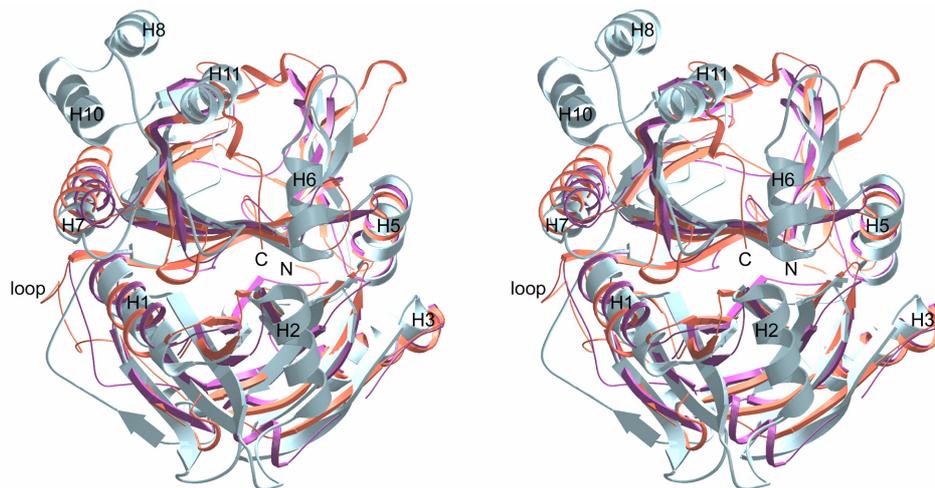


Abb. 32: Überlagerung der monomeren Strukturen unterschiedlicher Dioxygenasen Dargestellt sind Ribbonsplots der *zmHPPD* (hellblau) und zweier extradiol spaltender Dioxygenasen, der 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase (DHBD, violett, nach Uragami et al., 2001) und der Catechol 2,3-Dioxygenase (MPC, rot, nach Kita et al., 1999).

Der aus der MPC Struktur hervorstehende *loop* (Gly130 bis Trp139) entspricht dem in *zmHPPD* die Module 2 und 3 verbindenden Bereich. Dieser ist sowohl in MPC an der Tetramerisierung, als auch in HPPD an der Dimerisierung beteiligt, während die korrespondierenden Reste der bakteriellen HPPD Struktur nicht in deren Tetramerisierung involviert sind. Auch hier zeigt der Vergleich, daß die Zusammenlagerung der pflanzlichen HPPD Monomere nicht den beiden möglichen MPC Dimeren entspricht, sondern, wie im Unterschied zu *pfHPPD*, das Dimer des eukaryotischen Enzyms fast orthogonal zur Tetramerisierungsfläche der MPC gebildet wird.

Größere strukturelle Unterschiede liegen in der C-terminalen Domäne. Diese ist in DHBD weiter geöffnet als in *zmHPPD*, da das Barrel nicht durch eine Helix abgeschlossen wird. Das umgekehrte ist der Fall in der MPC Struktur. Dort ist das C-terminale Barrel durch einen längeren *loop*, der durch eine kurze Helix unterbrochen wird, noch enger abgeschlossen als in DHBD und den pflanzlichen Strukturen, was auf das kleinere Substratmolekül zurückzuführen ist. Trotzdem ist das aktive Zentrum der HPPDs gegenüber dem Lösungsmittel weniger exponiert als die aktiven Zentren beider ringspaltenden Dioxygenasen.

In allen Enzymen besteht der Kernbereich des aktiven Zentrums aus zwei Histidin- und einem Glutamatrest, die das katalytische Eisenatom koordinieren und fast perfekt überlagern. Dabei entspricht His219 aus *zmHPPD* His145 (DHBD) bzw. His153 (MPC), His301 überlagert mit His209 bzw. His214 und Glu387 mit Glu260 bzw. Glu265. Doch während die Koordinationsgeometrie des Eisenatoms im substratfreien Komplex der MPC sowie der *atHPPD* als verzerrter Tetraeder und in DHBD als quadratisch pyramidal beschrieben wurde (Han et al., 1995; Kita et al., 1999; Uragami et al., 2001), liegt in *zmHPPD* eine oktaedrische Koordination des Eisenatoms vor. Wie in der DHBD Struktur sind auch in *zmHPPD* Wassermoleküle an der Koordination des Eisens beteiligt. Die in der Familie der extradiol spaltenden Dioxygenasen streng konservierten Reste His194, His240 und Tyr249 in DHBD bzw. His199, His246 und Tyr255 in MPC haben bis auf den Tyrosinrest, der mit Phe374 (*zmHPPD*) überlagert, keine korrespondierenden Reste im aktiven Zentrum der HPPD, die in irgendeiner Weise an der Katalyse beteiligt sein könnten. Auch die Erfordernis der α -Ketosäure als Cofaktor für HPPD stellt ein Unterscheidungsmerkmal zwischen diesen Enzymklassen dar.

Trotz der geringen Sequenzidentität ist den aktiven Zentren aller Enzyme der hydrophobe Charakter gemein. Die auffallendsten strukturellen Unterschiede bestehen in der Größe der das aktive Zentrum bildenden Vertiefung, deren Zugänglichkeit für das Solvens, in der Koordinationsgeometrie der Eisenatome und den verschiedenen Oligomerisierungsmodi der Enzyme dieser verschiedenen Dioxygenasefamilien.

4.5. RÖNTGENSTRUKTURANALYSE DER LÖSLICHEN ANORGANISCHEN PYROPHOSPHATASE AUS *HELIOTHIS VIRESCENS*

4.5.1. Kristallisation und Datensammlung

Röntgentaugliche Kristalle der löslichen anorganischen Pyrophosphatase aus *H. virescens* (*hvPPase*) entstanden aus zwei unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen im Dampfdiffusionsverfahren in CrysChem-Platten (Charles Supper Co., USA). Innerhalb von 5 Tagen wuchsen bei 18°C aus der Präzipitansbedingung (1) 12 % PEG 3350 in 50 mM Citrat/NaOH, pH 4,2 bipyramidale Kristalle mit einer Größe von etwa 0,6 x 0,6 x 0,5 mm³. Dabei lag das Protein in einer Konzentration von 10,6 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 und

3 mM MgCl₂ vor. Die Kristallisationstropfen (*sitting drop*) setzten sich aus 5 µl Proteinlösung und 2 µl Präzipitanslösung, sowie 4 µl 24 % PEG 3350 zusammen. Der Ansatz wurde gegen 300 µl Bodenpuffer über die Gasphase äquilibriert.

Der zweite Kristalltyp wuchs innerhalb von 2 Tagen bei identischer Zusammensetzung und Konzentration der Proteinlösung sowie identischen äußeren Bedingungen aus zwei unterschiedlichen Präzipitansbedingungen (2) 20 % MPD, 0,1 M Natriumacetat, pH 5 und (3) 40 % MPD, 0,1 M MES, pH 6,0.

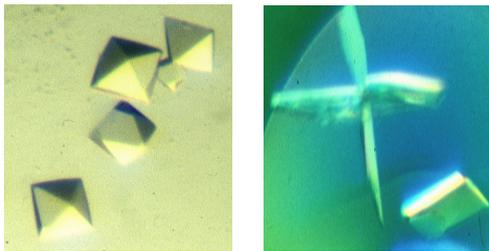


Abb. 33: hvPPase-Kristalle aus Kristallisationsbedingung (1) links und (4) rechts

- (1) 12 % PEG 3350, 50 mM Citrat/NaOH, pH 4,2
- (4) 18 % PEG 6000, 16,6 mM MgCl₂ in 100 mM MES, pH 6,1

Die Röntgenbeugungsdaten der hvPPase-Kristalle aus Bedingung (1) wurden bei Raumtemperatur mit einer *Image Plate* auf einem Röntgendrehanodengenerator aufgenommen. Der Kristall beugte bis zu einer maximalen Auflösung von 2,5 Å. Bei der Auswertung der Daten stellte sich jedoch heraus, daß die Kristalle verzwilligt waren.

Die Beugungsdaten der Kristalle aus Bedingung (3) wurden zunächst ebenfalls bei Raumtemperatur mit Graphit-monochromatisierter Röntgenstrahlung ($\lambda = 1,5418$ Å) mittels einem *Image Plate* Detektor aufgenommen. Dazu wurden die Kristalle in silanisierten Quarzkapillaren montiert. Diese beugten anfänglich bis zu einer maximalen Auflösung von 3 Å, wurden jedoch im Verlauf der Messung so stark geschädigt, daß keine kompletten Datensätze aufgezeichnet werden konnten. Deshalb wurden zur Vermeidung von Strahlenschäden die Beugungsdaten dieser Kristalle unter *Cryo*bedingungen aufgenommen. Dafür wurde dem Kristallisationspuffer 10 % Glycerin zugegeben, der Kristall kurz im Puffer veränderter Zusammensetzung äquilibriert, anschließend in einem *cryoloop* geerntet, sofort auf der Meßapparatur montiert und im Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren.

Durch Veränderung der Kristallisationsbedingung zu Bedingung (4) 18 % PEG 6000, 16,6 mM MgCl₂ in 100 mM MES, pH 6,1 konnten Kristalle erzeugt werden, die bis zu einer begrenzenden Auflösung von 2,07 Å beugten.

Der Drehwinkel je Aufnahme betrug 1,5° über einen Meßbereich von 190,5°.

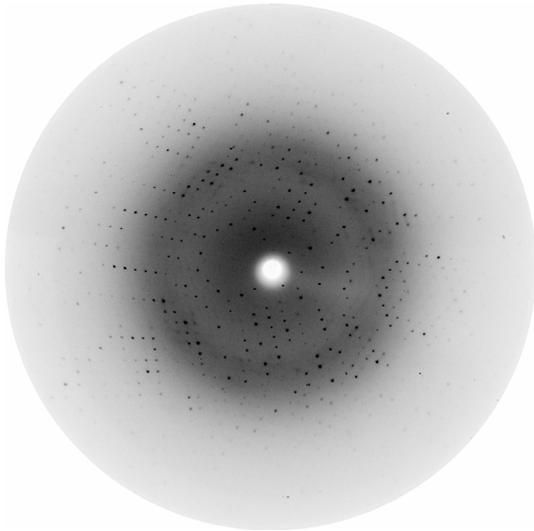


Abb. 34: Beugungsbild einer Rotationsaufnahme der *hvPPase* Die Auflösung am Detektorrand beträgt 2,07 Å, die Rotation 1,5° und die Wellenlänge $\lambda = 1,5418$ Å.

Die Bestimmung der Raumgruppe, die Verfeinerung der Zellparameter und die Integration erfolgte mit dem Programm MOSFLM Version 6.01 (Leslie, 1998). Die Datenreduktion wurde mit dem Programm SCALA (CCP4, 1994) durchgeführt. Die Statistik der Datenprozessierung ist in Tabelle 7 zusammengefaßt.

4.5.2. Patterson-Suche

Die Struktur der *hvPPase* wurde mittels der Patterson-Suchmethode (MR) mit Hilfe des Programms AMoRe (Navaza, 1994) gelöst. Es wurden Daten des niedriger aufgelösten Datensatzes mit einer Auflösung von 45 bis 3,5 Å verwendet. Als Suchmodell diente die Struktur der PPase aus *Saccharomyces cerevisiae* (PDB Eintrag: 1HUK) von Swaminathan et al. (1998). Die erste Lösung hatte einen Korrelationsfaktor von $c = 0,493$, einen R-Faktor von 43,8 % und hob sich damit klar von den weiteren gefundenen Lösungen ab.

Tabelle 7: Datenprozessierungsstatistik der löslichen anorganischen PPase aus *H. virescens*

DATENSAMMLUNG	
Raumgruppe	C2
Zellkonstanten [Å, °]	
a	110,9
b	50,8
c	61,1
α	90
β	121,6
γ	90
Einheitszellvolumen [Å ³]	344220,3
V _m [Å ³ /Da]	2,26
Wassergehalt [%]	46
Anzahl der Moleküle pro asymmetrischer Einheit	1
begrenzende Auflösung [Å]	2,07
gemessene Reflexe	64604
unabhängige Reflexe	16955
Multiplizität	3,8
I/σ	11,3 (3,6)
Vollständigkeit der Daten [%]	95,4 (95,4)
R _{merge}	4,8 (25,6)
$R_{\text{merge}} = \frac{\sum (I - \langle I \rangle)}{\sum I}$	
Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der jeweils äußersten Auflösungsschale (2,18 - 2,07 Å).	

4.5.3. Modellbau und Verfeinerung

Die Kristallstruktur der *hv*PPase wurde mit dem Programm CNS unter Verwendung der Parameter von Engh und Huber verfeinert (Engh & Huber, 1991). Eine *rigid body* Verfeinerung mit dem höher aufgelösten Datensatz (2,1 Å) und ein *simulated annealing* bei 2000 K ergab einen ersten kristallographischen R-Faktor von 40,71 % und einen freien R-Faktor von 39,1 %. Die berechnete 2F_o-F_c Elektronendichte war von guter Qualität und erlaubte den manuellen Einbau der Aminosäuren Ala2 bis Leu287. Im späteren Verlauf der Verfeinerung wurden zwei Mg²⁺-Ionen in die 2F_o-F_c Dichte eingebaut und 132 Wassermoleküle identifiziert. Jedem Verfeinerungsschritt folgte ein manuelles Überbauen des Modells mit dem Programm MAIN (Turk, 1992), bei dem auch die automatisch positionierten Solvensmoleküle überprüft, wenn nötig entfernt, oder neue Moleküle eingebaut wurden. Die

finalen Verfeinerungsschritte schlossen anisotrope B-Faktorverfeinerung ein und führten zu einem kristallographischen R-Faktor von 20,5 % und einem freien R-Faktor von 25,9 %.

Die Elektronendichte der fünf C-terminalen Aminosäuren wurde jedoch auch in späteren Verfeinerungszyklen nicht interpretierbar, so daß sich das finale *hvPPase* Atommodell auf 286 Aminosäuren bezieht.

4.5.4. Qualität des Atommodells

Im final verfeinerten Molekülmodell der *hvPPase* sind, abgesehen von den fünf C-terminalen Aminosäuren und den Seitenketten weniger langkettiger, an der Moleküloberfläche lokalisierter Reste, alle übrigen Aminosäuren, zwei Mg^{2+} -Ionen und die Solvensmoleküle sehr gut durch die $2F_o - F_c$ Elektronendichte definiert.

Eine Überprüfung der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette im *hvPPase* Atommodell zeigte, daß sich 90,9 % aller Aminosäuren (ausgenommen Glycin und Prolin) in dem am meisten bevorzugten Bereich und 9,1 % im zusätzlich erlaubten Bereich befinden. Einzig Aminosäure Pro87 zeigt eine cis-Bindungsgeometrie, die in den verbotenen Bereich der Ramachandran-Statistik (Ramachandran & Sasisekharan, 1968) fällt. Dies stimmt mit der Struktur der PPase aus *S. cerevisiae* überein. In Abb. 35 ist die Ramachandranstatistik aller Aminosäuren des finalen Atommodells der *hvPPase* graphisch dargestellt. Die Qualität des verfeinerten Atommodells wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al., 1993) überprüft, die Verfeinerungsstatistik des endgültigen Modells ist in Tabelle 8 zusammengefaßt.

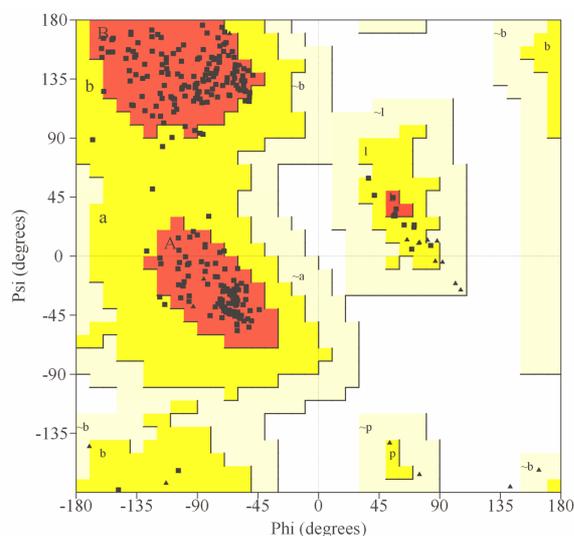


Abb. 35: Ramachandran-Plot der dihedralen Hauptkettenwinkel Phi und Psi des finalen *hvPPase* Modells Die Bereiche, die für L-Aminosäuren erlaubt sind, sind gelb dargestellt, wobei die sterisch günstigsten Regionen rot gekennzeichnet sind. Weiße Flächen markieren sterisch verbotene Bereiche.

Tabelle 8: Verfeinerungsstatistik der löslichen anorganischen PPase aus *H. virescens*

VERFEINERUNG	
Auflösungsbereich [Å]	35 – 2,1
verwendete Reflexe	16368
Reflexe im Arbeitsset	15556
Reflexe im Testset	812
R-Faktor [%]	20,5
R _{free} [%]	25,9
r.m.s. Abweichungen von Idealwerten der	
Bindungslängen [Å]	0,011
Bindungswinkel [°]	1,502
mittlerer B-Faktor [Å ²]	
Hauptkettenatome	31,57
Seitenkettenatome	33,15
Solvensmoleküle	36,89
Metallatome	32,35
Anzahl der Atome in der asymmetrischen Einheit	
Proteinatome (ohne Wasserstoff)	2258
Solvensmoleküle	132
Metallatome	2
(Φ, Ψ) – Winkelverteilung im	
bevorzugten Bereich [%]	90,9
zusätzlich erlaubten Bereich [%]	9,1
$R = \frac{\sum (F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})}{\sum F_{\text{obs}} }$	
R _{free} wurde mit 5 % der Daten berechnet, die von der Verfeinerung ausgeschlossen wurden.	

4.5.5. Strukturbeschreibung der *hv*PPase

4.5.5.1. Überblick

Die rekombinante *hv*PPase besteht aus 286 Aminosäuren pro monomerer Untereinheit und weist eine kompakte, globuläre Form auf (Abb. 36). Die Kernstruktur des Enzyms besteht aus einem verdrehten β-Barrel. Dieses wird aus fünf β-Strängen gebildet, die in der Abfolge β1, β4, β5, β6, β7 antiparallel zueinander verlaufen und ist von vier α-Helices umgeben, die sich an der Proteinoberfläche befinden. Das aktive Zentrum ist innerhalb dieses Barrels lokalisiert und wird von Helix A gegenüber dem Solvens abgeschirmt.

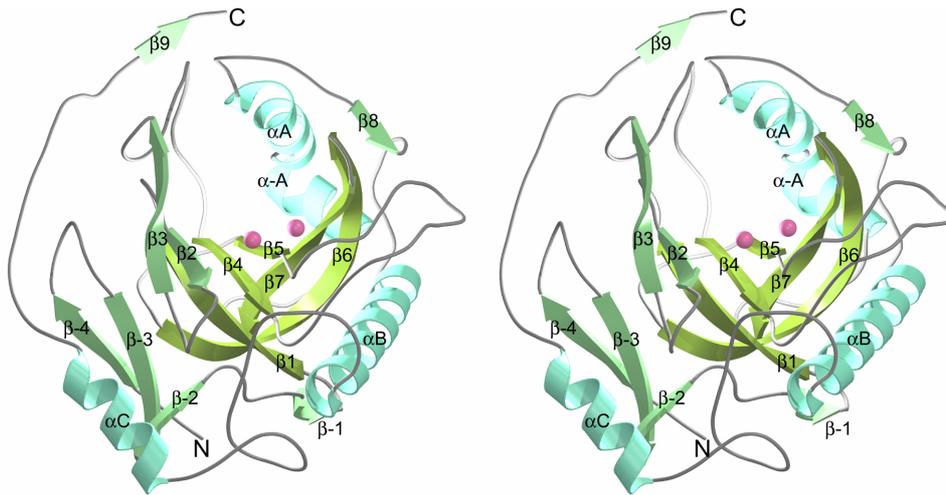


Abb. 36: Stereo-Ribbon-Darstellung des *hvPPase* Monomers In der Abbildung sind β -Stränge mit mindestens drei und α -Helices mit mindestens vier Aminosäuren dargestellt. Die konservierten Sekundärstrukturen (β 1 bis β 8 sowie α A und α B) sind wie in den löslichen anorganischen Pyrophosphatasen aus *E. coli* und *T. thermophilus* (Teplyakov et al., 1994; Kankare et al., 1996) benannt. Sekundärstrukturelemente, die im bakteriellen Enzym nicht vorkommen, sind entsprechend der Bezeichnungen der PPase aus *S. cerevisiae* durch absteigende Numerierung für N-terminale (β -1, β -2, α -A usw.) und durch aufsteigende Numerierung für C-terminale Insertionen (β 9 und α C) gekennzeichnet. Das aktive Zentrum befindet sich innerhalb des β -Barrels unterhalb von Helix α A, die Mg^{2+} -Ionen sind als pink gefärbte Kugeln dargestellt.

Diese Anordnung des β -Barrels und zweier Helices (α A und α B) ist in den bekannten Strukturen anderer PPasen von Typ I konserviert. Der zweite Teil der Untereinheit umfaßt ein der Struktur des Hefeenzym homologes β -Faltblatt, das aus den N-terminalen β -Strängen β -4, β -3 und β -2 aufgebaut wird. Dieses Faltblatt wird von Helix α C gegenüber dem Lösungsmittel abgeschirmt. Das β -Barrel wird von diesem Faltblatt durch einen haarnadelartigen *loop* getrennt, der durch die β -Stränge β 2 und β 3 gebildet wird. Die Position dieses *loops* wird durch Kontakte zu Resten zwischen den α -Helices B und C stabilisiert. Obwohl die *hvPPase* aus β -Barrel und β -Faltblatt besteht, sind diese eng gepackt und bilden keine separaten Domänen.

Zwischen β 3 und β 4 befindet sich ein langer *loop*, der in Kontakt zu Helix A steht. Auf ihm sind zwei Reste (Arg80 und Tyr91) lokalisiert, die gleichzeitig Bestandteil des aktives Zentrums sind. Außerdem interagiert dieser *loop* mit dem N-terminalen β -Strang 9 und stabilisiert so die Lage des C-Terminus. Zwischen Phe86 und Pro87 liegt, wie in der PPase-Struktur aus *S. cerevisiae* eine *cis*-Bindung vor. Außerdem ist dieser *loop* auch an der Dimerisierung der *hvPPase* beteiligt.

4.5.5.2. Das physiologische Dimer

Das physiologische Dimer der *hv*PPase wird über die zweifache kristallographische Achse aufgebaut und ist in Abb. 37 dargestellt. Durch die Dimerisierung, die hauptsächlich über *stacking* aromatischer Aminosäurereste vermittelt wird, werden 1018 Å² pro Monomer vom Solvens abgeschirmt.

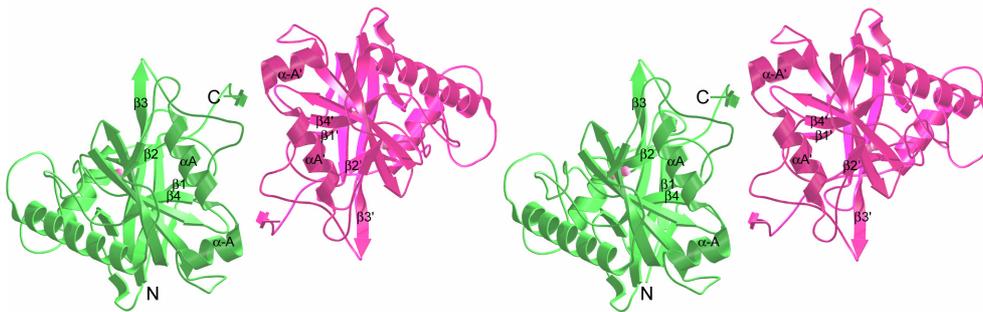


Abb. 37: Physiologisches Dimer der löslichen anorganischen Pyrophosphatase aus *H. virescens* Der Blick verläuft entlang der zweifachen Symmetrieachse. Die Monomere sind in grün bzw. pink, die Mg²⁺-Ionen in rosa dargestellt. Das Zentrum der Kontaktfläche wird von den *loops* zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$, sowie zwischen $\beta 3$ und $\beta 4$ gebildet.

Die den zentralen Teil der Kontaktfläche bildenden Reste Arg53, Trp54 sowie Trp284 sind in allen tierischen PPasen und den Enzymen aus Hefe konserviert. Anders als in der PPase aus *S. cerevisiae* bildet jedoch kein Histidinrest das Zentrum des Kontaktbereichs, da dieses in *H. virescens* gegen Arg89 ausgetauscht ist, dessen Seitenketten nicht zur Kontaktfläche hin orientiert sind, sondern durch Wasserstoffbrücken zu Asp282 des gleichen Monomers stabilisiert werden. Dieses Arg89 ist in anderen PPasen eukaryotischer Organismen gegen einen Lysinrest ausgetauscht. Die Seitenketten des benachbarten konservierten His88 sind dagegen 8 Å voneinander entfernt, so daß Stabilisierung durch *stacking* in diesem Bereich nicht möglich ist. Die hydrophobe Seitenkette von Arg53 ist gegen die Seitenkette von Trp54 gepackt und bildet Wasserstoffbrücken zu Gly127 und Glu128. Das N^ε-Proton steht mit den delokalisierten Elektronen der Seitenkette von Trp54 in Verbindung. Trp54 selbst wird durch die fast orthogonale Anordnung seiner Seitenkette relativ zur denen von Trp284' und Arg89' stabilisiert.

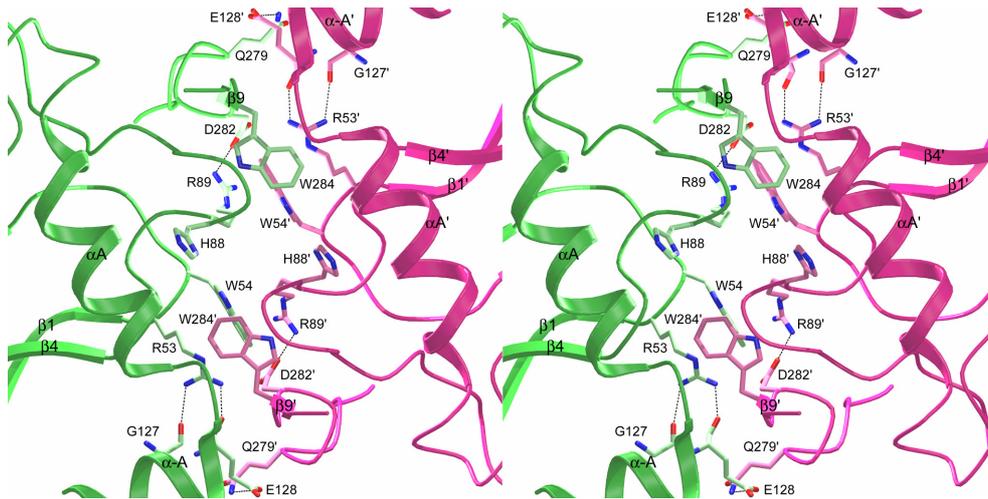


Abb. 38: Stereoabbildung des Intermonomerkontakts des *hvPPase* Dimers Die Dimerisierung der beiden Untereinheiten des Enzyms (hier grün bzw. pink dargestellt) wird hauptsächlich durch Wechselwirkung aromatischer Reste vermittelt. In den Randbereichen der Kontaktfläche wird das Dimer durch Wasserstoffbrücken zwischen den Resten Gln279 und Glu128, sowie durch Wechselwirkungen zwischen dem N^ε-Proton von Arg53, den delokalisierten Elektronen der Seitenketten von Trp54, Trp284' und Arg89' stabilisiert.

Keiner der an der Dimerisierung beteiligten Reste gehört gleichzeitig zum aktiven Zentrum, anders als im Enzym aus *E. coli*, in dem die Mutationen mancher Aminosäuren im aktiven Zentrum die Dissoziation des Hexamers in Trimere verursachen (Salminen et al., 1995).

4.5.5.3. Das aktive Zentrum

Das aktive Zentrum der *hvPPase* befindet sich in einer Vertiefung von etwa 20 Å Durchmesser im konservierten β -Barrel und ist in Abb. 39 dargestellt. Der hydrophobe Zugangsbereich des aktiven Zentrums wird von den Resten Tyr91, Tyr95, Trp190, Phe191 und Tyr194 gebildet, während der übrige Teil der Tasche von polaren Resten ausgekleidet wird. Diese hydrophoben Reste werden von den positiv geladenen Aminosäuren Lys58, Arg80, Lys156, Lys195 und Lys200 bedeckt, die sich, mit Ausnahme von Lys156, dabei nah an der Oberfläche des Moleküls befinden und damit für das Solvens zugänglich sind. Diesem positiv geladenen Bereich liegt am Grund der Vertiefung ein Cluster negativ geladener Aminosäuren gegenüber. Von diesen Resten liegen Glu60 und Asp73 auf den β -Strängen β 2 bzw. β 3, die weiteren Reste Glu50, Asp117, Asp119, Asp122, Asp149, Glu150, Glu152 und Asp154 sind im β -Barrel lokalisiert. Insgesamt sind an der Bildung des aktiven Zentrums (ohne Gly96) zwanzig Aminosäuren beteiligt, deren Seitenketten ausnahmslos in Richtung der Koordinationsstellen der bivalenten Metallionen weisen.

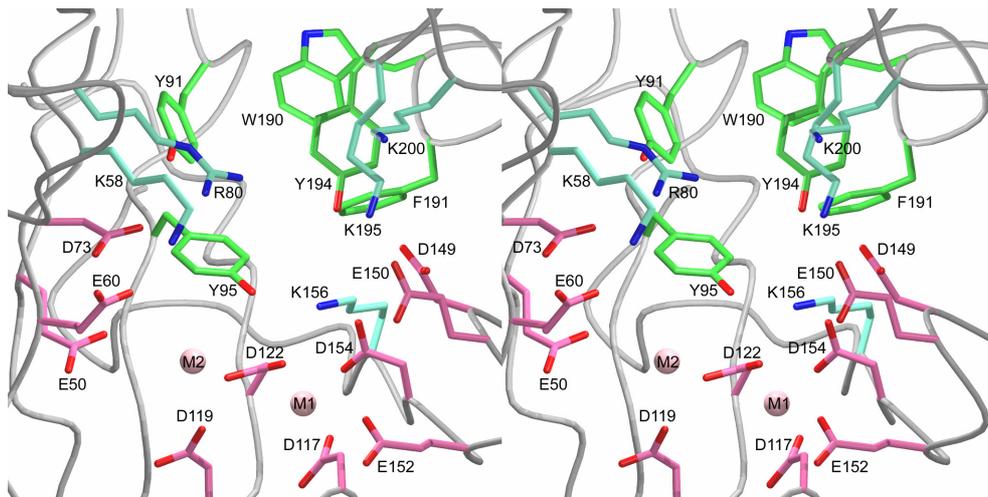


Abb. 39: Stereobild des aktiven Zentrums der hvPPase In der Abbildung sind die zwanzig das aktive Zentrum aufbauenden Aminosäurereste gezeigt. Saure Reste sind in pink, basische in türkis, die hydrophoben Aminosäuren in grün dargestellt. Die Positionen der Mg²⁺-Ionen sind durch pinkfarbene Kugeln markiert.

Diese Reste sind im Alignment mit der PPase aus *S. cerevisiae* komplett konserviert, während im Vergleich zur PPase aus *E. coli* nur 19 Reste konserviert sind. Achtzehn dieser Reste sind am Aufbau des aktiven Zentrums im bakteriellen Enzym beteiligt und von diesen wiederum zehn für die Bindung der Ionen und des Substrats erforderlich (Samygina et al., 2001).

Durch die zuvor beschriebene Anordnung der Reste liegt das aktive Zentrum der hvPPase in der durch die drastische Aufweitung des β -Barrels frei zugänglichen Vertiefung, die in der Oberflächendarstellung deutlich erkennbar ist.

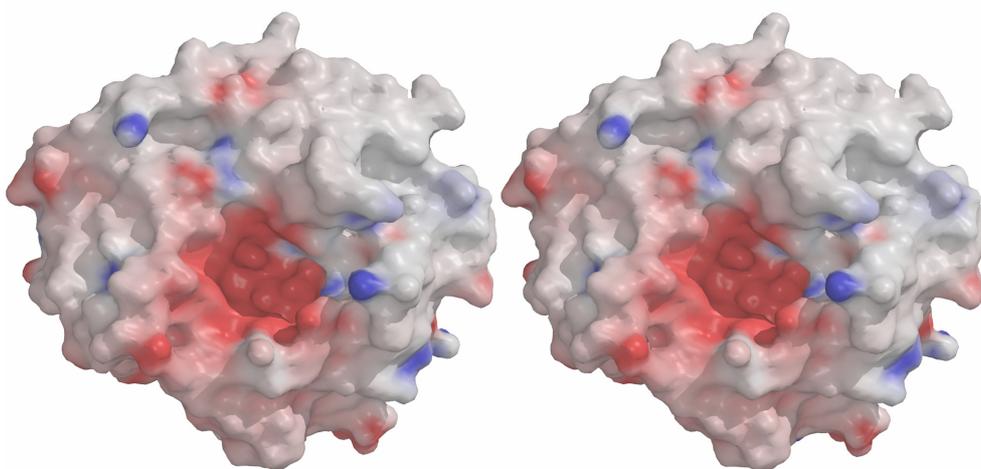


Abb. 40: Oberflächendarstellung der hvPPase Die Oberfläche des Proteinmoleküls wurde nach dem elektrostatischen Potential eingefärbt. In der Mitte ist die das aktive Zentrum beinhaltende stark negativ geladene Vertiefung deutlich erkennbar.

Der stark saure Charakter des aktiven Zentrums, der die Präferenz für die Bindung zweier positiv geladener Metallionen und des mit zwei weiteren Ionen komplexierten Substrats verursacht, ist in der vorangehenden Abbildung dargestellt.

4.5.5.4. Bindung der bivalenten Metallionen

In der Abwesenheit von Substrat binden zwei aktivierende Mg^{2+} -Ionen am Grund des aktiven Zentrums in M1 und M2. Dabei dienen Aminosäurereste aus dem negativ geladenen Cluster als Liganden (s. Abb. 39). Diese würden durch die Bindung des mit weiteren Ionen komplexierten Substrates vom Lösungsmittel abgeschirmt.

Die Lokalisation von zwei Mg^{2+} -Ionen konnte anhand positiver Differenzdichte bestimmt werden. Mg^{2+} in M1 wird durch drei Aspartatreste (Asp117, Asp122 und Asp154) jeweils monodentat koordiniert. Die verbleibenden drei Koordinationsstellen sind durch Wassermoleküle besetzt, so daß eine oktaedrische Koordination des Metallions vorliegt. Die Bindung von Mg^{2+} in M2 erfolgt dagegen pentakoordinativ, von den Aminosäuren ist nur Asp122 beteiligt. Dieses verbindet dadurch M1 und M2, wird durch eine Wasserstoffbrücke zu Lys156 stabilisiert, welches wiederum eine Wasserstoffbrücke zu Tyr95 bildet. Die Grundfläche der hier vorliegenden planaren Pyramide wird im Gegensatz zur Koordination des Ions in M1 von vier Wassermolekülen aufgespannt, die sechste Koordinationsstelle des Metallions ist unbesetzt.

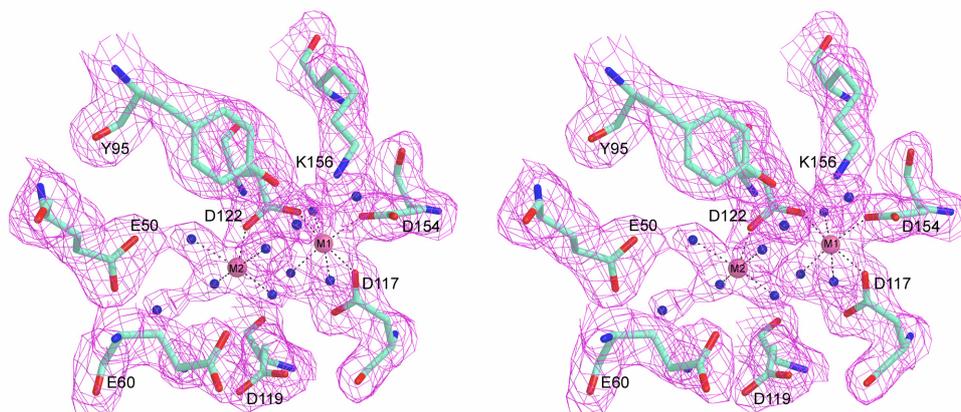


Abb. 41: Die Koordinationssphäre der Metallionen im aktiven Zentrum der hvPPase Das Metallatom in M1 wird oktaedrisch durch drei Aminosäurereste (Asp117, Asp122 und Asp154), sowie drei Wassermoleküle koordiniert, während die Koordinationsstellen von Mg^{2+} in M2 nicht vollständig besetzt sind. Die $2F_o - F_c$ Dichte ist bei 1σ konturiert.

Diese unvollständige oktaedrische Koordination liegt auch im aktiven Zentrum der *scPPase* (Heikinheimo et al., 1996) vor. Eines dieser Wassermoleküle wird zusätzlich durch eine Wasserstoffbrücke zu E50 stabilisiert. Außerdem ist das Ion in M2 ebenfalls, vermittelt durch ein Wassermolekül, indirekt an den Carbonylsauerstoff von Asp119 koordiniert. Beide Ionen werden durch zwei Wassermoleküle miteinander verbunden, die 1,9 bzw. 2 Å von diesen entfernt sind.

Aufgrund des nahezu doppelt so hohen Temperaturfaktors des Mg^{2+} Ions in M2 im Vergleich zu denen seiner Liganden ist jedoch davon auszugehen, daß diese Position nur in etwa 50 % aller Moleküle durch Mg^{2+} besetzt ist. Der Koordinationsabstand beider Ionen zu ihren Liganden liegt zwischen 1,9 und 2,2 Å.

Diese Beobachtungen bestätigen Untersuchungsergebnisse der PPase aus *S. cerevisiae*, nach denen die Dissoziationskonstante für das Metallion in M2 viermal so hoch ist wie für dasjenige in M1 (Cooperman et al., 1981).

4.5.6. Vergleich mit dem Enzym aus *S. cerevisiae* und *E. coli*

Wie am Sekundärstruktur-basierten Alignment (Abb. 42) erkennbar ist, weisen die Enzyme aus *H. virescens* und *S. cerevisiae* große Homologien auf. Die Identität der Reste von *hvPPase* zu *scPPase* beträgt 57 %. Wie aufgrund dieser Ähnlichkeit zu erwarten ist, zeigt die Überlagerung der Monomere beider Enzyme, daß 149 von 265 Resten topologisch äquivalent sind, woraus sich r.m.s. Abweichungen von 0,84 Å ergeben.

Der Unterschied zum bakteriellen Enzym besteht vor allem in den verlängerten N- und C-Termini der eukaryotischen PPase und in der geringeren Aminosäureidentität, die nur 29,7 % beträgt. Die Überlagerung der Monomere zeigt, daß nur 43 C α Atome von 145 Resten zur Deckung gebracht werden können, und daß die r.m.s. Abweichung in diesem Fall 1,13 Å beträgt.

Größere Differenzen zwischen den monomeren Strukturen der eukaryotischen Enzyme liegen in der Lokalisation der Aminosäurereste Ser25 bis Gly26 von *H. virescens* und den entsprechenden Resten Gly23 bis Lys24 aus *S. cerevisiae*. Eine weitere Abweichung betrifft den durch die Reste Ala237 bis Asp241 (*hvPPase*) bzw. Ser235 bis Gly239 (*scPPase*) aufgebauten *loop* zwischen den Helices α B und α C. In diesem Bereich weichen die Positionen der C α Atome um durchschnittlich 4 Å voneinander ab. Auch die Position der C-terminalen Helix α C und des folgenden *loops* zeigt eine deutliche Abweichung, vor allem

im Bereich zwischen Lys267 bis Pro270 (*hvPPase*) bzw. Pro262 bis Ser265 (*scPPase*), wo der Unterschied zwischen den C α Positionen bis zu 7 Å beträgt. Diese Differenz wird durch die Insertion von drei Aminosäuren in *hvPPase* verursacht, deren Helix α C deutlich länger ist als im Enzym aus Hefe. Die Lokalisation des β -Stranges β 9 weicht ebenfalls voneinander ab. Während in *scPPase* dieser β -Strang parallel zu β -4 verläuft und damit am Aufbau des β -Faltblattes beteiligt ist, ist β 9 in *hvPPase* in Richtung des C-Terminus verlagert und stabilisiert den *loop* zwischen den β -Strängen β 3 und β 4. Die räumliche Position dieses *loops* ist sowohl für die Integrität des aktiven Zentrums von großer Bedeutung, da auf ihm Arg80 und Tyr91 lokalisiert sind, als auch notwendig für die Dimerisierung, weil His88 und Arg89 an der Stabilisierung der Intermonomerkontaktfläche beteiligt sind. Die Lokalisation der die Metallionen koordinierenden Aminosäuren und der übrigen die Dimerisierung vermittelnden *loops* stimmen dagegen überein.

Zwischen *hvPPase* und *ecPPase* ist die Kernstruktur, bestehend aus dem β -Barrel (β 1 und β 3 bis β 7), sowie β -Strang 3 und den Helices α A und α B konserviert, während die β -Stränge β -4 bis β -1, β 9 und die Helices α -A und α C in *E. coli* aufgrund der verkürzten N- bzw. C-Termini völlig fehlen. Diese Unterschiede sind in Abb. 43 dargestellt. Das Fehlen von Helix α -A wird durch die veränderte Primärstruktur der *ecPPase* Sequenz bedingt. Der *loop* zwischen Ala162 und Pro165 (*hvPPase*) hat im bakteriellen Enzym wegen der Insertion zweier Aminosäuren eine andere Konformation, während die sich in *hvPPase* an diesen Bereich anschließende Helix aufgrund der Deletion von drei Aminosäuren fehlt. Eine Abweichung der C α Positionen von etwa 4 Å ist im Bereich des β -Stranges β 8 zu beobachten, der in *ecPPase* vier Aminosäuren länger ist als in *hvPPase*.

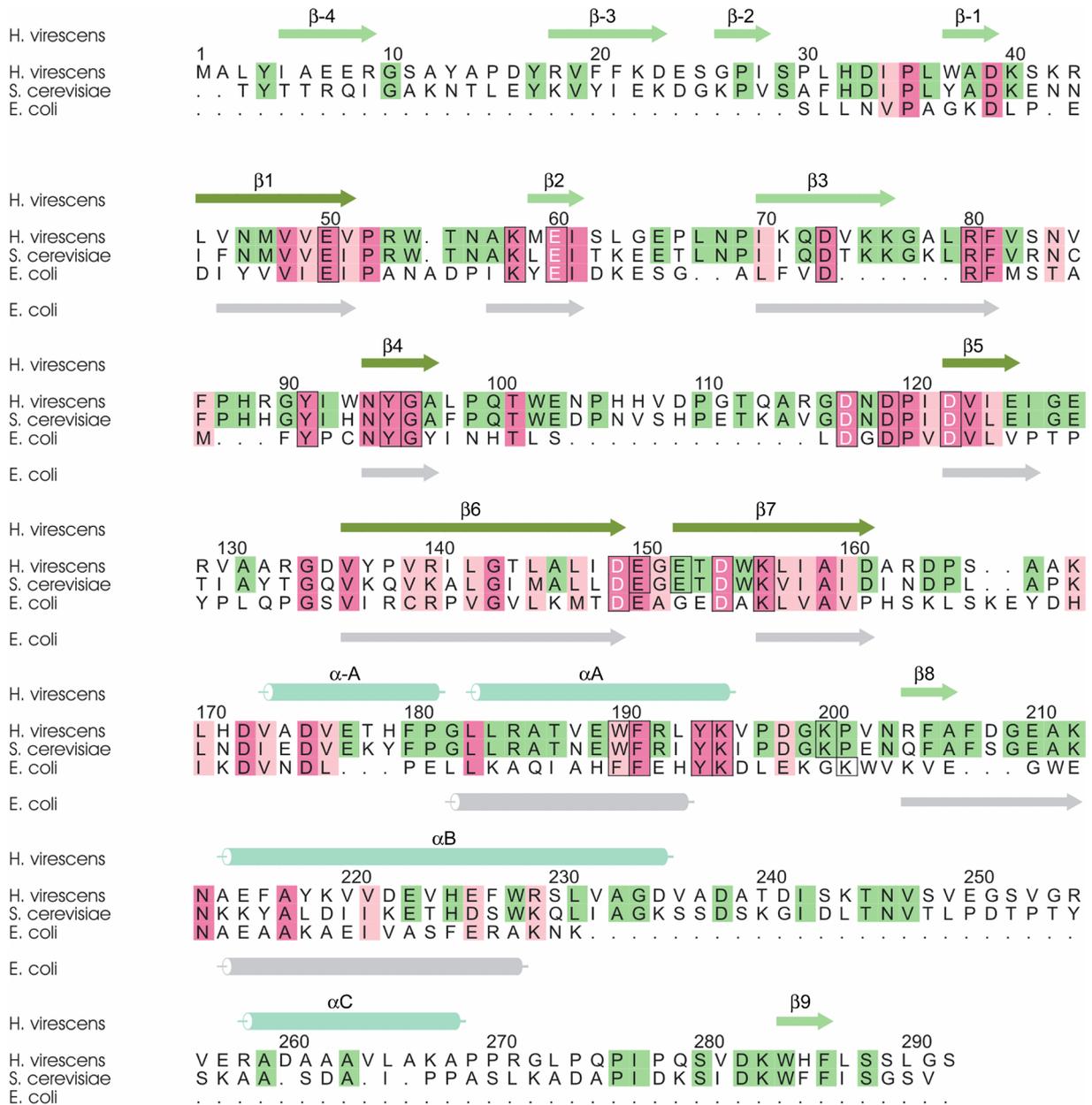


Abb. 42: Strukturbasierter Vergleich der PPase Sequenzen aus *H. virescens*, *S. cerevisiae* und *E. coli*
 Zwischen bakterieller und eukaryotischen Sequenzen konservierte Reste sind pink, homologe Austausche rosa unterlegt. Die zwischen den eukaryotischen Enzymen konservierten Aminosäuren sind grün unterlegt. Die Numerierung bezieht sich auf die Sequenz der *hvPPase*, deren Sekundärstrukturen oberhalb des Alignments dargestellt sind, während die bakteriellen unterhalb in hellgrau abgebildet sind. Die das aktive Zentrum aufbauenden Reste sind durch eine Box markiert, die die Metallatome koordinierenden Reste sind weiß hervorgehoben.

Einer der beiden an der Koordination der Metallionen beteiligten *loops* zwischen β4 und β5 (Glu103 bis Asn118 in *hvPPase*) gehört ebenfalls zu den sich am deutlichsten unterscheidenden Regionen, was durch die Insertion von 12 Aminosäuren in den eukaryotischen Enzymen bedingt wird, deren aktives Zentrum durch diesen verlängerten *loop* als enger geschlossen erscheint.

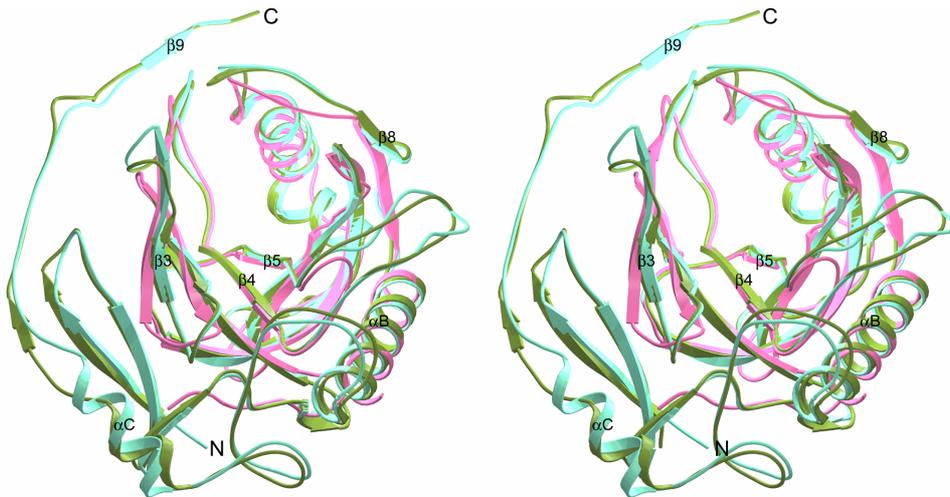


Abb. 43: Überlagerung der monomeren Untereinheiten unterschiedlicher PPasen Dargestellt ist die Überlagerung je einer Untereinheit der dimer organisierten eukaryotischen PPasen (*H. virescens* türkis, *S. cerevisiae* grün) und der ein Hexamer bildenden PPase aus *E. coli* (pink).

4.5.6.1. Der Aufbau der aktiven Zentren

Die Topologie des aktiven Zentrums von *hvPPase* ist sehr ähnlich zu dem von *scPPase* und, mit wenigen Einschränkungen, auch zum bakteriellen Enzym aus *E. coli*. Fast alle katalytischen Reste sind konserviert und nehmen ähnliche räumliche Positionen ein. Ausnahmen sind die Reste Trp190, das in *E. coli* gegen Phe137 und Glu152, das gegen Gly100 ausgetauscht ist. Letzterer Rest ist auch in *scPPase* (Glu150) nicht für die Enzymaktivität essentiell, da er weder an Substratbindung, noch an der Metallkoordination beteiligt ist. Die Seitenkette von Glu98, die Glu150 in *hvPPase* entspricht, ist in *ecPPase* nicht in den Aufbau des aktiven Zentrums involviert. Aufgrund der nahezu identischen Position von Asp122/Asp120 (*hvPPase/scPPase*) im Vergleich zum korrespondierenden Asp70 aus *ecPPase* ist die Affinität für das Ion in M1 in *hvPPase* vermutlich ebenso hoch, wie im Hefeenzym, während diese in *ecPPase* aufgrund des größeren Abstandes zwischen Metall und Ligand geringer ist. Diese konservierte Architektur des aktiven Zentrums der eukaryotischen Enzyme läßt auf einen identischen Reaktionsmechanismus schließen, wie er für das Enzym aus Hefe postuliert wird, wo im stark geladenen aktiven Zentrum nahezu jede geladene Gruppe von Substrat, Übergangszustand und Produkt durch Metallionen, Wasserstoffbrückenbindungen zu Seitenketten des Proteins oder zu geordneten Wassermolekülen koordiniert wird.

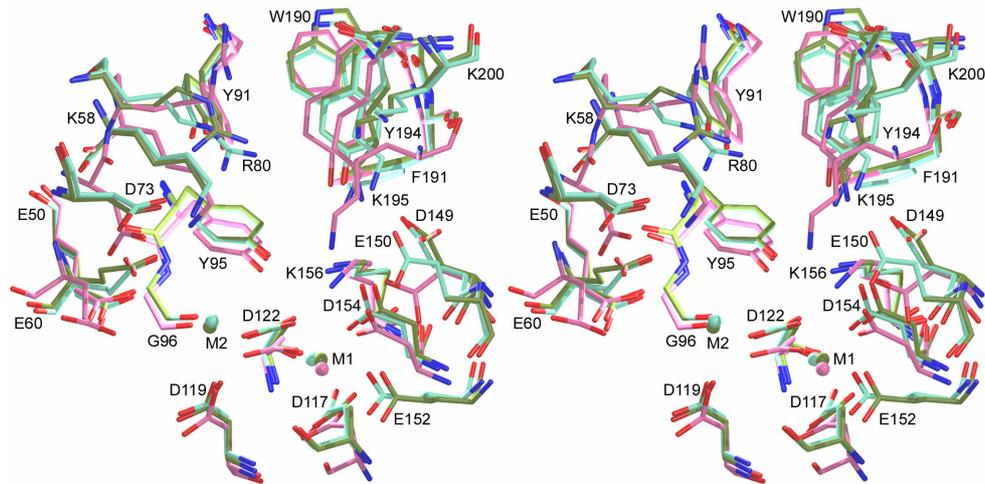


Abb. 44: Aufbau der aktiven Zentren eu- und prokaryotischer PPasen Dargestellt ist eine Überlagerung der aktiven Zentren der Enzyme aus *H. virescens* (türkis), *S. cerevisiae* (grün) und *E. coli* (pink). Die Numerierung bezieht sich auf die Sequenz der *hvPPase*.

Durch die hier untersuchte Struktur wird ebenfalls bestätigt, daß die Besetzung zweier Koordinationsstellen mit den „aktivierenden“ Metallionen vor der Substratbindung erfolgt und daß die Bindungsstellen eine unterschiedliche Affinität für diese Ionen besitzen, weil die Position M2 nur in etwa 50 % aller Moleküle besetzt ist, wie dies auch in *ecPPase* der Fall ist (Kankare et al., 1996b; Harutyunyan et al., 1997).

Daraus wird ersichtlich, daß vermutlich das Ion in M1 auf jeden Fall zum Strukturertalt des aktiven Zentrums und des β -Barrels erforderlich ist. Durch dessen Koordination über Asp117, Asp122 und Asp154 und die Bindung des zweiten Ions wird zusammen mit den Seitenketten von Arg80, Lys156 und Lys195 die stark negative Ladung des aktiven Zentrums kompensiert, so daß das Substrat im Komplex mit weiteren Ionen binden kann. Wie in den PPase-Strukturen von Tuominen et al. (1998) und Heikinheimo et al. (2001) liegt auch in *hvPPase* eine durch zwei Wassermoleküle gebildete Brücke von 2,5 Å Länge zwischen M1 und M2 vor, die ihrerseits 4,32 Å voneinander entfernt sind. Vermutlich wird eines dieser Wassermoleküle während der Substratbindung aus dem Komplex verdrängt, weil sich M1 und M2 aufeinander zubewegen, so daß ein Wassermolekül zwischen den Metallatomen zurückbleibt, welches als Nukleophil an P2 des Substrates angreifen und dessen Hydrolyse induzieren kann. Der Abstand von 4,32 Å zwischen M1 und M2 liegt genau zwischen den von Heikinheimo et al. (1996) beobachteten Abständen des substratfreien (4,9 Å) bzw. des Enzym-Produkt-Komplexes (3,7 Å) der *scPPase*. Analog zum Hefeenzym kann davon ausgegangen werden, daß die zur Katalyse nötigen weiteren Metallionen über beide Phosphoratome des Substrates und durch weitere Koordination durch die Carboxylatgruppen

der Seitenketten von Glu60 (M3) und Asp149, sowie Asp154 (M4) stabilisiert werden. Die Bindung des Substrates würde über die Seitenketten von Lys58, Arg80, Tyr194, Lys195, M3 und M4 erfolgen, wobei die als erstes aus dem aktiven Zentrum austretende Phosphatgruppe nur über einen positiv geladenen Rest (Lys58) koordiniert wäre. Das Substrat würde über zusätzliche Wassermoleküle an weitere Aminosäuren gebunden, so daß seine negative Ladung abgeglichen würde. Dies stellt eine notwendige Voraussetzung für einen möglichen nukleophilen Angriff auf PP_i durch ein „aktiviertes“ Wassermolekül oder Hydroxylion dar.

V. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACV	δ -(L- α -amino adipoyl)-L-cysteinyl-D-valin
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>atHPPD</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase
Å	Angström (1 Å = 10 ⁻¹⁰ m)
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CCD	<i>charge coupled device</i>
cDNA	komplementäre DNA
<i>ceHPPD</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
ddH ₂ O	<i>aqua bidestilata</i>
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
et al.	und Mitarbeiter
ϵ	Extinktionskoeffizient
Faktor Xa	aktivierter Blutgerinnungsfaktor Xa
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
His-Tag	(Histidin) ₆ -Markierung
HPP	4-Hydroxyphenylpyruvat
HPPD	4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase
<i>hvPPase</i>	<i>Heliothis virescens</i> anorganische lösliche Pyrophosphatase
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
M	Molar (mol/l)
MAD	<i>Multiple Anomalous Dispersion</i>
MBP	<i>maltose binding protein</i>
MES	Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MR	<i>Molecular Replacement</i> (Molekularer Ersatz)
NAD(P)H	Nicotinamiddinukleotid(-phosphat)
<i>ncs</i>	<i>non crystallographic symmetry</i>
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda=x$ nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCC	<i>Pasteur Culture Collection</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PDB	Protein Database
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	Piperazin-N,N'-bisethansulfonsäure
PP _i	Pyrophosphat
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
PVDF	Polyvinylidendifluorid
r.m.s.	<i>root mean square</i> (mittlerer Standard)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)

RT	Raumtemperatur
<i>sc</i> PPase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> lösliche anorganische Pyrophosphatase
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde
<i>s</i> HPPD	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase
SIR	<i>Single Isomorphous Replacement</i>
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
THP	Tetrahydropterin
Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
ü.N.	über Nacht
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galactopyranosid
<i>zm</i> HPPD	<i>Zea mays</i> 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase

VI. LITERATUR

- Ahn, S., Milner, A. J., Fütterer, K., Konopka, M., Ilias, M., Young, T. W. & White, S. A. (2001). The „open“ and „closed“ structures of the type-c inorganic pyrophosphatases from *Bacillus subtilis* and *Streptococcus gordonii*. *J. Mol. Biol.* **313**, 797-811
- Anzellotti D. & Ibrahim, R. K. (2000). Novel flavonol 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase: affinity purification, characterization and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **382**, 161-172
- Arciero D. M., Orville A. M. & Lipscomb J. D. (1985). [O-17] water and nitric-oxide binding by protocatechuate 4,5-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase – evidence for binding of exogenous ligands to the active-site Fe²⁺ of extradiol dioxygenases. *J. Biol. Chem.* **260**, 4035-4044
- Avaeva, S. M., Rodina, E. V., Kurilova, S. A., Nazarova, T. I. & Vorobyeva, N. N. (1996). Effect of D42N substitution in *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase on catalytic activity and Mg²⁺-binding. *FEBS Lett.* **392**, 91-94
- Avaeva, S., Kurilova, S., Nazarova, T., Rodina, E., Vorobyeva, N., Sklyankina, V., Grigorjeva, O., Harutyunyan, E., Oganessyan, V., Wilson, K., Dauter, Z., Huber, R. & Mather, T. (1997). Crystal structure of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase complexed with SO₄²⁻. Ligand-induced molecular asymmetry. *FEBS Lett.* **410**, 502-508
- Avaeva, S. M., Rodina, E. V., Vorobyeva, N. N., Kurilova, S. A., Nazarova, T. I., Sklyankina, V. A., Oganessyan, V. Y. & Harutyunyan, E. H. (1998). Changes in *E. coli* inorganic pyrophosphatase structure induced by binding of metal activators. *Biochemistry (Moscow)* **63**, 699-707
- Awata, H., Endo, F. & Matsuda, I. (1994). Structure of the human 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase gene (HPD). *Genomics* **23**, 534-539
- Baldwin, J., Voegtli, W. C., Khidekel, N., Moëne-Loccoz, P., Krebs, C., Pereira, A. S., Ley, B. A., Huynh, B. H., Loehr, T. M., Riggs-Gelasco, P. J., Rosenzweig, A. C. & Bollinger, J. M. (2001). Rational reprogramming of the R2 subunit of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase into a self-hydroxylating monooxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 7017-7030
- Baltscheffsky, M. & Baltscheffsky, H. (1992). Inorganic pyrophosphate and inorganic pyrophosphatase. In: Ernster, L., ed., *Molecular mechanisms in bioenergetics*. Elsevier, Amsterdam, pp 331-348
- Baltscheffsky, M., Schultz, A. & Baltscheffsky, H. (1999). H⁺-proton-pumping inorganic pyrophosphatase: a tightly membrane-bound family. *FEBS Lett.* **452**, 121-123
- Banerjee, A. & Cooperman, B. S. (1983). Electron paramagnetic resonance studies of Mn(II)-Mn(II) interaction in yeast inorganic pyrophosphatase. *Inorg. Chim. Acta* **79**, 146-148
- Bartley, G. E., Maxwell, C. A., Wittenbach, V. A. & Scolnik, P. A. (1997). Cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA for p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol.* **113**, 1465-1468
- Barton, G. J. (1993). ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments. *Protein. Eng.* **6**, 37-40
- Baykov, A. A., Alexandrov, A. P. & Smirnova, I. N. (1992). A two-step mechanism of fluoride inhibition of rat liver inorganic pyrophosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 238-243
- Baykov, A. A. & Shestakov, A. S. (1992). Two pathways of pyrophosphate hydrolysis and synthesis by yeast inorganic pyrophosphatase. *Eur. J. Biochem.* **206**, 463-470
- Baykov, A. A., Hyytiä, T., Volk, S. E., Kasho, V. N., Vener, A. V., Goldman, A., Lahti, R. & Cooperman, B. S. (1996). Catalysis by *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase: pH and Mg²⁺ dependence. *Biochemistry* **35**, 4655-4661
- Baykov, A. A., Cooperman, B. S., Goldman, A. & Lahti, R. (1999). Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. In: Schröder, H. C., Müller, W. E. G., eds., *Progress in molecular and subcellular biology*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, pp 127-150
- Baykov, A. A., Fabrichniy, I. P., Pohjanjoki, P., Zyryanov, A. B. & Lahti, R. (2000). Fluoride effects along the reaction pathway of pyrophosphatase: Evidence for a second enzyme pyrophosphate intermediate. *Biochemistry* **39**, 11939-11947
- Belogurov, G. A., Fabrichniy, I. P., Pohjanjoki, P., Kasho, V. N., Lehihulta, E., Turkina, M. V., Cooperman, B. S., Goldman, A., Baykov, A. A. & Lahti, R. (2000). Catalytically important ionizations along the reaction pathway of yeast pyrophosphatase. *Biochemistry* **39**, 13931-13938
- Berger, S., Eilersiek, U., Kinzelt, D. & Steinmüller, K. (1993). Immunopurification of a subcomplex of the NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* **326**, 246-250
- Bernal, J. D. & Crowford, D. (1934). X-ray photographs of crystalline pepsin. *Nature* **133**, 794-795
- Birboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1522
- Blundell, T. L. & Johnson, L. N. (1976). *Protein Crystallography*. Academic Press, London, UK

- Bonting, C. F. C., Gerards, R., Zehnder, A. J. B. & Kortstee, G. J. J. (1999). Purification and properties of pyrophosphatase of *Acinetobacter johnsonii* 210A and its involvement in the degradation of polyphosphate. *Biodegradation* **10**, 393-398
- Boyington, J. C., Gaffney, B. J. & Arnez, M. (1993). The 3-dimensional structure of an arachidonic-acid 15-lipoxygenase. *Science* **260**, 1482-1486
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Bragg, W. L. (1913). The structure of some crystals as indicated by their diffraction of X-rays. *Proc. Roy. Soc. A* **89**, 248-277
- Brown, C. A., Pavlosky, M. A., Westre, T. E., Zhang, Y., Hedman, B., Hodgson, K. O. & Solomon, E. I. (1995). Spectroscopic and theoretical description of the electronic structure of S=3/2 iron-nitrosyl complexes and their relation to O-2 activation by non-heme iron enzyme active sites. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 715-732
- Brünger, A. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-475
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. und Warren, G. L. (1998). Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr.* **D 54**, 905-921
- Carter, C. W., Jr. & Carter, C. W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.* **254**, 12219-12223
- Castenholz, R. (1988). Culturing methods for cyanobacteria. *Meth. Enzymol.* **167**, 68-93
- CCP4 (1994). The CCP4 suite: Collaborative Computational Project, Number 4. *Acta Crystallogr.* **D 50**, 760-763
- Chiou, Y.-M. & Que, L., Jr. (1995). Models for α -keto acid-dependent non-heme iron enzymes: Structures and reactivity of $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{L})(\text{O}_2\text{CCOPh})](\text{ClO}_4)$ complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 3999-4013
- Clifton, I. J., Hsueh, L.-C., Baldwin, J. E., Harlos, K. & Schofield, C. (2001). Structure of proline 3-hydroxylase. Evolution of the family of 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6625-6636
- Cooperman, B. S., Panackal, A., Springs, B. & Hamm, D. J. (1981). Divalent metal ion, inorganic phosphate and inorganic phosphate analogue binding to yeast inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry* **20**, 6051-6060
- Cowtan, K. (1994). Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on protein crystallography **31**, 34-38
- Crouch, N. P., Adlington, R. M., Baldwin, J. E., Lee, M.-H. & Mackinnon, C. H. (1997). A mechanistic rationalization for the substrate specificity of recombinant mammalian 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD). *Tetrahedron* **53**, 6993-7010
- Crouch, N. P., Lee, M. H., Iturriagagoitia-Bueno, T. & MacKinnon, C. H. (2000). Cloning, expression, and purification of mammalian 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase/alpha-ketoisocaproate dioxygenase. *Methods Enzymol.* **324**, 342-355
- Dähnhardt, D., Falk, J., Appel, J., van der Kooij, T. A. W., Schulz-Friedrich, R. & Krupinska, K. (2002). The hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 is not required for plastoquinone synthesis. *FEBS Lett.* **523**, 177-181
- De Carolis, E. & De Luca, V. (1994). 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase and related enzymes: biochemical characterization. *Phytochemistry* **36**, 1093-1107
- Denum, J., Lindstedt, S. & Rundgren, M. (1982). In: King, T. E., Mason, H. S. & Morrison, M., eds., *Oxidases and related redox systems*. Pergamon Press, Albany, New York, pp 519-542
- Desikan, K. R., Dhodapkar, M. V., Munshi, N. C. & Barlogie, B. (1999). Recent advances in the treatment of multiple myeloma. *Curr. Op. in Hematology* **6**, 216-221
- Drenth, J. (1994). *Principles of X-ray Crystallography*. Springer Verlag, New York, USA
- Edman, P. & Henschen, A. (1975). *Sequence determination. Protein Sequence determination*. Springer Verlag, Heidelberg
- Efimova, I. S., Salminen, A., Pohjanjoki, P., Lapinniemi, J., Magretova, N. N., Cooperman, B. S., Goldman, A., Lahti, R. & Baykov, A. A. (1999). Directed mutagenesis studies of the metal binding site at the subunit interface of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* **274**, 3294-3299
- Ellaway, C. J., Holme, E., Standing, S., Preece, M. A., Green, A., Ploechl, E., Ugarte, M., Trefz, F. K. & Leonard, J. V. (2001). Outcome of tyrosinaemia type III. *J. Inher. Metab. Dis.* **24**, 824-832
- Ellis, M. K., Whitfield, A. C., Gowans, L. A., Auton, T. R., Provan, W. M., Lock, E. A. & Smith, L. L. (1995). Inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione and 2-(2-chloro-4-methanesulfonylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione. *Toxicol. Appl. Pharm.* **133**, 12-19

- Ellis, H. R., Daubner, S. C., McCulloch, R. I. & Fitzpatrick, P. F. (1999). Phenylalanine residues in the active site of tyrosine hydroxylase: mutagenesis of Phe300 and Phe309 to alanine and metal ion-catalyzed hydroxylation of Phe300. *Biochemistry* **38**, 10909-10914
- Endo, F., Awata, H., Tanoue, A., Ishiguro, M., Eda, Y., Titani, K. & Matsuda, I. (1992). Primary structure deduced from complementary DNA sequence and expression in cultured cells of mammalian 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase. Evidence that the enzyme is a homodimer of identical subunits homologous to rat liver-specific alloantigen F. *J. Biol. Chem.* **267**, 24235-24240
- Endo, F., Awata, H., Katoh, H. & Matsuda, I. (1995). A nonsense mutation in the 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase gene (*hpd*) causes skipping of the constitutive exon and hypertyrosinemia in mouse strain III. *Genomics* **25**, 164-169
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein-structure refinement. *Acta Crystallogr. A* **47**, 392-400
- Ericksson, M., Myllyharju, J., Tu, H., Hellman, M. & Kivirikko, K. I. (1999). Evidence for 4-hydroxyproline in viral proteins. Characterization of a viral prolyl 4-hydroxylase and its peptide substrates. *J. Biol. Chem.* **274**, 22131-22134
- Esnouf, R. M. (1997). An extensively modified version of Molscript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graphics* **15**, 132-134
- Ewald, P. P. (1921). Das „reziproke“ Gitter in der Strukturtheorie. *Zeitschrift für Kristallographie* **56**, 129-156
- Fernández-Cañón, J. M. & Peñalva, M. A. (1995). Molecular characterization of a gene encoding a homogentisate dioxygenase from *Aspergillus nidulans* and identification of its human and plant homologues. *J. Biol. Chem.* **270**, 21199-21205
- Fersht, A. (1985). Enzyme structure and mechanism. A guide to enzyme catalysis and protein folding. 2nd edition. W. H. Freeman, New York
- Fersht, A. (1999). Structure and mechanism in protein science. W. H. Freeman and Company, New York, pp 125-127, 164-165
- Fiedler, E., Soll, J. & Schultz, G. (1982). The formation of homogentisate in the biosynthesis of tocopherol and plastoquinone in spinach chloroplasts. *Planta* **155**, 511-515
- Fitzpatrick, P. (1998). In: Sinnott, M., ed., *Comprehensive Biological Catalysis*, Vol 3. Academic Press, New York, pp 181-194
- Forbes, B. J. R. & Hamilton, G. A. (1994). Mechanism and mechanism-based inactivation of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Bioorg. Chem.* **22**, 343-361
- Friedrich, W., Knipping, P. & Laue, M. (1912). *Sitzungsberichte der mathematisch-physikalischen Klasse der Königlichen Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München*
- Frishman, D. & Argos, P. (1995). Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins* **23**, 566-79
- Fuqua, W. C., Coyne, V. E., Stein, D. C., Lin, C.-M. & Weiner, R. M. (1991). Characterization of melA: A gene encoding melanin biosynthesis from the marine bacterium *Shewanella colwelliana*. *Gene* **109**, 131-136
- Garcia, I., Rodgers, M., Lenne, C., Rolland, A., Sailland, A. & Matringe, M. (1997). Subcellular localization and purification of a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells and characterization of the corresponding cDNA. *Biochem. J.* **325**, 761-769
- Garcia, I., Rodgers, M., Pepin, R., Hsieh, T.-F. & Matringe, M. (1999). Characterization and subcellular compartmentation of recombinant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Arabidopsis* in transgenic Tobacco. *Plant Phys.* **119**, 1507-1516
- Gibson, D. T., ed. (1984). *Microbial degradation of organic molecules*. Marcel Dekker, New York, pp 535
- Gill, S. C. & Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326
- Gishla, S. & Massey, V. (1989). Mechanism of flavoprotein-catalyzed reactions. *Eur. J. Biochem.* **181**, 1-17
- Golden, B. D. (1998). The prevention and treatment of osteoporosis. *Arthrit. Care Res.* **11**, 124-134
- Gonzalez, M. A. & Cooperman, B. S. (1986). Glutamic acid-149 is important for enzymatic activity of yeast inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry* **25**, 7179-7185
- Goodwill, K. E., Sabatier, C. & Stevens, R. C. (1998). Crystal structure of tyrosine hydroxylase with bound cofactor analogue and iron at 2.3 Å resolution: self-hydroxylation of Phe300 and the pterin-binding site. *Biochemistry* **37**, 13437-13445
- Green, D. W., Ingram, V. M. & Perutz, M. F. (1954). The structure of hemoglobin IV. Sign determination by isomorphous replacement method. *Proc. Roy. Soc. Sect. A* **225**, 287-307
- Hamilton, G. A. (1971). In: Kaiser, E. T. & Kezdy, F. J., eds., *Progress in bioorganic chemistry*, Vol 1. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp 83-157
- Han, S., Eltis, L. D., Timmis, K. N., Muchmore, S. W. & Bolin, J. T. (1995). Crystal structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB-degrading pseudomonad. *Science* **270**, 976-980

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformations of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- Hanauske-Abel, H. M. & Gunzler, V. (1982). A stereochemical concept for the catalytic mechanism of prolylhydroxylase: applicability to classification and design of inhibitors. *J. Theor. Biol.* **94**, 421-455
- Hansen, T., Leppänen, V.-M., Goldman, A. & Schäfer, G. (1999). The extreme thermostable pyrophosphatase from *Sulfolobus acidocaldarius*: Recombinant expression, crystallization and comparative biophysical characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* **363**, 135-147
- Harayama, S., Kok, M. & Neidle, E. L. (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 565-601
- Harding, M. M. (1999). The geometry of metal-ligand interactions relevant to proteins. *Acta Crystallogr.* **D 55**, 1432-1443
- Harker, D. (1956). The determination of the phases of the structure factors on noncentrosymmetric crystals by the method of double isomorphous replacement. *Acta. Cryst.* **9**, 1-9
- Harpel, M. R. & Lipscomb, J. D. (1990). Gentisate 1,2-dioxygenase from *pseudomonas* – substrate coordination to active-site Fe²⁺ and mechanism of turnover. *J. Biol. Chem.* **265**, 22187-22196
- Harutyunyan, E. H., Kuranova, I. P., Vainshtein, B. K., Höhne, W. E., Lamzin, V. S., Dauter, Z., Teplyakov, A. V. & Wilson, K. S. (1996). X-ray structure of yeast inorganic pyrophosphatase with manganese and phosphate. *Eur. J. Biochem.* **239**, 220-228
- Harutyunyan, E. H., Oganessyan, V. Y., Oganessyan, N. N., Terzyan, S. S., Popov, A. N., Rubinskiy, S. B., Vainshtein, B. K., Nazarova, T. I., Kurilova, S. A., Vorobjeva, N. N. & Avaeva, S. M. (1996b). *Kristallografiya* **41**, 84-96
- Harutyunyan, E. H., Oganessyan, V. Y., Oganessyan, N. N., Avaeva, S. M., Nazarova, T. I., Vorobjeva, N. N., Kurilova, S. A., Huber, R. & Mather, T. (1997). Crystal structure of holo inorganic pyrophosphatase from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution. Mechanism of hydrolysis. *Biochemistry* **36**, 7754-7760
- Hauptmann, H. & Karle, J. (1953). Solution of the phase problem. I. The centro-symmetric crystal. Polycrystal Book Service, Pittsburgh
- Heikinheimo, P., Lehtonen, J., Baykov, A., Lahti, R., Cooperman, B. S. & Goldman, A. (1996). The structural basis for pyrophosphatase catalysis. *Structure* **4**, 1491-1508
- Heikinheimo, P., Tuominen, V., Ahonen, A.-K., Teplyakov, A., Cooperman, B. S., Baykov, A. A., Lahti, R. & Goldman, A. (2001). Toward a quantum-mechanical description of metal-assisted phosphoryl transfer in pyrophosphatase. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3121-3126
- Hendrickson, W. A. (1991). Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science* **254**, 51-58
- Höhne, W. E. & Heitmann, P. (1974). Tripolyphosphate as a substrate of the inorganic pyrophosphatase from baker's yeast; the role of divalent metal ions. *Acta Biol. Med. Germ.* **33**, 1-14
- Hoppe, W. (1957a). Die Faltmolekülmethode: eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen. *Acta Crystallogr.* **10**, 750-751
- Hoppe, W. (1957b). Die Faltmolekülmethode und ihre Anwendung in der röntgenographischen Konstitutionsanalyse von Biflorin. *Zeitschrift für Elektrochemie* **61**, 1076-1083
- Huber, R. (1965). Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Crystallogr.* **19**, 353-356
- Hünefeld, F. (1840). *Der Chemismus in der thierischen Organisation*, Leipzig
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* **11**, 268-272
- Jencks, W. P. (1969). *Catalysts in chemistry and enzymology*. McGraw-Hill, New York
- Johnson-Winters, K., Purpero, V. M., Kavana, M., Nelson, T. & Moran, G. R. (2003). (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase from *Streptomyces avermitilis*: The basis for ordered substrate addition. *Biochemistry* **42**, 2072-2080
- Josse, E.-M., Simkin, A. J., Laouré, A.-M., Kuntz, M. & Carol, P. (2000). A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant. Physiol.* **123**, 1427-1436
- Kahnert, A. & Kertesz, M. A. (2000). Characterization of a sulfur-regulated oxygenative alkylsulfatase from *Pseudomonas putida* S-313. *J. Biol. Chem.* **275**, 31661-31667
- Kankare, J., Neal, G. S., Salminen, T., Glumhoff, T., Cooperman, B. S., Lahti, R. & Goldman, A. (1994). The structure of *E. coli* soluble inorganic pyrophosphatase at 2.7 Å resolution. *Protein Eng.* **7**, 823-830
- Kankare, J., Salminen, T., Lahti, R., Cooperman, B., Baykov, A. A. & Goldman, A. (1996). The structure of *E. coli* inorganic pyrophosphatase at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallogr.* **D 52**, 551-563
- Kankare, J., Salminen, T., Lahti, R., Cooperman, B., Baykov, A. A. & Goldman, A. (1996b). Crystallographic identification of metal-binding sites in *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry* **35**, 4670-4677

- Kauppi, B., Lee, K., Carredano, E., Parales, R. E., Gibson, D. T., Eklund, H. & Ramaswamy, S. (1998). Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure* **6**, 571-586
- Kay, H. D. (1928). Phosphatases of mammalian tissues. II. Pyrophosphatases. *Biochem. J.* **22**, 14446-14448
- Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strandberg, B. E., Hart, R. C. & Davies, D. R. (1960). Structure of myoglobin; a three-dimensional fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature* **185**, 422-427
- Kim, K. H. & Petersen, M. (2002). cDNA-cloning and functional expression of hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cell suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Sci.* **163**, 1001-1009
- Kita, A., Kita, S., Fujisawa, I., Inaka, K., Ishida, T., Horiike, K., Nozaki, M. & Miki, K. (1999). An archetypical extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: the crystal structure of catechol 2,3-dioxygenase (metapyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2. *Structure* **7**, 25-34
- Kivirikko, K. I., Myllylä, R. & Pihlajaniemi, T. (1989). Protein hydroxylation – prolyl 4-hydroxylase, an enzyme with four cosubstrates and a multifunctional subunit. *FASEB J.* **3**, 1609-1617
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1994). Halloween...Masks and Bones. In: Bailey, S., Hubbard, R. & Waller, D., eds., From first map to final model. SERC Daresbury Laboratory, Warrington, pp 59-66
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1996). xdlMAPMAN and xdlDATAMAN - programs for reformatting, analysis and manipulation of biomacromolecular electron-density maps and reflection data sets. *Acta Crystallogr.* **D 52**, 826-828
- Knight, W. B., Dunaway-Mariano, D., Ransom, S. C. & Villafranca, J. J. (1984). Investigations of the metal-ion binding-sites of yeast inorganic pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* **259**, 2886-2895
- Kornberg, A. (1962). On the metabolic significance of phosphorolytic and pyrophosphorolytic reactions. In: Kasha, M., Pullman, D., eds., *Horizon in Biochemistry*. Academic Press, New York, pp 251-264
- Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-50
- Kuhn, N. J. & Ward, S. (1998). Purification, properties, and multiple forms of a manganese-activated inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **354**, 47-56
- Kunitz, M. (1961). Hydrolysis of adenosine triphosphate by crystalline yeast pyrophosphatase. *J. Gen. Physiol.* **45**, 31-46
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- 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
- Lee, D. L., Prisbylla, M. P., Cromartie, T. H., Dagarin, D. P., Howard, S. W., Provan, W. M., Ellis, M. K., Fraser, T. & Mutter, L. C. (1997). The discovery and structural requirements of inhibitors of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Weed Sci.* **45**, 601-609
- Lee, D. L., Knudsen, C. G., Michaely, W. J., Chin, H. L., Nguyen, N. H., Carter, C. G., Cromartie, T. H., Lake, B. H., Shribbs, J. M. & Fraser, T. (1998). The structure-activity relationships of the triketone class of HPPD herbicides. *Pestic. Sci.* **54**, 377-384
- Lenne, C., Matringe, M., Roland, A., Sailland, A., Pallett, K. E. & Douce, R. (1995). Partial purification and localization of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activity from cultured carrot cells. In: Mathis, P., ed., *Photosynthesis: From light to biosphere*, Vol V. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 285-288
- Leppänen, V. M., Nummelin, H., Hansen, T., Lahti, R., Schafer, G., Goldman, A. (1999). *Sulfolobus acidocaldarius* inorganic pyrophosphatase: structure, thermostability, and effect of metal ion in an archael pyrophosphatase. *Protein Sci.* **8**, 1218-1231
- Leslie, A. G. W. (1991). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. In: Leslie, A. G. W., ed., *CCP4 and ESF-EACMB Newsletters on Protein Crystallography*. Daresbury, Warrington, UK
- Leslie, A. G. W. (1998). *MOSFLM*, Cambridge, UK
- Lichtenthaler, H. K., Prenzel, U., Douce, R. & Joyard, J. (1981). Localization of prenylquinones in the envelope of spinach-chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **641**, 99-105
- Liebler, C. (1993). The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit. Rev. Toxicol.* **23**, 147-169
- Lindblad, B., Lindstedt, S. & Steen, G. (1977). Purification and some properties of human 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **252**, 5073-5084
- Linden, Lars (2000). Isolierung, Klonierung, Expression, Reinigung und Kristallisation eukaryotischer 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenasen – Röntgenstrukturanalyse von Inhibitorkomplexen der löslichen anorganischen Pyrophosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation TU München, Deutschland

- Lindstedt, S. & Rundgren, M. (1982). Blue color, metal content, and substrate binding in 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain P. J. 874. *J. Biol. Chem.* **257**, 11922-11931
- Liu, A., Ho, R. Y. N., Que, L., Jr., Ryle, M. J., Phinney, B. S. & Hausinger, R. P. (2001). Alternative reactivity of an α -ketoglutarate-dependent iron (II) oxygenase: enzyme self-hydroxylation. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5126-5127
- Lock, E. A., Ellis, M. K., Gaskin, P., Robinson, M., Auton, T. R., Provan, W. M., Smith, L. L., Prisbylla, M. P., Mutter, L. C. & Lee, D. L. (1998). From toxicological problem to therapeutic use - the discovery of the mode of action of 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC), its toxicology and development as a drug. *J. Inher. Metab. Dis.* **21**, 498-506
- Löffelhardt, W. & Kindl, H. (1979). Conversion of 4-hydroxyphenylpyruvic acid into homogentisic acid at the thylakoid membrane of *Lemna gibba*. *FEBS Lett.* **104**, 332-334
- Logan, D. T., deMaré, F., Persson, B. O., Slaby, A., Sjöberg, B.-M. & Nordlund, P. (1998). Crystal structures of two self-hydroxylating ribonucleotide reductase protein R2 mutants: structural basis for the oxygen-insertion step of hydroxylation reactions catalyzed by diiron proteins. *Biochemistry* **37**, 10798-10807
- Lundin, M., Baltscheffsky, H. & Ronne, H. (1991). Yeast-ppa2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* **266**, 12168-12172
- Maina, C. V., Riggs, P. D., Grandea, A. G. III, Slatko, B. E., Moran, L. S., Tagliamonte, J. A., McReynolds, L. A. & Guan, C. (1988). An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins in *Escherichia coli* by fusion to and separation from maltose binding protein. *Gene* **74**, 365-373
- Mansurova, S. E. (1989). Inorganic pyrophosphate in mitochondrial metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **977**, 237-247
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497
- Maxwell, C. A., Scolnik, P. A., Wittenbach, V. A. & Gutteridge, S., inventors. December 31, 1997. Plant gene for p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. International Application No. PCT/US97/11295
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.* **189**, 1-23
- Merckel, M. C., Fabrichniy, I. P., Salminen, A., Kalkkinen, N., Baykov, A. A., Lahti, R. & Goldman, A. (2001). Crystal structure of *Streptococcus mutans* pyrophosphatase: A new fold for an old mechanism. *Structure* **9**, 289-297
- Merritt, E. A. & Bacon, D. J. (1997). Raster3D photorealistic molecular graphics. *Method. Enzymol.* **277**, 505-524
- Minor, W., Steczko, J., Bolin, J. T., Otwinowski, Z. & Axelrod, B. (1993). Crystallographic determination of the active-site iron and its ligands in soybean lipoxygenase L-1. *Biochemistry* **32**, 6320-6323
- Mitsuda, N., Enami, K., Nakata, M., Takeyasu, K. & Sato, M. H. (2001). Novel type *Arabidopsis thaliana* H⁺-PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* **488**, 29-33
- Mitchell, G., Bartlett, D. W., Fraser, T. E. M., Hawkes, T. R., Holt, D. C., Townson, J. K. & Wichert, R. A. (1999). Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest. Manag. Sci.* **57**, 120-128
- Moe, O. A. & Butler, L. G. (1972). Yeast inorganic pyrophosphatase. 3. Kinetics of Ca²⁺ inhibition. *J. Biol. Chem.* **247**, 7315-7319
- Moseley, J., Quinn, J., Eriksson, M. & Merchant, S. (2000). The *Crd1* gene encodes a putative di-iron enzyme required for photosystem I accumulation in copper deficiency and hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* **19**, 2139-2151
- Mukherji, M., Chien, W., Kershaw, N. J., Clifton, I. J., Schofield, C. J., Wierzbicki, A. S. & Lloyd, M. D. (2001). Structure-function analysis of phytanoyl-CoA 2-hydroxylase mutations causing Refsum's disease. *Human Molec. Genet.* **10**, 1971-1982
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro with a polymerase catalyzed reaction. *Method. Enzymol.* **155**, 335-350
- Munné-Bosch, S. & Alegre, L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **21**, 31-57
- Murzin, A. G. (1996). Structural classification of proteins: new superfamilies. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **6**, 386-394
- Nakai, K. & Kanehisa, M. (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**, 897-911
- Navaza, J. (1994). AMoRe: An automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr. A* **50**, 157-163
- Nelson, M. J. & Seitz, S. (1995). In: Valentine, J. S., Foote, C. S., Greenberg, A. & Liebman, J. F., eds., *Active Oxygen in Biochemistry*. Chapman and Hall, Glasgow, UK, pp 276-312
- Nicholls, A., Bharadwaj, R. & Honig, B. (1993). GRASP – graphical representation and analysis of surface properties. *Biophys. J.* **64** A 166

- Norris, S. R., Barrette, T. R. & DellaPenna, D. (1995). Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* **7**, 2139-2149
- Norris, S. R., Shen, X. H. & DellaPenna, D. (1998). Complementation of the *Arabidopsis pds1* mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol.* **117**, 1317-1323
- Oganessyan, V. Y., Kurilova, S. A., Vorobjeva, N. N., Nazarova, T. I., Popov, A. N., Lebedev, A. A., Awaeva, S. M. & Harutyunyan, E. H. (1994). X-ray crystallographic studies of recombinant inorganic pyrophosphatase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **348**, 301-304
- Ohlendorf, D. H., Lipscomb, J. D. & Weber, P. C. (1988). Structure and assembly of protocatechuate 3,4-dioxygenase. *Nature* **336**, 403-404
- Ohlendorf, D. H., Orville, A. M. & Lipscomb, J. D. (1994). Structure of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* at 2.15 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **244**, 586-608
- Oliva, G., Romero, I., Ayala, G., Barrios-Jacobo, I. & Celis, H. (2000). Characterization of the inorganic pyrophosphatase from the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Arch. Microbiol.* **174**, 104-110
- Orville, A. M., Lipscomb, J. D. & Ohlendorf, D. H. (1997). Crystal structures of substrate and substrate analog complexes of protocatechuate 3,4-dioxygenase. Endogenous Fe³⁺ ligand displacement in response to substrate binding. *Biochemistry* **36**, 10052-10066
- Otwinowski, Z. (1991). Proceedings of the CCP4 study weekend. In: Wolf, W., Evans, P. R., Leslie, A. G. W., eds., Isomorphous replacement and anomalous scattering. Daresbury Laboratory, Warrington, pp 80-86
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth. Enzymol.* **276**, 307-326
- Pallett, K. E., Little, J. P., Sheekey, M. & Veerasekaran, P. (1998). The mode of action of isoxaflutole I. Physiological effects, metabolism and selectivity. *Pestic. Biochem. Physiol.* **62**, 113-124
- Parfenyev, A. N., Salminen, A., Halonen, P., Hachimori, A., Baykov, A. A. & Lahti, R. (2001). Quaternary structure and metal ion requirement of family II pyrophosphatases from *Bacillus subtilis*, *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus mutans*. *J. Biol. Chem.* **276**, 24511-24518
- Pascal, R. A., Oliver, M. A. & Chen, Y. C. J. (1985). Alternate substrates and inhibitors of bacterial 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Biochemistry* **24**, 3158-3165
- Perutz, M. F., Rossman, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G. & North, A. C. T. (1960). Structure of haemoglobin; a three dimensional fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature* **185**, 416-422
- Pohjanjoki, P., Lahti, R., Goldman, A. & Cooperman, B. S. (1998). Evolutionary conservation of enzymatic catalysis: Quantitative comparison of the effects of mutation of aligned residues in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatases on enzymatic activity. *Biochemistry* **47**, 1754-1761
- Pohjanjoki, P., Fabrichniy, I. P., Kasho, V. N., Cooperman, B. S., Goldman, A., Baykov, A. A. & Lahti, R. (2001). Probing essential water in yeast pyrophosphatase by directed mutagenesis and fluoride inhibition measurements. *J. Biol. Chem.* **276**, 434-441
- Prescott, A. G. (1993). A dilemma of dioxygenases (or where biochemistry and molecular biology fail to meet). *J. Exp. Bot.* **44**, 849-861
- Prescott, A. G. & Lloyd, M. D. (2000). The iron(II) and 2-oxoacid-dependent dioxygenases and their role in metabolism. *Nat. Prod. Rep.* **17**, 367-383
- Que, L., Jr. & Ho, R. Y. N. (1996). Dioxygen activation by enzymes with mononuclear non-heme iron active sites. *Chem. Rev.* **96**, 2607-2624
- Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **23**, 283-437
- Rea, P. A. & Poole, J. R. (1993). Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. *Ann. Rev. in Plant Phys. and Plant Mol. Biol.* **44**, 157-180
- Roach, P. L., Clifton, I. J., Fülöp, V., Harlos, K., Barton, G. J., Hajdu, J., Andersson, I., Schofield, C. J. & Baldwin, J. E. (1995). Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes. *Nature* **375**, 700-704
- Roach, P. L., Clifton, I. J., Hensgens, C. M., Shibata, N., Schofield, C. J., Hajdu, J. & Baldwin, J. E. (1997). Structure of isopenicillin N synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation. *Nature* **387**, 827-830
- Roche, P. A., Moorehead, T. J. & Hamilton, G. H. (1982). Purification and properties of hog liver 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**, 62-73
- Rodina, E. V., Vainonen, Y. P., Vorobyeva, N. N., Kurilova, S. A., Nazarova, T. I. & Awaeva, S. M. (2001). The role of Asp43 in *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase functioning. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3851-3857

- Romagni, J. G., Meazza, G., Nanayakkara, N. P. D. & Dayan, F. E. (2000). The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Lett.* **480**, 301-305
- Rossman, M. G. & Blow, D. M. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallogr.* **15**, 24-31
- Rüetschi, U., Odelhoeg, B., Lindstedt, S., Barros-Soederling, J., Persson, B. & Joernvall, H. (1992). Characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Primary structure of the *Pseudomonas* enzyme. *Eur. J. Biochem.* **205**, 738-744
- Rüetschi, U., Dellesen, A., Sahlin, P., Stenman, G., Rymo, L. & Lindstedt, S. (1993). Human 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Primary structure and chromosomal localization of the gene. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1081-1089
- Rundgren, M. (1977). Steady-state kinetics of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from human liver.3. *J. Biol. Chem.* **252**, 5094-5099
- Rundgren, M. (1982). Tritium isotope effects in the reaction catalyzed by 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain P. J. 874. *Biochim. Biophys. Acta* **704**, 59-64
- Salminen, T., Kapyla, J., Heikinheimo, P., Kankare, J., Goldman, A., Heinonen, J., Baykov, A. A., Cooperman, B. S. & Lahti, R. (1995). Structure and function analysis of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase: is an hydroxide ion the key to catalysis? *Biochemistry* **34**, 782-791
- Salminen, T., Teplyakov, A., Kankare, J., Cooperman, B. S., Lahti, R. & Goldman, A. (1996). An unusual route to thermostability disclosed by the comparison of *Thermus thermophilus* and *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatases. *Protein Sci.* **5**, 1014-1025
- Salminen, A., Parfenyev, A. N., Salli, K., Efimova, I. S., Magretova, N. N., Goldman, A., Baykov, A. A. & Lahti, R. (2002). Modulation of dimer stability in yeast pyrophosphatase by mutations at the subunit interface and ligand binding to the active site. *J. Biol. Chem.* **277**, 15465-15471
- Samygin, V. R., Popov, A. N., Rodina, E. V., Vorobyeva, N. N., Lamzin, V. S., Polyakov, K. M., Kurilova, S. A., Nazarova, T. I. & Awaeva, T. T. (2001). The structures of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase complexed with Ca²⁺ or CaPP_i at atomic resolution and their mechanistic implications. *J. Mol. Biol.* **314**, 633-645
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fidds, C. A., Hutchinson, C. A., Slocombe, P. M. & Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**, 687-695
- Scheiner-Bobis, G. & Schreiber, S. (1999). Glutamic acid 472 and lysine 480 of the sodium pump $\alpha 1$ subunit are essential for activity. Their conservation in pyrophosphatases suggests their involvement in recognition of ATP phosphates. *Biochemistry* **38**, 9198-9208
- Schlesinger, M. J. & Coon, M. J. (1960). Hydrolysis of nucleoside di- and triphosphates by crystalline preparations of yeast inorganic pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 30-36
- Schulz, A., Ort, O., Beyer, P. & Kleinig, H. (1993). SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Lett.* **318**, 162-166
- Schwarm, H.-M., Vogenschow, H. & Knobloch, K. (1986). Purification and properties of a soluble inorganic pyrophosphatase from *Rhodospseudomonas palustris*. *Biol. Chem. H.-S.* **367**, 119-126
- Secor, J. (1994). Inhibition of barnyardgrass 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by sulcotrione. *Plant Physiol.* **106**, 1429-1433
- Senda, T., Sugiyama, K., Narita, H., Yamamoto, T., Kimbara, K., Fukuda, M., Sato, M., Yano, K. & Mitsui, Y. (1996). Three-dimensional structures of free form and two substrate complexes of an extradiol ring-cleavage type dioxygenase, the BphC enzyme from *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Mol. Biol.* **255**, 735-752
- Serre, L., Sailland, A., Sy, D., Boudec, P., Rolland, A., Pebay-Peyroula, E. & Cohen-Addad, C. (1999). Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase: an enzyme involved in the tyrosine degradation pathway. *Structure* **7**, 977-988
- Sheldrick, G. M. (1990). Phase annealing in SHELX 90: direct methods for larger structures. *Acta Crystallogr. A* **46**, 467-473
- Shintani, T., Uchiumi, T., Yonezawa, T., Salminen, A., Baykov, A. A., Lahti, A. A. & Hachimori, A. (1998). Cloning and expression of a unique inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*: Evidence for a new family of enzymes. *FEBS Lett.* **439**, 263-266
- Shu, L., Chiou, Y. M., Orville, A. M., Miller, M. A., Lipscomb, J. D. & Que, L., Jr. (1995). X-ray-absorption spectroscopic studies of the Fe(II) active-site of catechol 2,3-dioxygenase – implications for the extradiol cleavage mechanism. *Biochemistry* **34**, 6649-6659
- Sivula, T., Salminen, A., Parfenyev, N., Pohjanjoki, P., Goldman, A., Cooperman, B. S., Baykov, A. A. & Lahti, R. (1999). Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. *FEBS Lett.* **454**, 75-80

- Smirnova, I. N., Baykov, A. A. & Avaeva, S. M. (1986). Studies on inorganic pyrophosphatase using imidodiphosphate as a substrate. *FEBS Lett.* **206**, 121-124
- Smoker, J. & Barnum, S. (1988). Rapid small scale DNA isolation from filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**, 119-122
- Soll, J., Schulz, G., Joyard, J., Douce, R. & Block, M. A. (1985). Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **238**, 290-299
- Solomon, E. I., Brunold, T. C., Davis, M. I., Kemsley, J. N., Lee, S. K., Lehnert, N., Neese, F., Skulan, A. J., Yang, Y. S. & Zhou, J. (2000). Geometric and electronic structure/function correlations in non-heme iron enzymes. *Chem. Rev.* **100**, 235-349
- Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D. & Dawson, J. H. (1996). Heme-containing oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2841-2888
- Stenflo, J., Holme, E., Lindstedt, S., Chandramouli, N., Tsai Huang, L. H., Tam, J. P. & Merrifield, R. B. (1989). Hydroxylation of aspartic-acid in domains homologous to the epidermal growth-factor precursor is catalyzed by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 444-447
- Stenmark, P., Grünler, J., Mattsson, J., Sindelar, P. J., Nordlund, P. & Berthold, D. A. (2001). A new member of the family of di-iron carboxylate proteins: Coq7 (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 33297-33300
- Stetten, D. W. (1960). Biosynthesis and Pyrophosphate. *Am. J. Med.* **28**, 867-870
- Stout, G. H. & Jensen, L. H. (1989). X-ray Structure Determination. John Wiley & Sons, New York
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, I. J. & Duben hoff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89
- Swaminathan, K., Cooperman, B. S., Lahti, R. & Voet, D. (1998). Refined structure of yeast inorganic pyrophosphatase and its K61R mutant. To be Published
- TePLYakov, A., Obmolova, G., Wilson, K. S., Ishii, K., Kaji, H., Samejima, T. & Kuranova, I. (1994). Crystal structure of inorganic pyrophosphatase from *Thermus thermophilus*. *Protein Sci.* **3**, 1098-1107
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-2018
- Thomson, J. J. (1903). Conduction of electricity through gases.
- Tono, H. & Kornberg, A. (1967). Biochemical studies of bacterial sporulation. 3. Inorganic pyrophosphatase of vegetative cells and spores of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **242**, 2375-2382
- Tuominen, V., Heikinheimo, P., Kajander, T., Torkkel, T., Hyytiä, T., Kapyla, J., Lahti, R., Cooperman, B. S. & Goldman, A. (1998). The R78K and D117E active-site variants of *Saccharomyces cerevisiae* soluble inorganic pyrophosphatase: structural studies and mechanistic implications. *J. Mol. Biol.* **284**, 1565-1580
- Turk, D. (1992). Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen. PhD Thesis. Technische Universität München, München
- Turk, D. (1996). MAIN 96: An interactive software for density modifications, model building, structure refinement and analysis. In: Bourne, P. E. & Watenpaugh, K., eds., Proceedings from the 1996 meeting of the International Union of Crystallography Macromolecular Macromolecular Computing School.
- Uragami, Y., Senda, T., Sugimoto, K., Sato, N., Nagarajan, V., Masai, E., Fukuda, M., Mitsui, Y. (2001). Crystal structures of substrate free and complex forms of reactivated BphC, an extradiol type ring-cleavage dioxygenase. *J. Inorg. Biochem.* **83**, 269-279
- Unguryte, A., Smirnova, I. N. & Baykov, A. A. (1989). Kinetic models for the action of cytosolic and mitochondrial inorganic pyrophosphatases of rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **273**, 292-300
- Vagin, A. & TePLYakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022-1025
- Velichko, I. S., Mikalahti, K., Kasho, V. N., Dudarenkov, V. Y., Hyytiä, T., Goldman, A., Cooperman, B. S., Lahti, R. & Baykov, A. A. (1998). Trimeric inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* obtained by directed mutagenesis. *Biochemistry* **37**, 734-740
- Vetting, M. W. & Ohlendorf, D. H. (2000). The 1.8 Å crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker. *Structure* **15**, 429-440
- Visser, K., Heimovaara-Dijkstra, S., Kijne, J. & Wang, M. (1998). Molecular cloning and characterization of an inorganic pyrophosphatase from barley. *Plant Mol. Biol.* **37**, 131-140
- Viviani, F., Little, J. P. & Pallett, K. E. (1998). The mode of action of isoxaflutole II. Characterization of the inhibition of carrot 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by the diketone nitrile derivative of isoxaflutole. *Pestic. Biochem. Physiol.* **62**, 125-134
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 615-619

- Volk, S. E., Baykov, A. A., Kostenko, E. B. & Avaeva, S. M. (1983). Isolation, subunit structure and localization of inorganic pyrophosphatase of heart and liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta* **744**, 127-134
- Wada, G. H., Fellman, J. H., Fujita, F. S. & Roth, E. (1975). Purification and properties of avian liver p-hydroxyphenylpyruvate hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **250**, 6720-6726
- Walsh, C. (1979). *Enzymatic reaction mechanisms*. W. H. Freeman, San Francisco
- Welsh, K. M., Jacobyansky, A., Springs, B. & Cooperman, B. S. (1983). Catalytic specificity of yeast inorganic pyrophosphatase for magnesium ion as cofactor. An analysis of divalent metal ion and solvent isotope effects on enzyme function. *Biochemistry* **22**, 2243-2248
- Welsh, K. M. & Cooperman, B. S. (1984). Yeast inorganic pyrophosphatase. A model for active-site structure based on cadmium-113 and phosphorus-31 NMR studies. *Biochemistry* **23**, 4947-4955
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119
- Young, T. W., Kuhn, N. J., Wadeson, A., Ward, S., Burges, D. & Cooke, G. D. (1998). *Bacillus subtilis* ORF *yybQ* encodes a manganese-dependent inorganic pyrophosphatase with distinctive properties: The first of a new class of soluble pyrophosphatase? *Microbiology* **144**, 2563-2571