

Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Strukturforschung

**Biochemische und röntgenkristallographische Untersuchungen  
am Transkriptionsaktivator MaltT  
und den Pyridoxal-5'-phosphat-abhängigen Enzymen  
Cystathionin- $\gamma$ -Lyase und Cystathionin- $\gamma$ -Synthase**

Clemens Steegborn

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. J. Buchner

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huber  
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher  
3. Priv.-Doz. Dr. A. Messerschmidt, Universität Konstanz

Die Dissertation wurde am 16.1.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 5.3.2001 angenommen.



*Meinen Eltern*



# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1997 bis Dezember 2000 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Robert Huber in der Abteilung Strukturforschung des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Robert Huber für die wohlwollende Unterstützung und Förderung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Durch wertvolle Anregungen, sein fortwährendes Interesse an meiner Arbeit und sein Vertrauen in mich war er ein steter Rückhalt.

Bei Herrn Dr. Tim Clausen bedanke ich mich sehr herzlich für die Einführung auf die Gebiete der Kristallographie und der PLP-abhängigen Enzyme, für zahlreiche Hilfestellungen und Ratschläge und für die angenehme Zusammenarbeit. Auch bei Herrn Priv. Doz. Dr. Albrecht Messerschmidt möchte ich mich für seine stete Hilfsbereitschaft und die ausgezeichnete Zusammenarbeit bedanken.

Frau Dr. Evelyne Richet und Herrn Dr. Olivier Danot am Pasteur-Institut, Paris, danke ich sehr herzlich für ihre Hilfsbereitschaft, die engagierte und angenehme Zusammenarbeit auf dem MalT-Projekt sowie unzählige hilfreiche Diskussionen. Bei den Mitarbeitern von Aventis, Frankfurt, insbesondere bei Herrn Dr. Bernd Laber, bedanke ich mich für die angenehme Zusammenarbeit an Cystathionin- $\gamma$ -Synthase und die Überlassung von Plasmiden und Inhibitoren.

Bei Herrn Dr. Markus Wahl bedanke ich mich besonders für viele hilfreiche Diskussionen und die angenehme Zusammenarbeit an Cystathionin- $\gamma$ -Lyase. Frau Andrea Papendorf und Herrn Snezan Marinkovic danke ich sehr herzlich für die tatkräftige Unterstützung im Labor, Herrn Gleb Bourenkov für die ausgezeichnete Betreuung an Beamline BW6 des DESY, Hamburg, und Herrn Dr. Karlheinz Mann und Herrn Marius Bociu für die Sequenzierung zahlreicher Protein- und DNA-Proben.

Meinen Bürokollegen Dr. Matthias Bochtler, Ulrike Breitinger, Dr. Reiner Kiefersauer, Marianne Braun, Daniela Jozic, Claudia Hartmann, Dr. Stefan Strobel, Ulf Marquardt, Dr.

Francesca Benvenuti, Dr. Paolo Pirani, Dr. Klaus Maskos, Dr. Merold Müller, Marcos Melero-Alvarez, Stephan Henrich und Michael Koch danke ich für die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre. Ebenso möchte ich mich bei meinen Laborkollegen Snezan Marinkovic, Marta Garrido-Franco, Constanze Breithaupt, Tobias Krojer, Dr. Tim Clausen, Dr. Hans Brandstetter, Jochen Kluge, Anja Lang, Kerstin Wendt, Dr. Uwe Jakob, Stephan Krapp, Stephan Ehlert, Dr. Jörg Knäblein, Dr. Oliver Einsle, Sofia Marcieira, Berta Martins, Dr. Sandra Ribeiro, Dr. Pedro Peirera, Dr. Markus Wahl und Rasso Willkom für die angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre bedanken. Auch allen weiteren Mitarbeitern der Abteilung danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre. Mein besonderer Dank gilt meinen Freunden und Kollegen Daniela Jozic, Marianne Braun, Mireia Comellas, Uta-Maria Ohndorf, Marta Garrido, Tim Clausen, David Reverter, Martin Augustin, Gerd Bader und Stephan Ehlert für viele angenehme Stunden und die schöne Zeit mit ihnen.

Bei Frau Renate Rüller, Frau Gina Beckmann, Frau Marion Heinze, Herrn Werner Dersch, Herrn Herbert Fischer und Herrn Ottmar Paul bedanke ich mich sehr herzlich für ihre stete Hilfsbereitschaft und die vielfältige Unterstützung bei Problemen mit Verwaltung, Organisation und Technik.

Dem Boehringer Ingelheim Fonds möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken. Den Mitarbeitern des BIF, insbesondere Frau Monika Beutelspacher, Frau Dr. Claudia Walther und Herrn Dr. Hermann Fröhlich, danke ich sehr herzlich für die angenehme Betreuung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung und den steten Rückhalt, sowie Nicole und allen Freunden, die mir zur Seite standen.

# Abkürzungen

aa	Aminosäuren
ACD	Datenbank kommerziell verfügbarer Chemikalien
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AMP-PNP	$\beta,\gamma$ -Imidoadenosin-5'-triphosphat
APPA	DL-E-2-Amino-5-phosphono-3-pentensäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AU	asymmetrische Einheit
AVG	L-Aminoethoxyvinylglycin
AXP	Adeninnukleotid
bp	Basenpaar(e)
BSA	Serumalbumin aus Rind
CBL	Cystathionin- $\beta$ -Lyase
CBS	Cystathionine- $\beta$ -synthase
CCD	<i>charge coupled device</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGL	Cystathionin- $\gamma$ -Lyase
CGS	Cystathionin- $\gamma$ -Synthase
CIP	Phosphatase aus Kälberdarm
CRP	Bindeprotein für zyklisches AMP
CTCPO	5-Carboxymethylthio-3-(3'-chlorophenyl)-1,2,4-oxadiazol
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT <sub>n</sub>	MalT Domäne <i>n</i>
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
F <sub>3</sub> Ala	$\beta,\beta,\beta$ -Trifluor-L-alanin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
hCGL	humane Cystathionin- $\gamma$ -Lyase
Hepes	Hydroxyethylpiperazinethylsulfonsäure
hPP5	humane Protein-Phosphatase 5
Hsp	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalaktopyranosid
k <sub>cat</sub>	Katalyserate
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
k <sub>inact</sub>	Inaktivierungsrate

$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
$k_{obs}$	apparente Geschwindigkeitskonstante der Komplexbildung
LAL	große ATP-bindende Transkriptionsaktivatoren der LuxR-Familie
LB	Luria-Bertani
LRV	<i>leucine rich variant</i>
MES	2-Morpholinoethylsulfonsäure
MIR	multipler isomorpher Ersatz
MWCO	Ausschlußgrenze, Angabe als Molekulargewicht
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NCS	nichtkristallographische Symmetrie
NTA	Nitrilotriessigsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PG	D,L-Propargylglycin
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPCA	3-(Phosphonomethyl)pyridin-2-carbonsäure
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r.m.s.	Wurzel aus dem Mittelwert der quadrierten Werte
RNA	Ribonukleinsäure
RXR	<i>9-cis Retinoic Acid</i> -Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUPR	<i>superhelical peptide repeats</i>
tCGS	Cystathionin- $\gamma$ -Synthase
TPR	<i>tetratrico peptide repeats</i>
TR	Thyroid-Rezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
UV/ <i>vis</i>	Wellenlängenbereich des ultravioletten und sichtbaren Lichts
$v_o$	Anfangsgeschwindigkeit
$V_{max}$	maximale Geschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
*	Aminosäure im Partnermonomer eines aktiven Dimers



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1	Transkriptionsaktivator MalT	5
2.1.1	Regulation der Transkription	5
2.1.2	Der Transkriptionsaktivator MalT aus <i>Escherichia coli</i>	9
2.1.3	Die MalT-Familie ATP-bindender Transkriptionsaktivatoren	12
2.2	Die PLP-abhängigen Enzyme Cystathionin- $\gamma$ -Synthase und Cystathionin- $\gamma$ -Lyase	14
2.2.1	PLP-abhängige Enzyme - Katalyse und Klassifizierung	14
2.2.2	Transsulfurierung - Methionin- und Cysteinestoffwechsel	18
2.1.3	Inhibition der Transsulfurierungsenzyme	20
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>25</b>
3.1	Materialien	25
3.1.1	Bakterienstämme, Plasmide, Oligonukleotide	25
3.1.2	Chemikalien und Enzyme	26
3.1.3	Sonstige Materialien	27
3.2	Methoden	27
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	27
	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
	Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	28
	DNA-Isolierung aus Gelen	28
	DNA-Sequenzierung	28
	Konzentrationsbestimmung von DNA	29
	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	29
	Dephosphorylierung von DNA	29
	Ligation von DNA-Fragmenten	29
	Präparation von Plasmid-DNA	30
	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	30
	Plattenkulturen	30
	Flüssigkulturen	31
	Glycerinkulturen	31
	Klonierung und Expression von MalT	31
	Expression von MalT-Domänen	32
	Klonierung und rekombinante Expression humaner CGL	32
	Rekombinante Expression von tCGS	33
3.2.2	Proteinchemische Methoden	33
	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	33
	Denaturierende Gelelektrophorese und Westernblotting	34
	N-terminale Sequenzierung von Proteinen	35

Aufschluß von <i>E. coli</i> -Zellen nach Expression rekombinanter Gene	35
Reinigung von MalT aus <i>E. coli</i>	35
Reinigung einzelner und kombinierter Domänen von MalT aus <i>E. coli</i>	36
Reinigung rekombinanter hCGL	39
Reinigung rekombinanter tCGS	40
Aktivitätstest für tCGS	41
Aktivitätstest für hCGL	41
Aktivitätstest für Transkriptionsaktivierung durch MalT	42
Immobilisierung von MalY und Interaktionsexperimente	43
Dynamische Lichtstreuungsexperimente	43
3.2.3 Kristallographie und Strukturbestimmung	44
Kristallisation	44
Aufnahme und Auswertung von Röntgendiffraktionsdaten	45
Berechnung von Elektronendichten und Mittelung im direkten Raum	46
Modellbau und -verfeinerung	46
Geometrische Analyse und graphische Darstellung von Atommodellen	47
Kristallisation der hCGL	47
Strukturbestimmung von tCGS	48
Strukturbestimmung von tCGS-Inhibitorkomplexen	49
Strukturbestimmung von DT3	50
3.2.4 Sonstige Methoden	51
Sequenzanalysen	51
Modellierung von tCGS-Substratkomplexen	52
Strukturbasierte Suche nach tCGS-Inhibitoren durch <i>Molecular Modelling</i>	52
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>53</b>
4.1 Transkriptionsaktivator MalT aus <i>E. coli</i>	53
4.1.1 Expression und Reinigung von MalT	53
4.1.2 Interaktion zwischen MalT und MalY	53
4.1.3 Expression und Reinigung von MalT-Domänen	54
4.1.4 Kristallisation von DT3	55
4.1.5 Aufklärung der Raumstruktur von DT3	56
4.1.6 Das Strukturmodell von DT3	60
4.1.7 Vergleich der DT3-Struktur mit anderen Helix-Repeat-Faltungstypen	63
4.1.8 Das SUPR-Motiv kommt in weiteren Proteinsequenzen vor	65
4.1.9 Der Superhelixtunnel in DT3 enthält eine potentielle Maltotriose-Bindungsstelle	67
4.1.10 Die DT3-Superhelix bildet eine Protein/Protein-Interaktionsfläche	68
4.2 Cystathionin- $\gamma$ -Synthase aus <i>Nicotiana tabacum</i>	70
4.2.1 Expression und Reinigung von tCGS	70
4.2.2 Kristallisation und Datenaufnahme	70
4.2.3 Strukturbestimmung und Verfeinerung des tCGS-Modells	72
4.2.4 Strukturbeschreibung	73

Das Aktivzentrum der tCGS	75
4.2.5 Strukturen von tCGS-Inhibitorcomplexen	76
Komplex mit dem Substratanalogon DL-E-2-Amino-5-phosphono-3-pentensäure	78
Komplex mit dem Pyridinderivat 3-(Phosphonomethyl)pyridin-2-carbonsäure	79
Komplex mit dem Inhibitor 5-Carboxymethylthio-3-(3'-chlorphenyl)-1,2,4-oxadiazol	81
4.2.6 Modellierete Komplexe mit den Substraten L-Homoserinphosphat und L-Cystein	83
4.2.7 <i>Docking</i> -Suche nach neuen Inhibitoren	84
4.3 Humane Cystathionin- $\gamma$ -Lyase	86
4.3.1 Klonierung, rekombinante Expression und Reinigung	86
4.3.2 Biophysikalische Charakterisierung	87
4.3.3 Kinetische Charakterisierung	88
4.3.4 <i>Slow-binding</i> Inhibition der hCGL durch AVG	90
4.3.5 Irreversible Inaktivierung der hCGL durch PG und F <sub>3</sub> Ala	92
4.3.6 Kristallisation der hCGL	93
<b>5 Diskussion</b>	<b>95</b>
5.1 Transkriptionsaktivator MalT	95
5.1.1 Regulation der MalT-Aktivität	95
5.1.2 Der neue Helix-Repeat-Faltungstyp in MalT Domäne III	96
5.1.3 Modell für den Aufbau des aktiven MalT-Oligomers	98
5.2 Cystathionin- $\gamma$ -Synthase aus <i>N. tabacum</i>	100
5.2.1 Vergleich der tCGS mit verwandten Enzymen	100
5.2.2 Reaktionsmechanismus und Substratspezifität	101
5.2.3 Inhibitorcomplexe und strukturbasierte Wirkstoffentwicklung	104
Inhibition durch das Substratanalogon APPA	105
Inhibition durch PPCA und verwandte Pyridinderivate	105
Der Inhibitor CTCPO besetzt eine neue Bindungstasche	106
Ausblick	107
5.3 Humane Cystathionin- $\gamma$ -Lyase	108
5.3.1 Ein effizientes Expressions- und Reinigungssystem für humane CGL	108
5.3.2 Humane CGL zeigt ausgeprägte Substrat- und Reaktionsspezifität	109
5.3.3 Inhibition durch AVG, PG und F <sub>3</sub> Ala	110
AVG ist ein hochaffiner hCGL-Inhibitor	110
Irreversibler Inaktivierung der hCGL durch PG und F <sub>3</sub> Ala	112
Ausblick auf die weitere Wirkstoffentwicklung	113
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>115</b>



# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Transkriptionsaktivator MalT

MalT aus *Escherichia coli* wird seit langem als Modellsystem für die regulierte Transkriptionsaktivierung verwendet. Das Protein umfaßt vier Domänen und oligomerisiert nach Bindung der Aktivatoren ATP und Maltotriose. In dieser multimeren Form aktiviert MalT die Transkription der fünf Maltose-Operons. Obwohl MalT zu den bestuntersuchten Transkriptionsaktivatoren zählt, ist die Regulation der MalT-Aktivität auf molekularer Ebene bisher nur unvollständig geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen MalT und dem Inhibitorprotein MalY charakterisiert sowie die Kristallstruktur der Domäne III von MalT (DT3) gelöst. Mit diesen Ergebnissen konnte ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Transkriptionsregulation geleistet werden.

Die Kristallstruktur von DT3 wurde durch multiplen isomorphen Ersatz mit vier Schweratomverbindungen gelöst und bei 1,45 Å Auflösung verfeinert. DT3 besteht aus zwei Subdomänen, einer superhelikalen Anordnung von acht zwei-Helixbündeln und einer C-terminalen Subdomäne aus drei  $\alpha$ -Helices. Die superhelikale Teildomäne hat einen Durchmesser von 35 Å und eine Ganghöhe von 30 Å bei fünf zwei-Helixbündel-Motiven pro Superhelixwindung. Die zweite superhelikale Windung ist in Kontakt mit der ersten, so daß ein röhrenförmiges Molekül mit geschlossenen Wänden resultiert. Trotz lokaler Ähnlichkeit zu anderen superhelikalen Strukturen aus Helix-Wiederholungen führt die abweichende Größe und Anordnung der Helices zu einem bisher einzigartigen Faltungstyp. Der N-terminale Bereich der DT3-Superhelix bildet eine große Protein/Protein-Interaktionsfläche, über die im Kristallgitter zwei DT3-Moleküle wechselwirken. Größe und Hydrophobizität der Fläche sowie Analogien zu anderen Superhelix-Strukturen legen nahe, daß es sich um eine physiologische Protein/Protein-Interaktionsfläche handelt. Weiterhin wurde innerhalb des Superhelixtunnels ein Glycerinmolekül identifiziert, das zusammen mit einer Sulfation eine potentielle Bindungsstelle für den MalT-Induktor Maltotriose besetzt. Basierend auf diesen Daten wurde ein Modell entwickelt, in dem DT3 für die Maltotriose-induzierte Oligomerisierung verantwortlich ist, die essentiell für die Aktivität von MalT ist.

Durch einen strukturbasierten Sequenzvergleich der einzelnen zwei-Helixbündel wurde ein neues, degeneriertes Sequenzmotiv gefunden, das aufgrund der superhelikalen Struktur der Motivwiederholungen SUPR genannt wurde (*SUPERhelical Peptide Repeats*). Anhand einer Datenbanksuche mit diesem Motiv konnte eine Gruppe großer Transkriptionsregulatoren

identifiziert werden, die mehrere SUPR-Motive enthalten. Ein N-terminales ATP-Bindungsmotiv in allen diesen Sequenzen läßt vermuten, daß die SUPR-Motivwiederholungen an einem gemeinsamen Mechanismus der ATP-regulierten Transkriptionsaktivierung durch ligandeninduzierte Oligomerisierung beteiligt sind.

## **1.2 Die Pyridoxal-5'-phosphat-abhängigen Enzyme Cystathionin- $\gamma$ -Synthase und Cystathionin- $\gamma$ -Lyase**

Cystathionin- $\gamma$ -Synthase (CGS) und Cystathionin- $\gamma$ -Lyase (CGL) gehören zur  $\gamma$ -Familie Pyridoxal-5'-phosphat-abhängiger (PLP-abhängiger) Enzyme und bilden bzw. spalten C $\gamma$ -S-Bindungen in ihren Aminosäuresubstraten. CGS katalysiert in Prokaryonten, Pilzen und Pflanzen den ersten Schritt der Methioninbiosynthese, die Bildung von Cystathionin aus Cystein und aktiviertem Homoserin. Da das Enzym in Säugern nicht auftritt, ist es ein attraktives Target für die Pestizidentwicklung. In der vorliegenden Arbeit konnten die Strukturen der CGS aus Tabak (tCGS) sowie ihrer Komplexe mit verschiedenen Inhibitoren gelöst werden. Diese Strukturen liefern mehrere Ansatzpunkte zur Verbesserung bekannter und zur Entwicklung neuer Inhibitoren.

Die Kristallstruktur der tCGS wurde mittels Patterson-Suchmethoden mit der CGS aus *E. coli* als Suchmodell gelöst und bei 2,9 Å Auflösung verfeinert. Jedes Monomer des tCGS-Homotetramers enthält drei Domänen. Die kleine N-terminale Domäne ist am Aufbau des Tetramers und des Aktivzentrums des Partnermonomers beteiligt. Die PLP-bindende Domäne mit einem zentralen siebensträngigen  $\beta$ -Faltblatt beinhaltet die meisten katalytisch wichtigen Reste. Die C-terminale Domäne mit einem zentralen fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt ist an der Bindung des zweiten Substrats L-Cystein beteiligt. In seiner Gesamtstruktur ähnelt tCGS der CGS und der Cystathionin- $\beta$ -Lyase (CBL) aus *E. coli*. Der Vergleichs der Aktivzentren dieser Enzyme zeigt, welche Faktoren die jeweilige Spezifität beeinflussen.

Weitere Aufschlüsse über diese Faktoren lieferten die Strukturen der tCGS-Komplexe mit Inhibitoren aus drei verschiedenen Stoffklassen. Der Komplex mit dem Substratanalogon DL-E-2-Amino-5-phosphono-3-pentensäure identifiziert die Phosphat- und die Carboxylbindungstasche im Aktivzentrum. Ein Modell mit dem zweiten Substrat L-Cystein zeigt einen sterischen Konflikt mit der Phosphat-Abgangsgruppe des ersten Substrats, was den Verlauf der Katalyse nach einem ping-pong-Mechanismus erklärt. In der Phosphatbindungstasche wurde Lys165 als entscheidender Faktor für die Substratspezifität identifiziert. Für Lys261 und Tyr163 konnten Funktionen als Säure-Base-Katalysatoren postuliert werden. Im tCGS-Komplex mit dem Inhibitor 3-(Phosphonomethyl)pyridin-2-carbonsäure fällt auf, daß die

funktionellen Gruppen dieses Inhibitors nicht optimal orientiert werden können und die aromatische Wechselwirkung zwischen Tyr163 und dem PLP-Cofaktor gestört wird, was die niedrige Affinität dieser Substanz für CGS erklärt. Im dritten Komplex der tCGS, mit dem neuen Inhibitor 5-Carboxymethylthio-3-(3'-chlorophenyl)-1,2,4-oxadiazol, wurde eine ungewöhnliche Bindungsgeometrie für den Inhibitor beobachtet, die für seine hohe Affinität verantwortlich ist. Der Inhibitor besetzt die Carboxylbindungsstelle und eine bisher unbekannte, hydrophobe Bindungstasche im Aktivzentrum der tCGS. Dadurch wird eine Störung der Wechselwirkung zwischen Tyr163 und dem PLP vermieden. Die Ausnutzung dieser Bindungstasche sollte die Entwicklung neuer hochaffiner Inhibitoren für CGS ermöglichen.

Das zweite untersuchte Enzym, die CGL, katalysiert in Säugern die umgekehrte Reaktion, die Abspaltung von Cystein aus Cystathionin. Sie spielt bei mehreren Krankheiten eine Rolle und ist daher auch von medizinischem Interesse. Die biochemischen Eigenschaften dieses mit der CGS eng verwandten Enzyms waren aufgrund seiner geringen Verfügbarkeit aus natürlichen Quellen bisher nur unzulänglich charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit konnte das Gen für humane CGL (hCGL) kloniert und in *E. coli* exprimiert werden. Ein Protokoll zur Reinigung des Proteins wurde etabliert. Dieses Vorgehen lieferte die für eine biochemische Charakterisierung des Enzyms notwendige Menge an Protein. Für die gereinigte hCGL konnte eine ausgeprägte Substrat- und Reaktionsspezifität nachgewiesen werden. Wie Inhibitionsstudien mit den irreversiblen Inaktivatoren Propargylglycin und  $\beta,\beta,\beta$ -Trifluor-L-alanin bestätigten, erfolgt die Katalyse bevorzugt am  $\gamma$ -Atom eines gebundenen Substrats bzw. Inhibitors. Diese Regioselektivität sollte in der weiteren Wirkstoffentwicklung ausgenutzt werden können. Weiterhin wurde der Effekt von Aminoethoxyvinylglycin (AVG) auf hCGL untersucht. AVG ist ein potenter Inhibitor bakterieller und pflanzlicher CBL und war daher als Leitstruktur für die Entwicklung von Pestiziden vorgeschlagen worden. Für hCGL wurde eine reversible Inhibition durch AVG beobachtet. Die Reaktion folgte einem *slow-tight-binding* Mechanismus mit einer unerwartet niedrigen Inhibitionskonstanten von 10,5  $\mu\text{M}$ . In Anbetracht dieser Kreuzreaktivität des Inhibitors mit dem humanen Enzym ist die in der Literatur vorgeschlagene Verwendung von AVG als Leitstruktur für die Entwicklung von Pestiziden äußerst fraglich.

Die Kristallisation der hCGL gelang nach weiterer Reinigung des Proteins durch präparative Polyacrylamidgelelektrophorese. Erste Diffraktionsexperimente zeigen, daß die Kristalle für die Strukturlösung geeignet sind, dazu jedoch noch vergrößert werden müssen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Clemens Steegborn, Tim Clausen, Peter Sondermann, Uwe Jacob, Michael Worbs, Snezan Marinkovic, Robert Huber, Markus C. Wahl (1999) Kinetics and inhibition of recombinant human cystathionine  $\gamma$ -lyase - toward the rational control of transsulfuration. *J. Biol. Chem.* **274**, 12675 – 12684

Clemens Steegborn, Albrecht Messerschmidt, Bernd Laber, Wolfgang Streber, Robert Huber, Tim Clausen (1999) The crystal structure of cystathionine  $\gamma$ -synthase from *Nicotiana tabacum* reveals its substrate and reaction specificity. *J. Mol. Biol.* **290**, 983 - 996

Tim Clausen, Markus C. Wahl, Albrecht Messerschmidt, Robert Huber, Jens Fuhrmann, Bernd Laber, Wolfgang Streber, Clemens Steegborn (1999) Cloning, purification and characterisation of cystathionine  $\gamma$ -synthase from *Nicotiana tabacum*. *Biol. Chem.* **380**, 1237 - 1242

Valérie Schreiber, Clemens Steegborn, Tim Clausen, Winfried Boos, Evelyne Richet (1999) A new mechanism for the control of a prokaryotic transcriptional regulator: antagonistic binding of positive and negative effectors. *Mol. Microbiol.* **35**, 765 – 776

Clemens Steegborn, Tim Clausen. Specific inhibition of transsulfuration enzymes. *Recent Research Developments in Biochemistry*, im Druck

Clemens Steegborn, Bernd Laber, Albrecht Messerschmidt, Robert Huber, Tim Clausen. Crystal structures of cystathionine  $\gamma$ -synthase inhibitor complexes rationalize the increased affinity of a novel inhibitor. *Arbeit zur Publikation eingereicht bei Biochemistry*

Clemens Steegborn, Olivier Danot, Tim Clausen, Robert Huber. Crystal structure of transcription factor MalT domain III - a novel helix repeat fold. *Arbeit zur Publikation eingereicht bei EMBO J.*



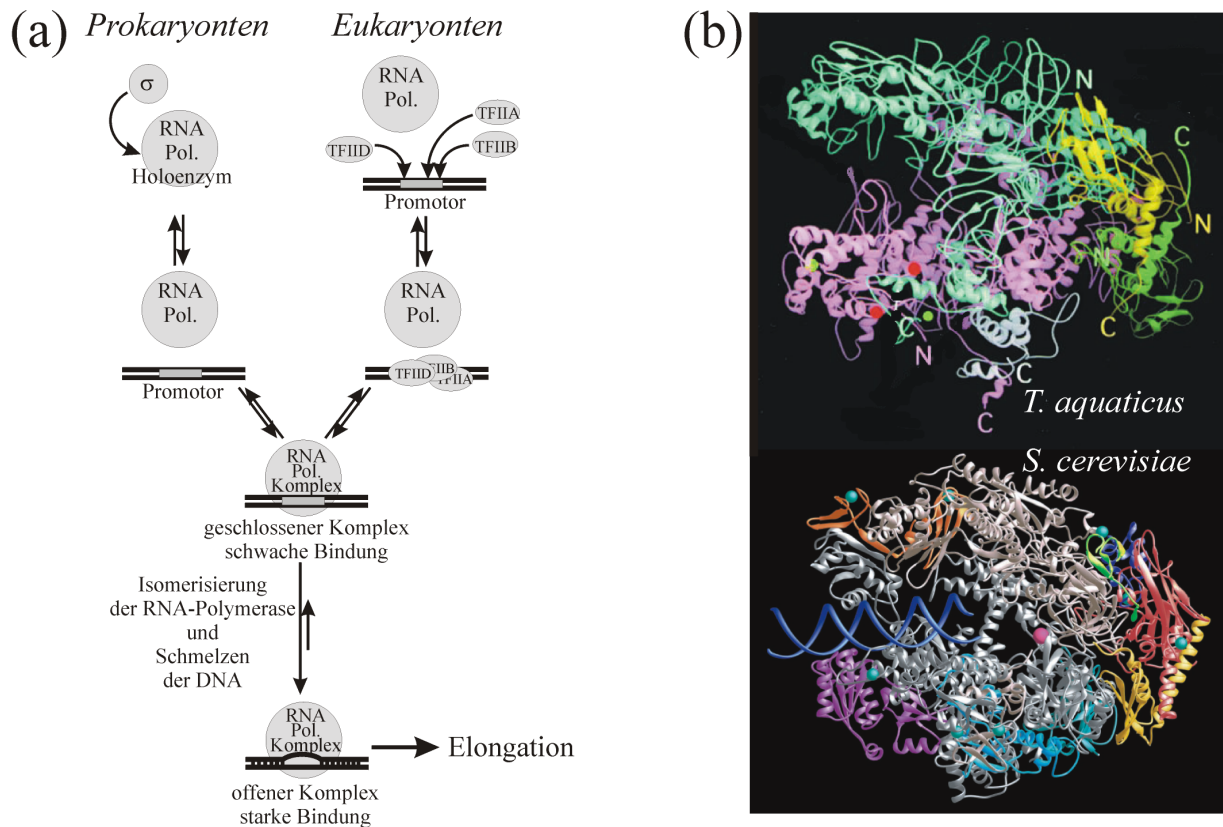
## 2. Einleitung

### 2.1 Transkriptionsaktivator Malt

#### 2.1.1 Regulation der Transkription

Für ihre Entwicklung und Funktion benötigen Zellen unter verschiedenen Bedingungen oder in verschiedenen Geweben unterschiedliche Proteine in unterschiedlichen Mengen. Der Proteininhalt der Zelle wird hauptsächlich durch die gezielte, regulierte Expression von Genen festgelegt (Lewin, 1994). Der erste Schritt der Genexpression ist die Transkription, sie stellt den wichtigsten Regulationspunkt für die Genexpression dar (Weinzierl, 1999). Die Fehlregulation der Transkription kann zu verschiedenen Krankheiten führen, z.B. zur Krebsentstehung (Dang & Lewis, 1997; Mui, 1999).

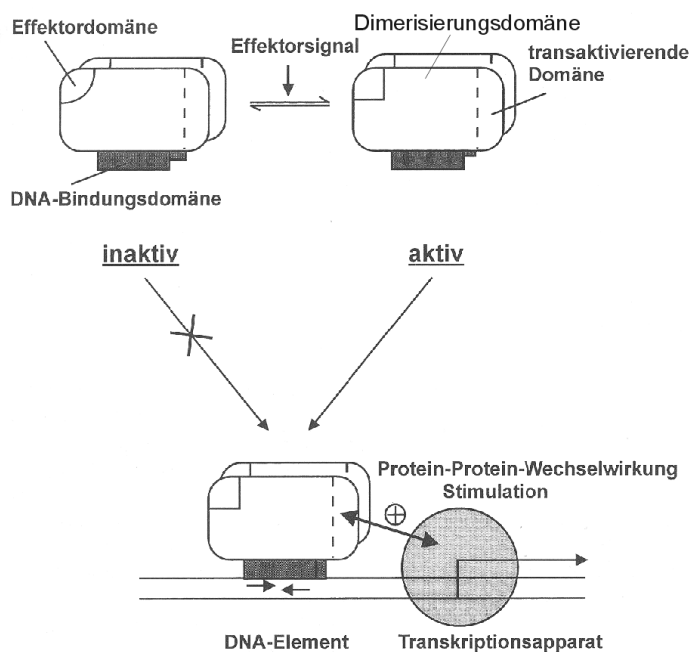
Die Transkription eines Gens umfaßt die drei aufeinanderfolgenden Phasen der Initiation, Elongation und Termination. Die Initiation als erster und meist geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist dabei der Hauptregulationspunkt (Krauss, 1997). Die Initiation beinhaltet den Zusammenbau eines aktiven Initiationskomplexes, die Bindung an die Promotor-DNA (geschlossener Komplex) sowie das Schmelzen des DNA-Doppelstrangs und die Isomerisierung des RNA-Polymerasekomplexes (offener Komplex). Dabei unterscheiden sich prokaryontische und eukaryontische Systeme in der Komplexität der einzelnen Schritte, nicht jedoch im Gesamtmechanismus (Eick *et al.*, 1994) (Abbildung 2-1a). Das zeigen die Ähnlichkeiten zwischen Untereinheiten prokaryontischer und eukaryontischer RNA-Polymerasen auf Sequenzebene (Jokerst, 1989; Zhang & Darst, 1998) ebenso wie auf struktureller Ebene. Die RNA-Polymerasen aus *Thermus aquaticus* (Zhang *et al.*, 1999) und aus *Saccharomyces cerevisiae* (Cramer *et al.*, 2000; Fu *et al.*, 1999; Poglitsch *et al.*, 1999) bilden beide einen Kanal, der die DNA in Richtung Zentrum des Enzyms leitet (Abbildung 2-1b). An mechanistisch kritischen Stellen, z.B. der Bindungsstelle für das DNA/RNA-Hybrid, ist die gleiche Anordnung von Sekundärstrukturelementen zu finden (Cramer *et al.*, 2000). Das eukaryontische Enzym besitzt darüber hinaus einige zusätzliche Untereinheiten, die für seine höhere Regulierbarkeit notwendig sind. Daher werden häufig prokaryontische Systeme als Modellsysteme verwendet. Sie weisen gegenüber den mindestens zehn Untereinheiten der eukaryontischen RNA Polymerasen einen überschaubareren Aufbau (meist  $\alpha_2\beta\beta'$ ) auf und benötigen nur einen zusätzlichen Faktor, den  $\sigma$ -Faktor, für die Initiation.



**Abbildung 2-1: Initiation der Transkription und Struktur der RNA-Polymerase.** (a) Schematische Darstellung der Initiation der Transkription. Die RNA-Polymerase bindet an den Promotor, der bei Eukaryonten bereits von TFIIA, B und D besetzt ist. Der geschlossene Komplex isomerisiert anschließend zum offenen Komplex mit getrennten DNA-Strängen. (b) Kristallstrukturen der RNA-Polymerasen aus *T. aquatica* (Zhang *et al.*, 1999) (oben) und Hefe (Cramer *et al.*, 2000) (unten). Der Gesamtaufbau der Enzyme ist ähnlich, obwohl das prokaryontische Enzym vier, das eukaryontische jedoch zehn Untereinheiten umfaßt. Das DNA-Modell wurde anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen in der Kristallstruktur plaziert. Zn-Ionen sind als grüne und Mg-Ionen als rote Kugeln dargestellt.

Für die Regulation der Transkriptionsinitiation sind Transkriptionsfaktoren verantwortlich. Sie können als Inhibitoren die Expression einzelner Gene verhindern (negative Regulation) oder als Aktivatoren die Transkription von Genen spezifisch verstärken (positive Regulation). Ein Inhibitor kann z.B. durch Bindung an eine spezifische DNA-Sequenz (Operator) im Promotorbereich den Transkriptionskomplex behindern (Rojo, 1999), oder über Protein/Protein-Wechselwirkungen einen Transkriptionsaktivator in seiner Aktivität stören (Jones, 1991). Die Aktivierung der Transkription verläuft meist über Protein/Protein-Wechselwirkungen zwischen dem Transkriptionskomplex und dem Aktivator, der in der Nähe des entsprechenden Gens an spezifische DNA-Sequenzen bindet (Ranish & Hahn, 1996). Der Transkriptionsfaktor erhöht durch die Wechselwirkungen mit der RNA-Polymerase deren lokale Konzentration. Eine Ladungsänderung durch Phosphorylierung in wiederholten Heptamersequenzen der RNA-Polymerase scheint dann zu einer elektrostatischen Abstoßung

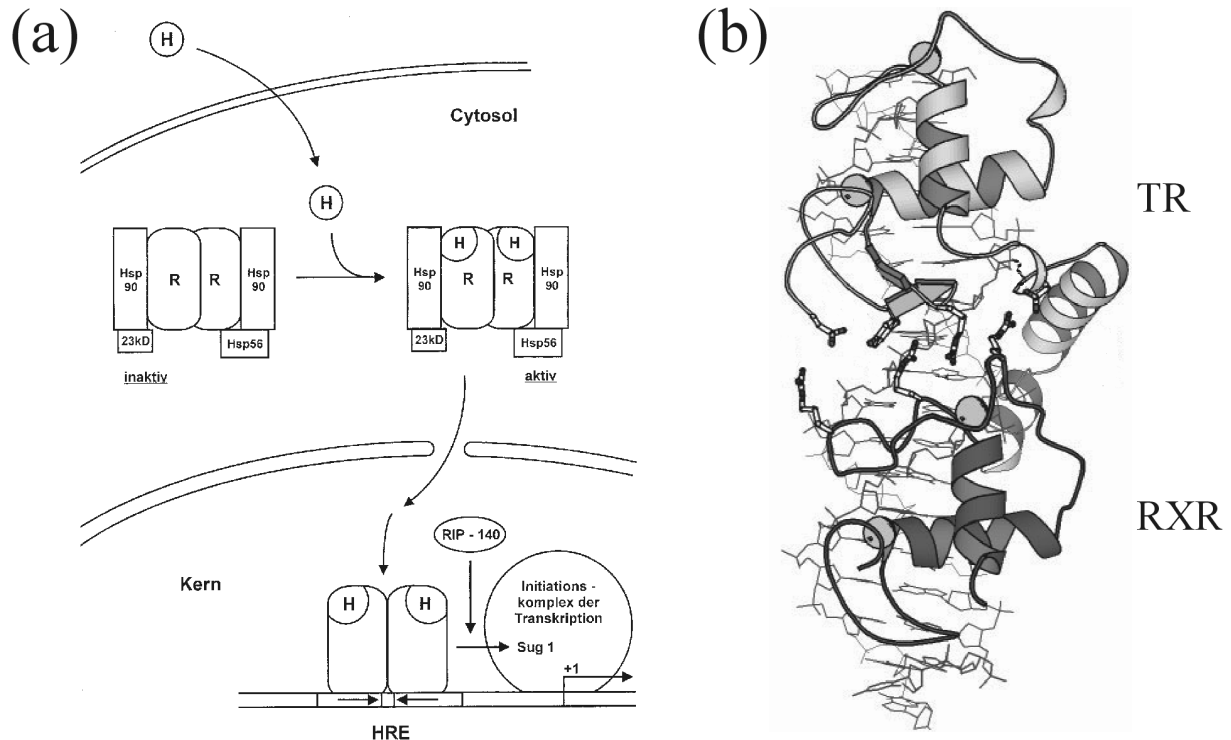
zwischen RNA-Polymerase und Transkriptionsfaktor zu führen (Lu *et al.*, 1992a), wodurch die RNA-Polymerase für die Elongation freigesetzt wird. Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Transkriptionsregulation ist die Modulation der DNA-Konformation (Felsenfeld *et al.*, 1996), z.B. durch DNA-verbiegende Proteine wie CRP (Prokaryonten) oder die Acetylierung/Deacetylierung von Nukleosomen (Eukaryonten). Dadurch werden die Schmelzeigenschaften der DNA verändert, die Zugänglichkeit der DNA für Proteine reguliert, und die Nachbarschaftsverhältnisse zwischen DNA-gebundenen Proteinen beeinflusst.



**Abbildung 2-2: Modularer Aufbau eines Transkriptionsaktivators.** Verschiedene Funktionen wie DNA-Bindung oder Dimerisierung können meist einzelnen Domänen des Proteins zugeordnet werden, die sich allerdings gegenseitig beeinflussen. Im dargestellten Beispiel ermöglicht erst die Bindung eines Effektors die Bindung des Proteins an die DNA, wodurch die Aktivierungsdomäne mit dem Transkriptionsapparat in Wechselwirkung treten kann. Aus Krauss (1997).

Die Aktivierungsfunktion kann, ebenso wie andere Funktionen, meist einer einzelnen Domäne zugeordnet werden (Wolberger, 1999) (Abbildung 2-2). Die Bindung niedermolekularer Liganden erfolgt über eine Effektor-domäne, und für Interaktionen mit anderen Proteinen ist meist auch eine einzelne Domäne verantwortlich. Über eine DNA-Bindungs-domäne erfolgt die spezifische Erkennung von DNA-Sequenzen, die meist als Palindrom oder als direkte Wiederholung kurzer Sequenzen aufgebaut ist (Krauss, 1997). Durch diese Kombination mehrerer Erkennungsstellen werden Spezifität und Affinität des Aktivators erhöht, der als Homo- oder Heterodimer oder höheres Oligomer bindet. Die Bindung als Heterodimer stellt dabei einen wichtigen Regulationsmechanismus dar. In Kombination mit anderen Proteinen kann so ein Regulatorprotein an der Kontrolle mehrerer Gene mitwirken (kombinatorische Kontrolle; Wolberger, 1999), wie z.B. der Steroidhormon-Rezeptor RXR (*9-cis Retinoic Acid Receptor*) in Kombination mit TR (*Thyroid Receptor*),

RAR (*all-trans Retinoic Acid Receptor*) oder VDR (*Vitamin D<sub>3</sub> Receptor*) (Mangelsdorf & Evans, 1995). Auch die Bindung als Oligomer stellt einen Regulationsmechanismus dar, der durch einen kooperativen Bindungsverlauf eine besonders empfindliche Reaktion auf eine Stimulation ermöglicht.



**Abbildung 2-3: Regulation und Struktur der Steroidhormon-Rezeptoren.** (a) Regulation der Transkriptionsaktivierung durch Steroidhormon-Rezeptoren. Der Rezeptor liegt im Cytosol als inaktiver Komplex mit Hitzeschockproteinen (Hsp) vor. Durch Bindung des Hormons wird der Komplex gelöst und der Rezeptor in den Kern transportiert, wo er an sein *Hormone Responsive Element* (HRE) bindet. Die Aktivierung der Transkription erfolgt unter Beteiligung weiterer Proteine, z.B. RIP-140. Aus Krauss (1997). (b) Struktur des Heterodimers aus RXR und TR in Komplex mit einem DNA-Fragment. Beide Proteine binden über einen Cys<sub>4</sub>-Zn-Finger an die DNA. Für die Heterodimerkontakte sind hauptsächlich Reste eines zweiten Zn-haltigen Moduls verantwortlich. Die Zn-Ionen sind als Kugeln eingezeichnet, und die am Dimerkontakt beteiligten Reste als Stabmodelle. Aus Wolberger (1999).

Die Aktivität eines Transkriptionsfaktors wird über verschiedene Mechanismen reguliert (Calkhoven & Ab, 1996). Die Aktivität kann durch die Expression des Regulators selbst, die DNA-Struktur, inhibitorische Proteine, kovalente Modifikationen und niedermolekulare Liganden verändert werden. Während Neusynthese des Faktors und die Veränderung der DNA-Struktur aufwendig sind und daher vor allem für lang anhaltende Veränderungen der Expression eines Gens verwendet werden, erlauben kovalente Modifikation und Bindung von inhibitorischen Proteinen oder niedermolekularen Liganden als flexible Mechanismen eine schnelle Reaktion auf eingehende Signale. Letztere bewirken meist eine Konformations-

änderung im Transkriptionsaktivator, welche die DNA-Bindung oder Wechselwirkungen mit anderen Proteinen beeinflusst. So liegen z.B. die Steroidhormon-Rezeptoren im Cytosol in einem inaktiven Komplex mit den Hitzeschockproteinen Hsp90 und Hsp56 vor (Beato *et al.*, 1996) (Abbildung 2-3a). Durch Bindung des Steroidhormons als niedermolekularen Induktor wird der Komplex mit den Hsp-Proteinen gelöst, und der aktivierte Rezeptor kann in den Kern transportiert werden. Dort bindet er an spezifische HRE-DNA-Sequenzen (*Hormone Responsive Element*) und aktiviert so gezielt die Transkription einzelner Gene.

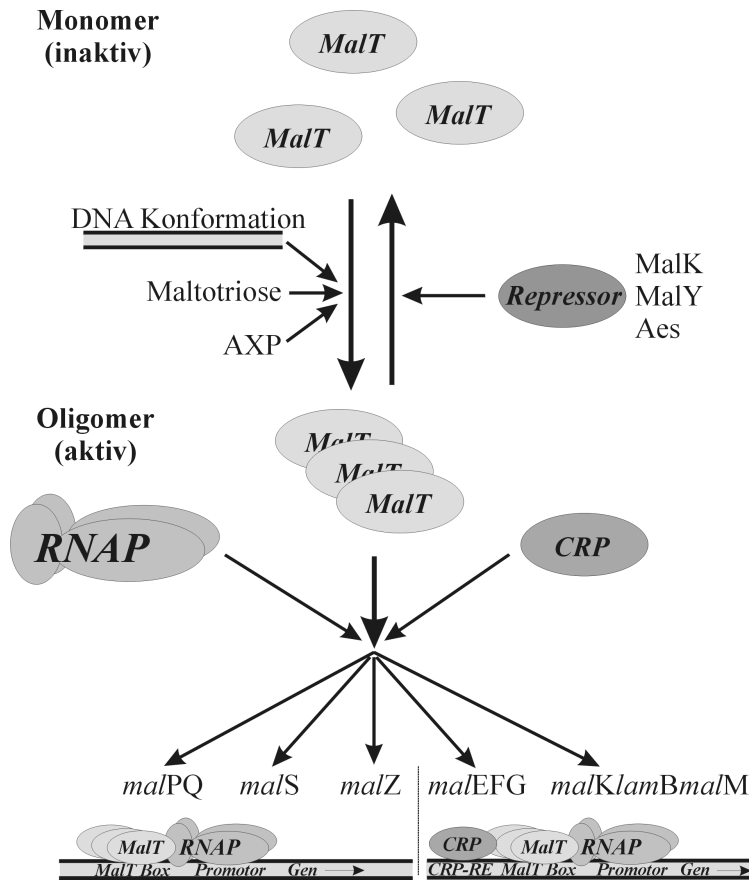
Die Regulation der Transkription erfolgt durch ein Zusammenspiel von Protein/Protein-, Protein/Liganden- und Protein/DNA-Interaktionen. Strukturen vieler DNA-Bindungsmotive sind bekannt (Pabo & Sauer, 1992), und auch die Strukturen erster Multiprotein-DNA-Komplexe sind gelöst (Wolberger, 1999) (Abbildung 2-3b). Dabei handelt es sich jedoch nur um Teile von Regulationskomplexen, und viele mechanistische Details der Transkriptionsregulation bleiben weiterhin unverstanden.

### 2.1.2 Der Transkriptionsaktivator MalT aus *Escherichia coli*

Ein seit langem studierter Transkriptionsaktivator ist MalT aus *E. coli* (Boos & Shuman, 1998). Er reguliert das Maltose-Regulon (*mal*-Regulon), das fünf Operons mit insgesamt zehn Genen umfaßt, deren Genprodukte an Aufnahme und Abbau von Maltodextrinen beteiligt sind. Die Aktivität von MalT wird einerseits über das Expressionsniveau seines Gens und andererseits über niedermolekulare Liganden, die DNA-Konformation und verschiedene Protein/Protein-Wechselwirkungen reguliert (Boos & Shuman, 1998) (Abbildung 2-4). Zwei der Operons aktiviert MalT zusammen mit dem Transkriptionsaktivator CRP (*cAMP recognition protein*; Schwartz, 1987), der an der Aktivierung mehrerer verschiedener Regulons beteiligt ist. Diese Regulationsmechanismen machen das *mal*-Regulon und seinen zentralen Aktivator MalT zu einem geeigneten Modellsystem für die Regulation der Transkription.

Freies MalT ist ein 103 kDa großes Protein (901 Aminosäuren), das in Lösung als Monomer vorliegt. In Gegenwart der positiven Effektoren ATP und Maltotriose (Raibaud & Richet, 1987; Richet & Raibaud, 1989) oligomerisiert das Protein (Schreiber & Richet, 1999) (Abbildung 2-4). Zwei Beobachtungen zeigen, daß das MalT-Oligomer die aktive Form von MalT ist. (a) Die beiden Effektoren Maltotriose und ATP, welche die Oligomerisierung induzieren, sind essentiell für die MalT-Aktivität (Raibaud & Richet, 1987; Richet & Raibaud, 1989); (b) alle *mal*-Promotoren enthalten mehrere Kopien der asymmetrischen DNA-Bindungsstelle 5'-ggGGa[T/G]GAgg-3' für MalT (MalT-Box), und die Besetzung

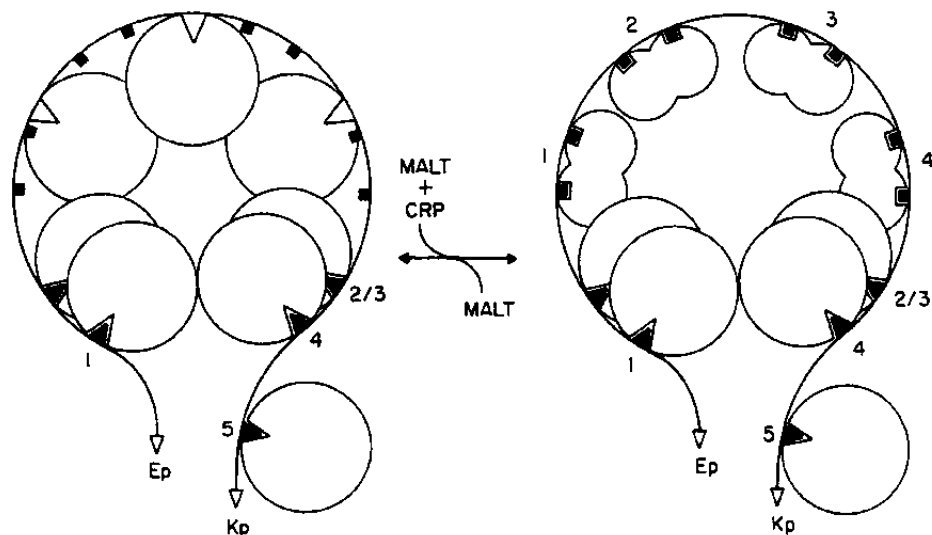
dieser Bindungsstellen durch MalT erfolgt kooperativ (Danot & Raibaud, 1994; Richet, 1996; Vidal-Ingigliardi *et al.*, 1991).



**Abbildung 2-4: Regulation der Aktivität des Transkriptionsaktivators MalT aus *E. coli*.** MalT liegt in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen einer inaktiven monomeren und einer aktiven oligomeren Form vor. Die Lage des Gleichgewichts wird beeinflusst vom Induktor Maltotriose, dem gebundenen Adeninnukleotid (AXP), der DNA-Konformation und den Repressorproteinen MalK, MalY und Aes. Das aktive MalT-Oligomer bindet an DNA-Sequenzen (MalT-Box) vor den Promotoren der fünf *mal*-Operons und aktiviert den Transkriptionsapparat. Für die Aktivierung an zwei der Operons ist außerdem CRP notwendig.

Der Abstand zwischen den MalT-Boxen im *malEp-malKp*-Promotor kann nur um eine oder mehrere vollständige Helixwindungen vergrößert werden, ohne die Aktivität des Promotors merklich zu verringern (Raibaud *et al.*, 1989). Auf der Grundlage dieser Daten und von DNA-*Footprinting*-Experimenten schlugen Raibaud *et al.* (1989) ein Modell vor, nach dem die DNA um den oligomeren MalT-Komplex gewunden ist (Abbildung 2-5), ähnlich wie um das eukaryontische Nukleosom (Luger *et al.*, 1997) und den Replikationsursprung aus DnaA (Fuller *et al.*, 1984). Im CRP-abhängigen Doppelpromotor *malEp-malKp* hilft dieses Protein beim Aufbau des Komplexes, indem es die DNA krümmt (Richet & Sogaard-Andersen, 1994) und indem es MalT auf der DNA repositioniert (Richet *et al.*, 1991) (Abbildung 2-5). Erst diese Verschiebung des MalT auf Bindungsstellen niedrigerer Affinität ermöglicht den Aufbau eines aktiven Komplexes. Die DNA-Konformation beeinflusst nicht nur die Bildung, sondern auch die Stabilität dieses Komplexes (Richet & Raibaud, 1991). Die ATPase-Aktivität von MalT (Richet & Raibaud, 1989) scheint ebenfalls die Stabilität des aktiven MalT-Komplexes zu beeinflussen. Für die MalT-Oligomerisierung, die Promotorbindung,

und die Bildung des elongationsaktiven *open complex* der RNA-Polymerase ist keine ATP-Hydrolyse nötig (Richet & Raibaud, 1989; Schreiber & Richet, 1999). Die Fähigkeit zur Oligomisierung ist für die ADP-gebundene Form von MalT jedoch verringert im Vergleich zur ATP-gebundenen Form (Schreiber & Richet, 1999). Daher wird vermutet, daß die ATP-Hydrolyse für den Abbau des oligomeren Aktivierungskomplexes benötigt wird.



**Abbildung 2-5: Modell für den Nukleoproteinkomplex aus MalT, CRP und dem *malEp-malKp*-Promotorbereich.** Im Komplex aus der DNA eines *mal*-Promotors und dem aktiven MalT-Multimer ist die DNA um das Proteino oligomer gewunden (linke Seite). Am *malEp-malKp*-Promotor ist dieser Komplex jedoch noch nicht aktiv. Durch die Bindung von CRP kommt es zur Verdrängung von unspezifisch gebundenem MalT und zur Repositionierung des spezifisch gebundenen MalT. Erst dieser heterooligomere Komplex kann die Transkription aktivieren. Übernommen aus Raibaud *et al.* (1989).

Die Aktivität von MalT wird nicht nur durch die DNA-Konformation und niedermolekulare Liganden reguliert, sondern sie wird außerdem durch die Proteine MalK (Reyes & Shuman, 1988), MalY (Reidl & Boos, 1991) und Aes (Peist *et al.*, 1997) inhibiert. Für MalK, die ATP-bindende Untereinheit des Maltose-Transportsystems, wurde eine direkte Interaktion mit MalT nachgewiesen (Panagiotidis *et al.*, 1998). Die Repression des *mal*-Regulons wird durch Mutationen in *malk* verstärkt, welche die ATPase-Aktivität von MalK zerstören (Kuhnau *et al.*, 1991). Die Repression durch MalK scheint also das Expressionsniveau der *mal*-Gene an die ATP-Hydrolyserate des Transportsystems und somit an die verfügbare Menge des Substrats zu koppeln. Die konstitutiv aktive MalT-Variante MalT1(Con) (Debarbouille *et al.*, 1978) wird durch MalK nicht mehr reprimiert, obwohl die beiden Proteine weiterhin miteinander wechselwirken können (Panagiotidis *et al.*, 1998). Der Repressionsmechanismus scheint also komplexer zu sein, als die einfache Behinderung der MalT-Oligomerisierung

durch MalK-Bindung an die monomere Form. MalY ist ein cytoplasmatisches PLP-enthaltendes Protein (2 x 43.5 kDa) mit C $\beta$ -S-Lyaseaktivität (Reidl & Boos, 1991). Seine Kristallstruktur (Clausen *et al.*, 2000) zeigt deutliche Homologie zu Mitgliedern der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Familie bzw. *Faltungstyp I* der PLP-abhängigen Enzyme (siehe Abschnitt 2.2.1). Die Repression der MalT-Aktivität ist jedoch unabhängig von der C $\beta$ -S-Lyaseaktivität (Zdych *et al.*, 1995). Sie kann durch Maltotriose unterdrückt werden, und ihr Ausmaß ist auch davon abhängig, welches Adeninnukleotid an MalT gebunden ist (AMP, ADP, ATP oder AMP-PNP; Schreiber *et al.*, 2000). Mechanismus und physiologische Funktion der MalT-Inhibition durch MalY sind bisher unklar. Dies trifft gleichermaßen auf den dritten Repressor des *mal*-Regulons zu, das Protein Aes. Aes weist eine schwache Sequenzhomologie zu Lipasen auf und besitzt Esterase-Aktivität (Peist *et al.*, 1997).

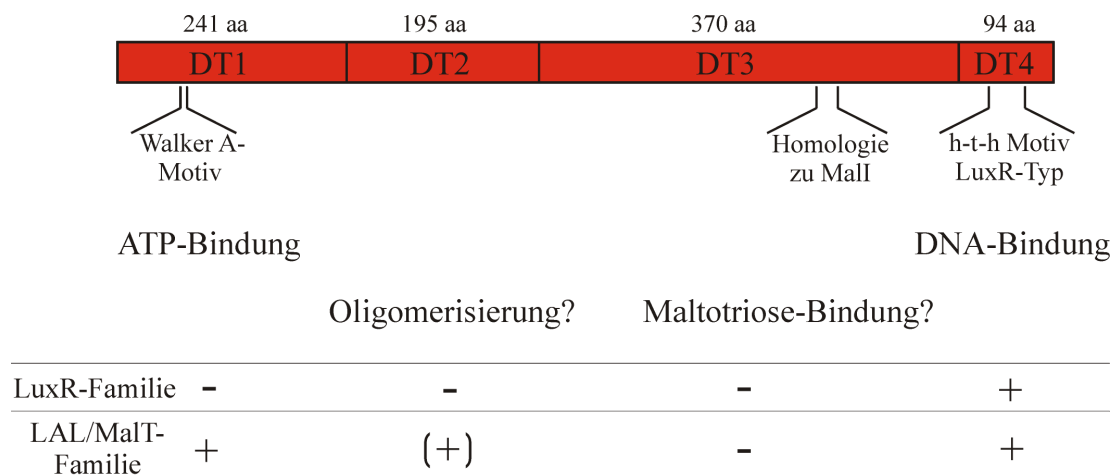
### 2.1.3 Die MalT-Familie ATP-bindender Transkriptionsaktivatoren

MalT ist der am besten untersuchte Vertreter der MalT-Familie großer Transkriptionsaktivatoren (zwischen 832 und 1159 Aminosäuren) (Danot, 2000; Valdez *et al.*, 1999). Es handelt sich um eine Untergruppe der LuxR-Familie prokaryontischer Transkriptionsaktivatoren (Swift *et al.*, 1993), die auch LAL-Familie (*Large ATP-binding regulators of the LuxR family*) genannt wird (De Schrijver & De Mot, 1999). Zusätzlich zum typischen Helix-turn-Helix-DNA-Bindungsmotiv der LuxR-Familie am C-Terminus weisen sie noch ein N-terminales Nukleotid-Bindungsmotiv (Walker A-Motiv; Saraste *et al.*, 1990) auf (Abbildung 2-6). Daher wurde vorgeschlagen, daß diese beiden Bereiche für einen gemeinsamen ATP-abhängigen Mechanismus der Transkriptionsaktivierung verantwortlich sind (De Schrijver & De Mot, 1999). Die nichthomologen Bereiche zwischen diesen Abschnitten wären demnach für die Bindung spezifischer Effektoren und die individuelle Regulation des jeweiligen Transkriptionsfaktors verantwortlich.

Die Mechanismen für die Transkriptionsaktivierung durch LAL-Proteine und ihre Regulation sind auf molekularer Ebene bisher kaum verstanden, und für die Proteine dieser Familie sind keine Strukturdaten vorhanden. Am besten untersucht ist die Regulation durch MalT (Abschnitt 2.1.2). Für dieses Protein wurde kürzlich sein Aufbau aus vier Domänen beschrieben (Danot, 2000). Die ATP-Bindungsstelle befindet sich in der ersten der durch limitierte Proteolyse identifizierten Domänen (DT1, 241 Aminosäuren). Die Domänen II (DT2, 195 Aminosäuren) und III (DT3, 370 Aminosäuren) stellen den mittleren Abschnitt dar, der im Bereich der Domäne II eine sehr schwache Sequenzhomologie zu den anderen Mitgliedern der LAL-Gruppe aufweist. Diese Domänen sind vermutlich für die Bindung des



Liganden Maltotriose und die dadurch induzierte Oligomerisierung von MalT (Schreiber & Richet, 1999) verantwortlich.



**Abbildung 2-6: Domänenorganisation von MalT als Prototyp eines LAL-Proteins.** Die Domänengrenzen wurden durch limitierte Proteolyse bestimmt (Danot, 2000). In der C-terminalen Domäne befindet sich ein Helix-*turn*-Helix-DNA-Bindungsmotiv vom LuxR-Typ. Die LAL-Untergruppe großer Proteine besitzt zusätzlich ein ATP-Bindungsmotiv am N-Terminus. Die Domänen II und III sind vermutlich für die Oligomerisierung und Effektor-Bindung verantwortlich. Domäne II zeigt eine schwache Konservierung innerhalb der Proteinfamilie (Danot, 2000), und Domäne III eine kurze Sequenzhomologie zu MalI (Reidl & Boos, 1991).

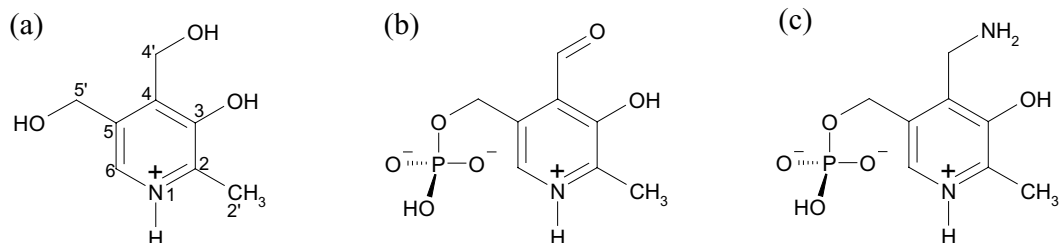
DT3 enthält einen kurzen Sequenzabschnitt, der homolog zu einem Bereich in MalI ist (Reidl *et al.*, 1989). Da dieses Protein ebenfalls durch Maltotriose reguliert wird, könnte es sich um eine Maltotriose-Bindungsstelle handeln. Tatsächlich konnte kürzlich die Bindung von Maltotriose an DT3 nachgewiesen werden (Danot, 2000), auch wenn die Bindungsaffinität für DT3 niedriger ist (Dissoziationskonstante  $K_d = 2,5 \text{ mM}$ ) als für das MalT-Gesamtprotein ( $K_d = 0,02 \text{ mM}$ ). Die Affinität zu DT3 wird durch die Gegenwart von Domäne II deutlich erhöht, wobei diese Domäne alleine keine Maltotriose bindet (Danot, 2000). DT2 und DT3 scheinen also gemeinsam für die ligandenregulierte Oligomerisierung verantwortlich zu sein. Domäne IV (DT4, 94 Aminosäuren) enthält ein typisches Helix-*turn*-Helix-DNA-Bindungsmotiv (Vidal-Ingigliardi *et al.*, 1993) vom LuxR-Typ (Swift *et al.*, 1993). Für diesen Bereich ist die Struktur eines sequenzverwandten Proteins bekannt, die DNA-Bindungsdomäne von NarL (Baikalov *et al.*, 1996), das einer anderen Untergruppe der LuxR-Familie angehört. In MalT ist Domäne IV allerdings nicht nur für die DNA-Bindung verantwortlich, sondern auch an der Transkriptionsaktivierung beteiligt, vermutlich über eine direkte Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase (Danot *et al.*, 1996).

MalT ist ein typischer Vertreter einer Familie großer, ATP-bindender Transkriptionsaktivatoren. Die Regulation der MalT-Aktivität durch mehrere Faktoren macht das *mal*-Regulon mit seinem zentralen Aktivator MalT zu einem attraktiven Modellsystem für die Transkriptionsregulation. Obwohl bereits eine Vielzahl biochemischer Daten gesammelt wurde (Boos & Shuman, 1998), sind die molekularen Grundlagen der Transkriptionsaktivierung durch MalT und der Regulation seiner Aktivität weitgehend ungeklärt. Die Strukturanalyse des MalT-Proteins sollte entscheidende Informationen für die Aufklärung dieser Mechanismen liefern.

## 2.2 Die PLP-abhängigen Enzyme Cystathionin- $\gamma$ -Synthase und Cystathionin- $\gamma$ -Lyase

### 2.2.1 PLP-abhängige Enzyme - Katalyse und Klassifizierung

Vitamin B<sub>6</sub> wurde zu Beginn der 30iger Jahre des vorigen Jahrhunderts entdeckt (György, 1934) und zunächst in der Pyridoxin-Form isoliert (György, 1964). In der physiologisch aktiven Form, dem Pyridoxal-5'-phosphat (PLP), ist die 4-Hydroxymethylgruppe zum Aldehyd oxidiert und die 5-Hydroxymethylgruppe phosphoryliert (Abbildung 2-7).

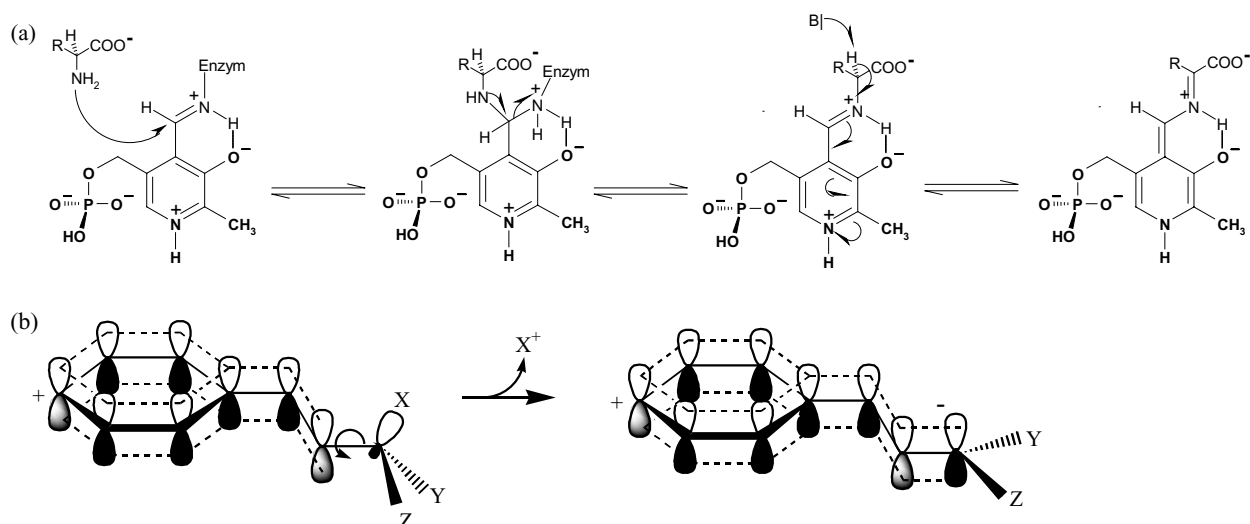


**Abbildung 2-7: Verschiedene Formen der Vitamin B<sub>6</sub>-Gruppe.** (a) Pyridoxin (Vitamin B<sub>6</sub>) mit der Standardnummerierung für Pyridoxin und seine Derivate. (b) Pyridoxal-5'-phosphat, die am häufigsten auftretende Cofaktor-Form. (c) Pyridoxamin-5'-phosphat, das häufig als Zwischenprodukt auftritt, z.B. bei Transaminierungen.

PLP-abhängige Enzyme nehmen eine zentrale Rolle im Aminosäurestoffwechsel ein, da sie ein breites Spektrum an Reaktionen an Aminosäuresubstraten katalysieren können (Dunathan, 1971). Das PLP ist normalerweise kovalent über eine Iminbindung (Schiff-Base, Aldimin) mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins im Aktivzentrum des jeweiligen Enzyms verknüpft (internes Aldimin). Die Iminbindung kann reversibel gespalten werden. Durch Kondensation der Aldehydgruppe des PLP mit der Aminogruppe eines Substrats entsteht dann ein kovalenter Komplex zwischen Enzym und Substrat (externes Aldimin; Abbildung 2-6a). Am

gebundenen Substrat läuft nun eine der Reaktionen ab, die von PLP-abhängigen Enzymen katalysiert werden können. Die wichtigste Eigenschaft des PLP-Cofaktors ist dabei seine elektronenziehende Wirkung ("Elektronenfalle"), die auf den elektrophilen Pyridinstickstoff zurückzuführen ist (John, 1995). Sie wird meist durch Protonierung dieses Stickstoffs noch weiter verstärkt. Elektronen in intermediär auftretenden Carbanionen können daher leicht in das mesomeriestabilisierte  $\pi$ -System des Cofaktors aufgenommen werden (elektrophile Katalyse).

Die von PLP-abhängigen Enzymen katalysierten Reaktionen folgen alle einem ähnlichen Schema, mit Ausnahme einiger Oligosaccharid-Phosphorylasen wie Glykogen-Phosphorylase und MalP (O'Reilly *et al.*, 1997; Palm *et al.*, 1990). Letztere verwenden die 5'-Phosphatgruppe als Säure-Base-Katalysator und werden im weiteren nicht berücksichtigt. Im normalen Verlauf der PLP-abhängigen Katalyse wird nach der Transaldiminierungsreaktion zum externen Aldimin (Abbildung 2-8a) eine der drei übrigen Bindungen zu  $C\alpha$  gelöst. Je nach gespaltener Bindung findet eine Decarboxylierung, der erste Schritt einer Transaminierung, eine Racemisierung, oder eine Modifikation der Substratseitenkette statt.



**Abbildung 2-8:** (a) Reaktionsverlauf der Transaldiminierung an PLP und anschließende Abstraktion des  $\alpha$ -Protons als Beispiel für einen ersten Reaktionsschritt. (b) Modell der stereoelektronischen Katalyse. Die Bindung zu Substituent X ist in der Position, welche die stärkste Überlappung mit dem  $\pi$ -Elektronensystem des Cofaktors ermöglicht. Diese Bindung wird daher am leichtesten gespalten.

Alle Hypothesen zum Zustandekommen der Reaktionsspezifität PLP-abhängiger Enzyme haben gemeinsam, daß diejenige Bindung geschwächt wird, welche die stärkste Überlappung mit dem  $\pi$ -Elektronensystem des Cofaktors aufweist (Dunathan & Voet, 1974). Die Elektronen dieser Bindung können besonders leicht in das  $\pi$ -System des PLP delokalisiert

werden. Durch Rotation um die C $\alpha$ -N Bindung kann jede der drei Bindungen an C $\alpha$  in diese Position in einer Ebene senkrecht zur Ebene des Cofaktors gebracht werden (stereoelektronische Katalyse; Abbildung 2-8b). Die geometrischen und elektrostatischen Bedingungen im Aktivzentrum des jeweiligen Enzyms bestimmen, welche Bindung diese Position einnimmt. Der Proteinanteil PLP-abhängiger Enzyme unterdrückt über diesen Mechanismus eine Vielzahl möglicher Reaktionen und favorisiert so die gewünschte Reaktion (John, 1995).

Auf Grundlage der vielen bekannten Sequenzen und Strukturen PLP-abhängiger Enzyme (Jansonius, 1998; Mehta & Christen, 1998) konnten mehrere Proteinfamilien mit unterschiedlichem evolutionärem Ursprung identifiziert werden. Alexander *et al.* (1994) definierten anhand von Sequenzvergleichen drei Familien PLP-abhängiger Enzyme, die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Familie (Tabelle 2-1).

**Tabelle 2-1: Einige Vertreter der drei großen Familien PLP-abhängiger Enzyme**

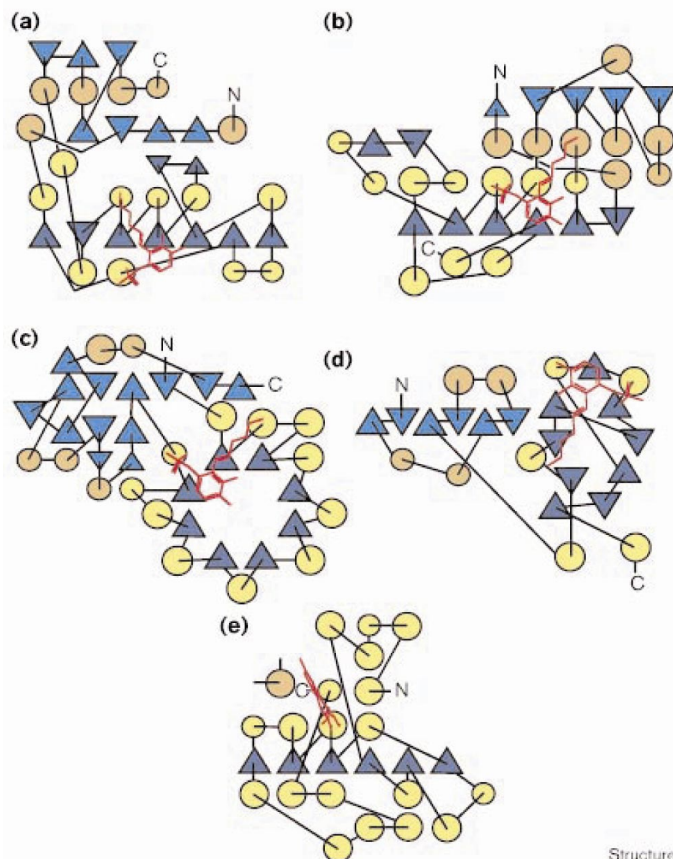
$\alpha$ -Familie	$\beta$ -Familie	$\gamma$ -Familie
Aminotransferasen <sup>1</sup>	Threonin-Synthase	Cystathionin- $\gamma$ -Synthase
5-Aminolävulinat-Synthase	Tryptophan-Synthase	Cystathionin- $\gamma$ -Lyase
Dialkylglycin-Decarboxylase	Cystein-Synthase	Cystathionin- $\beta$ -Synthase
Tyrosin-Phenol-Lyase	Serin-Dehydratase	O-Acetylhomoserin-Lyase

<sup>1</sup> Ausnahme: Untergruppe III nach Mehta (1993)

Sie stellten eine starke Korrelation zwischen dieser Einteilung und der Reaktionsspezifität der Enzyme fest. Die  $\alpha$ -Familie katalysiert vornehmlich Reaktionen an C $\alpha$ , während sich bei der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Familie nach einer Protonenabstraktion an C $\alpha$  ein weiterer Reaktionsschritt an C $\beta$  bzw. C $\gamma$  anschließt. Während die  $\beta$ -Familie keine Homologien zu einer der beiden anderen aufweist, scheinen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Familie weitläufig miteinander verwandt zu sein. Der jeweils erste Vertreter der drei Familien, dessen dreidimensionale Struktur gelöst wurde, war Aspartat-Aminotransferase (Ford *et al.*, 1980) ( $\alpha$ -Familie), Tryptophan-Synthase (Hyde, 1988) ( $\beta$ -Familie) und Cystathionin- $\beta$ -Lyase (Clausen *et al.*, 1996) (CBL;  $\gamma$ -Familie). Die Struktur der CBL (siehe Abschnitt 2.2.2) zeigte, daß die Enzyme der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Familie einen gemeinsamen Faltungstyp aufweisen und somit tatsächlich verwandt sind.

Inzwischen ist für mehr als 30 PLP-abhängige Enzyme die dreidimensionale Struktur bekannt (Jansonius, 1998), und eine neue, verfeinerte Klassifizierung mit fünf Familien wurde vorgeschlagen (Grishin *et al.*, 1995) (Abbildung 2-9). *Faltungstyp I* verknüpft  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Familie und umfaßt die meisten Aminotransferasen, z.B. Aspartat-Aminotransferase. Die

katalytisch aktive Form ist ein Homodimer, aber einige Vertreter bilden aus diesen Dimeren noch höhere Oligomere. Die zentrale PLP-Bindungsdomäne weist ein typisches siebensträngiges  $\beta$ -Faltblatt auf. *Faltungstyp II* entspricht der  $\beta$ -Familie, z.B. Tryptophan-Synthase. Sie bilden Heterotetramere in linearer  $\alpha\beta\beta\alpha$ -Anordnung. Die  $\beta$ -Untereinheit enthält den PLP-Cofaktor und besitzt zwei Domänen mit je einem viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt im Zentrum eines  $\alpha\beta\alpha$ -Sandwichs.



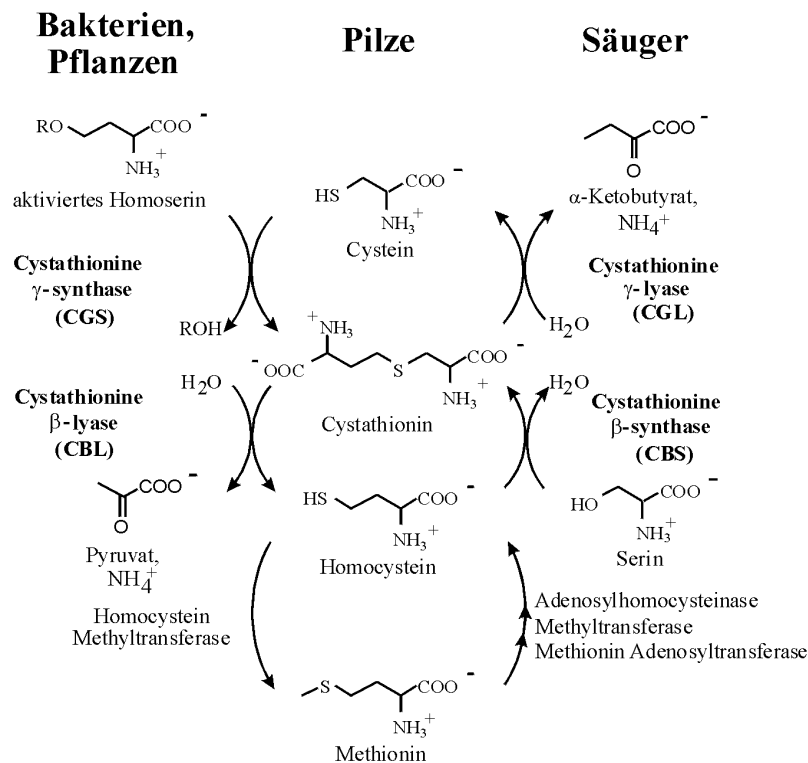
**Abbildung 2-9: Faltungstypen PLP-abhängiger Enzyme.** Kreise symbolisieren Helices, Dreiecke stehen für  $\beta$ -Faltblattstränge. Die Helices der PLP-Bindungsdomäne sind gelb eingefärbt, die Faltblattstränge dunkelblau. Der PLP-Cofaktor ist rot dargestellt. (a) Diaminopelargonsäure-Synthase, *Faltungstyp I* (b) Tryptophan-Synthase, *Faltungstyp II* (c) Alanin-Racemase, *Faltungstyp III* (d) D-Alanin-Aminotransferase, *Faltungstyp IV* (e) C-terminale PLP-Bindungsdomäne der Glykogen-Phosphorylase, *Faltungstyp V*. Eine Helix der N-terminalen Domäne, die mit dem Cofaktor interagiert, ist ebenfalls dargestellt. Die Abbildung wurde aus Schneider *et al.* (2000) übernommen.

*Faltungstyp III* umfaßt Homodimere mit einem *TIM barrel* Faltungstyp, z.B. Alanin-Racemase. Die Monomere besitzen zwei Domänen, der Cofaktor ist nahe des C-Terminus der N-terminalen *TIM barrel*-Domäne gebunden. *Faltungstyp IV* umfaßt kleine Homodimere, z.B. D-Aspartat-Aminotransferase. Der Cofaktor ist zwischen den beiden Domänen eines Monomers gebunden. *Faltungstyp V* umfaßt die Phosphorylasen, z.B. Glykogen-Phosphorylase. Der PLP-Cofaktor dient hier als Säure-Base-Katalysator.

Die Transsulfurierungsenzyme Cystathionin- $\beta$ -Lyase (CBL) und Cystathionin- $\gamma$ -Synthase (CGS) bilden eine Untergruppe von *Faltungstyp I*, die CBL-Gruppe (Käck *et al.*, 1999). Zu dieser Gruppe gehört vermutlich auch die Cystathionin- $\gamma$ -Lyase (CGL).

### 2.2.2 Transsulfurierung - Methionin- und Cysteinestoffwechsel

Unter den zwanzig proteinogenen Aminosäuren enthalten nur Cystein und Methionin das Element Schwefel. Während Mikroorganismen und Pflanzen durch die sogenannte Transsulfurierung (Abbildung 2-10, linke Seite) den Schwefel aus Cystein zum Aufbau von Methionin verwenden können, stellt Methionin für Säugetiere eine essentielle Aminosäure dar (Flavin, 1975; Rose *et al.*, 1935). Säuger können dafür Methionin zu Cystein umwandeln (Griffith, 1987) (reverse Transsulfurierung; Abbildung 2-10, rechte Seite), ein Vorgang der bei erhöhtem Cysteinbedarf von Bedeutung ist, z.B. während der Embryonalentwicklung im Gehirn. Beide Stoffwechselwege verlaufen über das gemeinsame Zwischenprodukt Cystathionin.



**Abbildung 2-10: Reaktionsschritte der Methioninbiosynthese und der reversen Transsulfurierung.** Je nach Organismus sind die Enzyme für die Übertragung des Schwefels von Cystein auf Homocystein, für den umgekehrten Reaktionsweg, oder für beide Richtungen vorhanden. Die Namen der Transsulfurierungsenzyme sind hervorgehoben.

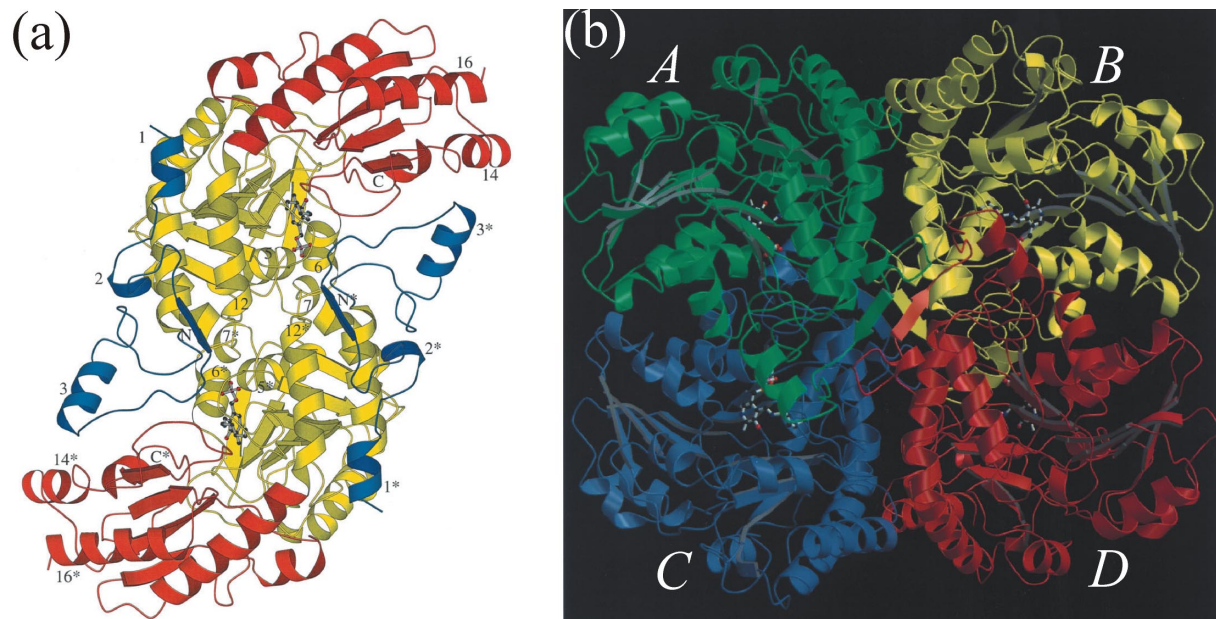
In Mikroorganismen und Pflanzen wird im ersten Schritt der Methioninbiosynthese Cystathionin gebildet. Dabei wird, katalysiert durch Cystathionin- $\gamma$ -Synthase, Cystein mit einer aktivierten Form von Homoserin verknüpft. Das Cystathionin wird dann von Cystathionin- $\beta$ -Lyase zu Homocystein, Pyruvat und Ammoniak gespalten. In Säugern wird im ersten Schritt der reversen Transsulfurierung ebenfalls Cystathionin als Zwischenprodukt gebildet, katalysiert durch Cystathionin- $\beta$ -Synthase. Das Cystathionin wird anschließend vom Enzym Cystathionin- $\gamma$ -Lyase an der C $\gamma$ -S-Bindung gespalten, es entsteht Cystein, Pyruvat und Ammoniak.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Enzyme CGS aus Tabak und humane CGL untersucht. CGS katalysiert die Kondensation von Cystein und einer aktivierten Form von Homoserin (Abbildung 2-10). Als aktivierte Vorstufe wird von Bakterien und einigen Pilzen O-Acetyl- oder O-Succinylhomoserin (Umbarger, 1978), von Pflanzen Homoserinphosphat verwendet (Giovanelli *et al.*, 1980). CGL ist das einzige bekannte Enzym, dessen physiologische Reaktion eine Substitution an C $\gamma$  einer Aminosäure beinhaltet. Das Enzym kann außerdem  $\beta$ -Eliminierung,  $\beta$ -Substitution und Protonen-Austauschreaktionen an C $\alpha$  und C $\beta$  geeigneter Substratanaloga katalysieren. In Abwesenheit des zweiten Substrats Cystein katalysiert CGS auch eine  $\gamma$ -Eliminierungsreaktion.

CGL katalysiert die Hydrolyse von Cystathionin zu Cystein, Ammoniak und  $\alpha$ -Ketobutyrat (Abbildung 2-10). Das Enzym aus Hefe kann eine Vielzahl an Reaktionen katalysieren, z.B.  $\beta$ - und  $\gamma$ -Eliminierung mit Cystathionin als Substrat, und eine  $\gamma$ -Substitution mit O-Succinylhomoserin als Substrat (Yamagata *et al.*, 1993). CGL spielt eine wichtige Rolle im Aminosäuremetabolismus und steht beim Menschen in Verbindung mit Stoffwechselstörungen wie Cystinose und Cystathionuria (Uren *et al.*, 1978), und möglicherweise auch der alkoholbedingten Schädigung der Leber (Lu *et al.*, 1992b). Die Aminosäuresequenzen der bekannten CGL zeigen deutliche Homologien zu CBL und CGS (Steebhorn *et al.*, 1998). Insbesondere katalytisch wichtige Reste dieser beiden Enzyme sind auch in CGL konserviert. Daher wird vermutet, daß CGL auch strukturell eng mit CBL und CGS verwandt ist.

Die Transsulfurierungsenzyme CBL, CGS und CGL gehören zur  $\gamma$ -Familie der PLP-abhängigen Enzyme bzw. bilden die CBL-Untergruppe des *Faltungstyp I* (Abschnitt 2.2.1). Aus dieser Gruppe sind die Strukturen der CBL (Clausen *et al.*, 1996) (Abbildung 2-11) und CGS (Clausen *et al.*, 1998) aus *E. coli* bekannt. Es handelt sich um homotetramere Enzyme aus Untereinheiten von je 40-48 kDa. Sie enthalten einen PLP-Cofaktor pro Monomer, der zu einem Absorptionsmaximum bei 425 nm führt. Ein Monomer bildet über eine Vielzahl an Interaktionen, u.a. im Aktivzentrum, einen Komplex mit einem zweiten Monomer, das sogenannte aktive Dimer. Zwei dieser aktiven Dimere bilden ein Dimer von Dimeren, das physiologisch aktive Homotetramer. Das Monomer besteht aus drei Domänen: (I) eine N-terminale Domäne mit vorwiegend *loop*-Struktur, die an der Dimerisierung und der Cofaktor-Bindung des Partnermonomers beteiligt ist; (II) einer zentralen Domäne mit einem typischen siebensträngigen  $\beta$ -Faltblatt, die den PLP-Cofaktor und die katalytisch aktiven Seitenketten enthält; sowie (III) einer C-terminalen Domäne mit einem von  $\alpha$ -Helices umgebenen

viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt, die an der Bindung des distalen Teils von Cystathionin (CBL und CGL) bzw. des zweiten Substrats L-Cystein (CGS) beteiligt ist.



**Abbildung 2-11:** Struktur der CBL aus *E. coli*. (a) Aktives Dimer der CBL. Die N-terminale Domäne ist blau, die zentrale PLP-Bindungsdomäne gelb und die C-terminale Domäne rot dargestellt. Für die Sekundärstrukturelemente, die an Dimer- und Tetramerkontakten beteiligt sind, ist die Numerierung angegeben. (b) Das CBL-Homotetramer, die physiologisch aktive Form. Monomere A und C sowie Monomere B und D bilden je ein aktives Dimer. Die Abbildungen wurden modifiziert aus Clausen *et al.* (1996) übernommen.

### 2.2.3 Inhibition der Transsulfurierungsenzyme

Die Transsulfurierungsreaktionen sind für Mikroorganismen und Pflanzen essentiell, treten jedoch in Säugern nicht auf. Die beteiligten Enzyme CBL und CGS stellen daher attraktive Angriffsziele für antibakterielle, fungizide und herbizide Wirkstoffe dar. Derartige Pestizide können, eine ausreichende Spezifität vorausgesetzt, ihre Wirkung ausüben, ohne Menschen zu schädigen. Eine Inhibition der Säugerenzyme CBS und CGL der reversen Transsulfurierung ist ebenfalls von Interesse, da einige Krankheiten, wie z.B. Cystinurie, mit ihnen assoziiert sind (Griffith, 1987).

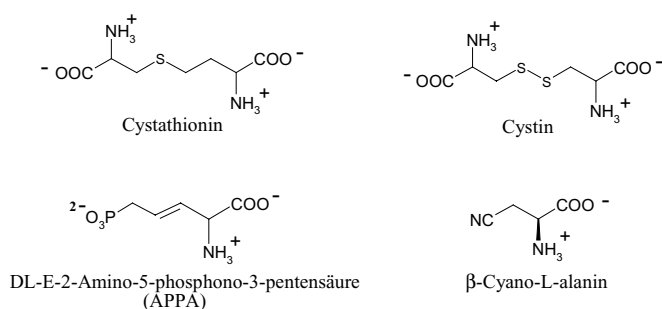
Die Grundlagen der Enzyminhibition sind z.B. in Fersht (1985) und in Walsh (1979) ausführlich beschrieben. Ein Überblick über die Inhibition der PLP-abhängigen Transsulfurierungsenzyme ist in Steegborn & Clausen (2000) zu finden. Im folgenden wird eine Zusammenfassung gegeben.



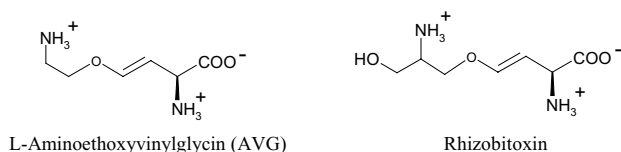
### a) reversible Inhibition

Kato *et al.* (1966) beschrieben die reversible Inhibition von CGL durch L-Cystein und L-Cystin (Abbildung 2-12). Der Effekt durch L-Cystein ist ein Beispiel für Produktinhibition, während die Wirkung von L-Cystin ein Beispiel für die Inhibition durch ein Substratanalogon ist. Billy *et al.* (1975) untersuchten die Inhibition von CGL durch S-Carboxymethyl- und S-Carboxyethylcystein und Homocystein. Inhibitionskonstanten  $K_i$  um  $10^{-3}$  zeigen, daß die korrekte Kettenlänge und die distale Carboxylgruppe für eine hohe Affinität nicht ausreichen. Für den stärksten bekannten reversiblen CGL-Inhibitor,  $\beta$ -Cyano-L-alanin, wurde ein  $K_i$ -Wert von  $1 \times 10^{-7}$  M angegeben (Mushahwar & Koeppe, 1973), der jedoch nur auf einem Meßwert beruht. Aufgrund der kurzen Seitenkette mit nur einer funktionellen Gruppe fehlt  $\beta$ -Cyano-L-alanin, wie allen anderen bisher untersuchten Substanzen, die nötige Spezifität für die Entwicklung von Wirkstoffen. So inhibiert  $\beta$ -Cyano-L-alanin z.B. auch CGS, ebenso wie eine Vielzahl anderer Carbonsäure- und Aminosäurederivate, z.B. 2-Oxoglutarat und 2-Oxo-3-methylvalerat (Aarnes, 1980).

#### (a) reversible Inhibitoren



#### (b) slow-binding Inhibitoren



#### (c) irreversible Inhibitoren



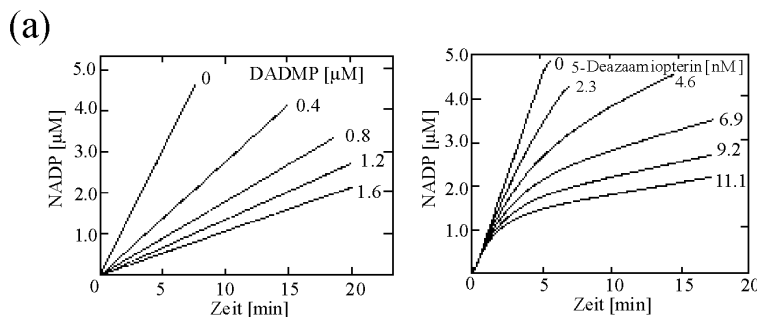
**Abbildung 2-12: Einige Inhibitoren der PLP-abhängigen Transsulfurierungsenzyme.** (a) Reversible Inhibitoren Cystin, APPA und  $\beta$ -Cyanoalanin. Das zentrale Intermediat der Transsulfurierung, Cystathionin, ist je nach Enzym Produkt- bzw. Substrat und ist zum Vergleich aufgeführt. (b) Die *slow-binding* Inhibitoren AVG und Rhizobitoxin sind dem Cystathionin strukturell eng verwandt. (c) Die irreversiblen Inaktivatoren PG und  $F_3$ Ala weisen zu kleine Seitenketten auf, um ausreichend Wechselwirkungen für eine hohe Bindungsspezifität einzugehen.

Eine erhöhte Spezifität für CGS konnte mit 3-(Phosphonomethyl)pyridin-2-carbonsäure (PPCA), 4-(Phosphonomethyl)pyridine-2-carbonsäure und DL-E-2-Amino-5-phosphono-3-pentensäure (APPA; Abbildung 2-12a) erreicht werden (Clausen *et al.*, 1999; Kreft *et al.*,

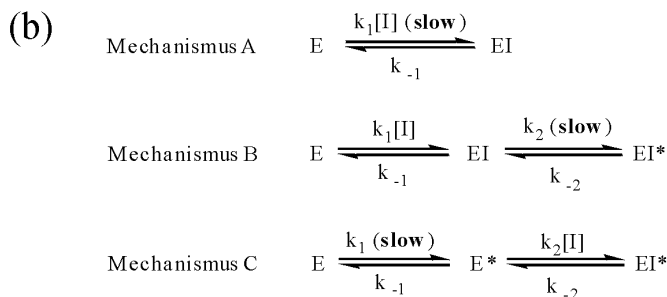
1994). Diese Substanzen sind Analoga des ersten Substrats pflanzlicher CGS, Homoserinphosphat. Aufgrund ihrer niedrigen Affinität ( $K_i$ -Werte zwischen  $5 \times 10^{-4}$  und  $3 \times 10^{-5}$  M) und der möglichen Inhibition anderer Enzyme, die Homoserinphosphat als Substrat verwenden (z.B. Threonin-Synthase), sind diese Substanzen allenfalls als Startpunkt für die Wirkstoffentwicklung geeignet.

*b) slow-binding Inhibition*

Bei der *slow-binding* Inhibition, einer Sonderform der reversiblen Inhibition (Morrison & Walsh, 1988), stellt sich das Gleichgewicht zwischen freiem Enzym und Inhibitor sowie deren Komplex langsam, im Bereich von Minuten bis Stunden, ein. Man beobachtet ein biphasische Verhalten bei Auftragung der Restaktivität gegen die Zeit (Abbildung 2-13a), da mit zunehmender Zeitdauer mehr Enzym inaktiviert wird, bis sich das Bindungsgleichgewicht eingestellt hat.



**Abbildung 2-13: *Slow-binding* Inhibition.** (a) Produktbildung durch Dihydrofolat-Reduktase aus *E. coli* in Gegenwart des klassischen Inhibitors 2,4-Diamino-6,7-dimethylpteridin (DADMP; links). Im analogen Experiment in Gegenwart des *slow-binding* Inhibitors 5-Deazaaminopterin (rechts) wird durch die langsame Gleichgewichtseinstellung ein biphasisches Verhalten beobachtet. (b) Mechanismen zur Interpretation der *slow-binding* Inhibition. Durch kinetische Experimente kann zwischen diesen drei Möglichkeiten unterschieden werden. Aus Steegborn & Clausen (2000).



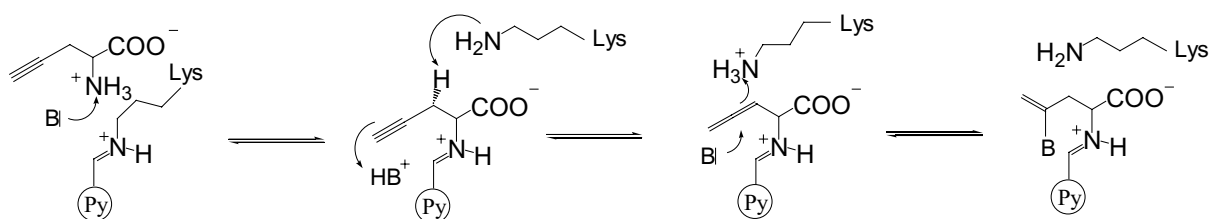
Drei Mechanismen stehen zur Interpretation dieses Verhaltens zur Verfügung (Abbildung 2-13b). In Mechanismus A bindet I langsam an das Enzym E, während in Mechanismus B der EI-Komplex schnell gebildet wird und sich dann langsam zu einem stabilen EI\*-Komplex umlagert. In Mechanismus C findet zunächst eine langsame Umlagerung im Enzym E statt, bevor der Inhibitor binden kann. Für die meisten bisher untersuchten Systeme wurde Mechanismus B beobachtet (Morrison & Walsh, 1988). Dies gilt auch für die Inhibition von CBL durch L-Aminoethoxyvinylglycin (AVG), einer bakterioziden Aminosäure aus

Streptomyceten (Pruess *et al.*, 1974), und Rhizobitoxin, einer phytotoxischen Aminosäure aus *Rhizobium japonicum* (Minamisawa *et al.*, 1990; Owens *et al.*, 1968). Für die Inhibition der *E. coli*-CBL durch AVG wurde eine Inhibitionskonstante  $K_i^*$  von 1  $\mu\text{M}$  bestimmt (Clausen *et al.*, 1997a), und für die Inhibition von CBL aus *Salmonella typhimurium* durch Rhizobitoxin beträgt der  $K_i^*$ -Wert sogar 0,02  $\mu\text{M}$  (Owens *et al.*, 1968). Aufgrund der hohen Affinität dieser Substanzen zu CBL und der von Owens *et al.* (1968) postulierten Unempfindlichkeit der reversen Transsulfurierungsenzyme aus Säugern wurden diese Substanzen als Leitstrukturen für die Wirkstoffentwicklung vorgeschlagen.

### c) irreversible Inhibition

Ein Problem mit reversiblen Inhibitoren ist die zeitabhängige Abnahme der Konzentration freien Inhibitors durch Metabolisierung und Exkretion. Die resultierende Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes kann durch Verwendung von irreversiblen Inhibitoren verhindert werden. Die für die Wirkstoffentwicklung nötige Spezifität erreicht man mit sogenannten *mechanism-based* Inhibitoren (Silverman, 1995). Eine unreaktive Substanz wird durch das zu inhibierende Enzym unter Ausnutzung des entsprechenden Katalysemechanismus aktiviert und reagiert so spezifisch in diesem Aktivzentrum. Diese Stoffe werden auch Trojanische Pferde oder Suizidsubstrate genannt. Der aktivierte Inhibitor kann vor der Inaktivierungsreaktion auch abdissoziieren, und die Effizienz des Inaktivators wird dann durch das Verteilungsverhältnis  $P = k_{\text{Dissoziation}}/k_{\text{Inaktivierung}}$  ausgedrückt.

Verschiedene ungesättigte oder polyhalogenierte Aminosäuren wirken als irreversible Inaktivatoren auf die PLP-abhängigen Transsulfurierungsenzyme (Abbildung 2-13). Die Inaktivierung von CGL durch Propargylglycin (PG) verläuft vermutlich über eine Allenzwischenstufe (Abeles & Walsh, 1973; Washtien & Abeles, 1977) (Abbildung 2-14).



**Abbildung 2-14: Postulierter Inaktivierungsmechanismus für PG.** Der Pyridinring des PLP-Cofaktors ist als Py dargestellt. Die Aktivierung der  $\beta,\gamma$ -Doppelbindung der Allenzwischenstufe durch die terminale Vinylgruppe ermöglicht die Michael-Addition eines Nukleophils im Aktivzentrum, z.B. einer Hydroxyl- oder einer Sulfhydrylgruppe.

Der Reaktionsmechanismus beschränkt die Spezifität von PG jedoch nur auf Enzyme, die ein  $\beta$ -Proton abstrahieren können. Daher inaktiviert PG auch CGS (Johnston *et al.*, 1979). Die Inaktivierung der CBL aus *Lactobacillus lactis* resultiert vermutlich aus der Fähigkeit dieses Enzyms, in einer unphysiologischen Reaktion ein  $\beta$ -Proton zu abstrahieren.

Die Inaktivierung von CGL und CBL durch  $\beta,\beta,\beta$ -Trifluor-L-alanin ( $F_3Ala$ ) erfolgt nach einem ähnlichen Mechanismus (Silverman & Abeles, 1976). Durch Abstraktion des  $\alpha$ -Protons kommt es zur Abspaltung von HF. Die verbleibenden Fluoratome aktivieren die entstandene  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung für die Michael-Addition eines Nucleophils, z.B. einer Hydroxylgruppe. Obwohl auch CGS das  $\alpha$ -Proton abstrahieren kann, wird dieses Enzym durch  $F_3Ala$  nicht inhibiert. Vermutlich besitzt CGS kein Nucleophil, das zu einer Michael-Addition an  $C\beta$  in der Lage ist. Für eine Reaktion an  $C\gamma$  sind  $\beta$ -Trifluormethyl-L-alanin und  $\beta$ -Trifluorvinyl-L-alanin geeignet. Für ihre Aktivierung ist wie bei PG eine Protonenabstraktion an  $C\beta$  notwendig. Diese Substanzen sollten daher eine erhöhte Spezifität für CGS und CGL aufweisen. Die irreversible Inaktivierung von CGL durch diese Substanzen konnte bereits nachgewiesen werden (Alston *et al.*, 1981).

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Bakterienstämme, Plasmide, Oligonukleotide

##### *Bakterienstämme*

- E. coli* BL 21(DE3):  $F^{\prime} ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3)$
- E. coli* BL 21(DE3)pLysS:  $F^{\prime} ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3) pLysS$
- E. coli* DH5 $\alpha$ :  $F^{\prime} \phi 80d lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) deoR recA1 endA1 hsdR17 (r_K^- m_K^+) phoA supE44 \lambda thi-1 gyrA96 relA1$
- E. coli* XL-1 *Blue*:  $recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F^{\prime} proAB lacI^q Z\Delta M15 Tn10(tet^r)]$
- E. coli* MC4100 $\Delta malA157$ :  $F^{\prime} araD139 \Delta(argF-lac)-U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR \Delta mal157$

Alle Stämme sind *E. coli* K12 Derivate. *E. coli* MC4100 $\Delta malA157$  wurde freundlicherweise von Dr. Evelyne Richet (Pasteur-Institut, Paris) zur Verfügung gestellt, die *E. coli* Stämme XL-1 *Blue* und BL 21(DE3) wurden von Stratagene (Heidelberg) und *E. coli* DH5 $\alpha$  von ITC Biotechnology GmbH (Heidelberg) bezogen. Die *E. coli* Stämme DH5 $\alpha$  und XL-1 *Blue* wurden für molekularbiologische Arbeiten eingesetzt, und *E. coli* MC4100 $\Delta malA157$  (das gesamte MalT-Gen ist deletiert) zur Expression von MalT mit dem Konstrukt pOM2*malTp7*. *E. coli* DE3-Stämme sind  $\lambda$ DE3 lysogen, d.h. sie tragen das Gen für T7 RNA Polymerase und wurden zur Expression von hCGL und tCGS sowie der MalT-Konstrukte mit T7-Promotor verwendet.

##### *Plasmide*

Für die Expression in *E. coli* wurden die Plasmide pET16b, pET22b(+) und pET23c(+) der Firma Novagen (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden) verwendet. In diesen Vektoren steht das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Für einige MalT-Konstrukte wurde das Plasmid pARA14 verwendet (Jean-Michel Masson, Centre de transfert en Biotechnologie-Microbiologie, Toulouse, Frankreich), das einen Arabinose-induzierbaren Promotor für die Expression und das  $\beta$ -Laktamasegen als Resistenzmarker trägt. Zur Expression von löslichem MalT wurde das Konstrukt pOM2*malTp7* (Danot & Raibaud, 1994) verwendet, das ein Tetracyclin-Resistenzgen trägt und auf dem sich MalT hinter einem modifizierten *malA*-Promotor befindet.

### *Oligonukleotide*

Oligonukleotide wurden in HPLC-gereinigter Form von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

#### *a) Primer für die PCR-Amplifikation von Genen*

hCGL\_vorwärts (*Nde*I): 5'-CGATGGGTACCCATATGCAGGAAAAAGACGCCTCCTCACAAGG-3'

hCGL\_rückwärts (*Xho*I): 5'-GCGGTACCTCGAGTACTACTGTGAATTCCTGGAGGGTGTGCTGCC-3'

MalT\_vorwärts (*Nde*I): 5'-CGAGAATTCCCATATGCTGATTCCGTCAAAACTAAGTCG-3'

MalT\_rückwärts (*Bam*HI): 5'-TGGATCCTCATTACACGCCGTACCCCATCATC-3'

Die Sequenzabschnitte, die zum jeweiligen Zielgen gehören, sind kursiv geschrieben. Die Erkennungsstelle für das jeweilige Restriktionsenzym ist unterstrichen.

#### *b) Primer für die PCR-Sequenzierung von Genen*

T7-Promotor: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

T7-Terminator: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

MalT\_Seq2: 5'-GCCAATCTGCGTGTTTCGTG-3'

MalT\_Seq3: 5'-GAACTGGCGGCGGAGCTG-3'

MalT\_Seq4: 5'-AGGCGAATTGACCCGCTC-3'

MalT\_Seq5: 5'-CGCTGCCAACTGGTTGCG-3'

MalT\_Seq6: 5'-CTGGAAATCGCGCAACCACC-3'

MalT\_SeqR2: 5'-CTGCCGGTTCAAACCTCGCCC-3'

MalT\_SeqR3: 5'-GCGTAGTGCCAGACATCGTGC-3'

MalT\_SeqR4: 5'-CAAGCTGTCCCACGGCAGGGC-3'

MalT\_SeqR5: 5'-CCCAACCGGAAACGTCATCG-3'

### **3.1.2 Chemikalien und Enzyme**

Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Reagenzien von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) im Reinheitsgrad *p.a.* bezogen.

PfuTurbo DNA-Polymerase wurde von Stratagene (Heidelberg) bezogen, Reverse Transkriptase von Roche Diagnostics (Mannheim) und Laktat-Dehydrogenase von Sigma (Deisenhofen). Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase und DNA-Phosphatase aus Kälberdarm waren von NEB (Schwalbach). Zur Reinigung von Plasmid-DNA und von PCR-Produkten wurden Kits von Quiagen (Hilden) verwendet. *Big Dye Terminator Mix* für die DNA-Sequenzierung wurde von Applied Biosystem (Weiterstadt) bezogen.

### 3.1.3 Sonstige Materialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Amicon (Witten), Eppendorf (Hamburg), Hampton Research (Laguna Hills, USA), Millipore (Eschborn), Quiagen (Hilden), Stratagene (Heidelberg) und BioRad (München) bezogen.

Zur elektronischen Datenverarbeitung wurden Rechner der Firmen Digital, Silicon Graphics, Evans & Sutherland und Apple sowie IBM-kompatible Personal Computer eingesetzt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle Medien, Lösungen und Arbeitsgeräte für Arbeiten mit Bakterien wurden vor und nach den Arbeiten autoklaviert, nicht autoklavierbare Lösungen vor Verwendung sterilfiltriert.

#### *Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)*

Da die Sequenzen der Gene, die in dieser Arbeit kloniert wurden, bekannt waren, wurden PCR-Reaktionen zur Amplifikation der Gene (Mullis & Faloona, 1987) und zur Einführung geeigneter Restriktionsschnittstellen mit spezifischen Primern durchgeführt (siehe 3.1.1). Als *template* wurde für hCGL cDNA humaner HepG2-Leberzellen (ATCC-Nr. HB-8065) verwendet. Für MalT wurden ganze *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen als *template* eingesetzt.

Reaktionsansätze von 25 bis 50  $\mu$ l Volumen enthielten 2.5 U PfuTurbo Polymerase (Stratagene, Heidelberg), PfuTurbo Reaktionspuffer (10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris/HCl pH 8,75, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 % Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA), *template* entsprechend 50-100 ng DNA, jeweils 5-15 pmol 5'- und 3'-Primer und je 250  $\mu$ M dATP, dTTP, dGTP, dCTP (für MalT zusätzlich: 5 % DMSO). Diese Ansätze wurden in einem RoboCycler Gradient 96 (Stratagene, Heidelberg) folgendem Temperaturprogramm unterworfen:

1x	1'30''	96 °C
	45''	47 bis 58 °C
	<i>n</i> x 2'	72 °C
28x	45''	96 °C
	45''	47 bis 58 °C
	<i>n</i> x 2'	72 °C
1x	45''	96 °C
	45''	47 bis 58 °C
	10'	72 °C

Dabei steht  $n$  für die Länge des zu amplifizierenden Gens in kb. Die geeignete Annealingtemperatur wurde in einem Gradientenblock mit einer Temperatur von 47 bis 58 °C experimentell bestimmt. Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick Kit (Quiagen, Hilden) gereinigt, oder durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe unten).

#### *Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten*

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8 bis 1,2 % Agarose (w/v) in kochendem TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, pH 8,0, 1 mM EDTA) für präparative Gele oder TBE-Puffer (90 mM Tris/Borsäure, pH 8,0, 2 mM EDTA) für analytische Gele gelöst. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (Molecular Probes Europe BV, Leiden; Endkonzentration 1 µg/ml) wurde die Agarose in der horizontalen Laufkammer (MPI für Biochemie, Eigenanfertigung) ausgeliefert. Die DNA-Proben wurden mit 6x Auftragspuffer versetzt und die Elektrophorese in TAE- bzw. TBE-Puffer bei 70 V durchgeführt.

6xAuftragspuffer: 30 % (v/v) Glycerin  
0,25 % (w/v) Xylencyanol FF  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

#### *DNA-Isolierung aus Gelen*

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Gelbereiche ausgeschnitten. Die Elution erfolgte elektrophoretisch bei 100 V für 1 h in einer Elektroelutionskammer (Biometra, Göttingen). Als Elektrodenpuffer wurde TBE-Puffer und zum Auffangen der eluierten DNA 5 M NaCl-Lösung mit 0,05 % (w/v) Bromphenolblau und 0,05 % (w/v) Xylencyanol FF verwendet. Die eluierte DNA wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 versetzt, durch Zugabe von absolutem Ethanol (Endkonzentration 70 % Ethanol) gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, und in Wasser aufgenommen.

#### *DNA-Sequenzierung*

Alle DNA-Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind unter 3.1.1 angegeben. Ansätze aus 4 µl *Big Dye* Terminator Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt; enthält thermostabile DNA-Polymerase sowie Desoxy- und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide), 3,5 pmol Primer und 0,6 µg *template*-DNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden in einem RoboCycler Gradient 96 (Stratagene, Heidelberg) 30 Zyklen folgender Temperaturschritte unterworfen: 96 °C 30 s, 48 °C 30 s, 60 °C 4 min. Die Reaktionsprodukte wurden mit Hilfe von Micro-Spin S-200 Säulchen (Pharmacia, Schweden) gereinigt und mit Ethanol gefällt. Die gelelektrophoretische



Auftrennung und fluoreszenzspektroskopische Analyse wurde von Marius Bociu (MPI für Biochemie, Martinsried) mit einem ABI Prism DNA-Sequenator (Model 373, Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

#### *Konzentrationsbestimmung von DNA*

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde absorptionsphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Messungen wurden mit verdünnten Lösungen im Bereich 0,1 bis 1,0 Absorptionseinheiten durchgeführt, und aus dem Absorptionswert mit folgender Formel die Konzentration berechnet:

$$c[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260} \frac{V}{k}$$

Dabei ist  $c$  die gesuchte Konzentration,  $V$  der Verdünnungsfaktor,  $A_{260}$  der Meßwert, und  $k$  ein nukleinsäureabhängiger Skalierungsfaktor: Für dsDNA ist  $k = 20$ , für ssDNA  $k = 30$  und für ssRNA  $k = 25$  einzusetzen.

#### *DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen*

Zur Charakterisierung von DNA oder zur Konstruktion neuer Plasmide wurden 0,1-2,0 µg DNA mit 0,1-2,0 U der entsprechenden Restriktionsendonukleasen (NEB, Schwalbach) in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern inkubiert. Die Spaltung erfolgte bei 37 °C, für die Inkubationszeit (je nach Enzym 2 bis 20 h) wurden die vom Hersteller empfohlenen Werte verwendet. Zur Kontrolle der Reaktion wurden die Ansätze auf einem Agarosegel elektrophoretisch analysiert.

#### *Dephosphorylierung von DNA*

Um die Religation von Vektoren zu verhindern, wurden die beim Restriktionsverdau entstandenen 5'-Phosphate abgespalten. Die Dephosphorylierung erfolgte enzymatisch mit 0,5 U DNA-Phosphatase (*calf intestine phosphatase*, CIP; NEB, Schwalbach) pro µg DNA im jeweiligen Restriktionspuffer oder in 10 µl 1x CIP-Puffer (NEB, Schwalbach) für 1 h bei 37 °C.

#### *Ligation von DNA-Fragmenten*

Die kovalente Verknüpfung zweier DNA-Fragmente erfolgte enzymatisch mit T4 DNA-Ligase (NEB, Schwalbach). Ligationsansätze enthielten Ligase-Puffer und T4 DNA-Ligase, sowie Vektor- und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis zwischen 1:1 und 1:6. Die Ligation erfolgte für 16 h bei 16 °C.

### *Präparation von Plasmid-DNA*

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse, gefolgt von SDS-Präzipitation und Anionenaustauschchromatographie durchgeführt, je nach benötigter DNA-Menge mit einem Mini- oder Maxi-Prep Kit (Quiagen, Hilden). Dazu wurden 2 ml (Mini-Prep) bzw. 100 ml (Maxi-Prep) einer Übernachtskultur abzentrifugiert. Die Präparation der Plasmid-DNA wurde wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. Das erhaltene DNA-Pellet wurde unter Vakuum (Vakuumkonzentrator, Bachhofer, Reutlingen) getrocknet und in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgenommen (Miniprep: 20 µl; Maxiprep: 200 µl).

### *Transformation kompetenter E.coli-Zellen*

a) *Elektroporation*: Elektrokompente Zellen der verwendeten *E. coli*-Stämme wurden nach der Vorschrift von Smith *et al.* (1991) hergestellt. Zur Transformation wurden 50 bis 150 ng DNA in Elektroporationsküvetten (BioRad, München) mit 40 µl elektrokompenten Zellen gemischt. Die Elektroporation wurde in einem Elektroporator 1000 (Stratagene, Heidelberg) bei 1650 V durchgeführt.

b) *Transformation chemisch kompetenter Zellen*: Chemisch kompetente Zellen der verwendeten *E. coli*-Stämme wurden mit der RbCl-Methode (Hanahan, 1983) hergestellt. 50 µl transformationskompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 10-200 ng Plasmid-DNA zugegeben und der Ansatz 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 s bei 42 °C inkubiert und anschließend 2 min in einem Eisbad gekühlt.

Transformierte Zellen wurden zur Expression des entsprechenden Resistenzgens 40 min in 800 µl LB-Medium bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf Mediumplatten oder in Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht inkubiert.

### *Plattenkulturen*

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) wurde mit 15 g/l Agar versetzt und autoklaviert. Für McConkey-Mal-Platten wurde M9-Medium mit 0,4 % (w/v) Maltose und 15 g/l McConkey-Agar verwendet. Nach dem Abkühlen auf ca. 45 °C wurde Ampicillin (Endkonzentration 200 µg/ml) bzw. Chloramphenicol (Endkonzentration 34 µg/ml) bzw. Kanamycin (Endkonzentration 25 µg/ml) bzw. Tetracyclin (Endkonzentration 10 µg/ml) zugegeben und das Medium in sterile Petrischalen gegossen. Die Platten wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Nach dem Ausplattieren von Bakterien wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

LB-Medium (1 l):	10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 10 g NaCl
M9-Medium:	48 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 22 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,6 mM NaCl 18,6 mM NH <sub>4</sub> Cl 2 mM MgSO <sub>4</sub> 0,1 mM CaCl <sub>2</sub>

### *Flüssigkulturen*

Zur Plasmidpräparation wurden 5 bis 100 ml große Kulturen (Falcon-Röhrchen bzw. 250 ml Schikanekolben) verwendet, für Proteinexpressionen 5 bis 12 l Kulturvolumen (2 l Schikanekolben mit je 500 ml Medium). LB- oder 2YT-Medium wurde in den Kolben autoklaviert. Die Ansätze wurden mit Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 bis 1:1000 angeimpft. Das benötigte Antibiotikum (Endkonzentrationen siehe Plattenkulturen) wurde dem Medium unmittelbar vor Gebrauch zugegeben. Die Kolben wurden mit 160 rpm geschüttelt, Temperatur und Inkubationsdauer sind beim jeweiligen Experiment angegeben.

LB-Medium:	siehe Plattenkulturen
2YT-Medium (1 l):	16 g Trypton 10 g Hefe-Extrakt 5 g NaCl

### *Glycerinkulturen*

0,85 ml einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Bakterienkultur wurden mit 150 µl einer 87 %igen, sterilen Glycerinlösung gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gelagert wurden die Glycerinkulturen bei -70 °C.

### *Klonierung und Expression von MalT*

#### *a) Expression in unlöslicher Form (in Einschlußkörpern)*

Das *malA*-Gen aus *E. coli*, das für MalT kodiert, wurde durch PCR mit spezifischen Primern und *E. coli*-Zellen als *template* vervielfältigt (siehe Abschnitt *PCR*). Das gereinigte PCR-Produkt wurde über die *NdeI* (5'-Ende) und *BamHI* (3'-Ende) Schnittstellen in die pET-Expressionsvektoren (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden) pET16b mit *His-tag* (pTHisMalT) und pET22b(+) ohne *His-tag* (pTMalT) hinter einen T7-Promotor kloniert. Die Expression wurde mit dem Konstrukt pTHisMalT in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium mit Ampicillin bei 37 °C. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,8 mit IPTG (Endkonzentration 1 mM), und die Zellen wurden nach Induktion für weitere 5 h bei 37 °C geschüttelt.

*b) Expression in löslicher Form*

Die Expression von MalT in löslicher Form wurde mit dem Konstrukt pOM2*malTp7* in *E. coli* MC4100Δ*malA157* durchgeführt. Zum Animpfen der Vorkultur wurde auf einer McConkey-Mal-Platte eine stark exprimierende Kolonie selektiert (weißer Rand um rotes Zentrum). Die Anzucht der Zellen erfolgte in 2YT-Medium mit Tetracyclin. Die Kulturen wurden nach dem Animpfen 17 h bei 24 °C geschüttelt, eine gezielte Induktion erfolgt bei diesem Konstrukt nicht.

*Expression von MalT-Domänen*

Zur Expression von MalT-Domänen wurden pARA-Konstrukte (pOM156=pARA::HDT2, pOM158=pARA::DT1-2H, pOM152=pARA::DT3; Danot, 2000) in *E. coli* MC4100Δ*malA157* bzw. pET-Konstrukte (pETDT1H, pETDT3-4; Danot, 2000) in *E. coli* BL21(DE3) verwendet (HDT2-3: pETHDT2-3 in *E. coli* BL21(DE3)pLysS). Die Anzucht erfolgte in LB-Medium mit Ampicillin (pOM152, pOM156, pOM158) bzw. Kanamycin (pETDT1H, pETDT3-4; pETHDT2-3: zusätzlich Chloramphenicol) bei 18 °C (pETHDT2-3) bzw. 25 °C (pETDT1H, pOM152) bzw. 37 °C (pOM156, pOM158, pETDT3-4). Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,8 mit Arabinose (pOM152, pOM156, pOM158; Endkonzentration 0,02 % (w/v)) bzw. IPTG (pETDT1H, pETHDT2-3, pETDT3-4; Endkonzentration 1 mM), und die Zellen wurden nach Induktion für weitere 5 h (pOM156, pOM158, pETDT1H, pETHDT2-3, pETDT3-4) bzw. 15 h (pOM152) bei der entsprechenden Temperatur geschüttelt.

*Klonierung und rekombinante Expression humaner CGL*

Die Klonierung des CTH-Gens für hCGL (Hs. 19904) gelang ausgehend von Gesamt-RNA aus HepG2-Leberzellen, die freundlicherweise von Dr. Peter Sondermann (MPI für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt wurde. 100 pmol Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primer und 25 µg der RNA wurden in einem 50 µl-Ansatz zur Synthese des ersten cDNA-Strangs verwendet. Die weiteren Komponenten und Bedingungen entsprachen den Empfehlungen des Lieferanten der Reversen Transkriptase (RT; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Das Produkt der RT-Reaktion wurden mit einem QIAquick Kit (Quiagen, Hilden) gereinigt. Synthese des zweiten cDNA-Strangs und Vervielfältigung des CTH-Gens erfolgte durch PCR (siehe Abschnitt *PCR*) mit spezifischen Primern (siehe 3.1.1) in einem 50 µl PCR-Ansatz und 5 µl des RT-Produkts als *template*. Abweichend von den Bedingungen, die im Abschnitt *PCR* angegeben sind, wurden 100 pmol Primer eingesetzt, und die 30 Temperaturzyklen waren

30 s 95 °C, 60 s 55 °C und 12 min 68 °C. Das PCR-Produkt wurde über die *NdeI* (5'-Ende) und *XhoI* (3'-Ende) Schnittstellen in den Vektor pET22b(+) (Novagen, Madison, USA) hinter einen T7-Promotor (pThCGL) und in den Vektor pCYB1 (NEB, Schwalbach) hinter einen Tac-Promotor (pChCGL) kloniert.

hCGL wurde mit dem Plasmid pThCGL im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) überexprimiert. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium mit Ampicillin bei 20 °C. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,8 mit IPTG (Endkonzentration 1 mM), und die Zellen wurden nach Induktion für weitere 12 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

### *Rekombinante Expression von tCGS*

Das *metB*-Gen aus *Nicotiana tabacum*, welches für CGS kodiert, wurde unter Kontrolle eines T7-Promotors im Vektor pET23c(+) (Plasmid pENCN1117; Clausen, 1999) in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium mit Ampicillin bei 37 °C. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,8 mit IPTG (Endkonzentration 1 mM), und die Zellen wurden nach Induktion für weitere 5 h bei 37 °C geschüttelt.

## **3.2.2 Proteinchemische Methoden**

### *Bestimmung von Proteinkonzentrationen*

#### *a) Absorptionsspektroskopie*

Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm im Absorptionsbereich 0,1 bis 1,0 bestimmt:  $A_{280} = \epsilon_{280} c d$

$A_{280}$  ist der Absorptionswert bei 280 nm,  $\epsilon_{280}$  der Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm,  $c$  die gesuchte Konzentration und  $d$  die Schichtdicke der Probe. Als Extinktionskoeffizienten wurden Näherungswerte verwendet, die aus der Anzahl der Tryptophane und Tyrosine im Protein berechnet werden können (Mach *et al.*, 1992):

$$\epsilon_{280} = (5540 * W + 1480 * Y) * \frac{1}{MW * cm}$$

Dabei bezeichnet  $W$  die Anzahl der Tryptophanreste,  $Y$  die Anzahl der Tyrosine und  $MW$  das Molekulargewicht. Für tCGS ergibt sich als Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280} = 2,03 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , für hCGL  $\epsilon_{280} = 3,05 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  und für DT3  $\epsilon_{280} = 7,04 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Für MalT wurde der experimentell bestimmte Wert  $\epsilon_{280} = 1,50 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Schreiber *et al.*, 2000) verwendet.

*b) Kolorometrie*

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford *et al.* (Bradford, 1976) bestimmt. Dazu wurde die Probe (0,5 µg bis 5 µg Protein) mit 200 µl Bradfordreagens (Biorad, München) versetzt, mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1ml aufgefüllt, nach 5 min Inkubation die Extinktion bei 595 nm gemessen und mit der Absorption einer Serie von Eichlösungen (BSA in Wasser) verglichen.

*Denaturierende Gelelektrophorese und Westernblotting*

Denaturierende SDS-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Laemmli *et al.* (1970) durchgeführt. Dazu wurden 10 %ige oder 12 %ige Polyacrylamid-Gele mit 5 %igem Sammelgel verwendet. Proteinproben wurden vor dem Auftragen 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 5 min gekocht. Die Elektrophorese wurde bei 150 V durchgeführt und die Gele anschließend 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte über Nacht in Entfärberlösung.

Probenpuffer (2x): 100 mM Tris/AcOH, pH 6,8

100 mM DTT

5 mM EDTA

20 % (v/v) Glycerin

0,04 % (w/v) Bromphenolblau

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)

Alternativ zur Anfärbung mit Coomassie-Blau wurden die in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine in einer *semi dry blot* Apparatur (BioRad, München) im Elektroblothing-Verfahren auf eine PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) übertragen. Ausgehend von der unten liegenden Anode wurden folgende Schichten übereinander gelegt:

- 6 Lagen 3MM-Filterpapier (Whatman, Maidstone, England) getränkt mit Anodenpuffer I (300 mM Tris pH ~10,4, 20 % (v/v) Methanol)
- 3 Lagen 3MM-Filterpapier getränkt mit Anodenpuffer II (25 mM Tris pH ~10 , 20 % (v/v) Methanol)
- 1 Lage PVDF-Membran (Porendurchmesser 0,45 µm) getränkt mit 60 % (v/v) Methanol, mit Wasser gewaschen
- das Gel
- 6 Lagen 3MM-Filterpapier getränkt mit Kathodenpuffer (25 mM Tris pH ~10 , 40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % (v/v) Methanol)

Die Proteine wurden durch Elektrophorese für 1,5 Stunden bei einem Stromfluß von 50 mA (ca. 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche) auf die PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde 2 min in Membranfärbelösung gefärbt und zur Entfärbung 5 min in Membranentfärber inkubiert.

Membranfärbelösung: 50 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva)

Membranentfärber: 30 % (v/v) Methanol

7 % (v/v) Eisessig

### *N-terminale Sequenzierung von Proteinen*

Gereinigte Proteine wurden auf PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) aufgetragen, ungereinigter Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE durch Blotting auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe *Western-Blotting*). Die Sequenzierung nach Edmann (Edman, 1970) wurde von Dr. K.-H. Mann (MPI für Biochemie, Martinsried) mit einem Applied Biosystems (Weiterstadt) Sequencer Model 492 durchgeführt.

### *Aufschluß von E. coli-Zellen nach Expression rekombinanter Gene*

*E. coli*-Zellen wurde nach der Proteinexpression zur Ernte 35 min bei 4 °C und 4200 rpm im JS4.2 Rotor (Beckmann, München) pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in 10 ml Aufschlußpuffer (bei der jeweiligen Reinigungsvorschrift angegeben) pro l Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 30 min mit 0,3 mg/ml Lysozym aus Hühnereiweiß bei Raumtemperatur inkubiert. DNA-Scherung und Komplettierung der Zell-Lyse wurden durch 3x 2 min Ultraschall-Behandlung (Microtip-Sonifier, Branson, Danbury, USA; 90 % der maximalen Ausgangsleistung, 60 % Zeitpulse) auf Eis erreicht. Das Lysat wurde 45 min bei 4 °C und 20000 rpm im JA25.50-Rotor (Beckmann, München) zentrifugiert. Alle folgenden Reinigungsschritte wurden bei 4 °C bzw. unter Eiskühlung durchgeführt.

### *Reinigung von MalT aus E. coli*

#### *a) native Reinigung*

Für die Reinigung von MalT wurde ein Protokoll von Danot & Raibaud (1994) modifiziert. Die Zellen mit löslich exprimiertem MalT wurden in Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 100 mM KCl, 10 % Saccharose) mit 0,5 mM PMSF aufgenommen und mit Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen (siehe oben). Der Überstand des Zellaufschlusses wurde mit 5 mM ATP versetzt und auf eine DEAE-Sephrose FF (Pharmacia, Freiburg) Anionentauschersäule (Bettvolumen 500 ml) aufgetragen, die mit Puffer A äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit Puffer A gespült und die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von 0 auf 1,0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in Puffer A eluiert. Die Fraktionen des MalT-Peaks (bei ca. 450 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) wurden über SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und auf 0,8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  eingestellt. Das Protein wurde auf eine Propylagarose (Sigma, Deisenhofen) HIC-Säule (Bettvolumen 100 ml) aufgetragen, die mit Puffer A + 0,8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  äquilibriert worden war. Gebundenes Protein wurde durch einen linearen Gradienten von 0,8 zu 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in Puffer A eluiert. Die MalT-Fraktionen (bei ca. 150 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) wurden durch SDS-PAGE identifiziert und mit 1 mM Magnesiumacetat und 0,1 mM EDTA versetzt. MalT wurde

unter Rühren durch schrittweise Zugabe von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bis zur Endkonzentration 1,65 M ausgefällt und durch Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C, 20 min, JA25.50-Rotor) pelletiert. Das Protein wurde in Puffer B (50 mM Tris/HCl, pH7,8, 0,3 M KCl, 1 mM Magnesiumacetat, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM ATP) + 0,5 mM ATP aufgenommen und 10 min bei 10000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf einer Sephacryl S200 HR Säule (Bettvolumen 300 ml) einer Gelfiltration in Puffer B unterworfen. Fraktionen mit reinem MalT wurden durch SDS-PAGE identifiziert, vereinigt, in Centricons 50 (Millipore, Eschborn) auf 8 mg/ml konzentriert, in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

*b) denaturierende Reinigung über Einschlußkörper*

Die Zellen der Expression wurden in Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 100 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerin) aufgenommen und mit Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen (siehe oben). Das Pellet des Zellaufschlusses wurde in Puffer A + 0,5 % N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid resuspendiert und erneut abzentrifugiert (20000 rpm, 4 °C, 20 min im JA25.50-Rotor). Das Waschen wurde mit Puffer A + 0,5 % N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid wiederholt, und anschließend zweimal mit Puffer A ohne Detergens. Die gereinigten Einschlußkörper wurden in 10 ml Puffer B (50 mM Tris, pH 7,8, 6 M Guanidiniumchlorid, 100 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerin, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) gelöst und auf eine NiNTA (Quiagen, Hilden) Affinitätssäule (Bettvolumen 50 ml) aufgetragen, die zuvor mit Puffer B äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit Puffer B gespült und die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von Puffer B auf 0,5 M Imidazol in Puffer A + 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol eluiert. Die Fraktionen des MalT-Peaks (bei ca. 300 mM Imidazol) wurden über SDS-PAGE identifiziert, vereinigt, in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

*Reinigung einzelner und kombinierter Domänen von MalT aus E. coli*

Für die Konstrukte DT1H, DT1-2H, HDT2, HDT2-3 mit N-terminalem His-tag sowie DT3 und DT3-4 (ohne His-tag) wurde als erster Reinigungsschritt eine Affinitätschromatographie an einer NiNTA-Säule durchgeführt. Die Fraktionen wurden bei allen Konstrukten durch SDS-PAGE analysiert. HDT2 wurde unter denaturierenden Bedingungen gereinigt, die Chromatographie auf NiNTA ist daher gesondert beschrieben. Für die einzelnen Konstrukte wurden verschiedene Puffer A verwendet, sie sind beim jeweiligen Konstrukt angegeben, ebenso wie die jeweilige weitere Behandlung des entsprechenden Proteins.

Die Zellen der Expression wurden in Puffer A + 0,5 mM PMSF aufgenommen und mit Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen (s. oben). Der Überstand wurde auf eine NiNTA-Säule (Quiagen, Hilden; Bettvolumen 50 ml) aufgetragen, die mit Puffer A äquilibriert



worden war. Die Säule wurde mit Puffer A gewaschen, die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von 0 auf 0,5 M Imidazol in Puffer A eluiert, und die Fraktionen des DTn-Peaks (DT3 und DT3-4 bei ca. 25 mM Imidazol; DT1H, DT1-2H und HDT2-3 bei ca. 150 mM Imidazol) vereinigt.

a) *Domäne 1*: Das Protein wurde mit 0,05 mM AMP-PNP versetzt, in Centricons 10 auf 15 mg/ml konzentriert und über eine NAP-Säule (Pharmacia, Freiburg) umgepuffert auf Puffer B (50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM EDTA, 0,1 mM AMP-PNP) bzw. Puffer C (50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 200 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM EDTA, 5 mM ADP). Das Protein wurde in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

Puffer A: 50 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7,0; beim Waschen der NiNTA-Säule Wechsel auf 50 mM Tris, pH 7,8  
0,5 M KCl  
1 mM  $\text{MgCl}_2$   
0,1 mM EDTA  
10 % (w/v) Saccharose  
0,1 mM ATP

b) *Domäne 2*: Die Zellen der Expression wurden in Puffer A + 0,5 mM PMSF aufgenommen und mit Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen (s. oben). Nach Zugabe von 2 % (w/v) Natriumdeoxycholat wurde 20 min ( $4^\circ\text{C}$ , 20000 rpm, JA25.50-Rotor) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer A + 2 % (w/v) Natriumdeoxycholat resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet in Puffer A + 0,6 % (w/v) Sarkosyl gelöst und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (10 min,  $4^\circ\text{C}$ , 20000 rpm, JA25.50-Rotor). Der Überstand wurde auf eine NiNTA-Säule (Quiagen, Hilden; Bettvolumen 50 ml) aufgetragen, die zuvor mit Puffer A + 0,6 % (w/v) Sarkosyl äquilibriert wurde. Die Säule wurde mit Puffer A + 0,6 % (w/v) Sarkosyl gewaschen die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von 0 auf 0,5 M Imidazol in Puffer A + 0,6 % (w/v) Sarkosyl eluiert. Die Fraktionen des HDT2-Peaks (bei ca. 150 mM Imidazol) wurden vereinigt, mit Puffer B (50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 500 mM KCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 20 % Glycerin) auf 0,03 % Sarkosyl verdünnt und zweimal gegen das zehnfache Volumen Puffer B dialysiert. Das Protein wurde in Centricons 10 (Millipore, Eschborn) auf ca. 10 mg/ml konzentriert, über eine NAP-Säule (Pharmacia, Freiburg) auf Puffer C (50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 200 mM KCl, 5 mM DTT) umgepuffert, in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 7,7  
500 mM KCl  
10 % (w/v) Saccharose

c) *Domäne 3*: Das Protein wurde mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,7, 10 % (w/v) Saccharose 1:5 verdünnt und auf eine DEAE-Sepharose FF (Pharmacia, Freiburg) Anionentauschersäule (Bettvolumen 300 ml) aufgetragen, die zuvor mit Puffer B (50 mM Tris/HCl, pH 7,7, 100 mM KCl, 10 % (w/v) Saccharose) äquilibriert wurde. Die Säule wurde mit Puffer B gespült und die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von 0 auf 1,0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in Puffer B eluiert. Die Fraktionen mit reinem DT3 (bei ca. 450 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) wurden vereinigt, in Centricons 10 (Millipore, Eschborn) auf ca. 12 mg/ml konzentriert, über eine NAP-Säule (Pharmacia, Freiburg) auf Puffer C (50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 100 mM KCl, 400 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 % (w/v) Saccharose) bzw. Puffer D (10 mM Tris/HCl, pH 7,8) umgepuffert, in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren und bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 7,7  
500 mM KCl  
10 % (w/v) Saccharose  
1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

d) *Domänen 1-2*: Das angereicherte Protein aus der Affinitätschromatographie wurde in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren und bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 7,7  
100 mM KCl  
10 % (w/v) Saccharose

e) *Domänen 2-3*: Das Protein wurde mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,7, 10 % (w/v) Saccharose 1:5 verdünnt und auf eine DEAE-Sepharose FF (Pharmacia, Freiburg) Anionentauschersäule (Bettvolumen 300 ml) aufgetragen, die mit Puffer B (50 mM Tris/HCl, pH 7,7, 100 mM KCl, 10 % (w/v) Saccharose) äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit Puffer B gespült und die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von 0 auf 1,0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in Puffer B eluiert. Die Fraktionen mit reinem DT2-3 (bei ca. 600 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) wurden vereinigt, in Centricons 30 (Millipore, Eschborn) auf ca. 5 mg/ml konzentriert, in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren und bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 7,7  
500 mM KCl  
10 % (w/v) Saccharose  
10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

f) *Domänen 3-4*: Das Protein wurde in Centricons 30 (Millipore, Eschborn) auf ca. 10 mg/ml konzentriert und über eine NAP-Säule (Pharmacia, Freiburg) umgepuffert auf Puffer B (50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 100 mM KCl, 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 % (w/v) Saccharose). Das Protein wurde in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren und bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 7,7  
500 mM KCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 % (w/v) Saccharose

### *Reinigung rekombinanter hCGL*

#### *a) native Reinigung*

Die Zellen der hCGL-Expression wurden in 50 mM KP<sub>i</sub>, pH 8,0, 0,5 mM PLP, 2 mM EDTA aufgenommen und mit Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen (siehe oben). Der Überstand des Zellaufschlusses wurde auf eine DEAE-Sepharose FF (Pharmacia, Freiburg) Anionentauschersäule (Bettvolumen 300 ml) aufgetragen, die mit Puffer A (20 mM KP<sub>i</sub>, pH 8,0, 0,1 mM PLP, 2 mM EDTA) äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit Puffer A gespült und die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von 0 auf 0,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Puffer A eluiert. Die Fraktionen des hCGL-Peaks (bei ca. 0,1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wurden über SDS-PAGE und Aktivitätstests identifiziert, vereinigt und auf 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingestellt. Das Protein wurde auf eine Phenylsepharose HP (Pharmacia, Freiburg) HIC-Säule (Bettvolumen 100 ml) aufgetragen, die mit Puffer A + 1,0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> äquilibriert worden war. Gebundenes Protein wurde durch einen linearen Gradienten von 1,0 zu 0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Puffer A eluiert. Die hCGL-Fraktionen (bei ca. 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wurden durch SDS-PAGE und Aktivitätstests identifiziert, vereinigt und durch Ultrafiltration in einer Amicon-Zelle (30 kDa MWCO; Millipore, Eschborn) konzentriert. Das Protein wurde auf einer Sephacryl S200 HR Säule (Bettvolumen 300 ml) einer Gelfiltration in 20 mM KP<sub>i</sub>, pH 8,0, 10 μM PLP unterworfen. Fraktionen mit reiner hCGL wurden durch SDS-PAGE und Aktivitätstests identifiziert, vereinigt, in Centricons 30 (Millipore, Eschborn) auf ca. 20 mg/ml konzentriert, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Das Protein konnte unter diesen Bedingungen für mindestens ein Jahr ohne Verlust der katalytischen Aktivität gelagert werden.

#### *b) denaturierende Reinigung*

Die Zellen der hCGL-Expression wurden in 50 mM KP<sub>i</sub>, pH 8,0, 0,5 mM PLP, 2 mM EDTA aufgenommen und mit Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen (siehe oben). Das Pellet des Zellaufschlusses wurde in Puffer A (50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,8, 300 mM NaCl) + 0,5 % N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid resuspendiert, 15 min sonifiziert (Branson, Danbury, USA; Macrotip, 80 % Pulse, 80 % der maximalen Ausgangsleistung) und abzentrifugiert (20 min, 20000 rpm, 4 °C, JA25.50-Rotor). Das Waschen wurde nochmals mit Puffer A + 0,5 % N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid wiederholt, und anschließend zweimal mit Puffer A ohne Detergens. 150 mg der gereinigten Einschlußkörper wurden in 10 ml Puffer B (100 mM Tris,

pH 8,5, 6 M Guanidiniumchlorid, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20  $\mu$ M PLP, 5 mM DTT) gelöst und über Nacht in 500 ml Puffer C (100 mM Tris, pH 8,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20  $\mu$ M PLP, 5 mM DTT) eingetroffen. Die Lösung wurde drei mal gegen 4 l (a) 100 mM Tris, pH 8,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20  $\mu$ M PLP; (b) 100 mM Tris, pH 8,5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10  $\mu$ M PLP; (c) 20 mM Tris, pH 8,5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10  $\mu$ M PLP dialysiert. Die Lösung wurde anschließend auf eine DEAE-Sepharose FF (Pharmacia, Freiburg) Anionentauschersäule (Bettvolumen 500 ml) aufgetragen, die mit Puffer D (20 mM Tris, pH 8,5, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10  $\mu$ M PLP) äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit Puffer D gespült und die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von 0 auf 0,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in Puffer D eluiert. Die Fraktionen des hCGL-Peaks (bei ca. 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) wurden über SDS-PAGE identifiziert, vereinigt, in Centricons 30 (Millipore, Eschborn) auf ca. 10 mg/ml konzentriert, in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

#### *Reinigung rekombinanter tCGS*

Die Zellen der tCGS-Expression wurden in Puffer A (100 mM Tris/HCl, pH 7,9, 10  $\mu$ M PLP, 2 mM EDTA, 2 mM DTT) mit 2 mM PMSF aufgenommen und mit Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen (siehe oben). Der Überstand des Zellaufschlusses wurde auf eine DEAE-Sepharose FF (Pharmacia, Freiburg) Anionentauschersäule (Bettvolumen 500 ml) aufgetragen, die mit Puffer A äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit Puffer A gespült und die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von 0 auf 0,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in Puffer A eluiert. Die Fraktionen des tCGS-Peaks (bei 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) wurden über SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und auf 1,0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  eingestellt. Das Protein wurde auf eine Phenylsepharose HP (Pharmacia, Freiburg) HIC-Säule (Bettvolumen 75 ml) aufgetragen, die mit Puffer A + 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  äquilibriert worden war. Gebundenes Protein wurde durch einen linearen Gradienten von 1,0 zu 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in Puffer A eluiert. Die tCGS-Fraktionen (bei 250 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) wurden durch SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und durch Ultrafiltration in einer Amicon-Zelle (30 kDa MWCO; Millipore, Eschborn) konzentriert. Das Protein wurde auf einer Sephacryl S200 HR Säule (Bettvolumen 300 ml) einer Gelfiltration in 10 mM Tris/HCl, pH 7,9, 10  $\mu$ M PLP unterworfen. Fraktionen mit reiner tCGS wurden durch SDS-PAGE identifiziert, vereinigt, in Centricons 30 (Millipore, Eschborn) auf ca. 10 mg/ml konzentriert, in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

### *Aktivitätstest für tCGS*

Die Aktivität der tCGS wurde über die Bestimmung von freigesetztem Phosphat (aus dem Substrat Homoserinphosphat) nach der Methode von Lanzetta *et al.* (Lanzetta *et al.*, 1979) getestet. Der Aktivitätstest wurde in Ansätzen zu 300 µl mit 100 mM MOPS, pH 7,5, 0,1 mM PLP, 1 mM L-Cystein, 7,5 mM Homoserinphosphat durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,4 µg tCGS in 10 mM Tris/HCl, pH 7,8, 10 µM PLP gestartet. Jeweils nach 1 min, 2,5 min, 4 min, 5,5 min und 7 min wurden 50 µl des Ansatzes mit 500 µl Phosphatreagens (0,033 % (w/v) Malachitgrün, 1,05 % (w/v) Ammoniumheptamolybdat, 0,02 % (v/v) Tween 80) abgestoppt und nach 1 min mit 100 µl 34 %iger Trinatriumcitratlösung versetzt. Nach 60 min Inkubation der abgestoppten Reaktion bei 20 °C wurde die Absorption bei 660 nm bestimmt. Die Phosphatfreisetzung pro Minute wurde durch Auftragung der Absorptionswerte gegen die Reaktionszeit und anschließende lineare Regression bestimmt. Eine Eichkurve wurde mit Reaktionen erstellt, zu denen zum Starten der Reaktion an Stelle von tCGS 0-20 nmol  $KP_i$ , pH 7,5 zugegeben wurden.

Zum Testen potentieller Inhibitoren wurden Reaktionsansätze vor dem Starten der Reaktion mit verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden Substanz (erster Test: jeweils 1 mM) versetzt, und die Aktivität wie oben angegeben bestimmt.

### *Aktivitätstest für hCGL*

Die hCGL-Aktivität wurde mit einem kolorimetrischen Test bei 30 °C bestimmt (Uren, 1987). Reaktionsansätze von 1 ml Gesamtvolumen enthielten 985 µl 40 mM Boratpuffer mit Cystathionin-Konzentrationen zwischen 3,0 und 0,03 mM, 10 µl 0,1 M DTNB in Ethanol und 5 µl hCGL (6 mg/ml). Das pH-Optimum wurde durch Verwendung verschiedener Boratpuffer zwischen pH 7,8 und 9,4 zu pH 8,2 bestimmt, und alle weiteren Kinetiken wurden bei diesem pH-Wert durchgeführt. Nach Starten der Reaktion durch Enzymzugabe wurde für 1 min der lineare Anstieg der Absorption bei 412 nm spektrophotometrisch verfolgt. Die Daten wurden in reziproker Form nach Eadie und Hofstee (Eadie, 1942; Hofstee, 1959) ausgewertet.

Zur Bestimmung der Substratspezifität wurde das Cystathionin durch L-Cystein bzw. L-Cystin ersetzt. L-Cystein-Konzentrationen wurden auch nach der unten angegebenen Methode bestimmt, und die Umsetzung von L-Cystin wurde zusätzlich durch einen gekoppelten enzymatischen Test mit Laktat-Dehydrogenase über die Detektion der Oxidation von NADH verfolgt (Flavin & Slaughter, 1964).

Die Bildung des Produkts L-Cystein wurde nach der Methode von Gaitonde *et al.* (1967) bestimmt. Dazu wurden aus Reaktionsansätzen, bestehend aus 995 µl 40 mM Boratpuffer,

pH 8,2 mit Cystathionin-Konzentrationen zwischen 3,0 und 0,03 mM und 5 µl hCGL (6 mg/ml), 80 µl-Proben entnommen und die Reaktion mit 30 µl 20 %iger TCA abgestoppt. 80 µl der abgestoppten Reaktion wurden mit gleichen Teilen Essigsäure und Ninhydrinreagens (250 mg Ninhydrin gelöst in 6 ml Essigsäure und 4 ml HCl) gemischt, 10 min gekocht und mit 1 ml 95 %igem Ethanol verdünnt. Cystein-Konzentrationen wurden spektroskopisch bei 560 nm ( $\epsilon_{560}(\text{Cys}) = 2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) bestimmt. Die Linearität des Verhältnisses Signal zu Cystein-Konzentration wurde durch eine Referenzkurve mit bekannten Cystein-Konzentrationen überprüft. Unter den angegebenen Bedingungen ergeben L-Homocystein und L-Cystin kein Signal.

*a) Inhibition durch Propargylglycin (PG) und Trifluoralanin (F<sub>3</sub>Ala)*

Reaktionsansätze enthielten eine sättigende Konzentration an L-Cystathionin (2,5 mM) in 40 mM Boratpuffer, pH 8,2 und wurden auf 37 °C temperiert. Reaktionen wurde durch Zugabe von 16 µM hCGL gestartet, die mit verschiedenen Konzentrationen an Inhibitor (D,L-PG: 1-167 µM; L-F<sub>3</sub>Ala: 0,1-0,5 mM) vorinkubiert worden war. Die Reaktionen wurde 1 min durch den DTNB-Assay verfolgt und so die Restaktivitäten nach verschiedenen Zeiten bestimmt. Für F<sub>3</sub>Ala wurden daraus Halbwertszeiten für die Inaktivierung bestimmt, die in einem Kitz-Wilson-Plot (Kitz & Wilson, 1962) analysiert wurden. Für PG wurden die normalisierten Restaktivitäten gegen das Verhältnis Inhibitor/Enzym-Aktivzentren aufgetragen.

*b) Inhibition durch Aminoethoxyvinylglycin (AVG)*

Die Inhibition von hCGL durch AVG wurde mit dem DTNB-Assay in Reaktionen von 30 min Dauer beobachtet. Reaktionsansätze enthielten eine sättigende Konzentration an L-Cystathionin (2,5 mM) in 40 mM Boratpuffer, pH 8,2 und verschiedenen Konzentrationen an L-AVG (0,1 bis 400 µM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 34 nM CGL gestartet. Die Absorptionskurven bei 412 nm wurden nach Cha (Cha, 1975; Cha, 1976), Morrison (1982) und Morrison & Walsh (1988) analysiert (siehe Resultate).

*Aktivitätstest für Transkriptionsaktivierung durch MalT*

MalT wurde 15 min bei 30°C in 18 µl 40 mM Hepes/KOH, pH 8,0, 10 mM Tris/HCl, pH 7,7, 33 mM Trikaliumcitrat, 12 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT, 100 µg/ml acetyliertes Rinderserumalbumin, 16,7 µM ATP und 1,67 mM Maltotriose vorinkubiert. 2 µl RNA-Polymeraselösung (0,54 µM in 40 mM Hepes/KOH, pH 8,0, 33 mM Trikaliumcitrate, 1 mM DTT, 100 µg/ml acetyliertes Rinderserumalbumin) wurde zugegeben und der Ansatz 10 min

bei 30 °C inkubiert. Die Synthese von ApApC wurde durch Zugabe von 2 µl einer Lösung von 5 mM ApA, 0,5 mM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-CTP (0,3 Ci/mmol; Amersham, Braunschweig) und 500 µg/ml Heparin (Sigma, Deisenhofen) gestartet. Der Reaktionsansatz wurde weitere 15 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels Chromatographie auf Whatman (Maidstone, England) 3MM-Papier (Laufmittel: 3,0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 % (v/v) 2-Propanol, 5 mM EDTA) von freiem [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-CTP abgetrennt. Die Menge an gebildetem ApApC wurde mit einem PhosphorImager quantifiziert.

#### *Immobilisierung von MalY und Interaktionsexperimente*

Für die Immobilisierung von MalY wurden 2,5 ml N-Hydroxysuccinimid-aktivierte Agarose (Affigel 10; Bio-Rad, München) in eine leere NAP-Säule (Pharmacia Biotech, Schweden) gefüllt. Die Agarose wurde mit Wasser gewaschen und mit Bindungspuffer (20 mM Mops/NaOH, pH 6,8, 300 mM NaCl) äquilibriert. MalY in Bindungspuffer (1,7 ml, 26 mg/ml) wurde zugegeben, und das Material 4 h bei 4 °C *end-over-end* rotiert. Das Material wurde mit Bindungspuffer gewaschen und freie Bindungsstellen mit 1 M Ethanolamin/HCl, pH 7,5, abgesättigt (1 h bei 20 °C *end-over-end* rotiert). Das Säulenmaterial wurde mit Bindungspuffer gewaschen, mit 0,2 % NaN<sub>3</sub> versetzt und bei 4 °C gelagert. Für die Herstellung einer *Dummy*-Säule wurden 2,5 ml Affigel 10 wie oben beschrieben behandelt, jedoch ohne den MalY-Bindungsschritt, d.h. das aktivierte Material wurde sofort mit Ethanolamin abgesättigt.

Vor Affinitätsexperimenten wurde die Aktivität des immobilisierten MalY-Proteins durch den Aktivitätstest nach Uren (Uren, 1987) überprüft. Alle Interaktionsexperimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Säulenmaterial wurde mit Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 0,3 M KCl, 10 % (w/v) Saccharose, 1 mM Magnesiumacetat, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM ATP) äquilibriert. Die zu testende Proteinprobe wurde aufgetragen und 10 min auf dem Säulenmaterial inkubiert. Die Säule wurde mit 10 ml Puffer A gewaschen und dabei Fraktionen à 2 ml gesammelt. Gebundenes Protein wurde mit 8 ml Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2 M KCl) eluiert und wiederum Fraktionen à 2 ml gesammelt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

#### *Dynamische Lichtstreuungsexperimente (Dynamic Light Scattering, DLS)*

Für dynamische Lichtstreuexperimente wurde ein „DynaPro“ *Light Scattering* System (Protein Solutions, Charlottesville, USA) verwendet. Das Protein wurde zu einer Konzentration von etwa 1 mg/ml im jeweiligen Puffer verdünnt und vor Meßbeginn das

Probenvolumen (20  $\mu$ l) filtriert (0,1  $\mu$ m Porengröße), um Aggregate und Staubpartikel zu entfernen. Die Auswertung der Messdaten erfolgt mit den Programmen Dynamics und DynaLS (Protein Solutions, Charlottesville, USA).

### 3.2.3 Kristallographie und Strukturbestimmung

#### *Kristallisation*

Alle Kristallisationsexperimente wurden im Dampfdiffusionsverfahren durchgeführt, bei dem es in einem abgeschlossenen Raum über die Gasphase zur Gleichgewichtseinstellung zwischen zwei Lösunsvolumina kommt (Übersichtsartikel: McPherson, 1982). Die Kristallisationsexperimente wurden in CrysChem-Platten (Charles Supper Company, Natick, USA) mit CrystalClear-Abdeckung (Hampton, Laguna Hills, USA) in sitzenden Tropfen bzw. Linbro-Platten (ICN, Eschwege) mit silikonisierten Glasdeckgläschen (Hampton, Laguna Hills, USA) in hängenden Tropfen bzw. Plexiglasschalen (3 cm hoch, 7,5 cm Durchmesser) mit Plexiglasbänkchen in sitzenden und hängenden Tropfen in einem Ansatz durchgeführt. Die Linbro-Ansätze wurden mit Silikonfett (Wacker, München) abgedichtet. Die Plexiglasbänkchen wurden mit Silikonfett behandelt, um ein Zerlaufen der Tropfen zu verhindern, und die Plexiglasschalen wurden mit Klebeband abgedichtet. Das Volumen der Reservoirlösung betrug in CrysChem- und Linbro-Platten je 500  $\mu$ l, in den Plexiglasschalen 5 ml. Für die Kristallisation geeignete Reservoirlösungen wurden nach dem *incomplete factorial* Ansatz (Carter & Carter, 1979) (Suche im vieldimensionalen Raum der Lösungszusammensetzung durch gleichmäßig gestreute Stichproben) mit kommerziell erhältlichen faktoriellen *Screens* (Hampton, Laguna Hills, USA) und einem abteilungseigenen *Screen* ermittelt. Dabei wurden auch Temperatur (4 °C, 18 °C und 30 °C), Größe der Kristallisationstropfen (2 bis 9  $\mu$ l Gesamtvolumen) und das Verhältnis von Proteinlösung zu Reservoirlösung (zwischen 1:2 und 2:1) variiert. Geeignete Bedingungen wurden durch systematische Variation dieser Parameter, der Proteinkonzentration und der Reservoirzusammensetzung sowie durch Zugabe von zusätzlichen Substanzen (Additiven; z.B. weitere Salze, Aminosäuren, Glycerin *etc.*) optimiert. Für die Kristallisation von tCGS zur Lösung von Inhibitor-Komplex-Strukturen wurden außerdem nach der Methode des *Microseedings* Kristalltrümmer als Kristallisationskeime in die Tropfen eingebracht. Die jeweils geeigneten und optimierten Kristallisationsbedingungen sind für die verschiedenen Kristallisationen getrennt aufgeführt.



*Aufnahme und Auswertung von Röntgendiffraktionsdaten*

Für Messungen bei Raumtemperatur wurden die Kristalle mit einem geeigneten Erntepuffer (meist Reservoirlösung) überschichtet und in silikonisierten Quarzkapillaren (Mark-Röhrchen, W. Müller, Berlin) montiert. Zum Silikonisieren wurden die Kapillaren 10 min in PrepSil (Pharmacia, Freiburg) eingelegt, mit Wasser gewaschen und 3 h bei 180 °C getrocknet. Kristalle wurden in der Kapillare mit *Paper Wicks* (Long X-Fine; Hampton Research, Laguna Hills, USA) bis auf ein vom Kristall getrenntes Lösungsmittelreservoir trockengelegt und die Kapillare mit Dentalwachs (Harvard-Dental-GmbH, Berlin) verschlossen. Für die Messungen bei 100 K an einer Cryostat-Anlage (Oxford Cryosystems, Oxford, England) wurden DT3 Kristalle in 50 mM MES/NaOH, pH6,0, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30 % (v/v) Glycerin inkubiert, um durch das zusätzliche Glycerin die Bildung von Eiskristallen zu verhindern. Die Kristalle wurden dann in *Cryo-Loops* (Hampton Research, Laguna Hills, USA) im Strahlengang montiert.

Diffractionsdaten wurden auf einem *image plate*-Detektor (MAR Research, Hamburg) unter Verwendung monochromatischer CuK $\alpha$ -Strahlung (Graphit-Monochromator,  $\lambda=1,5418$  Å) von einem rotierenden Drehanoden-Röntgenstrahlgenerator RU200 (Rigaku, Tokyo, Japan) gesammelt. Die Belichtungszeiten pro Bild lagen zwischen 10 und 25 min, der Drehwinkel bei 1,0° (tCGS und tCGS-Inhibitor Komplexe) bzw. 1,2° (DT3) pro Bild. Hochaufgelöste Daten (nativer Datensatz DT3) wurden unter Verwendung von Synchrotronstrahlung an der *Wiggler-Beamline* BW6 des HASYLAB (Deutsches Elektronensynchrotron, Hamburg) mit einem MAR Research (Hamburg) CCD-Detektor aufgenommen. Die Belichtungszeit pro Bild betrug 100 s, der Drehwinkel 0,5°. Die Bestimmung des idealen Meßbereichs sowie geeigneter Belichtungszeiten und Drehwinkel erfolgte mit MOSFLM (Leslie, 1990).

Indizierung, Bestimmung der Kristallorientierung und Integration der Diffractionsdaten wurden mit den Programmen DENZO (Otwinowski & Minor, 1993) oder MOSFLM (Leslie, 1990) durchgeführt, Datenreduktion und Datenskalisierung mit SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1993) oder SCALA (Evans, 1997). Zur Bestimmung der Punktsymmetrie der jeweiligen Raumgruppe wurden die Ausgabedaten aus DENZO (Otwinowski & Minor, 1993), MOSFLM (Leslie, 1990) und SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1993) verwendet, zur Bestimmung von Schraubenachsen wurden die Strukturfaktoramplituden mit SCALEPACK und durch direkte Analyse auf systematische Auslöschungen untersucht.

*Berechnung von Elektronendichten und Mittelung im direkten Raum*

Elektronendichten wurden mit FFT (CCP4, 1979), XPLOR (Brünger, 1992b) oder CNS (Brünger *et al.*, 1998) berechnet und gegebenenfalls mit MapMan (Kleywegt & Jones, 1996b) konvertiert.  $2F_o-F_c$ -omit-Elektronendichten (DT3) wurden mit CNS (Brünger *et al.*, 1998) berechnet, wobei jeweils 10 % des Inhalts der asymmetrischen Einheit (AU) bei der Berechnung der  $F_c$  weggelassen wurden. Zur Mittelung von Elektronendichten im direkten Raum (tCGS-Struktur und tCGS-Inhibitor Komplexe) wurde das Programm AVE (Jones, 1992) verwendet. Die benötigten Molekülmasken wurden mit MaMa (Kleywegt & Jones, 1993) erzeugt, und die nichtkristallographischen Symmetrieoperatoren wurden mit LSQMan (Kleywegt & Jones, 1994) bestimmt.

*Modellbau und -verfeinerung*

Strukturmodelle wurden mit dem Programm O (Jones & Kjølgaard, 1991) in  $2F_o-F_c$  und  $F_o-F_c$  Elektronendichten gebaut. Für die tCGS-Struktur (8 Monomere in der AU) und die tCGS-Inhibitor Komplexe (12 Monomere in der AU) wurden die entsprechenden gemittelten Dichten verwendet (siehe *Mittelung im direkten Raum*), für DT3 wurden zusätzlich mit CNS (Brünger *et al.*, 1998) berechnete  $2F_o-F_c$ -omit-Elektronendichten (10 % des AU-Inhalts wurden weggelassen) verwendet. Die Verfeinerung der Modelle wurde mit XPLOR (Brünger, 1992b) (tCGS-Struktur und tCGS-Inhibitor Komplexe) bzw. CNS (Brünger *et al.*, 1998) (DT3) durchgeführt, unter Verwendung der Parameter von Engh & Huber (Engh & Huber, 1991). Parameter für Cofaktoren, Inhibitoren und Liganden wurden, soweit nicht mit XPLOR oder CNS mitgeliefert, mit XPLO2D (Kleywegt, 1995) erzeugt. Strukturmodelle wurden durch *rigid body*-Rechnungen sowie *simulated annealing*-Rechnungen (DT3) und *conjugate gradient*-Energiminimierungen (tCGS-Struktur, tCGS-Inhibitor Komplexe, DT3) verfeinert. Die Verfeinerungen wurden mit dem kristallographischen R-Faktor (tCGS-Struktur und tCGS-Inhibitor Komplexe) bzw. einer *maximum likelihood*-Funktion (DT3; Verfeinerung gegen MIR-Daten: CNS *mlhl*-Funktion; Verfeinerung gegen hochaufgelöste native Daten: CNS *mlf*-Funktion) als Zielfunktion durchgeführt. Die geeignete relative Gewichtung von experimentellen Daten und Strukturparametern wurde in XPLOR mit *weight.inp* (Brünger, 1992b) bestimmt, in CNS wurde die automatische Bestimmung durch das entsprechende Protokoll verwendet. Um eine Überfittung der Daten zu vermeiden, wurde der Verlauf der Verfeinerung über einen freien R-Faktors ( $R_{\text{free}}$ ) kreuzverifiziert (Brünger, 1992a). Dazu wurden 5 % (tCGS-Struktur und tCGS-Inhibitor Komplexe) bzw. 10 % der Strukturparametern (DT3) nicht für die Verfeinerung eingesetzt und mit diesen Daten der  $R_{\text{free}}$  berechnet. Nach

dem Erreichen von R-Faktoren von ca. 30 % wurden in jedem Verfeinerungszyklus zusätzlich individuelle isotrope Debye-Waller-Faktoren verfeinert. Weitere Details der Strukturverfeinerung sind für die einzelnen Strukturen gesondert angegeben.

#### *Geometrische Analyse und graphische Darstellung von Atommodellen*

Die Analyse der Debye-Waller-Faktoren sowie der geometrischen Parameter wie Bindungslängen, Bindungswinkel und dihedrale Winkel erfolgte mit XPLOR (Brünger, 1992b), CNS (Brünger *et al.*, 1998), MoleMan (Kleywegt & Jones, 1996a) und ProCheck (Laskowski *et al.*, 1993). Sekundärstrukturelemente wurden durch Analyse der Wasserstoffbrückenmuster und der  $\phi, \psi$ -Torsionswinkel mit DSSP (Kabsch & Sander, 1983) bestimmt. Die Analyse der NCS-verwandten Moleküle der tCGS-Struktur und der tCGS-Inhibitor Komplexe erfolgte mit LSQMan (Kleywegt & Jones, 1994).

Abbildungen von Proteinstrukturen wurden mit SETOR (Evans, 1993) oder Molscript (Kraulis, 1991) und Raster3D (Merrit & Murphy, 1994) erzeugt. Moleküloberflächen wurden mit dem Programm GRASP berechnet und dargestellt. Schematische Darstellungen wurden mit ChemDraw Pro 5.0 (CambridgeSoft Corp., Cambridge, USA) oder Isis/Draw 2.1.3 (MDL Information Systems, Köln) erstellt. Der lösungsmittelzugängliche Oberflächenbereich von DT3 und die Größe des Protein/Protein-Interaktionsbereichs wurden mit NAccess (Hubbard *et al.*, 1991) berechnet. Die physikalischen Eigenschaften des Protein/Protein-Interaktionsbereichs wurden mit Hilfe des Protein/Protein-Interaktions-Servers analysiert (Jones & Thornton, 1995) (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PP/server/>). Der Vergleich der dreidimensionalen Struktur von DT3 mit den Strukturen der *Protein Data Bank* (Berman *et al.*, 2000) wurde mit dem DALI-Server (Holm & Sander, 1993) des *European Bioinformatics Instituts* durchgeführt (<http://www.ebi.ac.uk/dali/>).

#### *Kristallisation der hCGL*

Kristallisationsexperimente wurden zunächst mit dem wie oben beschrieben gereinigten Protein sowie mit Apoprotein ohne PLP-Cofaktor durchgeführt, jedoch ohne Kristalle zu erhalten. Daher wurde das Protein (15 mg/ml in 20 mM Natriumborat, pH 7,9, 10  $\mu$ M PLP, 10 % (w/v) Saccharose) durch native Elektrophorese in einem 6 %igen Polyacrylamidgel (in Borat-Puffer, pH 7,9; Geldicke 3 mm) weiter gereinigt. Die Elektrophorese wurde 5 h bei 400 V und 10 °C durchgeführt. Der Gelbereich, der die hCGL enthielt, wurde an der Gelbfärbung aufgrund des PLP-Cofaktors identifiziert, ausgeschnitten, und das Protein in 20 mM Natriumborat, pH 7,9, 10  $\mu$ M PLP eluiert. Das Protein wurde in Centricons 30

(Millipore, Eschborn) auf 15 mg/ml konzentriert und für Kristallisationsansätze eingesetzt oder in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Die Kristallisation wurde nach der Methode des sitzenden Tropfens in CrysChem-Platten durchgeführt. Die Äquilibrierung erfolgte bei 18 °C gegen 100 mM Hepes/NaOH, pH 7,6, 1,02 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 % (w/v) PEG 4000. Die Tropfen wurden aus 1,5 µl Proteinlösung und 1,5 µl Reservoirlösung gemischt.

### *Strukturbestimmung von tCGS*

tCGS wurde in Plexiglasschalen mit 5 ml Reservoirlösung kristallisiert. Die Kristalle in sitzenden und hängenden Tropfen unterschieden sich nicht. Die Äquilibrierung erfolgte gegen 100 mM MES/NaOH, pH 6,0, 200 mM MgCl<sub>2</sub>, 11 % PEG 8000 bei 18 °C. Der Tropfen wurde aus 5 µl Proteinlösung (24 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 7,8, 10 µM PLP) und 4 µl Reservoir gemischt. Als Erntepuffer wurde Reservoirlösung verwendet. Ein vollständiger Datensatz bis 2,9 Å Auflösung wurde mit einem einzelnen Kristall bei Raumtemperatur aufgenommen.

Die Phasen der Strukturdaten des aufgenommenen Datensatzes wurden durch die Methode des molekularen Ersatzes (Huber, 1965; Crowther & Blow, 1967) mit dem Programm AMoRe (Navaza, 1994) ermittelt. Dazu wurde aus den Koordinaten der eCGS (PDB Eintrag 1CS1; Clausen *et al.*, 1998) ein Suchmodell erstellt, indem die PLP-Cofaktoren und die zwischen *E. coli*-CGS und tCGS nicht identischen Seitenketten entfernt wurden. Rotations- und Translationssuche im Pattersonraum mit Daten bis 3,5 Å Auflösung und 2,5° bzw. 0,88 Å Schrittweite ergaben eine eindeutige Lösung mit zwei Homotetrameren in der asymmetrischen Einheit (Korrelationskoeffizient 34,9 % und R-Faktor 48,4 %). Mit diesem Modell wurden Phasen berechnet, die mit den experimentellen Amplituden zur Berechnung einer Elektronendichte benutzt wurden. Diese Elektronendichte wies deutliche Dichte sowohl für den Cofaktor PLP als auch für die fehlenden Aminosäureseitenketten auf. Die Qualität der Elektronendichten wurde durch achtfaches Mitteln im realen Raum verbessert.

Zur Verfeinerung des tCGS-Modells wurde der Inhalt der AU erzeugt durch Anwendung der NCS-Operatoren, ermittelt mit LSQMan (Kleywegt & Jones, 1994), auf das in die gemittelte Dichte gebaute Modell. Die NCS wurde während der Verfeinerung durch *restraints* (Gewichtung: 30 kcal mol<sup>-1</sup>Å<sup>-1</sup>) aufrechterhalten, außer für Reste, die an Kristallkontakten beteiligt sind (Aminosäuren 48-52, 154-157, 178-184, 192-202, 317-337, 343-359, 369 und 434-437). Ab einem R<sub>free</sub>-Wert von unter 30 % wurde ein globaler anisotroper Debye-Waller-Faktor auf die Strukturfaktoramplituden angewandt, gefolgt von der Verfeinerung individueller isotroper Debye-Waller-Faktoren (Gewichtung für NCS *restraints*: σB = 4 Å<sup>2</sup>).

Gegen Ende der Verfeinerung wurden 46 Wassermoleküle in die gemittelte Dichte an stereochemisch geeignete Positionen gebaut, und die symmetrieverwandten Wassermoleküle wurden durch Anwendung der NCS-Operatoren erzeugt.

#### *Strukturbestimmung von tCGS-Inhibitor-komplexen*

tCGS wurde ohne Inhibitor in sitzenden Tropfen in Plexiglasschalen kristallisiert. Die Äquilibrierung erfolgte bei 18 °C gegen 100 mM MES/NaOH, pH 6,0, 200 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % PEG 8000. Der Tropfen wurde aus 3 µl Proteinlösung (12 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 7,8, 10 µM PLP) und 2 µl Reservoirlösung gemischt und ohne Vorinkubation mit tCGS-Mikrokristallen versetzt. Dazu wurde ein vorhandener tCGS-Kristall mit einem Kaninchen-Tasthaar berührt und das Haar anschließend durch die neuen Kristallisationstropfen gezogen. Die nach ca. 5 Tagen erhaltenen tCGS-Kristalle wurden 10 h mit 5 mM DL-E-2-amino-5-phosphono-3-pentensäure (APPA) bzw. 48 h mit 10 mM 3-(phosphonomethyl)pyridine-2-carbonsäure (PPCA) bzw. 72 h mit 5 mM 5-Carboxymethylthio-3-(3'-chlorophenyl)-1,2,4-oxadiazol (CTCPO), jeweils gelöst in Reservoirlösung, inkubiert. Diffraktionsdaten wurden mit zwei (APPA), drei (PPCA) bzw. einem (CTCPO) Kristall bei Raumtemperatur aufgenommen.

Die durch *Microseeding* erhaltenen tCGS-Kristalle gehören zur monoklinen Raumgruppe C2, im Gegensatz zu den orthorombischen Kristallen der Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, die zur Lösung der Struktur der freien tCGS verwendet wurden. Daher wurden die Strukturen der tCGS-Inhibitor-komplexe durch molekularen Ersatz (Huber, 1965; Crowther & Blow, 1967) mit dem Programm MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997) gelöst (Auflösungsbereich 20-4 Å). Als Suchmodell wurde die Struktur des nativen Homotetramers der tCGS ohne den Cofaktor PLP verwendet. Rotations- und Translationssuche im Pattersonraum ergaben jeweils eine eindeutige Lösung mit drei Homotetrameren in der asymmetrischen Einheit (R-Faktoren/Korrelationskoeffizienten nach *rigid body* Verfeinerung: APPA 32 %/63 %, PPCA 32 %/69 %, CTCPO 38 %/56 %). Die erhaltenen Elektronendichten wiesen deutliche Dichte sowohl für den Cofaktor PLP als auch für den jeweiligen Inhibitor auf. Die Qualität der Elektronendichten wurde durch zwölfaches Mitteln im realen Raum verbessert.

Atommodelle für die Inhibitoren wurden mit Sybyl (Tripos GmbH, München) erzeugt. Zur Verfeinerung der Modelle der tCGS-Inhibitor-komplexe wurde der Inhalt der AU erzeugt durch Anwendung der NCS-Operatoren, ermittelt mit LSQMan (Kleywegt & Jones, 1994), auf das in die gemittelte Dichte gebaute Modell. Die NCS wurde während der Verfeinerung durch *restraints* (Gewichtung: 30 kcal mol<sup>-1</sup>Å<sup>-1</sup>) aufrechterhalten. Ab einem R<sub>free</sub>-Wert von

30 % wurde ein globaler anisotroper Debye-Waller-Faktor auf die Strukturfaktoramplituden angewandt, gefolgt von der Verfeinerung individueller isotroper Debye-Waller-Faktoren (Gewichtung für NCS *restraints*:  $\sigma_B = 3 \text{ \AA}^2$ ).

### *Strukturbestimmung von DT3*

#### *a) Kristallisation und Datenaufnahme*

DT3 wurde nach der Methode des sitzenden Tropfens kristallisiert. Die Äquilibrierung erfolgte bei 18 °C in ChrysChem-Platten gegen 50 mM MES/NaOH, pH6,0, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tropfen wurde aus 1,5 µl Proteinlösung (7,5 mg/ml in 50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 100 mM KCl, 400 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 % (w/v) Saccharose) und 1,5 µl Reservoirlösung gemischt. Als Erntepuffer wurde Reservoirlösung verwendet, als Cryo-Schutzpuffer Reservoir mit 30 % (v/v) Glycerin. Ein nativer Datensatz bis 2,6 Å Auflösung wurde bei Raumtemperatur aufgenommen, und ein hochaufgelöster nativer Datensatz (1,45 Å Auflösung) bei 100 K. Die Datensätze der mit Schweratomlösungen behandelten Kristalle zur Suche von Schweratomderivaten wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Alle Datensätze wurden jeweils mit einem einzelnen Kristall aufgenommen.

#### *b) Phasenbestimmung für die DT3-Daten durch MIR (Multiple Isomorphous Replacement)*

Zur Derivatisierung wurden Kristalle in Lösungen verschiedener Schwermetallverbindungen in Kristallisationspuffer eingelegt. Je nach Konzentration und Reaktivität der Verbindung betrug die Dauer einige Stunden bis mehrere Tage (12 h in 5 mM [Ta<sub>6</sub>Br<sub>12</sub>]Br<sub>2</sub>; 7 d in 5 mM K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>; 5 d in 1 mM K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>; 18 h in 0,8 mM Thiomersal). Nach der Datenaufnahme wurden die Derivatdatensätze mit ScaleIt (CCP4, 1979) relativ zum Nativdatensatz skaliert. Eine mögliche Derivatisierung wurde anhand der isomorphen Differenzen im Auflösungsbereich 20-3,5 Å beurteilt.

Die Schweratompositionen in den isomorphen Derivaten wurden mit SOLVE (Los Alamos Nat. Lab., USA) und RSPS (Knight, 1989) bestimmt. Die Koordinaten dieser Positionen, ihre Besetzungen und isotrope Temperaturfaktoren wurden mit MLPhare (Otwinowski, 1991) gegen eine *lack-of-closure*-Zielfunktion verfeinert. Die bei Raumtemperatur aufgenommenen nativen Daten wurden mit diesen Positionen und MLPhare bis 3,2 Å Auflösung phasiert. Die Phasen wurden durch Elektronendichtemodifikation (*solvent flattening*, *histogram matching*, *multi-resolution modification* und *skeletonization*) mit dem Programm DM (Cowtan, 1994) verbessert. Aus den so erhaltenen Phasen und den nativen Strukturfaktoramplituden wurde mit dem Programm FFT (CCP4, 1979) eine Elektronendichteverteilung berechnet. Durch Analyse des Drehsinns der  $\alpha$ -Helices in dieser Elektronendichte wurde die Händigkeit der

kristallographischen dreifachen Schraubenachse und entsprechend die korrekte Position der Schweratome bestimmt.

### *c) Modellbau und -verfeinerung für DT3*

In die mit den experimentellen Phasen berechnete Elektronendichteverteilung bis 3,2 Å Auflösung wurde ein Modell eingepaßt, das ca. 75 % der Proteinatome enthielt, und wie oben beschrieben verfeinert. Mit diesem Modell und dem hochaufgelösten nativen Datensatz wurden mit CNS Rotations- und Translationsfunktionen im Auflösungsbereich 12-4 Å berechnet, die eine eindeutige Lösung ergaben (Korrelationskoeffizient 45 % und R-Faktor 48 % für Daten bis 1,45 Å). In den weiteren Modellbau- und Verfeinerungsschritten wurde der hochaufgelöste native Datensatz verwendet, der um einen globalen anisotropen Debye-Waller-Faktor und mit einem *bulk solvent*-Modell korrigiert wurde. In die erhaltene Elektronendichte konnte ein komplettes DT3-Modell eingepaßt werden, bis auf zwei Reste am N-Terminus und fünf Reste am C-Terminus. Ab einem R-Faktor von unter 27 % wurden individuelle isotrope Debye-Waller-Faktoren verfeinert, und 408 Wasser-, acht Sulfat-, einem Glycerin- und einem Benzoesäure-Molekül wurden in die Dichte eingebaut. In der letzten Modellbaurunde wurden für Phe451, Arg487, Cys500, Ser535, Arg622, Ser646, Asn684, Met724, Gln776 und Gln780 zwei Konformationen eingepaßt und mit einer konstanten Besetzung von 50 % für jede Konformation verfeinert.

## **3.2.4 Sonstige Methoden**

### *Sequenzanalysen*

Zur Analyse von Sequenzdaten und zur Erzeugung von Sequenzalignments wurden die Programme des GCG-Packets (GCG Inc., Wisconsin, USA) verwendet. Zur graphischen Aufbereitung von Sequenzvergleichen wurde das Programm ALSCRIPT (Barton, 1993) verwendet.

Zur Generierung eines Sequenzprofils für das SUPR-Motiv (siehe Abschnitt 4.1.8) und das Durchsuchen der Sequenzdatenbanken wurden Programme des GCG-Packets (GCG Inc., Wisconsin, USA) verwendet. Die Motive aus DT3 (SWISSPROT: P06993) bzw. aus DT3, SC3A7.02c (PIR: E1313491), OrfV (PIR: G3978477) und AcoK (PIR: G504484) wurden mit dem Programm Gap *aligned* und das Profil mit ProfileMake berechnet. Mit diesem Profil wurden die SWISSPROT-, PIR- und TrEMBL-Datenbanken mit Hilfe des Programms MotifSearch durchsucht. Die Treffer dieser Suche (kombinierte p-Werte unter  $1,0 \times 10^{-6}$ ) wurden per Hand auf weitere Kriterien hin analysiert (siehe Abschnitt 4.1.8).

### *Modellierung von tCGS-Substratkomplexen*

Die Modellierung der Substratkomplexe wurde mit den Modulen Viewer, Builder, Docking, Delphi und Discover3 des Programmpackets Insight II (MSI, Los Angeles, USA) durchgeführt. Für ein Aldimin aus Homoserinphosphat und PLP wurde ein Modell erzeugt und im aktiven Dimer der verfeinerten tCGS-Kristallstruktur (Monomere A und C) positioniert, wobei für die Orientierung die des AVG in der Kristallstruktur des AVG-CBL-Komplexes (Clausen *et al.*, 1997a; PDB Eintrag 1CL2) als Startpunkt verwendet wurde. Die Energieminimierung wurde in Insight II mit Discover3 und dem CVFF-Kraftfeld (*consistent valence forcefield*) über 200 Minimierungsschritte bis zur Konvergenz (0,1 kcal/mol Toleranz) durchgeführt. Die Energie wurde für das tCGS-Dimer und den Liganden gleichzeitig minimiert. Zur Modellierung des Komplexes mit dem zweiten Substrat L-Cystein wurde der erhaltene Homoserinphosphat-Komplex als Ausgangspunkt verwendet. Durch Entfernen der Phosphat-Abgangsgruppe und eines  $\beta$ -Protons wurde ein PLP-gebundenes 2-Aminobut-3-enoat erzeugt. Ein L-Cystein wurde in der elektrostatisch und sterisch geeignete Bindungstasche positioniert, und die Energie des Komplexes wie oben beschrieben minimiert.

### *Strukturbasierte Suche nach tCGS-Inhibitoren durch Molecular Modelling*

Für die strukturbasierte Suche nach neuen potentiellen tCGS-Inhibitoren wurden die aktiven Dimere der tCGS-Struktur und der tCGS-Inhibitor Komplexe, ohne den jeweiligen Inhibitor, verwendet. Als Mittelpunkt des Aktivzentrums wurde das Zentrum des jeweiligen Inhibitors bzw. C $\beta$  des modellierten Homoserinphosphat-Komplexes für tCGS ohne Inhibitor verwendet. Interaktionen innerhalb eines Radius von 7 Å wurden für das *Docking* der kohlenstoffhaltigen Substanzen des ACD (*Available Chemicals Dictionary*; MDL Information Systems, Köln) in das jeweilige Aktivzentrum berücksichtigt. Das *Docking* wurde mit dem Programm LUDI (Böhm, 1992) durchgeführt, und die am besten bewerteten Substanzen wurden anschließend mit FlexX (Rarey *et al.*, 1998) nochmals in das Aktivzentrum eingefügt, wobei der Ligand als flexibles Molekül behandelt wurde. Aus der von FlexX vorhergesagten Gesamtbindungsenergie wurden theoretische Bindungskonstanten berechnet, und die modellierten Komplexe wurden mit dem Programm Sybyl (Tripos GmbH, München) analysiert.



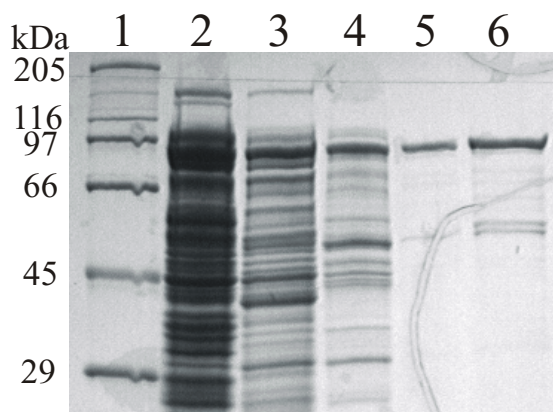
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Transkriptionsaktivator MalT aus *E. coli*

#### 4.1.1 Expression und Reinigung von MalT

MalT wurde mit Hilfe des Konstrukts pOM2malTp7 (Danot & Raibaud, 1994) in *E. coli* in löslicher Form überexprimiert und nach einem Protokoll von Danot & Raibaud (1994) gereinigt, das im Rahmen dieser Arbeit modifiziert und erweitert wurde. Durch eine Kombination aus Anionenaustauschromatographie, hydrophober Chromatographie an Propylsepharose, Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltration konnte zu ca. 95 % reines MalT erhalten werden (Abbildung 4-1). Die Ausbeute betrug ca. 40 mg MalT aus einer 6 l *E. coli*-Anzucht. Der Anreicherungsfaktor konnte nicht bestimmt werden, da der aufwendige MalT-Aktivitätstest nicht für die einzelnen Reinigungsstufen durchgeführt wurde.

Die Expression von MalT mit dem Konstrukt pTHisMalT lieferte das Protein in unlöslichen Einschlusskörpern. Eine Renaturierung gelang nicht, aber das Protein konnte zur Produktion von anti-MalT Antikörpern verwendet werden (A. Böhm, Universität Konstanz, unveröffentlicht).

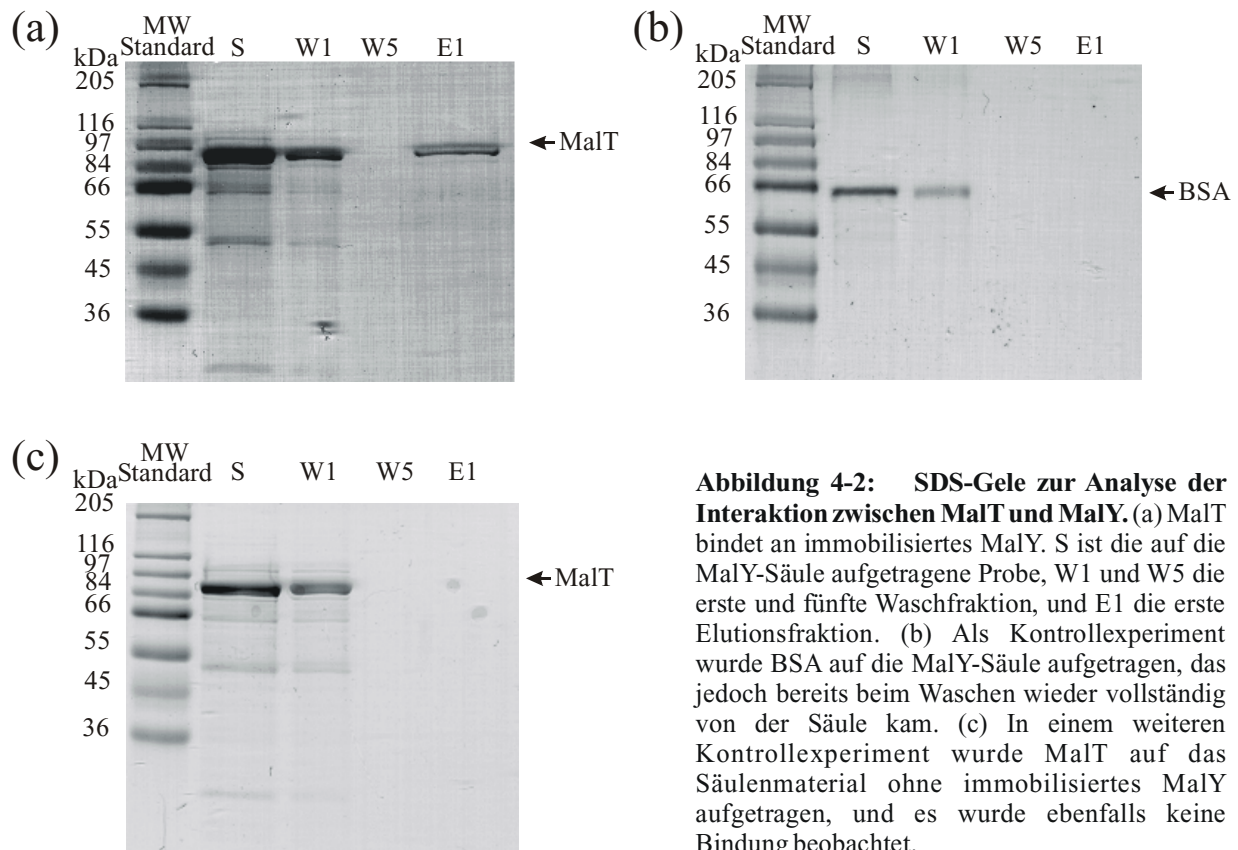


**Abbildung 4-1: Reinigung von überexprimiertem MalT.** Auf dem SDS-Polyacrylamidgel sind Molekulargewichtsstandard (Bahn 1) und die Reinigungsstufen für MalT zu sehen: Zell-Lysat (Bahn 2), Pool der DEAE-Anionenaustauschromatographie (Bahn 3), Pool der hydrophoben Chromatographie (Bahn 4), Pellet der Ammoniumsulfatfällung (Bahn 5), Pool der Gelfiltration (Bahn 6).

#### 4.1.2 Interaktion zwischen MalT und MalY

Die direkte, physikalische Wechselwirkung zwischen MalT und MalY konnte durch Affinitätschromatographie nachgewiesen werden. Dazu wurde MalY kovalent an aktiviertes Agarose-Säulenmaterial gekoppelt. Aufgetragenes MalT wurde auf dieser MalY-Säule zurückgehalten und erst bei hohen Salzkonzentrationen wieder eluiert. Die Spezifität der Wechselwirkung ist bereits daran zu erkennen, daß die Verunreinigungen der MalT-Präparation nicht an die Säule binden, sondern vollständig in der Waschfraktion zu finden

sind (Abbildung 4-2a). Außerdem wurden drei Kontrollexperimente durchgeführt. BSA bindet nicht an die MalY-Säule (Abbildung 4-2b), ebenso wie die Proteine eines *E. coli*-Lysats (Daten nicht gezeigt), d.h. die Bindung ist spezifisch für MalT. Schließlich wurde gezeigt, daß MalT nicht an abgesättigtes Säulenmaterial ohne immobilisiertes MalY bindet (Abbildung 4-2c). Demnach kommt die Bindung von MalT nicht durch Interaktion mit dem Säulenmaterial zustande, sondern durch eine Wechselwirkung mit MalY.



**Abbildung 4-2: SDS-Gele zur Analyse der Interaktion zwischen MalT und MalY.** (a) MalT bindet an immobilisiertes MalY. S ist die auf die MalY-Säule aufgetragene Probe, W1 und W5 die erste und fünfte Waschfraktion, und E1 die erste Elutionsfraktion. (b) Als Kontrollexperiment wurde BSA auf die MalY-Säule aufgetragen, das jedoch bereits beim Waschen wieder vollständig von der Säule kam. (c) In einem weiteren Kontrollexperiment wurde MalT auf das Säulenmaterial ohne immobilisiertes MalY aufgetragen, und es wurde ebenfalls keine Bindung beobachtet.

#### 4.1.3 Expression und Reinigung von MalT-Domänen

Einzelne Domänen und Kombinationen von jeweils zwei Domänen von MalT wurden in *E. coli* exprimiert. Dazu wurden pET- und pARA-Konstrukte (pOMn) verwendet, die freundlicherweise von Dr. O. Danot (Institut Pasteur, Paris) zu Verfügung gestellt wurden. Tabelle 4-1 gibt einen Überblick über die verwendeten Konstrukte und die entsprechenden Proteinreinigungen.

Alle Proteine mit Ausnahme von HDT2 konnten in löslicher Form exprimiert und isoliert werden. HDT2 wurde in Form von Einschlußkörpern exprimiert und nach deren Isolierung rückgefaltet. In Tabelle 4-1 sind die Chromatographieschritte und Ausbeuten der Reinigungen

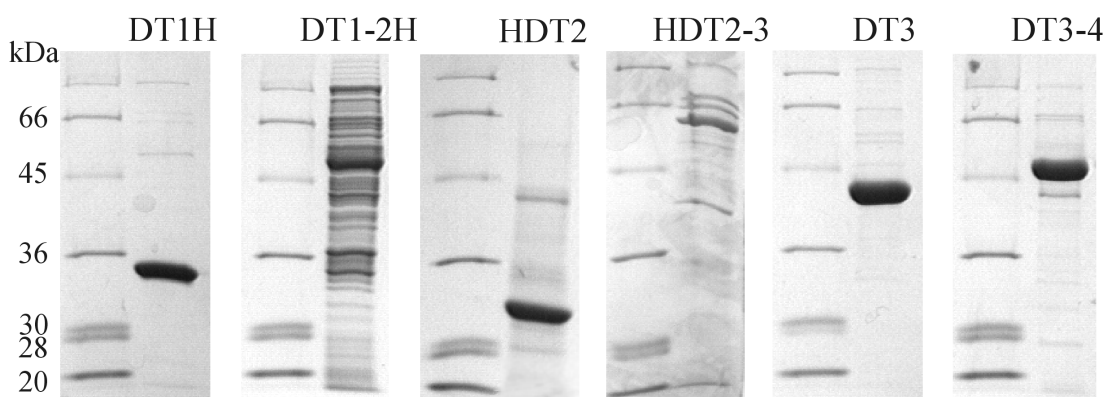
der einzelnen Proteine aufgeführt. Für die Reinigung von DT3 und DT3-4 konnte eine Ni-NTA-Säule verwendet werden, obwohl diese Proteine keinen His-tag besitzen.

**Tabelle 4-1: Konstrukte zur Expression von MalT-Domänen**

Domäne(n)	Konstrukt	His-tag	Reinigung	Ausbeute (pro l Kulturlösung)
DT1H	pETDT1H	C-terminal	nativ; NiNTA	17 mg
DT1-2H	pOM158	C-terminal	nativ; NiNTA	4 mg*
HDT2	pOM156	N-terminal	denaturierend; NiNTA	15 mg
HDT2-3	pETDT2-3	N-terminal	nativ; NiNTA, DEAE	6 mg*
DT3	pOM152	---	nativ; NiNTA, DEAE	28 mg
DT3-4	pETDT3-4	---	nativ; NiNTA	3 mg

\* Protein noch unrein, nicht zur Kristallisation geeignet

Die MalT-Domänen DT1H, HDT2, DT3 und DT3-4 konnten durch die angegebenen Schritte zu hoher Reinheit aufgearbeitet werden (Abbildung 4-3). Diese Proteine wurden für Kristallisationsexperimente eingesetzt, und mit DT3 wurden gut streuende Kristalle erhalten (Abschnitt 4.1.4). Die Präparationen der MalT-Domänen DT1-2H und HDT2-3 weisen noch keine hohe Reinheit auf. Diese Proteine müssen noch weiter gereinigt werden, bevor sie für Kristallisationsexperimente geeignet sind.

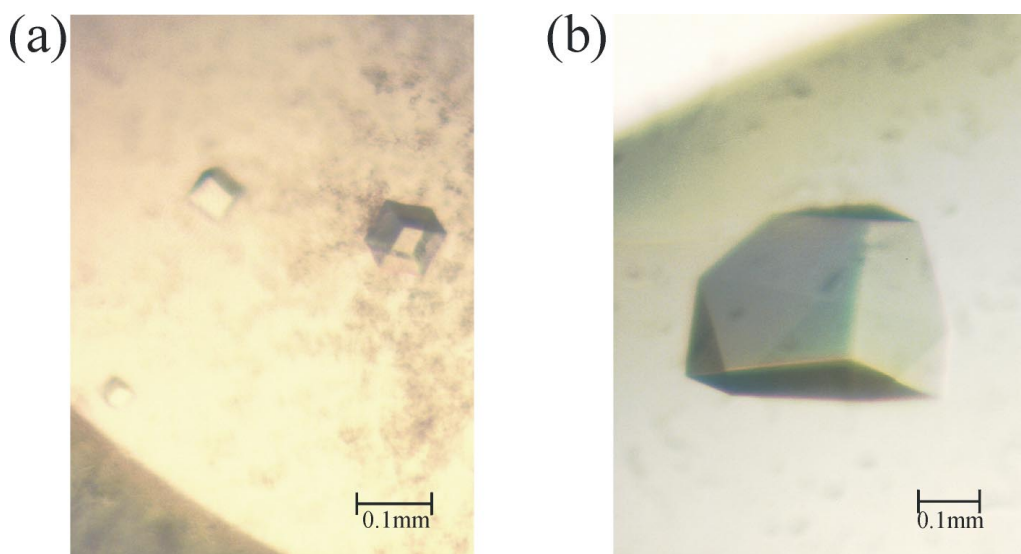


**Abbildung 4-3: Reinigung von MalT-Domänen analysiert anhand von SDS-PAGE.** Für die in Tabelle 4-1 aufgeführten Proteine ist jeweils das Endprodukt der angegebenen Reinigung neben einem Molekulargewichtsstandard aufgetragen. DT1H, HDT2, DT3 und DT3-4 wurden für Kristallisationsexperimente eingesetzt.

#### 4.1.4 Kristallisation von DT3

DT3 konnte bei 18 °C in Dampfdiffusionsexperimenten nach der Methode des sitzenden Tropfens kristallisiert werden. Eine geeignete Reservoirlösung wurde mit Hilfe von *incomplete factorial screens* (Carter & Carter, 1979) gefunden (Abbildung 4-4a) und durch

*grid screens* zu 50 mM MES/NaOH, pH 6,5, 1,8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 30 mM  $\text{MgSO}_4$  verfeinert. Tropfen aus 1,5  $\mu\text{l}$  Proteinlösung (7,8 mg/ml in 50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 100 mM KCl, 400 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 % (w/v) Saccharose) und 1,5  $\mu\text{l}$  Reservoirlösung wurden gegen 500  $\mu\text{l}$  Reservoir äquilibriert. Kristalle der Dimensionen  $0,2 \times 0,2 \times 0,25 \text{ mm}^3$  wuchsen reproduzierbar innerhalb von 5 Tagen (Abbildung 4-4b). Die Kristalle konnten zum Ernten in der Kapillare mit Reservoirpuffer überschichtet werden, ohne daß ihre Streufähigkeit beeinträchtigt wurde. Zum Einfrieren der Kristalle unter Vermeidung von Eisreflexen konnte eine Lösung benutzt werden, die 30 % Glycerin enthielt und ansonsten der Zusammensetzung der Reservoirlösung entsprach.

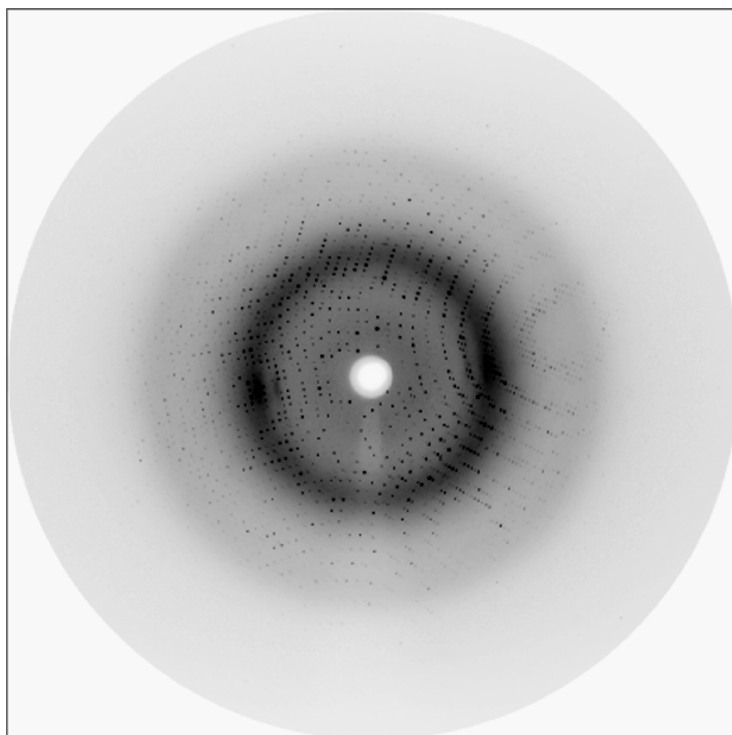


**Abbildung 4-4: Kristalle von DT3.** (a) Kristalle, die mit einer Lösung eines *factorial screens* erhalten wurden. (b) Kristall von ca.  $0,2 \times 0,2 \times 0,25 \text{ mm}^3$  Größe, der nach Verfeinerung der anfänglichen Bedingungen erhalten wurde. Zu dieser Größe wuchsen die DT3-Kristalle reproduzierbar innerhalb von 5 Tagen.

#### 4.1.5 Aufklärung der Raumstruktur von DT3

##### *Datenaufnahme und Raumgruppenbestimmung*

Die DT3-Kristalle beugten bei Raumtemperatur auf einer Diffraktionsanlage mit MAR-*Image plate* als Detektor und einem Rigaku-Röntgengenerator mit rotierender Kupferanode bis 1,9 Å Auflösung. Ein vollständiger Datensatz mit 2,6 Å Auflösung konnte unter diesen Bedingungen aufgenommen werden. Nach dem Einfrieren eines Kristalls konnte an *beamline* BW6 am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY, Hamburg) mit einem MAR-CCD-Detektor ein vollständiger Datensatz mit 1,45 Å Auflösung aufgenommen werden (Tabelle 4-2; Abbildung 4-5).



**Abbildung 4-5: Diffractionsbild eines DT3-Kristalls.** Das Diffractionsbild wurde an *beamline* BW6 (Deutsches Elektronensynchrotron DESY, Hamburg) bei  $\lambda=1,05 \text{ \AA}$  mit einem MAR-CCD-Detektor aufgenommen. Der Drehwinkel betrug  $0,5^\circ$ . Der Plattenrand entspricht einer Auflösung von  $1,45 \text{ \AA}$ .

Die Auswertung der Diffractionsdaten ergab ein trigonales Kristallgitter mit Zellkonstanten  $a = b = 88 \text{ \AA}$ ,  $c = 112 \text{ \AA}$ . Auswertung in P321 ergab gegenüber der Auswertung in P3 keine deutliche Erhöhung der  $R_{\text{sym}}$ -Werte, was auf eine zweizählige Symmetrieachse in Richtung der b-Achse schließen lässt. Die systematischen Auslöschungen für  $h = 0, k = 0, l \neq 3n$  zeigten, daß es sich bei der dreifachen Symmetrieachse um eine Schraubenachse handelt, so daß die Daten in der Folge in der Raumgruppe  $P3_121$  ausgewertet wurden. Die spätere Analyse der ersten Elektronendichte erlaubte schließlich, anhand der Händigkeit der  $\alpha$ -Helices in DT3 die umgekehrte Händigkeit der Schraubenachse und somit die Raumgruppe zu  $P3_221$  zu bestimmen.

#### *Phasenbestimmung, Modellbau und Strukturverfeinerung*

Die Diffractionsdaten der DT3-Kristalle wurden mit der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes (MIR) phasiert. Derivatisierungsversuche mit zwölf verschiedenen Schweratomverbindungen unter verschiedenen Bedingungen (Konzentration der Schweratomverbindung, Einwirkungsdauer) lieferten vier zur Phasenbestimmung geeignete Schweratomderivate (Tabelle 4-2). Die Lage des  $[\text{Ta}_6\text{Br}_{12}]^{2+}$ -Clusters konnte durch Analyse der Pattersonfunktion bestimmt werden, die mit den Differenzen zwischen den Strukturfaktoramplituden des nativen und des isomorphen derivatisierten Kristalls berechnet wurde. Die Lagen der Schweratome in den weiteren Derivate-Datensätzen wurde durch Kreuzphasierung mit der

[Ta<sub>6</sub>Br<sub>12</sub>]<sup>2+</sup>-Lage bestimmt. Die Schweratompositionen, ihr Besetzung, und isotrope Temperaturfaktoren wurden verfeinert und die mit den erhaltenen Phasen berechnete Elektronendichteverteilung durch Dichtemodifikation (*solvent flattening*, *histogram matching*, *multi-resolution modification* und *skeletonization*) verbessert. In die erhaltene Elektronendichte wurde ein unvollständiges Strukturmodell gebaut, das über Patterson-Suchmethoden auf den hochaufgelösten Datensatz übertragen werden konnte. Das Modell wurde dann mit diesem Datensatz vervollständigt und verfeinert.

**Tabelle 4-2: Aufnahme und Phasierung der Diffraktionsdaten von DT3**

	Nativ (100 K)	Nativ (293 K)	[Ta <sub>6</sub> Br <sub>12</sub> ]Br <sub>2</sub> (293 K)	K <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub> (293 K)	K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> (293 K)	Thiomersal (293 K)
Auflösungsgrenze (Å)	1,45	2,6	3,2	3,2	3,15	3,5
Gemessene Reflexe	678133	46047	21178	22772	17293	15116
Unabhängige Reflexe	86222	15120	7622 <sup>(4)</sup>	8085	7741	5921
% Vollständigkeit (äußerste Schale)	98,9 (99,2)	93,7 (86,9)	86,2 (70,7)	92,0 (85,1)	84,2 (71,3)	87,3 (87,4)
R <sub>merge</sub> <sup>1</sup> (äußerste Schale)	5,3 (38,6)	10,5 (30,4)	8,4 (24,6)	8,6 (18,4)	9,7 (20,6)	7,7 (19,6)
Konzentration / Einwirkdauer	---	---	5 mM / 12 h	5 mM / 7 d	1 mM / 5 d	0,8 mM / 18 h
Schweratom- Bindungsstellen	---	---	1	2	3	1
Phasing power <sup>2</sup>	---	---	1,8	1,4	1,7	0,5
FOM <sup>3</sup> : MIR / nach Dichte- modifikation	0,448 / 0,753 (3,2 Å Auflösungsgrenze)					

$$^1 R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl}(i) - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_{hkl}(i)}; I_{hkl}(i) \text{ ist die Intensität für die individuelle Messung } i, \langle I_{hkl} \rangle \text{ ist der}$$

Mittelwert für den entsprechenden Reflex.

$$^2 \text{ Phasing power} = \text{r.m.s.} \left( \left| \frac{F_H}{E} \right| \right); |F_H| \text{ ist die Strukturfaktoramplitude für die Schweratomstruktur, } E \text{ ist der}$$

*residual lack of closure*.

$$^3 \text{ FOM} = \text{Figure of merit: } ((\cos\phi)^2 + (\sin\phi)^2)^{1/2}$$

<sup>4</sup> Für die Phasierung wurden von diesem Datensatz nur die 2134 Reflexe bis 5,0 Å Auflösung verwendet.

In der asymmetrischen Einheit befindet sich ein DT3-Molekül, das die Aminosäuren 437 bis 806 von MalT umfaßt, mit einem zusätzlichen Gly am N-Terminus und einer GlyAla-Erweiterung am C-Terminus (Molekulargewicht 42836 Da). Der Wassergehalt beträgt 54 % und der Matthews-Koeffizient 2,9. Das Strukturmodell wurde bei einer Auflösung von 1,45 Å zu einem R-Faktor von 18,9 % und einem freien R-Faktor von 20,7 % verfeinert. In 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>-Dichten wurde durchgängige Elektronendichte für die gesamte Hauptkette erhalten, außer für zwei Reste am N-Terminus und fünf Reste am C-Terminus, die scheinbar sehr flexibel sind.

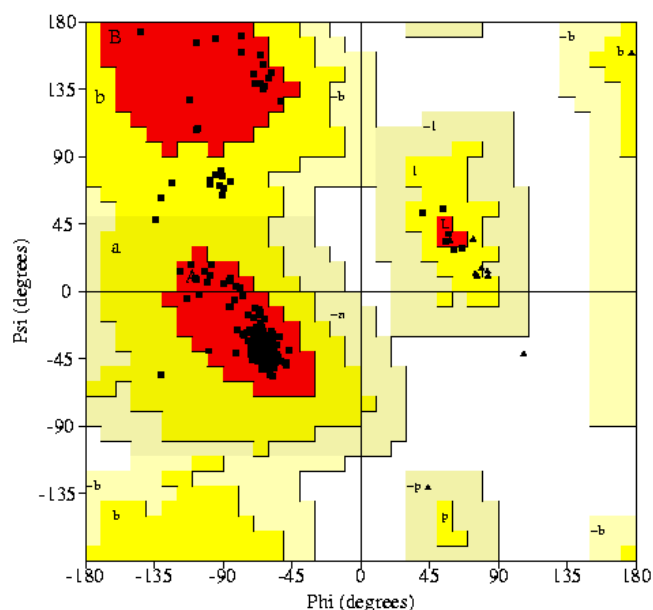
Der mittlere Fehler der Atompositionen wurde nach der kreuzverifizierten  $\sigma_A$ -Methode (Read, 1986) zu 0,13 Å bestimmt. Die stereochemischen Parameter des verfeinerten Modells weisen nur geringe Abweichungen von Standardwerten (Engh & Huber, 1991) auf (Tabelle 4-3). Alle dihedralen Hauptkettenwinkel  $\phi$  und  $\psi$ , abgesehen von einigen der variableren Glycinreste, liegen in energetisch günstigen Bereichen des Ramachandran-Plots (Ramachandran & Sasisekharan, 1968), 95 % davon im günstigsten Bereich (Abbildung 4-6).

**Tabelle 4-3: Modellbau und Verfeinerung der DT3-Struktur**

Auflösungsbereich		1,45-12,0 Å
R-Faktor / R <sub>free</sub> -Faktor <sup>1,2</sup>		18,9 / 20,7
Atomanzahl	aktive Proteinatome	2977
	aktive Lösungsmittelatome	
	Wasser	408
	Sulfat	40
	Glycerin	6
	Benzoessäure	9
R.m.s. Abweichungen von Idealwerten	Bindungslängen	0,007 Å
	Bindungswinkel	1,2°
	dihedrale Winkel	17,6°
Mittlere B-Faktoren	alle Atome	22,0 Å <sup>2</sup>
	Proteinatome	20,4 Å <sup>2</sup>
	Lösungsmittelatome	32,7 Å <sup>2</sup>
R.m.s. Abweichungen B-Faktoren gebundener Atome		2,1 Å <sup>2</sup>

$$^1 \text{ R-Faktor} = \frac{\sum \|F_{obs} - k|F_{calc}|\|}{\sum |F_{obs}|}$$

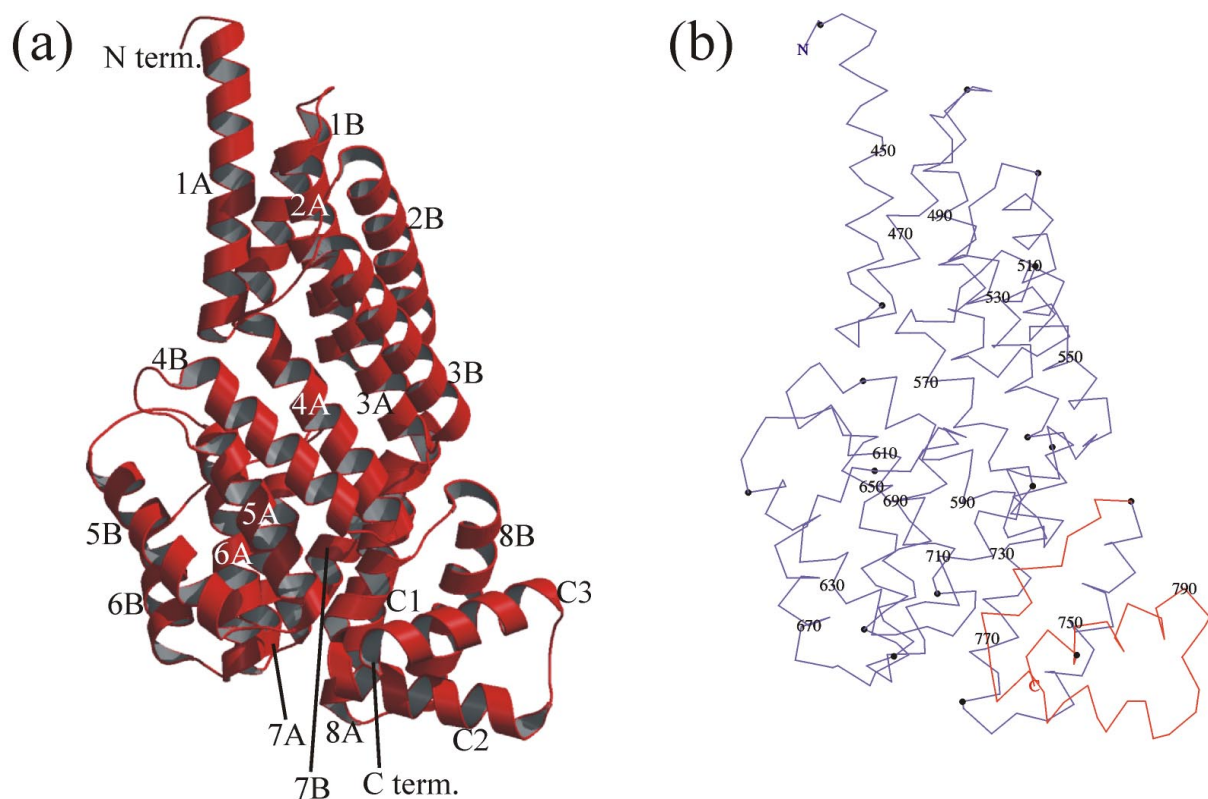
<sup>2</sup> Der freie R-Faktor R<sub>free</sub> wurde mit 10 % der gemessenen Daten berechnet, die nicht für die Verfeinerung verwendet wurden.



**Abbildung 4-6: Ramachandran-Plot für das verfeinerte DT3-Strukturmodell.** Für jede Aminosäure ist die Kombination ihres  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkels markiert. Die energetisch günstigste Region ist rot, die energetisch erlaubte Region gelb dargestellt. Hellgelb ist die energetisch noch mögliche, weiß die verbotene Region. Glycine (▲) sind aufgrund der fehlenden Seitenkette auch in den weißen Regionen erlaubt, alle anderen Aminosäuren (■) befinden sich in energetisch günstigen Regionen. A markiert den Geometriebereich für  $\alpha$ -helikale Strukturen, B für  $\beta$ -Faltblattstränge, L für linksgängige  $\alpha$ -Helices und p für  $\epsilon$ -Regionen.

#### 4.1.6 Das Strukturmodell von DT3

DT3 gehört zur *all- $\alpha$* -Familie (Murzin *et al.*, 1995) der Proteinstrukturen (Abbildung 4-7a). Von den 366 strukturell definierten Aminosäuren nehmen 79 % eine  $\alpha$ -helicale Konformation ein, 14 % bilden *turns* und 7 % befinden sich in Bereichen ohne repetitive Sekundärstruktur. Das röhrenförmige Molekül mit einer Gesamtgröße von  $83 \times 45 \times 45 \text{ \AA}^3$  umfaßt zwei Teildomänen (Abbildung 4-8b). Die 16 N-terminalen Helices bilden acht aufeinanderfolgende zwei-Helixbündel, die in einer rechtshändigen Superhelix angeordnet sind. Die drei C-terminalen Helices bilden eine kleine Teildomäne, die gegen die Grundfläche der Superhelix gepackt ist.



**Abbildung 4-7:** Strukturmodell für MalT Domäne III (DT3). (a) *Ribbon*-Modell der DT3-Struktur. Die zwei-Helixbündel sind, angefangen am N-Terminus, fortlaufend nummeriert. Die jeweils erste Helix eines Bündels liegt auf der Innenseite der Superhelix und ist mit A beschriftet, die äußere Helix mit einem B. Die drei Helices der C-terminalen Domäne sind fortlaufend mit C1-C3 beschriftet. (b) C $\alpha$ -Modell der DT3-Struktur. Jeder zwanzigste Rest ist mit der Aminosäurenummer in MalT beschriftet, jeder zehnte Rest dazwischen ist mit einem Punkt markiert. Die superhelikale Teildomäne ist blau gezeichnet, die C-terminale Teildomäne rot.

In der Superhelix-Teildomäne bilden die ersten Helices (A-Helices) der zwei-Helixbündel die Oberfläche des Superhelixtunnels, während die zweiten Helices (B-Helices) den größten Teil der äußeren Oberfläche bilden. Die zwei-Helixbündel sind einander ähnlich, paarweise Überlagerungen der 39 bis 42 Aminosäuren langen Motive ergeben mittlere quadratische



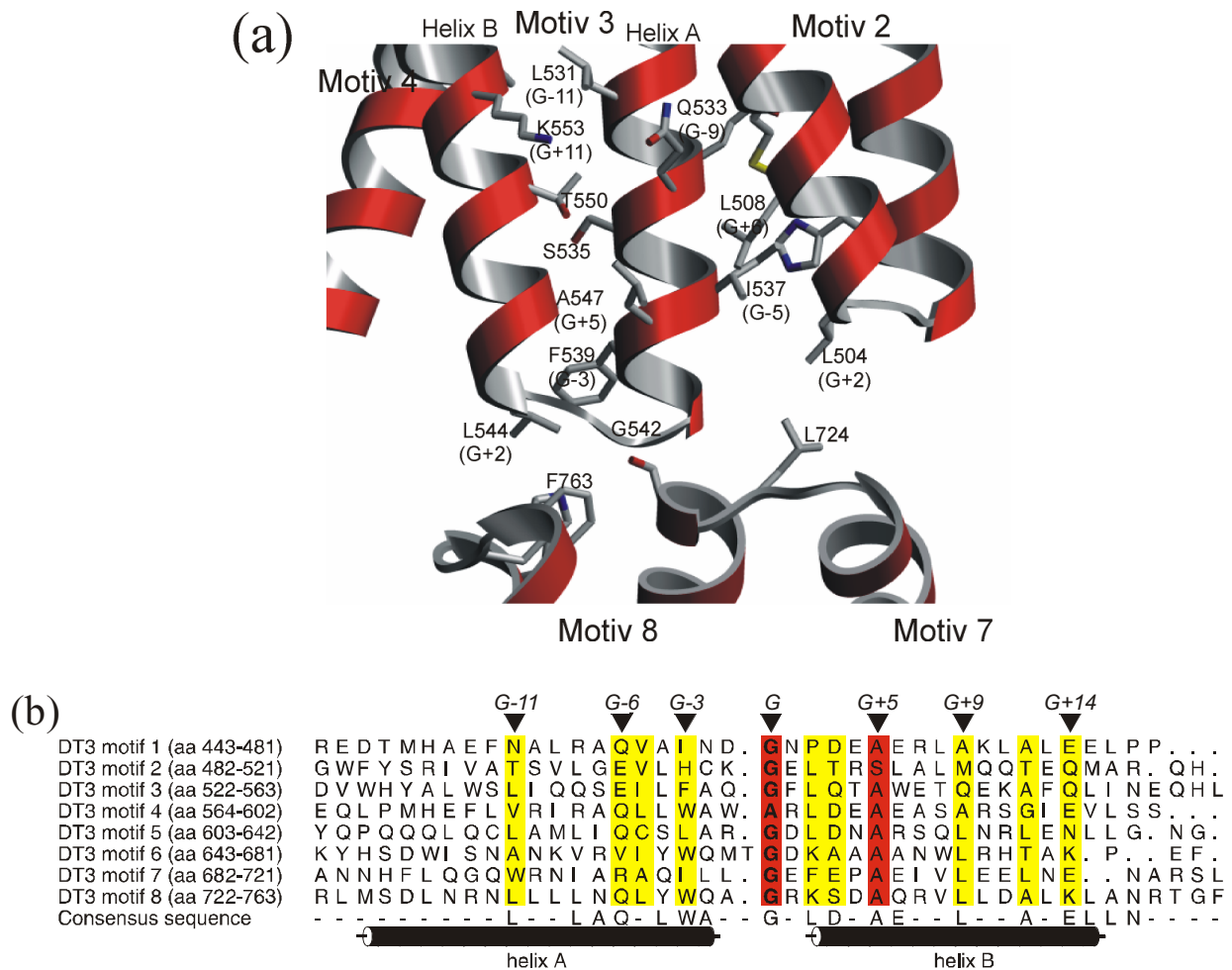
Abweichungen von 0,3 bis 1,2 Å für die C $\alpha$ -Positionen. Die Länge der Helix A ist stärker konserviert (16-18 Aminosäuren, außer Helix 1A mit 20 Aminosäuren) als die Länge der Helix B (10-17 Aminosäuren). Enge *turns* sind konserviert zwischen den A- und B-Helices, während die Verbindungen zwischen aufeinanderfolgenden Motiven stärker variieren. Allerdings bilden auch sie relativ enge *loops* oder *turns*, es stehen keine größeren *loops* von der kompakten Superhelix ab.

Die Winkel zwischen den A- und B-Helices variiert zwischen 23° und 27°, mit Ausnahme von Motiv 3 (15°). Zwischen aufeinanderfolgenden Bündeln variieren die Winkel stärker, zwischen 18° und 42°, um den Mittelwert von 30°. Die stärkste Abweichung von dieser regelmäßigen Anordnung liegt zwischen Helices 6B und 7A vor (42°), wo das C-terminale Ende von Helix 6B durch einen größeren *loop* ersetzt ist.

Durch die verkippte Anordnung der Helices entsteht eine rechtsgängige Superhelix mit einem Außendurchmesser von 35 Å und einem Innendurchmesser von 14 Å. Die Bündel sind um eine Achse senkrecht zur Superhelixachse verkippt. Eine Superhelixwindung umfaßt zehn Helices und hat eine Ganghöhe von 30 Å. Die Bündel sind in engem Kontakt zur ihrem fünften Nachfolger (Abbildung 4-8a), so daß die Superhelix eine geschlossene Oberfläche aufweist. Der *turn* innerhalb eines Bündels *n* ist über der Lücke zwischen den Helices des *n+5*ten Motivs angeordnet. Aufgrund der geometrischen und sterischen Anforderungen an dieser Position ist in diesem *turn* ein Glycinrest konserviert (Abbildung 4-8b). Neben hydrophoben und polaren Kontakten zwischen Hauptketten- und Seitenkettenatomen (siehe unten) tragen möglicherweise Wechselwirkungen zwischen den Helixdipolen zur Stabilität der Superhelix bei.

Die strukturelle Ähnlichkeit der einzelnen zwei-Helixbündel spiegelt sich auf Sequenzebene nur schwach wieder (Abbildung 4-8b). Die meisten Reste an Positionen mit konservierten physikalisch-chemischen Eigenschaften sind an der Stabilisierung einzelner zwei-Helixbündel und der Anordnung aufeinanderfolgender Bündel beteiligt, insbesondere durch hydrophobe Wechselwirkungen. Ein Alaninrest im N-terminalen Teil von Helix B, 5 Reste nach dem konservierten Gly (*G+5*), ist in die Packungsfläche der Helices A und B gerichtet (Abbildung 4-8a). Dieser Rest interagiert mit den Seitenketten der Reste 3 und 4 Positionen vor dem Gly (*G-3* oder *G-4*). *G-3* interagiert außerdem mit der Seitenkette von *G+2*. *G-11* ist ebenfalls in die Kontaktfläche der Helices A und B gerichtet, zwischen die Seitenketten der Reste *G+11* und *G+12*. Ein Kontakt zum vorangehenden Bündel geht von *G-5* aus, das zwischen *G-3* und *G+6* des vorhergehenden Bündels packt. *G-8* und *G-9* tragen ebenfalls zu dieser Fläche bei, indem sie mit *G+9* des vorangehenden Motivs wechselwirken. Auch

Wechselwirkungen zwischen polaren Seitenketten sind an der Helixpackung beteiligt, z.B. zwischen Ser535 und Thr550 (Abbildung 4-8a). Sie bilden jedoch kein ausgeprägtes Konservierungsmuster, während hydrophile Seitenketten an den lösungsmittlexponierten Positionen  $G+3$  und  $G+14$  durchaus konserviert sind. Aufgrund der superhelikalen Struktur, die sich aus der Wiederholung der zwei-Helixbündel ergibt, wird für das hier beschriebene Sequenzmotiv der Name SUPR (*SUPERhelical Peptide Repeats*) eingeführt.



**Abbildung 4-8:** Strukturbasierter Sequenzvergleich der zwei-Helixbündel-Motive in DT3. Der Superhelix-Faltungstyp von DT3 weist einige schwach konservierte Positionen auf. (a) Der Ausschnitt der DT3-Struktur zeigt, daß die meisten der konservierten Reste an der Packung der Helices in den zwei-Helixbündeln und der aufeinanderfolgenden Bündel beteiligt sind. (b) Im Sequenzvergleich der Motive ist zu erkennen, daß der *loop* zwischen Helices A und B und der N-Terminus von Helix B am stärksten konserviert ist.

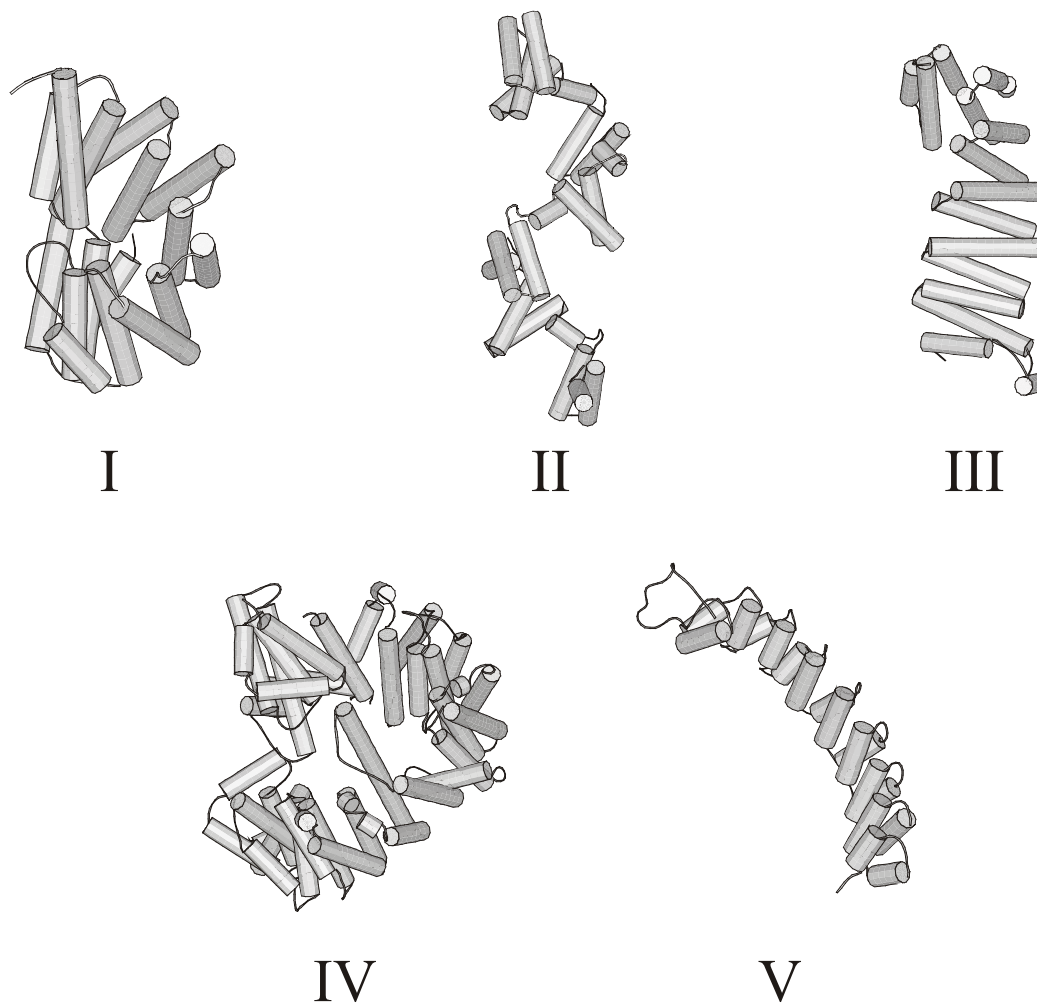
In der kleinen C-terminalen Teildomäne verbindet die kurze  $\alpha$ -Helix C1 (vier Aminosäuren) ein zwei-Helixbündel (Helices C2 und C3) mit dem Ende der Superhelix. Die beiden Helices sind jeweils 14 Aminosäuren lang und nahezu senkrecht zur Superhelixachse orientiert. Die C1-Helix ist gegen die Unterfläche der Superhelix gepackt und bildet Kontakte aus, die denen

zwischen zwei-Helixbündeln aufeinanderfolgender superhelikaler Windungen ähneln. Das C-terminale Bündel ist vom Zentrum der Superhelix verschoben, so daß der Superhelixtunnel für das Lösungsmittel frei zugänglich ist.

#### 4.1.7 Vergleich der DT3-Struktur mit anderen Helix-Repeat-Faltungstypen

Der Vergleich der DT3-Struktur mit den in der *Protein Data Bank* hinterlegten Proteinstrukturen zeigt, daß die kompakte DT3-Superhelix mit geschlossenen Wänden bisher einzigartig ist. DT3 (Abbildung 4-9 I) weist nur lokal Strukturähnlichkeiten zu anderen Helix-Repeat-Faltungstypen auf, am stärksten zu den drei *tetratricopeptide repeats* (TPRs) der humanen Proteinphosphatase 5 (Das *et al.*, 1998) (hPP5; DALI Z-Wert 14,3, r.m.s. Abweichung für 142 C $\alpha$ -Positionen 2,5 Å). Das TPR-Motiv ist ein 34 Aminosäuren langes, degeneriertes Sequenzmotiv, das in 3 bis 16 Kopien auftritt. Das Motiv enthält ein konserviertes Muster an kleinen und großen hydrophoben Resten und ist für die Interaktionen mit anderen Proteinen verantwortlich. Die TPRs der hPP5 falten ebenso wie die SUPR-Motive in DT3 in eine antiparallele Helix-loop-Helix-Struktur, die durch Interaktionen der konservierten Reste stabilisiert wird. Im längeren DT3-Motiv führen längere Helices und eine andere Helixpackung zu einem abweichenden Konservierungsmuster und zu einer anderen Gesamtstruktur. Basierend auf der experimentell bestimmten hPP5-Struktur modellierten Das *et al.* (1998) eine TPR-Struktur mit zwölf Motiven (Abbildung 4-9 II). Sie erhielten eine Superhelix mit einer Ganghöhe von 60 Å, einem Durchmesser von 42 Å und sieben Motiven pro Helixwindung. Trotz der lokalen Ähnlichkeit ist die Packung der Superhelix in DT3 kompakter. Dies spiegelt sich wieder in der Ganghöhe von 30 Å bei einem Durchmesser von 35 Å und 5 Motiven pro Superhelixwindung.

Lokale Strukturähnlichkeit bei abweichender Gesamtstruktur ergaben auch die Vergleiche mit Sec17 (Rice & Brünger, 1999) (Z-Wert 12,9; Abbildung 4-9 III) und 14-3-3-Proteinen (Liu *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1995) (Z-Wert 10,6). Sec17 ist ein Adapterprotein, das an der Regulation des zellulären Membranverkehrs beteiligt ist. Seine zwei-Helixbündel bilden eine ausgestreckte Superhelix mit einer Ganghöhe, die doppelt so groß ist wie die der TPR-Helix. Dadurch ergibt sich eine deutlich flachere Superhelixfurche. 14-3-3-Proteine liegen als Dimere in der Zelle vor und binden phosphorylierte Peptide und Proteine. Die Interaktion wird über eine Furche im Dimer vermittelt, die durch antiparallele  $\alpha$ -Helices gebildet wird, welche jedoch nicht als regelmäßig wiederholte zwei-Helixbündel angeordnet sind.



**Abbildung 4-9: Vergleich der DT3-Superhelix mit anderen superhelikalen Proteinen.** Struktur der superhelikalen Teildomäne in DT3 (I). Modell für eine TPR-Superhelix, basierend auf der Struktur der drei TPR-Motive in hPP5 (II). Superhelikale Anordnung der zwei-Helixbündel in Sec17 (III). Superhelix-Struktur der HEAT-*Repeats* in Importin- $\beta$  (IV). Superhelix aus zwei-Helixbündeln in LRV (V). (II) und (III) weisen die größte lokale Strukturähnlichkeit zu DT3 auf, während (IV) und (V) den geschlossenen Wänden der DT3-Superhelix am nächsten kommen.

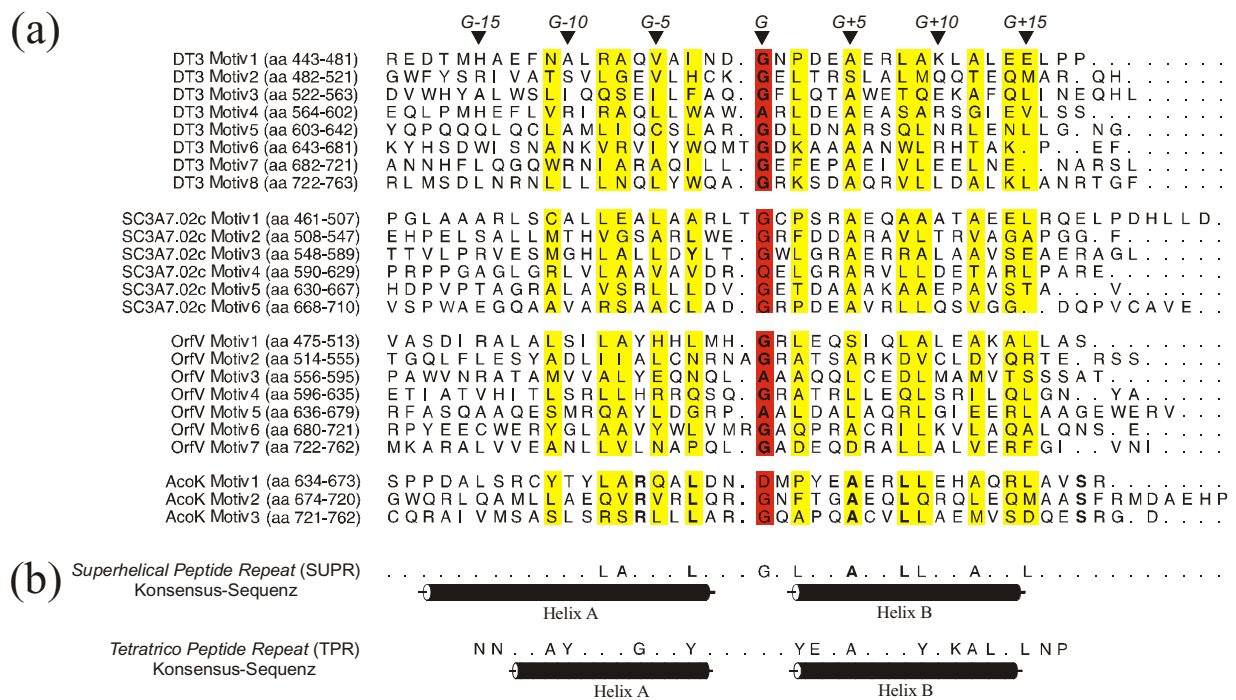
Die Helix-Repeat-Faltungstypen der *leucine-rich variant repeat* Motive (im LRV-Protein; Peters *et al.*, 1996), von HEAT Motiven (z.B. in PR65A; Groves *et al.*, 1999) und ähnlichen Helix-Doppelschichten (z.B. in Protein-Farnesyltransferase; Park *et al.*, 1997), in der schweren Kette des Clathrins (Ybe *et al.*, 1999) sowie der Armadillo-Motive (in  $\beta$ -Catenin; Huber *et al.*, 1997) und in Importin- $\alpha$  (Conti *et al.*, 1998) weisen kaum strukturelle Ähnlichkeiten zu DT3 auf (Z-Werte kleiner 6).

Trotz der lokalen Strukturähnlichkeiten ist die Gesamtstruktur der DT3-Superhelix mit ihren geschlossenen Wänden einzigartig. Dieser Gesamtstruktur kommen die HEAT-*Repeats* des Importin- $\beta$  am nächsten, die eine Superhelix mit 50 Å Durchmesser und einem schmalen Spalt zwischen den Superhelixwindungen bilden (Cingolani *et al.*, 1999) (Abbildung 4-9 IV).

Eine ähnliche Superhelix mit nahezu geschlossenen Wänden wurde außerdem für die *leucine-rich variant repeats* in LRV berechnet (Abbildung 4-9 V), ausgehend von der Struktur einer halben Superhelixwindung (Peters *et al.*, 1996).

#### 4.1.8 Das SUPR-Motiv kommt in weiteren Proteinsequenzen vor

Die Proteine der MalT-Familie großer Regulatorproteine (Valdez *et al.*, 1999) weisen Homologien in den Domänen I, II und IV auf (Danot, 2000). Für Domäne III wurde jedoch nur extrem niedrige oder gar keine Homologie gefunden. Die Analyse der Proteinsequenzen der MalT-Familie zeigt jedoch, daß in den meisten dieser Proteine SUPR-Motiv oder sehr ähnliche, wiederholte Sequenzmotive zu finden sind. Die größte Ähnlichkeit weisen die Motive in SC3A7.02c aus *Streptomyces coelicolor* (PX:E1313491; sechs Motive), OrfV aus *Pseudomonas alcaligenes* (PX:G3978477; sieben Motive) und AcoK aus *Klebsiella pneumoniae* (PX:G504484; drei Motive) auf (Abbildung 4-10a).



**Abbildung 4-10: SUPR-Motive in Proteinen der MalT-Proteinfamilie.** (a) Der struktur-basierte Vergleich der SUPR-Motive in DT3, erweitert um die Motive, die in den Sequenzen weiterer LAL-Proteine identifiziert wurden. Die angegebene Numerierung bezieht sich auf die am stärksten konservierten Position (rot). Positionen mit geringerer Konservierung der physikalisch-chemischen Eigenschaften sind gelb hinterlegt. (b) Konsensus-Sequenz für die SUPR-Motive in den Proteinen der MalT-Familie. Lediglich Alaninreste und Leucinreste sind zusätzlich zum Glycin im *turn* zwischen Helix A und Helix B konserviert. Konservierungsmuster und Länge der Helix A unterscheiden sich von denen der TPRs (Small & Peters, 2000), ebenso wie die Strukturen der beiden Motive (siehe Abschnitt 4.1.7).

Die Motive in diesen Proteinen wurden dazu verwendet, ein Sequenzprofil zu erstellen, mit dem die Sequenzen der SWISSPROT, PIR und TrEMBL-Datenbanken durchsucht wurden. Auf die Treffer dieser Datenbanksuche (kombinierte p-Werte unter  $1,0 \times 10^{-6}$ ) wurden weitere Kriterien angewandt: Drei oder mehr Motive von 34-48 Aminosäuren Länge mußten in direkter Folge auftreten, und es durften keine Proline in den Bereichen zu finden sein, die vermutlich Helices bilden.

Die Proteinsequenzen, die Folgen von SUPR-Motiven entsprechend der genannten Kriterien enthalten, sind in Tabelle 4-4 aufgeführt. Die Gruppe umfaßt derzeit elf Proteine aus sechs prokaryontischen Organismen. Es handelt sich um große Proteine von ca. 900 Aminosäuren Länge, nur eine Sequenz ist kürzer als 750 Aminosäuren. Die SUPR Motive sind im Zentrum der Sequenzen zu finden, N- und C-terminal flankiert von weiteren Domänen.

**Tabelle 4-4: Proteinsequenzen, die mindestens drei direkte Wiederholungen des SUPR Motivs aufweisen.** Die Sequenzen sind nach der Ähnlichkeit zum SUPR-Profil sortiert.

Protein	Spezies	Datenbank Eintrag	Länge (aa)	Funktion	Walker A-Motiv (Untergruppe)	Mindestanzahl SUPR-Motive
SC3A7.02c	<i>S. coelicolor</i>	PX:E1313491	892	Transkriptionsregulator <sup>1</sup>	ja (I)	6
MalT	<i>E. coli</i>	PIR_1:RGECMT	901	Transkriptionsaktivator	ja (I)	8
AcoK	<i>K. pneumoniae</i>	PX:G504484	921	Transkriptionsaktivator	ja (I)	3
OrfV	<i>P. alcaligenes</i>	PX:G3978477	877	Transkriptionsaktivator <sup>1</sup>	ja (I)	7
SCJ21.13	<i>S. coelicolor</i>	TrEMBL:Q9S1Z4	919	Transkriptionsregulator <sup>1</sup>	ja (I)	3
GGDEF Protein	<i>D. radiodurans</i>	TrEMBL:Q9RYH1	860	unbekannt	nein (II)	6
GGDEF Protein	<i>D. radiodurans</i>	TrEMBL:Q9RYL5	533	unbekannt	nein (II)	6
AfsR	<i>S. coelicolor</i>	PIR_3:JQ0488	993	Transkriptionsaktivator	ja (I)	6
SC9C5.28	<i>S. coelicolor</i>	TrEMBL:CAB93384	750	unbekannt	ja (I)	3
MTV036.21	<i>M. tuberculosis</i>	PIR_2:E70834	1085	Transkriptionsregulator	ja (I)	5
SCM1.10	<i>S. coelicolor</i>	TrEMBL:Q9RD32	888	Transkriptionsregulator <sup>1</sup>	ja (I)	3

<sup>1</sup> vorgeschlagene Funktion, noch nicht experimentell bestätigt

Die Proteine in Tabelle 4-4 können in zwei Untergruppen eingeteilt werden. Die erste Untergruppe umfaßt neun Transkriptionsregulatoren, die als weitere Gemeinsamkeit ein Walker A-Motiv (Saraste *et al.*, 1990) N-terminal von den SUPR-Motiven aufweisen. Das N-terminale Walker A-Motiv ist auch in den Proteinen der MalT-Familie vorhanden, in deren Sequenz keine SUPR-Motive identifiziert werden konnten. Möglicherweise benutzen die

Proteine der MalT-Familie und die übrigen Proteine der Untergruppe I verwandte Mechanismen für die Transkriptionsregulation. Die zweite Untergruppe in Tabelle 4-4 umfaßt zwei Proteine mit unbekannter Funktion, die beide das funktionell uncharakterisierte GGDEF-Motiv aufweisen. Das Auftreten von SUPR-Motiven in diesen Sequenzen weist darauf hin, daß die superhelikale Struktur von DT3 in regulatorischen Proteinen weit verbreitet und nicht auf Transkriptionsregulatoren beschränkt ist.

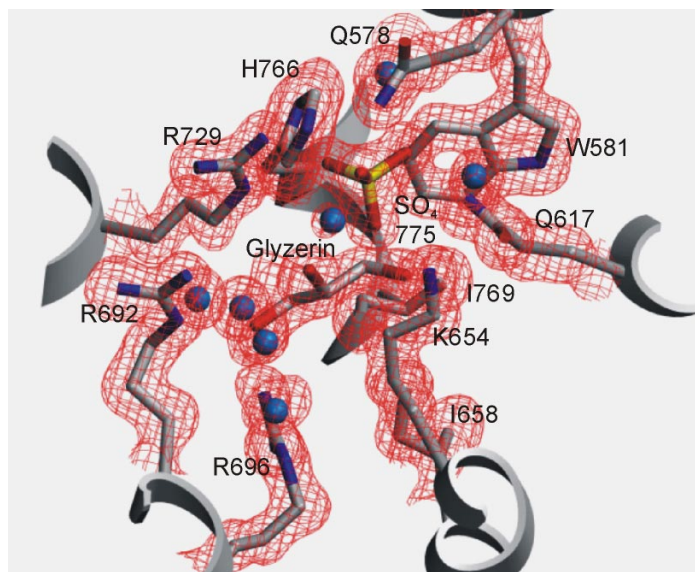
Das strukturell zu DT3 ähnlichste *Helix-Repeat*-Motiv ist das TPR-Motiv. Diese Verwandtschaft spiegelt sich auf Sequenzebene schwach wieder (Abbildung 4-10b). Die bevorzugten Aminosäuren an Positionen  $G+5$ ,  $G+12$  und  $G+15$  sind identisch. Die Reste an Positionen  $G-3$ ,  $G+2$  und  $G+9$ , die an der Packung der Helices beteiligt sind, unterscheiden sich jedoch in der Größe der bevorzugten hydrophoben Seitenkette. Zusammen mit einigen völlig unterschiedlich besetzten Positionen (z.B.  $G-11$  und  $G-6$ ) und Unterschieden in der Motiv-Länge führen diese Abweichungen zu einer auseinandergezogeneren Struktur für die TPR-Superhelix. Die Datenbanksuchen mit dem SUPR-Motiv ergaben zunächst zwei Treffer für Proteine, die zuvor als TPR-Proteine klassifiziert worden waren (TrEMBL:Q9RVT5 und PIR:A69496). Beide Treffer wurden aufgrund der zusätzlichen Kriterien für SUPR-Motive verworfen. Diese Motive scheinen jedoch auch keine TPRs zu sein, da sie in Motiv-Länge und Aminosäuremuster vom TPR-Konsensus abweichen. Diese vermutliche Fehlklassifizierung legt nahe, bei der Einteilung von Proteinen aufgrund von Homologien zu degenerierten Motiven zusätzliche Kriterien anzuwenden.

Durch Datenbanksuchen mit einem Sequenzprofil, das nur mit den Motiven aus DT3 erstellt wurde, konnte ein weiteres verwandtes Motiv identifiziert werden. In der leichten Kette des Kinesins aus *Plectonema boryanum* (PIR:U78597) treten Wiederholungen eines 41 aa langen Motivs auf, das dem SUPR-Motiv ähnelt, jedoch weitere konservierte Positionen aufweist. Diese zusätzlichen Konservierungen könnten zu einer anderen Packung von Helices führen, sie könnten aber auch in einer DT3-ähnlichen Struktur eine funktionelle Aufgabe haben.

#### **4.1.9 Der Superhelixtunnel in DT3 enthält eine potentielle Maltotriose-Bindungsstelle**

In der Mitte des Superhelixtunnels in DT3 konnte ein gebundenes Glycerinmolekül identifiziert werden (Abbildung 4-11). Glycerin diente als Cryoprotectans und die Analyse nativer Daten, die bei Raumtemperatur aufgenommen wurden, zeigte keine entsprechende Elektronendichte. B-Faktoren um 26 Å zeigen, daß das Glycerin eine hohe Besetzung aufweist und stark gebunden ist. Das Molekül interagiert mit Gln617 (3,1 Å), Arg696 (3,2 Å), einem fest gebundenen Sulfatmolekül (2,7 und 2,8 Å) und den Wassermolekülen S843 (2,7 Å), S899

(2,8 Å), und S927 (2,9 und 3,0 Å). Die Konformation des Glycerins entspricht der von C4 bis C6 eines Glucopyranosemoleküls. Das O3 des Glycerins besetzt die Position des C6 eines potentiellen Zuckerliganden. Zusätzliche Elektronendichte deutet allerdings auf eine zweite Konformation hin, in der O3 wie das O5 eines Glucosemoleküls orientiert ist. Das Glycerinmolekül besetzt scheinbar die Bindungsstelle für den MalT-Induktor Maltotriose. Die Bindung von Maltotriose an DT3 konnte nachgewiesen werden (Danot, 2000), und die identifizierte Bindungsstelle stellt ausreichend Platz und Interaktionspartner für einen solchen Zuckerliganden zur Verfügung



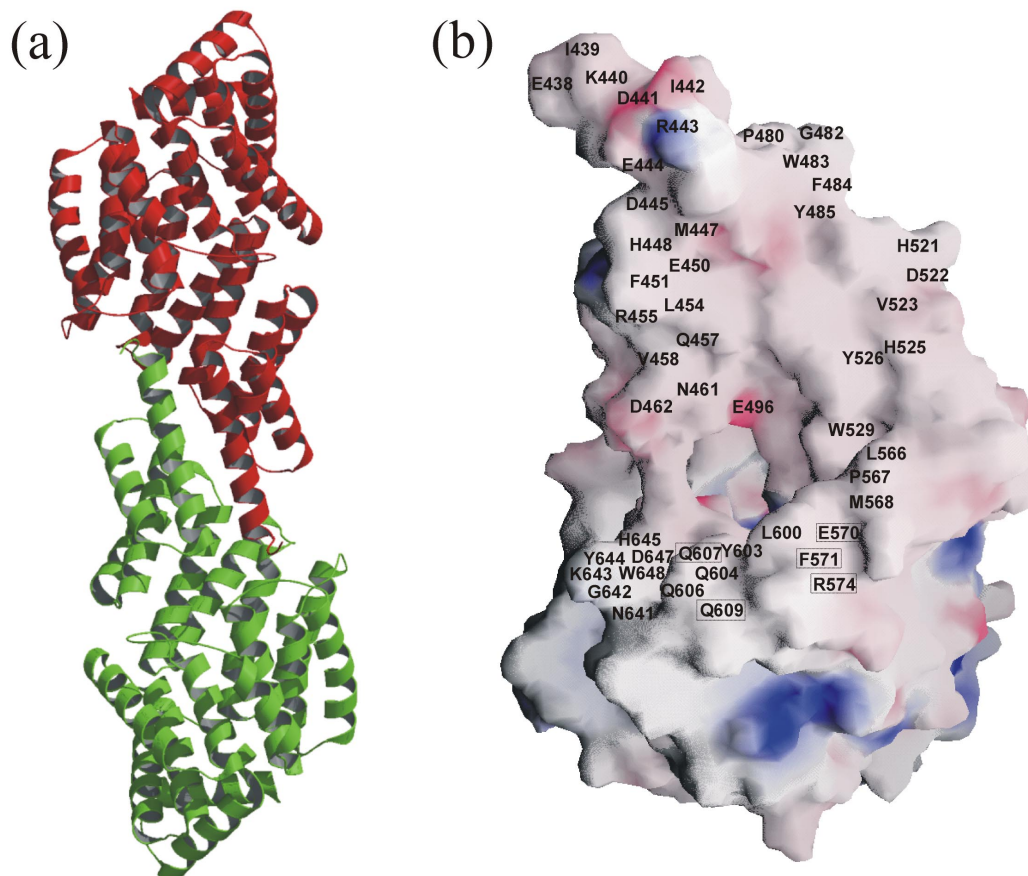
**Abbildung 4-11: Potentielle Maltotriose-Bindungsstelle im Innern der DT3-Superhelix.** Dargestellt sind die Seitenketten und Wassermoleküle (blaue Kugeln) nahe der gebundenen Liganden Glycerin und Sulfat. Dem Modell ist eine  $2F_o-F_c$ -Elektronendichte überlagert, die bei einer Auflösung von 1,45 Å berechnet und bei  $1,8\sigma$  konturiert wurde.

Benachbart zum Glycerinmolekül ist ein Sulfation im DT3-Superhelixtunnel gebunden. Das Sulfat interagiert mit Gln578 (2,7 Å Abstand), Gln617 (2,9 Å), Lys654 (2,8 Å), Arg729 (2,8 Å und 3,1 Å) und His766 (2,8 Å), sowie den Solvensmolekülen S712 (2,8 Å), S1080 (2,6 Å) und S1211 (2,9 Å). Zusammen könnten die beiden Bindungsstellen eine Erkennungstasche für einen phosphorylierten Zucker darstellen. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, daß es sich um die Bindungsstelle für den Induktor von MalT handelt, da Maltose-1-phosphat ebenso wie Maltotriose die Transkriptionsaktivierung durch MalT induzieren kann (Decker *et al.*, 1999).

#### 4.1.10 Die DT3-Superhelix bildet eine Protein/Protein-Interaktionsfläche

Die Interaktionsfläche zwischen den DT3-Molekülen, die über eine kristallographische zweifache Rotationsachse zueinander in Beziehung stehen, ist außergewöhnlich groß (Abbildung 4-12a). Durch diese Interaktion werden 12 % (2111 Å<sup>2</sup>) der Oberfläche eines Monomers (17480 Å<sup>2</sup>) für das Lösungsmittel unzugänglich.





**Abbildung 4-12: DT3 Dimer im Kristallgitter.** (a) Zwei DT3-Monomere, die über eine kristallographische  $C_2$ -Achse zueinander in Beziehung stehen. Die beiden Monomere interagieren über eine große Kontaktfläche und lagern jeweils ihre lange N-terminale Helix in die konkave Furche des Partnermonomers ein. (b) Ladungsverteilung auf der Oberfläche des DT3-Moleküls. Die Reste der Interaktionsfläche mit dem Partnermonomer sind beschriftet, Reste mit einem Rahmen um die Beschriftung liegen im Innern der Superhelix. Die hydrophobe Interaktionsfläche umfaßt die Kante und die konkave Innenfläche der Superhelix.

Die Interaktionsfläche besteht aus der langen N-terminalen Helix 1A, der konkaven Innenfläche der Motive 1-5 und der Kante, die von den *loops* zwischen diesen Motiven gebildet wird (Abbildung 4-12b). Aufgrund der symmetrischen Anordnung liegen die Helices 1A der beiden Monomere antiparallel zueinander, und auch die beiden Kanten interagieren symmetrisch miteinander. Die Interaktionsfläche hat hydrophoben Charakter, 65 % der beteiligten Atome sind unpolar. Außerdem enthält der Wechselwirkungsbereich zehn Wasserstoffbrückenbindungen und vier Salzbrücken. Größe und Hydrophobizität der Interaktionsfläche sind typisch für interne Regionen von Proteinen und für Interaktionsflächen oligomerer Proteine (Dasgupta *et al.*, 1997; Jones & Thornton, 1995). Das weist darauf hin, daß es sich um eine physiologisch genutzte Protein/Protein-Interaktionsfläche handelt. Weitere Hinweise darauf sind ähnliche Kristallkontakte in anderen Helix-Repeat-Faltungstypen, die über physiologische Protein/Protein-Wechselwirkungsflächen vermittelt

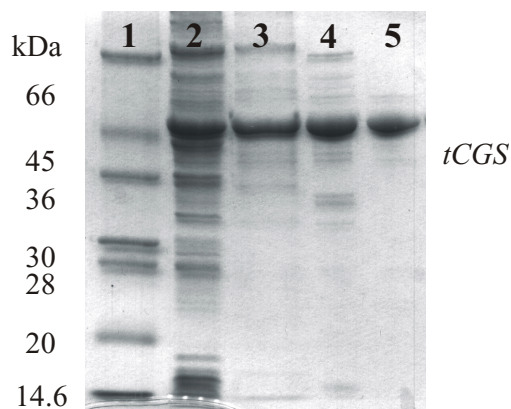
werden, und die Beteiligung aller bekannten *Helix-Repeat*-Faltungstypen an Protein/Protein-Interaktionen (siehe Abschnitt 5.1.2).

In einer hydrophoben Tasche der Dimerisierungsfläche wurde Elektronendichte für einen unbekanntem Liganden gefunden. Der Ligand besteht aus einem planaren Sechsring mit einem Substituenten, der in Richtung zweier polarer Interaktionspartner orientiert ist. Benzoesäure konnte in die Elektronendichte eingepaßt werden, aber die genaue Identität des Liganden und seine physiologische Funktion sind noch Gegenstand weiterer Untersuchungen.

## 4.2 Cystathionin- $\gamma$ -Synthase aus *Nicotiana tabacum*

### 4.2.1 Expression und Reinigung von tCGS

CGS aus *N. tabacum* (tCGS) wurde mit dem Konstrukt p1117 (Clausen *et al.*, 1999) in *E. coli* überexprimiert. Die Reinigung zu apparenter Homogenität gelang durch Kombination dreier Chromatographieschritte: Anionentauscherchromatographie an DEAE-Sephharose, hydrophober Interaktionschromatographie an Phenylsepharose, und einer abschließenden Gel-permeationschromatographie (Abbildung 4-13).



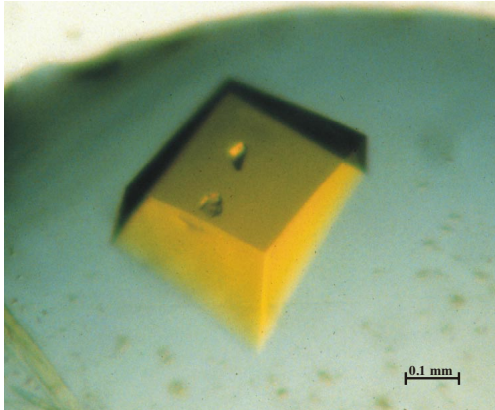
**Abbildung 4-13: Reinigung der tCGS, rekombinant exprimiert in *E. coli*.** Bahn 1: Molekulargewichtsstandard; Bahn 2: *E. coli*-Lysat; Bahn 3: Pool nach DEAE-Anionentauscherchromatographie; Bahn 4: Protein nach hydrophober Interaktionschromatographie an Phenylsepharose; Bahn 5: tCGS nach Gel-permeationschromatographie.

Pro Liter Kulturmedium wurden 2 mg reines, lösliches Protein erhalten. Da der Aktivitätstest für tCGS aufwendig und störanfällig ist, wurde die Reinigung nur über SDS-PAGE verfolgt. Die Reinigung verlief reproduzierbar und lieferte tCGS mit einer spezifischen Aktivität von ca. 3  $\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{mg})$ .

### 4.2.2 Kristallisation und Datenaufnahme

Kristallisationsbedingungen für tCGS wurden durch *sitting drop* Dampfdiffusionsexperimente bei 18 °C gefunden. Eine geeignete Reservoirolösung wurde mit Hilfe von *factorial screens*

(Carter & Carter, 1979) identifiziert und durch *grid screens* zu 0,1 M MES/NaOH, pH 6,0, 0,2 M Magnesiumacetat und 11 % PEG 8000 verfeinert. 5 µl Proteinlösung (10 mg/ml) wurden mit 4 µl Reservoirlösung gemischt. Dieses Tropfenverhältnis und die Äquilibration in Kunststoffschalen mit großem Reservoirvolumen (5 ml) waren essentiell, um Kristalle ausreichender Größe zu erhalten. Kristalle der Dimensionen 0,3 x 0,3 x 0,4 mm<sup>3</sup> wuchsen innerhalb von sechs Tagen (Abbildung 4-14).



**Abbildung 4-14: Kristall der tCGS.** Der Kristall wurde durch Dampfdiffusion gegen 0,1 M MES/NaOH, pH 6,0, 0,2 M Magnesiumacetat und 11 % PEG 8000 erhalten. Seine Größe von 0,4 x 0,3 x 0,3 mm<sup>3</sup> hatte der Kristall nach sechs Tagen erreicht.

Die tCGS-Kristalle konnten zum Ernten in der Kapillare mit Reservoirpuffer überschichtet werden, ohne daß ihre Streufähigkeit beeinträchtigt wurde. Die Kristalle streuten bei Raumtemperatur bis 2,7 Å Auflösung, ein vollständiger Datensatz mit 2,9 Å Auflösung konnte unter diesen Bedingungen aufgenommen werden (Tabelle 4-5). Die Auswertung der Diffraktionsdaten ergab ein orthorhombisch primitives Kristallgitter mit Zellkonstanten  $a = 120,0 \text{ \AA}$ ,  $b = 129,5 \text{ \AA}$ ,  $c = 309,8 \text{ \AA}$ . Die systematischen Auslöschungen für  $h00$  mit  $h \neq 2n$ ,  $0k0$  mit  $k \neq 2n$  und  $00l$  mit  $l \neq 2n$  zeigten, daß es sich bei allen drei zweifachen Symmetrieachsen um Schraubenachsen handelt, so daß die Raumgruppe zu  $P2_12_12_1$  bestimmt werden konnte.

**Tabelle 4-5: Diffraktionsdaten der tCGS-Kristalle**

Auflösungsbereich		$\infty$ -2,9 Å
Anzahl Reflexe	gemessen	473528
	$F \geq 2\sigma(F)$	307805
	unabhängig	95418
Vollständigkeit (2,9-3,0 Å)		88,2 % (86,4 %)
$I / \sigma(I)$ (2,9-3,0 Å)		6,9 (1,8)
$R_{\text{merge}}^1$ (2,9-3,0 Å)		14,8 % (55,4 %)

$$^1 R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl}(i) - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_{hkl}(i)}; I_{hkl}(i) \text{ ist die Intensität für die individuelle Messung } i,$$

$\langle I_{hkl} \rangle$  ist der Mittelwert für den entsprechenden Reflex.

### 4.2.3 Strukturbestimmung und Verfeinerung des tCGS-Modells

Die Kristallstruktur der tCGS wurde bei einer Auflösung von 2,9 Å gelöst. Die Phasenbestimmung gelang mit Hilfe von Patterson-Suchmethoden mit der CGS aus *E. coli* als Modell. Nach Berechnung der Rotations- und Translationsfunktionen wurde ein Modell erhalten, das einen Korrelationskoeffizienten von 34,9 % und einen R-Faktor von 48,4 % ergab. Die erhaltene Elektronendichte zeigte deutlich die Lage des PLP Cofaktors. Das Strukturmodell wurde bis zu einem R-Faktor von 20,1 % verfeinert ( $R_{\text{free}} = 25,0 \%$ ).

**Tabelle 4-6: Verfeinerung des tCGS-Strukturmodells**

Atomanzahl in der	aktive Proteinatome	24256
asymmetrischen Einheit	aktive Cofaktoratome	120
	aktive Lösungsmittelatome	326
R-Faktor / $R_{\text{free}}$ -Faktor <sup>1,2</sup>		20,1 % / 25,0 %
R.m.s. Abweichungen von	Bindungslängen	0,006 Å
Idealwerten	Bindungswinkel	1,2 °
	dihedrale Winkel	25,8 °
	B-Faktoren gebundener Atome	2,9 Å <sup>2</sup>
B-Faktoren	alle Atome	33,0 Å <sup>2</sup>
	Proteinatome	33,0 Å <sup>2</sup>
	Hauptkettenatome	32,1 Å <sup>2</sup>
	PLP Cofaktor	27,0 Å <sup>2</sup>
	Lösungsmittelatome	35,0 Å <sup>2</sup>
R.m.s. Abweichungen der	alle Proteinatome	0,25 Å
Atompositionen zwischen	Hauptkettenatome	0,15 Å
Monomer A und NCS-	PLP Cofaktor	0,04 Å
verwandten Molekülen		

$$^1 \text{ R-Faktor} = \frac{\sum \|F_{\text{obs}} - k|F_{\text{calc}}\|}{\sum |F_{\text{obs}}|}$$

<sup>2</sup> Der freie R-Faktor  $R_{\text{free}}$  wurde mit 5 % der Daten berechnet, die nicht für die Verfeinerung verwendet wurden.

Die asymmetrische Einheit wird aus acht tCGS Monomeren (Molekulargewicht 48017 Da) gebildet. Die Elektronendichten konnten daher durch achtfaches Mitteln im realen Raum verbessert werden. Für das Proteinrückgrat wurde durchgängige Elektronendichte erhalten. Die fehlende Dichte für die 47 N-terminalen Aminosäuren und die Seitenketten einiger Oberflächenreste entwickelte sich auch im Verlauf der Strukturverfeinerung nicht, was auf eine hohe Flexibilität dieser Reste hinweist. Die erhaltene Struktur zeigt nur geringe Abweichungen von der Standardgeometrie kleiner Peptide (Engh & Huber, 1991) (Tabelle 4-6). Der mittlere Fehler der Atomkoordinaten wurde mittels eines Luzatti-Plots (Luzatti, 1952) zu 0,33 Å bestimmt, und über die  $\sigma$ A-Methode (Read, 1986) zu 0,38 Å. Die dihedralen Winkel des Proteinrückgrats, abgesehen von denen einiger Glycine sowie von Glu107 und

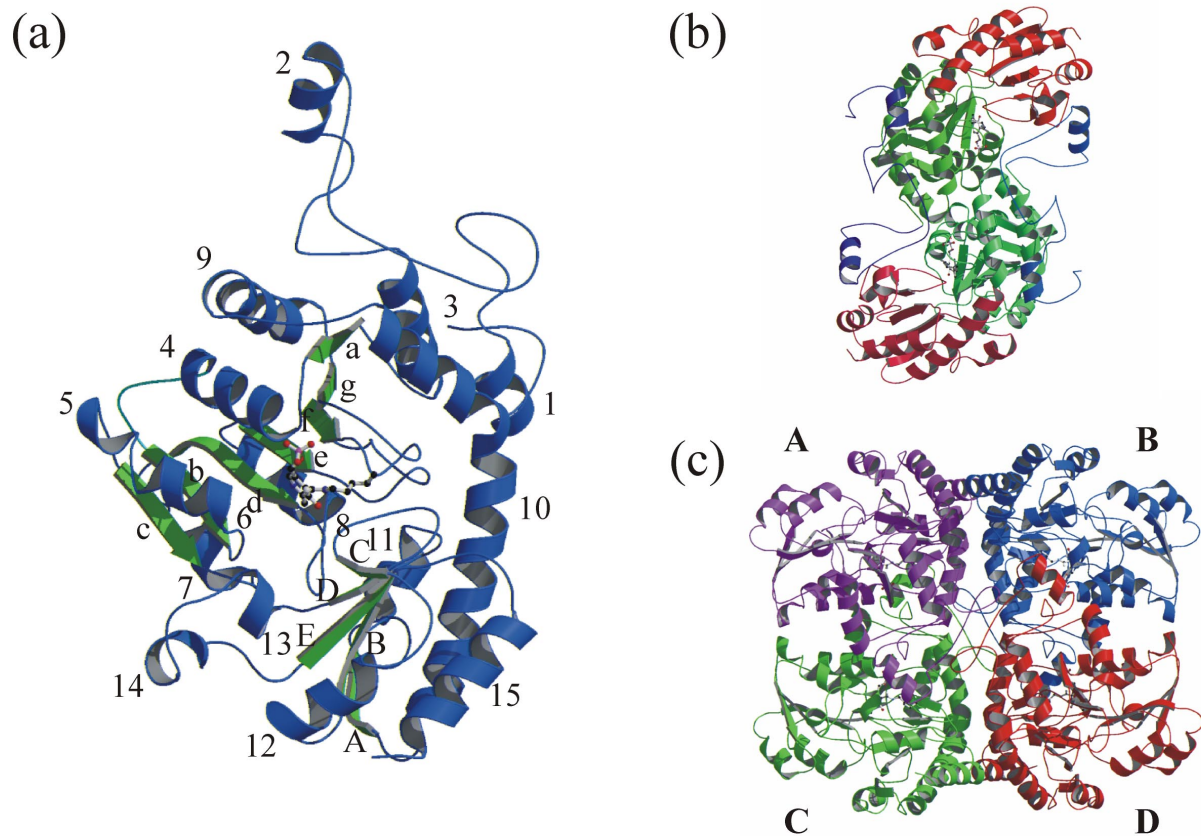
Thr241, liegen innerhalb der energetisch günstigen Bereiche des Ramachandran-Plots (Ramachandran & Sasisekharan, 1968), 86 % befinden sich in den sterisch günstigsten Regionen. Die beiden Ausreißer Glu107 und Thr241 liegen im Aktivzentrum des Enzyms und weisen gut definierte Elektronendichte auf.

#### 4.2.4 Strukturbeschreibung

Das tCGS-Monomer enthält einen PLP Cofaktor und 398 strukturell definierte Aminosäuren, mit 39 %  $\alpha$ -helikaler und 15 %  $\beta$ -Faltblattkonformation. Das Monomer besteht aus vier unterscheidbaren Regionen (Abbildung 4-15a). Dem ungeordneten N-terminalen Bereich (Aminosäuren 1-47) folgen drei Strukturdomänen: (I) Die N-terminale „Arm“-Domäne (Aminosäuren 48-109) ist am Aufbau des Aktivzentrums des Partnermonomers innerhalb des aktiven Dimers beteiligt. Sie besteht aus zwei kurzen Helices (Helices 1 und 2) und einem weitläufigen *loop*. (II) Die große PLP-Bindedomäne (Aminosäuren 110-310) enthält den PLP-Cofaktor und die meisten katalytisch wichtigen Reste. Zentrales Element dieser Domäne ist ein siebensträngiges, größtenteils paralleles  $\beta$ -Faltblatt (a, g, f, e, d, b, c; g ist antiparallel orientiert). Das  $\beta$ -Faltblatt ist um Helix 4 gebogen und wird durch sieben Helices zum Lösungsmittel (Helices 4-6 und 9) und zur Kontaktfläche der Domänen (Helices 3, 7 und 8) hin abgegrenzt. Der PLP-Cofaktor ist kovalent an Lys261 gebunden und liegt am Ende der  $\beta$ -Stränge d, e und f, orientiert in Richtung der C-terminalen Domäne. (III) Die C-terminale Domäne (Aminosäuren 311-445) ist an der Erkennung und Bindung des Substrats L-Cystein beteiligt. Diese Domäne enthält ein fünfsträngiges  $\beta$ -Faltblatt (A, B, E, D, C mit Richtungen +, -, +, -, -), das durch die Helices 10-15 zum Lösungsmittel hin abgegrenzt wird. C-terminale und PLP-bindende Domäne werden über die 33 Aminosäuren lange, um Leu312 geknickte Helix 10 verbunden.

In der Kristallstruktur liegt tCGS als Homotetramer vor, ebenso wie die CGS aus *E. coli* (Clausen *et al.*, 1998). Zwei Monomere, die über eine nichtkristallographische zweizählige Drehachse miteinander in Beziehung stehen, bilden ein aktives Dimer mit zwei Aktivzentren, wobei beide Monomere am Aufbau beider Aktivzentren beteiligt sind (Abbildung 4-15b). Zwei solche Dimere bilden über eine weitere nichtkristallographische Drehachse das Tetramer von 90 Å x 85 Å x 75 Å Größe (Abbildung 4-15c). Die zwei Monomere eines aktiven Dimers sind stark miteinander assoziiert. Die N-terminale Domäne eines Monomers steht leicht vom globulären Rest des Monomers ab und klammert das Protein an das Partnermonomer. Dadurch liegt die N-terminale Domäne eines Monomers am Rande des Aktivzentrums des Partnermonomers und ist an der Bildung des Aktivzentrums beteiligt

(siehe nächster Abschnitt). Die Bindung an das Partnermonomer kommt durch Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem *loop* der N-terminalen Domäne und der C-terminalen Domäne des Partnermonomers zustande. Phe88, Phe89, Leu95 und Ile96 interagieren mit einer hydrophoben Fläche, die hauptsächlich von Tyr384\*, Ile385\*, Ala386\*, His387\*, Ile401\*, Met402\* und Trp405\* gebildet wird (\*: Aminosäure im Partnermonomer innerhalb des aktiven Dimers).

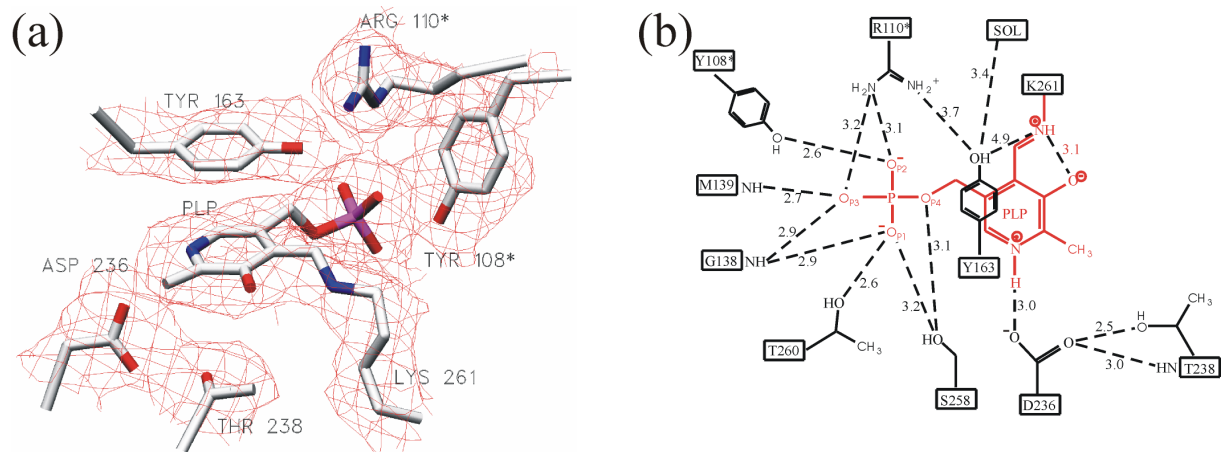


**Abbildung 4-15: Struktur der tCGS.** (a) Das Monomer mit der im Text verwendeten Nomenklatur für die Sekundärstrukturelemente. (b) Das Dimer wird durch eine zweifache Rotationssymmetrie senkrecht zur Bildebene aufgebaut. Beide Monomere sind am Aufbau beider Aktivzentren dieses sogenannten aktiven Dimers beteiligt. (c) Zwei tCGS Dimere bilden ein Tetramer, die physiologisch aktive Form der tCGS.

Die Kontakte zwischen den beiden aktiven Dimeren des Tetramers sind weniger stark ausgeprägt. Zwischen den Monomeren A und B besteht ein symmetrischer Kontakt durch Val428, den N-Terminus von Helix 10 (Tyr301, Leu302, Arg305, Gly306, His311, Leu312) und durch Reste im *loop* zwischen den  $\beta$ -Strängen f und g (His266, Asp268). Außerdem interagiert der N-terminale Bereich von Helix 1 mit dem N-Terminus von Helix 15 über ein Netz von Wasserstoffbrücken (Asn55, Ser56, Ser58, Ser59, Glu429, Asp430, Asp433). Die Monomere A und D interagieren über einen symmetrischen Kontakt der Reste 75 bis 88.

### Das Aktivzentrum der tCGS

Abbildung 4-16a zeigt das Aktivzentrum der tCGS überlagert mit achtfach gemittelter  $2F_o-F_c$ -Elektronendichte. Die schematische Darstellung in Abbildung 4-16b zeigt die Abstände und Wasserstoffbrücken der Reste im Aktivzentrum.



**Abbildung 4-16: Aktivzentrum der tCGS.** (a) Verfeinertes Modell des tCGS Aktivzentrums. Das Modell ist überlagert mit gemittelter  $2F_o-F_c$  Elektronendichte, die bei 2,9 Å Auflösung berechnet und bei  $1,2\sigma$  konturiert wurde. (b) Schematische Darstellung der Reste im Aktivzentrum der tCGS. Angegeben sind Wasserstoffbrücken und einige Abstände, die vermutlich für den Katalysemechanismus von Bedeutung sind.

Der PLP-Cofaktor ist über eine Schiff-Basenbindung kovalent mit Lys261 verknüpft (internes Aldimin). Der protonierte Stickstoff N1 des Pyridinrings wechselwirkt mit der Carboxylatgruppe (OD2) des Asp236, wodurch die positive Ladung an N1 stabilisiert und so die Elektrophilie des Cofaktors erhöht wird. Asp236 wiederum wird durch eine Wechselwirkung von OD1 zu Thr238 in seiner Position fixiert. Die Methylgruppe an C2 geht keine ausgeprägten Wechselwirkungen mit dem Protein ein. Die Hydroxylgruppe an C3 liegt vermutlich ionisiert vor und bildet eine Salzbrücke zur Schiff-Base aus. Die starke Absorption des Proteins bei 425 nm deutet darauf hin, daß die Schiff-Basenbindung des internen Aldimins protoniert vorliegt. Die daraus resultierende positive Ladung wird durch die Salzbrücke zu O3' kompensiert.

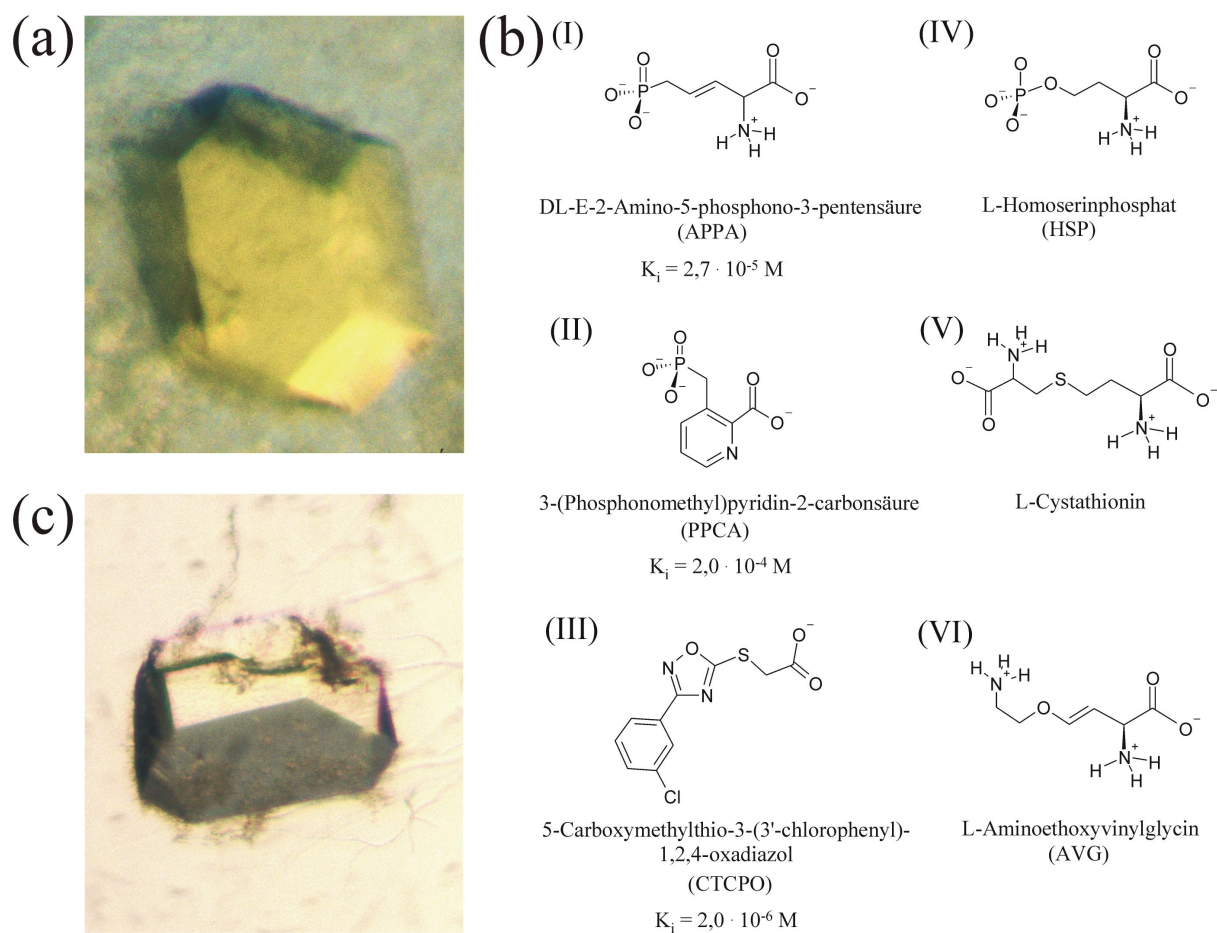
Die Bindung des PLP an das Aktivzentrum der tCGS erfolgt hauptsächlich über das Phosphat des Cofaktors. Die Phosphatgruppe wechselwirkt mit dem Makrodipol von Helix 4 und bildet neun Wasserstoffbrücken aus zu Gly138, Met139, Ser258, Thr260, Tyr108\* und Arg110\* (Abbildung 4-16b). Die Orientierung des PLP Pyridinrings wird fixiert durch van der Waals-Kontakte zu Thr238 und Ser258 auf der dem Protein zugewandten Seite und zu Tyr163 auf

der anderen Seite. Der Phenolring von Tyr163 ist in einem Abstand von 3,7 Å parallel zum Cofaktor angeordnet und geht mit ihm eine  $\pi$ - $\pi$ -stacking-Wechselwirkung ein.

Im Aktivzentrum der tCGS befinden sich im *loop* zwischen  $\beta$ -Strang d und Helix 8 zwei Proline mit *cis*-Peptidbindungen. Diese beiden Reste, Pro209 und Pro212, sind für die Bildung eines engen *turns* verantwortlich, der Asn211 enthält, welches an der Substratbindung beteiligt ist (siehe Abschnitt 4.2.6).

#### 4.2.5 Strukturen von tCGS-Inhibitorkomplexen

Durch *Microseeding* wurde eine monokline Kristallform der tCGS erhalten (Raumgruppe C2). Die Kristalle wuchsen bei 18 °C innerhalb von fünf Tagen zu einer Größe von 0,4 x 0,3 x 0,2 mm<sup>3</sup> (Abbildung 4-17a).



**Abbildung 4-17:** (a) Kristalle der tCGS der Raumgruppe C2. Die Kristalle wurden durch *Microseeding* mit Kristallen der Raumgruppe P<sub>2</sub><sub>1</sub>2<sub>1</sub> erhalten. (b) Inhibitoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Strukturen der tCGS wurden gelöst im Komplex mit APPA (I), PPCA (II), und CTCPO (III). Der Vergleich mit Homoserinphosphat (IV) zeigt, daß APPA ein Substratanalogon ist, während AVG (VI) dem Reaktionsprodukt Cystathionin (V) ähnelt. (c) tCGS-Kristall nach Zugabe von APPA. Die Entfärbung zeigt, daß eine Reaktion am PLP-Cofaktor stattfindet.



Komplexe der tCGS mit drei verschiedenen Inhibitoren (Abbildung 4-17b) konnten durch *soaking* der Kristalle mit der entsprechenden Inhibitorlösung erhalten werden. Die Strukturen wurden durch Anwendung von Patterson-Suchmethoden gelöst. Statistiken zu Datenaufnahme und Strukturverfeinerung sind in Tabelle 4-7 aufgeführt.

**Tabelle 4-7: Datenaufnahme und Strukturverfeinerung für die tCGS-Inhibitorkomplexe**

	tCGS-APPA	tCGS-PPCA	tCGS-CTCPO
Zellkonstanten	a = 312,2 Å, b = 166,0 Å, c = 161,8 Å; $\alpha = 90,0^\circ$ , $\beta = 90,2^\circ$ , $\gamma = 90,0^\circ$	a = 309,6 Å, b = 170,1 Å, c = 162,1 Å; $\alpha = 90,0^\circ$ , $\beta = 90,1^\circ$ , $\gamma = 90,0^\circ$	a = 312,4 Å, b = 165,6 Å, c = 162,2 Å; $\alpha = 90,0^\circ$ , $\beta = 89,8^\circ$ , $\gamma = 90,0^\circ$
Auflösung	20,0 – 3,2 Å	20,0 – 3,1 Å	20,0 – 3,25 Å
unabhängige Reflexe	116746	117451	118526
Vollständigkeit	87 % (77 %)	78 % (64 %)	93 % (92 %)
(äußerste Auflösungs- schale)			
R <sub>merge</sub> <sup>1</sup>	18,0 % (36,2 %)	14,6 % (32,7 %)	13,8 % (49,6 %)
(äußerste Auflösungs- schale)			
Anzahl Atome in der asymmetrischen Einheit			
Protein	36288	36288	36288
Cofaktor	180	180	180
Inhibitor	144	168	204
R <sub>cryst</sub> / R <sub>free</sub> <sup>2,3</sup>	23,9 % / 27,2 %	23,6 % / 26,8 %	22,6 % / 25,7 %
R.m.s. Abweichungen von Idealwerten:			
Bindungslängen	0,005 Å	0,005 Å	0,005 Å
Bindungswinkel	1,0°	1,0°	0,8°
dihedrale Winkel	0,5°	0,5°	0,5°
B-Faktoren gebundener Atome	3,8 Å <sup>2</sup>	2,9 Å <sup>2</sup>	3,5 Å <sup>2</sup>
B-Faktoren:			
Protein	22,8 Å <sup>2</sup>	22,2 Å <sup>2</sup>	36,1 Å <sup>2</sup>
PLP	23,5 Å <sup>2</sup>	21,0 Å <sup>2</sup>	39,6 Å <sup>2</sup>
Inhibitor	38,9 Å <sup>2</sup>	61,7 Å <sup>2</sup>	48,5 Å <sup>2</sup>

<sup>1</sup>  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl}(i) - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_{hkl}(i)}$ ;  $I_{hkl}(i)$  ist die Intensität für die individuelle Messung  $i$ ,  $\langle I_{hkl} \rangle$  ist der Mittelwert für den entsprechenden Reflex.

<sup>1</sup> R-Faktor =  $\frac{\sum \|F_{\text{obs}} - k|F_{\text{calc}}\|}{\sum |F_{\text{obs}}|}$

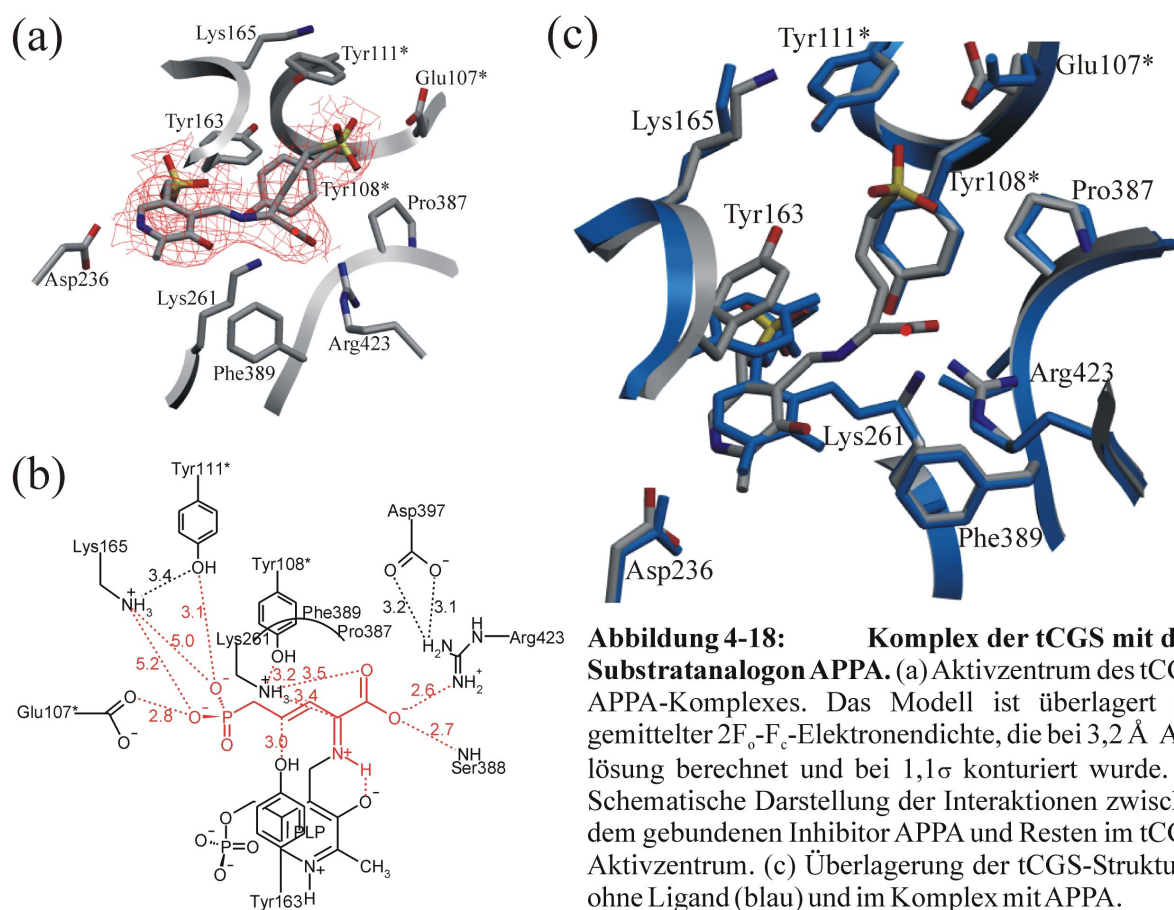
<sup>3</sup> Der freie R-Faktor R<sub>free</sub> wurde mit 5 % der Daten berechnet, die nicht für die Verfeinerung verwendet wurden.

Die asymmetrische Einheit wird durch drei tCGS-Tetramere gebildet. Die nicht-kristallographische Symmetrie zwischen den zwölf Monomeren wurde während der

Verfeinerung *restrained* und zur Mittelung der Elektronendichten im realen Raum ausgenutzt, so daß gut definierte Modelle mit geringen Abweichungen von Standardgeometrie-Werten erhalten wurden (Tabelle 4-7).

#### Komplex mit dem Substratanalogon DL-E-2-Amino-5-phosphono-3-pentensäure (APPA)

Die Struktur des tCGS-APPA-Komplexes wurde bei einer Auflösung von 3,2 Å gelöst und bis zu einem R-Faktor von 23,9 % verfeinert ( $R_{\text{free}}$  27,2 %). Die gut definierte Elektronendichte für den PLP-Cofaktor und den Liganden zeigt die kovalente Bindung des APPA an das PLP (Abbildung 4-18a). Die Interaktionen zwischen Enzym und APPA sind in Abbildung 4-18b schematisch dargestellt.



**Abbildung 4-18: Komplex der tCGS mit dem Substratanalogon APPA.** (a) Aktivzentrum des tCGS-APPA-Komplexes. Das Modell ist überlagert mit gemittelter  $2F_o - F_c$ -Elektronendichte, die bei 3,2 Å Auflösung berechnet und bei  $1,1\sigma$  konturiert wurde. (b) Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen dem gebundenen Inhibitor APPA und Resten im tCGS-Aktivzentrum. (c) Überlagerung der tCGS-Strukturen ohne Ligand (blau) und im Komplex mit APPA.

Die r.m.s. Abweichung von 0,3 Å für die Positionen der C $\alpha$ -Atome des freien und des komplexierten Enzyms zeigt, daß keine großen Konformationsänderungen in tCGS auftreten (Abbildung 4-18c). Die kovalente Bindung des APPA erfolgt wie mit dem Substrat durch Bildung einer Aldiminbindung zwischen PLP C4' und der  $\alpha$ -Aminogruppe des Inhibitors. Die Planarität der C4'-N-C $\alpha$ -C $\beta$ -Verknüpfung läßt vermuten, daß eine Tautomerisierung zu

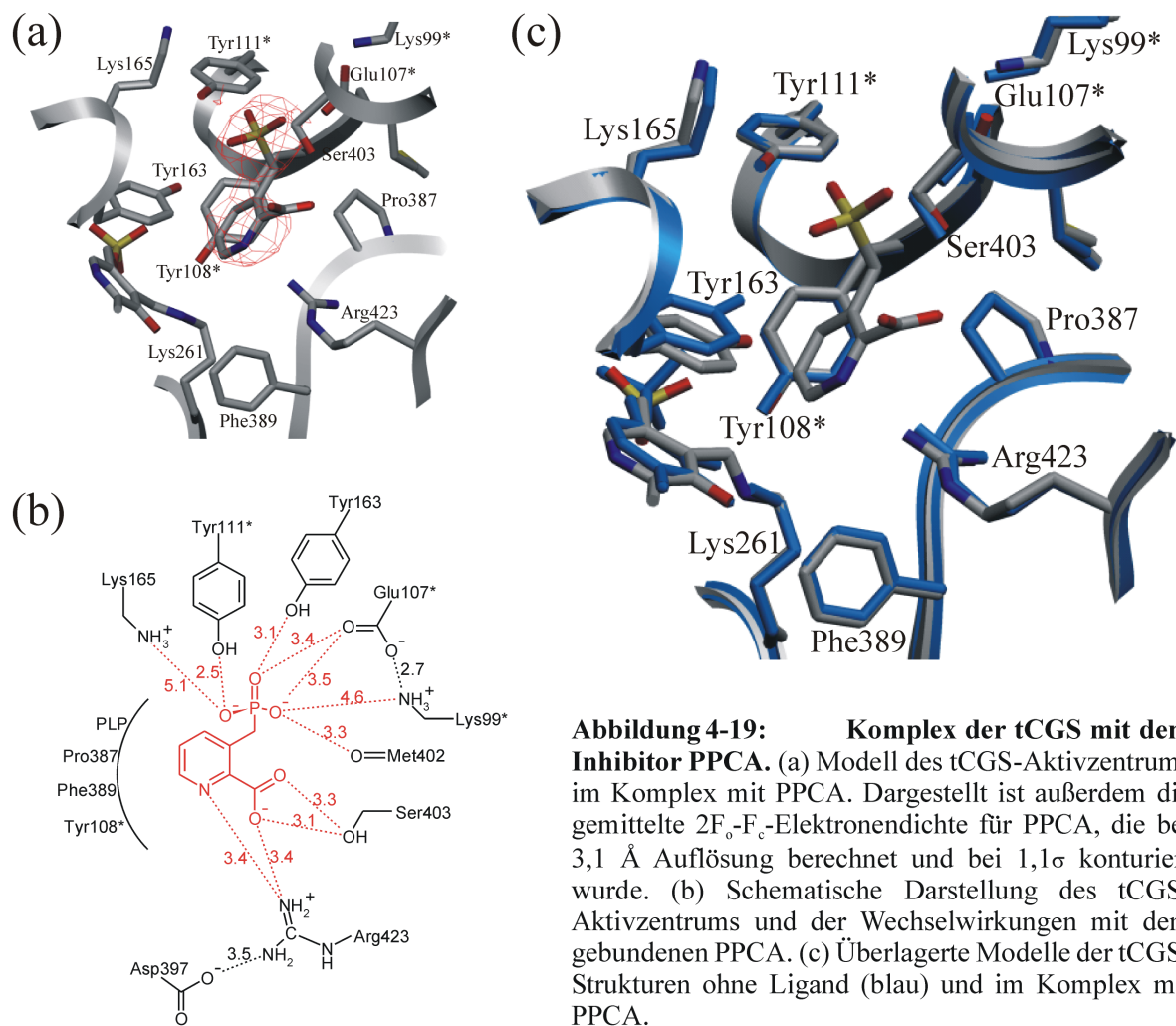
einem Ketimin stattgefunden hat, was den Verlust der tCGS-Absorptionsbande bei 425 nm bei APPA-Bindung erklärt.

Die Seitenkette des Lys261, die aus dem internen Aldimin freigesetzt wird, bewegt ihre Aminogruppe 2,5 Å weg vom PLP, hauptsächlich durch eine Rotation um die C $\delta$ -C $\epsilon$ -Bindung. Die Aminogruppe liegt nahe C $\alpha$  des APPA (3,4 Å). Der PLP-Cofaktor ist um eine Achse zwischen C5 und der C2-C3-Bindung verkippt. Dadurch bleibt der PLP Phosphatanker in seiner Bindungstasche (Gly138, Met139, Ser258, Thr260, Tyr108\*), während sich das N1 des Cofaktors 0,9 Å auf Tyr163 zubewegt. Dieser Rest folgt der Bewegung des Cofaktors durch eine Rückgratverschiebung (0,9 Å für C $\alpha$ ) und eine Verkipfung der Seitenkette, was zu einer Verschiebung seiner Hydroxylgruppe um 2,7 Å führt. Diese Gruppe ist nun in Richtung C $\gamma$  des APPA orientiert (3,0 Å Abstand). Durch diese Verschiebung wird Platz frei für die Seitenkette (C $\beta$  und C $\gamma$ ) des Inhibitors. Tyr163 ist in seiner neuen Position wieder koplanar zum PLP-Cofaktor angeordnet, wodurch die *stacking*-Interaktion zwischen den beiden aromatischen Ringsystemen aufrechterhalten bleibt.

Die Carboxylgruppe des APPA interagiert mit der Seitenkette von Arg423, die durch Asp397 positioniert wird. Ein Stickstoff des Arg423 liegt zwischen den Sauerstoffatomen der APPA Carboxylgruppe, die beiden anderen sind nur schwach an der Bindung beteiligt. Die Phosphonatgruppe des APPA liegt in der Phosphatbindungstasche, die von Glu107\*, Tyr111\* und Lys165 gebildet wird. Die Aminogruppe von Lys165 bewegt sich 1,7 Å hin zum Phosphonat unter Bildung einer Salzbrücke. Die Seitenkette von Glu107\* wird ebenfalls für die Wechselwirkung repositioniert (0,9 bzw. 1,4 Å Verschiebung der Carboxyl-Sauerstoffatome), wohingegen Tyr111\* bereits im unkomplexierten Enzym in einer geeigneten Position ist. Die Reste Phe389, Tyr108\* und Pro387, die eine hydrophobe Fläche im Aktivzentrum bilden, müssen für die Bindung von APPA ebenfalls nicht repositioniert werden.

#### *Komplex mit dem Pyridinderivat 3-(Phosphonomethyl)pyridin-2-carbonsäure (PPCA)*

Der Komplex der tCGS mit PPCA wurde bei einer Auflösung von 3,1 Å gelöst und die Struktur bis zu einem R-Faktor von 23,6 % verfeinert (R<sub>free</sub> 26,8 %). Der PLP-Cofaktor bildet weiterhin ein internes Aldimin mit Lys261 und der Inhibitor besetzt die Bindungstaschen für Seitenkette, Phosphat und Carboxylgruppe des Substrats HSP. Abbildung 4-19a zeigt das verfeinerte Modell des komplexierten Aktivzentrums und Abbildung 4-19b schematisch die Interaktionen zwischen tCGS und PPCA.



Für die Bindung von PPCA sind keine großen Konformationsänderungen in tCGS notwendig, die r.m.s. Abweichung der C $\alpha$ -Positionen beträgt 0,2 Å. Einige Seitenketten im Aktivzentrum werden allerdings repositioniert (Abbildung 4-19c). Arg423 interagiert mit der Carboxylgruppe des Inhibitors und ahmt so die Wechselwirkung mit der  $\alpha$ -Carboxylgruppe des Substratanalogons APPA nach. Geometrie und Abstände deuten jedoch auf eine schwächere Wechselwirkung als im APPA-Komplex hin. Die Guanidiniumgruppe des Arg423 ist 0,5 Å in Richtung des Inhibitors verschoben und interagiert vermutlich auch mit dem Pyridinstickstoff des PPCA (3,4 Å Abstand). Die 3'-Phosphonatgruppe ist zur Phosphatbindungstasche hin orientiert und interagiert mit Glu107\*, Tyr111\*, Lys99\*, Tyr163 und Lys165. Im Gegensatz zum APPA-Komplex orientiert sich Lys165 nicht hin zum Phosphonat des Inhibitors, sondern bleibt auf 5,1 Å Distanz. Die Aminogruppe von Lys99\* verschiebt sich dagegen um 0,6 Å zum Inhibitor und bildet eine Salzbrücke zum Phosphonat aus. Tyr111\* bleibt unverändert, und Glu107\* zeigt lediglich eine Rotation der Carboxylgruppe, um das Phosphonat aufzunehmen.

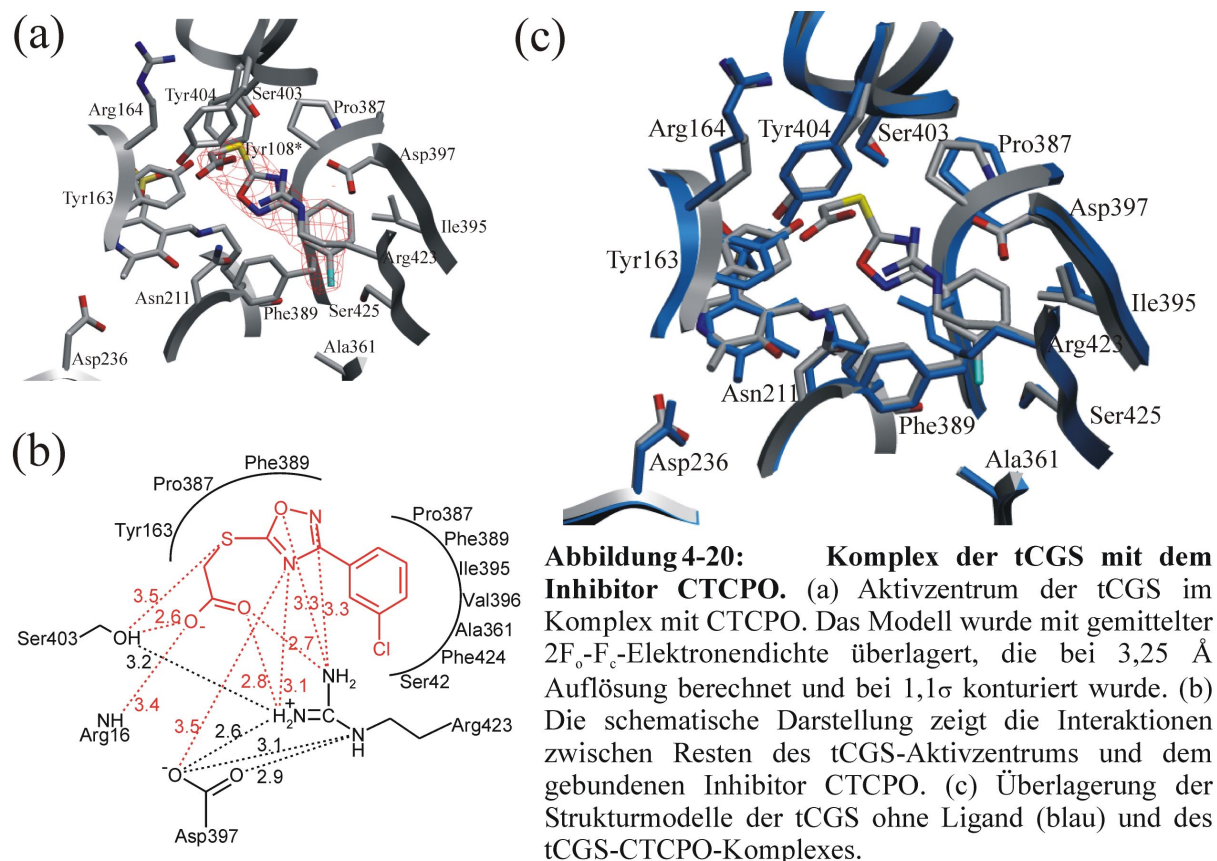
Tyr163 und der PLP-Cofaktor durchlaufen eine deutliche Konformationsänderung, um PPCA aufnehmen zu können. Durch eine Verkippung von Tyr163 bewegt sich dessen Hydroxylgruppe 1,2 Å hin zur Phosphonatgruppe des Inhibitors. Die Reorientierung des Tyr163 zerstört die *stacking*-Interaktion mit dem Pyridinring des PLP, ist aber notwendig, um Platz für PPCA zur Verfügung zu stellen. Der Winkel zwischen den Ringsystemen von Tyr163 und PLP wird durch die Rotation des Cofaktors um eine Achse von C3 nach C5 noch vergrößert, wobei PLP C4' weitere 0,4 Å von Tyr163 wegbewegt wird. Durch diese Bewegung wird weiterer Platz für PPCA frei, ohne daß die Cofaktor-Verankerung über das PLP-Phosphat beeinträchtigt wird. Die aromatischen Ringsysteme des Cofaktors und von Tyr163 tragen zu den hydrophoben Wechselwirkungen mit PPCA bei. Weitere beteiligte Reste sind Pro387, Phe389 und Tyr108\*, die für die PPCA-Bindung nicht repositioniert werden müssen.

*Komplex mit dem Inhibitor 5-Carboxymethylthio-3-(3'-chlorphenyl)-1,2,4-oxadiazol (CTCPO)*

Die Affinität des kürzlich identifizierten, kompetitiven Inhibitors CTCPO ( $K_i = 2 \mu\text{M}$ ; Steegborn *et al.*, zur Publikation eingereicht) ist eine Größenordnung höher als die des Substratanalogons APPA, des bislang stärksten bekannten Inhibitors. CTCPO kann keiner der bekannten CGS-Inhibitorclassen zugeordnet werden (Steegborn & Clausen, 2000). Um die Grundlage der Affinität von CTCPO zu tCGS zu klären, wurde die Struktur des tCGS-CTCPO-Komplexes gelöst. Die Struktur wurde bei einer Auflösung von 3,25 Å bestimmt und das Modell zu einem R-Faktor von 22,6 % verfeinert ( $R_{\text{free}} 25,7 \%$ ). Der Cofaktor bildet im CTCPO-Komplex wie im freien Enzym ein internes Aldimin mit Lys261. Der Inhibitor besetzt im Gegensatz zu APPA und PPCA nur teilweise die Substratbindungstasche, der größere Teil von CTCPO ist in einer bisher nicht identifizierten Tasche des tCGS-Aktivzentrums gebunden (Abbildung 4-20a). Die Wechselwirkungen zwischen CTCPO und tCGS sind in Abbildung 4-20b schematisch dargestellt.

Für die Bindung von CTCPO sind keine großen Konformationsänderungen notwendig. Die mittlere quadratische Abweichung der C $\alpha$ -Positionen von freiem und CTCPO-gebundenem Enzym beträgt 0,34 Å. Die Überlagerung der Aktivzentren zeigt, daß lediglich die Seitenketten von Arg423 und Tyr163 repositioniert werden (Abbildung 4-20c). Die Carboxylgruppe des CTCPO interagiert mit der Guanidiniumgruppe von Arg423 ähnlich wie das Substratanalogon APPA über elektrostatische Wechselwirkungen, möglicherweise begleitet von der Bildung einer Wasserstoffbrücke. Arg423 durchläuft eine ausgeprägte

Konformationsänderung (Ne verschiebt sich um 3.1 Å), um diese Interaktion zu optimieren. Die CTCPO Carboxylgruppe interagiert außerdem mit der Hydroxylgruppe von Ser403, die nahe des CTCPO-Schwefelatoms positioniert ist.

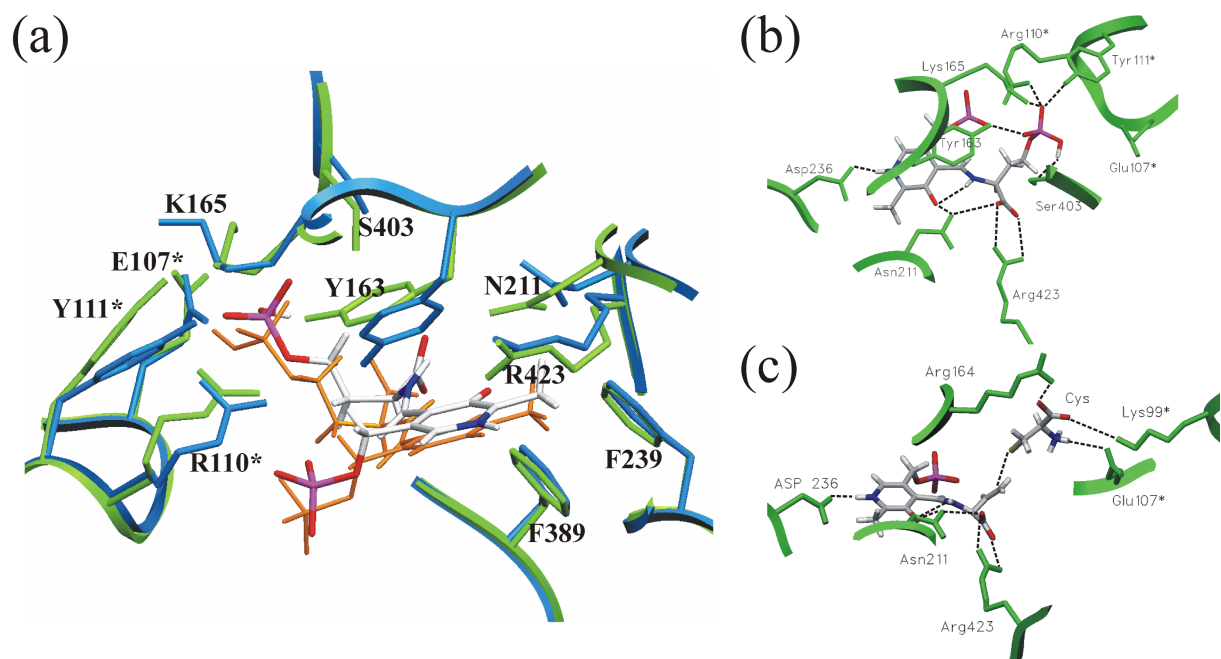


Die beiden Ringsysteme des CTCPO sind nicht in Richtung Zentrum und Phosphatbindungstasche des tCGS-Aktivzentrums orientiert. Statt dessen ermöglicht es der starke „Knick“ des Inhibitors an seinem Schwefelatom, daß diese Gruppen in eine bisher nicht beschriebene Tasche des tCGS-Aktivzentrums binden. Die Ringsysteme sind parallel zur Seitenkette von Arg423 orientiert. Das 1,2,4-Oxadiazol liegt parallel zur Guanidiniumgruppe von Arg423, und der Chlorphenyl-Substituent ist in Richtung Ser425 orientiert. O1 und N2 des Oxadiazolrings bilden polare Wechselwirkungen zu Arg423 aus, und N4 zu Arg423 und Asp397. Der Inhibitor ist in hydrophobem Kontakt zu Pro387 und Phe389, die beide auch an der Bindung des 3'-Chlorphenyls beteiligt sind. Das 3'-Chloratom bildet weitere hydrophobe Kontakte zu den C $\alpha$ -Atomen von Phe424 und Ser425 sowie dem C $\beta$ -Atom von Arg423 und der Methylgruppe von Ala361. Der Phenylring des CTCPO steht in hydrophobem Kontakt zu Ile395 und Val396.

Die beiden Ringsysteme des CTCPO binden in eine bisher nicht beschriebene Bindungstasche anstelle der Interaktionstasche für das Substrat Homoserinphosphat. Daher ist nur eine geringfügige Verschiebung von Lys261 und des daran gekoppelten PLP-Cofaktors nötig, um den Inhibitor aufzunehmen. Tyr163 folgt der Bewegung des Cofaktors durch eine Verschiebung um 1,1 Å und bleibt in einer parallelen Anordnung zum Pyridinring des PLP. Diese Bewegung wird durch eine Verschiebung des Proteinrückgrats ermöglicht, die außerdem zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Peptidstickstoff des Arg164 und der Carboxylgruppe des CTCPO führt.

#### 4.2.6 Modellierte Komplexe mit den Substraten L-Homoserinphosphat und L-Cystein

Die Strukturen der tCGS im Komplex mit den beiden physiologischen Substraten L-Homoserinphosphat und L-Cystein wurde modelliert. Homoserinphosphat wurde in einer Orientierung entsprechend dem Substratanalogon APPA in das Aktivzentrum der freien tCGS gelegt, mit der Carboxylgruppe nahe Arg423 und der Phosphatgruppe in der Bindungstasche um Tyr111\*. Der Vergleich der Startstruktur mit dem energieminierten Komplex ist in Abbildung 4-21a zu sehen.



**Abbildung 4-21: Modellierter Komplex der tCGS mit ihren Substraten L-Homoserinphosphat und L-Cystein.** (a) Überlagerung des externen Aldimins der tCGS mit dem Substrat L-Homoserinphosphat vor (Protein blau, Cofaktor orange) und nach Energieminimierung (Protein grün, Cofaktor grau). (b) Komplex der tCGS mit L-Homoserinphosphat nach Energieminimierung. Die Interaktionen des Substrats mit dem Protein sind durch gestrichelte Linien dargestellt. (c) Komplex der tCGS mit PLP-gebundenem  $\beta,\gamma$ -ungesättigtem Reaktionsintermediat und dem zweiten Substrat L-Cystein. Interaktionen mit dem Protein sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

Der Komplex zeigt ähnliche Veränderungen wie der experimentell bestimmte tCGS-APPA-Komplex. Der Pyridinring des Cofaktors ist im externen Aldimin verkippt gegenüber dem internen Aldimin. Die neue Orientierung wird durch eine Interaktion zwischen dem PLP-O3' und Asn211 stabilisiert. Tyr163 folgt der Bewegung des Cofaktors, so daß die parallele Orientierung zum PLP erhalten bleibt. Die Hydroxylgruppe des Tyrosins ist im Komplex in Richtung des terminalen Phosphats orientiert. Die Seitenketten von Tyr111\*, Arg110\* und Lys165 ändern ihre Konformation, um die Wechselwirkungen mit der Phosphatgruppe des Substrats zu optimieren. Die Phosphatgruppe interagiert außerdem mit Tyr163 und Ser403 (Abbildung 4-21b).

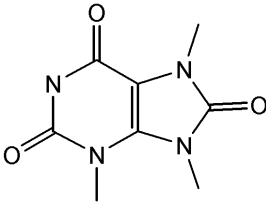
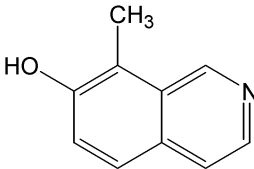
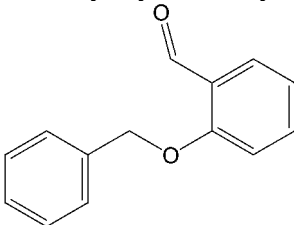
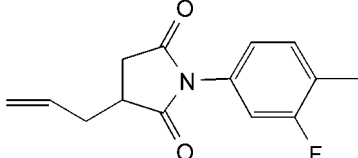
Für die Aufnahme des zweiten tCGS-Substrats L-Cystein eignet sich eine Bindungstasche nahe Lys99\*. Diese Bindungstasche ist elektrostatisch komplementär zum zwitterionischen L-Cystein. Die Bindungsstelle ist jedoch teilweise durch das Phosphat des Homoserinphosphats versperrt. Das L-Cystein kann daher erst nach Freisetzung der Phosphat-Abgangsgruppe binden, d.h. die Reaktion verläuft vermutlich nach einem ping-pong *bi-bi* Mechanismus. Abbildung 4-21c zeigt den modellierten ternären Komplex aus tCGS, dem PLP-gebundenen  $\beta,\gamma$ -ungesättigten  $\alpha$ -Iminointermediat (siehe Diskussion) sowie dem zweiten Substrat L-Cystein. Die  $\alpha$ -Aminogruppe des Cysteins interagiert mit Glu107\*, während die  $\alpha$ -Carboxylgruppe mit Arg164 und Lys99\* wechselwirkt. Das Schwefelatom befindet sich in diesem Modell in einer geeigneten Position für einen nachfolgenden nukleophilen Angriff an C $\gamma$  des PLP-gebundenen Intermediats.

#### **4.2.7 Docking-Suche nach neuen Inhibitoren**

Die Komplexe mit verschiedenen Inhibitoren zeigen unterschiedliche Konformationsänderungen im Aktivzentrum der tCGS, die zur Optimierung der Interaktionen mit einem Liganden auftreten können. Daher wurde jede dieser Strukturen ebenso wie die des freien Enzyms als Ausgangspunkt für die *in silico*-Suche nach neuen Inhibitoren verwendet. Die Substanzen der ACD-Datenbank wurden mit *Docking*-Algorithmen im Aktivzentrum der jeweiligen Struktur positioniert. Dabei wurde der Ligand als flexibles Molekül behandelt, das Protein jedoch als starrer Körper. Die Substanzen, für die die höchsten Affinitäten vorhergesagt wurden, sind in Tabelle 4-8 aufgeführt. Lediglich für das freie Enzym und für das Protein aus dem tCGS-CTCPO-Komplex wurden Liganden gefunden, für die Affinitäten im  $\mu\text{M}$ -Bereich vorhergesagt werden.

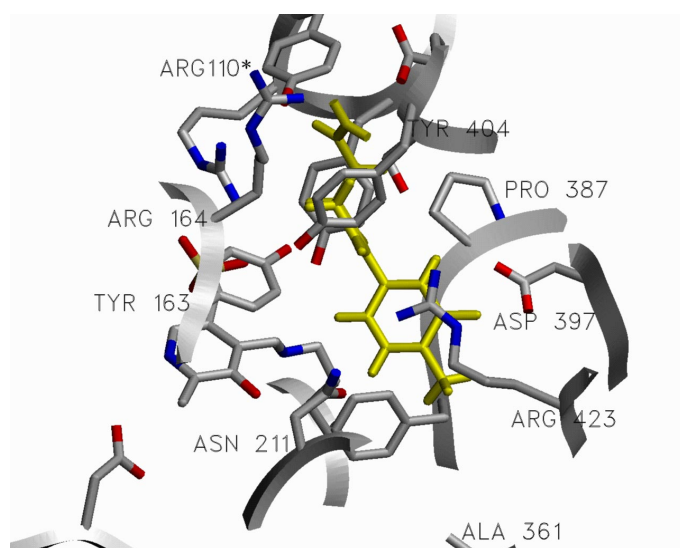


**Tabelle 4-8: Potentielle Inhibitoren der tCGS**

<i>freie tCGS</i>	<i>tCGS-PPCA</i>	<i>tCGS-APPA</i>	<i>tCGS-CTCPO</i>
3,7,9-Trimethylharnsäure	7-Hydroxy-8-methyl- isochinolin	2-Benzyloxybenzaldehyd	3-Allyl-1-(3'-fluor-4'-methyl- phenyl)pyrrolidin-2,5-dion
			
$K_i^{\#} = 10^{-5} \text{ M}$	$K_i^{\#} = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$	$K_i^{\#} = 10^{-3} \text{ M}$	$K_i^{\#} = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$

$K_i^{\#}$ : Inhibitionskonstante, die mit der von FlexX vorhergesagten Bindungsenergie berechnet wurde

Abbildung 4-22 zeigt das Modell des Komplexes der tCGS aus dem tCGS-CTCPO-Komplex mit dem Liganden 3-Allyl-1-(3-fluor-4-methylphenyl)pyrrolidin-2,5-dion. Der Ligand besetzt mit seinem Phenylring die hydrophobe Bindungstasche, die im CTCPO-Komplex von den beiden Ringsystemen des Inhibitors belegt ist. Über sein Pyrrolidon im Zentrum des tCGS-Aktivzentrums reicht der Ligand bis in die Phosphatbindungstasche um Arg110\*. Diese Interaktion kann jedoch, ebenso wie die Wechselwirkung mit Arg423, noch weiter optimiert werden (siehe Diskussion).



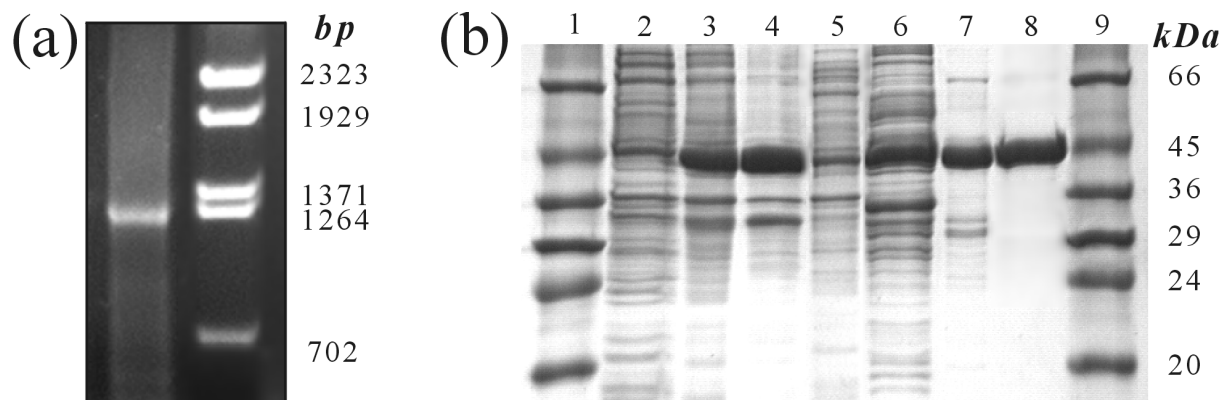
**Abbildung 4-22: Modell des Komplexes aus tCGS und 3-Allyl-1-(3'-fluor-4'-methylphenyl)pyrrolidin-2,5-dion.** Dargestellt ist der von FlexX vorhergesagte Bindungsmodus, für den das Programm eine Dissoziationskonstante von  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$  vorhersagt. Der Ligand ist zur besseren Sichtbarkeit gelb hervorgehoben.

Experimentelle Werte für die Bindungsaffinität konnten bisher weder für 3-Allyl-1-(3'-fluor-4'-methylphenyl)pyrrolidin-2,5-dion noch für 3,7,9-Trimethylharnsäure bestimmt werden, da beide Substanzen nicht kommerziell bezogen werden konnten. Für 7-Hydroxy-8-methylisochinolin und 2-Benzyloxybenzaldehyd konnte lediglich der erwartete vernachlässigbare Inhibitionseffekt nachgewiesen werden.

### 4.3 Humane Cystathionin- $\gamma$ -Lyase

#### 4.3.1 Klonierung, rekombinante Expression und Reinigung

Nach 30 PCR-Zyklen und Restriktionsverdau wurde ein einzelnes Produkt der erwarteten Größe (1218 bp) erhalten (Abbildung 4-23a). Die Sequenz des anschließend in den Vektor pET22b(+) klonierten Gens entsprach der zuvor von Lu *et al.* (1992) veröffentlichten Sequenz (EMBL S52028). Expression der humanen CGL in *E. coli* über den T7-Promotor des Vektors führte unter allen getesteten Kulturbedingungen zur Bildung von unlöslichen Einschlusskörpern. Denaturierende Reinigung mit anschließender Rückfaltung durch schnelles Verdünnen des Denaturierungsmittels Guanidiniumchlorid ergab lösliche hCGL. Die kinetische Charakterisierung deutet jedoch darauf hin, daß nur ein Teil des Proteins korrekt gefaltet ist (siehe unten). Daher wurde die Reinigung der hCGL in nativer Form optimiert.



**Abbildung 4-23: Klonierung, rekombinante Expression und Reinigung humaner CGL.** (a) Produkt der PCR-Amplifikation des CTH-Gens für hCGL (links) neben BstEII-verdauter  $\lambda$ -DNA als Marker. (b) Reinigungsschritte für hCGL. Bahnen 1 und 9: Molekulargewichtsstandard. Bahn 2: Zellen vor Induktion. Bahn 3: Zellen 12 h nach Induktion. Bahn 4: unlösliche Fraktion nach Zellaufschluß. Bahn 5: lösliche Fraktion nach Zellaufschluß. Bahn 6: Pool nach DEAE-Anionenaustauscherchromatographie. Bahn 7: Protein nach hydrophober Chromatographie. Bahn 8: Pool nach Gelpermeationschromatographie.

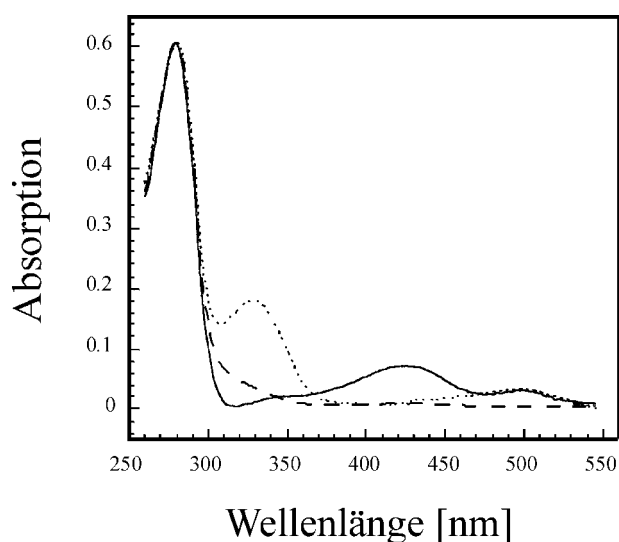
Die Erniedrigung der Wachstumstemperatur auf 20 °C führte zu einer leichten Erhöhung des löslichen Anteils an der Gesamtmenge hCGL. Die Reinigung des löslichen Proteins über eine Folge von Ionenaustauscher-, hydrophober und Gelfiltrationschromatographie lieferte zu über 95 % reines hCGL-Protein (Abbildung 4-23b). Für die weiteren Studien wurde dieses in nativer Form gereinigte Protein verwendet.

**Tabelle 4-9: Reinigungsverlauf für hCGL**

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Protein-konzentration [mg/ml]	Proteinmasse [mg]	Aktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungs-faktor
Zellextrakt	80	13,4	1072	150	0,14	100	1,0
DEAE-Anionen-tauscherchromato-graphie	105	2,6	276	116	0,42	77	3,0
Phenylsepharose-chromatographie	70	0,8	56	95	1,7	63	12,1
Größenausschluß-chromatographie	45	0,7	31,5	78,8	2,5	53	17,9

### 4.3.2 Biophysikalische Charakterisierung

Die gereinigte hCGL zeigte die erwartete, starke Aktivität gegen das physiologische Substrat L-Cystathionin (siehe unten) und ein UV/*vis*-Spektrum mit den typischen Maxima bei 280 nm (Protein) und 427 nm (proteingebundenes PLP; Abbildung 4-24). Ein zusätzliches, schwaches Maximum war bei 494 nm sichtbar. Diese Absorption könnte durch eine quinoide Form des PLP-Cofaktors zustande kommen, die durch Bildung eines externen Aldimins mit einem Substrat oder Inhibitor erklärt werden könnte. Bildung des Apoenzyms durch Dialyse gegen Puffer mit L-Alanin führte zum Verschwinden beider langwelliger Maxima (Abbildung 4-24).



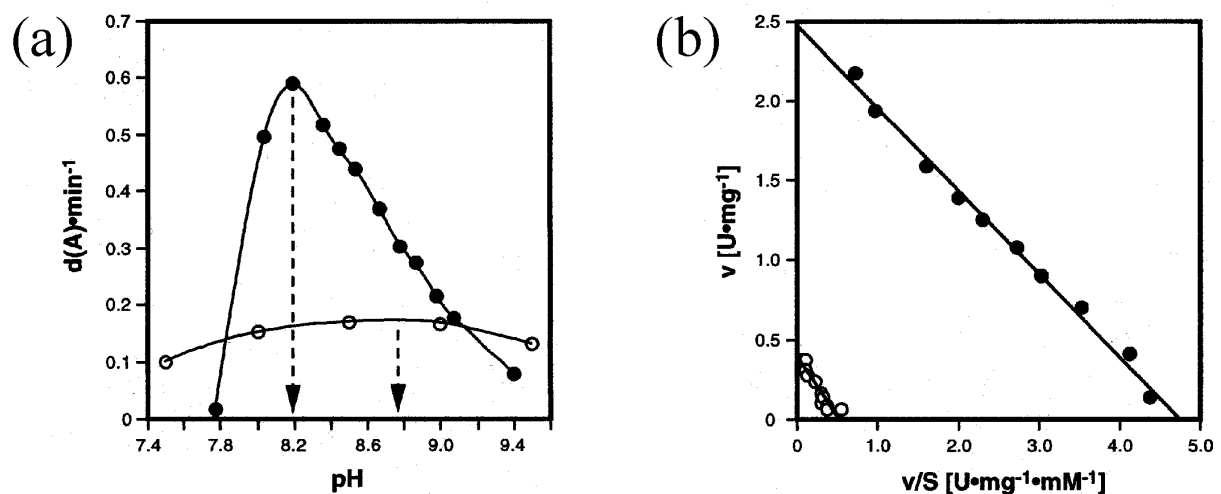
**Abbildung 4-24: UV/*vis*-Spektren der hCGL.** Das nativ gereinigte Protein (durchgezogene Linie) weist langwellige Maxima bei 427 nm und bei 494 nm auf, dem Apoenzym (gestrichelte Linie) fehlen diese Maxima. Bei Inaktivierung durch AVG (gepunktete Linie) tritt an Stelle des Maximums bei 427 nm ein Absorptionspeak bei 330 nm auf. Die Spektren wurden in 40 mM Boratpuffer, pH 8,2 aufgenommen.

Dies deutet darauf hin, daß beide Maxima durch den Cofaktor hervorgerufen werden, und nicht durch eine Verunreinigung. Für eine hohe Homogenität des Proteins spricht auch die einzelne Bande auf den SDS-Gelen und die eindeutige Sequenz für den N-Terminus des Reinigungsprodukts. Wurde das Holoenzym durch Zugabe von PLP rekonstituiert, dann trat das Maximum bei 494 nm nicht mehr auf.

Die Retentionszeit in der Größenausschlußchromatographie war für hCGL (Monomer: 45 kDa) innerhalb des experimentellen Fehlers identisch zum Wert für die CGS aus *E. coli* (Monomer: 40 kDa), die als Homotetramer vorliegt (Brzovic *et al.*, 1990; Wahl *et al.*, 1997). hCGL bildet unter nativen Bedingungen also ein Tetramer, ebenso wie das Enzym aus anderen Organismen (Matsuo & Greenberg, 1958; Nagasawa *et al.*, 1984; Yamagata *et al.*, 1993).

### 4.3.3 Kinetische Charakterisierung

Der optimale pH-Wert für die Umsetzung von L-Cystathionin durch hCGL wurde in Boratpuffer zu pH 8,2 bestimmt (Abbildung 4-25a). Im Gegensatz zu früheren Berichten wurden in anderen Puffern (Phosphat, Tris) keine abweichenden Ergebnisse erhalten, ebenso wie die UV/*vis*-Spektren vom verwendeten Puffersystem nicht beeinflusst wurden.  $K_m$ - und  $v_{max}$ -Werte für humane CGL gegen das physiologische Substrat L-Cystathionin wurden bei pH 8,2 in Boratpuffer ermittelt. Die graphische Analyse nach Eadie-Hofstee (Eadie, 1942; Hofstee, 1959; Abbildung 4-25b) ergab für  $K_m = 0,5$  mM, für  $v_{max} = 2,5$  U/mg und für  $k_{cat} = 1,9$  s<sup>-1</sup>.

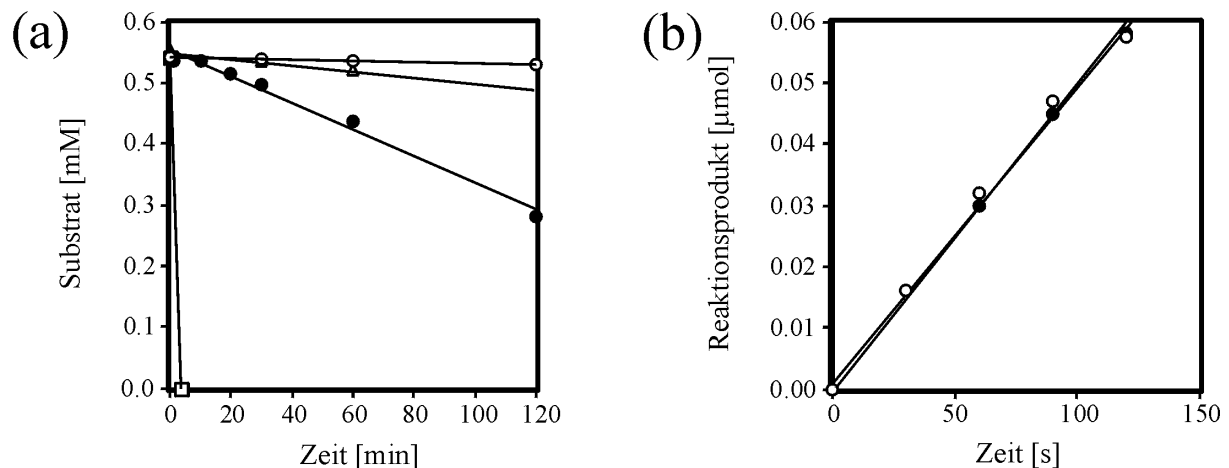


**Abbildung 4-25: Kinetische Charakterisierung der hCGL.** (a) Bestimmung des optimalen pH-Werts für die Umsetzung des physiologischen Substrats L-Cystathionin. Das rückgefaltete Protein (○) zeigt ein abweichendes Verhalten von dem der nativ gereinigten hCGL (●). (b) Auftragung der CGL-Aktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen nach Eadie-Hofstee (Eadie, 1942; Hofstee, 1959).  $v_{max}$  entspricht dem y-Achsenabschnitt, die Steigung beträgt  $-K_m$ .

Das pH-Optimum der rückgefalteten hCGL lag mit pH 8,7 etwa einen halben Wert über dem des nativ gereinigten Enzyms (Abbildung 4-25a). Die UV/*vis*-Spektren des rückgefalteten Proteins zeigten anstelle der langwelligen Cofaktor-Absorption bei 427/494 nm ein schwächeres Absorptionsmaximum bei 326 nm. Die katalytische Effizienz  $v_{max}/K_m$  lag um

eine Größenordnung unter der des nativ gereinigten Proteins ( $K_m = 0,8 \text{ mM}$ ,  $v_{\max} = 0,4 \text{ U/mg}$ ). Die parallelen Linien für nativ gereinigtes und rückgefaltetes Enzym in der reziproken Auftragung deuten darauf hin, daß nur ein Teil des rückgefalteten Proteins korrekt gefaltet ist (Abbildung 4-25b). Für alle weiteren Experimente wurde daher das nativ gereinigte Enzym verwendet.

CGL aus Hefe (Yamagata *et al.*, 1993) und Rattenleber (Uren *et al.*, 1978) zeigen ausgeprägte CBL-Aktivität, d.h. sie können sowohl die  $C\gamma$ -S als auch die  $C\beta$ -S-Bindung des L-Cystathionins spalten. Bei hCGL entspricht die Menge der produzierten Sulfhydrylgruppen (bestimmt über die DTNB-Methode) genau der Menge des gebildeten L-Cysteins (bestimmt über die Methode nach Gaitonde (1967); Abbildung 4-26). hCGL spaltet das Substrat L-Cystathionin also ausschließlich an der  $C\gamma$ -S-Bindung.

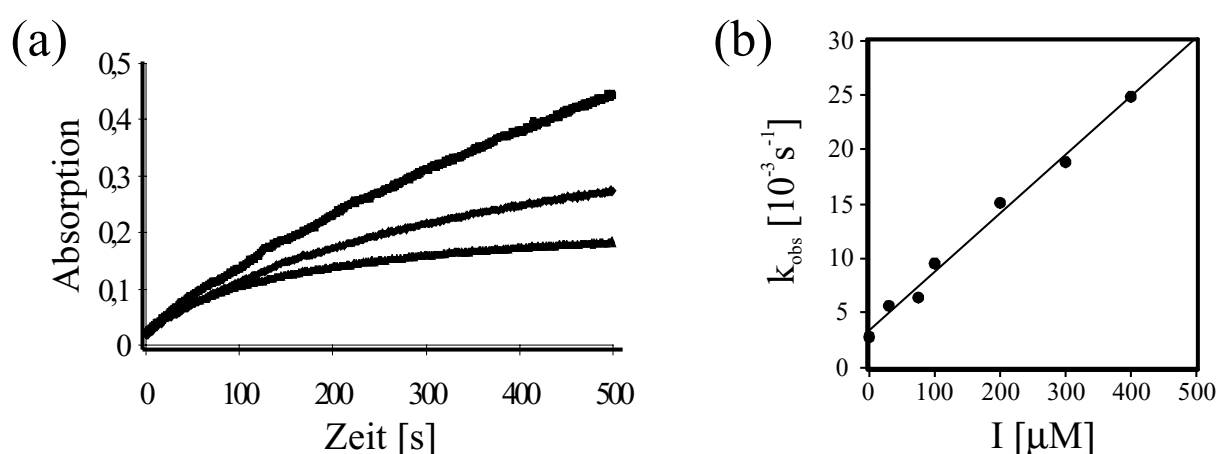


**Abbildung 4-26: Substrat- und Reaktionsspezifität der hCGL.** (a) Abbau verschiedener Substrate durch hCGL. Das physiologische Substrat L-Cystathionin (□) wird schnell umgesetzt, während L-Cystein (●) langsam und L-Cystin (●) mit kaum nachweisbarer Rate abgebaut wird (Substratkonzentration jeweils 0,55 mM). Der nichtenzymatische Cystein-Abbau (●) ist vernachlässigbar. (b) Abbau von L-Cystathionin durch hCGL. Die Mengen an gebildetem L-Cystein (●) entspricht der Anzahl freier Sulfhydrylgruppen (○), was auf eine ausschließliche Spaltung der  $C\gamma$ -S-Bindung schließen läßt.

L-Cystein wird von hCGL mindestens zwei Größenordnungen langsamer abgebaut als L-Cystathionin. Der Abbau von L-Cystin war über die Bildung von  $\alpha$ -Ketosäuren (LDH-Test) nicht, über den DTNB-Test nur schwach nachweisbar. Für beide Umsetzungen (L-Cystein und L-Cystin) wäre die Spaltung einer  $C\beta$ -S-Bindung nötig. hCGL zeigt also eine ausgeprägte Reaktionsspezifität für  $C\gamma$ -S-Bindungen.

#### 4.3.4 *Slow-binding* Inhibition der hCGL durch AVG

In hCGL-Reaktionsansätzen, die zusätzlich zu sättigenden Mengen Cystathionin noch den Inhibitor AVG enthielten, wurde eine zeitabhängige Verminderung der Enzymaktivität beobachtet. Die sich schließlich einstellende *steady-state*-Geschwindigkeit variierte mit der Inhibitorkonzentration (Abbildung 4-27a). Um auszuschließen, daß Zerfall oder Umsetzung von AVG durch hCGL diese langsame Einstellung des *steady-state*-Umsatzes bewirken, wurden hCGL-Aliquots vor Substratzugabe mit AVG inkubiert. Da in den nachfolgenden Aktivitätstests die gleichen Geschwindigkeiten erhalten wurden, wirkt AVG auf humane CGL als *slow-binding* Inhibitor (Morrison, 1982).



**Abbildung 4-27:** *slow-binding* Inhibition der hCGL durch AVG. (a) AVG führt zu einer zeitabhängigen Verminderung der hCGL-Aktivität. Die anfängliche Umsatzrate ist unabhängig von der Inhibitorkonzentration. Die *steady-state* Rate dagegen ist um so geringer, je höher die eingesetzte Inhibitorkonzentration ist. (b) Auftragung der beobachteten Umsatzrate  $k_{\text{obs}}$ , die mit Gleichung 1 (Tabelle 4-10) bestimmt wurde, gegen die Inhibitorkonzentration. Auch bei hohen AVG-Konzentrationen ist kein Sättigungsverhalten zu beobachten.

In Tabelle 4-10 sind die drei Mechanismen zusammengestellt, die für die Interpretation der beobachteten *slow-binding* Inhibition in Frage kommen: (I) langsame Bindung des Inhibitors I an das Enzym E. (II) Schnelle Bindung von I an E, gefolgt von einem langsamen Isomerisierungsschritt zu  $EI^*$ . (III) Langsame Isomerisierung von E zu einer Form  $E^*$ , die dann schnell I bindet. Die drei Mechanismen können durch Auftragung der apparenten Inhibitions geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  (Tabelle 4-10, Gleichung 1) gegen die Inhibitorkonzentration unterschieden werden (Abbildung 4-27b). In Tabelle 4-10 ist angegeben, welcher Zusammenhang zwischen  $k_{\text{obs}}$  und der Inhibitorkonzentration bei den Mechanismen (I), (II) und (III) jeweils zu erwarten ist.

**Tabelle 4-10: Mechanismen für die *slow-binding* Inhibition von Enzymen.**  $P$ ,  $v_o$  und  $v_s$  sind die Produktkonzentration, die Anfangs- und die *steady-state*-Geschwindigkeit.

Mechanismus	Modell	Gleichung	Gleichung Nr.
<i>slow-binding</i> allgemein		$P = v_s t + (v_o - v_s) \frac{1 - e^{(-k_{obs}t)}}{k_{obs}}$	1
(I)	$E \xrightleftharpoons[k_2]{k_1[I](\text{slow})} EI$	$k_{obs} = k_2 + \frac{k_2[I]}{K_i(1 + [S]/K_m)} \quad (a)$	2
(II)	$E \xrightleftharpoons[k_2]{k_1[I]} EI \xrightleftharpoons[k_4]{k_3(\text{slow})} EI^*$	$k_{obs} = k_4 \left( 1 + \frac{[I]}{K_i^* (1 + [S]/K_m)} \right) \Bigg/ \left( 1 + \frac{[I]}{K_i (1 + [S]/K_m)} \right) \quad (b)$	3
(II spezial) siehe Diskussion		$k_{obs} = k_4 + \frac{k_4[I]}{K_i^* (1 + [S]/K_m)}$	4
(III)	$E \xrightleftharpoons[k_2]{k_1(\text{slow})} E^* \xrightleftharpoons[k_4]{k_3} E^*I$	$k_{obs} = \frac{k_1}{1 + [S]K_m} + \frac{k_2 K_i}{[I] + K_i} \quad (c)$	5

(a)  $K_i = k_2/k_1$ ; (b)  $k_4 K_i / (k_3 + k_4)$ ; (c)  $k_4/k_3$

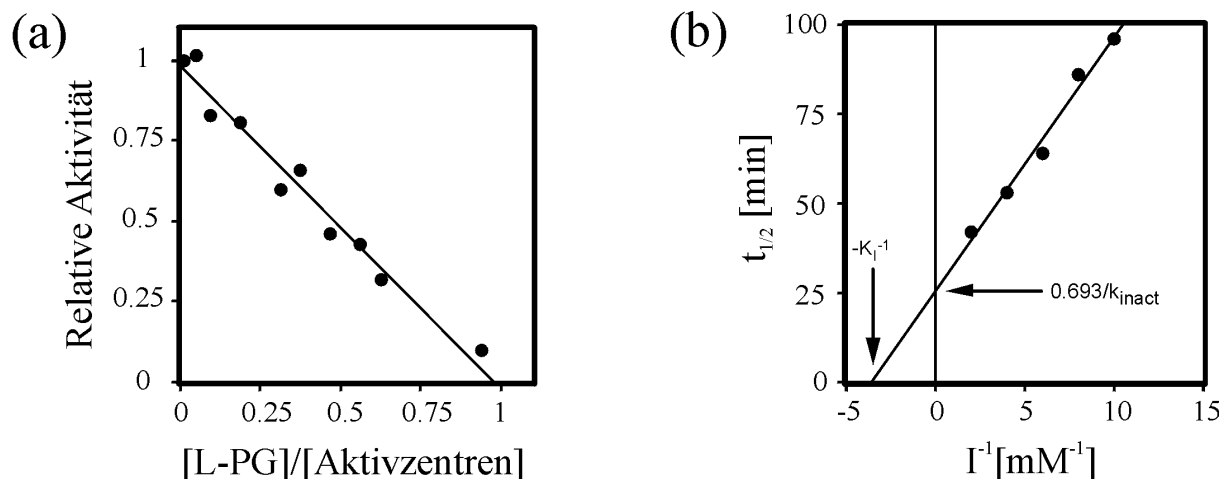
Mechanismus (III) kann ausgeschlossen werden, da  $k_{obs}$  mit steigender Inhibitorkonzentration ansteigt. Für Mechanismus (I) erwartet man einen linearen Zusammenhang zwischen  $k_{obs}$  und der Inhibitorkonzentration, für Mechanismus (II) jedoch einen sigmoidalen, bei dem  $k_{obs}$  bei hohen Inhibitorkonzentrationen gegen  $k_3+k_4$  konvergiert. Die lineare Korrelation von  $k_{obs}$  mit der AVG-Konzentration (Abbildung 4-27b) spricht also für Mechanismus (I). Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung der Mechanismen (I) und (II) besteht im Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten  $v_o$  bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen. Für Mechanismus (I) ist  $v_o$  unabhängig von der Inhibitorkonzentration, für Mechanismus (II) erhält man einen reziproken Zusammenhang. Der bei der Inhibition von hCGL durch AVG beobachtete konstante  $v_o$ -Wert (Abbildung 4-27a) deutet also ebenfalls auf Mechanismus (I) hin, der daher für die Auswertung der Daten verwendet wurde. Die Dissoziationsrate  $k_2$  wurde zu  $3,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  und die Inhibitionskonstante  $K_i$  zu  $10,5 \text{ } \mu\text{M}$  bestimmt. Mit der Gleichung  $K_i = k_2/k_1$  wurde die Rate der Assoziationsreaktion  $k_1$  zu  $324 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  berechnet.

Die Bindung von AVG an hCGL wurde auch über UV/*vis*-Spektren verfolgt. Während der Bindung verschwand die PLP-Absorptionsbande bei 427 nm, und parallel dazu entstand ein neues Absorptionsmaximum bei 330 nm (Abbildung 4-24). Um die Reversibilität der Inhibition zu überprüfen, wurde AVG-inhibierte hCGL gegen AVG-freien Puffer dialysiert. Mehr als 90 % der ursprünglich eingesetzten Enzymaktivität wurden wiedererlangt. Die Reaktivierung wurde von einer Rückkehr der Absorption bei 427 nm und dem Verschwinden

der Absorption bei 330 nm begleitet. AVG wirkt auf hCGL also als *slow-tight-binding* Inhibitor, der reversibel an das PLP im Aktivzentrum des Enzyms bindet und dadurch die Absorptionseigenschaften des Cofaktors beeinflusst.

#### 4.3.5 Irreversible Inaktivierung der hCGL durch PG und F<sub>3</sub>Ala

Die Inaktivierung von hCGL durch PG erfolgte bei manueller Mischung innerhalb der Mischzeit. Die Inhibition von CGL durch PG wurde bereits mit dem Enzym aus Rattenleber untersucht (Abeles & Walsh, 1973) und der folgende Mechanismus vorgeschlagen: Abstraktion eines  $\beta$ -Protons führt zu einem Allenintermediat, daß in einer Michael-Addition mit einem Nucleophil des Aktivzentrums reagiert (Abbildung 5-9). Die schnelle Inaktivierung ist daher nicht überraschend, da die Reaktion am  $\gamma$ -Kohlenstoff stattfindet, d.h. am Angriffspunkt im physiologischen Substrat L-Cystathionin. Die Inaktivierung wurde daher durch zehninütige Inkubation des Enzyms mit verschiedenen PG-Konzentrationen und nachfolgender Bestimmung der Restaktivität untersucht. Die Auftragung dieser Restaktivität gegen das Verhältnis PG-Moleküle/Aktivzentren ist in Abbildung 4-28a zu sehen. Es ist zu erkennen, daß es sich um eine sehr starke Inhibition handelt, da ein PG-Molekül ein Aktivzentrum inaktiviert, d.h. nahezu jedes PG-Molekül führt zur Inaktivierung eines Aktivzentrums.



**Abbildung 4-28:** Irreversible Inaktivierung von hCGL durch L-PG und F<sub>3</sub>Ala. (a) Inaktivierung der hCGL durch PG. Die Restaktivität des Enzyms wurde nach Inkubation mit verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen bestimmt. Für die Auftragung wurde die Inhibitor-Konzentration in Relation zur Anzahl Aktivzentren im Ansatz verwendet. (b) Inaktivierung der hCGL durch F<sub>3</sub>Ala. Die Zeit, nach der die anfängliche Enzymaktivität um 50 % vermindert war, wurde bei verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen bestimmt. Dargestellt ist eine reziproke Auftragung (Kitz-Wilson-Plot).

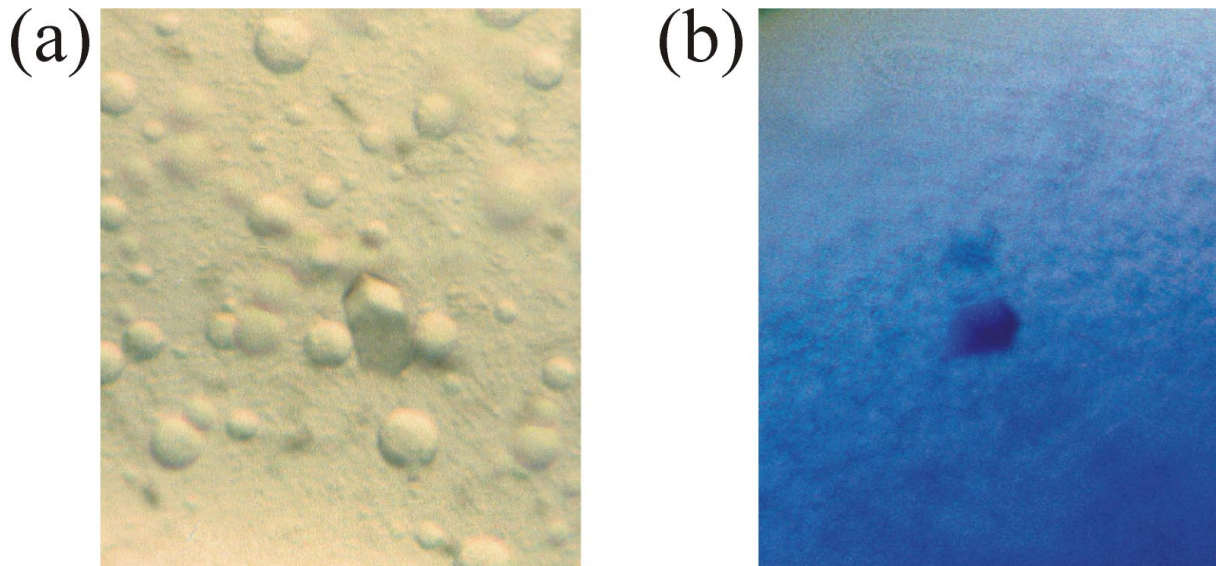


Im Gegensatz zu PG muß F<sub>3</sub>Ala an seinem  $\beta$ -Kohlenstoffatom reagieren, was die deutlich langsamere Inaktivierung von hCGL durch F<sub>3</sub>Ala erklärt. Die Inaktivierung wurde durch Inkubation von hCGL-Aliquots mit F<sub>3</sub>Ala und Bestimmung der Restaktivität nach verschiedenen Reaktionszeiten bestimmt. Bei Auftragung der Restaktivität gegen die Inkubationszeit wurde ein biphasisches Verhalten beobachtet, d.h. einer schnelleren Inaktivierung folgte eine langsamere bei längerer Inkubation. Dieses Verhalten wird bei irreversibler Inhibition häufiger beobachtet und ist auf den Verbrauch des Inhibitors zurückzuführen. Daher wurden die anfänglichen Inaktivierungsraten verwendet, um über einen Kitz-Wilson-Plot (Abbildung 4-28b; Kitz & Wilson, 1962) die Inhibitionskonstante  $K_i$  zu 0,27 mM und die Inaktivierungsrate  $k_i$  zu 0,027 min<sup>-1</sup> zu bestimmen.

Absorptionsspektren von hCGL nach Inaktivierung durch PG bzw. F<sub>3</sub>Ala zeigten keine Abnahme der Absorption bei 427 nm. Das Enzym bildet also mit den beiden Inhibitoren wie mit seinem Substrat ein protoniertes Aldimin. Weder mit PG noch mit F<sub>3</sub>Ala inaktivierte hCGL konnte durch Dialyse gegen Puffer ohne Inhibitor reaktiviert werden. Es liegt also eine irreversible Inaktivierung durch eine kovalente Modifikation vor, die am Proteinanteil des Enzyms stattfindet, ohne den PLP-Cofaktor zu modifizieren.

#### 4.3.6 Kristallisation der hCGL

Kristallisationsversuche mit hCGL waren zunächst nicht erfolgreich, weder mit dem Holoenzym noch mit dem Apoenzym, das durch Dialyse gegen Puffer mit L-Alanin erhalten wurde. Das Protein wurde daher durch präparative Gelelektrophorese weiter gereinigt. Mit Hilfe von *factorial screens* konnte eine für die Kristallisation des Reinigungsprodukts geeignete Reservoirlösung gefunden werden (0,1 M Hepes/NaOH, pH 7,6, 1,02 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 % PEG 4000). Verfeinerung der Lösung zu 0,1 M Hepes/NaOH, pH 7,8, 1,4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 % PEG 4000 ergab Kristalle, die innerhalb von sieben Tagen zu einer Größe von ca. 25 x 25 x 35  $\mu\text{m}^3$  wuchsen (Abbildung 4-29a). Der Test mit dem Farbstoff „IzIt“ zeigte, daß es sich um Proteinkristalle handelt (Abbildung 4-29b). Das wurde durch erste Diffraktionsexperimente bestätigt, die schwache Signale bis zu einer Auflösung von ca. 9 Å ergaben. Der Abstand der Signale deutet auf eine Elementarzelle hin, die in zwei Dimensionen eine Länge von ca. 100 Å aufweist. Für die Aufnahme höher aufgelöster Diffraktionsdaten sind die hCGL-Kristalle bisher zu klein. Das Züchten größerer Kristalle sollte durch eine weitere Optimierung der Bedingungen möglich sein und schließlich zur Lösung der hCGL-Struktur führen.



**Abbildung 4-29: Kristalle der hCGL.** (a) Nach weiterer Reinigung des Proteins durch präparative Gelelektrophorese konnte hCGL kristallisiert werden. Die Kristalle wuchsen bei Raumtemperatur in sieben Tagen zu einer Größe von ca.  $25 \times 25 \times 35 \mu\text{m}^3$ . (b) Die Blaufärbung nach Zugabe des Farbstoffs „IzIt“ zeigt, daß es sich um Proteinkristalle handelt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Transkriptionsaktivator MalT

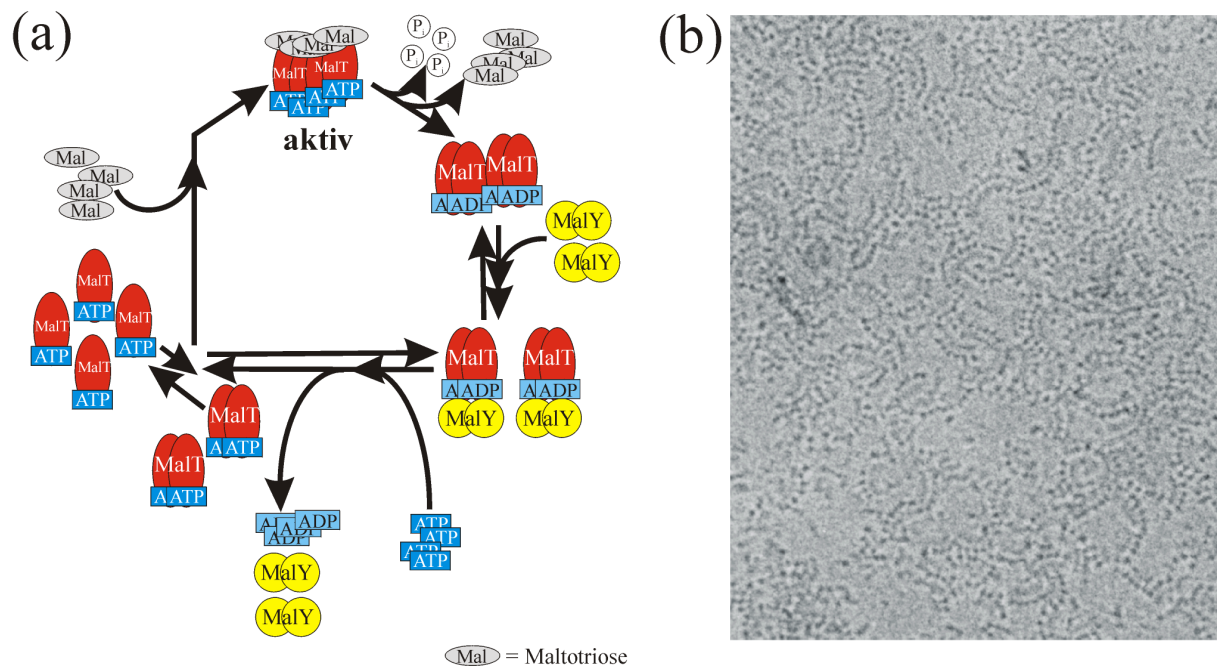
#### 5.1.1 Regulation der MalT-Aktivität

Der Transkriptionsaktivator MalT aus *E. coli* integriert mehrere verschiedene Regulations-signale (Boos & Shuman, 1998). Aufgrund seiner Überschaubarkeit im Vergleich zu eukaryontischen Transkriptionssystemen eignet sich MalT als Modellsystem für die positive kombinatorische Regulation. Über den Mechanismus der Inhibition von MalT durch MalY ist jedoch wenig bekannt (Zdych *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte die physikalische Interaktion von MalT mit MalY nachgewiesen werden. Dabei konkurriert MalY mit Maltotriose um die Bindung an MalT (Schreiber *et al.*, 2000), ähnlich der Regulation von Steroidhormon-Rezeptoren durch Hitzeschockproteine und Steroidhormone (Whitfield *et al.*, 1999). Der MalT/MalY-Komplex enthält vermutlich zwei MalT-Monomere (Schreiber *et al.*, 2000) und ein MalY-Dimer (Clausen *et al.*, 2000). ATP und AMP-PNP unterstützen die Bindung von Maltotriose an MalT (Schreiber *et al.*, 2000), was zu dessen Oligomerisierung führt (Schreiber & Richet, 1999) und die Interaktion mit MalY verhindert. In Gegenwart von ADP ist die Maltotriose-Aktivität dagegen verringert. Die ATPase-Aktivität von MalT könnte also energetisch oder regulatorisch am Abbau der aktiven MalT-Form beteiligt sein. Das entstehende ADP-gebundene MalT kann dann wieder durch MalY in dieser inaktiven Form stabilisiert werden (Abbildung 5-1a).

Für die Interaktion mit MalY scheint die N-terminale ATP-Bindungsdomäne von MalT (DT1) verantwortlich zu sein (Danot, unveröffentlichte Daten). Möglicherweise beeinflusst also das gebundene Nukleotid die MalY-Bindung direkt und nicht nur über den Oligomerisierungszustand von MalT. Auf der Seite des MalY scheint eine hydrophobe Fläche auf der dem Aktivzentrum abgewandten Seite für die Interaktion verantwortlich zu sein (Clausen *et al.*, 2000). Neben der Unabhängigkeit der Repressoreigenschaft von der katalytischen Aktivität (Zdych *et al.*, 1995) ist das ein weiterer Hinweis darauf, daß die enzymatische Aktivität von MalY nicht an der Regulation des Maltose-Operons beteiligt ist.

Gelfiltrationsexperimente (Schreiber *et al.*, 2000) deuten darauf hin, daß sich der MalT/MalY-Komplex in einem schnellen Gleichgewicht mit den Einzelkomponenten befindet. Die Interaktion scheint zu schwach zu sein, um den Komplex kristallisieren zu können. Die Kristallisation des MalT-Gesamtproteins alleine gelang bisher ebenfalls nicht.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Richtet *et al.*, unveröffentlichte Daten; Abbildung 5-1b) weisen darauf hin, daß die aktive oligomere Form von MalT aus einer heterogenen Mischung von Multimeren mit unterschiedlicher Anzahl an Untereinheiten besteht. Zur Kristallisation ist jedoch eine sehr homogene Spezies notwendig. Die inaktive Form von MalT liegt zwar relativ homogen als Monomer vor, ist aufgrund ihrer Aggregationsneigung aber ebenfalls nicht gut zur Kristallisation geeignet.



**Abbildung 5-1: Regulation der MalT-Aktivität.** (a) Modell für die Regulation der MalT-Aktivität durch MalY. In Gegenwart von ATP und Maltotriose bildet sich aktives MalT-Oligomer, möglicherweise ausgehend von einer dimeren Form (Schreiber & Richtet, 1999). Nach ATP-Hydrolyse und Dissoziation der Maltotriose stabilisiert MalY die inaktive Form von MalT. Erst der Austausch des Adeninnukleotids und die Dissoziation von MalY ermöglichen eine erneute Multimerisierung des MalT. (b) Elektronenmikroskopische Aufnahme aktiver MalT-Oligomere. Das Protein bildet in Gegenwart von Maltotriose und AMP-PNP ein heterogenes Gemisch bogenförmiger Multimere mit einer unterschiedlichen Anzahl an Monomeren.

### 5.1.2 Der neue Helix-Repeat-Faltungstyp in MalT Domäne III

Innerhalb der MalT-Familie großer Transkriptionsaktivatoren (Valdez *et al.*, 1999) sind die Domänen I, II und IV homolog zueinander (Danot, 2000) und die enthaltenen ATP- und DNA-Bindungsmotive konserviert. Daher wurde postuliert, daß diese Bereiche strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen und für einen gemeinsamen Mechanismus ATP-abhängiger Regulation verantwortlich sind (Danot, 2000; De Schrijver & De Mot, 1999). Die DT3-Struktur ermöglichte hier die Definition des degenerierten SUPR-Sequenzmotivs, das in Domäne III der meisten Proteine der MalT-Familie identifiziert werden konnte. Die Proteine dieser Familie besitzen also zusätzlich zu den Domänen mit homologer Sequenz

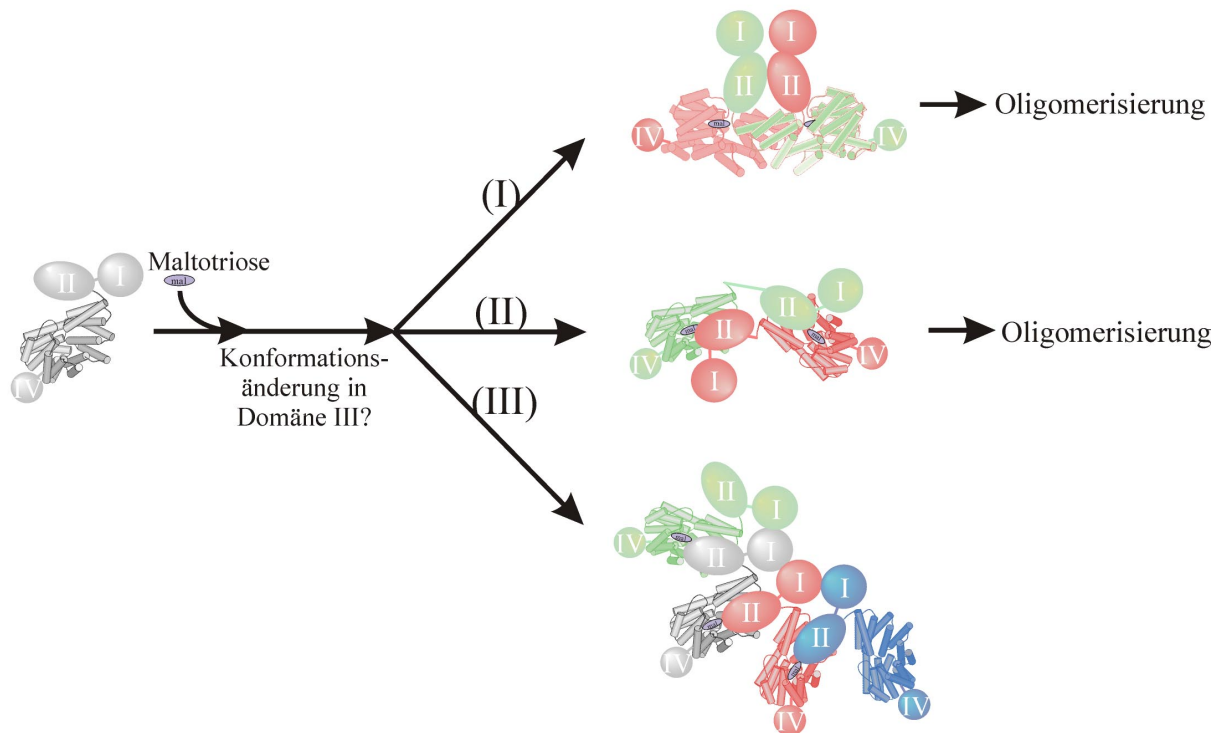
wahrscheinlich auch strukturell ähnliche Domänen III, was ein weiterer Hinweis auf einen gemeinsamen Regulationsmechanismus ist. Über das hier definierte SUPR-Motiv konnten außerdem weitere prokaryontische Regulatorproteine identifiziert werden, die eine Domäne mit DT3-ähnlicher Struktur aufzuweisen scheinen. Einige dieser Proteine können der MalT-Familie zugeordnet werden und zeigen, daß Mitglieder dieser Familie in einer Vielzahl prokaryontischer Organismen vorkommen. Andere Sequenzen lassen vermuten, daß auch über die MalT-Familie hinaus SUPR-Motive und somit vermutlich DT3-ähnliche Strukturen vorkommen, möglicherweise mit gleicher oder ähnlicher Funktion wie in MalT. Die DT3-Struktur sollte als neues *template* die vergleichende Modellierung der Strukturen dieser verwandten Proteine ermöglichen.

Die DT3-Struktur ermöglicht zum ersten mal fundierte Vermutungen über die Funktion der Domäne III und den zugrundeliegenden Mechanismus. Der Kontakt zwischen zwei DT3-Molekülen könnte die Interaktionsfläche zur fehlenden Domäne II identifizieren, oder einen ungewöhnlichen Kristallkontakt darstellen. Größe und Hydrophobizität der Kontaktfläche und der Vergleich mit anderen Proteinen deuten jedoch darauf hin, daß die SUPR-Motive in dieser Domäne ein Gerüst für die ligandenregulierte Oligomerisierung von MalT bilden und so die Aktivität von MalT steuern. Die SUPR-Motive weisen lokal strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen *Helix-Repeat*-Faltungstypen auf, die alle an Protein/Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind (Groves & Barford, 1999; Rice & Brünger, 1999; Ybe *et al.*, 1999). In der Kristallstruktur des hPP5 wurde außerdem ein vergleichbarer Kristallkontakt beobachtet. Eine lange, C-terminale Helix interagiert in ähnlicher Orientierung wie in DT3 mit der konkaven Oberfläche der TPRs des Partnermonomers (Das *et al.*, 1998). Dabei handelt es sich um eine unphysiologische Wechselwirkung eines physiologischen Interaktionsmotivs, da hPP5-Gesamtprotein in Lösung als Monomer vorliegt und über seine TPRs mit Hsp90 wechselwirkt (Chen *et al.*, 1996). In der Kristallstruktur der Hop TPRs wurde ebenfalls ein ähnlicher Kristallkontakt beobachtet. Peptide, die von Sequenzen bekannter Hop-Interaktionspartner abgeleitet wurden, interagierten in der gleichen Orientierung mit der konkaven Fläche der Hop TPRs (Scheufler *et al.*, 2000). Eine vergleichbare Bindungsgeometrie wurde in physiologischen Komplexen weiterer mit DT3 strukturverwandter *Helix-Repeat*-Faltungstypen beobachtet. Im Komplex zwischen den HEAT-Motiven des Importin- $\beta$  und einer Importin- $\alpha$ -Domäne bildet die konkave Innenseite der Superhelix die Interaktionsfläche (Cingolani *et al.*, 1999), ebenso wie im Importin- $\beta$ /Ran-Komplex (Vetter *et al.*, 1999) und in 14-3-3-Protein/Phosphopeptidkomplexen (Rittinger *et al.*, 1999). In Proteinphosphatase 2A PR65/A scheint dagegen die Kante, die aus den *turns* zwischen den HEAT-Motiven besteht,

die Interaktionsfläche zu bilden (Groves *et al.*, 1999). In der DT3-Struktur wird eine Kombination dieser zwei Interaktionen beobachtet. Die konkave Fläche der SUPR-Motive und die Kante, die aus den *loops* zwischen den Motiven besteht, bilden die Interaktionsfläche. Diese Kombination wurde auch für die Komplexe der Ankyrin-Repeat-Proteine IκB (mit NF-κB; Jacobs & Harrison, 1998) und p19<sup>INK4d</sup> (mit CDK6; Brotherton *et al.*, 1998) beschrieben und für den Aufbau des Clathrin-Trimers vorgeschlagen (Ybe *et al.*, 1999). Die Trimerisierung des Clathrins ist auch funktionell der postulierten Funktion der Superhelix in MalT, der Oligomerisierung, am ähnlichsten.

### 5.1.3 Modell für den Aufbau des aktiven MalT-Oligomers

Die aktive Form des MalT ist ein Homomultimer. Basierend auf dem DT3-Dimer, das in der Kristallanordnung beobachtet wurde, können drei Modelle für den Aufbau des MalT-Oligomers entwickelt werden. Im ersten Modell stellt das DT3-Dimer den Grundbaustein für das MalT-Oligomer dar (Abbildung 5-2, Modell I).



**Abbildung 5-2: Modelle für den Aufbau des aktiven MalT-Oligomers.** Auf Grundlage der Protein/Protein-Interaktionsfläche in DT3 können drei Modelle vorgeschlagen werden. In Modell (I) wird durch homologe Interaktionen zwischen DT2 und DT3 ein Dimer gebildet, während das Dimer in Modell (II) durch überkreuzte Interaktionen der zwei Domänen aufgebaut wird. Wechselwirkungen zwischen diesen Dimeren führen dann zur Oligomerisierung. In Modell (III) interagiert jedes MalT-Molekül über DT2 und DT3 mit zwei verschiedenen Partnermolekülen. In allen drei Modellen wird die Oligomerisierung durch die Bindung von Maltotriose in den Superhelix-Tunnel initiiert.

Die Stabilisierung des Dimers durch die zusätzlichen Wechselwirkungen zwischen den DT2-Domänen der beiden Monomere erklärt, wie die Gegenwart dieser Domäne die Affinität von DT3 für Maltotriose erhöht. In den beiden anderen Modellen wird diese Beobachtung durch direkte Wechselwirkungen zwischen DT2 und DT3 erklärt. In Modell II dimerisieren zwei Monomere durch überkreuzte Wechselwirkungen zwischen den beiden Domänen, und das Dimer ist wieder der Baustein für das Oligomer. In Modell III wird das Oligomer durch eine kettenartige Verknüpfung der Monomere aufgebaut, indem jedes MalT-Molekül über DT2 und DT3 mit zwei weiteren MalT-Monomeren interagiert. Für die Modelle (II) und (III) spricht, daß zwischen isoliertem DT2 und DT3 in Lösung eine Wechselwirkung festgestellt werden konnte (Danot, unveröffentlichte Ergebnisse), und daß das DT3-Dimer im Kristall in Abwesenheit des für die Oligomerisierung essentiellen Liganden Maltotriose erhalten wurde. Weiterhin favorisiert der scheinbare Verlauf der MalT-Oligomerisierung über eine dimere Form (Schreiber & Richet, 1999) Modell (II) gegenüber Modell (III).

Wie Maltotriose die Oligomerisierung moduliert wird in weiteren Studien zu klären sein. Die gebundene Maltotriose könnte direkt den Protein/Protein-Interaktionspartner kontaktieren, der an die Wechselwirkungsfläche am Ende des Superhelixtunnels bindet. Das Zerschneiden der DT3-Kristalle bei Zugabe von Maltotriose deutet jedoch auf eine Konformationsänderung durch Bindung des Liganden hin. Nach Zugabe von Glucose konnte keine zusätzliche Elektronendichte identifiziert werden, und in Lösung wird ebenfalls ein oligomerer Zucker für eine effiziente Bindung benötigt (Danot, 2000). Ein ähnliches Verhalten wurde für *maltose binding protein* (MBP) und Maltodextrin-Phosphorylase (MalP) beschrieben (O'Reilly *et al.*, 1997; Quijcho *et al.*, 1997). Bindung eines Oligosaccharids führt bei diesen Proteinen zum Verknicken eines Gelenkbereichs, und Glucose ist nicht dazu in der Lage, diese Konformationsänderung zu induzieren (Quijcho *et al.*, 1997). Möglicherweise wird in DT3 durch die Ligandenbindung die Form der Superhelix verändert, z.B. der Durchmesser, und damit die Interaktionsfläche. Eine Konformationsänderung in MalT wird auch durch das veränderte Proteolysemuster nach Maltotriosebindung angedeutet (Danot, 2000). Der Verknüpfungsbereich zwischen DT2 und DT3 wird dabei geschützt, was durch eine Konformationsänderung innerhalb einer der beiden Domänen, einer Änderung der relativen Orientierung der Domänen zueinander, oder die induzierte Oligomerisierung erklärt werden kann.

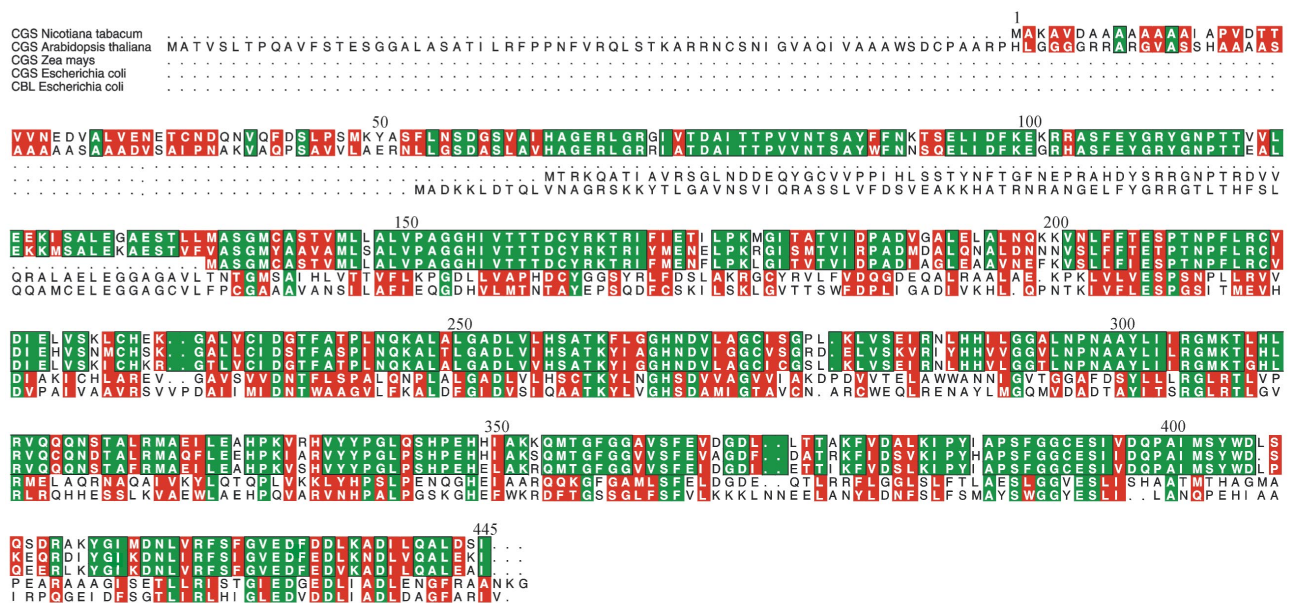
Die Protein/Protein-Interaktionsfläche von DT3 könnte auch für die Bindung anderer Proteine, z.B. MalK, verwendet werden, und somit an der Repression der MalT-Aktivität über Protein/Protein-Wechselwirkungen beteiligt sein. Es ist jedoch nicht die Bindungsstelle für

MalY, da DT3 im Gegensatz zu MalT nicht an immobilisiertes MalY bindet (Daten nicht gezeigt).

## 5.2 Cystathionin- $\gamma$ -Synthase aus *N. tabacum*

### 5.2.1 Vergleich der tCGS mit verwandten Enzymen

Auf Sequenzebene ähnelt die tCGS den CGS Enzymen aus anderen Organismen und auch der CBL (Abbildung 5-3). Auffällig ist die N-terminale Erweiterung der CGS aus Pflanzen. Sie enthält die Signalsequenz für den Transport in Chloroplasten (Wallsgrave, 1983) und wird *in vivo* vermutlich durch spezifische Proteasen entfernt. In der Struktur der tCGS ist dieser Bereich scheinbar flexibel und in der Elektronendichteverteilung nicht definiert. Der Sequenz aus *Zea mays* fehlt die N-terminale Erweiterung und zusätzlich die gesamte N-terminale Domäne, die an der Bindung des PLP-Cofaktors und dem Aufbau des CGS-Tetramers beteiligt ist. Die Analyse der DNA-Sequenz läßt vermuten, daß diese verkürzte Sequenz auf die Mißinterpretation eines internen Methionins als Startcodon zurückzuführen ist.



**Abbildung 5-3: Vergleich der CGS-Sequenzen aus verschiedenen Organismen sowie der CBL aus *E. coli*.** Die Numerierung der Aminosäuren in tCGS ist über der Sequenz angegeben. Konservierte Reste sind grün eingefärbt. Sie sind außerdem eingerahmt, wenn sie in den CGS-Sequenzen aus Pflanzen konserviert sind. Positionen mit konservierten physikalisch-chemischen Eigenschaften sind rot hervorgehoben.

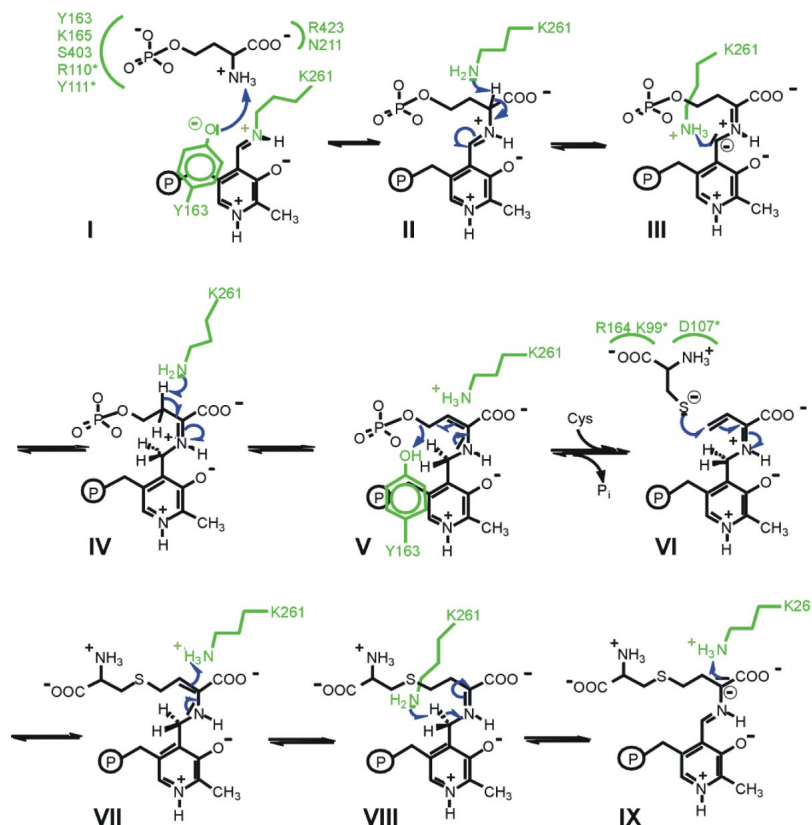
Der Sequenzvergleich spiegelt auch die unterschiedliche Substratspezifität bakterieller und pflanzlicher CGS sowie die abweichende Reaktionsspezifität der CBL wider. Während tCGS



zum Enzym aus *Arabidopsis thaliana* 78 % identische Positionen aufweist, sind es zur CGS aus *E. coli* nur 34 % und zur CBL aus *E. coli* 28 %. Einige der Reste im Aktivzentrum sind konserviert, z.B. Tyr163 (Numerierung für tCGS), Asp236 und Lys261, während andere Positionen, die an der Substratbindung beteiligt sind, mit dem Reaktionstyp und der Substratspezifität variieren, z.B. Glu107, Pro387 und Cys392. In allen Enzymen konservierte Reste finden sich über die gesamte Sequenz verteilt, v.a. Glycine (z.B. Gly112, 251, 306, 392) und Proline (Pro209, 323, 340) in engen *turns* und anderen strukturell wichtigen Positionen. Zusammen mit dem konservierten Hydrophobizitätsmuster, z.B. im  $\beta$ -Faltblatt der PLP-bindenden Domäne (konserviert hydrophob: 133, 156, 157, 183, 203-205, 232, 235, 254, 256, 275), bestimmen sie den konservierten Faltungstyp von tCGS (Abschnitt 4.2.4) sowie CGS (Clausen *et al.*, 1998) und CBL (Clausen *et al.*, 1996) aus *E. coli*. Innerhalb der sehr ähnlichen Gesamtstrukturen bestimmen dann kleine Variationen und einzelne Aminosäureaustausche den Reaktionstyp und die Substratspezifität.

### 5.2.2 Reaktionsmechanismus und Substratspezifität

Für die Katalyse durch CGS wurde ein Mechanismus vorgeschlagen (Brzovic *et al.*, 1990), der hier mit kleinen Veränderungen übernommen wurde. Aufgrund der Strukturdaten können jetzt die substratbindenden Reste benannt und den konservierten Resten Lys261, Tyr108\* und Tyr163 katalytische Funktionen zugeordnet werden (Abbildung 5-4).

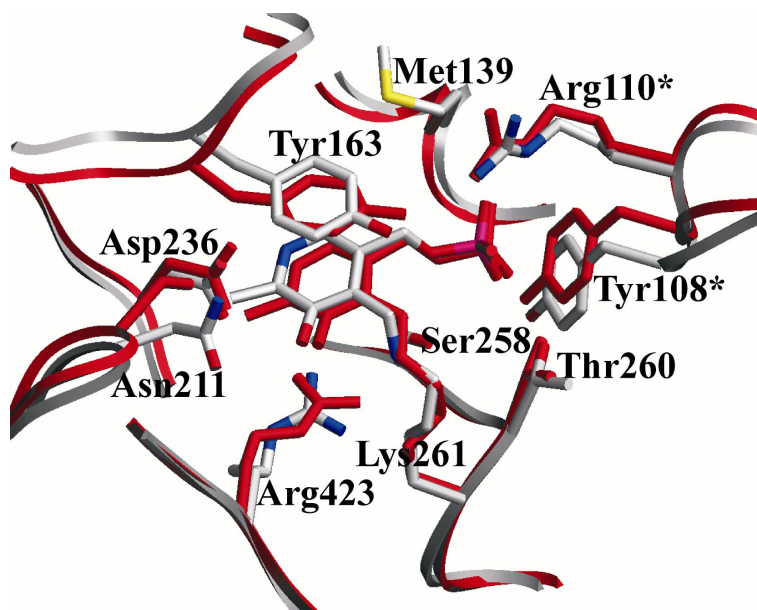


**Abbildung 5-4: Reaktionsmechanismus für tCGS.** Transaldiminierung (I) und Protonentransfer von C $\alpha$  auf C4' (II-III) führen zur Bildung eines Ketimsins (IV). Das Ketimin wird an C $\beta$  deprotoniert (IV) und das Phosphat abgespalten (V). Das entstandene  $\beta,\gamma$ -ungesättigte Zwischenprodukt (VI) wird *partitioning intermediate* genannt. Es kann zu einem Enamino-PLP-aldimin isomerisieren ( $\gamma$ -Eliminierung), oder durch ein Nukleophil angegriffen werden ( $\gamma$ -Substitution), in der physiologischen Reaktion L-Cystein (VI). Schließlich wird das Proton von C4' auf C $\alpha$  zurück übertragen (VII-IX).

Nach Transaldiminierung (I) und  $\alpha$ -Protonenabstraktion (II) entsteht ein Pyridoxalketimin (III). Abspaltung eines  $\beta$ -Protons (IV) sowie der Abgangsgruppe (V) führen zur Bildung eines  $\beta,\gamma$ -ungesättigten Ketimins, dem sogenannten *partitioning intermediate* (VI). Von hier aus kommt es durch Addition eines Nucleophils (VI), in der physiologischen Reaktion L-Cystein, zur  $\gamma$ -Substitution (VII) und der Bildung des Produkt-PLP-aldimins (VII-IX). Alternativ kann eine  $\gamma$ -Eliminierung stattfinden, indem durch Isomerisierung des *partitioning intermediate* ein Enamino-PLP-aldimin entsteht, das in  $\alpha$ -Ketobutyrat und Ammoniak gespalten wird.

Die Hydroxylgruppe des Tyr163 wird durch Bindung des Substratanalogons APPA von der Aldiminbindung verdrängt und zur  $C\gamma$ - $C\delta$ -Bindung des Liganden verschoben. Durch diese Bewegung könnte Tyr163 ein Proton von der Aminogruppe des ankommenden Homoserinphosphats auf die Phosphat-Abgangsgruppe des Substrats übertragen. Das Tyrosin ist in den Transsulfurierungsenzymen der  $\gamma$ -Familie konserviert, während in anderen PLP-Enzymen auch Histidin oder Tryptophan diese Position parallel zum PLP-Cofaktor einnehmen können. Der erniedrigte  $pK_a$ -Wert für die Hydroxylgruppe des Tyr163, den die vorgeschlagene Säure-Base-Katalyse voraussetzt, könnte auf die Interaktion mit dem protonierten Aldimin und den nur in CGS und CBL beobachteten Kontakt zu Arg110\* zurückzuführen sein. Aufschluß über die Bedeutung der Hydroxylgruppe sollten Experimente mit einer Tyr163Phe-Variante der tCGS liefern können.

Die Aldiminbindung zwischen dem PLP-Cofaktor und dem Substratanalogon APPA tautomerisiert vermutlich, wie für das Substrat vorgeschlagen (Abbildung 5-4), zu einem Ketimin.

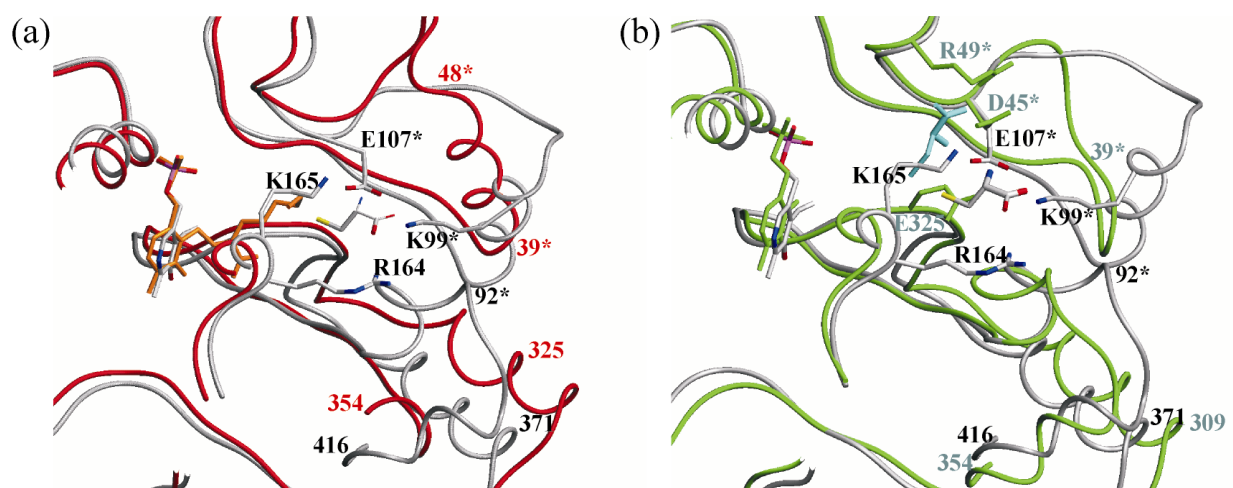


**Abbildung 5-5: Überlagerung der Aktivzentren von tCGS und der CBL aus *E. coli*.** Die Reste sind mit der Numerierung für tCGS beschriftet. Die größten Unterschiede zur CBL weisen Tyr163, Tyr108\* und Asn211 auf. Die beiden Tyrosine sind vermutlich in beiden Enzymen an der Katalyse beteiligt.

Die Planarität der C3-C4-C4'-N-C $\alpha$ -C $\beta$ -Kette läßt nicht eindeutig auf eine Form schließen, aber die Abnahme der Absorption bei 425 nm und die Zunahme der Absorption bei 330 nm während der Komplexbildung deuten auf die Bildung eines Ketimins hin. Die Seitenkette des Lys261 ist in einer geeigneten Position, um den Protonentransfer von C $\alpha$  auf C4' zu katalysieren. Sie wird durch eine Interaktion mit Tyr108\* nahe dem C $\alpha$  des APPA fixiert. In der CBL hingegen überträgt das Lysin des Aktivzentrums das abstrahierte  $\alpha$ -Proton vermutlich direkt auf die Abgangsgruppe des Substrats. Das Tyr108\* der tCGS ist in identischer Position wie das Tyrosin in der *E. coli*-CGS, während der Rest in der CBL in Richtung des distalen Endes des PLP-gebundenen Substrats verschoben ist (Abbildung 5-5). Dieses Tyrosin scheint die Seitenkette des Lysins im Aktivzentrum nach der  $\alpha$ -Protonenabstraktion zu C4' (CGS) bzw. der Abgangsgruppe (CBL) zu dirigieren.

Asn211 bildet mit den beiden *cis*-Prolinen in einem *turn* im Aktivzentrum ein PXNP-Motiv, das in allen CGS-Sequenzen konserviert ist. Der modellierte Komplex mit Homoserinphosphat zeigt, daß das Asparagin die verkipppte Orientierung des PLP-Cofaktors im externen Aldimin durch eine Interaktion mit O3' stabilisieren könnte. Im Komplex der tCGS mit dem Substratanalogon APPA konnte allerdings kein solcher Kontakt identifiziert werden.

Die Bindungsstelle für das zweite Substrat L-Cystein ist in tCGS elektrostatisch und sterisch gut auf den Liganden abgestimmt. Allerdings wird der Bereich für die Seitenkette des Cysteins zunächst durch die Abgangsgruppe des ersten Substrats Homoserinphosphat versperrt. Das erklärt auf molekularer Ebene den beobachteten Katalyseverlauf nach einem ping-pong *bi-bi* Mechanismus (Kreft *et al.*, 1994).



**Abbildung 5-6:** Vergleich der Strukturen von tCGS sowie CBL und CGS aus *E. coli*. (a) Vergleich der tCGS (grau) mit CBL (rot). Auffällige Unterschiede ergeben sich um CBL Rest 325, tCGS Rest 371, und CBL Helix3 (zwischen 39\* und 48\*). (b) Vergleich der tCGS (grau) mit der CGS aus *E. coli* (grün). Die modellierten Komplexe mit L-Cystein ergeben unterschiedliche Bindungsorientierungen. Allerdings kommen die terminalen Sulfhydrylgruppen der Cysteinmoleküle in ähnlichen Positionen zu liegen.

In der *E. coli*-CGS erfolgt die Bindung des Cysteins in einer anderen Orientierung (Clausen *et al.*, 1998), aber die terminale Sulfhydrylgruppe kommt in einer ähnlichen Position zu liegen (Abbildung 5-6b), die für den folgenden Angriff an C $\gamma$  des PLP-gebundenen  $\beta,\gamma$ -ungesättigten Reaktionsintermediats geeignet ist.

Der modellierte Homoserinphosphatkomplex und die experimentell bestimmte Struktur des Komplexes mit dem Substratanalogen APPA stimmen in den Interaktionen zwischen tCGS und dem Liganden gut überein. Allerdings ist im APPA-Komplex im Gegensatz zum modellierten Komplex Glu107\* der nächste Bindungspartner in der Phosphatbindungstasche. Die Nähe des negativ geladenen Rests zur negativ geladenen Abgangsgruppe läßt vermuten, daß Glu107\* an der Freisetzung des Phosphats beteiligt ist. Das Phosphonat bzw. Phosphat des APPA bzw. Homoserinphosphats interagiert außerdem mit der zu ihm rotierten Aminogruppe des Lys165. Dieser Rest ist in den pflanzlichen CGS konserviert, in den bakteriellen Enzymen jedoch durch ein Glycin ersetzt. Die Wechselwirkung mit Lys165 scheint von entscheidender Bedeutung für die Spezifität des pflanzlichen Enzyms für den Phosphoester des Homoserins zu sein. Das Glycin im bakteriellen Enzym favorisiert hingegen die Bindung von Homoserin mit den größeren und weniger stark negativ geladenen Abgangsgruppen Succinat bzw. Acetat.

Da in CGS und CBL viele katalytisch wichtige Aminosäuren konserviert sind, scheint der Substratbindungsgeometrie eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der Reaktionsspezifität zuzukommen. In der CBL aus *E. coli* versperren die Aminosäuren im Bereich um Helix 3 (Reste 37\* bis 55\*) die Bindungsstelle, die tCGS für Cystein verwendet (Abbildung 5-6a). Für die Aufnahme des distalen Teils des Cystathionins scheint daher eine Bewegung von Helix 3 notwendig zu sein (Clausen *et al.*, 1997b). Diese Helix könnte in CBL die Abgangsgruppe des Substrats verdrängen und dadurch Substitutionsreaktionen verhindern, was die Spezifität der CBL für Eliminierungsreaktionen erklären könnte. In CGS sind die beiden Bindungsstellen für Homoserin und Cystein, d.h. für den proximalen und den distalen Teil des Cystathionins, bereits vorgeformt. Das erklärt die Inhibition der CGS-Aktivität durch das Produkt Cystathionin (Guggenheim & Flavin, 1969).

### **5.2.3 Inhibitor Komplexe und strukturbasierte Wirkstoffentwicklung**

CGS ist ein attraktiver Angriffspunkt für die Pestizidentwicklung (siehe Abschnitt 2.2.3). Die Affinität der bekannten CGS-Inhibitoren reicht bisher nicht für die Wirkstoffentwicklung aus (Steebhorn & Clausen, 2000), und das Erreichen einer hohen Spezifität ist aufgrund der Ähnlichkeit zu hCGL notwendig und schwierig (Abschnitt 5.3). Die vorgestellten

Kristallstrukturen von Komplexen zwischen tCGS und Inhibitoren zeigen Faktoren auf, welche die Affinität und Spezifität für Liganden bestimmen, und liefern so wichtige Informationen für die weitere Wirkstoffentwicklung.

#### *Inhibition durch das Substratanalogon APPA*

APPA bildet ein externes Aldimin mit dem PLP-Cofaktor, aber keine kovalente Bindung zum Proteinanteil der tCGS. Eine bei Inhibition PLP-abhängiger Enzyme durch  $\beta,\gamma$ -ungesättigte Aminosäuren oft beobachtete irreversible Inaktivierung durch Michael-Addition an der Doppelbindung findet also nicht statt. Das Ausbleiben der Inaktivierungsreaktion könnte auf die Optimierung des Aktivzentrums für die Aufnahme einer solchen reaktiven Spezies hindeuten, da das Zwischenprodukt der physiologischen Reaktion auch ein  $\beta,\gamma$ -ungesättigtes Ketimin ist. APPA weist keinen elektronegativen Substituenten auf, der die Doppelbindung für einen nukleophilen Angriff aktiviert, im Gegensatz zu den bekannten irreversiblen Inaktivatoren wie Propargylglycin.

Der  $K_m$ -Wert von 7 mM für Homoserinphosphat deutet auf eine schwache Bindung dieses Substrats hin, was die Erfolgsaussichten für Substratanaloga als Inhibitoren einschränkt. Die Affinität des APPA reicht tatsächlich nicht für die Wirkstoffentwicklung aus, aber eine Verbesserung des Inhibitors scheint möglich zu sein. Die Affinität könnte durch weitere Gruppen erhöht werden, die Interaktionen mit Seitenketten im Aktivzentrum eingehen, z.B. durch eine Carboxymethylgruppe an C $\delta$  für die Interaktion mit Arg110\*, Tyr163 oder Tyr111\*. Ein anderer Ansatz wäre die Aktivierung der Doppelbindung für einen nukleophilen Angriff durch Tyr163, z.B. durch einen Fluor-Substituenten an C $\gamma$ .

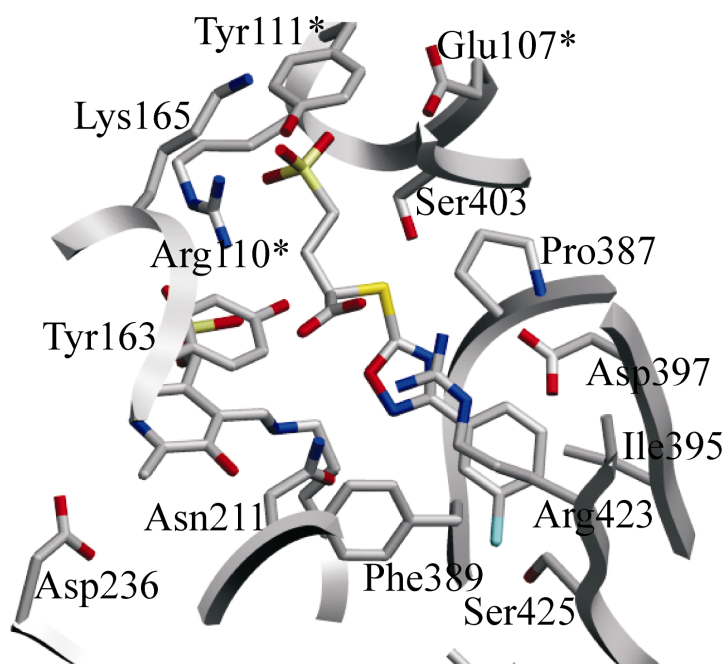
#### *Inhibition durch PPCA und verwandte Pyridinderivate*

PPCA interagiert ebenso wie APPA mit der Phosphat- und der Carboxylbindungstasche der tCGS, aber es kann kein externes Aldimin bilden. Die niedrigere Affinität des PPCA ist wahrscheinlich auf die gestörte *stacking*-Wechselwirkung zwischen Tyr163 und dem PLP-Cofaktor zurückzuführen. Außerdem orientiert der Pyridinring des PPCA die beiden funktionellen Gruppen so, daß die gleichzeitige Interaktion sowohl mit der Phosphat- als auch mit der Carboxylbindungstasche nicht mit optimaler Bindungsgeometrie erfolgt. Die Optimierung einer der Interaktionen würde jedoch die andere Interaktion verhindern und ist daher energetisch ungünstig. Die nicht-optimale Besetzung der Phosphatbindungstasche zeigt Lys165, das sich dem PPCA-Phosphonat nicht nähert. Die schwache Bindung des PPCA äußert sich auch im hohen mittleren B-Faktor für den Inhibitor.

Es liegt nahe, die Bindung von PPCA durch Neuordnung der funktionellen Gruppen zu verbessern. Verschiebung der Phosphonomethylgruppe nach Position 4 oder Verlängerung zu einer Phosphonoethylgruppe sollte eine optimierte Interaktion zwischen der PPCA-Carboxylgruppe und Arg423 ermöglichen. Diese Verbesserung scheint allerdings durch den Verlust der Interaktion des Pyridinstickstoffs mit Arg423 mehr als ausgeglichen zu werden, da 4-(Phosphonomethyl)pyridin-2-carbonsäure ein schwächerer Inhibitor ( $K_i = 0,3 \text{ mM}$ ) der tCGS ist als PPCA ( $K_i = 0,2 \text{ mM}$ ) (Clausen *et al.*, 1999). Die Störung der *stacking*-Wechselwirkung zwischen Tyr163 und dem Cofaktor läßt die Entwicklung hochaffiner Inhibitoren auf Basis des PPCA jedoch generell fraglich erscheinen.

#### *Der Inhibitor CTCPO besetzt eine neue Bindungstasche*

Die Struktur des tCGS/CTCPO-Komplexes zeigt eine ungewöhnliche Bindungsgeometrie, die wichtige Anregungen für die weitere Wirkstoffentwicklung gibt. Aufgrund der gebogenen Konformation des Inhibitors bleibt die Mitte des Aktivzentrums unbesetzt und die *stacking*-Interaktion zwischen Tyr163 und dem PLP wird nicht gestört. Die Ringsysteme des CTCPO interagieren statt dessen mit einer bisher unbekannten Bindungstasche im Aktivzentrum, die von den physiologischen Substraten nicht genutzt wird. Das ermöglicht CTCPO die um eine Größenordnung stärkere Bindung an tCGS ( $K_i = 2 \text{ }\mu\text{M}$ ) im Vergleich zu APPA ( $K_i = 27 \text{ }\mu\text{M}$ ). Die Kombination von Interaktionen in allen drei Bindungstaschen, der neuen Bindungstasche sowie der Carboxyl- und der Phosphatbindungstasche, sollte CGS-Inhibitoren liefern, die den bekannten Inhibitoren in Affinität und Spezifität deutlich überlegen sind.



**Abbildung 5-7: Modellierter Komplex aus tCGS und einem CTCPO-Derivat.** An C $\alpha$  der CTCPO-Carboxymethylgruppe wurde eine Phosphonoethylgruppe angefügt. Diese Gruppe ermöglicht eine zusätzliche Interaktion mit der Phosphatbindungstasche der tCGS, ohne die *stacking*-Wechselwirkung zwischen Tyr163 und dem PLP-Cofaktor zu stören.

Ausgehend von CTCPO würde eine zusätzliche Phosphonoethylgruppe eine Interaktion mit der Phosphatbindungstasche ermöglichen, ohne die *stacking*-Wechselwirkung zwischen Tyr163 und dem Cofaktor zu stören (Abbildung 5-7). Ein anderer Ansatz wäre, einem Substratanalogon, das ein externes Aldimin bilden kann (z.B. 2-Amino-5-phosphonopentansäure), an C $\beta$  eine Gruppe für Interaktionen in der neuen Bindungstasche anzufügen. Die fehlende Konformationsänderung für Arg423 im APPA-Komplex deutet jedoch darauf hin, daß CTCPO die geeignetere Leitstruktur ist. Diese Konformationsänderung des Arg423 öffnet die neue Bindungstasche, ermöglicht die Interaktion mit dem 1,2,4-Oxadiazol und scheint die Interaktion mit der Carboxylatgruppe zu optimieren, indem sie eine wasserstoffverbrückte Ionenbindung ermöglicht (N-H $\cdots$ O Winkel 160° für CTCPO, 146° für APPA, 139° für PPCA; Mittelwert nach Taylor & Kennard (1983): 162°).

Die Reste, welche die neue Bindungstasche in tCGS bilden, sind innerhalb der  $\gamma$ -Familie PLP-abhängiger Enzyme nicht konserviert (Abbildung 5-3). Die Ausnutzung dieser Bindungstasche sollte daher geeignet sein, die Spezifität von Inhibitoren für CGS zu erhöhen. Selbst die Unterscheidung zwischen pflanzlicher und bakterieller CGS scheint möglich, da die entsprechenden Reste in den pflanzlichen CGS höher konserviert sind als in den bakteriellen.

#### *Ausblick*

Die Komplexe der tCGS mit Inhibitoren zeigen, daß die Bindungstaschen für Liganden in tCGS größtenteils vorgeformt sind. Daher ist dieses Enzym für das strukturbasierte Wirkstoffdesign geeignet. Größere Konformationsänderungen werden lediglich für Arg423, Tyr163 und Lys261 beobachtet, wovon die beiden letzteren vermutlich an der Katalyse beteiligt sind.

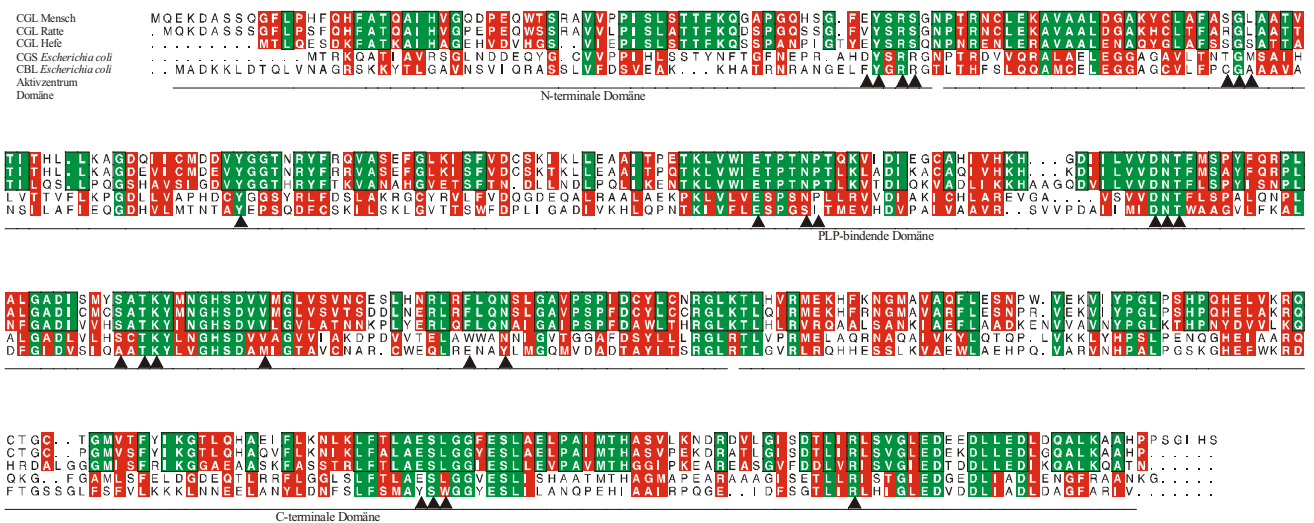
CGS-Inhibitoren, welche die Mitte des Aktivzentrums mit großen Gruppen besetzen, machen eine Verkipfung des Tyr163 notwendig. Diese Verkipfung scheint nur dann günstig zu sein, wenn der PLP-Cofaktor dieser Bewegung durch eine Transaldiminierung folgen kann. Die Bindung in der CTCPO-Geometrie erfordert keine Verkipfung des Tyr163. Die Kombination dieses Bindungsmodus mit Interaktionen in der Phosphatbindungstasche scheint daher sehr aussichtsreich für die Entwicklung hochaffiner Inhibitoren, die eine hohe Spezifität für tCGS zeigen (siehe auch Abschnitt 5.3.3).

### 5.3 Humane Cystathionin-γ-Lyase

#### 5.3.1 Ein effizientes Expressions- und Reinigungssystem für humane CGL

Aufgrund der wichtigen physiologischen Rolle der CGL und ihrer Verknüpfung mit verschiedenen Krankheiten sind funktionelle und strukturelle Untersuchungen an diesem Enzym von großem Interesse. Die vorgestellte rekombinante Expression und Reinigung des Enzyms in aktiver Form machen hCGL in großer Menge zugänglich und ermöglichen so derartige Untersuchungen. Damit gelang die erste rekombinante Produktion eines Transsulfurierungsenzyms aus einem Säugerorganismus.

Nach Amplifikation der hCGL-mRNA konnte kein zweites PCR-Produkt mit einer internen Deletion detektiert werden, wie es von Lu *et al.* (1992b) beschrieben worden war. Die hCGL weist in ihrer gesamten Sequenz eine hohe Homologie zu den Enzymen aus anderen Organismen und zu den Sequenzen von CGS- und CBL-Enzymen auf (Abbildung 5-8).



**Abbildung 5-8: Vergleich der Aminosäuresequenzen von CGL-Enzymen sowie CGS und CBL.** Positionen mit identischen Aminosäuren sind grün hinterlegt, während die Positionen, die mit Aminosäuren ähnlicher physikalisch-chemischer Eigenschaften besetzt sind, rot hervorgehoben sind. Reste, die in den Strukturen von CBL und CGS als Aktivzentrum-Reste identifiziert wurden, sind markiert (▲).

Aus den Kristallstrukturen von CBL (Clausen *et al.*, 1996) und CGS (Clausen *et al.*, 1998; Steegborn *et al.*, 1999) können den Domänen und einzelnen Aminosäuren dieser Proteine und ihrer Verwandten spezifische Funktionen zugeordnet werden. Die kürzere mRNA-Spezies würde zu einem Protein führen, dem ein Teil der PLP-Bindungsdomäne mit katalytisch wichtigen Resten fehlt (Abbildung 5-8). Das entsprechende Protein wäre also nicht aktiv.



Das UV/*vis*-Spektrum der gereinigten hCGL wies ein unerwartetes zusätzliches Maximum bei 494 nm auf. Diese Bande könnte auf eine Heterogenität der Aktivzentren aufgrund eines unidentifizierten Faktors aus *E. coli* zurückzuführen sein, der mit dem PLP-Cofaktor ein stabiles Quinonderivat bildet. Da die Bande nicht beobachtet wurde, wenn CGL-Holoenzym aus freiem PLP und Apoenzym rekonstituiert wurde, scheint es sich nicht um unterschiedliche Cofaktor-Umgebungen innerhalb des CGL-Tetramers zu handeln. Für CGL aus Rattenleber waren anhand von Fluoreszenzstudien zwei unterschiedliche PLP-Bindungsstellen mit zehnfach unterschiedlicher Affinität für den Cofaktor identifiziert worden (Churchich *et al.*, 1975). Ein  $\alpha_2\beta_2$ -Aufbau wurde auch für CGS aus *E. coli* beschrieben, wobei  $\alpha$  und  $\beta$  gleiche Polypeptide mit unterschiedlichen Nettoladungen und Reaktionsraten für PG darstellen (Johnston *et al.*, 1979).

### 5.3.2 Humane CGL zeigt ausgeprägte Substrat- und Reaktionsspezifität

Für CGL aus Hefe wurden für die Substrate L-Cystin und L-Cystein spezifische Aktivitäten gefunden, die 78 % bzw. 10 % der Aktivität mit dem physiologischen Substrat L-Cystathionin entsprechen (Yamagata *et al.*, 1993). Auch die CGL aus *Streptomyces sp.* (Nagasawa *et al.*, 1984) und das Enzym aus Rattenleber (Matsuo & Greenberg, 1958; Uren *et al.*, 1978) zeigen ausgeprägte Aktivität gegen L-Cystin (Tabelle 5.1). Im Gegensatz dazu besitzt hCGL eine überraschende Substratspezifität und eine klare Präferenz für die Trennung von C-S- gegenüber S-S-Bindungen. L-Cystein und L-Cystin werden um Größenordnungen langsamer umgesetzt als das physiologische Substrat Cystathionin, das zudem nahezu ausschließlich an der C $\gamma$ -S-Bindung gespalten wird.

**Tabelle 5.1: Kinetische Parameter für CGL-Enzyme aus verschiedenen Organismen**

Organismus	Substrat	K <sub>m</sub> [mM]	v <sub>max</sub> [mol/(min x mg)]	v <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> [ml/(min x mg)]	Referenz
Mensch	L-Cystathionin	0,5	2,5	5,0	vorliegende Arbeit
Ratte	L-Cystathionin	3,0	12,3	4,1	(Matsuo & Greenberg, 1958)
	L-Cystathionin	3,5	4,6	1,3	(Uren <i>et al.</i> , 1978)
	L-Cystin	0,07	0,29	4,1	(Uren <i>et al.</i> , 1978)
Bäckerhefe	L-Cystathionin	0,25	0,71	2,8	(Yamagata <i>et al.</i> , 1993)
<i>Streptomyces</i>	L-Cystathionin	0,20	1,37	6,9	(Nagasawa <i>et al.</i> , 1984)
	L-Cystin	0,91	4,73	5,3	(Nagasawa <i>et al.</i> , 1984)
<i>Neurospora</i>	L-Cystin	0,03			(Flavin & Slaughter, 1964)

Ein Grund für die schlechte Umsetzung von L-Cystin könnte sein, daß es schwierig ist, die Bindung zwischen zwei gleichen Atomen (den beiden Schwefelatomen) ausreichend zu polarisieren. Die Aktivität der CGL aus anderen Organismen gegenüber L-Cystin läßt sich dann durch eine geringere Regiospezifität erklären, die einen Angriff an der C $\beta$ -S-Bindung ermöglicht.

Berücksichtigt man neben der hohen Substratspezifität der hCGL die geringen Konzentrationen von L-Cystein und L-Cystin *in vivo* (Griffith, 1987), so scheint eine nennenswerte Umsetzung dieser Substrate durch hCGL äußerst unwahrscheinlich. Die vermutete Bedeutung von hCGL bei einigen Formen der Cystinose (Akkumulation von L-Cystein) oder eine Verwendung von CGL für die Verringerung des Cyst(e)in-Levels zur Behandlung von Leukomen scheint daher äußerst fraglich (Uren *et al.*, 1978).

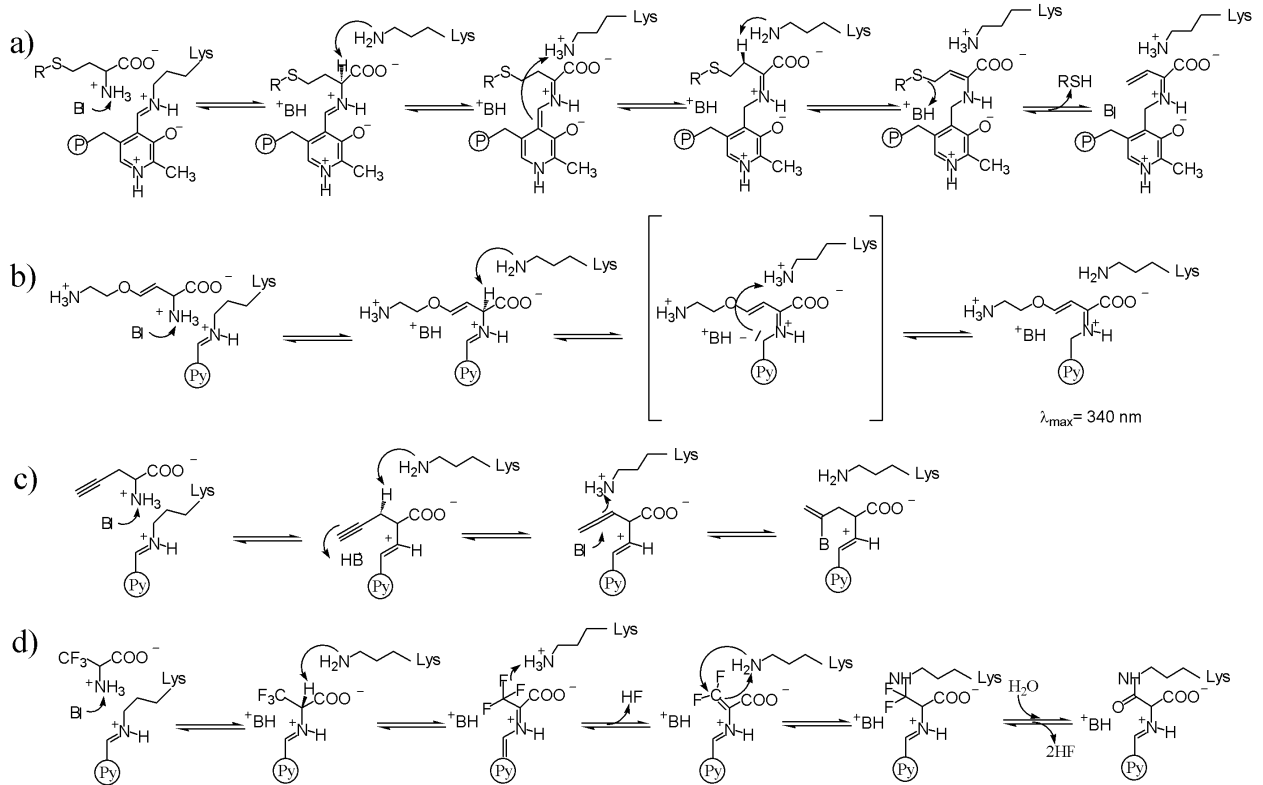
### 5.3.3 Inhibition durch AVG, PG und F<sub>3</sub>Ala

*AVG ist ein hochaffiner hCGL-Inhibitor*

Die Inhibition der hCGL durch AVG folgt einem *slow-binding* Mechanismus. Die Meßwerte konnten dabei mit Mechanismus (I) aus Tabelle 4-10 interpretiert werden. Allerdings ergab die Auftragung von  $1/(k_{\text{obs}}-k_2)$  gegen  $1/[I]$  nicht den erwarteten linearen Zusammenhang, sondern ein hyperbolisches Verhalten, das Mechanismus (II) favorisiert. Dieser Mechanismus wurde bisher für die meisten *slow-binding* Inhibitionsreaktionen gefunden (Morrison & Walsh, 1988; Szedlacsek & Duggleby, 1995). Diese Diskrepanz läßt sich unter der Annahme erklären, daß  $K_i$  sehr viel größer ist als  $K_i^*$ . Bei einer Variation der Inhibitorkonzentration im Bereich von  $K_i^*$  ( $\mu\text{M}$ ) bewegt man sich deutlich unter  $K_i$  ( $\text{mM}$ ). Die Gleichung für  $k_{\text{obs}}$  kann dann für Mechanismus (II) zu Gleichung 4 (Tabelle 4-10) vereinfacht werden, welche die gleiche Form hat wie Gleichung 2. Die Auswertung der Daten mit Gleichung 2 ist in diesem Fall also auch für Mechanismus (II) korrekt.

Der folgende Reaktionsverlauf erklärt die beobachtete Inhibition der CGL durch AVG nach Mechanismus II (Abbildung 5-9b). AVG bildet mit dem PLP-Cofaktor ein externes Aldimin, das dem schwachen Komplex EI entspricht, da es durch Umkehrung der Transaldiminierung wieder gelöst werden kann. Abstraktion des AVG-C $\alpha$ -Protons durch das Lysin im Aktivzentrum der CGL und Transfer des Protons auf PLP-C4' kann dann zur Bildung eines stabilen Ketiminkomplexes führen, der EI\* entspricht. Dieser Mechanismus wurde von Clausen *et al.* (1997a) für die AVG-Inhibition der CBL auf Grundlage der Kristallstruktur des CBL-AVG-Komplexes vorgeschlagen. Da die meisten Reste im Aktivzentrum der CBL auch in CGL konserviert sind (Abbildung 5-8), kann für CGL ein ähnlicher Mechanismus

angenommen werden. Ein Ketiminkomplex erklärt auch das Auftauchen der Bande bei 330 nm und die gleichzeitige Abnahme der Absorption bei 427 nm, welche die Bindung von AVG begleiten.



**Abbildung 5-9:** Mechanismen für Katalysezyklus und Inaktivierung von CGL. Das PLP-Phosphat ist als P und der Pyridinring als Py dargestellt. (a) Vorgeschlagener Katalysemechanismus für CGL. Neben dem Lysin ist ein noch nicht identifizierter Rest B als Säure-Base-Katalysator beteiligt. (b) Inhibition der CGL durch AVG. Nach der Transaldiminierung findet eine Umlagerung zu einem stabilen Ketimin statt. (c) Inaktivierung der CGL durch PG. Durch Umlagerung zu einem Allen wird C $\gamma$  für die nachfolgende Michael-Addition aktiviert. (d) Irreversible Inaktivierung der CGL durch F<sub>3</sub>Ala. Das aktivierte C $\beta$  ist Ziel einer Michael-Addition, vermutlich mit der Aminogruppe des Lysins als Nukleophil.

Da in Säugern keine Methioninbiosynthese stattfindet, sind die Enzyme dieses Stoffwechselweges attraktive Angriffspunkte für Pestizide. Aufgrund der effizienten Inhibition der CBL aus *E. coli* und Pflanzen durch AVG und der Annahme, AVG zeige nur geringe Reaktivität gegenüber den Transsulfurierungsenzymen aus Säugern (CGL und CBS) (Owens *et al.*, 1968), wurde diese Substanz als Leitmolekül für die Entwicklung neuer Pestizide vorgeschlagen (Clausen *et al.*, 1997a; Owens *et al.*, 1968). Die vorliegende Arbeit zeigt allerdings, daß die Inhibitionskonstante  $K_i^*$  für hCGL (10,5  $\mu$ M) lediglich um den Faktor 10 über dem Wert für *E. coli*-CBL liegt (1,1  $\mu$ M) (Clausen *et al.*, 1997a), und um den Faktor 50 kleiner ist als der  $K_m$  für das physiologische Substrat L-Cystathionin (0,5 mM).

AVG ist also ein starker Inhibitor der hCGL und scheint nicht als Leitstruktur für die Pestizidentwicklung geeignet zu sein.

#### *Irreversible Inaktivierung der hCGL durch PG und F<sub>3</sub>Ala*

Es wird seit längerem diskutiert, daß der Ansatz der *mechanism-based* Inaktivierung die Entwicklung von sehr spezifischen Inhibitoren ermöglichen sollte (John, 1995; Silverman, 1988). PG und F<sub>3</sub>Ala sind als effiziente irreversible Inaktivatoren der Transsulfurierungsenzyme bekannt (Abeles & Walsh, 1973; Fearon *et al.*, 1982; Silverman & Abeles, 1976; Silverman & Abeles, 1977; Washtien & Abeles, 1977). Die ausgeprägte Substrat- und Reaktionsspezifität der hCGL und die Inhibitionsstudien der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, daß die Entwicklung von *mechanism-based* Inhibitoren möglich ist, die zwischen den homologen Aktivzentren von CGL und CBL unterscheiden können. PG ist ein deutlich stärkerer Inhibitor der CGL als F<sub>3</sub>Ala, und die relativen Reaktivitäten dieser Inhibitoren stimmen qualitativ mit der hCGL-Aktivität gegen die Substrate L-Cystathionin/L-Cystin überein. Bei der Inhibition der CBL kehren sich die relativen Reaktivitäten von PG und F<sub>3</sub>Ala um (Alting *et al.*, 1995; Silverman & Abeles, 1976). In diesem Zusammenhang ist auch interessant, daß  $\gamma,\gamma,\gamma$ -Trifluormethylalanin ein deutlich stärkerer CGL-Inhibitor ist als F<sub>3</sub>Ala (Alston *et al.*, 1981), was die Entwicklung spezifischer CGL- und CGS-Inhibitoren auf der Basis  $\gamma$ -halogenierte  $\alpha$ -Aminosäuren nahelegt.

Die höhere Reaktivität von PG gegen CGL im Vergleich zu F<sub>3</sub>Ala kann mit dem postulierten Reaktionsmechanismen für CGL erklärt werden (Abbildung 5-9a). Nach Abstraktion des  $\alpha$ -Protons durch das Lysin im Aktivzentrum wird durch Reprotonierung an C4' ein Ketimin gebildet. Anschließend abstrahiert der Lysinrest ein Proton in  $\beta$ -Position. Eine weitere, noch nicht identifizierte Base im Aktivzentrum, die während der vorhergehenden Transaldiminierung ein Proton von der Aminogruppe des Liganden abstrahiert hat, fungiert nun als Protonendonator bei der Spaltung der C $\gamma$ -S-Bindung. Diese Basenfunktion könnte von PG genutzt werden, um über sein aktiviertes  $\gamma$ -Kohlenstoffatom eine kovalente Bindung zum Enzym zu knüpfen (Abbildung 5-9c). Im Gegensatz dazu besitzt F<sub>3</sub>Ala kein reaktives  $\gamma$ -Kohlenstoffatom, und die einzige Base, die reaktiv gegen den  $\beta$ -Kohlenstoff sein dürfte, ist das Lysin des Aktivzentrums. In der CBL protoniert dieses Lysin die Abgangsgruppe an C $\beta$  und ist daher in einer geeigneten Orientierung für eine Michael-Addition, wohingegen das entsprechende Lysin in der CGL vermutlich C4' protoniert und daher in einer Orientierung vorliegt, die eine Reaktion an C $\beta$  weniger begünstigt.

*Ausblick auf die weitere Wirkstoffentwicklung*

Die vorliegenden Inhibitorstudien lassen die Entwicklung spezifischer Inhibitoren für Transsulfurierungsenzyme auf Basis irreversibler Inaktivatoren aussichtsreicher erscheinen als die Entwicklung ausgehend von AVG. Die Spezifität der irreversiblen Inaktivatoren kommt durch Schritte zustande, die der anfänglichen  $\alpha$ -Protonenabstraktion nachfolgen. Dadurch kann z.B. eine relativ hohe Selektivität für CGS und CGL erreicht werden, die beide am  $C\gamma$ -Atom ihres Substrats angreifen. Eine anspruchsvolle Aufgabe liegt nun in der Entwicklung von Inhibitoren, die zwischen den ähnlichen Aktivzentren von CGS und CGL unterscheiden können. Ein Ansatz ist die Inhibition der CGS durch Analoga ihres ersten Substrats, einer aktivierten Form von Homoserinphosphat. Die Struktur des Komplexes mit einem solchen Analogon, APPA (Abschnitt 4.2.5), zeigt Möglichkeiten auf, wie die Affinität und Spezifität derartiger Inhibitoren weiter gesteigert werden kann. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Struktur der CGS im Komplex mit dem neuen Inhibitor CTCPO (Abschnitt 4.2.5). Mit Hilfe dieser Struktur konnte eine Bindungstasche identifiziert werden, die von den physiologischen Substraten nicht genutzt wird und für CGS spezifisch ist. Eine Kombination dieser Interaktionen mit dem Prinzip der *mechanism-based* Inaktivierung sollte die spezifische und effiziente Inhibition der CGS möglich machen. Die Struktur der CGL wird uns in Zukunft vermutlich ähnliche Informationen über das Aktivzentrum dieses Enzyms liefern und so zur Entwicklung spezifischer CGL-Inhibitoren beitragen.



- Aarnes, H. (1980). Biosynthesis of the thioether cystathionine in barley seedlings. *Plant Sci. Lett.* **19**, 81-89.
- Abeles, R. H. & Walsh, C. T. (1973). Acetylenic enzyme inactivators. Inactivation of  $\gamma$ -cystathionase, *in vitro* and *in vivo*, by propargylglycine. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 6124-6125.
- Alexander, F. W., Sandmeier, E., Mehta, P. K. & Christen, P. (1994). Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regionspecific  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subgroups. *Eur. J. Biochem.* **219**, 953-960.
- Alston, A. T., Muramatsu, H., Ueda, T. & Bright, H. J. (1981). Inactivation of  $\gamma$ -cystathionase by  $\gamma$ -fluorinated amino acids. *FEBS Lett.* **128**, 293-297.
- Alting, A. C., Engels, W. J. M., Schalkwijk, S. & Exterkate, F. A. (1995). Purification and characterization of cystathionine  $\beta$ -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 and its possible role in flavor development in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4037-4042.
- Baikalov, I., Schroder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Grzeskowiak, K., R.P., G. & Dickerson, R. E. (1996). Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry* **35**, 11053-11061.
- Barton, G. J. (1993). ALSCRIPT a tool to format multiple sequence alignments. *Prot. Engineering* **6**, 37-40.
- Beato, M., Chavez, S. & Truss, M. (1996). Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* **61**, 240-251.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucl. Acids Res.* **28**, 235-242.
- Billy, G., Muller, P. & Chatagner, F. (1975). New insights into the active center of rat liver cystathionase. *Biochim. Biophys. Acta* **397**, 231-243.
- Boos, W. & Shuman, H. (1998). Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: Transport, metabolism, and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 204-229.
- Böhm, H.-J. (1992). The computer program LUDI: A new method for the de novo design of enzyme inhibitors. *J. Comput.-Aided Mol. Design* **6**, 61-78.
- 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.
- Brotherton, D. H., Dhanaraj, V., Wick, S., Brizuela, L., Domaille, P. J., Volyanic, E., Xu, X., Parisini, E., Smith, B. O., Archer, S. J., Serano, M., Brenner, S. L., Blundell, T. L. & Laue, E. D. (1998). Crystal structure of the complex of the cyclin-D dependent kinase cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19<sup>INK4a</sup>. *Nature* **365**, 244-250.
- Brünger, A. T. (1992a). The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-474.
- Brünger, A. T. (1992b). *X-PLOR (Version 3.1) Manual*, Yale University Press, New Haven and London.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* **D54**, 905-921.
- Brzovic, P., Litzenberger Holbrook, E., Greene, R. C. & Dunn, M. F. (1990). Reaction mechanism of *Escherichia coli* cystathionine  $\gamma$ -synthase: Direct evidence for a pyridoxamine derivative of vinylglyoxylate as a key intermediate in pyridoxal phosphate dependent  $\gamma$ -elimination and  $\gamma$ -replacement reactions. *Biochemistry* **29**, 442-451.
- Calkhoven, C. F. & Ab, G. (1996). Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochem. J.* **317**, 329-342.
- Carter, C. W. j. & Carter, C. W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.* **254**, 12219-12223.

- CCP4. (1979). *The SERC (UK) Collaborative Computing Project No. 4, a suite of programs for protein crystallography*, Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
- Cha, S. (1975). Tight-binding inhibitors-I. Kinetic behavior. *Biochem. Pharmacol.* **24**, 2177-2185.
- Cha, S. (1976). Tight-binding inhibitors-III. A new approach for the determination of competition between tight-binding inhibitors and substrates-inhibition of adenosine deaminase by coformycin. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 2695-2702.
- Chen, M.-S., Silverstein, A. M., Pratt, W. B. & Chinkers, M. (1996). The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant. *J. Biol. Chem.* **271**, 32315-32320.
- Churchich, J. E., Beeler, T. & Ja Oh, K. (1975). Nonequivalent binding sites in cystathionase. Nanosecond and steady fluorescence studies. *J. Biol. Chem.* **250**, 7722-7727.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. & Müller, C. W. (1999). Structure of importin- $\beta$  bound to the IBB domain of importin- $\alpha$ . *Nature* **399**, 221-229.
- Clausen, T., Huber, R., Laber, B., Pohlenz, H.-D. & Messerschmidt, A. (1996). Crystal structure of the pyridoxal-5'-phosphate dependent cystathionine  $\beta$ -lyase from *Escherichia coli* at 1.83 Å. *J. Mol. Biol.* **262**, 202-224.
- Clausen, T., Huber, R., Messerschmidt, A., Pohlenz, H.-D. & Laber, B. (1997a). Slow-binding inhibition of *Escherichia coli* cystathionine  $\beta$ -lyase by L-aminoethoxyvinylglycine: A kinetic and x-ray study. *Biochemistry* **36**, 12633-12643.
- Clausen, T., Huber, R., Prade, L., Wahl, M. C. & Messerschmidt, A. (1998). Crystal structure of *Escherichia coli* cystathionine  $\gamma$ -synthase at 1.5 Å resolution. *EMBO J.* **17**, 6827-6838.
- Clausen, T., Laber, B. & Messerschmidt, A. (1997b). Mode of action of cystathionine  $\beta$ -lyase. *Biol. Chem.* **378**, 321-326.
- Clausen, T., Schlegel, A., Peist, R., Schneider, E., Steegborn, C., Chang, Y.-S., Haase, A., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D. & Boos, W. (2000). X-ray structure of MalY from *Escherichia coli*: A pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzyme acting as a modulator in *mal* gene expression. *EMBO J.* **19**, 831-842.
- Clausen, T., Wahl, M. C., Messerschmidt, A., Huber, R., Fuhrmann, J. C., Laber, B., Streber, W. & Steegborn, C. (1999). Cloning, purification and characterisation of cystathionine  $\gamma$ -synthase from *Nicotiana tabacum*. *Biol. Chem.* **380**, 1237-1242.
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. & Kuriyan, J. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localisation signal by the nuclear import factor karyopherin  $\alpha$ . *Cell* **94**, 193-204.
- Cowtan, A. (1994). 'dm': An automated procedure for phase improvement by density modification *ESF/CCP4 Newsletter* **31**, 34-38.
- Cramer, P., Bushnell, D. A., Fu, J. H., Gnatt, A. L., Maier-Davis, B., Thompson, N. E., Burgess, R. R., Edwards, A. M., David, P. R. & Kornberg, R. D. (2000). Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* **288**, 640-649.
- Crowther, R. A. & Blow, D. M. (1967). A method of positioning a known molecule in an unknown crystal structure. *Acta Cryst.* **23**, 544-548.
- Dang, C. V. & Lewis, B. C. (1997). Role of oncogenic transcription factor c-Myc in cell cycle regulation, apoptosis and metabolism. *J. Biomed. Sci.* **4**, 269-278.
- Danot, O. (2000). A complex signaling module governs the activity of MalT, the prototype of an emerging transactivator family. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, in press.
- Danot, O. & Raibaud, O. (1994). Multiple protein-DNA and protein-protein interactions are involved in transcriptional activation by MalT. *Mol. Microbiol.* **14**, 335-346.
- Danot, O., Vidal-Ingigliardi, D. & Raibaud, O. (1996). Two amino acid residues from the DNA-binding domain of MalT play a crucial role in transcriptional activation. *J. Mol. Biol.* **262**, 1-11.



- Das, A. K., Cohen, P. T. W. & Barford, D. (1998). The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* **17**, 1192-1199.
- Dasgupta, S., Iyer, G. H., Bryant, S. H., Lawrence, C. E. & Bell, J. A. (1997). Extent and nature of contacts between protein molecules in crystal lattices and between subunits of protein oligomers. *Proteins* **28**, 494-514.
- Decker, K., Gerhardt, F. & Boos, W. (1999). The role of the trehalose system in regulating the maltose regulon of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **32**, 777-788.
- De Schrijver, A. & De Mot, R. (1999). A subfamily of MalT-related ATP-dependent regulators in the LuxR family. *Microbiology* **145**, 1287-1288.
- Debarbouille, M., Shuman, H. A., Silhavy, T. J. & Schwartz, M. (1978). Dominant constitutive mutations in *malT*, the positive regulator gene of the maltose regulon in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **124**, 359-371.
- Dunathan, H. C. (1971). Stereochemical aspects of pyridoxal phosphate catalysis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **35**, 79-134.
- Dunathan, H. C. & Voet, J. G. (1974). Stereochemical evidence for the evolution of pyridoxal-phosphate enzymes of various function from a common ancestor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **71**, 3888-3891.
- Eadie, G. S. (1942). *J. Biol. Chem.* **146**, 85.
- Edman, P. (1970). Sequence determination. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* **8**, 211-255.
- Eick, D., Wedel, A. & Heumann, H. (1994). From initiation to elongation: comparison of transcription by prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases. *Trends Genet.* **10**, 292-296.
- Engl, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein-structure refinement. *Acta Cryst.* **A47**, 392-400.
- Evans, P. R. (1997). Scala. *ESF/CCP4 Newsletter* **33**, 22-24.
- Evans, S. V. (1993). SETOR: hardware lighted three-dimensional solid model representations of macro-molecules. *J. Mol. Graphics* **11**, 134-138.
- Fearon, C. W., Rodkey, J. A. & Abeles, R. H. (1982). Identification of the active-site residue of  $\gamma$ -cystathionase labeled by the suicide inactivator  $\beta,\beta,\beta$ -trifluoralanine. *Biochemistry* **21**, 3790-3794.
- Felsenfeld, G., Boyes, J., Chung, J., Clark, D. & Studitsky, V. (1996). Chromatin structure and gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9384-9388.
- Fersht, A. (1985). *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman, New York.
- Flavin, M. (1975). Methionine biosynthesis. In *Metabolic Pathways* (Greenberg, D. M., ed.), Vol. 7, pp. 457-503. Academic Press, New York.
- Flavin, M. & Slaughter, C. (1964). *J. Biol. Chem.* **239**, 2212-2219.
- Ford, G. C., Eichele, G. & Jansonius, J. N. (1980). Three-dimensional structure of a pyridoxal phosphate dependent enzyme, mitochondrial aspartate aminotransferase. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* **77**, 2559-2563.
- Fu, J. H., Gnatt, A. L., Bushnell, D. A., Jensen, G. J., Thompson, N. E., Burgess, R. R., David, P. R. & Kornberg, R. D. (1999). Yeast RNA polymerase II at 5 angstrom resolution. *Cell* **98**, 799-810.
- Fuller, R. S., Funnell, B. E. & Kornberg, A. (1984). The DnaA protein complex with the *Escherichia coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites. *Cell* **38**, 889-900.
- Gaitonde, M. K. (1967). A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem. J.* **104**, 627-633.
- Giovanelli, J., Mudd, S. H. & Datko, A. H. (1980). Sulfur amino acids in plants. In *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise* (Stumpf, P. K., Conn, E.E., ed.), Vol. 5, pp. 453-505. Academic Press, New York.

- Griffith, O. W. (1987). Mammalian sulfur amino acid metabolism: An overview. *Methods Enzymol.* **143**, 367-376.
- Grishin, N. V., Phillips, M. A. & Goldsmith, E. J. (1995). Modelling of the spatial structure of eukaryotic ornithin decarboxylase. *Protein Sci.* **4**, 1291-1304.
- Groves, M. R. & Barford, D. (1999). Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 383-389.
- Groves, M. R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B. A. & Barford, D. (1999). The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly arranged HEAT motifs. *Cell* **96**, 99-110.
- Guggenheim, S. & Flavin, M. (1969). Cystathionine  $\gamma$ -synthase. A pyridoxal phosphate enzyme catalyzing rapid exchanges of beta and alpha hydrogen atoms in amino acids. *J. Biol. Chem.* **244**, 3722-3727.
- György, P. (1934). Vitamin B<sub>2</sub> and the pellagra-like dermatitis of rats. *Nature* **133**, 448-449.
- György, P. (1964). History of vitamin B<sub>6</sub>. Introductory remarks. *Vitamines & Hormones* **22**, 361-365.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hofstee, B. H. J. (1959). *Nature* **184**, 1296.
- Holm, L. & Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices (Dali 2.0). *J. Mol. Biol.* **233**, 123-138.
- Hubbard, S. J., Campbell, S. F. & Thornton, J. M. (1991). Molecular recognition conformational-analysis of limited proteolytic sites and serine proteinase protein inhibitors. *J. Mol. Biol.* **220**, 507-530.
- Huber, A. H., Nelson, J. W. & Weiss, W. I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of  $\beta$ -catenin. *Cell* **90**, 871-882.
- Huber, R. (1965). Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Cryst.* **19**, 353-356.
- Hyde, C. C., Ahmed, S. A., Padlan, E. A., Miles, E. W. & Davies, D. R. (1988). Three-dimensional structure of the tryptophane synthetase  $\alpha_2\beta_2$  multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **263**, 17857-17871.
- Jacobs, M. D. & Harrison, S. C. (1998). Structure of an I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B complex. *Cell* **95**, 749-758.
- Jansonius, J. N. (1998). Structure, evolution and action of vitamin B-6-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 759-769.
- John, R. A. (1995). Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1248**, 81-96.
- Johnston, M., Jankowski, D., Marcotte, P., Tanaka, H., Esaki, N., Soda, K. & Walsh, C. (1979). Suicide inactivation of bacterial cystathionine  $\gamma$ -synthase and methionine  $\gamma$ -lyase during processing of L-propargylglycine. *Biochemistry* **18**, 4691-4701.
- Jokerst, R. S. (1989). *Mol. Gen. Genet.* **215**, 266.
- Jones, N. (1991). Complex inhibitions. *Curr. Biol.* **1**, 224-226.
- Jones, S. & Thornton, J. M. (1995). Protein-protein interactions - a review of protein dimer structures. *Progress Biophys. Mol. Biol.* **63**, 31-65.
- Jones, T. A. (1992). a, yaap, asap, @\*\*\*? A set of averaging programs. In *Molecular Replacement (CCP4)*, pp. 92-105.
- Jones, T. A. & Kjeldgaard, M. (1991). *O - The Manual*, Uppsala, Sweden.
- Käck, H., Sandmark, J., Gibson, K., Schneider, G. & Lindqvist, Y. (1999). Crystal structure of diaminopelargonic acid synthase: Evolutionary relationships between pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *J. Mol. Biol.* **291**, 857-876.

- Kabsch, W. & Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637.
- Kato, A., Ogura, M. & Suda, M. (1966). Control mechanism in the rat liver enzyme system converting L-methionine to L-cysteine. *J. Biochem.* **59**, 40-48.
- Kitz, R. & Wilson, I. B. (1962). *J. Biol. Chem.* **237**, 3245.
- Kleywegt, G. J. (1995). *ESF/CCP4 Newsletter* **31**, 45-50.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1993). Masks made easy. *ESF/CCP4 Newsletter* **28**, 56-59.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1994). A super position. *ESF/CCP4 Newsletters* **31**, 9-14.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1996a). Phi/Psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure* **4**, 1395-1400.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1996b). xdlMAPMAN and xdIDATAMAN. *Acta Cryst.* **D52**, 826-828.
- Knight, S. (1989). *Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase - A structural study*, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950.
- Krauss, G. (1997). *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Kreft, B. D., Townsend, A., Pohlenz, H. D. & Laber, B. (1994). Purification and properties of cystathionine  $\gamma$ -synthase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* **104**, 1215-1220.
- Kuhnau, S., Reyes, M., Sievertsen, A., Shuman, H. A. & Boos, W. (1991). The activities of the Escherichia coli MalK protein in maltose transport, regulation, and inducer exclusion can be separated by mutations. *J. Bacteriol.* **173**, 2180-2186.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S. & Candia, O. A. (1979). An improved assay for nanomolar amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* **100**, 95-97.
- 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.
- Leslie, A. G. W. (1990). MOSFLM program. Abstract of the crystallographic computing school., pp. 27-38, Bischofberg.
- Lewin, B. (1994). *Genes V*, Oxford University Press, Oxford.
- Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R. J., Fu, H. & Liddington, R. (1995). Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* **376**, 191-194.
- Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J. M. & Reinberg, D. (1992a). Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* **358**, 641-645.
- Lu, Y., O'Dowd, B. F., Orrega, H. & Israel, Y. (1992b). Cloning and nucleotide sequence of human liver cDNA encoding for cystathionine  $\gamma$ -lyase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 749-758.
- Luzatti, V. (1952). Traitement statistique des erreurs dans la détermination des structures cristallines. *Acta Cryst.* **A5**, 802-810.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R., K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 angstrom resolution. *Nature* **389**, 251-260.
- Mach, H., Middaugh, C. R. & Lewis, R. V. (1992). Statistical determination of the average values of the extinction coefficient of tryptophan and tyrosine residues in native proteins. *Anal. Biochem.* **200**, 74-80.
- Mangelsdorf, D. J. & Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850.

- Matsuo, Y. & Greenberg, D. M. (1958). A crystalline enzyme that cleaves homoserine and cystathionine. I. Isolation procedure and some physicochemical properties. *J. Biol. Chem.* **230**, 545-560.
- McPherson, A. (1982). *Preparation and Analysis of Protein Crystals*, Wiley, New York.
- Mehta, P. K., Hale, T. I. & Christen, P. (1993). Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur. J. Biochem.* **214**, 549-561.
- Mehta, P. K. & Christen, P. (1998). The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol.* **74**, 129-184.
- Merritt, E. A. & Murphy, M. E. P. (1994). RASTER3D Version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics. *Acta Cryst.* **D50**, 869-873.
- Minamisawa, K., Fukai, K. & Asami, T. (1990). Rhizobitoxine inhibition of hydrogenase synthesis in free-living *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **172**, 4505-4509.
- Morrison, J. F. (1982). The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions. *Trends Biochem. Sci.* **7**, 102-105.
- Morrison, J. F. & Walsh, C. T. (1988). The behavior and significance of slow-binding inhibitors. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **61**, 201-301.
- Mui, A. L.-F. (1999). The role of STATs in proliferation, differentiation, and apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 1547-1558.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T. & Chothia, C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins - database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* **247**, 536-540.
- Mushahwar, I. K. & Koeppe, R. E. (1973). Rat liver L-diaminopropionate ammonia lyase. Identification as cystathionase. *J. Biol. Chem.* **248**, 7407-7411.
- Nagasawa, T., Kanzaki, H. & Yamada, H. (1984). Cystathionine  $\gamma$ -lyase of *Streptomyces phaeochromogenes*. *J. Biol. Chem.* **259**, 10393-10403.
- Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst.* **A50**, 157-163.
- O'Reilly, M., Watson, K. A., Schinzel, R., Palm, D. & Johnson, L. N. (1997). Oligosaccharide substrate binding in *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase. *Nature Struct. Biol.* **4**, 405-412.
- Otwinowski, Z. (1991). *Daresbury Study Weekend proceedings*.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1993). DENZO: A film processing program for macromolecular crystallography, Yale University.
- Owens, L. D., Guggenheim, S. & Hilton, J. L. (1968). Rhizobium synthesized phytotoxin: an inhibitor of  $\beta$ -cystathionase in *Salmonella typhimurium*. *Biochim. Biophys. Acta* **158**, 219-225.
- Pabo, C. O. & Sauer, R. T. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 1053-1095.
- Palm, D., Klein, H. W., Schinzel, R., Buehner, M. & Helmreich, E. J. M. (1990). The role of pyridoxal-5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis. *Biochemistry* **29**, 1099-1107.
- Panagiotidis, C. H., Boos, W. & Shuman, H. A. (1998). The ATP-binding cassette subunit of the maltose transporter MalK antagonizes MalT, the activator of the *Escherichia coli* mal regulon. *Mol. Microbiol.* **30**, 535-546.
- Park, H.-W., Boduluri, S. R., Moomaw, J. F., Casey, P. J. & Beese, L. S. (1997). Crystal structure of protein farnesyltransferase at 2.25 angstrom resolution. *Science* **275**, 1800-1804.
- Peist, R., Koch, A., Bolek, P., Sewitz, S., Kolbus, T. & Boos, W. (1997). Characterization of the *aes* gene of *Escherichia coli* encoding an enzyme with esterase activity. *J. Bacteriol.* **179**, 7679-7686.

- Peters, J. W., Stowell, M. H. B. & Rees, D. C. (1996). A leucine-rich repeat variant with a novel repetitive protein structural motif. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 991-994.
- Poglitsch, C. L., Meredith, G. D., Gnatt, A. L., Jensen, G. J., Chang, W. H., Fu, J. H. & Kornberg, R. D. (1999). Electron crystal structure of an RNA polymerase II transcription elongation complex. *Cell* **98**, 791-798.
- Pruess, D. L., Scannell, J. P., Kellet, M., Ax, H. A., Janecek, J., Williams, T. H., Stempel, A. & Berger, J. (1974). Antimetabolites produced by microorganisms. X. L-2-amino-4-(2-aminoethoxy)-trans-3-butenoic acid. *J. Antibiotics* **27**, 229-233.
- Quioco, F. A., Spurlino, J. C. & Rodseth, L. E. (1997). Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin transport/chemosensory receptor. *Structure* **5**, 997-1015.
- Raibaud, O. & Richet, E. (1987). Maltotriose is the inducer of the maltose regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 3059-61.
- Raibaud, O., Vidal-Ingigliardi, D. & Richet, E. (1989). A complex nucleoprotein structure involved in activation of transcription of two divergent *Escherichia coli* promoters. *J Mol Biol* **205**, 471-85.
- Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Advan. Protein Chem.* **23**, 283-437.
- Ranish, J. A. & Hahn, S. (1996). Transcription: basal factors and activation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 151-158.
- Rarey, M., Kramer, B., Lemmen, C., Lengauer, T., Bernd, C., Hiller, C., Sonnenburg, F. & Zimmermann, M. (1998). *FlexX 1.6.5 User Guide*, GMD - German National Research Center for Information Technology, Sankt Augustin.
- Read, R. J. (1986). Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Cryst.* **A42**, 140-149.
- Reidl, J. & Boos, W. (1991). The *malX malY* operon of *Escherichia coli* encodes a novel enzyme II of the phosphotransferase system recognizing glucose and maltose and an enzyme abolishing the endogenous induction of the maltose system. *J. Bacteriol.* **173**, 4862-4876.
- Reidl, J., Romisch, K., Ehrmann, M. & Boos, W. (1989). MalI, a novel protein involved in regulation of the maltose system of *Escherichia coli*, is highly homologous to the repressor proteins GalR, CytR, and LacI. *J. Bacteriol.* **171**, 4888-99.
- Reyes, M. & Shuman, H. A. (1988). Overproduction of MalK protein prevents expression of the *Escherichia coli* mal regulon. *J. Bacteriol.* **170**, 4598-602.
- Rice, L. M. & Brünger, A. T. (1999). Crystal structure of the vesicular transport protein Sec17: Implications for SNAP function in SNARE complex disassembly. *Mol. Cell* **4**, 85-95.
- Richet, E. (1996). On the role of the multiple regulatory elements involved in the activation of the *Escherichia coli* malEp promoter. *J. Mol. Biol.* **264**, 852-62.
- Richet, E. & Raibaud, O. (1989). MalT, the regulatory protein of the *Escherichia coli* maltose system, is an ATP-dependent transcriptional activator. *EMBO J* **8**, 981-987.
- Richet, E. & Raibaud, O. (1991). Supercoiling is essential for the formation and stability of the initiation complex at the divergent malEp and malKp promoters. *J. Mol. Biol.* **218**, 529-42.
- Richet, E. & Sogaard-Andersen, L. (1994). CRP induces the repositioning of MalT at the *Escherichia coli* malKp promoter primarily through DNA bending. *EMBO J.* **13**, 4558-67.
- Richet, E., Vidal-Ingigliardi, D. & Raibaud, O. (1991). A new mechanism for coactivation of transcription initiation: repositioning of an activator triggered by the binding of a second activator. *Cell* **66**, 1185-95.
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J. & Yaffe, M. B. (1999). Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol. Cell* **4**, 153-166.
- Rojo, F. (1999). Repression of transcription initiation in bacteria. *J. Bacteriol.* **181**, 2987-2991.

- Rose, W. C., McCoy, R. H., Meyer, C. E., Carter, H. E., Womack, M. & Metz, E. T. (1935). Isolation of the "unknown essential" present in proteins. *J. Biol. Chem.* **109**, 77-80.
- Sanger, F., Nickler, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Saraste, M., Sibbald, P. R. & Wittinghofer, A. (1990). The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 430-434.
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F. U. & Moarefi, I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**, 199-210.
- Schneider, G., Käck, H. & Lindquist, Y. (2000). The manifold of vitamin B<sub>6</sub> dependent enzymes. *Structure* **8**, R1-R6.
- Schreiber, V. & Richet, E. (1999). Self-association of the *Escherichia coli* transcription activator MalT in the presence of maltotriose and ATP. *J. Biol. Chem.* **274**, 33220-33226.
- Schreiber, V., Steegborn, C., Clausen, T., Boos, W. & Richet, E. (2000). A new mechanism for the control of a procaryotic transcriptional regulator: antagonistic binding of positive and negative effectors. *Mol. Microbiol.* **35**, 765-776.
- Schwartz, M. (1987). The maltose regulon. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. & Umberger, H. E., eds.), pp. 1482-1502. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Silverman, R. B. (1988). *Mechanism-based enzyme inactivation: chemistry and enzymology*, 2, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Silverman, R. B. (1995). Mechanism-based enzyme inactivators. *Methods Enzymol.* **249**, 240-283.
- Silverman, R. B. & Abeles, R. H. (1976). Inactivation of pyridoxal phosphate dependent enzymes by mono- and polyhaloalanines. *Biochemistry* **15**, 4718-4723.
- Silverman, R. B. & Abeles, R. H. (1977). Mechanism of inactivation of  $\gamma$ -cystathionase by  $\beta,\beta,\beta$ -trifluoroalanine. *Biochemistry* **16**, 5515-5520.
- Small, I. D. & Peters, N. (2000). The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 46-47.
- Smith, M., Jessee, J., Landers, T., Jordan, J. (1991) High Efficiency Bacterial Electroporation:  $1 \times 10^{10}$  *E. coli* Transformants/ $\mu$ g. *Focus* **12**, 38-40.
- Steegborn, C. & Clausen, T. (2000). Specific Inhibition of transsulfuration enzymes. In *Recent Res. Dev. Biochem.* (Pandalai, S. G., ed.), Vol. 2, in press. Research Signpost, Kerala, India.
- Steegborn, C., Clausen, T., Sondermann, P., Jacob, U., Worbs, M., Marincovic, S., Huber, R. & Wahl, M. C. (1998). Cloning, bacterial expression, purification, and kinetic analysis of human cystathionine  $\gamma$ -lyase. *J. Biol. Chem.* **274**, 12675-12684.
- Steegborn, C., Messerschmidt, A., Laber, B., Streber, W., Huber, R. & Clausen, T. (1999). The crystal structure of cystathionine  $\gamma$ -synthase from *Nicotiana tabacum* reveals its substrate and reaction specificity. *J. Mol. Biol.* **290**, 983-996.
- Swift, S., Winson, M. K., Chan, P. F., Bainton, N. J., Birdsall, M., Reeves, P. J., Rees, C. E. D., Chhabra, S. R., Hill, P. J., Throup, J. P., Bycroft, B. W., Salmond, G. P. C., Williams, P. & Stewart, G. S. A. B. (1993). A novel strategy for the isolation of luxI homologues: evidence for the widespread distribution of a LuxR:LuxI superfamily in enteric bacteria. *Mol. Microbiol.* **10**, 511-520.
- Szedlacsek, S. E. & Duggleby, R. G. (1995). Kinetics of slow and tight-binding inhibitors. *Methods Enzymol.* **249**, 144-180.
- Taylor, R. & Kennard, O. (1983). The estimation of average molecular dimensions from crystallographic data. *Acta Cryst.* **B39**, 517-525.

- Umberger, H. E. (1978). Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 533-606.
- Uren, J. R. (1987). Cystathionine  $\beta$ -lyase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **143**, 483-486.
- Uren, J. R., Ragin, R. & Chaykovsky, M. (1978). Modulation of cysteine metabolism in mice - effects of propargylglycine and L-cyst(e)ine-degrading enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 2807-2814.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022-1025.
- Valdez, F., Gonzalez-Ceron, G., Kieser, H. M. & Servin-Gonzalez, L. (1999). The *Streptomyces coelicolor* A3(2) *lipAR* operon encodes an extracellular lipase and a new type of transcriptional regulator. *Microbiology* **145**, 2365-2374.
- Vetter, I. R., Arndt, A., Kutay, U., Görlich, D. & Wittinghofer, A. (1999). Structural view of the ran- importin  $\beta$  interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* **97**, 635-646.
- Vidal-Ingigliardi, D., Richet, E., Danot, O. & Raibaud, O. (1993). A small C-terminal region of the *Escherichia coli* MalT protein contains the DNA-binding domain. *J. Biol. Chem.* **268**, 24527-30.
- Vidal-Ingigliardi, D., Richet, E. & Raibaud, O. (1991). Two MalT binding sites in direct repeat. A structural motif involved in the activation of all the promoters of the maltose regulons in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* **218**, 323-34.
- Wahl, M. C., Huber, R., Prade, L., Marinkovic, S., Messerschmidt, A. & Clausen, T. (1997). Cloning, purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis of cystathionine- $\gamma$ -synthase from *E. coli*. *FEBS Lett.* **414**, 492-496.
- Wallsgrave, R. M., Lea, P.J., Mifflin, B.J. (1983). Intracellular localization of aspartate kinase and the enzymes of threonine and methionine biosynthesis in green leaves. *Plant Physiol.* **71**, 780-784.
- Walsh, C. T. (1979). *Enzymatic reaction mechanisms*, Freeman, San Francisco.
- Washtien, W. & Abeles, R. H. (1977). Mechanism of inactivation of  $\gamma$ -cystathionase by the acetylenic substrate analogue propargylglycine. *Biochemistry* **16**, 2485-2491.
- Weinzierl, R. O. J. (1999). *Mechanisms of Gene Expression. Structure, Function and Evolution of the Basal Transcriptional Machinery*, Imperial College Press, London.
- Whitfield, G., Jurutka, P., Haussler, C. & Haussler, M. (1999). Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **32-33**, 110-122.
- Wolberger, C. (1999). Multiprotein-DNA complexes in transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 29-56.
- Xiao, B., Smerdon, S. J., Jones, D. H., Dodson, G. G., Soneji, Y., Aitken, A. & Gamblin, S. J. (1995). Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* **376**, 188-191.
- Yamagata, S., D'Andrea, R. J., Fujisaki, S., Isaji, M. & Nakamura, K. (1993). Cloning and bacterial expression of the *CYS3* gene encoding cystathionine  $\gamma$ -lyase of *Saccharomyces cerevisiae* and the physicochemical and enzymatic properties of the protein. *J. Bacteriol.* **175**, 4800-4808.
- Ybe, J. A., Brodsky, F. M., Hofmann, K., Lin, K., Liu, S.-H., Chen, L., Earnest, T. N., Fletterick, R. J. & Hwang, P. K. (1999). Clathrin self-assembly is mediated by a tandemly repeated superhelix. *Nature* **399**, 371-375.
- Zdych, E., Peist, R., Reidl, J. & Boos, W. (1995). MalY of *Escherichia coli* is an enzyme with the activity of a beta C-S lyase (cystathionase). *J. Bacteriol.* **177**, 5035-5039.
- Zhang, G. & Darst, S. A. (1998). Structure of the *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit amino-terminal domain. *Science* **281**, 262.
- Zhang, G. Y., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K. & Darst, S. A. (1999). Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* **98**, 811-824.