

**Die Kristallstruktur eines ternären Komplexes der  
R-spezifischen Alkoholdehydrogenase aus  
*Lactobacillus brevis* in atomarer Auflösung**

**Aggregationsstudien und  
röntgenkristallographische Untersuchungen  
der thermoalkalophilen Lipase  
aus *Bacillus thermocatenuatus***

Inaugural - Dissertation

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

vorgelegt von  
Nils Helge Schlieben  
aus Schüttorf

Köln 2001



Meiner Familie



Am Ende zählt, was hinten rauskommt.

Helmut Kohl (Bundeskanzler a. D.)



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz herzlich bedanken bei

Prof. Dr. D. Schomburg, der mir dieses spannende und interessante Thema anvertraute, ein hervorragend ausgestattetes Arbeitsumfeld zur Verfügung stellte und zur steten Diskussion bereit war,

Priv.-Doz. Dr. S. Waffenschmidt für die Übernahme des Coreferats,

der *Konrad-Adenauer-Stiftung*, für die ideelle und finanzielle Förderung dieser Arbeit,

allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Anregungen und Hilfestellungen,

insbesondere Karsten Niefind, Jan Abendroth und Jörg Müller für die intensive Unterstützung und Diskussionsbereitschaft,

sowie Klaus Hövel und Annette Faust für die Hilfe bei der Messung der hochaufgelösten Daten am *ESRF* in Grenoble,

Prof. Dr. R. D. Schmid und dessen Arbeitsgruppe in Stuttgart für die durchgeführte Kooperation und Priv.-Doz. Dr. W. Hummel für die Bereitstellung transformierter *E. coli*-Zellen.



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

Nils Helge Schlieben

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dietmar Schomburg Priv.-Doz. Dr. Sabine Waffenschmidt
Einreichung des Gesuchs:	15. November 2001
Tag der mündlichen Prüfung:	14. März 2002



# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorspann</b> .....	<b>I</b>
Danksagung .....	I
Erklärung .....	III
Inhaltsverzeichnis .....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	IX
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Bedeutung von Biokatalysatoren in Stoffwechsel und Technik .....	1
1.2 Die Bedeutung NAD(P)H-abhängiger Dehydrogenasen .....	2
1.2.1 Die strukturelle Einteilung der NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen .....	4
1.2.2 Die Unterfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen .....	4
1.2.3 Die Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i> .....	8
1.3 Die Bedeutung und Struktur von Lipasen .....	9
1.3.1 Die thermoalkalophile Lipase aus <i>Bacillus thermocatenuatus</i> .....	13
1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit .....	15
<b>2 Theoretische Grundlagen ausgewählter Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1 Dynamische Lichtstreuung .....	17
2.2 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen .....	20
2.2.1 Kristallisation von Proteinen .....	20
2.2.2 Strukturlösung durch molekularen Ersatz .....	22
2.2.3 Verfeinerung der Struktur .....	24
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
3.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und EDV-Systeme .....	27
3.1.1 Chemikalien .....	27
3.1.2 Proteine .....	27
3.1.3 Materialien, Geräte und EDV-Systeme .....	27
3.2 Proteinreinigung .....	30
3.2.1 Zellaufschluß und Zentrifugation .....	30
3.2.2 Chromatographische Trennverfahren .....	31
3.2.2.1 Anionenausch-Chromatographie .....	31
3.2.2.2 Umpufferung .....	31

---

3.2.2.3	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie	32
3.2.2.4	Entsalzung	32
3.2.2.5	gekoppelte Kationen- / Anionenaustausch-Chromatographie	32
3.2.2.6	Gelpermeations-Chromatographie	32
3.2.2.7	Metallchelataffinitäts-Chromatographie	33
3.2.2.8	Umpufferung	33
3.2.2.9	Anionenaustausch-Chromatographie	33
3.2.2.10	Konzentrierung durch Ultrafiltration	33
3.3	Proteinanalytik	34
3.3.1	Proteinkonzentration	34
3.3.2	Aktivitätstests	34
3.3.3	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	35
3.3.4	Aktivitätsfärbung	35
3.3.5	Massenspektrometrie	36
3.3.5.1	ESI-Massenspektrometrie	36
3.3.5.2	MALDI-Massenspektrometrie	36
3.3.6	Dynamische Lichtstreuung	36
3.3.7	CD-Spektroskopie	36
3.4	Proteinkristallisation	37
3.5	Röntgendiffraktometrie	37
3.5.1	Kristallmontage	37
3.5.2	Diffractionsexperimente	38
3.6	Datenreduktion	39
3.7	Molekularer Ersatz und Strukturverfeinerung	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
4.1	Die R-ADH-Lb-G37D	41
4.1.1	Ausgangsbedingungen	41
4.1.2	Reinigung der R-ADH-Lb-G37D	41
4.1.2.1	4-Schritt-Aufreinigung der R-ADH-Lb-G37D	42
4.1.2.2	Zusammenfassung des Reinigungsprotokolls	45
4.1.3	Reinheitskontrolle und Analytik	45
4.1.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	46
4.1.3.2	Massenspektrometrie	46
4.1.3.3	Dynamische Lichtstreuung	48
4.1.4	Kristallisation der R-ADH-Lb-G37D	48
4.1.5	Röntgendiffraktometrie	52
4.1.6	Untersuchungen der Kristallpackung	56

4.1.7	Rechnungen zur Selbstrotationsfunktion	56
4.1.8	Rechnungen zum Molekularen Ersatz	58
4.1.8.1	Kreuzrotationsrechnungen	58
4.1.8.2	Translationsrechnungen	58
4.1.9	Strukturverfeinerung	59
4.1.10	Stereochemische Qualität der ermittelten Strukturen	66
4.2	Die H <sub>6</sub> -BTL-2	68
4.2.1	Ausgangsbedingungen	68
4.2.2	Reinigung der H <sub>6</sub> -BTL-2	68
4.2.2.1	2-Schritt-Reinigung der H <sub>6</sub> -BTL-2	68
4.2.2.1.1	Zusammenfassung des Reinigungsprotokolls	71
4.2.2.1.2	Weitere Versuche zur 2-Schritt-Reinigung	71
4.2.2.2	1-Schritt-Reinigung der H <sub>6</sub> -BTL-2	73
4.2.2.2.1	Zusammenfassung der Reinigungsprotokolle	75
4.2.3	Reinheitskontrolle und Analytik	76
4.2.3.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	76
4.2.3.2	Massenspektrometrie	77
4.2.3.3	CD-spektroskopische Messungen	78
4.2.4	Untersuchungen der WT-BTL-2, M13-IEGR-BTL-2 und H <sub>6</sub> -IEGR-BTL-2	80
4.2.5	Das Aggregationsproblem der H <sub>6</sub> -BTL-2	81
4.2.5.1	Das Löslichkeitsproblem der H <sub>6</sub> -BTL-2	81
4.2.5.2	Das Oligomerisierungsproblem der H <sub>6</sub> -BTL-2	82
4.2.6	Kristallisation der H <sub>6</sub> -BTL-2	91
4.2.6.1	Kristallisation der oligomerisierten H <sub>6</sub> -BTL-2	91
4.2.6.2	(Quasi-) Kristallisation der monomeren H <sub>6</sub> -BTL-2	93
4.2.7	Röntgendiffraktometrie	95
4.2.7.1	Röntgendiffraktometrie der oligomeren H <sub>6</sub> -BTL-2 -Kristalle	95
4.2.8	Bestimmung der Raumgruppe	96
4.2.9	Untersuchungen der Kristallpackung	98
4.2.10	Rechnungen zur Selbstrotationsfunktion	98
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>101</b>
5.1	Die R-ADH-Lb-G37D	101
5.1.1	Reinigung und Kristallisation der R-ADH-Lb-G37D	101
5.1.2	Röntgendiffraktometrie der R-ADH-Lb-G37D	102
5.1.3	Strukturlösung und Verfeinerung der Strukturen	103

---

5.1.4	Die Struktur der R-ADH-Lb-G37D	104
5.1.4.1	Einbau der Mutation	104
5.1.4.2	Bewegliche Bereiche innerhalb der Proteinstruktur	105
5.1.4.3	Bereiche mit alternativen Konformationen	107
5.1.4.4	Vergleich der verschiedenen Strukturen der R-ADH-Lb-G37D	107
5.1.4.5	Die Anordnung des Substrats und Cosubstrats im ternären Komplex der R-ADH-Lb-G37D	110
5.1.4.6	Der Bereich der Cosubstratbindung der R-ADH-Lb-G37D	113
5.1.4.7	Die Substratbindungsstelle der R-ADH-Lb-G37D	116
5.1.4.8	Das aktive Zentrum und der Reaktionsmechanismus der R-ADH-Lb-G37D	117
5.1.4.9	Die Cosubstratspezifität der R-ADH-Lb-G37D	121
5.1.4.10	Die Substrat- und Stereospezifität der R-ADH-Lb-G37D	124
5.1.4.11	Vergleich der R-ADH-Lb-G37D mit anderen SDR-Proteinen	128
5.2	Die H <sub>6</sub> -BTL-2	134
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>139</b>
7.1	Die R-ADH-Lb-G37D	139
7.2	Die H <sub>6</sub> -BTL-2	139
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>141</b>
A.1	Kurzzusammenfassung	141
A.2	Abstract	142
A.3	Lebenslauf	143
A.4	Veröffentlichungen über die Diplomarbeiten	144
A.5	Abbildungsverzeichnis	145
A.6	Tabellenverzeichnis	147
A.7	Literaturverzeichnis	149

# Abkürzungsverzeichnis

## 3-Buchstaben und 1-Buchstabencode der Aminosäuren

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

**Sonstige Abkürzungen**

ACP	Acetophenon
ADH	Alkoholdehydrogenase
a.i.	absolute Intensität
AS	Aminosäure
AU	<i>arbitrary units</i>
au	Asymmetrische Einheit der Elementarzelle
B	Temperaturfaktor
<i>B. pumilis</i>	<i>Bacillus pumilis</i>
BSA	Rinderserumalbumin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. thermocatenulatus</i>	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>
BTL-2	Lipase aus <i>Bacillus thermocatenulatus</i>
CD	Circulardichroismus
cmc	kritische Micellenkonzentration
Da	Dalton = 1/12 der Masse eines <sup>12</sup> C-Atoms (Einheit der molaren Masse)
DLS	dynamische Lichtstreuung
<i>E. coli</i>	Darmbakterium <i>Escherichia coli</i>
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
<i>ESRF</i>	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
E <sub>280</sub>	Extinktion bei $\lambda = 280$ nm
FAD	Flavinadenindinucleotid
F <sub>calc</sub>	berechnete Strukturfaktoramplituden
FDH	Formiatdehydrogenase
F <sub>obs</sub>	gemessene Strukturfaktoramplituden
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
F <sub>420</sub>	7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin Derivat
g	Gramm
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
His-tag	Aminosäuresequenz von 6 Histidine am Ende einer Proteinkette
H <sub>6</sub> -BTL-2	His-getaggte BTL-2
H <sub>6</sub> -IEGR-BTL-2	His-getaggte BTL-2 mit einer IEGR-Proteaseschnittstelle
I	Intensität
IEF	isoelektrische Fokussierung
IEGR	Aminosäuresequenz Isoleucin - Glutamat - Glutamin - Arginin
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>

l	Liter
LDR	<i>long chain dehydrogenases/reductases</i>
LDAO	Lauryldimethyaminoxid
M	molar
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted-laser-desorption/ionization-time-of-flight</i> -Massenspektrometrie
MDR	<i>medium chain dehydrogenases/reductases</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
Mol	Einheit der Stoffmenge
MPD	2-Methylpentadiol-2,4
MW	Molekulargewicht
M13	Aminosäuresequenz HNHRYGCGCC am Ende einer Proteinkette
M13-IEGR-BTL-2	M13-getaggte BTL-2 mit einer IEGR-Proteaseschnittstelle
N <sub>A</sub>	Avogadro-Zahl ( $6.023 \cdot 10^{23}$ Teilchen)
NAD(P)	Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat) (oxidiert)
NAD(P)(H)	Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat) (reduziert)
NCS	nicht-kristallographische Symmetrie
OGP	Octyl-β-D-glucopyranosid
p.a.	<i>pro analysi</i> (reinst)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
PEGMME	Polyethylenglycolmonomethylether
pI	Isoelektrischer Punkt
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
pK <sub>s</sub>	logarithmierte Dissoziationskonstante einer Säure
PQQ	Pyrolochinolinchinon
R-ADH-Lb	R-spezifische Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>
R-ADH-Lb-G37D	Mutante der R-spezifische Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>
R <sub>cryst</sub>	kristallographischer R-Wert
R <sub>free</sub>	freier R-Wert
R <sub>sym</sub>	linearer R-Wert
R <sub>work</sub>	R-Wert des Arbeitsdatensatzes
RSA	Röntgenstrukturanalyse
S	Siemens (Einheit der Leitfähigkeit)

## XII

---

SDR	<i>short chain dehydrogenases/reductases</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SLS	Statische Lichtstreuung
SOS	<i>sum of squares</i>
$T_M$	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UDP	Uridindiphosphat
UV	ultraviolettes Licht
$V_M$	Matthews-Koeffizient
v/v	Volumenprozent
w/w	Massenprozent
w/v	massenbezogene Volumenprozent
WT-BTL-2	Wildtyp-BTL-2
$\alpha, \beta, \gamma$	Gitterkonstanten
g	molarer Extinktionskoeffizient
$\lambda$	Wellenlänge
$\sigma_I$	Standardabweichung der Intensität
$\Theta$	Elliptizität
$[\Theta]$	spezifische Elliptizität

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Bedeutung von Biokatalysatoren in Stoffwechsel und Technik

Proteine gehören zu den wichtigsten Molekülen der belebten Natur. Ihre Vielfalt ist beinahe grenzenlos, ihre Funktionen reichen von mechanischen Aufgaben (Actin, Myosin) über Transportaufgaben (Hämoglobin, Transferrin) und Immunschutz (Antikörper) bis zu katalytischer Beteiligung an fast allen chemischen Reaktionen in biologischen Systemen (Biokatalysatoren). Proteine verfügen über zum Teil komplexe Reaktionswege, Energietransfersysteme und Regulationsmechanismen, deren Verständnis von elementarer Bedeutung für das Zusammenwirken von Stoffwechselwegen ist. Sowohl aus medizinischer (Pharmazeutika) und technischer (Waschmittel, Syntheseverfahren), als auch aus biologischer Sicht (Abbau von Schadstoffen, Umweltverschmutzung) ist das Wissen um und die Einsicht in derartige Mechanismen von besonderer Bedeutung. Die Tertiärstrukturen der Proteine sind äußerst komplex, wie sich schon aus der Vielfalt der Aufgaben ersehen läßt, die Proteine im Organismus erfüllen müssen. Das Verständnis der Raumstruktur ist entscheidend, um Funktion und Eigenschaften des betrachteten Proteins erklären zu können. Besonders bei Enzymen ist die Raumstruktur wichtig, um den genauen Reaktionsmechanismus zu bestimmen und um beobachtete Regulationsmechanismen erklären zu können. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen besteht die Möglichkeit die Stabilität, Spezifität und Effektivität des Enzyms zu verändern, dadurch den Wirkungsmechanismus im Detail zu verstehen und einen Biokatalysator mit maßgeschneiderten Eigenschaften für neuartige Anwendungen zu konstruieren (rationales Proteindesign, *Protein Engineering*).

Besonders in der pharmazeutisch-chemischen und in der Nahrungsmittelindustrie hat die Verwendung von Biokatalysatoren Einzug gehalten (zur Übersicht: Schmid et al., 2001). Die Verfügbarkeit einer hohen Anzahl unterschiedlicher Enzyme führt dazu, daß eine Vielzahl verschiedener Substrate mit einer eindeutigen Enantio- und Regioselektivität umgesetzt werden kann. Im Gegensatz zur traditionellen organischen Synthese ist hierbei kein aufwendiges Blockieren und Freisetzen von reaktiven Gruppen im Substratmolekül notwendig, die nicht an der Reaktion teilnehmen sollen. Als Beispiele für die industrielle Bedeutung von Biokatalysatoren soll die Verwendung von Penicillin-Amidase zur Produktion von semisynthetischem Penicillin (Boesten et al., 1996) oder die Verwendung von Xylose-Isomerase zur Herstellung von Fruktosesirup (Jensen et al., 1987) dienen. Auch in der chemischen Industrie wird die Enzym-vermittelte selektive Katalyse für die Synthese spezieller Chemikalien und Polymere von immer größer werdender Bedeutung (Schulze et al., 1998; Kaplan et al., 1998). Für die Synthese von phenolischen Wachsen wird beispielsweise Peroxidase verwendet, welche die

herkömmlichen Phenol-Formaldehyd-Produkte ersetzen sollen (Pokora et Cyrus, 1987) und Nitril-Hydratase, um Acrylonitril in Acrylamid umzuwandeln (Nagasawa et Yamada, 1990). Durch die Verwendung von Biokatalysatoren können diese chemische Synthesen im industriellen Maßstab unter deutlich milderer Bedingungen und billiger durchgeführt werden als durch die traditionelle organisch-chemische Variante. Bei den meisten enzymatisch-kommerziellen Prozessen kann eine hohe Ausbeute ohne störende Nebenprodukte erzielt werden.

Bei der Verwendung von Biokatalysatoren können entweder isolierte Enzyme oder auch ganze Zellen verwendet werden. Isolierte Enzyme werden typischerweise für Hydrolyse- oder Isomerisierungsreaktionen verwendet. Ganze Zellen werden häufig für Synthese-Reaktionen verwendet, bei denen neben dem Enzym ein Cofaktor notwendig ist, der seinerseits wiederum regeneriert werden muß (Faber, 1997; Dordick, 1991).

Die steigende Verwendung von Biokatalysatoren in der pharmazeutisch-chemischen Industrie ergibt sich aus der rasanten Entwicklung innerhalb zweier Schlüsseltechnologien, dem *Protein Engineering* (mit molekularer Evolution) und dem *Enzyme Engineering* (Arnold et Volkov, 1999; Stemmer, 1994). Das *Protein Engineering* und die molekulare Evolution stellen Enzyme/Proteine mit veränderter Struktur, Funktion und Selektivität vor allem im wäßrigen Milieu zur Verfügung. Das *Enzyme Engineering* beinhaltet besonders die Verbesserung des Enzyms in einer nicht-wäßrigen Umgebung. Normalerweise zeigen Enzyme in nicht-wäßriger Umgebung eine deutlich verringerte Aktivität als in ihrer natürlichen, wasserhaltigen Umgebung und schmälern dadurch die Anwendungschancen stark. Durch die Fortschritte innerhalb des *Enzyme Engineering* (zur Übersicht: Klibanov, 2001) können aber mittlerweile Biokatalysatoren produziert werden, die in wäßriger und nicht-wäßriger Umgebung eine vergleichbare Aktivität aufweisen (z.B. Subtilisin, Khmel'nitsky et al., 1994; Ru et al., 1999). Anwendungen der enzymatischen Katalyse in organischen Lösungsmitteln erstreckt sich von der Trennung chiraler Arzneimittel, Chemikalien und Reaktionsintermediate (Lalonde et Margolin, 1997) bis zur enantio- und regioselektiven Polymerisation (Park et Dordick, 2000).

## **1.2. Die Bedeutung NAD(P)H-abhängiger Dehydrogenasen**

Oxidoreduktasen sind Enzyme, die im Stoffwechsel Redoxreaktionen katalysieren. Dabei werden eine Vielzahl von unterschiedlichen Elektronenakzeptoren benötigt. Die Oxidoreduktasen lassen sich prinzipiell in drei große Gruppen aufteilen: die NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen, die NAD(P)-unabhängigen Dehydrogenasen und die meist FAD-abhängigen Alkoholoxidasen (Reid et Fewson, 1994). Die NAD(P)-unabhängigen Dehydrogenasen verwenden in der Regel PQQ oder F<sub>420</sub> als Cofaktor (Widdel et Wolfe, 1989). Die NAD(P)H-abhängigen Dehydrogenasen werden technisch als Katalysatoren für die Synthese von chiralen

Verbindungen verwendet. Viele aktive und stabile Enzyme sind heute kommerziell erhältlich, die mit einer hohen Enantioselektivität Ketone oder Ketosäuren zu chiralen Alkoholen, Hydroxysäuren oder Aminosäuren reduzieren (Hummel, 1999). Dabei können die bei der chemischen Synthese auftretenden Probleme wie Racemisierung oder Isomerisierung vermieden werden. Für technische Anwendungen ist es besonders wichtig, neuartige oder verbesserte Katalysatoren mit veränderten Substratspezifitäten zu finden. Für die Herstellung dieser verbesserten Katalysatoren gibt es zwei Möglichkeiten: Zum einen das Suchen nach neuen Enzymen innerhalb natürlich verfügbarer Quellen (*Screening*) und zum anderen die gezielte Mutation (*site-directed mutagenesis*) von bekannten Enzymen (*Protein Engineering*). Das *Screening* innerhalb von Mikroorganismen, Pflanzen und Tierzellen stellt dabei die traditionelle Methode dar, neue Enzyme zu finden (Hummel, 1997; Goodhue, 1982; Elander, 1987). *Site-directed mutagenesis* wird hingegen verwendet, um eine rationale Modifikation am bekannten Enzym durchzuführen. Dies setzt natürlich die genaue Kenntnis der Aminosäuresequenz, der dreidimensionalen Struktur und des aktiven Zentrums bzw. der Substratbindungsstelle voraus.

Aus ökonomischen Gründen müssen die NAD(P)H-abhängigen Reaktionen mit einer Regeneration des NAD(P)H einhergehen, da das Coenzym besonders in der reduzierten Form zu teuer ist, um es in stöchiometrischer Menge zu verwenden. Zudem würde das Anreichern des oxidierten Cofaktors zu einer Endprodukthemmung führen, welche zum Stillstand der gewünschten Reaktion führen würde. Durch die Kopplung der eigentlichen Dehydrogenase-Reaktion mit der Cofaktor-Regenerierungsreaktion kann es weiterhin gelingen, das Gleichgewicht thermodynamisch ungünstiger Reaktionen auf die gewünschte Produktseite zu verschieben. Üblicherweise wird zur Regeneration von NADH Formiat und die NAD-abhängige Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* verwendet (Wichmann et al., 1981). Die Verwendung von NADPH-abhängigen Dehydrogenasen wird aber dadurch erschwert, daß es keine Standardmethode gibt, um das verbrauchte Coenzym NADPH im technischen Maßstab wieder zu regenerieren. Prinzipiell kann dieses Problem durch die zwei folgenden Methoden umgangen werden. Zum einen kann die Cofaktorspezifität der reduzierenden Dehydrogenase verändert werden, indem eine NADPH-Abhängigkeit in eine NADH-Abhängigkeit umgewandelt wird. Zum anderen kann die Coenzympezifität der üblicherweise zur Regeneration verwendeten NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase (FDH) auch auf eine NADPH-Abhängigkeit erweitert werden. Da NADP(H) deutlich teurer und instabiler ist als NAD(H) (1g NADH kostet 167,- DM; 1g NADPH kostet 1.567,- DM), scheint es sinnvoll, die erste Methode zu wählen und die Cofaktorspezifität der eigentlichen Dehydrogenase zu ändern. Dies konnte schon erfolgreich für die NADP(H)-abhängige Glutathionreduktase gezeigt werden, deren Spezifität in eine NAD(H)-Abhängigkeit umgewandelt wurde (Luyten et al., 1989).

## 1.2.1 Die strukturelle Einteilung der NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen

Die NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen/Reduktasen lassen sich in drei Unterfamilien aufteilen: Die langkettigen (*long chain dehydrogenases*, LDR), die mittellangkettigen (*medium chain dehydrogenases*, MDR) und die kurzkettigen Dehydrogenasen (*short chain dehydrogenases*, SDR) (Persson et al., 1991). Diese Unterfamilien besitzen zwar alle eine gemeinsame enzymatische Aktivität, unterscheiden sich aber im Reaktionsmechanismus und in der Struktur. Die Unterfamilie der LDRs ist bisher nicht besonders gut charakterisiert worden (Inoue et al., 1989). Zu Beginn der Charakterisierungen der MDRs zählte man nur Enzyme mit einer Zink-abhängigen Aktivität zu dieser Unterfamilie, bei denen ein bestimmtes Ligandenmuster um das Zink-Ion angeordnet war (Eklund et al., 1985; Vallee et al., 1990). Dabei wurde das katalytisch wirkende Zink-Ion von drei Aminosäure-Seitenketten, meistens zwei Cysteinen und einem Histidin im aktiven Zentrum, chelatisiert. Mit der Charakterisierung des  $\zeta$ -Kristallin als MDR-Protein, welchem die typische Ligandenanordnung am Zink-Ion fehlte, wurde die genannte Restriktion aufgehoben (Borras et al., 1989). Mittlerweile gehören Enzyme wie Alkoholdehydrogenasen, Laktatdehydrogenasen, lösliche Malatdehydrogenasen und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenasen zu den MDRs (Persson et al., 1994). Die MDRs verwenden entweder NAD(H) oder NADP(H) als Cofaktor, sind Zink-abhängig und liegen in ihrer enzymatisch aktiven Form als Dimere oder Tetramere vor. Die MDRs sind bezüglich ihrer dreidimensionalen Struktur gut charakterisiert (Rossmann et al., 1975). Jedes Monomer besitzt eine Länge von 350 bis 400 Aminosäuren und setzt sich aus zwei Domänen zusammen, der katalytischen Domäne und der Cofaktorbindungsdomäne. Die Cofaktorbindungsdomäne besteht aus einer  $\beta\alpha\beta$ -Supersekundärstruktur, der sogenannten Rossmann-Faltung (s. Kap. 1.2.2). Die Struktur des katalytischen Zentrums variiert hingegen sehr stark unter den Mitgliedern der MDRs (Rossmann et al., 1975).

Die Untersuchungen an SDR-Proteinen begann erst später in den 80er Jahren. Zu Beginn ging man davon aus, daß SDRs nur in Prokaryonten und Insektenzellen vorkommen (Jörnvall et al., 1981, 1984). Mit der Charakterisierung der menschlichen 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase als SDR-Protein wurde diese Einschränkung aufgehoben (Krook et al., 1990). Eine eingehende Beschreibung dieser interessanten Unterfamilie der Dehydrogenasen erfolgt im nächsten Abschnitt.

## 1.2.2 Die Unterfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen

Innerhalb der Familie der *short chain dehydrogenases/reductases* (SDR), die auch als Tyrosin-abhängige Oxidoreduktasen klassifiziert werden, sind mittlerweile mehr als 1.600 DNA-Sequenzen in der Sequenzdatenbank registriert (Oppermann et al., 2001; Jörnvall et al., 1999) und mehr als 60 SDR-Enzyme sind biochemisch charakterisiert (Persson et al., 1991; Jörnvall

et al., 1995). Die SDR-Proteine besitzen nur wenige oder keine Cysteine (Schwartz, 1976; Marekov, 1990). Das von den SDR-Proteinen umgesetzte Substratspektrum ist sehr breit und besteht u. a. aus Alkoholen, Ribitolen, Glucosen, 15-Hydroxyprostaglandinen und unterschiedlichen Hydroxysteroiden. Die dreidimensionalen Strukturen von über 25 Mitgliedern der SDR-Familie konnten bisher zum Teil als Apoenzym und zum Teil als binärer und/oder ternärer Komplex mit Cofaktor und Substrat oder Inhibitor bestimmt werden. Dazu gehören die folgenden Strukturen:

- & 3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase aus *Streptomyces hydrogenans*  
(2HSD, 1HDC; Ghosh et al., 1991, 1994a, 1994b)
- & 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase aus Mensch  
(1A27; Ghosh et al., 1995; Azzi et al., 1996; Breton et al., 1996; Mazza et al., 1998)
- & 7 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase aus *E. coli*  
(1AH1, 1AHH, 1FMC; Tanaka et al., 1996a)
- & 3 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/Carbonylreduktase aus *Comamonas testosteroni*  
(1FK8, 1FJH; Grimm et al., 2000)
- & Carbonylreduktase/20 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase aus Schwein  
(1HU4; Ghosh et al., 2001)
- & Carbonylreduktase aus Mäuselunge  
(1CYD; Tanaka et al., 1996b)
- & 1,3,8-Trihydroxysteroidnaphthalenreduktase aus *Magnaporthe grisea*  
(1YBV, 1DOH, 1G0N, 1G0O; Anderson et al., 1996; Liao et al., 2001)
- & 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalenreduktase aus *Magnaporthe grisea*  
(1JA9, 4HNR; Liao et al., 2001)
- & Tropininreduktase I und II aus *Datura stramonium*  
(1AE1, 2AE1, 2AE2; Nakajima et al., 1998; Yamashita et al., 1999)
- & Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium*  
(1GCO; Yamamoto et al., 2000, 2001)
- & 3-Hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase aus Rattenhirn  
(1E3S, 1E3W, 1E6W; Powell et al., 2000)
- & cis-Biphenyl-2,3-dihydrodiol-2,3-dehydrogenase aus *Burkholderia cepacia*  
(1BDB; Hülsmeier et al., 1998)
- & meso-2,3-Butandioldehydrogenase aus *Klebsiella pneumoniae*  
(1GEG; Otagiri et al., 2001)
- &  $\beta$ -Keto-Acyl-Carrierprotein-Reduktase aus *Brassica napus* und *E. coli*  
(1EDO; Fisher et al., 2000; Price et al., unveröffentlicht)
- & Enoyl-Acyl-Carrierprotein-Reduktase aus *Brassica napus*  
(1CWU; Rafferty et al., 1995; Roujeinikova et al., 1999)

- & Dihydropteridinreduktase aus Rattenleber und aus Mensch  
(1DHR; Varughese et al. 1992; 1HDR; Su et al., 1993)
- & Sepiapterinreduktase aus Maus  
(1NAS; Auerbach et al., 1997)
- & GDP-4-Keto-6-deoxy-D-mannose-epimerase-reduktase aus *E. coli*  
(1FXS, 1BSV; Somers et al., 1998; Rosano et al., 2000a)
- & Mannitoldehydrogenase aus *Agaricus Bisporus*  
(1H5Q; Horer et al., 2001)
- & Alkoholdehydrogenase aus *Drosophila lebanonensis*  
(1A4U, 1B14, 1B15, 1B16, 1B2L; Benach et al., 1998; Benach et al., 1999)
- & Wildtyp der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*  
(Müller, 2000)

Zusätzlich wurde ein molekulares Modell mit Substrat-*Docking* für die Typ 10 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase aus Mensch veröffentlicht (Nordling et al., 2001).

Es existieren weitere zu den SDR-Proteinen verwandte Strukturen, die aber anderen Familien zugeordnet werden. Dies sind die UDP-galactose-4-epimerase aus *E. coli* (Bauer et al., 1992; Thoden et al., 1996), das Sulfolipid-Biosynthese-Protein aus *Arabidopsis thaliana* (Mulichak et al., 1999) und der Transkriptionsregulator NmrA (Stammers et al., 2001).

Trotz der geringen Sequenzidentität von 15 % bis 30 % weist die dreidimensionale Struktur dieser Enzyme deutliche Ähnlichkeiten in Bezug auf die Faltung, die intramolekularen Kontaktstellen, die Nucleotidbindungsstelle und das aktive Zentrum auf. In ihrer enzymatisch aktiven Form liegen die SDR-Proteine wie die MDRs entweder als Homodimere oder Homotetramere vor (Jörnvall et al., 1995). Als Ausnahme gilt hier die Carbonylreduktase aus Schwein, welche als Monomer enzymatisch aktiv ist (Ghosh et al., 2001). Jede einzelne Untereinheit ist aus ungefähr 250 Aminosäuren aufgebaut. Bei einer Unterform der SDR-Proteine, den sogenannten *extended type*-SDRs, besteht eine Untereinheit aus ungefähr 350 Aminosäuren. Alle SDR-Proteine verwenden NAD(H) und/oder NADP(H) als Cofaktor und sind Metallionen-unabhängig. Die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* bildet hier eine Ausnahme und ist das erste Metallionen-abhängige SDR-Protein.

Die Ein-Domänen-Gesamtstruktur der SDRs basiert auf einem typischen aminoterminalen Nucleotidbindungsmotif, das sich aus einzelnen  $\beta\beta$ -Einheiten aufbaut, welche ein paralleles  $\beta$ -Faltblatt bilden, das von zwei aus parallelen  $\alpha$ -Helices bestehenden Anordnungen flankiert wird (Rossmann-Faltung; Rossmann et al., 1975). Das glycinreiche Cofaktorbindungsmotif weist dabei das typische Sequenzmotif Gly-X-X-X-Gly-X-Gly auf. Alle SDR-Proteine zeigen ein zweites typisches Sequenzmotiv. Dabei handelt es sich um das Substratbindungsmotif Tyr-X-X-X-Lys, welches im aktiven Zentrum lokalisiert ist und zusammen mit einem konservierten Serin die katalytische Triade bildet. Neben den aufgeklärten Strukturen konnte durch Mutagenese-

studien die Wichtigkeit der Aminosäuren Tyrosin, Lysin und Serin für die katalytische Aktivität bestätigt werden (Ensor et al., 1991, 1994, 1996; Albalat et al., 1992; Obeid et al., 1992; Chen et al., 1993; Swanson et Frey, 1993; Cols et al., 1993; Puranen et al., 1994; Kiefer et al., 1996; Oppermann et al., 1997; Nakajin et al., 1998, 1999; Rosano et al., 2000).

Wahrscheinlich besitzen alle SDR-Proteine einen gemeinsamen Reaktionsmechanismus, der einen geordneten Verlauf besitzt, in dem zuerst der Cofaktor gebunden wird. Der während der Reaktion stattfindende Hydridtransfer wird von einem durch das Tyrosin der katalytischen Triade vermittelten Protonentransfer begleitet. Das katalytische Serin dient der Orientierung und Stabilisierung der Reaktionsintermediate. Alternativ wurde für das deprotonierte Serin die Rolle eines Säure-Base-Katalysators diskutiert, während dem Tyrosin hier nur noch eine untergeordnete Rolle zugesprochen wird (Winberg et al., 1999). Die duale Rolle des Lysins innerhalb der katalytischen Triade besteht aus der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum Nicotinamid-Ribose-Teil des Cofaktors, um dessen richtige Orientierung zu erreichen, und in der Aufgabe den  $pK_s$ -Wert der Seitenkette des katalytischen Tyrosins durch elektrostatische Wechselwirkungen zu verringern (Ghosh et al., 1994b; Auerbach et al., 1997; Benach et al., 1999). Während der Bindung des Substrats und des Cofaktors kommt es bei vielen SDR-Proteinen zu der Bewegung eines flexiblen Oberflächenloops, der beim Apoenzym ungeordnet ist. Der sogenannten Substratbindungsloop hat die Funktion das Substrat und die katalytische Triade zu bedecken und von der wasserhaltigen Umgebung abzuschirmen. Diese Region, die ungefähr zwischen den Aminosäuren 185 bis 220 liegt, weist bezüglich ihrer Hydrophobizität die größten Unterschiede unter den verschiedenen SDRs auf (Persson et al., 1991).

Die Struktur des Transkriptionsregulators NmrA, der in verschiedenen Pilzen vorkommt, weist eine unerwartete Ähnlichkeit zu der Faltung innerhalb der SDR-Familie auf, die sich aus der Aminosäuresequenz nicht ableiten läßt (Stammers et al., 2001). Dabei besitzt die aus zwei Domänen bestehenden NmrA die Rossmann-Faltung und kann NAD binden. Anders als bei den SDR-Proteinen fehlt NmrA aber das konservierte Tyrosin, das im aktiven Zentrum der SDR-Proteine lokalisiert ist. Somit weist NmrA keinerlei katalytische Aktivität als Dehydrogenase auf. Es wäre daher möglich, daß die SDR-Faltung neben ihrer typischen katalytischen Funktion in abgewandelter Form Aufgaben bei der nicht-enzymatischen Kontrolle (z.B. Transkriptionsregulation) übernehmen könnte (Stammers et al., 2001).

### 1.2.3 Die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (R-ADH-Lb und R-ADH-Lb-G37D)

Innerhalb der Gruppe der Dehydrogenasen kommt den Alkoholdehydrogenasen (ADHs) eine besondere Bedeutung zu, da sie in der Lage sind, aus prochiralen Ketonen chirale Alkohole zu bilden. Diese Alkohole stellen wiederum wertvolle Ausgangsstoffe für die Synthese von organischen Verbindungen im präparativen Maßstab dar oder können für die Produktion von Pharmazeutika und Herbiziden verwendet werden. Für die Synthese chiraler Alkohole sind verschiedene Alkoholdehydrogenasen (ADHs) erwerblich. Dazu zählen die NAD(H)-abhängige ADH aus *Saccharomyces cerevisiae*, die NAD(H)-abhängige ADH aus Pferdeleber und die NADP(H)-abhängige ADH aus *Thermobacterium brockii*, die jeweils unterschiedliche Substrate bzw. Substratgruppen umsetzen können. Keine dieser genannten Enzyme kann aber Ketone mit einer sperrigen Seitenkette wie z.B. Acetophenon oder Pinacolin umsetzen. Bei der Suche nach Enzymen, welche die genannten Substrate umsetzen können, wurde eine NAD(H)-abhängige ADH aus *Rhodococcus erythropolis* entdeckt, welche die eingesetzten Ketone in S-Alkohole umwandelt (Hummel, 1997). Weiterhin konnte eine NADP(H)-abhängige ADH aus *Lactobacillus brevis* gefunden werden, welche ähnliche Ketone in R-Alkohole umwandelte (Hummel, 1997).

Im Rahmen einer Doktorarbeit unseres Kooperationspartners am Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf am Forschungszentrum in Jülich wurde das Wildtyp-Protein dieser NADP(H)-abhängigen ADH aus *Lactobacillus brevis* (R-ADH-Lb) entdeckt, kloniert und biochemisch charakterisiert. Die R-ADH-Lb gehört zur Gruppe der NAD(P)-abhängigen kurzkettigen Dehydrogenasen. Die R-ADH-Lb bildet ein Homotetramer (4 x 26.6 kDa) mit je 251 Aminosäuren pro Untereinheit, zeigt eine  $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit und akzeptiert NADP(H) als Cosubstrat (Riebel, 1996). Die R-ADH-Lb ist mit einem Aktivitätsmaximum von 50°C thermisch außerordentlich stabil, was sie neben einem weiten Substratspektrum für biotechnologische Anwendungen prädestiniert. In Zusammenarbeit mit unserem Kooperationspartner wurde die R-ADH-Lb kristallisiert (Niefind et al., 2000). In unserer Arbeitsgruppe wurden von der innenzentriert orthorhombischen Kristallform vollständige Röntgendatensätze bis 0.99 Å gemessen und die 3D-Struktur mittels molekularen Ersatzes mit der 3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase als Suchmodell gelöst (Müller, 2000).

Durch den Austausch der Aminosäure Glycin gegen Aspartat in der Position 37 (Riebel, unveröffentlicht) konnte die Cosubstratspezifität von einer NADP(H)-Abhängigkeit bei der R-ADH-Lb zu einer dualen Cosubstrat-Abhängigkeit bei der R-ADH-Lb-G37D geändert werden. Die R-ADH-Lb-G37D zeigt dabei aber eine deutlich höhere Affinität für NAD(H) als für NADP(H). Die Aminosäuresequenz der R-ADH-Lb-G37D ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

```
1      SNRLDGKVAI  ITGGTLGIGL  AIATKFVEEG  AKVMITDRHS  DVGEKAAKSV
51     GTPDQIQFFQ  HDSSDEDGWT  KLFDATEKAF  GPVSTLVNNA  GIAVNKSVEE
101    TTTAEWRKLL  AVNLDGVFFG  TRLGIQRMKN  KGLGASIIINM  SSIEGFVGDV
151    SLGAYNASKG  AVRIMSKSAA  LDCALKDYDV  RVNTVHPGYI  KTPLVDDLPG
201    AEEAMSQRTK  TPMGHIGEPN  DIAYICVYLA  SNESKFATGS  EFVVDGGYTA
251    Q
```

**Abbildung 1.1:** Aminosäuresequenz der R-ADH-Lb-G37D. Die Sequenz des Wildtyps wurde durch Edmann-Abbau und Gensequenzierung bestimmt (Riebel, 1996).

### 1.3 Die Bedeutung und Struktur von Lipasen

Lipide machen einen großen Teil der Biomasse der Erde aus. In den Zellen nehmen sie Aufgaben von der Bildung von Membranen über Energiespeicherfunktionen bis hin zu hormonellen Aufgaben und der Lieferung von Reduktionsäquivalenten für die Biosynthese wahr. Die Einbindung dieser energiereichen Moleküle in den Stoffwechsel der Organismen erfolgt durch lipolytische Enzyme. Dazu gehören Lipasen, Phospholipasen und Esterasen. Lipasen sind Triacylglyceridesterhydrolasen und stellen eine den Carboxylesterhydrolasen eng verwandte Gruppe von Enzymen dar, die durch ihre große Verbreitung in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen gut zugänglich sind. Im Unterschied zu den Carboxylesterhydrolasen bevorzugen sie jedoch statt wasserlöslicher Ester wasserunlösliche Triacylglyceride, die zu Diacylglyceriden, Monoacylglyceriden, Fettsäuren und Glycerin gespalten werden. Diese Bestandteile können nach der durch die Lipasen erfolgten Initiierung des Fettkatabolismus leicht in die Zelle transportiert werden. Die Mobilisierung von Ölen während der Keimung in Pflanzensamen, die der Pflanze als Speicherstoffe dienen (z.B. Sonnenblumenkerne), werden durch Lipasen eingeleitet. Die Umesterungen von mit der Nahrung aufgenommenen Lipiden, z.B. zu Membranbestandteilen, sind ebenfalls Aufgaben, die den Lipasen obliegen.

Lipasen können sowohl die Hydrolyse als auch (vor allem im wasserfreien Medium) die Synthese von Triacylglyceriden katalysieren. Zusammen mit ihrem breiten Substratspektrum, der bereits zum Teil untersuchten Substratspezifität sowie ihrer Regio- und Stereoselektivität eröffnen sich dadurch enorme Möglichkeiten in der chemischen und industriellen Synthese sowie bei biotechnologischen Anwendungen. Hierbei werden Lipasen für die Trennung von Racematen, der Synthese von Estern, bei Umesterungen und als Additiv-Zusatz in Waschmitteln verwendet (Jaeger et Reetz, 1998; Jaeger et al., 1999).

Auch in der Medizin rücken Lipasen immer stärker ins Blickfeld. Durch ihre zentrale Rolle beim Fettstoffwechsel ist ihre Wirkung und Regulation bei Erkrankungen dieses Systems gut untersucht. Die pathogene Wirkung einiger bakterieller Lipasen ist inzwischen bekannt. Zum Beispiel sind Lipasen aus *Pseudomonas aeruginosa* insbesondere an der Zerstörung von

Lungenalveolen bei einer persistierenden Infektion mit diesem Bakterium beteiligt.

Bakterielle Lipasen werden in acht Familien unterteilt (Arpigny et Jaeger, 1999), von denen die größte Familie I die "echten" Lipasen umfaßt und in sechs Unterfamilien unterteilt wird. Lipasen aus *Bacillus* werden dabei den Unterfamilien vier und fünf zugeteilt. Die Unterfamilie vier besitzt bisher nur drei Mitglieder: die Lipasen LipA und LipB aus *B. subtilis* und eine Lipase aus *B. pumilis*. Bei beiden Unterfamilien wird das für Lipasen typische, um das katalytische Serin angeordnete konservierte Pentapeptid-Motif Gly-X-Ser-X-Gly leicht abgewandelt, indem das erste Glycin durch ein Alanin ersetzt wird.

Bisher konnten 13 verschiedene Lipase-Strukturen gelöst werden, die im folgenden aufgeführt sind:

- ! Lipase aus *Bacillus subtilis*  
(van Pouderoyen, 2001)
- ! Lipase aus *Rhizomucor miehei*  
(Brady et al., 1990)
- ! Lipase aus *Geotrichum candidum*  
(Schrag et al., 1991)
- ! Lipase aus *Candida rugosa*  
(Grochulski et al., 1994a)
- ! Lipase aus *Candida antartica B*  
(Uppenberg et al., 1994)
- ! Lipase aus *Pseudomonas cepacia*  
(Schrag et al., 1997; Kim et al, 1997)
- ! Lipase aus *Pseudomonas glumae*  
(Noble et al., 1993)
- ! Lipase aus *Chromobacterium viscosum*  
(Lang et al., 1996)
- ! Lipasen aus *Thermomyces lanuginosa*  
(Lawson et al., 1994; Brzozowski et al., 2000)
- ! Lipase aus menschlichem Pankreas  
(Winkler et al., 1990)
- ! Lipase aus Pferdepankreas  
(Bourne et al., 1994)

Weiterhin sind bisher mehrere Strukturen bekannt, bei denen ein Lipase-Inhibitor-Komplex kristallisiert wurde, bei dem der Inhibitor kovalent an die Lipase gebunden ist. Zu diesen Komplexen gehören die Lipase aus *Rhizomucor miehei* (Derewenda et al., 1992; Brzozowski et al., 1991) und aus *Candida antarctica B* (Uppenber et al., 1995), die mit einem C6-Alkylphosphonat kristallisiert wurden, die Lipase aus *Candida rugosa* (Grochulski et al., 1994b), die mit einem langkettigen Alkylsulfonat kristallisiert wurde und der Lipase-Colipase-Komplex aus menschlichem Pankreas (van Tilbeurgh et al., 1993; Egloff et al., 1995), der mit einem C11-Alkylphosphonat kristallisiert wurde. Bei diesen binären Komplexen wurden Inhibitoren verwendet, die sich in ihrer Struktur stark von den natürlichen Triacylglyceridester-Substraten der Lipasen unterscheiden und daher nur schwer einen Rückschluß auf die Anordnung des Substrats in der Substratbindungsstelle und/oder im aktiven Zentrum zulassen. Strukturen von binären Lipase-Substratanalogen-Komplexen konnten hingegen für Cutinase aus *Fusarium solani* (Longhi et al., 1997) und der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (Lang et al., 1998; Lang et al., unveröffentlicht; Luic et al., 2001), die jeweils mit Dialkylcarbamoylglycerophosphonaten kristallisiert wurden und für die Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa*, die mit  $R_C$ -( $R_P$ ,  $S_P$ )-1,2-dioctylcarbamoyl-glycero-3-O-p-nitrophenyloctylphosphonat ( $R_C$ -trioctyl) kristallisiert wurde (Nardini et al., 2000), bestimmt werden.

Trotz starker Unterschiede bezüglich ihrer Größe und ihrer Aminosäuresequenz weisen alle untersuchten Lipasen ein gemeinsames Strukturmotiv auf, nämlich eine Ein-Domänen-Struktur, die eine  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung besitzt (Ollis et al., 1992; Schrag et Cygler, 1997; Nardini et Dijkstra, 1999). Die  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung besteht aus einem mindestens fünfsträngigen parallelen  $\beta$ -Faltblatt, das auf beiden Seiten von mehreren  $\alpha$ -Helices umgeben wird (Ollis et al., 1992). Die katalytische Triade im aktiven Zentrum besteht aus den drei konservierten Aminosäuren Ser, Asp/Glu und His (Ollis et al., 1992), die in einem *Turn* (nukleophiler Ellbogen; *nucleophilic elbow*) angeordnet sind. In der Aminosäuresequenz tauchen die genannten Reste immer in dieser Reihenfolge auf. Bei der enzymatischen Reaktion polarisiert das Asp/Glu den Imidazolring des His, welches so ein Proton von der Hydroxylgruppe des Serin abstrahieren kann. Das so aktivierte Serinat-Anion greift nucleophil am Carbonyl-Kohlenstoff der Esterbindung an, bildet einen tetraedischen Übergangszustand, der durch den nucleophilen Angriff eines Wassermoleküls aufgelöst wird und so zur Spaltung des Esters führt. Die Bedeutung der genannten Reste für die katalytische Aktivität wurde für verschiedene Lipasen durch Mutagenesestudien bestätigt (Jaeger et al., 1993; Missel et al., 1994; Lohse et al., 1997).

Ein weiteres bei allen Lipasen vorkommendes Strukturmerkmal ist die Oxyaniontasche (*oxyanion hole*), welche aus zwei Amidgruppen der Peptidkette gebildet wird, und während der Reaktion den negativ geladenen tetraedischen Übergangszustand stabilisiert. Die genannte katalytische Triade und die Bildung der Oxyaniontasche findet man auch bei der Gruppe der Serinproteasen (Kraut, 1977; Brady et al., 1990).

Der eigentliche Reaktionsmechanismus der Hydrolyse bei Lipasen kann mit drei Teilschritten beschrieben werden:

1. Das Enzym adsorbiert an die Interphase und dringt, eventuell mittels einer oder mehrerer spezifischer Domänen, in diese ein.
2. Das Substrat wird in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt aufgenommen und ein Enzym-Substrat-Komplex am aktiven Zentrum des Enzyms gebildet.
3. Nach erfolgter Umsetzung werden die Produkte abgespalten, die je nach Löslichkeit in die wäßrige oder hydrophobe Phase wandern. Sie können in Einzelfällen jedoch auch in der Interphase verbleiben (Kang et al., 1989; Havsteen et al., 1992).

Die meisten Lipasen besitzen im Gegensatz zu fast allen anderen Enzymen ein unter Normalbedingungen völlig unzugängliches aktives Zentrum, welches von einer Lid-artigen Struktur bedeckt ist. Dieses Lid (*lid*, *loop*, *flap*) besteht aus einem amphipathischen Oberflächenloop, der das aktive Zentrum der Lipase überdeckt und so das Enzym inaktiviert (geschlossene Konformation). In der Gegenwart von Lipid-Aggregaten lagert sich das Enzym an die Grenzschicht zwischen wäßriger und hydrophober Phase (Öl-Wasser-Phasengrenzfläche) an, in welcher sich die Substrate befinden. Das Lid öffnet sich und das Enzym lagert sich in die offene Konformation um, indem die hydrophobe Innenseite exponiert wird, welche die Bindung des Substrats (oder von Inhibitoren) ermöglicht. Hierdurch wird das Enzym aktiviert (Interphasenaktivierung, *interfacial activation*; Derewenda, 1994; Nardini et Dijkstra, 1999). Es wird angenommen, daß dieser Öffnungsmechanismus durch Kontakt mit der Interphase an der Phasengrenzfläche aktiviert wird. Bei der Umlagerung von der geschlossenen in die offene Konformation bildet sich die schon beschriebene Oxyaniontasche.

Es sind drei Strukturen von kleineren Enzymen bekannt, die eine  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung besitzen, aber kein Lid aufweisen. Dazu gehören die Lipase LipA aus *Bacillus subtilis* (van Pouderooyen, 2001), die Cutinase aus *Fusarium solani* (Martinez et al., 1992; Longhi et al., 1997) und die Acetylxylosterase aus *Penicillium purpurogenum* (Ghosh et al., 1999). Diese drei Enzyme besitzen ein Lösungsmittel-zugängliches aktives Zentrum mit einer vorgeformten Oxyaniontasche und zeigen das Phänomen der Interphasenaktivierung nicht. Es scheint demnach ein direkter Zusammenhang zwischen Lid-Struktur und der Aktivierung durch eine hydrophile/hydrophobe Grenzfläche zu bestehen (Brzozowski et al., 1991; van Tilbeurgh et al., 1993).

### 1.3.1 Die thermoalkalophile Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus*

Die rekombinante Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus* wurde vom Kooperationspartner am Institut für technische Biochemie an der Universität Stuttgart produziert und charakterisiert (Schmidt-Dannert, 1994). Zur Vereinfachung der Aufreinigung und zur Gewinnung größerer Mengen dieser Lipase wurde das entsprechende Gen pLIP aus *B. thermocatenulatus* isoliert und in einen Expressionsvektor subkloniert. Dabei wurde das Gen pLIP mit einer sechsfachen Histidin-tag codierenden Nukleotidsequenz fusioniert und unter die Kontrolle des Hitze-induzierbaren  $\lambda$ -Promotors  $P_T$  gestellt. Dieser Expressionsvektor pT<sub>1</sub> (pCYTEXP1) wurde in den *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  transformiert und die His-getaggte H<sub>6</sub>-BTL-2 exprimiert. Der Expressionsvektor pT<sub>1</sub> ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

Die H<sub>6</sub>-BTL-2 besteht aus 388 Aminosäuren und besitzt im Vergleich zu anderen bekannten bakteriellen Lipasen ein hohes Molekulargewicht, welches für die H<sub>6</sub>-BTL-2 mit 44.020 Da berechnet wurde. Die meisten bakteriellen Lipasen haben Molekulargewichte unter 30 kDa. Die untersuchte Lipase ist von besonderem biotechnologischem Interesse (z.B. als Waschmittelzusatz), da ihr Temperaturoptimum bei Temperaturen von 60-75°C und ihr pH-Optimum in einem pH-Bereich von 7.5-9.5 liegt. Die Aminosäuresequenz der H<sub>6</sub>-BTL-2 ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Der Anteil an hydrophoben Aminosäuren (Ile, Val, Leu, Phe, Met, Ala) beträgt 33.2 %.

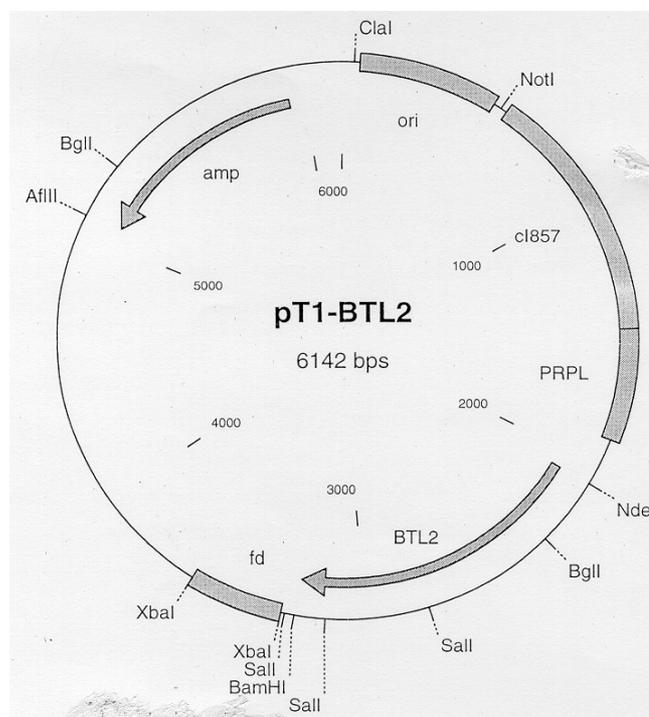


Abbildung 1.2: Karte des Expressionsvektors pT<sub>1</sub>.

HHHHHH

```
1    VSPRANDAPI VLLHGFTGWG REEMLGFKYW GGVRGDIEQW LNDNGYRTYT
51   LAVGPLSSNW DRACEAYAQL VGGTVDYGAA HAAKHGHARF GRTYPGLLPE
101  LKRGGRVHII AHSQGGQTAR MLVSLLENGS QEEREYAKAH NVSLSPLFEG
151  GHFVLSVTT  IATPHDGTTL VNMVDFTRF  FDLQKAVLKA AAVASNPYPT
201  SQVYDFKLDQ WGLRRQPGES FDHYFERLKR SPVWTSTDTA RYDLSIPGAE
251  KLNQWVQASP NTTYLSFSTE RTHRGALTGN YYPELGMNAF SAVVCAPFLG
301  SYRNEALGID DRWLENDGIV NTVSMNGPKR GSSDRIVPYD GTLKKGVWND
351  MGTCNVDHLE VIGVDPNPSF DIRAFYLRLA EQLASLRP
```

**Abbildung 1.3:** Aminosäuresequenz der H<sub>6</sub>-BTL-2. Die Sequenz wurde durch Gensequenzierung bestimmt (Schmidt-Dannert, 1994).

## 1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit

In dieser Promotion sollten die biotechnologisch interessante Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* und die Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus* bis zur Homogenität gereinigt, kristallisiert und die Raumstruktur der Enzyme durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden. Die Kristallisation der Proteine stellt hierbei das Nadelöhr der gesamten Strukturbestimmung dar. Da sowohl das Kristallisationsverhalten, als auch der Erfolg einer Kristallisation eines bestimmten Proteins nicht vorhersehbar sind, konnte zu Beginn der Arbeit nicht abgeschätzt werden, ob noch weitere zusätzliche Fragestellungen bearbeitet werden konnten.

Von der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* waren für den NADP(H)-abhängigen Wildtyp (R-ADH-Lb) die Kristallisationsbedingungen bekannt und die Struktur des Apoenzyms wurde innerhalb unserer Arbeitsgruppe gelöst. Für die Mutante R-ADH-Lb-G37D, die eine duale Cofaktorspezifität besitzt, sollte zu Beginn der Untersuchungen ein neues Reinigungsprotokoll entwickelt werden und auf Grundlage der für den Wildtyp bekannten Kristallisationsbedingungen ein ternärer Komplex aus Enzym, Substrat und Cofaktor kristallisiert und die Raumstruktur dieses Komplexes mittels molekularen Ersatzes gelöst, verfeinert und interpretiert werden. Hierbei war die Anordnung des Substrats und Cofaktors von besonderem Interesse, da die veränderte Cofaktorspezifität der R-ADH-Lb-G37D erklärt werden sollte.

Von der neuartigen His-getaggten Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus* (H<sub>6</sub>-BTL-2) existierte zu Beginn der Arbeit kein geeignetes Reinigungsprotokoll und es waren keinerlei Kenntnisse über das Kristallisationsverhalten und die dreidimensionale Struktur vorhanden. Da zu Beginn der Arbeit kein hinreichend homologes Modell vorhanden war, sollte die Struktur *de novo* gelöst werden.



# 2 Theoretische Grundlagen ausgewählter Methoden

## 2.1 Dynamische Lichtstreuung

Werden Teilchen mit polarisiertem Licht bestrahlt, wird das Licht an ihnen gestreut. Kleine Moleküle streuen dabei in alle Raumrichtungen gleichmäßig, während Teilchen, die so groß wie die Wellenlänge des einfallenden Lichtes sind, bevorzugt in bestimmte Richtungen streuen. In Abhängigkeit der verwendeten Wellenlänge des Lasers und der Größe der Teilchen zeigt das gestreute Licht dabei ein charakteristisches Intensitätsmuster. Dieses Muster resultiert aus Interferenzen zwischen dem gestreuten Licht der Teilchen und führt zu einer Sammlung von hellen (konstruktive Interferenz) und dunklen (destruktive Interferenz) Bereichen im Streumuster. Bei Lichtstremessungen wird nun unterschieden zwischen der statischen (SLS) und der dynamischen Lichtstreuung (DLS).

Bei der statischen Lichtstreuung ergibt sich für ein kleines, gelöstes Molekül mit geringer Konzentration die Intensität des gestreuten Lichtes, das senkrecht zu der Ebene der auftretenden Polarisation liegt, bei einem gegebenen Winkel  $\theta$  zu:

$$R(\theta) = M_w \cdot P(\theta) \cdot K^* \cdot c \quad (2.1)$$

mit

$$K^* = 4 \cdot \pi^2 \cdot n_s^2 \cdot (dn/dc)^2 / (\lambda^4 \cdot N_A) \quad (2.2)$$

$R(\theta)$  stellt das Rayleigh-Verhältnis dar und beschreibt die Intensität des gestreuten Lichtes bei einem gegebenen Streuwinkel  $\theta$  abzüglich des durch das reine Lösungsmittel allein gestreute Licht.  $M_w$  ist das Molekulargewicht des streuenden Moleküls,  $c$  die Konzentration der Lösung und  $P(\theta)$  der Formfaktor, der das Verhältnis der Intensitäten des gestreuten Lichtes bei dem gegebenen Winkel  $\theta$  zu der bei  $\theta = 0^\circ$  angibt. Die optische Konstante  $K^*$  enthält den Brechungsindex  $n_s$  des Lösungsmittels, die Avogadro-Zahl  $N_A$ , die Wellenlänge  $\lambda$  des einfallenden Lichtes und das Differential  $dn/dc$  des spezifischen Brechungsindex des Probemoleküls. Mit der Kenntnis der Konzentration  $c$  und des Differentials  $dn/dc$  des spezifischen Brechungsindex kann mit dem zu einem Zeitpunkt gemessenen Wert von  $R(\theta)$  das durchschnittliche Molekulargewicht berechnet werden.

Hierzu muß die Konzentration  $c$  und das Differential  $dn/dc$  des spezifischen Brechungsindex aber sehr genau bekannt sein, um ein genaues Molekulargewicht zu bestimmen. Durch SLS-Messungen können keine Information über die Form des untersuchten Teilchens und die eventuelle Größenverteilung innerhalb der Probe gewonnen werden.

Bei der dynamischen Lichtstreuung wird anstatt eines gemittelten Wertes für die gestreute Intensität zu einem einzigen Zeitpunkt, die Fluktuation der Intensität des gestreuten Lichtes in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Aus dieser zeitlichen Veränderung der Intensitätsfluktuationen kann für einzelne Teilchen wie z.B. Proteine, DNA, Polysaccharide oder Micellen ein translationaler Diffusionskoeffizient berechnet werden, aus dem sich der hydrodynamische Radius, das Molekulargewicht sowie Informationen über die Konformation, Interaktion oder das Aggregationsverhalten ableiten lassen. Das beobachtete Streumuster verändert sich nämlich mit der Zeit, da sich die Positionen der einzelnen Teilchen gemäß ihrer Brown'schen Molekularbewegung verändern. Diese Fluktuationen sind sehr groß bei kleinen Molekülen und weniger stark bei größeren Teilchen. Die zeitabhängige Intensität  $I(t)$  des gestreuten Lichtes wird nun für die Berechnung der zeitabhängigen Intensitäts-Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  verwendet, die ein Integral darstellt. Es gilt:

$$G(\tau) = \int I(t)I(t + \tau)dt / N \quad (2.3)$$

Die Funktion  $G(\tau)$  wird durch die Konstante  $N$  normalisiert, welche sich aus der erwarteten Photonen-Hintergrundsrate ergibt. Das Integral wird nun durch die Summe über die Meßdauer angenähert. Die erhaltene Korrelation kann dabei nur zu diskreten Zeitpunkten  $\tau$  erhalten werden, die im exponentiellen Zusammenhang mit der im Signal erhaltenen Information steht:

$$G(\tau) = b + \sum c_j \cdot \exp(-\tau / \tau_j) \quad (2.4)$$

Dabei treten drei *fitting*-Parameter auf: Die *baseline*  $b$ , die Amplitude  $c_j$  und die verstrichene Zeit  $\tau_j$ .

$b$  stellt den *baseline*-Parameter dar, der sich von der Vollständigkeit der Autokorrelationsfunktion ableitet und idealerweise den Wert 1 betragen soll.  $c_j$  ist die Amplitude, welche die Intensität des gestreuten Lichtes mit der Intensität des Hintergrund vergleicht und  $\tau_j$  die verstrichene Zeit, die ein Teilchen benötigt, um die Entfernung  $1/q$  zurückzulegen. Die Summe erstreckt sich von  $j = 1$  bis  $k$ , wobei  $k = 1$  ist für eine monomodale Regression (nur eine Teilchengröße) und  $k = 2$  ist für eine bimodale Regression (zwei Teilchengrößen).

Die verstrichene Zeit  $\tau_j$  hängt nun von dem Quadrat des Wellenvektors  $q$  und dem translationalen Diffusionskoeffizienten  $D_T$  ab.

Es gilt:

$$\tau_1 = 1 / (D_T \cdot q^2) \quad (2.5)$$

Durch Einsetzen von (2.5) in (2.4) und Umformen ergibt sich schließlich:

$$G(\tau) = 1 + \exp(-2 \cdot D_T \cdot q^2 \cdot \tau) \quad (2.6)$$

mit

$$q = [4 \cdot \pi \cdot n_s \cdot \sin(\theta / 2)] / \lambda \quad (2.7)$$

Der Wellenvektor  $q$  hängt dabei vom Streuwinkel  $\theta$ , dem Brechungsindex  $n_s$  des Lösungsmittels und der Wellenlänge  $\lambda$  des einfallenden Lichtes ab. Aus der Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  kann nun der Diffusionskoeffizient  $D_T$  errechnet werden, der seinerseits über die Stokes-Einstein-Beziehung mit dem hydrodynamischen Radius  $R_H$  in Beziehung steht. Es gilt:

$$D_T = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_H} \quad (2.8)$$

Hierbei ist  $k_B$  die Boltzmann-Konstante,  $T$  die absolute Temperatur in Kelvin und  $\eta$  die Viskosität des Lösungsmittels.

Aus dem Diffusionskoeffizienten  $D_T$  kann nun der hydrodynamische Radius  $R_H$  und die Größenverteilung verschiedener Teilchen innerhalb der Probe der Moleküle berechnet werden. Dabei werden Teilchen, die sich in weniger als zwei hydrodynamischen Radien unterscheiden, nicht mehr aufgetrennt und erscheinen als ein einziger Peak, der zwischen den beiden theoretischen liegt.

Bei der DLS ist im Gegensatz zur SLS keine zusätzliche Kenntnis des Differential  $dn/dc$  des spezifischen Brechungsindex und der Teilchenkonzentration notwendig, um den hydrodynamischen Radius des Moleküls zu bestimmen.

Ausgehend vom berechneten hydrodynamischen Radius  $R_H$  kann nun das Molekulargewicht  $M_w$  auf zwei Wegen berechnet werden:

#### 1. Globulärer Standard-Auswertungsmodus

Aus einer Vielzahl gut charakterisierter globulärer Proteine wurde ein empirischer Zusammenhang zwischen dem hydrodynamischen Radius und dem Molekulargewicht abgeleitet.

Es gilt:

$$M_w = (1.549 \cdot R_H)^{2.426} \quad (2.9)$$

## 2. Volume-Shape-Hydration-Auswertungsmodus

Bei der Berechnung des Molekulargewichtes wird davon ausgegangen, daß das Protein nicht kugelförmig ist. Es werden dabei neben dem hydrodynamischen Radius  $R_H$  das partielle, spezifische Volumen  $V_S$  und das Reibungsverhältnis  $f$  (*shape-hydration-factor*), das eine Information über die Molekülform enthält, einbezogen. Dabei können unterschiedliche Auswertungsmodelle benutzt werden (z.B. Durchschnittsproteine von 6-24 kDa, 24-110 kDa und 149-370 kDa oder Lysozym, Urease, Lipasen etc). Die jeweiligen Werte für  $R_H$  und  $V_S$  wurden experimentell bestimmt. Für die Berechnung des  $M_w$  gilt:

$$M_w = \frac{4/3 \cdot \pi \cdot N_a \cdot (R_H / f)^3}{V_S} \quad (2.10)$$

## 2.2 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

Die theoretischen und methodischen Grundlagen der Protein- und Röntgenkristallographie können in einer Vielzahl von Standardwerken nachgelesen werden (z. B. Blundell et Johnson, 1976; Ducruix et Giege, 1999; Bergfors, 1998; Übersichtsartikel: McPherson, 1990). An dieser Stelle soll daher nur eine Übersicht über die für diese Arbeit wichtigsten Punkte gegeben werden.

### 2.2.1 Kristallisation von Proteinen

Als Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Strukturaufklärung mittels Röntgenbeugung wird ein geeigneter Einkristall benötigt, der Reinheit, Stabilität und gutes Streuvermögen besitzen sollte. Kristalle sind idealerweise durch Translation von eindeutig definierten Einheiten entstandene, in alle drei Raumrichtungen ausgedehnte Anordnungen von Molekülen oder Atomen.

Die genauen Bedingungen, die für die Kristallisation eines bestimmten Proteins nötig sind, lassen sich nicht vorhersagen und müssen auch heute noch empirisch ermittelt werden. Hierbei sind Erfahrung und Wissen um die chemischen Zusammenhänge unersetzlich. Eine gute Abschätzung der wahrscheinlichsten Faktoren und eine Untersuchung der Kristallisationsbedingungen, die bei ähnlichen Proteinen gefunden wurden (Datenbankrecherche), können

hierbei wertvolle Anregungen geben. Als Startpunkt der Kristallisation bieten sich faktorielle *Screening*verfahren an (Jancarik et Kim, 1991; Cudney et al., 1994), bei denen die bisher bei Proteinen erfolgreichsten Kristallisationsbedingungen zusammengetragen wurden und die entsprechenden Lösungen in kommerzieller Form erworben werden können (z.B. Hampton Research). Ausgehend von den Ergebnissen dieser ersten breitgefächerten Kristallisationsansätze können vielversprechende Kristallisationsbedingungen systematisch variiert und optimiert werden.

Ein Kristallisationsansatz setzt sich prinzipiell aus drei Komponenten zusammen: einem (Haupt-) Fällungsmittel, einem Puffer und einem Salzzusatz; gegebenenfalls muß der Ansatz aber noch um weitere Additiv- und/oder Detergenzzusätze erweitert werden.

Bei der Kristallisation beeinflussen eine Vielzahl von Faktoren das Kristallisationsverhalten eines Proteins. Dazu zählen die Homogenität und Konzentration der Proteinprobe, der Oligomerisierungsgrad des Proteins, der pH-Wert und der verwendete Puffer der Proteinprobe und des Kristallisationsansatzes, die Konzentration, Art und Polarität des Fällungsmittels, die Ionenstärke und die Art eines Salzzusatzes, Additive wie z.B. Salze, organische Lösungsmittel, Chaotrope, Amphiphile, Linker, Polymere, Detergenzien, Substrate, Cofaktoren oder Inhibitoren, die Temperatur und die verwendete Kristallisationstechnik.

Die verschiedenen Kristallisationstechniken beruhen alle auf demselben Prinzip: Ziel ist es, einen übersättigten Zustand des Proteins zu erreichen, in dem es spontan zur Bildung von Kristallkeimen kommen kann. Der Zustand der Übersättigung der Proteinlösung soll möglichst langsam erreicht werden und das Ausmaß an Übersättigung nur so groß sein, daß sich nicht zu viele Kristallisationskeime gleichzeitig bilden und die entstehenden Kristalle langsam und daher mit wenig Fehlern wachsen. Wege, um Übersättigungen zu erreichen, sind die Zugabe von hohen Salzkonzentrationen zum Entzug von Lösungsmittelhüllen (Aussalzen), die Verringerung der Ionenstärke (Einsalzeffekt) oder die Zugabe eines Fällungsmittels oder anderer Lösungsmittel. Bei der häufig verwendeten Dampfdiffusionsmethode steht die sich in einem Tropfen befindende Proteinlösung mit einer Reservoirlösung, in der sich das Fällungsmittel befindet, über den Dampfraum in Kontakt. Zwischen dem Tropfen, der sich aus der Proteinlösung, dem Fällungsmittel und eventuell weiterer Additive zusammensetzt, und dem Reservoir kommt es durch eine kontinuierliche Verdampfung von flüchtigen Bestandteilen aus dem Tropfen zu einer Erhöhung der Protein- und Fällungsmittelkonzentration im Tropfen, wodurch die relative Übersättigung der Proteinprobe steigt. Dies geschieht solange, bis sich ein Konzentrationsgleichgewicht (genauer: ein Gleichgewicht der chemischen Potentiale) zwischen Tropfen und Reservoir eingestellt hat.

Bei der Dampfdiffusionsmethode kann entweder die Variante des sitzenden oder hängenden Tropfens angewendet werden. Diese Varianten unterscheiden sich in ihren Dampfdiffusionsgeschwindigkeiten, die sich aus den unterschiedlichen Oberflächen der Tropfen und der damit zusammenhängenden Kinetiken der Gleichgewichtseinstellung ergeben.

Eine weitere bisher eher selten angewandte Methode ist die umgekehrte Dampfdiffusion. Dabei ist eine bestimmte Salzkonzentration im Tropfen notwendig, um das Protein in Lösung zu halten und um eine Aggregation zu verhindern. Im Reservoir befindet sich eine Lösung, die eine geringere Salzkonzentration aufweist als der Tropfen. Während der Äquilibration diffundiert nun Wasser vom Reservoir in den Tropfen und sorgt dafür, daß sich die Salzkonzentration im Tropfen und die Löslichkeit des Proteins verringert. Dies führt dann wiederum zur Übersättigung der Proteinlösung und im Idealfall zur Kristallisation

Proteine verfügen über mehr oder weniger feste und diffuse Lösungsmittelwolken, die sich auch in ihren Kristallen wiederfinden. Der Lösungsmittelanteil innerhalb eines Kristalls kann zwischen 20 und 80 % variieren (Andersson et Hovmüller, 2000). Der hohe Lösungsmittelanteil ermöglicht in gewissen Grenzen die Diffusion von kleineren Molekülen innerhalb des Kristalls. Dadurch können z.B. Substrate, Inhibitoren, Cofaktoren oder Schwermetallionen nachträglich in den Kristallverband eingebaut werden.

### 2.2.2 Strukturlösung durch molekularen Ersatz

Aus den bei der Diffraktionsmessung gemessenen Reflexen soll die Elektronendichte abgeleitet werden, die für die Modellierung der Proteinstruktur notwendig ist. Das Diffraktionsmuster und die Elektronendichte stehen dabei durch die Fouriertransformation im folgenden Zusammenhang:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l=-\infty}^{+\infty} |F_{hkl}| \cdot e^{i\alpha_{hkl}} \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (2.11)$$

Dabei stellt  $\rho(xyz)$  die Elektronendichte,  $|F_{hkl}|$  den Betrag der Strukturfaktoramplituden,  $\alpha_{hkl}$  die Phaseninformation und  $e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$  die Basisfunktion dar.

Der Betrag der Strukturfaktoramplituden  $|F_{hkl}|$  läßt sich direkt aus den Diffraktionsmessungen bestimmen und den Gitterpunkten  $hkl$  zuordnen, während sich die Phaseninformation  $\alpha_{hkl}$  nicht messen läßt.

Zur Lösung des kristallographischen Phasenproblems bieten sich folgende Möglichkeiten an: Mit Hilfe anomaler Streuer kann über den multiplen isomorphen Ersatz (MIR) oder der multiplen anomalen Dispersion (MAD) die Phaseninformation bestimmt werden. Beim multiplen isomorphen Ersatz werden neben nativen Kristallen isomorphe Kristalle gemessen, die mit schweren Atomen (Schwermetalle, Halogenide, Edelgase) derivatisiert worden sind. Aus den isomorphen Differenzen zwischen den Strukturfaktoramplituden des nativen und eines Derivatdatensatzes lassen sich über Pattersonfunktionen die Lagen der Schweratome bestimmen. Mit Hilfe dieser Positionen können dann die ersten Phasen berechnet werden.

Bei den in der Kleinmolekülkristallographie üblichen direkten Methoden werden strukturinvariante Phasenbeziehungen verwendet, um aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden die Phasen direkt berechnen zu können. Dafür ist eine hohe Übereinstimmung der gemessenen Daten im Vergleich zu den zu bestimmenden Parametern notwendig, die erst bei atomaren Auflösungen erreicht wird. Auf Grund der begrenzten Streufähigkeit von Proteinkristallen ist dies in den meisten Fällen nicht gegeben.

Beim Verfahren des molekularen Ersatzes wird eine bekannte Proteinstruktur genutzt, um eine noch unbekannte Struktur aufzuklären, indem die ersten Phaseninformationen aus dem bekannten Protein gewonnen werden. Voraussetzung dafür ist, daß die Faltung der beiden Proteine und somit auch die Fouriertransformierte der Dichtefunktion ähnlich sind. Dies ist normalerweise dann gegeben, wenn die Sequenzidentität der beiden verschiedenen Proteine ungefähr 30 % beträgt. Bei den Rechnungen zum molekularen Ersatz wird die bekannte Struktur als Suchmodell verwendet und in der berechneten Elementarzelle der unbekannt Struktur positioniert, als Gesamtheit systematisch in seiner Orientierung und Position durch Rotationen und Translationen variiert und durch die entsprechenden Pattersonfunktionen korreliert. Rotations- und Translationssuchen lassen sich hierbei entkoppeln, so daß aus einer sechsdimensionalen Suche zwei dreidimensionale Suchen werden.

Bei der Rotationssuche wird zunächst die Orientierung des Suchmodells in der asymmetrischen Einheit der Einheitszelle der unbekannt Struktur bestimmt. Dabei wird die Pattersonfunktion des Suchmodells gegen die Pattersonfunktion der noch unbekannt Struktur gedreht, wobei nur die intramolekularen Vektoren (Selbstvektoren) berücksichtigt werden. Die Maxima der entsprechenden Rotationsfunktion sind die besten Orientierungen der beiden Vektorsätze zueinander und werden als Euler- oder Polarwinkel für die Translationssuche verwendet.

Die Pattersonfunktion ergibt sich als Fouriertransformierte der Intensitätsfunktion. Es gilt:

$$P(\vec{u}) = \frac{1}{V^2} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} |F(h, k, l)|^2 \cdot e^{2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (2.12)$$

Dabei ist V das Volumen der Einheitszelle und  $|F|^2$  das Quadrat der Strukturfaktoramplitude mit dem Index hkl.

Für die Rotationsfunktion gilt:

$$R(C) = \int_V P_1(\vec{u}) \cdot P_2(C, \vec{u}) du \quad (2.13)$$

Dabei ist  $P_1(u)$  die Pattersonfunktion des Kristalls der unbekannt Struktur und  $P(C, u)$  die mit der Rotationsmatrix C gedrehte Pattersonfunktion des Suchmodells. V ist das durch die Länge des Selbstvektors gegebene Volumen der Pattersonfunktion.

Bei der Translationsuche wird das richtig orientierte Suchmodell entlang kristallographischer Symmetrieachsen so bewegt, daß sich eine maximale Überlappung mit den gemessenen Diffraktionsdaten der unbekannt Struktur ergibt. Hierbei werden die Pattersonfunktionen der unbekannt Struktur und des Suchmodells an einer definierten Stelle in der Elementarzelle verglichen, wobei jeweils nur die intermolekularen Vektoren verwendet werden. Es gilt:

$$R(\tau) = \int_V P_1(\vec{u}) \cdot P_2(\tau, \vec{u}) du \quad (2.14)$$

Dabei ist  $P_1(u)$  die Pattersonfunktion des Kristalls der unbekannt Struktur und  $P(\tau, u)$  die mit der Translationsmatrix verschobene Pattersonfunktion des Suchmodells.  $V$  ist das durch die Länge des Translationsvektors gegebene Volumen der Pattersonfunktion.

### 2.2.3 Verfeinerung der Struktur

Nach der Lösung des Phasenproblems liegt ein erstes Startmodell der unbekannt Struktur vor, das kontinuierlich verbessert werden muß, indem eine Konvergenz der aus dem Suchmodell berechneten Strukturfaktoramplituden  $|F_{\text{calc}}|$  und der beim Diffraktionsexperiment gemessenen Strukturfaktoramplituden  $|F_{\text{obs}}|$  angestrebt wird. Der kristallographische R-Wert  $R_{\text{cryst}}$  dient bei der Verfeinerung als Maß für die Verbesserung der Qualität des bearbeiteten Strukturmodells und soll während der Verfeinerung einem Minimum zustreben. Es gilt:

$$R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - k \cdot |F_{\text{calc}}||}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|} \quad (2.15)$$

Dabei ist  $k$  ein Skalierungsfaktor zwischen den berechneten und gemessenen Daten.

Um eine Überverfeinerung des Modells aufgrund des  $R_{\text{cryst}}$  zu vermeiden, wird der Reflexdatensatz in einen Testdatensatz und einen Arbeitsdatensatz unterteilt, die getrennt verfeinert werden. Der Testdatensatz enthält dabei nur 5-10 % der Gesamtreflexanzahl. Für den Testdatensatz wird dabei ein freier R-Wert  $R_{\text{free}}$  und für den Arbeitsdatensatz ein R-Wert  $R_{\text{work}}$  berechnet, die sich wie der  $R_{\text{cryst}}$  zusammensetzen. Der Wert von  $R_{\text{free}}$  gilt hierbei als Maß für die Verbesserung der Qualität des bearbeiteten Strukturmodells.

Während der Verfeinerung soll die Gesamtenergie der Struktur einem globalen Minimum zustreben. Es kann aber passieren, daß die Struktur nur zu einem lokalen Energieminimum konvergiert. Durch die Verwendung einer Moleküldynamik (MD) kann dies verhindert werden. Dabei wird die Struktur auf eine Temperatur von mehreren Tausend Kelvin hochgeheizt und anschließend wieder langsam abgekühlt. Durch die resultierende thermische Bewegung der Atome können lokale Minima auf der Potentialhyperfläche verlassen werden.

Verfeinerungen mit Moleküldynamik wurden in der vorliegenden Arbeit mit dem Programmpaket CNS (Brünger et al., 1998) zu Beginn der Verfeinerung durchgeführt. Nach den ersten Verfeinerungsschritten wurden die Verfeinerungen ohne Moleküldynamik durchgeführt. Dabei wurde entweder CNS ohne Moleküldynamik oder das Programm REFMAC aus dem Programmpaket CCP4 (CCP4, 1994) verwendet.



# 3 Material und Methoden

## 3.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und EDV-Systeme

### 3.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten p.a.-Qualität und wurden von den Herstellern Biomol, Fluka, Merck und Sigma bezogen. Das Wasser wurde in einer Reinstwasseranlage aufbereitet und hatte eine Leitfähigkeit von  $\Omega^{-1} \# 50 \mu\text{m} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Sämtliche Lösungen wurden durch eine 0.2  $\mu\text{m}$ -Membran filtriert.

### 3.1.2 Proteine

Die beiden untersuchten Enzyme wurden in den Arbeitsgruppen der Kooperationspartner jeweils in rekombinanter Form hergestellt. Die R-ADH-Lb-G37D wurde in der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Hummel am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf am Forschungszentrum in Jülich in *E. coli*-Zellen exprimiert. Die Expression der H<sub>6</sub>-BTL-2 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Schmid am Institut für technische Biochemie an der Universität Stuttgart ebenfalls in *E. coli*-Zellen durchgeführt.

### 3.1.3 Materialien, Geräte und EDV-Systeme

Die wichtigsten Materialien, Geräte und Computerprogramme sind in den Tabellen 3.1, 3.2 und 3.3 zusammengefaßt.

Gerät	Hersteller
CCD-Detektor	
ADSC Quantum 210	ADSC, San Diego, California, USA
CD-Spektrometer	
CD-Spektropolarimeter J-715	Jasco
Chromatographiesysteme	
Äkta Explorer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
FPLC-System	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Cryostream Cooler	Oxford Cryosystems, Oxford, England

---

Disintegration	
Schwingkugelmühle	Retsch, Deutschland
Disintegrator S	IMA, Deutschland
Ultraschallgerät	Branson, USA
Drehanode (Cu) FR 591	Nonius, Delft, Niederlande
Dynamische Lichtstreuung	
DynaPro-801	Protein Solutions, Charlottesville, VA, USA
EDV-Systeme	
Indigo2 mit Irix 6.5	Silicon Graphics, München
Octane mit Irix 6.5	Silicon Graphics, München
O2 mit Irix 6.5	Silicon Graphics, München
PC mit Windows 98	SL Datentechnik, Köln
Flächenzähler	
DIP-2030H	MAC Science, Yokohama, Japan
French Press Aminco mit FA-030	SLM-Instruments, Rochester, USA
Massenspektrometrie	
ESI-MS LCQ (T)	Finnigan MAT, Bremen
MALDI-MS Biflex III (TOF)	Bruker, Bremen
Mikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Monochromatoren	
MAC-XOS Doppelspiegel	MAC Science, Yokohama, Japan
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Phast Elektrophoresesystem	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Reinstwasseranlage	Serlapur
Spektralphotometer Ultrospec 2000	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Spiegelreflexkamera EOS 500N	Canon, Tokyo, Japan
Waagen	
Analysenwaage FA-210-4	Faust, Köln
Laborwaage SBA 52	Scaltec, Heiligenstadt
Zentrifugen	
RC 3B Plus und RC 5B Plus	Sorvall, Newtown CT, USA
5417 C und 5810 R	Eppendorf, Hamburg

---

**Tabelle 3.1:** Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Bradford Proteinassay	BioRad, München
capillary wachs	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
Celluloseacetatfilter 0.2µm	Sartorius, Göttingen
Celluloseacetatfilter 0.02 µm	Whatman, Maidstone, England
Chromatographie-Säulen und -materialien	
HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (120 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
HiPrep 26/10 Desalting (15 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
HiPrep 16/10 Q FF (20 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
HiPrep 16/10 SP FF (20 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
MonoP HR 5/5 (1 ml) und 5/20 (4 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
MonoQ HR 5/5 (1 ml) und 10/10 (8 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
MonoS HR 5/5 (1 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
Ni-NTA Superflow (200 ml)	Qiagen, Hilden
Phenyl Sepharose CL-4B (20 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
Phenyl Superose HR 5/5 (1 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
Polybuffer	Amersham-Pharmacia, Schweden
Resource ETH (1 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
Resource ISO (1 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
Resource PHE (1 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
Resource Q (1 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
Resource S (1 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
Source 30Q (10 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
Source 30S (10 ml)	Amersham-Pharmacia, Schweden
Cryowerkzeuge	Hampton Research, Laguna Niguel, USA
Gelelektrophorese	
PhastGel Gradient 8-25 %	Pharmacia, Uppsala, Schweden
PhastGel IEF 3-9	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Goniometerköpfe	Stoe, Darmstadt
Linbro-Schalen	Hampton Research, Laguna Niguel, USA und ICN, Eschwege
Markröhrchen (0.1–1 mm ø)	Hilgenfeld, Malsfeld
Ultrafiltration	
Centricon-10 und -30	Millipore, Eschborn
Centriprep-10, -30 und -50	Millipore, Eschborn

Tabelle 3.2: Sonstige Materialien

Programm (-Paket)	Referenz
Kristallographie	
CCP4-suite	CCP4 (1994)
CNS-suite	Brünger et al. (1998)
HKL-suite	Otwinowski & Minor (1997)
Grapikprogramme	
O	Jones et al. (1991)
BRAGI	Schomburg & Reichelt (1988)
Auswertung von Röntgenstrukturen	
CCP4-suite	CCP4 (1994)
ProFit	McLachlan (1982)
TOPS	Westhead et al. (1999)
Darstellung von Proteinstrukturen und Elektronendichten	
BOBSCRIPT	Esnouf (1997)
MOLSCRIPT	Kraulis (1991)
RASTER3D	Merritt & Cacon (1997)
Validierung und Sekundärstrukturvorhersage	
PROCHECK	Laskowski et al. (1992)

**Tabelle 3.3:** Computerprogramme

## 3.2 Proteinreinigung

### 3.2.1 Zellaufschluß und Zentrifugation

Für den Zellaufschluß der *E. coli*-Zellen wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet.

#### **R-ADH-Lb-G37D**

Die Zellen wurden mit 1.5 ml Aufschlußpuffer pro Gramm Zellen aufgeschlämmt und mit der doppelten Menge an Glasperlen (0.3 mm  $\varnothing$ ) versetzt. Unter Eiskühlung wurde mittels Disintegration (Disintegrator S) 20 min bei 4.000 rpm aufgeschlossen. Pro Aufschluß wurden bis zu 50 g Zellen verwendet.

Aufschlußpuffer: 100 mM NaAc/HCl (pH = 4.5) + 1 mM MgCl<sub>2</sub> + 10 Tropfen Ucoloub/l

#### **H<sub>6</sub>-BTL-2**

Die Zellen wurden mit 10 ml Aufschlußpuffer pro Gramm Zellen aufgeschlämmt und in der *French Pressure Cell* bei einem Druck von 500 psi aufgeschlossen. Pro Aufschluß wurden bis zu 10 g Zellen verwendet.

Aufschlußpuffer: 50 mM Tris/HCl (pH = 8.0) + 2 mM LDAO + 0.1 % Na-cholat

Die aufgeschlossenen Zellen wurden in einem SS-34-Rotor bei 4°C und 13.000 rpm zweimal für jeweils 10 min (R-ADH-Lb-G37D) bzw. bei 10°C und 18.000 rpm zweimal für jeweils 15 min (H<sub>6</sub>-BTL-2) zentrifugiert, um nach der Zelllyse den Zelldebris zu entfernen. Der Überstand des Zellaufschlusses der R-ADH-Lb-G37D wurde mit bidestilliertem Wasser im Verhältnis 1:3 verdünnt, um die Salzkonzentration zu verringern. Durch die Zugabe von 1 M NaOH wurde der pH-Wert auf 7.2 eingestellt und die Lösung für die chromatographischen Trennungen verwendet. Der Überstand der H<sub>6</sub>-BTL-2 wurde ohne weitere Vorbehandlung für die nachfolgenden Reinigungsschritte verwendet.

### 3.2.2 Chromatographische Trennverfahren

Die chromatographischen Trennungen wurden alternativ mit einem EDV gesteuerten GradiFrac-, FPLC- oder Äkta-System durchgeführt.

#### 3.2.2.1 Anionentausch-Chromatographie

Der vorbehandelte Überstand des Zellaufschlusses der R-ADH-Lb-G37D wurde mit einer Flußrate von 5 ml/min auf eine HiPrep 16/10 Q FF-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer A gewaschen und die R-ADH-Lb-G37D bei einer Flußrate von 5 ml/min in einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten eluiert. Dabei wurde der Gradient nach dem Waschen wie folgt angewendet: linearer Gradient von 0–400 mM NaCl innerhalb des 30-fachen Säulenvolumens (600 ml), 400 mM NaCl mit einem fünffachen Säulenvolumen (100 ml) und Stoßelution mit 1 M NaCl mit einem vierfachen Säulenvolumen (80ml), um nicht R-ADH-Lb-G37D-Protein von der Säule zu waschen.

Puffer A: 20 mM TEA/HCl (pH = 7.0) + 1 mM MgCl<sub>2</sub>

Puffer B: 20 mM TEA/HCl (pH = 7.0) + 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 M NaCl

#### 3.2.2.2 Umpufferung

Die aktiven Fraktionen der Anionentausch-Chromatographie wurden vereinigt und auf einer HiPrep 26/10-Entsalzungssäule bei Raumtemperatur mit einer Flußrate von 8 ml/min umpuffert. Dabei wurden maximal 15 ml Probe aufgetragen und mit einem fünffachen Säulenvolumen (70 ml) eluiert.

Puffer: 20 mM TEA/HCl (pH = 7.0) + 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 3.2.2.3 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie

Die umgepufferten Fraktionen wurden bei Raumtemperatur auf eine Phenyl-Superose HR 5/5-Säule aufgetragen und die R-ADH-Lb-G37D nach Waschen mit Puffer A mit einer Flußrate von 0.5 ml/min im sinkenden Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Gradienten eluiert. Dabei wurde ein linearer Gradient von 1 M bis 0 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> innerhalb des 20-fachen Säulenvolumens (20ml) verwendet.

Puffer A: 20 mM TEA/HCl (pH = 7.0) + 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Puffer B: 20 mM TEA/HCl (pH = 7.0) + 1 mM MgCl<sub>2</sub>

### 3.2.2.4 Entsalzung

Die aktiven Fraktionen der hydrophoben Interaktions-Chromatographie wurden vereinigt und auf einer HiPrep 26/10-Entsalzungssäule bei Raumtemperatur mit einer Flußrate von 8 ml/min entsalzt. Dabei wurden maximal 15 ml Probe aufgetragen und mit einem fünffachen Säulenvolumen (70 ml) eluiert

Puffer: 20 mM TEA/HCl (pH = 7.0) + 1 mM MgCl<sub>2</sub>

### 3.2.2.5 gekoppelte Kationen- und Anionenaustausch-Chromatographie

Die entsalzten Fraktionen wurde mit einer Flußrate von 3 ml/min auf eine gekoppelte HiPrep 16/10 SP FF- und MonoQ HR 10/10-Säule aufgetragen. Nach der Probenauftragung wurde mit einem dreifachen Säulenvolumen (85 ml) mit Puffer A gewaschen und anschließend die HiPrep 16/10 SP FF-Säule aus dem System entfernt. Die R-ADH-Lb-G37D wurde in einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten eluiert. Dabei wurde ein linearer Gradient von 0–250 mM NaCl innerhalb des 20-fachen Säulenvolumens (160 ml) verwendet. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration mit Centriplus 10 auf 10 ml konzentriert.

Puffer A: 20 mM TEA/HCl (pH = 7.0) + 1 mM MgCl<sub>2</sub>

Puffer B: 20 mM TEA/HCl (pH = 7.0) + 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 M NaCl

### 3.2.2.6 Gelpermeations-Chromatographie

Die Gelpermeations-Chromatographie wurde mit einer HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade-Säule durchgeführt. Die Säule wurde äquilibriert, die konzentrierten aktiven Fraktionen aus dem vorherigen Schritt bei einer Flußrate von 0.75 ml/min aufgetragen und anschließend eluiert.

Puffer: 20 mM TEA/HCl (pH = 7.0) + 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 150 mM NaCl

### 3.2.2.7 Metallchelataffinitäts-Chromatographie

Die Affinitäts-Chromatographie wurde für die H<sub>6</sub>-BTL-2 mit 200 ml Ni-NTA Superflow-Säulenmaterial in einer XK 50/20 Säule mit einem variablen Adapter am oberen Ende durchgeführt. Der Überstand des Zellaufschlusses wurde mit einer Flußrate von 6 ml/min auf die Säule aufgetragen und die Säule mit dem dreifachen Säulenvolumen (600 ml) mit Puffer A gewaschen. Die gebundene H<sub>6</sub>-BTL-2 wurde in einem steigenden Imidazol-Gradienten eluiert. Dabei wurde ein linearer Gradient von 0–200 mM Imidazol innerhalb des dreifachen Säulenvolumens (600 ml) und anschließend eine Konzentration von 200 mM Imidazol für das eininhalbfache des Säulenvolumens (300ml) verwendet. Je nach Reinheitsgrad der H<sub>6</sub>-BTL-2 wurde diese nun für die nachfolgenden Kristallisationsansätze verwendet oder durch einen weiteren Schritt (Umpufferung und Anionenaustausch-Chromatographie) gereinigt.

Puffer A: 20 mM Tris/HCl (pH = 7.0) + 500 mM NaCl + 2 mM LDAO + 0.1 % Na-cholat + 10 mM Imidazol

Puffer B: 20 mM Tris/HCl (pH = 7.0) + 2 mM LDAO + 250 mM Imidazol

### 3.2.2.8 Umpufferung

Die aktiven Fraktionen der Affinitäts-Chromatographie wurden vereinigt und auf einer HiPrep 26/10-Entsalzungssäule bei Raumtemperatur mit einer Flußrate von 8 ml/min entsalzt. Dabei wurden maximal 15 ml Probe aufgetragen und mit einem fünffachen Säulenvolumen (70 ml) eluiert

Puffer: 20 mM Tris/HCl (pH = 8.5)

### 3.2.2.9 Anionenaustausch-Chromatographie

Die entsalzten Fraktionen wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min auf eine MonoQ HR 5/5-Säule aufgetragen. Nach der Probenauftragung wurde mit Puffer A gewaschen. Die H<sub>6</sub>-BTL-2 wurde in einem steigenden NaCl-Gradienten von 0–150 mM NaCl innerhalb des 50-fachen Säulenvolumens (50 ml) eluiert.

Puffer A: 20 mM Tris/HCl (pH = 8.5)

Puffer B: 20 mM Tris/HCl (pH = 8.5) + 150 mM NaCl

### 3.2.2.10 Konzentrierung durch Ultrafiltration

Die gereinigte R-ADH-Lb-G37D wurde durch Ultrafiltration mit Centriplus 10 in dem während der Gelpermeations-Chromatographie verwendeten Puffer für die Kristallisation auf eine Konzentration von 21 mg/ml konzentriert.

Die Lösung der gereinigten H<sub>6</sub>-BTL-2 wurde durch Zugabe von HCl auf einen pH-Wert von 9.0 eingestellt. Durch die Zugabe von 10 %igem Isopropanol wurde die Proteinstammlösung auf eine Endkonzentration von 5 % Isopropanol eingestellt. Während der anschließenden Ultrafiltration mit Centriplus 30 wurde die Proteinlösung dreimal mit einer Lösung aus 20 mM Tris/HCl (pH = 9.0) + 5 % Isopropanol umgepuffert und für die Kristallisation auf eine Konzentration von 1.6 mg/ml konzentriert.

### 3.3. Proteinanalytik

#### 3.3.1 Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden spektralphotometrisch nach Bradford (Bradford, 1976) mit dem Kit von BioRad (München) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  nm gegen einen BSA-Standard gemessen. Die Konzentrationen der gereinigten Enzyme wurden zusätzlich über die Extinktionen bei  $\lambda = 280$  nm unter Einbeziehung der Extinktionskoeffizienten bestimmt.

#### 3.3.2 Aktivitätstests

Die quantitative Aktivität der R-ADH-Lb-G37D wurde durch die Konzentrationsabnahme des an der enzymatischen Reaktion beteiligten Cofaktors NADH bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340$  nm spektralphotometrisch bestimmt. Dabei entspricht die umgesetzte Menge an NADH der Menge am Substrat Acetophenon, das im Versuchsansatz reduziert wird. 1 Unit ist hierbei definiert als die Menge an Enzym, die notwendig ist, um 1  $\mu$ mol Acetophenon in 1 min bei 30°C umzusetzen.

Testansatz:

970  $\mu$ l 11 mM Acetophenon in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.0)

20  $\mu$ l 9.55 mM NADH in 10 mM Tris/HCl (pH = 8.5)

10  $\mu$ l Enzym

Die quantitative Aktivität der H<sub>6</sub>-BTL-2 wurde durch die Spaltung von p-Nitrophenylpalmitat (pNPP) nach Winkler und Stuckmann (1979) bei 60°C unter Verwendung von Na-chofat als Emulgator bestimmt. Die Zunahme der Konzentration des bei der Reaktion entstehenden p-Nitrophenolat-Anions wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 410$  nm über einen Zeitraum von 1 min spektralphotometrisch bestimmt. 1 Unit ist hierbei definiert als die Menge an Enzym, die notwendig ist, um 1  $\mu$ mol p-NPP in 1 min bei 60°C umzusetzen.

Testansatz:

900 µl Testlösung

100 µl Enzym

Die Testlösung wird durch Mischen von Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:10 hergestellt.

Lösung 1: 30 mg pNPP ad 10 ml Isopropanol

Lösung 2: 1 g Na-cholat + 0.2 g Gummi Arabicum ad 200 ml 0.1 Tris/HCl (pH = 7.5)

### 3.3.3 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden das Phast System und vorgefertigte Gradientengele (8-25 % Acrylamid; PHAST-GEL IEF pH 5-8) der Fa. Pharmacia verwendet. Bei der SDS-PAGE wurde die Proteinlösung mit Wasser auf eine Konzentration von etwa 0.2 mg/ml verdünnt, mit dem Auftragspuffer (4x: 8 ml 60 mM Tris/HCl, pH = 8.0, 1 mM EDTA, 1 g SDS, 4 mg Bromphenolblau, 2 ml β-Mercaptoethanol) gemischt, 5 min bei 95°C inkubiert, kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Trennung wurde nach dem Pharmacia *Separation Technique File No. 110* durchgeführt. Bei der nativen PAGE wurde die verdünnte Proteinlösung sofort auf das Gel aufgetragen und nach dem *Separation Technique File No. 120* getrennt. Bei der isoelektrischen Fokussierung wurde die auf etwa 0.2 mg/ml verdünnte Proteinlösung sofort auf das Gel aufgetragen und nach dem *Separation Technique File No. 100* getrennt. Als Größenmarker wurde bei der SDS-PAGE die Proteinstandardmischung IV von Pharmacia verwendet, die aus folgenden Proteinen besteht: Cytochrom C 12.3 kDa, Myoglobin 16.9 kDa, Carboanhydrase 30 kDa, Ovalbumin 42.7 kDa, Albumin 66.3 kDa, Ovotransferrin 78 kDa. Für die IEF wurde das *IEF-high-pI-kit* von Pharmacia (pI: 5.20, 5.85, 6.55, 6.85, 7.35, 8.15, 8.45, 8.65, 9.30, 10.25) verwendet.

Nach der Trennung wurden die Proteine mit einer Silberfärbung detektiert (Pharmacia *Development Technique File No. 210*).

### 3.3.4 Aktivitätsfärbung

Auf den SDS-, nativen und IEF-Gelen (s. Kap. 3.3.3) wurden neben den Silberfärbungen Aktivitätsfärbungen für die H<sub>c</sub>-BTL-2 durchgeführt. Dabei wurde bei den SDS-Gelen zur Renaturierung des Proteins das SDS entfernt, indem das Gel 30 min in 50 ml 0.1 M Tris/HCl (pH = 8.0) + 0.5 % (w/v) Triton-X-100 inkubiert wurde. Die Gele wurden anschließend für 15-20 min mit der aus Lösung A und B (Mischung: 1+1) bestehenden Färbelösung inkubiert, um enzymatisch aktive Banden sichtbar zu machen:

Lösung A: 4 g 1-Naphtylacetat in 1 ml Aceton + 10 ml 0.1 M Tris/HCl (pH = 8.0)

Lösung B: 5 g *FastRed TR* (4-Chloro-2-Methylbenzoldiazoniumchlorid) in 10 ml 0.1 M Tris/HCl (pH = 8.0)

### **3.3.5 Massenspektrometrie**

#### **3.3.5.1 ESI-Massenspektrometrie**

Zur ESI-Massenspektrometrie wurden die Proteinproben gegen ein Methanol-Wasser-Gemisch 1:1 (v/v) mit 0.1 % Essigsäure dialysiert. Es wurden ca. 100  $\mu\text{l}$  mit einer Konzentration von 10 pmol/ $\mu\text{l}$  benötigt.

#### **3.3.5.2 MALDI-Massenspektrometrie**

Die ca. 100  $\mu\text{l}$  Proteinprobe mit 10-100 pmol/ $\mu\text{l}$  wurden gegen 0.1 % TFA dialysiert. 5  $\mu\text{l}$  davon wurden gemischt mit 15  $\mu\text{l}$  0.1 % TFA und 30  $\mu\text{l}$  einer mit Sinapinsäure gesättigten Acetonitril-Wasser-Lösung 1:1 (v/v). Die Spots auf dem Target wurden mit einer Ethanol-Dünnschicht (0.5  $\mu\text{l}$  in Ethanol gesättigte Sinapinsäure) benetzt und nach dem Trocknen mit 0.5  $\mu\text{l}$  Probe versehen. Nach dem Trocknen wurde die Probe direkt vermessen. Als Standard für die externe Kalibrierung wurde BSA verwendet.

### **3.3.6 Dynamische Lichtstreuung**

Die dynamische Lichtstreuung wurde mit dem Gerät DynaPro-801 durchgeführt. Die Proteinprobe mit einer Konzentration von 0.2-10 mg/ml wurde vor der Messung durch einen 0.2  $\mu\text{m}$ -Filter filtriert. Es wurden jeweils 20–50 Einzelmessungen aufgenommen. Die Auswertung erfolgte monomodal oder bimodal mit Durchschnittsproteinen 24-110 kDa als Standard für die Berechnung der Molmasse aus dem hydrodynamischen Radius mit der Software des Gerätes.

### **3.3.7 CD-Spektroskopie**

Für die Messung wurden die verwendeten Proteinproben in 5 mM Phosphatpuffer (pH = 7.5) umgepuffert und eine Proteinkonzentration von 0.1 mg/ml verwendet. Die Messungen fanden in einem Wellenlängenbereich von 185 bis 250 nm bei 20°C statt. Für die Auswertung wurden die Programme CONTIN (Provencher and Glöckner, 1981), K2D (Andrale et al., 1993) und SELCON (Sreerama and Woody, 1993) verwendet. Für die Messung von Schmelzkurven wurde bei einer Wellenlänge von 222 nm eine Temperaturgradient von 40°C/h durchgeführt.

## 3.4 Proteinkristallisation

Die konzentrierten Proteinproben der R-ADH-Lb-G37D und der H<sub>6</sub>-BTL-2 wurden für die Kristallisation verwendet. Die Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode mit sitzenden oder hängenden Tropfen durchgeführt. Es wurden Linbro-Platten und Polystyrol- und Polypropylen-Brücken verwendet. Die Tropfen wurden aus Proteinlösung, Reservoirlösung und gegebenenfalls Additiven sowie Detergenzien gemischt. Die Ergebnisse wurden in regelmäßigen Abständen unter einem Stereomikroskop untersucht und protokolliert. Die Reservoirs wurden von Hand gemischt. Der pH-Wert der Puffer wurde in den systematischen *Screens* per pH-Meter in einer 1 M Lösung eingestellt. Effekte weiterer Komponenten des Reservoirs wurden vernachlässigt. Bei der Beschreibung der Kristallisationsbedingungen handelt es sich grundsätzlich um die Beschreibung des Reservoirs. Erste Kristallisationsversuche der H<sub>6</sub>-BTL-2 wurden nach dem Schema der unvollständigen faktoriellen Suche (Jancarik & Kim, 1991, *sparse matrix screen*) durchgeführt. Ausgehend von diesen ersten Untersuchungen wurden systematische Ansätze mit der Variation von einem und/oder zwei Parametern durchgeführt.

Für die R-ADH-Lb-G37D wurden die für der Kristallisation des Wildtyps bekannten Fällungsmittel verwendet (MPD, PEG 400, PEGMME 550). Durch systematische Variation des pH-Wertes und der Fällungsmittelkonzentration wurde dabei die Kristallisation optimiert.

## 3.5. Röntgendiffraktometrie

### 3.5.1 Kristallmontage

Für Tieftemperaturmessungen wurden die Kristalle der R-ADH-Lb-G37D im Tropfen durch Einstechen in die Brücke in der Nähe vom Kristall vom Untergrund gelöst und mit einem *Cryoloop* nach der Montage auf dem Goniometerkopf möglichst schnell in einem Stickstoffstrom auf 100 K gekühlt.

Für Raumtemperaturmessungen wurden die Kristalle der H<sub>6</sub>-BTL-2 durch Einstechen in die Brücke in der Nähe vom Kristall vom Untergrund gelöst und in ein der Größe der Kristalle angepaßtes Markröhrchen (0.5–1.0 mm  $\varnothing$ ) gesogen. Mit einem dünneren Markröhrchen (0.1 mm  $\varnothing$ ) wurde die Mutterlauge um den Kristall entfernt. Zur Beibehaltung einer feuchten Atmosphäre wurde etwas Flüssigkeit in kurzem Abstand zum Kristall gelassen. Die Kapillare wurde an beiden Enden mit einem niedrigschmelzenden Wachs (*capillary wachs*) versiegelt und mit Knetgummi auf dem Goniometerkopf montiert.

### 3.5.2 Diffraktionsexperimente

Röntgendiffraktionsexperimente an der institutseigenen Drehanode wurden mit einer Kupferdrehanode mit Cu-K $\alpha$ -Strahlung durchgeführt. Das Beugungsmuster wurde dabei mit einer Bildspeicherplatte (DIP2030H) aufgezeichnet. Mit dieser Anlage wurden der Datensatz der H<sub>6</sub>-BTL-2 (bis 3.3 Å), der Datensatz des Apoenzyms (bis 2.2 Å) und die beiden Datensätze der ternären Komplexe der R-ADH-Lb-G37D bei 1.78 und 1.55 Å gemessen. Die Meßparameter sind in der Tabelle 3.4 aufgelistet.

Die beiden bis 1.10 und 1.05 Å hochaufgelösten Datensätze der R-ADH-Lb-G37D wurden bei 100 K am *European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)* in Grenoble am Meßplatz ID 29 unter Verwendung von Synchrotronstrahlung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 0.9155$  Å gemessen. Das Beugungsmuster wurde dabei mit einem CCD-Detektor *ADSC Quantum 210* aufgezeichnet. Die Meßparameter sind in der Tabelle 3.5 zusammengefaßt.

Spannung	45 kV
Stromstärke	100 mA
Wellenlänge	1.5418 Å
Kristall-Detektor-Abstand	110 - 150 mm
Monochromator	Graphitkristall oder Doppelspiegel
Rotation pro Bild	1° / Bild
Anzahl der Bilder	137 (2.2 Å), 216 (1.78 Å), 180 (1.55 Å)
Gesamtrotation	137° (2.2 Å), 127° (1.78 Å), 180° (1.55 Å)
Belichtungszeit	1200 sec / Bild
Kollimator	0.5 mm

**Tabelle 3.4:** Meßparameter der Diffraktionsexperimente an der institutseigenen Drehanode

Wellenlänge	0.9155 Å
Kristall-Detektor-Abstand	87 mm
Rotation pro Bild	0.5° / Bild
Anzahl der Bilder	183 (1.10 Å), 230 (1.05 Å)
Gesamtrotation	91.5° (1.10 Å), 115° (1.05 Å)
Belichtungszeit	0.5 sec / Bild

**Tabelle 3.5:** Meßparameter der hochaufgelösten Datensätze am *ESRF*

## 3.6 Datenreduktion

Die Diffraktionsbilder wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK aus dem HKL-Programmpaket (Otwinowski & Minor, 1997) indiziert, integriert und skaliert. Die Visualisierung der Beugungsbilder erfolgte mit XDISPLAY F. Das Konvertieren von Datenreihen und Dateien wurde mit SCALEPACK2MTZ durchgeführt. Die freien Reflexe für die Kreuzvalidierung bei der Strukturverfeinerung wurden mit UNIQUEIFY (CCP4, 1994) bestimmt. Die Packungsdichte wurde mit MATTHEWS\_COEFF (CCP4, 1994) und die Selbstrotationsfunktion mit GLRF aus dem REPLACE-Paket (Tong & Rossmann, 1997), berechnet.

## 3.7 Molekularer Ersatz und Strukturverfeinerung

Für den molekularen Ersatz wurde der Wildtyp der R-ADH-Lb (Müller, 2000) als Suchmodell verwendet. Bei der Strukturverfeinerung wurden in abwechselnden Zyklen von manuellem Modellbau in O (Jones et al., 1991) und Verfeinerungsrunden mit CNS (Brünger et al., 1998) und/oder REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) die einzelnen Modelle verfeinert.

Die Verfeinerung des Apoenzyms wurde ausschließlich mit CNS\_SOLVE durchgeführt. Nach den kombinierten Rotations- und Translationsrechnungen wurde zunächst eine Starre-Körper-Verfeinerung (*rigid-body-refinement*) bei einer maximalen Auflösung von 3 Å durchgeführt. Bei den ersten Verfeinerungsschritten wurde die nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) durch Verfeinerung eines Monomers und festen NCS-Operationen berücksichtigt (NCS *constraints*). Später wurde dann mit allen Monomeren gerechnet, wobei die Abweichungen der weiteren Monomere vom Referenzmonomer mit Energietermen belegt wurden (NCS *restraints*). Bei diesen Verfeinerungszyklen wurden die höheraufgelösten Reflexe bis 2.2 Å miteinbezogen. Um aus lokalen Energieminima herauszukommen, wurde bei den Verfeinerungsschritten vor der Minimierung ein *simulated annealing* mit Moleküldynamik beginnend bei 3000 K durchgeführt. Für den automatischen Wassereinbau wurden neben stereochemischen Gegebenheiten Peaks über  $3\sigma$  in sigmaA-gewichteten FoFc-Elektronendichten Peaks vorausgesetzt. Wassermoleküle mit B-Faktoren über 50 Å<sup>2</sup> wurden verworfen. Die Strukturverfeinerung der ternären Komplexe der R-ADH-Lb-G37D wurde zunächst mit CNS\_SOLVE und später mit REFMAC5 erst mit isotropen und dann mit anisotropen Temperaturfaktoren (Merritt, 1999) durchgeführt. Im ersten Verfeinerungsschritt wurden sofort die bekannten Koordinaten der Wildtyp-R-ADH verwendet und eine Energieminimierung einschließlich eines *simulated annealing* mit Moleküldynamik durchgeführt. Hierbei wurden direkt die höheraufgelösten Reflexe bis 1.78 Å, 1.55 Å, 1.10 Å bzw. 1.05 Å miteinbezogen.



# 4. Ergebnisse

## 4.1 Die R-ADH-Lb-G37D

### 4.1.1 Ausgangsbedingungen

In der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Hummel am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurde am Forschungszentrum in Jülich der Wildtyp der rekombinanten R-ADH-Lb produziert, vorgereinigt und erste Kristallisationsexperimente durchgeführt (Riebel, 1996). Die Endaufreinigung, Kristallisation und Strukturaufklärung der R-ADH-Lb wurde am hiesigen Institut für Biochemie durchgeführt (Müller, 2000; Niefind et al., 2000). Ausgehend vom NADP(H)-abhängigen R-ADH-Lb-Wildtyp wurde die G37D-Mutante mit einer dualen Cosubstratspezifität in Jülich produziert und vorgereinigt (Riebel, unveröffentlicht). Erste Kristallisationsversuche des Apoenzyms führten dabei zu kleinen Kristallplättchen (Riebel, unveröffentlicht), die zu Beginn der vorliegenden Arbeit für das erste Diffraktionsexperiment der R-ADH-Lb-G37D an der hauseigenen Drehanode verwendet wurden. Für sämtliche weitere Untersuchungen sowie der eigentlichen Strukturaufklärung der Mutante und der Kristallisation des ternären Komplexes aus Enzym, Substrat und Cofaktor wurden Proteinchargen verwendet, die nach einem im Rahmen dieser Arbeit neuentwickelten Protokoll selbst gereinigt wurden. Dies war notwendig, da das bisher vom Kooperationspartner verwendete Reinigungsprotokoll zum einem schwer reproduzierbar und zum anderen noch optimierbar war.

### 4.1.2 Reinigung der R-ADH-Lb-G37D

Das vom Kooperationspartner in Jülich entwickelte dreistufige Reinigungsprotokoll bestand aus zwei Reinigungsschritten, die auf hydrophober Interaktions-Chromatographie (Phenyl- und Octylsepharose) beruhten, und aus einem finalen Anionenaustausch-Chromatographieschritt. Ausgehend von 7 g Zellen, 44 g Gesamtprotein, einer Gesamtaktivität von 406 U und einer spezifischen Aktivität von 9.2 U/mg, konnten bei der Reinigung nur 0.7 mg konzentrierte ADH (= 1.6 %) mit einer Gesamtaktivität von 9 U (= 2.2 %) und einer spezifischen Aktivität von 13.1 U/mg erhalten werden (Weitz, persönliche Mitteilung). Wie eigene Versuche zeigten, war das vorgeschlagene Protokoll leider nicht reproduzierbar, da die R-ADH-Lb-G37D im ersten Reinigungsschritt nicht vollständig an die Säule band und während des gesamten kontinuierlichen Ammoniumsulfat-Gradienten ohne erkennbaren Reinigungserfolg eluierte.

Dies zeigte deutlich, daß die verwendete Salzkonzentration von 0.8 M Ammoniumsulfat nicht ausreichend für die Bindung an die Säule war. Weiterhin führte die Zugabe des für die hydrophobe Interaktionschromatographie verwendeten Ammoniumsulfats zu einer sofortigen Halbierung der Aktivität im Rohlysat. Es konnte somit festgestellt werden, daß die Verwendung von Ammoniumsulfat weder sinnvoll noch geboten erschien. Zusätzlich schien die Verwendung von Octylsepharose im 2. Reinigungsschritt fraglich, da aus den vorliegenden SDS-Gelen und den Ergebnissen des Reinigungsprotokolls praktisch kein Reinigungseffekt ersichtlich war. Um die Reproduzierbarkeit und Effektivität der Reinigung zu steigern, wurde das im folgenden beschriebene Protokoll entwickelt.

#### **4.1.2.1 4-Schritt-Aufreinigung der R-ADH-Lb-G37D**

Bei der Erarbeitung des Reinigungsprotokolls wurden Trennungen mittels hydrophober Interaktions-Chromatographie (Phenylsepharose, Phenylsuperose, Resource Phenyl), Anionen- und Kationenaustausch-Chromatographie (HiPrepQ FF + SP FF, SourceQ + S, ResourceQ + S, MonoQ + S + P) und Größenausschluß-Chromatographie durchgeführt.

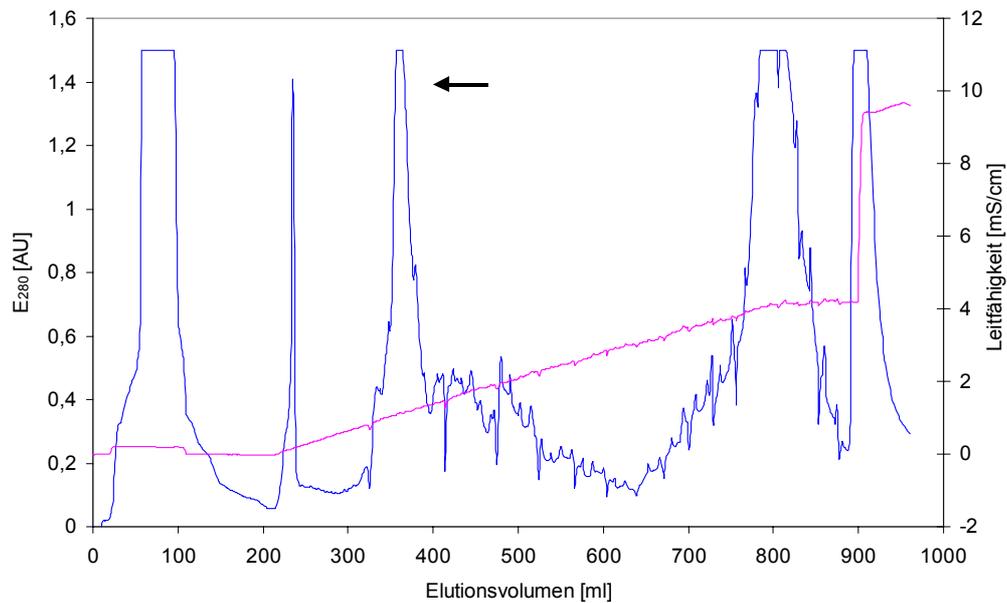
Das erarbeitete Reinigungsprotokoll für die R-ADH-Lb-G37D umfaßt folgende Schritte:

- Zellaufschluß der *E. coli*-Zellen mittels Disintegrator und Zentrifugation (SS-34-Rotor)
- Reinigung der ADH durch Anionenaustausch-Chromatographie (HiPrepQ FF)
- Umpufferung durch Gelpermeations-Chromatographie (HiPrep Desalting)
- Reinigung der ADH durch hydrophobe Interaktions-Chromatographie (Phenylsuperose)
- Umpufferung durch Gelpermeations-Chromatographie (HiPrep Desalting)
- Reinigung der ADH durch gekoppelte Kationen- und Anionenaustauschchromatographie (HiPrepSP FF + MonoQ)
- Reinigung der ADH durch Gelpermeations-Chromatographie (HiLoad Superdex 200)
- Konzentrierung durch Ultrafiltration

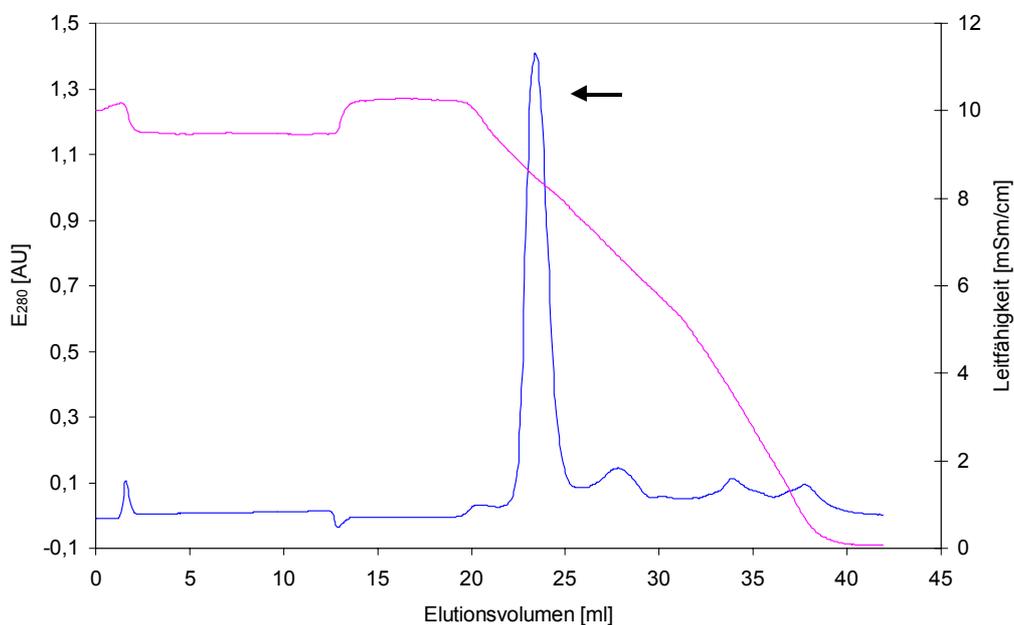
Im ersten Reinigungsschritt wurde die R-ADH-Lb-G37D mittels Anionenaustausch-Chromatographie im steigendem NaCl-Gradienten extrahiert. Die Elution der R-ADH-Lb-G37D erfolgte dabei zwischen 100 und 150 mM NaCl. Die hydrophobe Interaktions-Chromatographie wurde nach Umpufferung des vom Anionenaustauscher erhaltenen Proteingemisches als zweiter Reinigungsschritt mit sinkendem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Gradienten durchgeführt. Dabei erfolgte die Elution der R-ADH-Lb-G37D bei 900 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hierbei zeigte sich, daß die Zugabe von Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im Gegensatz zu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zum einen zur vollständigen Bindung des Proteins an die Säule führte und zum anderen kein Aktivitätsverlust des Enzyms zu beobachten war.

Die beiden ersten Reinigungsschritte stellen die Grobreinigung dar. Die gekoppelte Kationen- und Anionenaustausch-Chromatographie sowie die Gelpermeations-Chromatographie dienen zur Endreinigung der schon größtenteils gereinigten R-ADH-Lb-G37D.

In Abbildung 4.1 sind die Chromatogramme der einzelnen Reinigungsschritte dargestellt.

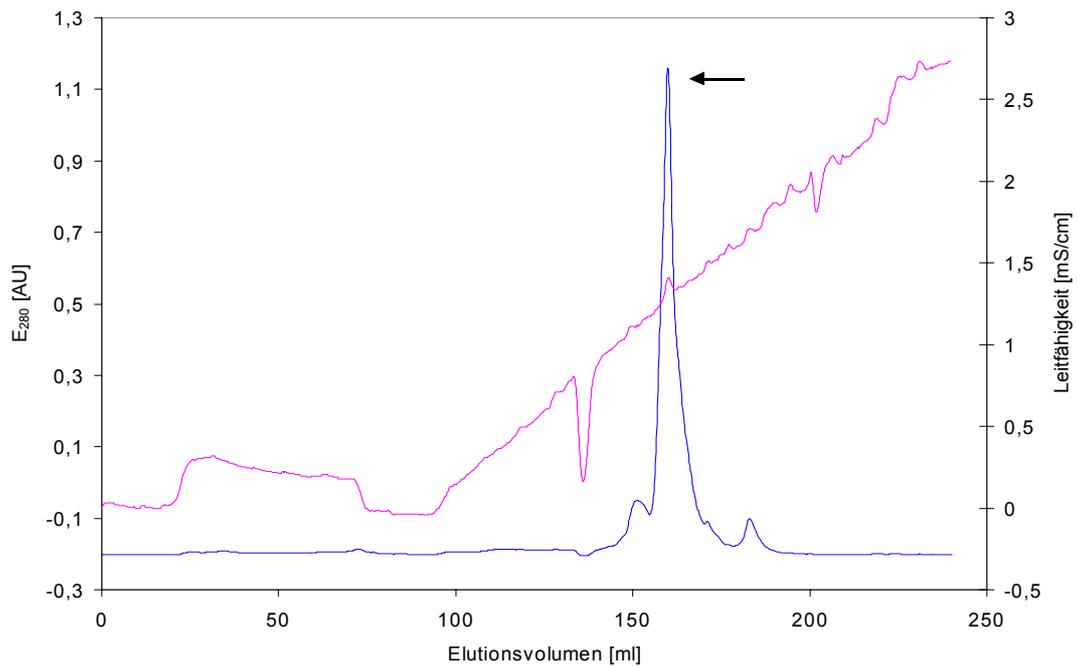


a) Anionenaustausch-Chromatographie mit HiPrepQ FF

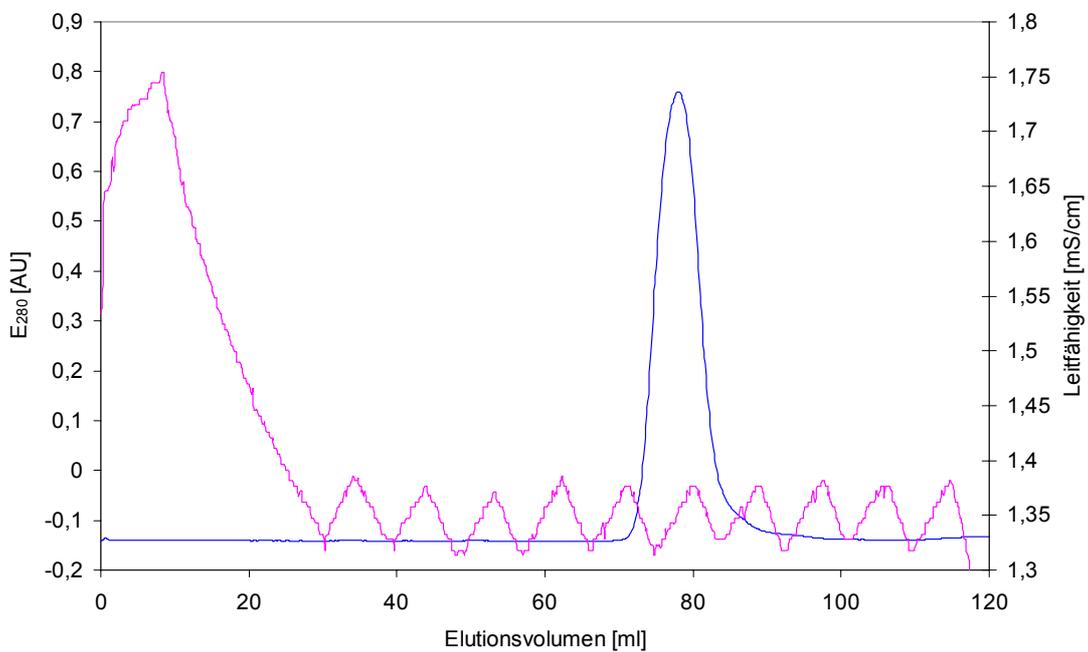


b) Hydrophobe Interaktions-Chromatographie mit Phenylsuperose

**Abbildung 4.1:** Chromatogramme der R-ADH-Lb-G37D. Die Extinktion bei  $\lambda = 280$  nm und die Leitfähigkeit sind gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die aktiven Fraktionen, die für die weiteren Schritte vereinigt wurden, sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.



c) gekoppelte Kationen- und Anionenaustausch-Chromatographie mit HiPrepSP FF und MonoQ



d) Gelpermeations-Chromatographie mit HiLoad Superdex 200

**Abbildung 4.1:** Chromatogramme der R-ADH-Lb-G37D. Die Extinktion bei  $\lambda = 280$  nm und die Leitfähigkeit sind gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die aktiven Fraktionen, die für die weiteren Schritte vereinigt wurden, sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

### 4.1.2.2 Zusammenfassung des Reinigungsprotokolls

Die verschiedenen Einzelschritte der Reinigung sind quantitativ in einem Reinigungsprotokoll in Tabelle 4.1 zusammengefaßt. Die R-ADH-Lb-G37D konnte dabei über eine 4-stufige Reinigung mit einer Ausbeute von 12 % und einem Reinigungsfaktor von 4.7 als homogene Enzymfraktion isoliert werden.

	Aktivität [U]	Protein [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Reinigungs- faktor	Ausbeute [%]
Überstand des Aufschlusses	2752	892	3.1	1.0	100
Anionenaustausch- Chromatographie	1698	182	9.3	3.0	62
Hydrophobe Interaktions- Chromatographie	1027	107	9.6	3.1	37
Kationen- und Anionenaustausch- Chromatographie	239	34	7.0	2.3	9
Größenausschluß- Chromatographie	328	32	10.4	3.4	12
Konzentrierung	318	22	14.5	4.7	12

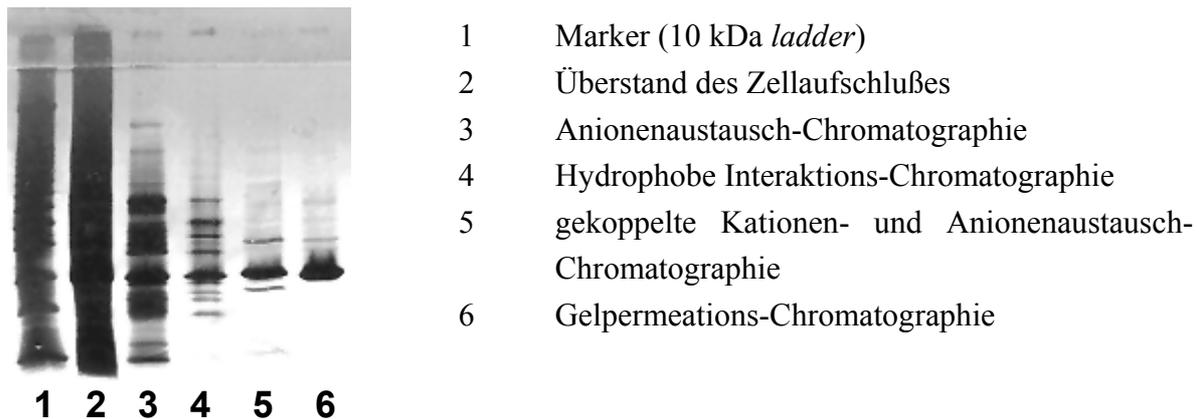
**Tabelle 4.1:** Zusammenfassung der verschiedenen Reinigungsschritte für die R-ADH-Lb-G37D. Für die Reinigung wurden 50 g *E. coli*-Zellen aufgeschlossen. Der Reinigungsfaktor ist definiert als der Quotient der spezifischen Aktivitäten und steigt ebenso wie die spezifische Aktivität im Laufe der Reinigung an. Die Ausbeute bezogen auf die Gesamtaktivität nimmt ab. Die Bestimmung der Proteingehalte erfolgte mit der Methode nach Bradford (1976). Die Gesamtaktivitäten wurden mit dem Substrat Acetophenon bestimmt. 1 Unit ist definiert als die Menge an R-ADH-Lb-G37D, die notwendig ist, um 1  $\mu\text{mol}$  Acetophenon in 1 min bei 25°C zu oxidieren.

### 4.1.3 Reinheitskontrolle und Analytik

Die Ergebnisse der jeweiligen Trennungen und die erzielte Reinheit der R-ADH-Lb-G37D wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen, massenspektrometrische Messungen (MALDI-TOF, ESI-MS) und dynamische Lichtstreuung untersucht.

### 4.1.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Nach der Anionenaustausch-Chromatographie waren auf dem SDS-Gel (Abbildung 4.2) eine starke Bande für die R-ADH-Lb-G37D um 25 kDa sowie eine Vielzahl weiterer Proteinbanden zu beobachten (Spur 3). Nach der hydrophoben Interaktions-Chromatographie waren auf den SDS-Gelen eine starke R-ADH-Lb-G37D-Bande sowie 5-10 weitere schwächere Proteinbanden zu erkennen (Spur 4), die durch die nachfolgenden Reinigungsschritte entfernt werden konnten (Spur 6).



**Abbildung 4.2:** SDS-Gel der erhaltenen R-ADH-Lb-G37D-Fraktionen. Die Spuren 2 bis 6 stellen die Ergebnisse der jeweiligen Reinigungsschritte dar. In Spur 1 ist ein Standardmarker (Gibco BRL) aufgetragen.

### 4.1.3.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektren eines MALDI-TOF- und ESI-MS-Experimentes sind in den Abbildungen 4.3 und 4.4 dargestellt.

Im MALDI-TOF- Spektrum wird der Molekülionpeak  $[R-ADH-Lb-G37D+H]^+$  bei einem  $m/z$ -Wert von 26.697 Da detektiert. Daneben kann das zweifach geladenen Molekülion  $[R-ADH-Lb-G37D+2H]^{2+}$  bei einem  $m/z$ -Verhältnis von 13.345 Da beobachtet werden. Zur Kalibrierung wurde ein interner BSA-Standard verwendet.

Im dekonvolierten ESI-MS-Spektrum ist ein scharfer Peak für das einfach geladene Molekülion  $[R-ADH-Lb-G37D+H]^+$  bei 26.684 Da und für das zweifach geladenen Molekülion  $[R-ADH-Lb-G37D+2H]^{2+}$  bei einem  $m/z$ -Verhältnis von 13.344 Da zu beobachten. Weiterhin können die einfachen bzw. zweifachen Na-Addukte bei 26.705 bzw. 26.726 Da deutlich erkannt werden (*Salz-tailing*).

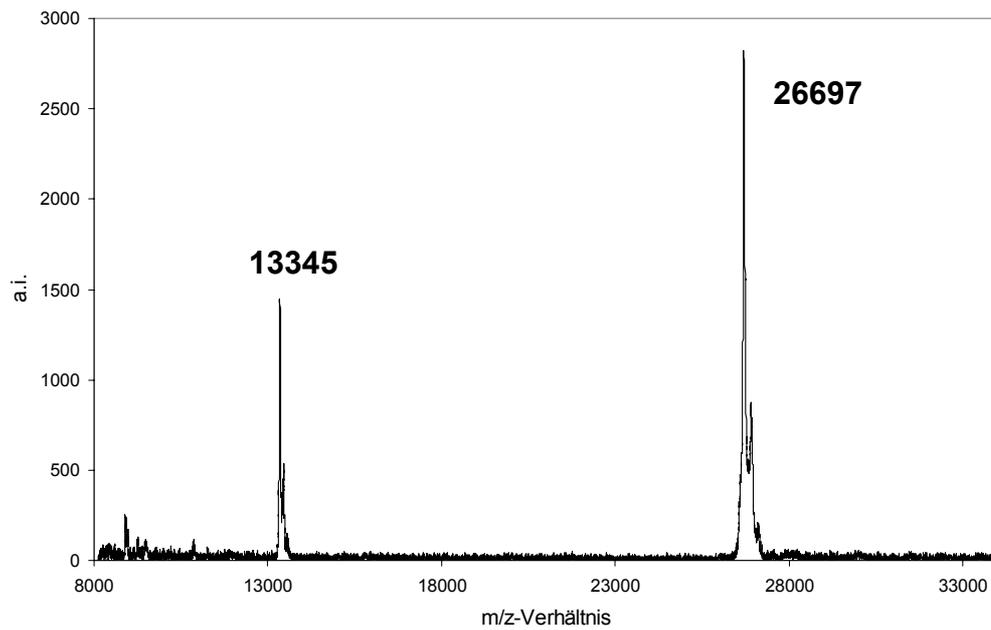


Abbildung 4.3: Massenspektrum eines MALDI-TOF-Experimentes der R-ADH-Lb-G37D.

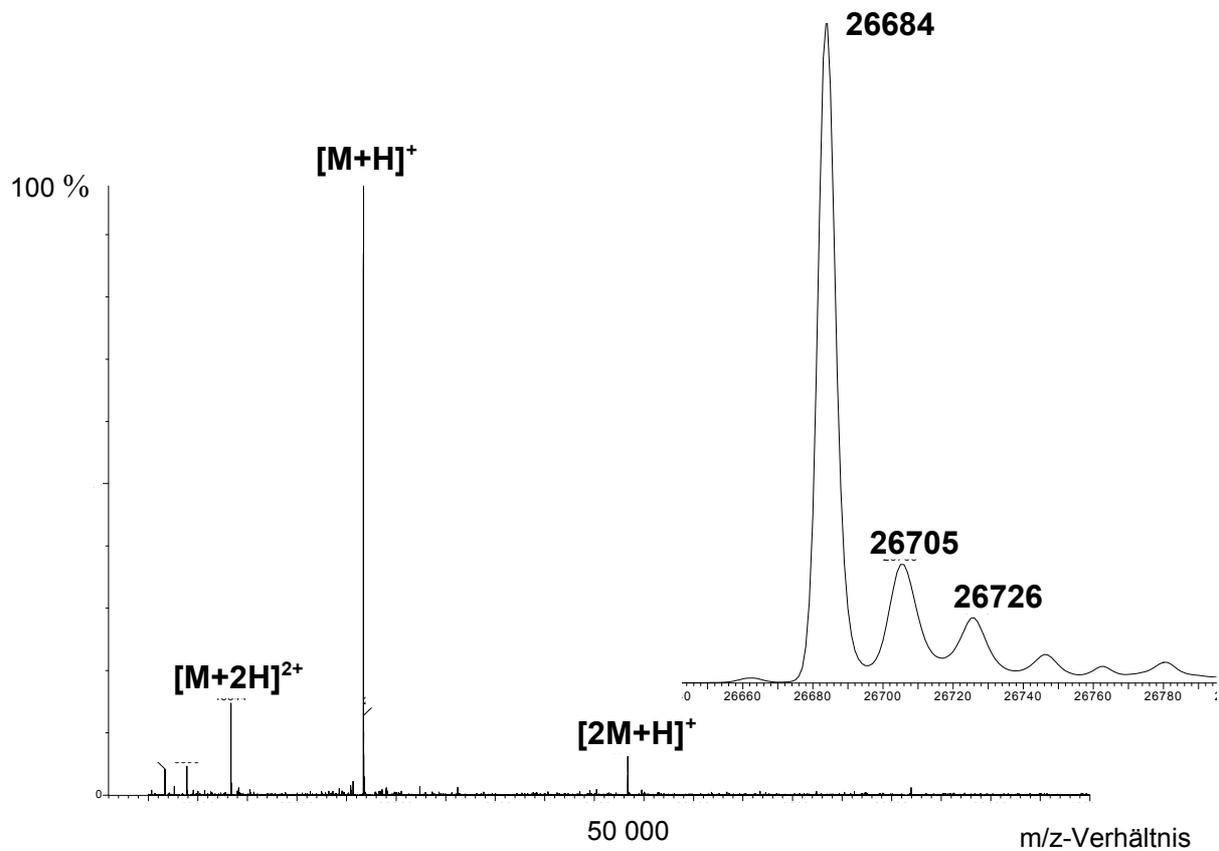


Abbildung 4.4: Massenspektrum eines ESI-MS-Experimentes der R-ADH-Lb-G37D. Der Ausschnitt zeigt die unterschiedlichen  $Na^+$ -Addukte.

### 4.1.3 Dynamische Lichtstreuung

Durch Messung der dynamischen Lichtstreuung wurde das Aggregationsverhalten der R-ADH-Lb-G37D untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, daß die R-ADH-Lb-G37D in ihrer funktionellen Einheit als Tetramer vorliegt und eine homogene Enzymfraktion mit monomodaler Größenverteilung aufweist. Für die R-ADH-Lb-G37D mit einer Konzentration von 3.5 mg/ml wurde ein Molekulargewicht von 99 kDa (Auswertungsmodus: Durchschnittsproteine 24-110 kDa) berechnet. Der angegebene Radius beträgt  $(3.8 \pm 0.6)$  nm, die *baseline* 1.003 und der *SOS*-Fehler 0.637. Die Abweichung des Radius liegt damit bei 16 %. Die Ergebnisse stellen jeweils den Mittelwert von 30-50 Messungen dar.

Die *baseline* und der *SOS*-Fehler sind zwei berechnete Größen, um die Qualität der Messung zu beurteilen. Die *baseline* leitet sich von der Vollständigkeit der Autokorrelationsfunktion ab. Der *SOS*-Fehler (*sum of squares*) gibt die Summe der mittleren quadratischen Fehler zwischen den gemessenen Rohdaten und den an die Autokorrelationsfunktion angepaßten Daten an. Für eine monomodale Verteilung sollte der Wert der *baseline* kleiner als 1.005, der Wert des *SOS*-Fehlers kleiner als 5 und zusätzlich die Standardabweichung des Radius kleiner als 30 % sein.

### 4.1.4 Kristallisation der R-ADH-Lb-G37D

In Anlehnung an die bekannten Kristallisationsbedingungen der Wildtyp-R-ADH-Lb und die Versuche einen Komplex zu kristallisieren (Müller et al., 2000) wurde die R-ADH-Lb-G37D sowohl in ihrer Apoform als auch als ternärer Komplex aus Enzym, Substrat und Cofaktor kristallisiert. Dafür wurden systematische Kristallisationsexperimente mit den kleinen (hydrophoben) Fällungsmitteln MPD, PEG 400 und PEGMME 550 durchgeführt.

Für die Kristallisation wurde die *sitting-drop*-Variante der Dampfdiffusionsmethode angewendet. Dabei wurden 4 µl Proteinlösung mit 4 µl Reservoirlösung versetzt. Die Konzentration der Proteinlösung betrug 21 mg/ml. Der Puffer der Proteinstammlösung enthielt 20 mM Triethanolamin (pH = 7.0) und 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 150 mM NaCl. Für die Kristallisation wurden die genannten Fällungsmittel mit variierenden Konzentrationen (10-60 %) bei unterschiedlichen pH-Werten (6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) und verschiedenen Temperaturen (12°C, 20°C) verwendet.

Der Versuch der Kristallisation eines ternären Komplexes der Wildtyp R-ADH-Lb mit dem oxidiertem Substrat Acetophenon und dem oxidiertem Cofaktor NAD verlief bisher nicht zufriedenstellend (Müller, 2000). Daher wurden bei Versuchen den ternären Komplex zu kristallisieren dem Tropfen 25 mM des reduzierten Substrats R,S-Phenylethanol und 50 mM des oxidierten oder reduzierten Cofaktors NAD bzw. NADH zugesetzt. Dabei konnten in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Reservoirlösung die Präzipitation und Phasentrennung

der Protein- und der Reservoirlösung, die Bildung von Quasikristallen und der Übergang zur Kristallbildung sowie verschiedene Kristallformen beobachtet werden (Abbildung 4.5).

Hierbei konnte die R-ADH-Lb-G37D als Plättchen, Nadel, Nadelbüschel und Einkristall mit dreidimensionaler Ausrichtung innerhalb eines Zeitraumes von 6 Stunden bis 1 Woche kristallisiert werden. Die für eine Diffraktionsmessung verwendbaren Einkristalle besaßen eine durchschnittliche Größe von 0.5 x 0.2 x 0.2 mm und eine maximale Größe von 1.7 x 0.5 x 0.4 mm.

Die Bedingungen unter denen das Apoenzym und der ternäre Komplex der R-ADH-Lb-G37D reproduzierbar kristallisiert werden konnten, sind in Tabelle 4.2 dargestellt. Dabei zeigte sich, daß das Apoenzym mit MPD, PEG 400 und PEGMME 550 kristallisiert werden konnte. Bei der Verwendung von MPD entstanden aber nur zweidimensional gewachsene Kristallnadeln, im Gegensatz zu der Verwendung von PEG 400 und PEGMME 550, die auch zu dreidimensional gewachsenen Einkristallen führte.

Die Verwendung von MPD führte bei der Kristallisation des ternären Komplexes nur zur Präzipitation und zu keiner Kristallisation der R-ADH-Lb-G37D. Die erfolgreiche Kristallisation des ternären Komplexes gelang mit PEG 400 und PEGMME 550. Wurde dabei der oxidierte Cofaktor NAD eingesetzt, kam es zunächst zu einer starken Präzipitatbildung im Tropfen und später zum Kristallwachstum innerhalb des Präzipitats. Bei der Verwendung des reduzierten Cofaktors NADH blieb der Tropfen zunächst klar und erst nach einiger Zeit erfolgte das Kristallwachstum. Die Präzipitatbildung ist wahrscheinlich die Folge der Reaktion zwischen Enzym, reduziertem Substrat und oxidiertem Cofaktor.

Die optimalen Kristallisationsbedingungen für den ternären Komplex waren wie folgt:

- 35 % PEG 400 + 0.1 M HEPES/NaOH (pH = 7.0) + 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
+ 50 mM Phenylethanol + 25 mM NADH/NAD
  
- 25 % PEGMME 550 + 0.1 M HEPES/NaOH (pH = 6.5-7.0) + 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
+ 50 mM Phenylethanol + 25 mM NADH/NAD

## a) Apoenzym

Fällungsmittel	Puffer	pH-Wert	Additiv
40-60 % MPD	0.1 M HEPES/NaOH	6.5-8.0	50 mM MgCl <sub>2</sub>
20-40 % PEG 400	0.1 M HEPES/NaOH 0.1 M Tris/HCl	7.0-7.5 8.0-8.5	50 mM MgCl <sub>2</sub>
15-25 % PEGMME 550	0.1 M HEPES/NaOH 0.1 M Tris/HCl	6.5-7.5 8.0-9.0	50 mM MgCl <sub>2</sub>

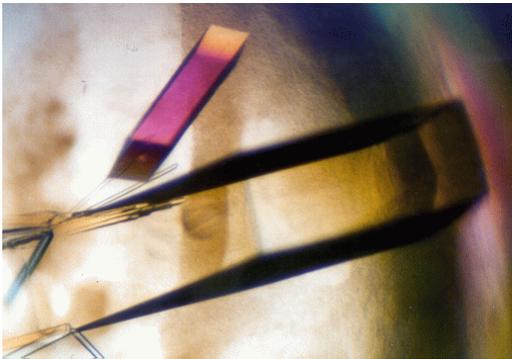
## b) ternärer Komplex

Fällungsmittel	Puffer	pH-Wert	Additive
30-45 % PEG 400	0.1 M HEPES/NaOH 0.1 M Tris/HCl	6.5-7.5 8.0	50 mM MgCl <sub>2</sub> + 50 mM Phenylethanol + 25 mM NADH bzw. NAD
15-40 % PEGMME 550	0.1 M HEPES/NaOH 0.1 M Tris/HCl	6.5-7.5 8.0	50 mM MgCl <sub>2</sub> + 50 mM Phenylethanol + 25 mM NADH bzw. NAD

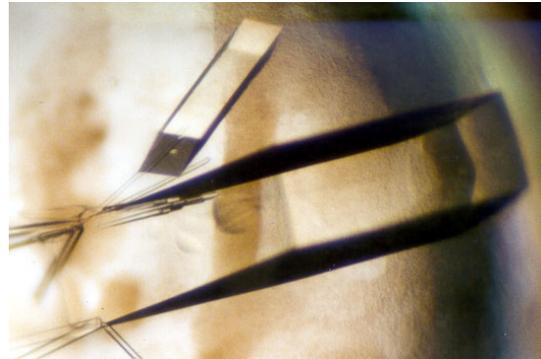
**Tabelle 4.2:** Erfolgreiche Kristallisationsbedingungen der R-ADH-Lb-G37D in der Apoform (a) und als ternärer Komplex mit Substrat und Cofaktor (b).

a) Einkristalle (mit Polarisationsfilter)

1.7 x 0.5 x 0.4 mm und 0.6 x 0.2 x 0.2 mm

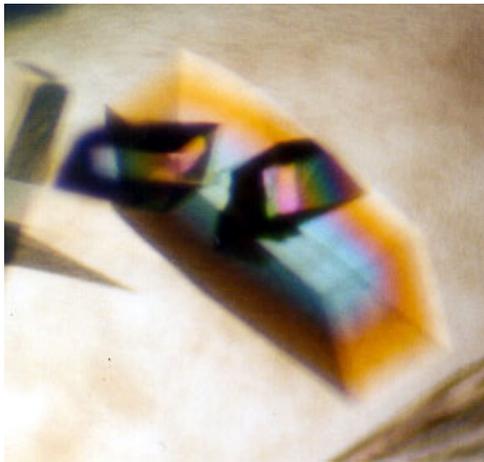


b) Einkristalle (ohne Polarisationsfilter)



c) Einkristall

0.5 x 0.2 x 0.2 mm

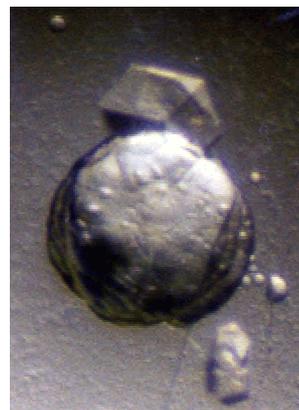


d) Einkristall

0.5 x 0.1 x 0.05 mm



e) Übergang zwischen Phasentrennung und Kristallbildung



f) mit Kristallbündeln verwachsener Einkristall



g) Nadelkristalle

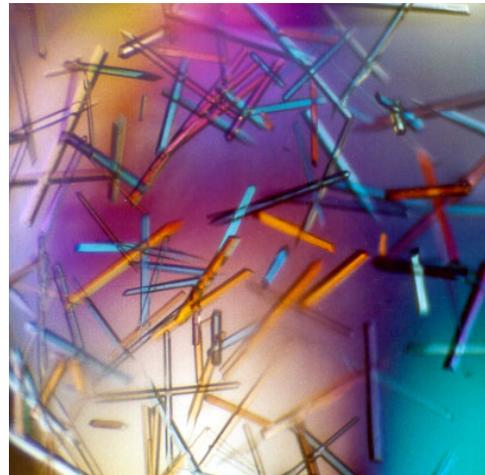


Abbildung 4.5: Kristalle des ternären Komplexes der R-ADH-Lb-G37D.

## 4.1.5 Röntgendiffraktometrie

Es wurden Kristalle, die unter folgenden Bedingungen gewachsen waren, für die Aufnahme von Datensätzen verwendet:

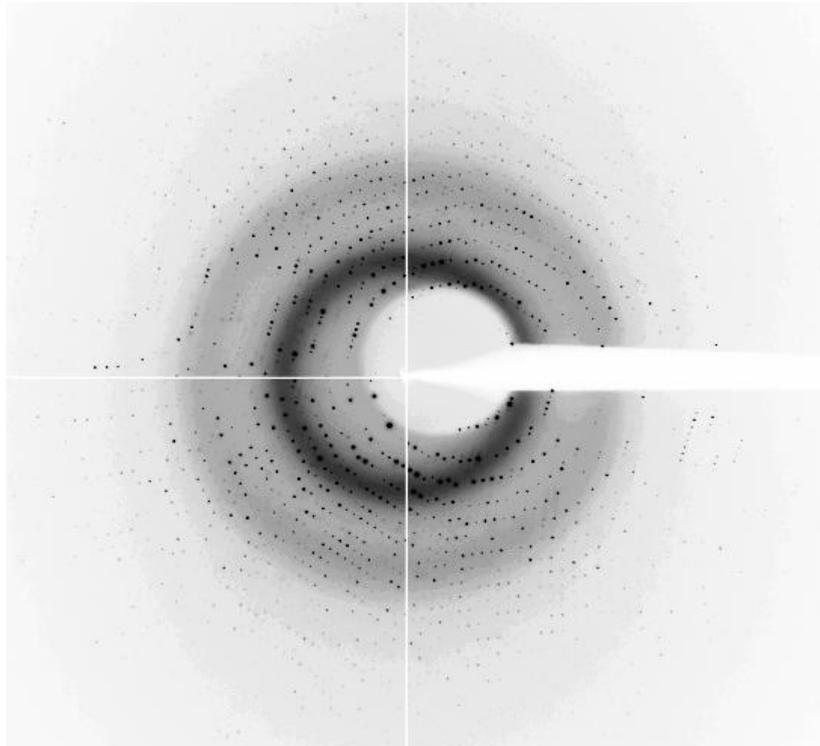
- & nativer Kristall:  
40 % MPD + 50 mM CaCl<sub>2</sub> + 100 mM HEPES (pH = 7.0)
- & ternärer Komplex:  
C35 % PEG 400 + 50 mM MgCl<sub>2</sub> + 100 mM HEPES (pH = 7.0)  
+ 50 mM Phenylethanol + 25 mM NAD  
C35 % PEG 400 + 50 mM MgCl<sub>2</sub> + 100 mM HEPES (pH = 7.0)  
+ 50 mM Phenylethanol + 25 mM NADH  
C25 % PEGMME 550 + 50 mM MgCl<sub>2</sub> + 100 mM HEPES (pH = 7.0)  
+ 50 mM Phenylethanol + 25 mM NAD  
C25 % PEGMME 550 + 50 mM MgCl<sub>2</sub> + 100 mM HEPES (pH = 6.5)  
+ 50 mM Phenylethanol + 25 mM NADH

Für die Diffraktionsmessungen war es sinnvoll und wünschenswert Cryobedingungen zu finden, um Tieftemperaturmessungen durchzuführen. Die aufgeführten Kristallisationsbedingungen enthielten jeweils schon ein Frostschutzmittel, welches zur Verhinderung von Eisringbildung geeignet war. Lediglich beim Fällungsmittel PEGMME 550 reichte die Konzentration von 25 % nicht zur Verhinderung von Eisringbildung aus, so daß die Konzentration des PEGMME 550 sukzessive von 25 % auf 40 % erhöht wurde, indem die Reservoirlösung täglich ausgetauscht wurde.

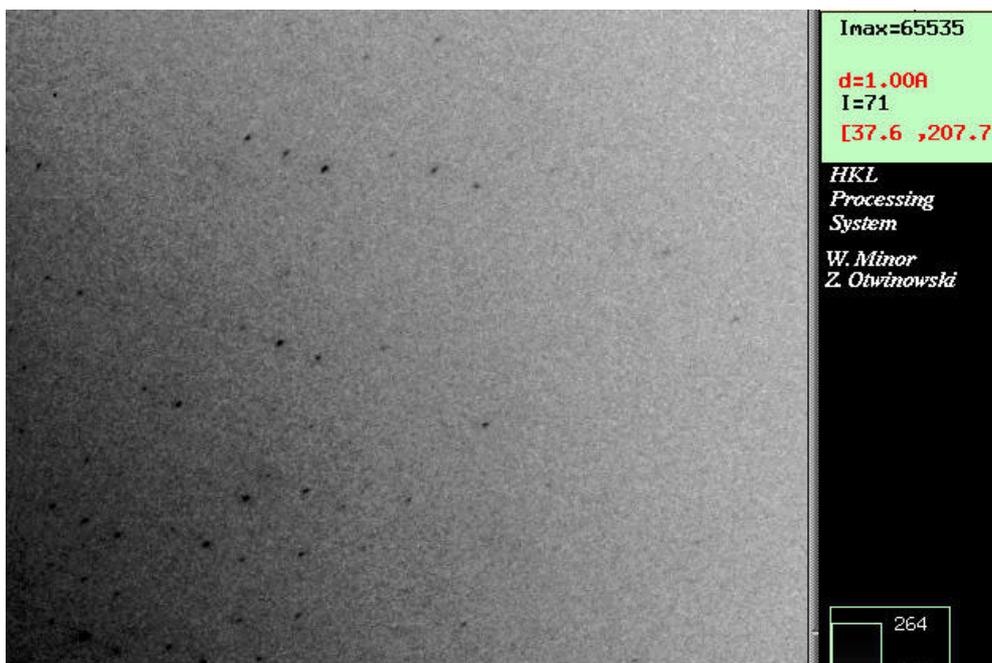
Alle Messungen wurden unter Stickstoffkühlung als Tieftemperaturdatensätze bei 100 K aufgenommen. Ein erster Testdatensatz der nativen R-ADH-Lb-G37D wurde mit einem vom Kooperationspartner hergestelltem Kristallplättchen (Größe: 0.35 x 0.45 x 0.01 mm) an der hauseigenen Drehanode gemessen.

Alle weiteren Datensätze wurden mit Einkristallen der nach dem neuen Protokoll gereinigten und kristallisierten R-ADH-Lb-G37D durchgeführt. Dabei wurden mit vier unterschiedlichen Kristallen vier Datensätze des ternären Komplexes aus Enzym, Substrat und Cofaktor aufgenommen. Zwei Messungen erfolgten an einer Drehanode der Fa. Nonius und einer MacScience Bildspeicherplatte mit der im Institut befindlichen Röntgenanlage.

Zwei hochauflösenden Datensätze wurden am *European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)* in Grenoble mit Synchrotronstrahlung ( $\lambda = 0.9155 \text{ \AA}$ ) unter Verwendung eines *ADSC Quantum 210* CCD-Detektors an der *beamline* ID 29 aufgenommen. Das Bild einer hochaufgelösten Beugungsaufnahme ist in Abbildungen 4.6 und 4.7 dargestellt.



**Abbildung 4.6:** Hochaufgelöste Beugungsaufnahme eines innenzentriert orthorhombischen Kristalls des R-ADH-Lb-G37D-Komplexes. Die Daten wurden am *ESRF* mit Synchrotronstrahlung ( $\lambda = 0.9155 \text{ \AA}$ ) unter Verwendung eines *ADSC Quantum 210* CCD-Detektors aufgenommen. Meßbedingungen: Temperatur: 100 K, Kristall-Detektor-Abstand: 87 mm, Drehung pro Aufnahme:  $0.5^\circ$ , Belichtungszeit pro Aufnahme: 0.5 sec.



**Abbildung 4.7:** Ausschnitt der hochaufgelösten Beugungsaufnahme von  $1.05 \text{ \AA}$  (links) bis  $0.98 \text{ \AA}$  (rechts).

Die bei der Röntgenmessung erhaltenen Daten wurden mit XDISPLAY F, DENZO und SCALEPACK aus dem HKL-Software-Paket (Otwinowski und Minor, 1997) und weiteren Programmen aus dem CCP4-Paket (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) prozessiert. Dabei wurden die Daten zunächst mit DENZO indiziert und integriert und anschließend mit SCALEPACK skaliert.

Das vom Kooperationspartner hergestellte Kristallplättchen des Apoenzyms kristallisierte in der primitiv triklinen Raumgruppe  $P1$  mit den folgenden Gitterparametern:

Kristallsystem: primitiv triklin ( $P1$ )  
Gitterkonstanten:  $a = 62.63 \text{ \AA}$ ,  $b = 72.23 \text{ \AA}$ ,  $c = 118.09 \text{ \AA}$   
 $\alpha = 101.41^\circ$ ,  $\beta = 92.77^\circ$ ,  $\gamma = 114.48^\circ$

Die Kristalle des ternären Komplexes kristallisierten in der innenzentriert orthorhombischen Raumgruppe  $I222$  mit folgenden Gitterparametern:

Kristallsystem: innenzentriert orthorhombisch ( $I222$ )  
Gitterkonstanten:  $a = 55.73 \pm 0.13 \text{ \AA}$ ,  $b = 79.76 \pm 0.09 \text{ \AA}$ ,  $c = 112.85 \pm 0.13 \text{ \AA}$   
 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

Die Statistiken der verschiedenen Datensätze der Kristalle der R-ADH-Lb-G37D sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

Der Testdatensatz des Apoenzyms konnte in der höchsten Auflösungsschale bis zur einer Auflösung von  $2.2 \text{ \AA}$  mit einem  $R_{\text{sym}}$ -Wert von 33.1 % und einem Signal-Rausch-Verhältnis ( $I/\sigma_I$ ) von 1.9 ausgewertet werden. Die Mosaizität betrug  $0.8^\circ$ .

Die Datensätze des ternären Komplexes konnten in der höchsten Auflösungsschale bis zur einer Auflösung von 1.78, 1.55, 1.10 bzw.  $1.05 \text{ \AA}$  mit einem  $R_{\text{sym}}$ -Wert von 39.7, 55.1, 19.0 bzw. 19.8 % und einem Signal-Rausch-Verhältnis ( $I/\sigma_I$ ) von 4.3, 1.5, 9.4 bzw. 5.2 ausgewertet werden. Die Mosaizität betrug jeweils 0.26, 0.31, 0.28 bzw.  $0.24^\circ$ .

Das Streuvermögen der im Strahl äußerst stabilen Kristalle war bei den hochauflösenden Aufnahmen noch nicht ausgeschöpft, da in der letzten Schale von  $1.14\text{-}1.10 \text{ \AA}$  bzw.  $1.09\text{-}1.05 \text{ \AA}$  das Signal-Rausch-Verhältnis noch über 9 bzw. 5 lag. Es wäre also durchaus möglich noch höher aufgelöste Datensätze aufzunehmen.

Bei der Aufnahme der hochauflösenden Datensätze am *ESRF* kam es zu einer Überladung der Reflexe im niedrigauflösendem Bereich, die dennoch sinnvoll ausgewertet werden konnten. Leider betrug die Vollständigkeit der niedrigauflösenden Schale von  $99\text{-}2.37 \text{ \AA}$  bzw.  $99\text{-}2.26 \text{ \AA}$  nur 75.0 % bzw. 67.7 %. Es wäre daher sinnvoll gewesen noch einen niedrigauflösenden Datensatz am *ESRF* zu messen. Aufgrund der begrenzten Meßzeit war dies aber leider nicht möglich.

Raumgruppe	Apoenzym	ternärer Komplex	ternärer Komplex	ternärer Komplex	ternärer Komplex
	<i>P1</i>	<i>I</i> 222	<i>I</i> 222	<i>I</i> 222	<i>I</i> 222
Zellkonstanten	a=62.63 Å b=72.23 Å c=118.09 Å $\alpha=101.4^\circ$ , $\beta=92.8^\circ$ , $\gamma=114.9^\circ$	a=55.85 Å b=79.81 Å c=112.62 Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=55.66Å b=79.75 Å c=112.95 Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=55.56 Å b=79.75 Å c=112.91 Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=55.86 Å b=79.85 Å c=112.92 Å $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Anzahl Monomere in AU	8	1	1	1	1
Wellenlänge [Å]	1.5418	1.5418	1.5418	0.9155	0.9155
Anzahl der Observationen	130 010	180 781	168 792	481 116	422 955
Anzahl der Observationen (I/ $\sigma$ \$I)	94 048	180 499	167 154	473 230	416 339
Anzahl unabhängiger Reflexe	82 986	23 985	36 295	90 752	108 778
Auflösungsbereich [Å]	65-2.20	99-1.78	99-1.55	99-1.10	99-1.05
Multiplizität	1.6	7.5	4.7	5.3	3.9
Multiplizität (erste Schale, [Å])	1.7 (65-4.74)	8.1 (99-3.83)	6.5 (99-3.34)	4.8 (99-2.37)	3.2 (99-2.26)
Multiplizität (letzte Schale, [Å])	1.5 (2.28-2.20)	6.3 (1.84-1.78)	2.2 (1.61-1.55)	5.3 (1.14-1.10)	3.2 (1.09-1.05)
I / $\sigma$	5.8	18.6	22.5	28.7	21.1
I / $\sigma$ (erste Schale)	10.9	26.5	38.8	32.8	21.8
I / $\sigma$ (letzte Schale)	1.9	4.3	1.5	9.4	5.2
Vollständigkeit [%]	89.1	97.7	98.5	89.0	93.8
Vollständigkeit [%] (erste Schale)	80.9	99.6	99.8	75.0	67.7
Vollständigkeit [%] (letzte Schale)	87.7	92.2	86.3	88.5	91.1
R <sub>sym</sub> [%]	10.4	10.1	6.0	5.2	5.6
R <sub>sym</sub> [%] (erste Schale)	5.1	6.6	4.6	3.9	4.5
R <sub>sym</sub> [%] (letzte Schale)	33.1	39.7	55.1	19.0	19.8

**Tabelle 4.3:** Statistiken der verschiedenen Datensätze des Apoenzym und der ternären Komplexe der R-ADH-Lb-G37D.

## 4.1.6 Untersuchungen der Kristallpackung

Die Berechnung der Packungsdichte wurde mit dem Programm MATTHEWS\_COEF (CCP4, 1994; Matthews, 1968) für die fünf Datensätze durchgeführt. Für die vier Datensätze des ternären Komplexes wurde die gefundene Raumgruppe *I*222 verwendet. Unter der Annahme, daß sich ein Monomer in der asymmetrischen Einheit und somit ein Tetramer in der Elementarzelle befindet, ergab sich mit einer berechneten Proteindichte von 1.34 % für die Packungsdichte der Kristallpackung ein  $V_M$ -Wert von  $2.35 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  und ein Lösemittelanteil von 47 %.

Für die Berechnung der Packungsdichte der in der Raumgruppe *P*1 kristallisierten R-ADH-Lb-G37D wurde von einem oder mehreren Tetrameren in der asymmetrischen Einheit ausgegangen, da die R-ADH-Lb-G37D in ihrer biologisch aktiven Form als Tetramer vorliegt. Mit einer berechneten Proteindichte von 1.34 % und unter der Annahme, daß sich ein bzw. zwei bzw. drei Tetramere in der asymmetrischen Einheit befinden, ergaben sich für die Packungsdichte der Kristallpackung die  $V_M$ -Werte  $4.42$  bzw.  $2.21$  bzw.  $1.47 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  und Lösemittelanteile von 71.9 bzw. 43.9 bzw. 15.9 %. Aus diesen Werten läßt sich ableiten, daß zwei Tetramere pro asymmetrischer Einheit die sinnvollste Lösung zu sein scheint.

## 4.1.7 Rechnungen zur Selbstrotationsfunktion

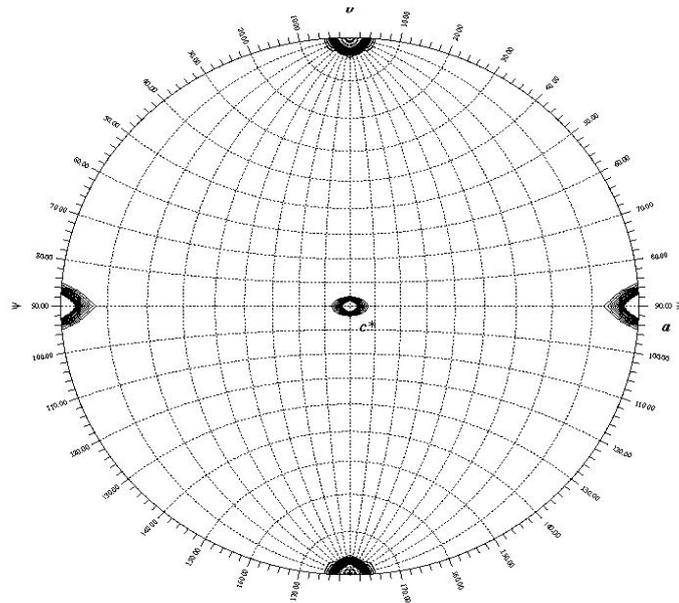
Für die weitere Auswertung der Röntgendaten ist es sehr hilfreich, die Symmetrieoperationen innerhalb der Elementarzelle (kristallographische Symmetrie) und innerhalb der asymmetrischen Einheit (nicht-kristallographische Symmetrie, NCS) zu kennen. Um die NCS zu ermitteln wurden mit GLRF (Tong & Rossmann, 1997) Selbstrotationsfunktionen berechnet. Für den in der Raumgruppe *I*222 kristallisierten Komplex der R-ADH-Lb-G37D bestätigte sich, daß nur ein Monomer in der asymmetrischen Einheit und damit ein Tetramer in der Elementarzelle vorliegt, da bei  $\kappa = 180^\circ$  nur die drei zweizähligen kristallographischen Achsen gefunden wurden.

Bei den Untersuchungen der in der Raumgruppe *P*1 kristallisierten R-ADH-Lb-G37D wurden unter Verwendung von Daten zwischen 20 bis  $4 \text{ \AA}$  bei  $\kappa = 180^\circ$  sieben zweizählige NCS-Achsen gefunden. Neben einer hervorstechenden Achse, die dreimal stärker war als die nächstschwächere, hatten zweimal jeweils drei weitere NCS-Achsen untereinander einen Abstand von  $90^\circ$ . Diese drei Achsen im Abstand von  $90^\circ$  stellen jeweils die Überführung der vier einzelnen Monomere innerhalb eines Tetramers ineinander dar. Dies steht im Einklang mit der Vermutung, daß zwei Tetramere in der asymmetrischen Einheit vorhanden sind. Die hervorstechende Achse stellt nun die Überführung des ersten Tetramers in das zweite Tetramer dar und ist überraschenderweise ebenfalls eine zweizählige Achse.

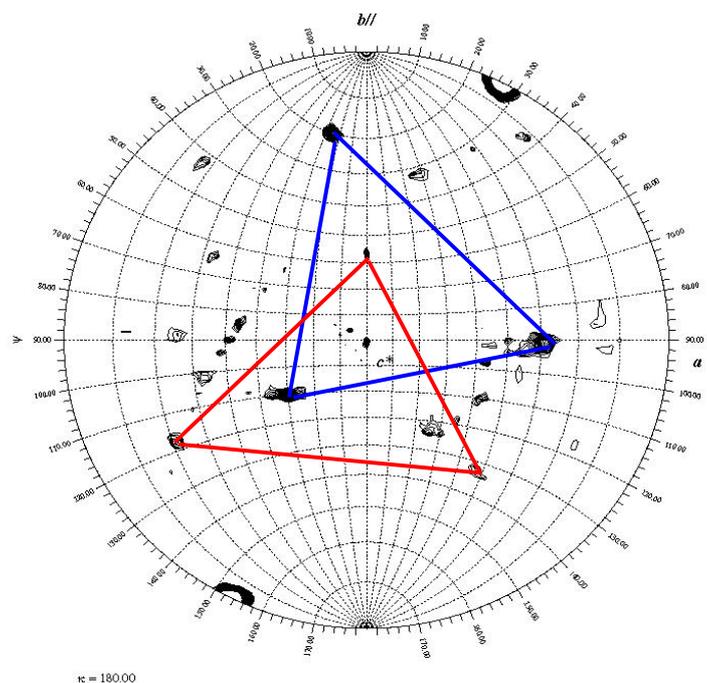
Weitere Peaks wurden bei  $\kappa = 78^\circ$ ,  $118^\circ$ ,  $138^\circ$ ,  $222^\circ$ ,  $242^\circ$ ,  $282^\circ$  gefunden und repräsentieren die Überführung der einzelnen Monomere des ersten Tetramers in die des zweiten Tetramers und umgekehrt. Diese Tatsache konnte durch die bei der Starre-Körper-Verfeinerung (s. Kap. 4.1.9) berechneten NCS-Operatoren bestätigt werden.

Die Karten der Selbstrotationsfunktionen bei  $\kappa = 180^\circ$  sind in Abbildung 4.8 dargestellt.

a) ternärer Komplex (*I222*)



b) Apoenzym (*P1*)



**Abbildung 4.8:** Karten der Selbstrotationsfunktionen bei  $\kappa = 180^\circ$  für den Komplex (*I222*, a) und das Apoenzym (*P1*, b) der R-ADH-Lb-G37D. Es wurden Daten von 20 bis 4 Å für die Berechnung verwendet. Die zwei 222-Systeme sind farbig gekennzeichnet.

## 4.1.8 Rechnungen zum Molekularen Ersatz

Da die Aminosäuresequenzen der R-ADH-Lb-G37D und die der Wildtyp-R-ADH-Lb praktisch identisch sind, wurde die R-ADH-Lb als Suchmodell für die Strukturlösung der in der Raumgruppe *P1* kristallisierten R-ADH-Lb-G37D verwendet.

Für die Strukturlösung der in der Raumgruppe *I222* kristallisierten R-ADH-Lb-G37D-Komplexe wurden die Kreuzrotations- und Translationsrechnungen nicht durchgeführt und die Koordinaten der ebenfalls in der Raumgruppe *I222* kristallisierten Wildtyp-R-ADH-Lb (Müller, 2000) sofort im ersten Verfeinerungsschritt verwendet.

### 4.1.8.1 Kreuzrotationsrechnungen

Die Kreuzrotationslösung wurde mit AMORE (CCP4, 1994) berechnet. Die Suche wurde in einem Auflösungsbereich von 20 bis 5 Å durchgeführt. Die Suche ergab für die Abbildung des einen Tetramers der R-ADH-Lb auf die beiden Tetramere der R-ADH-Lb-G37D innerhalb der asymmetrischen Einheit jeweils vier Lösungen, die untereinander ähnlich gut waren.

Für die Abbildung des Tetramers der R-ADH-Lb auf das erste Tetramer der R-ADH-Lb-G37D lieferte die Suche eine Lösung mit einem R-Wert von 49.4 % und einem Korrelationskoeffizienten von 33.5 sowie den Rotationswinkeln  $\theta_1 = 178.38^\circ$ ,  $\theta_2 = 60.51^\circ$  und  $\theta_3 = 21.09^\circ$ . Für die Abbildung des Tetramers der R-ADH-Lb auf das zweite Tetramer der R-ADH-Lb-G37D lieferte die Suche eine Lösung mit einem R-Wert von 50.9 % und einem Korrelationskoeffizienten von 31.0 sowie den Rotationswinkeln  $\theta_1 = 308.49^\circ$ ,  $\theta_2 = 118.36^\circ$  und  $\theta_3 = 19.83^\circ$ .

### 4.1.8.2 Translationsrechnungen

Ausgehend von der höchsten Lösung der Rotationssuche des ersten Tetramers wurde nun mit AMORE nach der korrekten Positionierung des Suchmoleküls in der Einheitszelle gesucht. Da die Raumgruppe *P1* keine kristallographischen Symmetrieelemente besitzt, konnte das erste Tetramer in den Ursprung der Elementarzelle positioniert werden.

Für das zweite Tetramer der R-ADH-Lb ergab die Translationssuche vier äquivalente, eindeutige Lösungen mit einem R-Wert von 37.0 % und einem Korrelationskoeffizienten von 62.7 sowie den Translationsvektoren  $x = 0.0214 \text{ \AA}$ ,  $y = 0.4814 \text{ \AA}$  und  $z = 0.4833 \text{ \AA}$ . Erwartungsgemäß lieferte erst die Abbildung auf das zweite Tetramer eine deutliche Erhöhung des Korrelationskoeffizienten und eine starke Verringerung des R-Wertes.

Im Anschluß wurde mit AMORE eine Starre-Körper-Verfeinerung durchgeführt, aus der sich für die kombinierten Rotations- und Translationslösungen folgender Werte ergaben:

Für das erste Tetramer wurden Rotationswinkel von  $\theta_1 = 178.64^\circ$ ,  $\theta_2 = 60.72^\circ$  und  $\theta_3 = 20.51^\circ$  sowie Translationsvektoren von  $x = 0.9972 \text{ \AA}$ ,  $y = 0.0093 \text{ \AA}$  und  $z = 0 \text{ \AA}$  berechnet.

Für das zweite Tetramer wurden Rotationswinkeln von  $\theta_1 = 308.99^\circ$ ,  $\theta_2 = 118.60^\circ$  und  $\theta_3 = 20.72^\circ$  sowie Translationsvektoren von  $x = 0.0174 \text{ \AA}$ ,  $y = 0.4866 \text{ \AA}$  und  $z = 0.4818 \text{ \AA}$  berechnet. Der berechnete R-Wert lag mit 34.6 % deutlich unter 50 % und der Korrelationskoeffizient mit 70.5 in der Nähe des Maximalwertes 100.

### 4.1.9 Strukturverfeinerung

Die Strukturverfeinerung des Apoenzym und der ternären Komplexe wurde in mehreren Schritten alternierend mit den Programmen O und CNS\_SOLVE / REFMAC durchgeführt. Die Darstellung der Struktur und der Elektronendichte am Bildschirm sowie die manuelle Strukturmodifikation erfolgte dabei mit O. Eine Übersicht über die einzelnen Schritte der Strukturverfeinerungen der fünf verschiedenen Datensätze ist in den Tabellen 4.4-4.8 dargestellt.

Bei den ausschließlich mit CNS\_SOLVE durchgeführten Verfeinerungen der in der Raumgruppe *P1* kristallisierten R-ADH-Lb-G37D wurde für das durch die kombinierten Rotations- und Translationsberechnungen positionierte Suchmodell zunächst eine Starre-Körper-Verfeinerung (*rigid-body-refinement*) durchgeführt, bei der alle acht Monomere der beiden Tetramere als feste Einheiten behandelt wurden. Anschließend wurden die Symmetrieeoperatoren berechnet, mit denen die einzelnen Monomere aufeinander abgebildet werden. Dabei wurde die maximale Auflösung zunächst auf 3 Å begrenzt.

Die schon bei der Selbstrotationsfunktion (s. Kap. 4.1.7) berechneten NCS-Operatoren bei  $\kappa = 78^\circ$ ,  $118^\circ$ ,  $138^\circ$ ,  $180^\circ$ ,  $222^\circ$ ,  $242^\circ$  und  $282^\circ$ , welche die Überführung der einzelnen Monomere des ersten Tetramers in die des zweiten Tetramers und umgekehrt darstellen, konnten bei dieser Rechnung wiedergefunden werden.

Durch die nun bekannten NCS-Operatoren konnten die folgenden Verfeinerungszyklen zunächst nur mit den Daten von einem Monomer durchgeführt werden. Um aus lokalen Energieminima herauszukommen, wurde vor der Minimierung ein *simulated annealing* mit Moleküldynamik beginnend bei 3000 K durchgeführt. Bei diesen Verfeinerungszyklen wurden die höheraufgelösten Reflexe bis 2.2 Å miteinbezogen. Nach dem ersten Verfeinerungszyklus wurde an der Position 37 die Aminosäure Glycin gegen Aspartat ausgetauscht, so daß die richtige Aminosäuresequenz der R-ADH-Lb-G37D vorlag. Mit der mutierten Struktur wurden die weiteren Verfeinerungsschritte durchgeführt. Diese bestanden aus dem Modellbau innerhalb der Struktur der R-ADH-Lb-G37D sowie dem Einbau von Wassermolekülen und Metallionen.

Die Strukturverfeinerung der in der Raumgruppe *I222* kristallisierten ternären Komplexe der R-ADH-Lb-G37D wurden zunächst mit CNS\_SOLVE und später mit REFMAC durchgeführt. Im ersten Verfeinerungsschritt wurden sofort die bekannten Koordinaten der Wildtyp-R-ADH-Lb verwendet und eine Energieminimierung einschließlich eines *simulated annealing* mit Moleküldynamik durchgeführt. Hierbei wurden direkt die höheraufgelösten Reflexe bis 1.78 Å,

1.55 Å, 1.10 Å bzw. 1.05 Å miteinbezogen. Nach dem ersten Verfeinerungszyklus wurde an der Position 37 die Aminosäure Glycin gegen Aspartat ausgetauscht, so daß die richtige Aminosäuresequenz der R-ADH-Lb-G37D vorlag. Mit der mutierten Struktur wurden die weiteren Verfeinerungsschritte durchgeführt. Diese bestanden aus dem Modellbau innerhalb der Struktur der R-ADH-Lb-G37D, dem Einbau von Wassermolekülen, Metallionen und multiplen Konformationen sowie dem Einbau des Substrats und des Cofaktors.

Am Ende der Verfeinerung wurden bei den Datensätzen bis zu einer Auflösung von 1.78 Å und 1.55 Å die Besetzungsfaktoren für das Substrat, den Cofaktor und die multiplen Konformationen mit den CNS-Skripten *qgroup* und *bindividual* angepaßt. Die Verfeinerung der Struktur erwies sich als recht problemlos, da in allen aus den vier Datensätzen abgeleiteten Strukturen die 2foc-Elektronendichte für die meisten Residuen wohldefiniert war.

Schritt	Verfeinerungsparameter	Programm	Anzahl vollständig besetzter Wassermoleküle	Anzahl halbbesetzter Wassermoleküle *	Anzahl weiterer Atome	R <sub>work</sub> [%]	R <sub>free</sub> [%]
1	Starre-Körper-Verfeinerung	CNS_SOLVE	0	0	0	35.0	34.3
2	Anpassungen in O	CNS_SOLVE	0	0	0	27.8	28.5
3	Einbau der Mutation	CNS_SOLVE	0	0	0	27.5	28.4
4	Anpassungen in O **	CNS_SOLVE	0	0	0	27.3	28.3
5	Wassersuche, Einbau von Mg <sup>2+</sup>	CNS_SOLVE	121	2	1 (Mg <sup>2+</sup> )***)	25.8	26.4
6	Erzeugung der zwei Tetramere ****	CNS_SOLVE	931	8	4 (Mg <sup>2+</sup> )***)	22.0	24.9

**Tabelle 4.4:** Darstellung der wichtigsten Schritte der Strukturverfeinerung des in der Raumgruppe P1 kristallisierten R-ADH-Lb-G37D-Apoenzym bei einer Auflösung von 2.2 Å. Alle mit CNS\_SOLVE durchgeführten Verfeinerungsschritte wurden mit einer Energieminimierung einschließlich *simulated annealing* und Moleküldynamik durchgeführt.

\* Die Wassermoleküle befinden sich auf speziellen Lagen im Kristallgitter.

\*\* Dieser Verfeinerungsschritt erfolgte ohne ein *simulated annealing*.

\*\*\* Das Mg<sup>2+</sup>-Ion befindet sich auf einer speziellen Lage und ist halbbesetzt.

\*\*\*\* Bei diesem Verfeinerungsschritt wurden die Bereiche von Aminosäure 35-46 und 185-210, die zuvor mit *constraints* und *restraints* verfeinert wurden, aus den NCS-*restraints* herausgenommen.

Schritt	Verfeinerungsparameter	Programm	Anzahl vollständig besetzter Wassermoleküle	Anzahl halbbesetzter Wassermoleküle *	Anzahl weiterer Atome	R <sub>work</sub> [%]	R <sub>free</sub> [%]
0	Start	CNS_SOLVE	0	0	0	37.1	37.5
1	Strukturzeugung	CNS_SOLVE	0	0	0	26.9	28.2
2	Einbau der Mutation, Anpassungen in O	CNS_SOLVE	0	0	0	26.3	26.8
3	Wassersuche	CNS_SOLVE	190	0	0	21.9	22.0
4	Wassersuche, Einbau von Mg <sup>2+</sup> **	CNS_SOLVE	190	2	1 (Mg <sup>2+</sup> ***)	20.0	20.7
5	Wassersuche, Einbau von Acetophenon	CNS_SOLVE	328	3	1 / 9	17.7	18.6
6	Einbau von NAD	CNS_SOLVE	328	4	1 / 9 / 44	17.9	18.1
7	Anpassungen in O	REFMAC	390	11	1 / 9 / 44	14.9	17.3
8	Änderung der Besetzungsfaktoren ****	REFMAC	390	11	1 / 9 / 44	14.8	17.1

**Tabelle 4.5:** Darstellung der wichtigsten Schritte der Strukturverfeinerung des ternären Komplexes aus R-ADH-Lb-G37D, Acetophenon und NAD bei einer Auflösung von 1.78 Å. Alle mit CNS\_SOLVE durchgeführten Verfeinerungsschritte wurden mit einer Energieminimierung einschließlich *simulated annealing* und Moleküldynamik durchgeführt.

\* Die Wassermoleküle befinden sich auf speziellen Lagen im Kristallgitter.

\*\* Der Testdatensatz wurde von 1 % auf 4 % erhöht.

\*\*\* Das Mg<sup>2+</sup>-Ion befindet sich auf einer speziellen Lage und ist halbbesetzt.

\*\*\*\* Die Besetzungsfaktoren für NAD wurden auf 0.68 gesetzt.

Schritt	Verfeinerungsparameter	Programm	Anzahl vollständig besetzter Wassermoleküle	Anzahl halbbesetzter * Wassermoleküle	Anzahl weiterer Atome	R <sub>work</sub> [%]	R <sub>free</sub> [%]
0	Start	CNS_SOLVE	0	0	0	37.0	37.9
1	Strukturzeugung	CNS_SOLVE	0	0	0	28.5	30.3
2	Einbau Mutation + Mg <sup>2+</sup> , Anpassungen in O	CNS_SOLVE	0	0	1 (Mg <sup>2+</sup> )**	27.1	28.5
3	Wassersuche	CNS_SOLVE	199	2	1 (Mg <sup>2+</sup> )**	22.5	23.8
4	Wassersuche, Einbau Phenylethanol+NADH	CNS_SOLVE	223	2	1 / 9 / 44	21.9	22.8
5	Wassersuche, Anpassungen in O	CNS_SOLVE	343	3	1 / 9 / 44	20.9	22.2
6	Einbau alternativer Konformationen	CNS_SOLVE	392	6	1 / 9 / 44	19.4	21.4
7	Anpassungen in O	REFMAC <sup>a</sup>	392	6	1 / 9 / 44	16.9	19.1
8	Anpassungen in O	REFMAC <sup>b</sup>	406	10	1 / 9 / 44	16.1	18.5
9	Einbau alternativer Konformationen	REFMAC <sup>b</sup>	406	10	1 / 9 / 44	15.8	18.5
10	Anpassungen in O	REFMAC <sup>b</sup>	406	10	1 / 9 / 44	15.8	18.2
11	Anpassungen in O	REFMAC <sup>a</sup>	406	10	1 / 9 / 44	14.6	17.4
12	Änderung der Besetzungsfaktoren ***	REFMAC <sup>a</sup>	406	10	1 / 9 / 44	14.5	17.3

**Tabelle 4.6:** Darstellung der wichtigsten Schritte der Strukturverfeinerung des ternären Komplexes aus R-ADH-Lb-G37D, Phenylethanol und NADH bei einer Auflösung von 1.55 Å. Alle mit CNS\_SOLVE durchgeführten Verfeinerungsschritte wurden mit einer Energieminimierung einschließlich *simulated annealing* und Moleküldynamik durchgeführt.

\* Die Wassermoleküle befinden sich auf speziellen Lagen im Kristallgitter.

\*\* Das Mg<sup>2+</sup>-Ion befindet sich auf einer speziellen Lage und ist halbbesetzt.

\*\*\* NADH: 0.68; Phenylethanol: 0.90; alternative Konformationen: die mit dem Programm *qgroup* berechneten Werte

<sup>a</sup>/<sub>b</sub>

Die Verfeinerung wurde mit isotropen / anisotropen Temperaturfaktoren durchgeführt.

Schritt	Verfeinerungsparameter	Programm	Anzahl vollständig besetzter Wassermoleküle	Anzahl halbbesetzter Wassermoleküle *	Anzahl weiterer Atome	R <sub>work</sub> [%]	R <sub>free</sub> [%]
0	Start	CNS_SOLVE	0	0	0	39.3	39.4
1	Strukturzeugung	CNS_SOLVE	0	0	0	27.0	27.5
2	Einbau der Mutation, Anpassungen in O	CNS_SOLVE	0	0	0	25.4	25.8
3	Wassersuche, Einbau von Mg <sup>2+</sup>	CNS_SOLVE	395	8	1 (Mg <sup>2+</sup> )**	21.5	20.9
4	Einbau von NAD und Phenylethanol	CNS_SOLVE	395	8	1 / 9 / 44	21.5	20.8
5	Anpassungen in O	REFMAC <sup>a</sup>	395	8	1 / 9 / 44	17.6	18.4
6	Anpassungen in O	REFMAC <sup>b</sup>	382	8	1 / 9 / 44	17.0	17.6
7	Einbau alternativer Konformationen	REFMAC <sup>b</sup>	382	8	1 / 9 / 44	15.6	16.7

**Tabelle 4.7:** Darstellung der wichtigsten Schritte der Strukturverfeinerung des ternären Komplexes aus R-ADH-Lb-G37D, Phenylethanol und NADH bei einer Auflösung von 1.10 Å. Alle mit CNS\_SOLVE durchgeführten Verfeinerungsschritte wurden mit einer Energieminimierung einschließlich *simulated annealing* und Moleküldynamik durchgeführt.

\* Die Wassermoleküle befinden sich auf speziellen Lagen im Kristallgitter.

\*\* Das Mg<sup>2+</sup>-Ion befindet sich auf einer speziellen Lage und ist halbbesetzt.

<sup>a</sup>/<sup>b</sup> Die Verfeinerung wurde mit isotropen / anisotropen Temperaturfaktoren durchgeführt.

Schritt	Verfeinerungsparameter	Programm	Anzahl vollständig besetzter Wassermoleküle	Anzahl halbbesetzter Wassermoleküle *	Anzahl weiterer Atome	R <sub>work</sub> [%]	R <sub>free</sub> [%]
0	Start	CNS_SOLVE	0	0	0	41.0	41.5
1	Strukturzeugung	CNS_SOLVE	0	0	0	29.6	30.6
2	Einbau der Mutation, Anpassungen in O	CNS_SOLVE	0	0	0	27.9	28.9
3	Wassersuche, Einbau von Mg <sup>2+</sup>	CNS_SOLVE	395	8	1 (Mg <sup>2+</sup> )**	23.7	24.2
4	Einbau von NAD und Phenylethanol	CNS_SOLVE	395	8	1 / 9 / 44	23.7	24.2
5	Anpassungen in O	REFMAC <sup>a</sup>	395	7	1 / 9 / 44	20.5	21.3
6	Anpassungen in O	REFMAC <sup>b</sup>	390	7	1 / 9 / 44	19.2	19.9
7	Einbau alternativer Konformationen	REFMAC <sup>b</sup>	390	7	1 / 9 / 44	17.8	18.6

**Tabelle 4.8:** Darstellung der wichtigsten Schritte der Strukturverfeinerung des ternären Komplexes aus R-ADH-Lb-G37D, Phenylethanol und NADH bei einer Auflösung von 1.05 Å. Alle mit CNS\_SOLVE durchgeführten Verfeinerungsschritte wurden mit einer Energieminimierung einschließlich *simulated annealing* und Moleküldynamik durchgeführt.

\* Die Wassermoleküle befinden sich auf speziellen Lagen im Kristallgitter.

\*\* Das Mg<sup>2+</sup>-Ion befindet sich auf einer speziellen Lage und ist halbbesetzt.

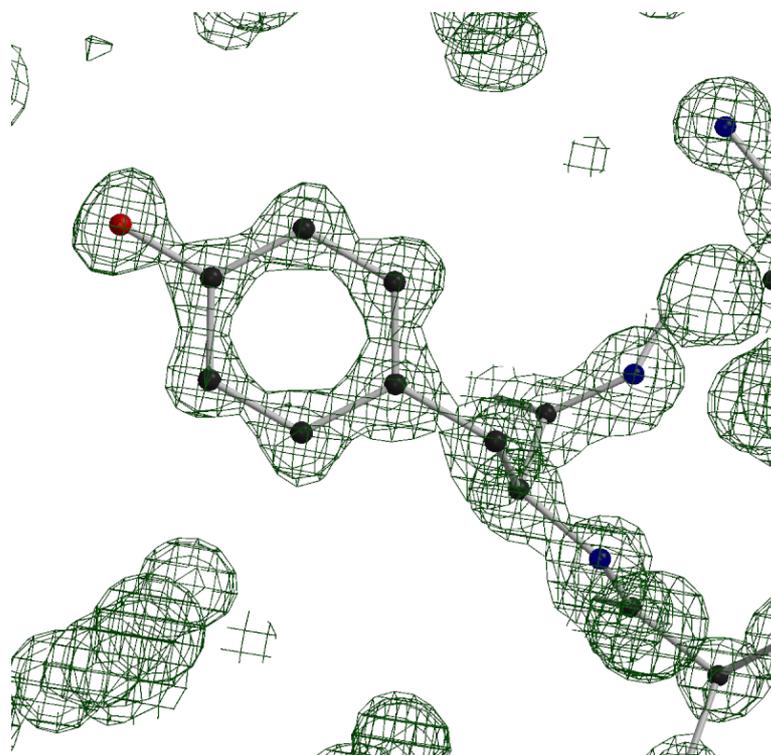
<sup>a</sup>/<sub>b</sub>

Die Verfeinerung wurde mit isotropen / anisotropen Temperaturfaktoren durchgeführt.

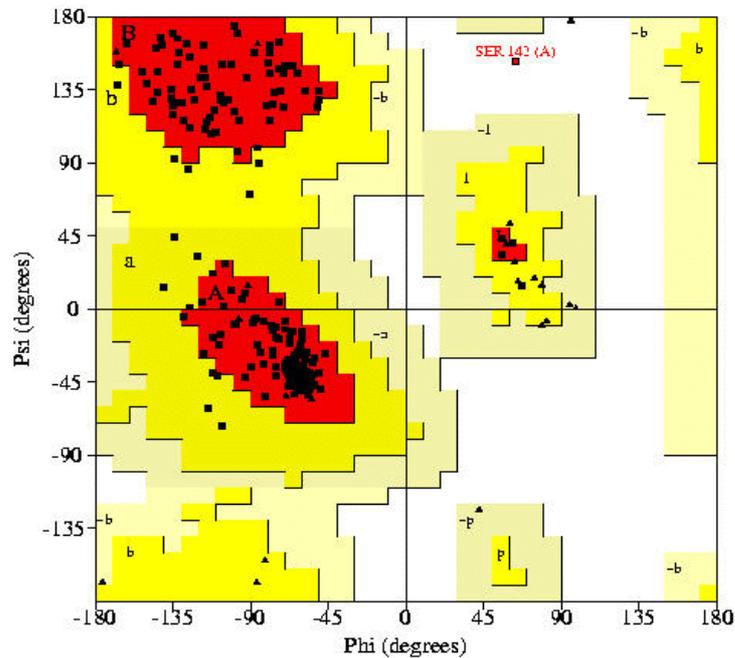
### 4.1.10 Stereochemische Qualität der ermittelten Strukturen

Die Strukturen des ternären Komplexes der R-ADH-Lb-G37D konnten jeweils bis zu einer Auflösung von 1.78, 1.55, 1.10 bzw. 1.05 Å gelöst werden. Daher war es möglich gerade bei den hochaufgelösten Datensätzen die Position einzelner Atome innerhalb der Elektronendichte gut zu bestimmen, einzelne Atomarten (O, N, C) zu unterscheiden und somit ein einwandfreies und plausibles Modell zu erstellen. Als Beispiel soll die 2fofc-Elektronendichte des Tyr155 in Abbildung 4.9 dienen, welche die distinkte Unterscheidung zwischen den einzelnen Atomsorten erkennen läßt.

Das in Abbildung 4.9 dargestellte Ramachandran-Diagramm (Ramachandran & Sasisekharan, 1968) zeigt die Verteilung der in der Proteinstruktur vorhandenen Aminosäuren auf die möglichen Kombinationen der Hauptkettentorsionswinkeln  $\Phi$  und  $\Psi$ . Aus dem mit PROCHECK (Laskowski et al., 1992) ermittelten Diagramm ist zu erkennen, daß sich jeweils über 90 % der Aminosäuren in der stereochemisch günstigsten Region und mit Ausnahme des Ser142 die restlichen Aminosäuren in der erlaubten Region befinden. Die Statistik dieses Diagramms ist in Tabelle 4.9 für die Struktur bei 1.10 Å dargestellt.



**Abbildung 4.8:** Elektronendichte des Aminosäurerestes Tyr155 bei einer Konturierung von  $2\sigma$ . Die Abbildung wurde mit BOBSCRIPT und RENDER erstellt.



**Abbildung 4.9:** Ramachandran-Diagramm der endverfeinerten Struktur der R-ADH-Lb-G37D bei 1.10 Å. A, B, L: erlaubte Regionen; a, b, l, p: erweitert erlaubte Regionen; ~a, ~b, ~l, ~p: großzügig erlaubte Regionen. Glycine sind als Dreiecke dargestellt.

AS in erlaubten Regionen	[A, B, L]	196	(91.6 %)
AS in erweitert erlaubten Regionen	[a, b, l, p]	17	(7.9 %)
AS in großzügig erlaubten Regionen	[~a, ~b, ~l, ~p]	0	(0.0 %)
AS in nicht-erlaubten Regionen	[XX]	1	(0.5 %)
Anzahl von Nicht-Glycin- und Nicht-Prolin-AS		214	(100.0 %)
Anzahl an Glycinen		27	
Anzahl an Prolinen		8	
Gesamtanzahl an AS		251	

**Tabelle 4.9:** Statistik der mit PROCHECK berechneten  $\Phi/\Psi$ -Torsionswinkelverteilung der endverfeinerten Struktur der R-ADH-Lb-G37D bei 1.10 Å. AS = Aminosäure.

## 4.2 Die H<sub>6</sub>-BTL-2

### 4.2.1 Ausgangsbedingungen

Die BTL-2 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Schmid am Institut für technische Biochemie an der Universität Stuttgart produziert. Die Herstellung der BTL-2 umfaßte die Klonierung, Transformation und Fermentation. Dabei wurden die nicht-His-getaggte rekombinante Wildtyp-BTL-2 (WT-BTL-2) sowie die His-getaggte (H<sub>6</sub>-BTL-2 und H<sub>6</sub>-IEGR-BTL-2) und die mit einem neuartig entwickelten *tag* versetzte BTL-2 (M13-IEGR-BTL-2) produziert. Der neuartig entwickelte *tag* besaß die Aminosäuresequenz HNHRYGCGCC und sollte eine bessere Auftrennung als der His-*tag* bei der immobilisierten Metallionenaffinitäts-Chromatographie bewirken (Enzelberger et al., 2000). Die H<sub>6</sub>-IEGR-BTL-2 und die M13-IEGR-BTL-2 besaßen im Gegensatz zu der H<sub>6</sub>-BTL-2 eine Protease-Schnittstelle IEGR zwischen dem *tag* und der BTL-2, die es ermöglichen sollte den *tag* nach gelungener Aufreinigung abzuspalten.

Außer für die WT-BTL-2 existierten zu Beginn der Arbeit keine verfügbaren Reinigungsprotokolle und es waren keinerlei Kenntnisse über das Kristallisationsverhalten und die dreidimensionale Struktur vorhanden.

### 4.2.2 Reinigung der H<sub>6</sub>-BTL-2

Für die Reinigung der H<sub>6</sub>-BTL-2 wurde zunächst ein 2-stufiges und im weiteren Verlauf der Arbeit ein effizienteres 1-stufiges Reinigungsprotokoll entwickelt. Hierbei wurden neben der immobilisierten Metallionenaffinitäts-Chromatographie (*IMAC*) als ersten Reinigungsschritt verschiedene ionenaustauschchromatographische Trennungen als weitere Schritte getestet.

#### 4.2.2.1 2-Schritt-Reinigung der H<sub>6</sub>-BTL-2

Das Reinigungsprotokoll für die 2-Schritt-Reinigung der H<sub>6</sub>-BTL-2 umfaßt folgende Schritte:

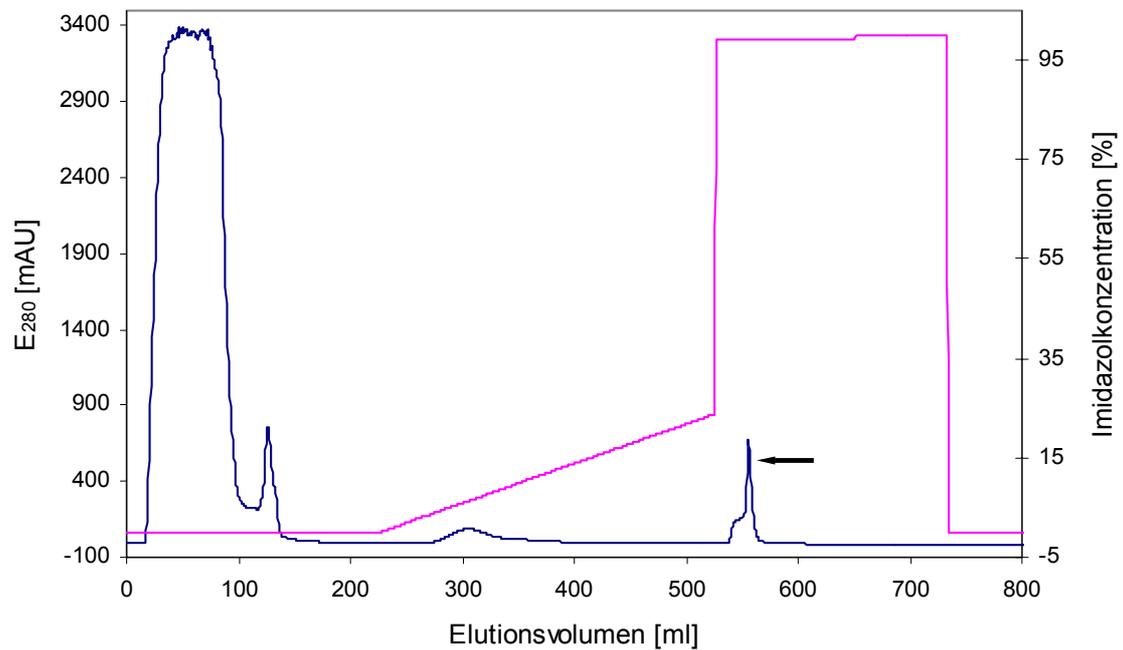
1. Zellaufschluß der *E. coli*-Zellen mittels *French Pressure Cell* und Zentrifugation (SS-34-Rotor)
2. Reinigung der H<sub>6</sub>-BTL-2 durch Metallionenaffinitäts-Chromatographie („Nickelchelatsäule“)
3. Umpufferung durch Gelpermeations-Chromatographie (HiPrep Desalting)
4. Reinigung der H<sub>6</sub>-BTL-2 durch Anionenaustausch-Chromatographie (MonoQ)
5. Konzentrierung durch Ultrafiltration

Im ersten Reinigungsschritt wurde die H<sub>6</sub>-BTL-2 über einer „Nickelchelatsäule“ mit steigender Imidazol-Konzentration gereinigt. Dabei wurde entweder ein Stufengradient mit anschließender Stoßelution oder ein kontinuierlicher Imidazol-Konzentrationsgradient verwendet.

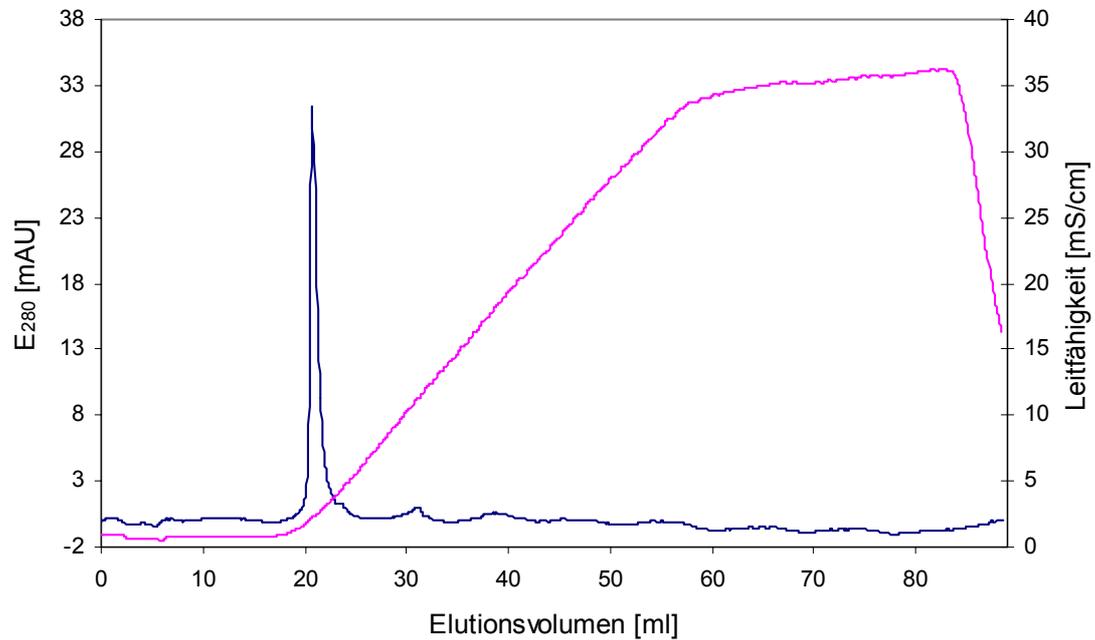
Bei beiden Varianten wurden zuerst nichtgebundene Proteine mit Startpuffer von der Säule eluiert. Bei Verwendung des Stufengradienten wurden weitere nicht H<sub>6</sub>-BTL-2-Proteine mit 120 mM Imidazol stoßeluiert. Die Elution der H<sub>6</sub>-BTL-2 erfolgte dann mit 250 mM Imidazol, wobei noch 10-15 weitere Proteine koeluierten. Bei Verwendung des kontinuierlicher Imidazol-Konzentrationsgradienten konnte eine weitgehende Abtrennung der koeluierten nicht-H<sub>6</sub>-BTL-2-Proteine erreicht werden.

Die Anionenaustausch-Chromatographie wurde nach Entsalzung und Umpufferung des von der „Nickelchelatsäule“ erhaltenen Proteingemisches als zweiter Reinigungsschritt mit steigendem NaCl-Gradienten durchgeführt. Dabei erfolgte die Elution der H<sub>6</sub>-BTL-2 zwischen 10 und 40 mM NaCl. Wurde bei der *IMAC* ein kontinuierlicher Imidazol-Konzentrationsgradient verwendet, diente die Anionenaustausch-Chromatographie lediglich zur Abtrennung eines geringen Anteils an Fremdprotein von der schon größtenteils gereinigten H<sub>6</sub>-BTL-2.

In Abbildung 4.10 sind die Chromatogramme der beiden Reinigungsschritte dargestellt.



a) Immobilisierte Metallionenaffinitäts-Chromatographie mit Nickel-NTA



b) Anionenaustausch-Chromatographie mit MonoQ

**Abbildung 4.10:** Chromatogramme der H<sub>6</sub>-BTL-2. Die Extinktion bei  $\lambda = 280$  nm und die Leitfähigkeit sind gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die aktiven Fraktionen, die vereinigt und von denen ein Teil für den zweiten Reinigungsschritt verwendet wurde, sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

	Gesamt- aktivität [U]	Protein [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Reinigungs- faktor	Ausbeute [%]
Überstand des Aufschlusses	85728	596	144	1	100
Affinitäts- Chromatographie	27660	18	1537	10.7	32
Umpufferung	23720	14	1694	11.8	28
Anionenaustausch- Chromatographie	17292	11	1572	10.9	20

**Tabelle 4.10:** Zusammenfassung der verschiedenen Reinigungsschritte für die H<sub>6</sub>-BTL-2. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert von drei unabhängigen Reinigungsdurchgängen dar. Für jede Reinigung wurden 10 g *E. coli*-Zellen aufgeschlossen. Der Reinigungsfaktor ist definiert als der Quotient der spezifischen Aktivitäten und steigt ebenso wie die spezifische Aktivität im Laufe der Reinigung an. Die Ausbeute bezogen auf die Gesamtaktivität nimmt ab. Die Bestimmung der Proteingehalte erfolgte mit der Methode nach Bradford (1976). Die Gesamtaktivitäten wurden mit dem Substrat p-Nitrophenylpalmitat bestimmt. 1 Unit ist definiert als die Menge an Lipase, die notwendig ist, um 1 µmol p-NPP in 1 min bei 60°C zu spalten.

#### 4.2.2.1.1 Zusammenfassung des Reinigungsprotokolls

Die verschiedenen Einzelschritte der Reinigung sind als Mittelwerte von drei unabhängigen Reinigungsdurchgängen quantitativ in einem Reinigungsprotokoll in Tabelle 4.10 zusammengefaßt. Die H<sub>6</sub>-BTL-2 konnte dabei über eine 2-stufige Reinigung mit einer Ausbeute von 20 % und einem Reinigungsfaktor von 10.9 als homogene Enzymfraktion isoliert werden.

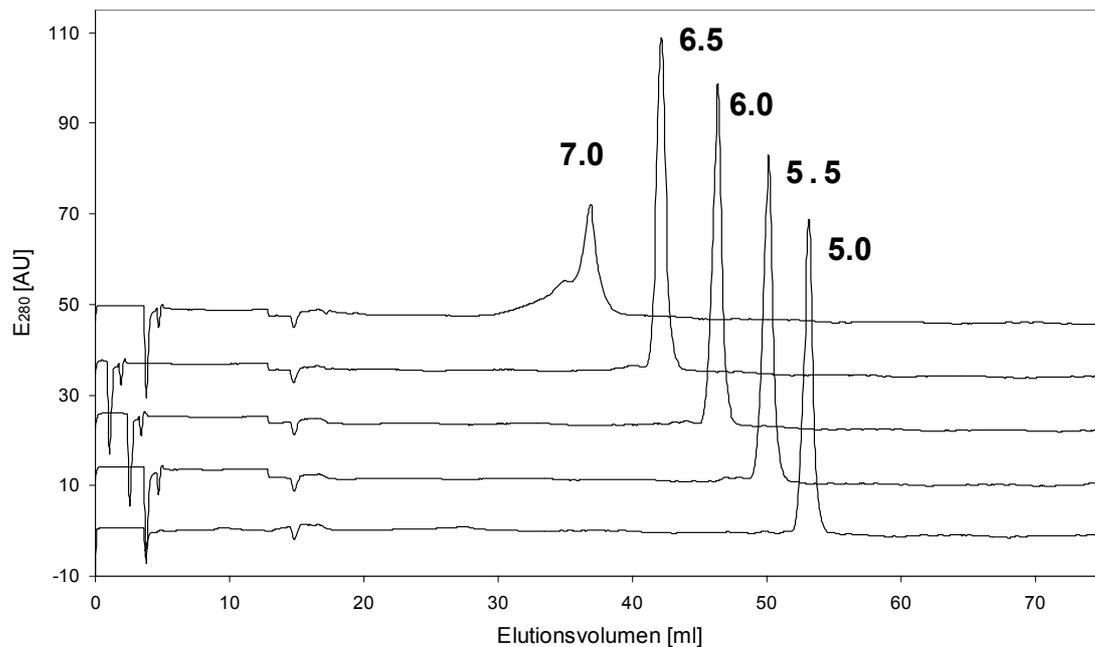
#### 4.2.2.1.2 Weitere Versuche zur 2-Schritt-Reinigung der H<sub>6</sub>-BTL-2

Bei der Erarbeitung des Reinigungsprotokolls wurden für den zweiten Reinigungsschritt neben der Anionenaustausch-Chromatographie kationenaustauschchromatographische Trennungen über eine MonoS HR 5/5-Säule sowie chromatofokussierende Trennungen über eine MonoP HR 5/20-Säule im pH-Intervall von 5.0 bis 9.0 durchgeführt.

Um die optimalen Trennbedingungen bei der Ionenaustausch-Chromatographie zu ermitteln, wurde sowohl für die Anionen- als auch für die Kationenaustausch-Chromatographie Reinigungsversuche im pH-Bereich zwischen 7.0 und 9.0 bzw. 5.0 und 7.0 durchgeführt (*buffer prep/pH-scouting*). Bei der Chromatofokussierung über die MonoP Säule wurden verschiedene Läufe im pH-Intervall von 5.0 bis 8.0 durchgeführt.

Die Ergebnisse der verschiedenen Läufe bei unterschiedlichen pH-Werten wiesen prinzipiell keine Unterschiede untereinander auf. Lediglich in der Nähe des pI der H<sub>6</sub>-BTL-2 von 7.2 band das Protein nur unzureichend an die Säule. Die Ergebnisse des *pH-scouting* sind exemplarisch für die Kationenaustausch-Chromatographie in Abbildung 4.11 dargestellt.

Sowohl die Läufe mit der MonoP- als auch mit der MonoS-Säule lieferten in Bezug auf die Ausbeute an Protein und die Reinheit im SDS- und IEF-Gel keine besseren Ergebnisse als die Reinigung über die MonoQ-Säule. Aus diesen Gründen wurde im weiteren Verlauf ausschließlich die Reinigung mittels Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt.



**Abbildung 4.11:** *pH-scouting*-Versuche bei der Kationenaustausch-Chromatographie im pH-Bereich zwischen 5.0 und 7.0.

#### 4.2.2.2 1-Schritt-Reinigung der H<sub>6</sub>-BTL-2

Neben der schon beschriebenen zweistufigen Reinigung der H<sub>6</sub>-BTL-2 konnte ein effizienteres einstufiges Reinigungsprotokoll entwickelt werden, welches nur die Reinigung durch Metallionenaffinitäts-Chromatographie umfaßt. Hierbei wurde ein kontinuierlicher Imidazol-Konzentrationsgradient von 0-200 mM Imidazol verwendet.

Bei der Entwicklung dieses Protokolls wurde die Abhängigkeit der Trennung der an die Säule gebundenen nicht-H<sub>6</sub>-BTL-2-Proteinen und der H<sub>6</sub>-BTL-2 vom pH-Wert mituntersucht. Dabei konnte beobachtet werden, daß bei einem pH-Wert von 8.5 die gebundenen nicht-H<sub>6</sub>-BTL-2-Proteine und die H<sub>6</sub>-BTL-2 in einem einzigen Peak eluieren, aber bei einer Verringerung des pH-Wertes über 8.0 und 7.5 bis zu 7.0 die Trennung in zwei getrennten Peaks möglich war (Abbildung 4.13).

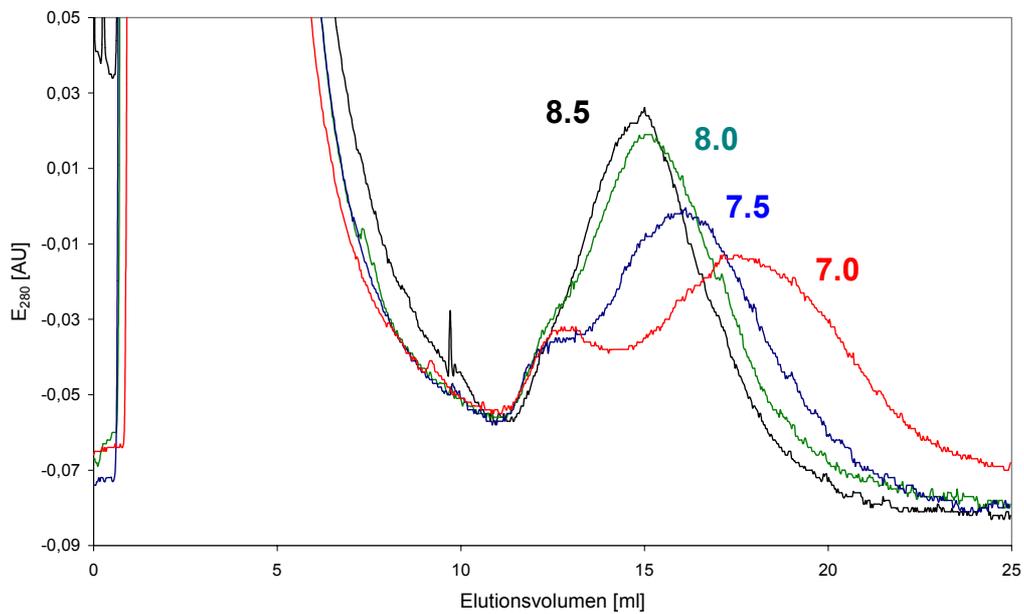
Der Phosphatpuffer, der bei der bisherigen Reinigung verwendet worden war und in dem die H<sub>6</sub>-BTL-2 bei einem pH-Wert von 7.5 nach einer 12-stündigen Inkubation nur noch eine Restaktivität von 30 % zeigt (Schmidt-Dannert, 1994), wurde für die einstufige Reinigung durch einen Tris-Puffer ersetzt, in dem kein Aktivitätsverlust beobachtet wurde.

Bei den Untersuchungen zeigte sich, daß der Zusatz des Detergenzes Natriumcholat im Aufschluß- und Waschpuffer unbedingt notwendig war, um die H<sub>6</sub>-BTL-2 an die Säule zu binden, aber nicht im Elutionspuffer verwendet werden mußte.

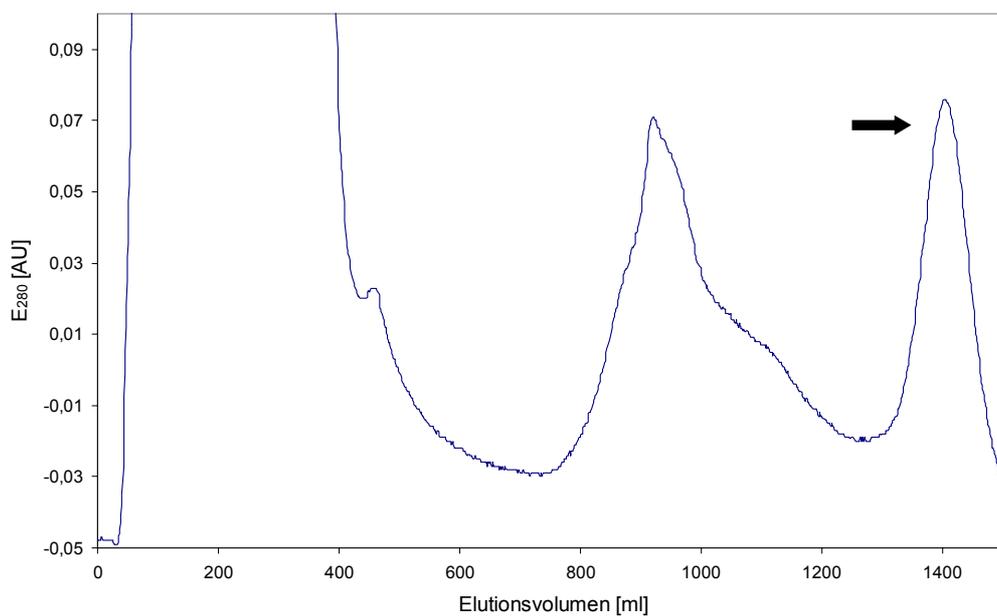
Da das Detergenz Lauryldimethylaminoxid (LDAO) bei der Kristallisation die Präzipitation der H<sub>6</sub>-BTL-2 zu verhindern schien (s. Kap. 4.2.6), wurde LDAO in den Aufschluß-, Wasch- und Elutionspuffer zugesetzt.

Wie die Ergebnisse der Aggregationsstudien zeigten (s. Kap. 4.2.7), verhindert Isopropanol die Oligomerisierung der H<sub>6</sub>-BTL-2 bei der Konzentrierung. Daher wurde in verschiedenen Testläufen im Aufschluß-, Wasch- und Elutionspuffer LDAO durch Isopropanol ersetzt. Dabei gelang es, die H<sub>6</sub>-BTL-2 genauso sauber zu reinigen wie in den bisherigen Versuchen. Die Gesamtausbeute bezogen auf die Aktivität und Proteinmenge war hingegen deutlich geringer (s. Tabelle 4.11), so daß weiterhin LDAO anstatt Isopropanol bei der Reinigung verwendet wurde.

Insgesamt konnte die H<sub>6</sub>-BTL-2 mit einer Ausbeute von 60 % und einem Reinigungsfaktor von 6.7 als homogene Enzymfraktion isoliert werden. Das Chromatogramm der Reinigung ist in Abbildung 4.12 dargestellt.



**Abbildung 4.12:** Chromatogramme der  $H_6$ -BTL-2 bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Extinktion bei  $\lambda = 280$  nm und die Leitfähigkeit sind gegen das Elutionsvolumen aufgetragen.



**Abbildung 4.13:** Chromatogramm der  $H_6$ -BTL-2. Die Extinktion bei  $\lambda = 280$  nm und die Leitfähigkeit sind gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die reinen und homogenen  $H_6$ -BTL-2-Fractionen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

#### 4.2.2.2.1 Zusammenfassung der Reinigungsprotokolle

Die Ergebnisse der Reinigungen sind quantitativ in den Reinigungsprotokollen in Tabelle 4.11 zusammengefaßt. Die H<sub>6</sub>-BTL-2 konnte dabei mit einer Ausbeute von 60 % und einem Reinigungsfaktor von 6.7 (a) bzw. einer Ausbeute von 20 % und einem Reinigungsfaktor von 5.3 als homogene Enzymfraktion isoliert werden.

	Gesamtaktivität [U]	Protein [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Reinigungs- faktor	Ausbeute [%]
Rohlysat	74778	539	139	1	100
<i>IMAC</i>	45395	49	926	6.7	60

##### a) Verwendung von 2 mM LDAO

	Gesamtaktivität [U]	Protein [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Reinigungs- faktor	Ausbeute [%]
Rohlysat	69517	333	209	1	100
<i>IMAC</i>	13904	13	1112	5.3	20

##### b) Verwendung von 5 % Isopropanol

**Tabelle 4.11:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Reinigung für die H<sub>6</sub>-BTL-2 unter Verwendung von 2 mM LDAO (a) und 5 % Isopropanol (b). Für die Reinigung wurden 6 g *E. coli*-Zellen aufgeschlossen. Der Reinigungsfaktor ist definiert als der Quotient der spezifischen Aktivitäten und steigt ebenso wie die spezifische Aktivität im Laufe der Reinigung an. Die Ausbeute bezogen auf die Gesamtaktivität nimmt ab. Die Bestimmung der Proteingehalte erfolgte mit der Methode nach Bradford (1976). Die Gesamtaktivitäten wurden mit dem Substrat p-Nitrophenylpalmitat bestimmt. 1 Unit ist definiert als die Menge an Lipase, die notwendig ist, um 1 µmol p-NPP in 1 min bei 60°C zu spalten.

## 4.2.3 Reinheitskontrolle und Analytik

Die Ergebnisse der jeweiligen Trennungen und die erzielte Reinheit der H<sub>6</sub>-BTL-2 wurden durch SDS-, IEF- und native Polyacrylamidgel-Elektrophoresen (PAGE) sowie durch massenspektrometrische Messungen (MALDI-TOF, ESI-MS) untersucht. Zusätzlich wurden bei den PAGEn Aktivitätsfärbungen durchgeführt. Dabei wurde die enzymatische Reaktion der Lipase (Spaltung von Triacylglyceriden/Estern) auf den Gelen zur Spaltung von  $\alpha$ -Naphthylacetat verwendet und die dabei durch Kopplung mit einem Farbstoff entstehende Rotfärbung zur Detektion und Identifizierung des Enzyms genutzt. Weiterhin wurde durch CD-spektroskopische Messungen eine Bestimmung von Sekundärstrukturgehalten durchgeführt.

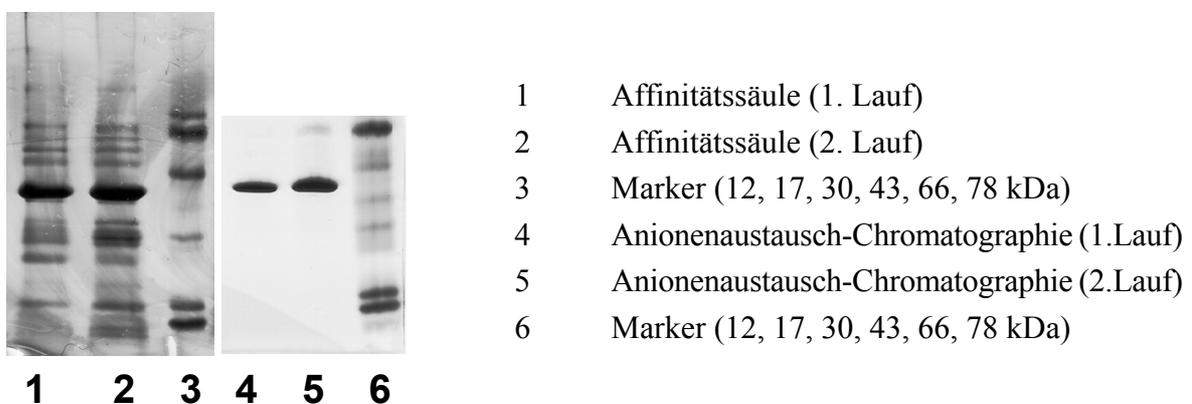
### 4.2.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach dem ersten Chromatographieschritt der zweistufigen Reinigung waren auf dem SDS-Gel (Abbildung 4.14a) eine starke Bande für die H<sub>6</sub>-BTL-2 um 40 kDa zu beobachten sowie ungefähr 15 Banden von weiteren Proteinen (Spur 1, 2), die durch die nachfolgende Anionenaustausch-Chromatographie entfernt werden konnten (Spur 4, 5).

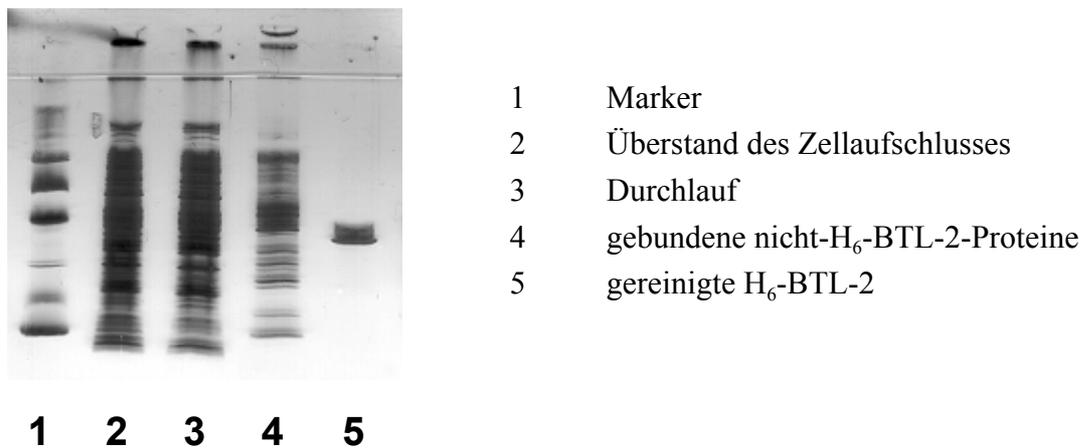
Bei der einstufigen Reinigung mit kontinuierlichem Gradienten war auf dem SDS-Gel eine starke Bande für die H<sub>6</sub>-BTL-2 bei apparenten 40 kDa sowie einer geringe Anzahl zusätzlicher schwacher Banden von weiteren Proteinen zu beobachten (Abbildung 4.14b).

Auf dem nativen Gel wurde mittels der sehr sensitiven Silberfärbung eine einzelne Bande und durch die noch empfindlichere Aktivitätsfärbung eine starke Bande gleichen Molekulargewichts sowie wenige zusätzliche schwache Banden detektiert (Abbildung 4.15a).

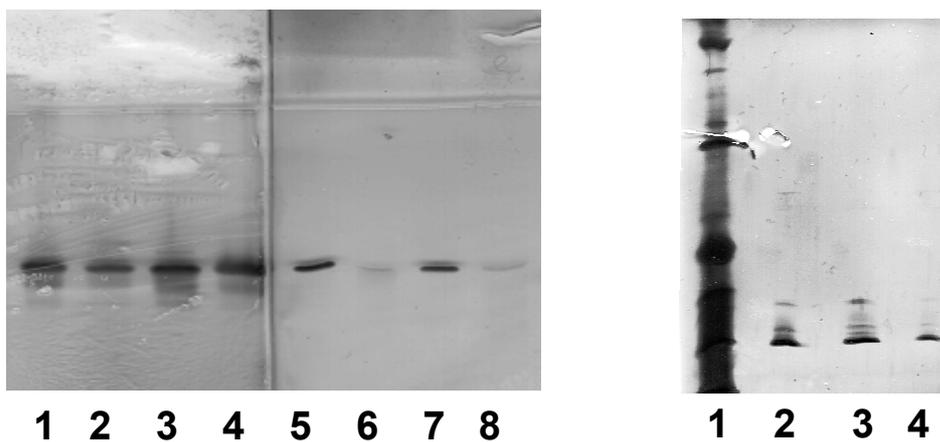
Auf den IEF-Gelen wurden nach der Ionenaustausch-Chromatographie eine starke Bande bei einem pI von 7.2 und bis zu drei weitere Banden zwischen pI-Werten von 7.2 bis 7.4 beobachtet, die nicht weiter getrennt werden konnten (Abbildung 4.15b).



**Abbildung 4.14a:** SDS-Gele der 2-Schritt-Reinigung der H<sub>6</sub>-BTL-2.



**Abbildung 4.14b:** SDS-Gel der 1-Schritt-Reinigung der H<sub>6</sub>-BTL-2.



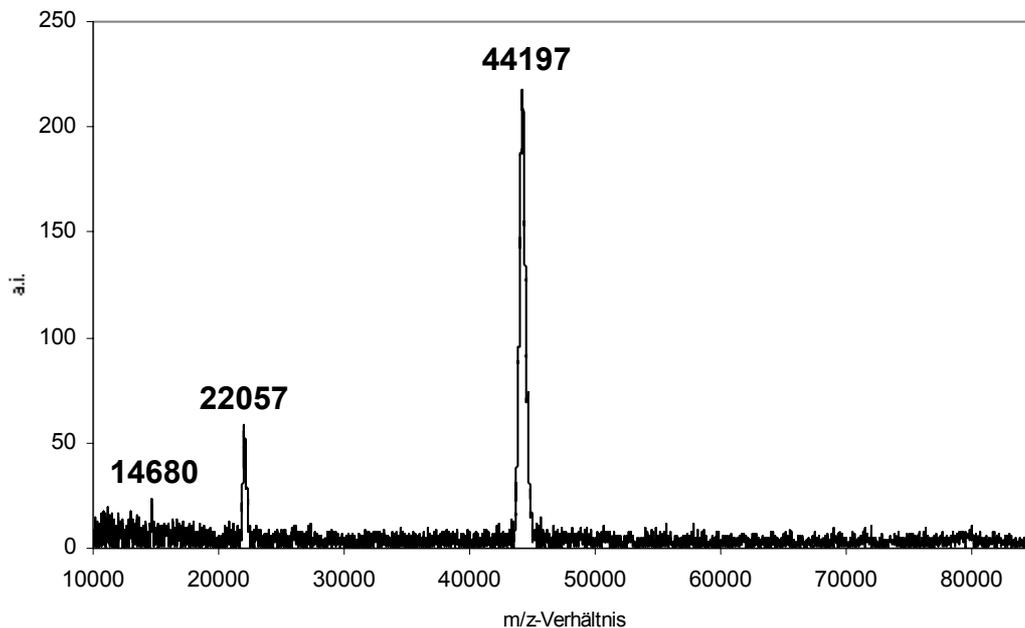
a) natives Gel

b) IEF-Gel

**Abbildung 4.15:** Natives (a) und IEF-Gel (b) der gereinigten H<sub>6</sub>-BTL-2. a) Die Spuren 1-4 zeigen die Ergebnisse der Aktivitätsfärbung und die Spuren 5-8 die entsprechende Detektion mittels Silberfärbung. b) Die Spuren 2-4 zeigen unterschiedliche Konzentrationen der H<sub>6</sub>-BTL-2. In Spur 1 ist ein Standardmarker aufgetragen.

#### 4.2.3.2 Massenspektrometrie

Die Reinheit der H<sub>6</sub>-BTL-2 wurde zusätzlich durch ein MALDI-TOF-Experiment analysiert. Ein solches Massenspektrum ist in Abbildung 4.16 dargestellt. Der Molekülionpeak [BTL-2+H]<sup>+</sup> wird bei einem m/z-Wert von 44.197 Da detektiert. Daneben kann bei einem m/z-Verhältnis von 22.057 Da bzw. 14.680 Da das zweifach bzw. dreifach geladene Molekülion [BTL-2+2H]<sup>2+</sup> bzw. [BTL-2+3H]<sup>3+</sup> beobachtet werden. Zur Kalibrierung wurde ein externer BSA-Standard verwendet.



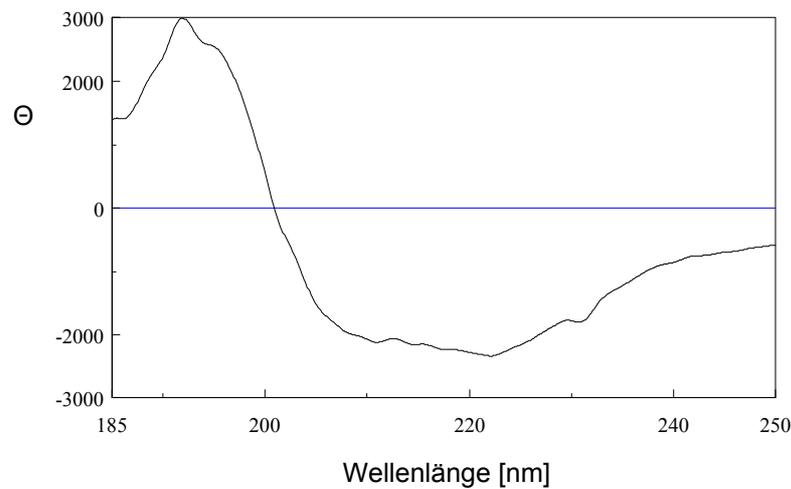
**Abbildung 4.16:** Massenspektrum eines MALDI-TOF-Experimentes der H<sub>6</sub>-BTL-2.

#### 4.2.3.3 CD-spektroskopische Messungen

Das CD-Spektrum der H<sub>6</sub>-BTL-2 ist in Abbildung 4.17 dargestellt. Dabei wurde die Messung bei 20°C durchgeführt. Die rechnerische Auswertung des Spektrums mit den Programmen CONTIN, K2D und SELCON führte zu den in Tabelle 4.12 zusammengefaßten Sekundärstrukturanteilen. Zusätzlich ist die aufgrund der bekannten Aminosäuresequenz durchgeführte Sekundärstrukturvorhersage aufgeführt.

Wie sich zeigt, ergibt sich aus der CD-Messung ein relativ geringer Anteil an  $\alpha$ -Helices und ein deutlich höherer Anteil an  $\beta$ -Faltblättern. Die Ergebnisse der sequenzbasierten Sekundärstrukturvorhersage bestätigen dies hingegen nicht.

Aus dem Habitus des Spektrums läßt sich die H<sub>6</sub>-BTL-2 nach Greenfield (1996) zu der Faltungsklasse der  $\alpha$ + $\beta$ -Proteine zählen, da das Signal bei 208 nm größer ist als bei 222 nm. Wäre das Verhältnis umgekehrt würde das Protein der Faltungsklasse der  $\alpha$ / $\beta$ -Proteine zugerechnet.

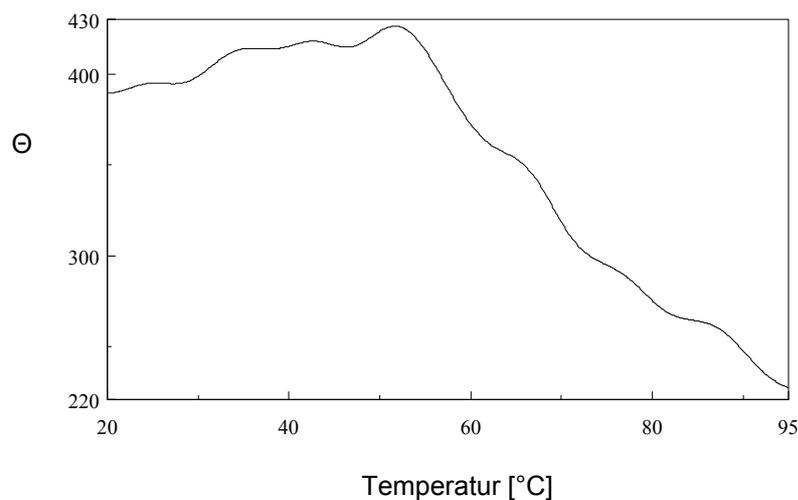


**Abbildung 4.17:** CD-Spektrum der H<sub>6</sub>-BTL-2 bei T = 20°C.

	$\alpha$ -Helix [%]	$\beta$ -Faltblatt [%]	Rest [%]
CONTIN	6	57	37
K2D	8	44	48
SELCON	5	49	46
Vorhersage	30	15	55

**Tabelle 4.12:** Ermittelte Sekundärstrukturanteile der H<sub>6</sub>-BTL-2. Bei CONTIN wurde eine Referenzdatensatz aus 16 nativen Proteinen verwendet (Provencher and Glöckner, 1981). SELCON wurde nach Sreerama and Woody (1990), K2D nach Andrale et al (1993) verwendet. Die Vorhersage wurde mit PREDATOR durchgeführt.

Um den Schmelzpunkt der H<sub>6</sub>-BTL-2 zu bestimmen, wurde eine Schmelzkurve bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 210$  nm aufgenommen (Abbildung 4.18). Dabei ist der Schmelzpunkt der H<sub>6</sub>-BTL-2 als Wendepunkt der Kurve definiert, der auch als Maximum der Ableitungsfunktion bestimmt werden kann. Da das gemessene Spektrum eine relativ geringe Änderung der Elliptizität aufweist und die Kurve bei einer Temperatur von 95°C noch nicht den kompletten Verlust der Sekundärstrukturanteile aufzuweisen scheint, kann kein exakter Wert für den Schmelzpunkt bestimmt werden. Wenn davon ausgegangen wird, dass sich die Kurve bei 95°C einem Plateau annähert, kann ein ungefährender Schmelzpunkt von 70°C postuliert werden.



**Abbildung 4.18:** Schmelzkurve der H<sub>6</sub>-BTL-2 bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 210$  nm.

#### 4.2.4 Untersuchungen der WT-BTL-2, M13-IEGR-BTL-2 und H<sub>6</sub>-IEGR-BTL-2

Da sich die M13-IEGR-BTL-2 und die H<sub>6</sub>-IEGR-BTL-2 aufgrund ihrer Proteaseschnittstelle in ihren Bindungseigenschaften bei der immobilisierten Metallionenaffinitäts-Chromatographie von der H<sub>6</sub>-BTL-2 zu unterscheiden schienen, konnte das unter 4.2.2 beschriebene Reinigungsprotokoll nicht zur Reinigung herangezogen werden.

Die von unserem Kooperationspartner in Stuttgart entwickelte zweistufige Aufreinigung für die WT-BTL-2 mittels hydrophober Interaktions-Chromatographie und Gelfiltrations-Chromatographie (z.B. Rua et al., 1997) konnte nicht reproduziert werden.

Zur Entwicklung von Reinigungsprotokollen für die WT-BTL-2, die H<sub>6</sub>-IEGR-BTL-2 und die M13-IEGR-BTL-2 wurden daher Trennungen mittels *IMAC*, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophober Interaktions-Chromatographie (Phenyl-, Butyl-, Isopropyl-, Ether-Säulen) durchgeführt. Eine vernünftige Reinigungsstrategie mit ausreichenden Ausbeuten konnte jedoch nicht gefunden werden. Der Hauptgrund hierfür ist wahrscheinlich in den extrem geringen Expressionsraten der genannten Lipase-Konstrukte zu finden, die aus den schwachen Banden auf verschiedenen SDS-Gelen und der niedrigen Aktivität im Rohlysat abgeleitet werden konnten.

## 4.2.5 Das Aggregationsproblem der H<sub>6</sub>-BTL-2

### 4.2.5.1 Das Löslichkeitsproblem der H<sub>6</sub>-BTL-2

Die H<sub>6</sub>-BTL-2 zeichnet sich in einer nur aus Puffer bestehenden Proteinstammlösung durch eine extrem geringe Löslichkeit von nur 0.2 mg/ml bei T = 4°C aus. Bei höheren Konzentrationen beginnt die H<sub>6</sub>-BTL-2 zu präzipitieren. Da für die Kristallisation von Proteinen üblicherweise Proteinkonzentrationen zwischen 5 und 50 mg/ml verwendet werden, schien eine Konzentration von 0.2 mg/ml für eine erfolgsversprechende Kristallisation zu gering.

Aus diesem Grunde wurden verschiedene Methoden getestet mit dem Ziel die Löslichkeit der H<sub>6</sub>-BTL-2 zu erhöhen. Da eine Temperaturerhöhung von T = 4°C auf T = 20°C die Löslichkeit nicht erhöhen konnte, wurde der Einfluß verschiedener Additive auf die Löslichkeit untersucht. Dabei wurden Salze und Kombinationen von verschiedenen Salzen und Detergenzien mit variierenden Konzentrationen und pH-Werten getestet. Es wurden dabei Puffer mit folgender Zusammensetzung verwendet:

20 mM Tris/HCl (pH = 7.0/8.5)

1. + 100/500 mM NaCl
2. + 100 mM NaCl + 1 % (w/v) Octyl-β-D-glucopyranosid (OGP)
3. + 100 mM NaCl + 1 % (w/v) Natriumcholat
4. + 50/200 mM Imidazol
5. + 200 mM Imidazol + 500 mM NaCl + 4.4 mM Lauryldimethylaminoxid (LDAO)
6. + 90 mM Imidazol + 2 mM Lauryldimethylaminoxid (LDAO)

Wurde bei diesen Versuchen die Löslichkeitsgrenze der H<sub>6</sub>-BTL-2 einmal überschritten, konnte ausgefallene H<sub>6</sub>-BTL-2 auch durch Verdünnen oder den Zusatz weiterer Additive nicht wieder in Lösung gebracht werden. Die Präzipitation war somit irreversibel.

Der alleinige Zusatz von NaCl führte unabhängig von der verwendeten Konzentration (100 oder 500 mM) nur zu einer geringen Erhöhung der Löslichkeit auf 0.3-0.4 mg/ml. Der Zusatz von OGP hatte keinen Einfluß auf die Löslichkeit. Durch den Zusatz von 1 % (w/v) des Detergenzes Natriumcholat oder durch die Verwendung von 50 bzw. 200 mM Imidazol konnte die Konzentration der H<sub>6</sub>-BTL-2 um das Achtfache bis auf 1.6 mg/ml erhöht werden. Die Funktion von Imidazol könnte hierbei sein, daß bivalente Kationen chelatisiert werden können und eine eventuelle Verbrückung der H<sub>6</sub>-BTL-2-Monomere über den His-tag und bivalente Kationen verhindert werden kann.

Die Verwendung einer Kombination aus 200 mM Imidazol + 500 mM NaCl + 4.4 mM LDAO bzw. 90 mM Imidazol + 2 mM LDAO als Zusatz führte zu einer Steigerung der Löslichkeit auf bis zu 2 mg/ml. Das Detergenz LDAO wurde hierbei verwendet, da es bei der Kristallisation die starke Präzipitation der H<sub>6</sub>-BTL-2 zu verringern schien (s. Kap. 4.2.6.1).

Wie die Ergebnisse der Kristallisationsversuche weiterhin zeigten (s. Kap. 4.2.6.1), ist unabhängig von der hier aufgeführten Zusammensetzung der bei der Konzentrierung verwendeten Proteinstammlösungen eine reproduzierbare Kristallisation nicht möglich. Dies bedeutet, daß eine Erhöhung der Löslichkeit der H<sub>6</sub>-BTL-2 allein nicht ausreichend ist, um die H<sub>6</sub>-BTL-2 in einen für die Kristallisation geeigneten Zustand zu überführen.

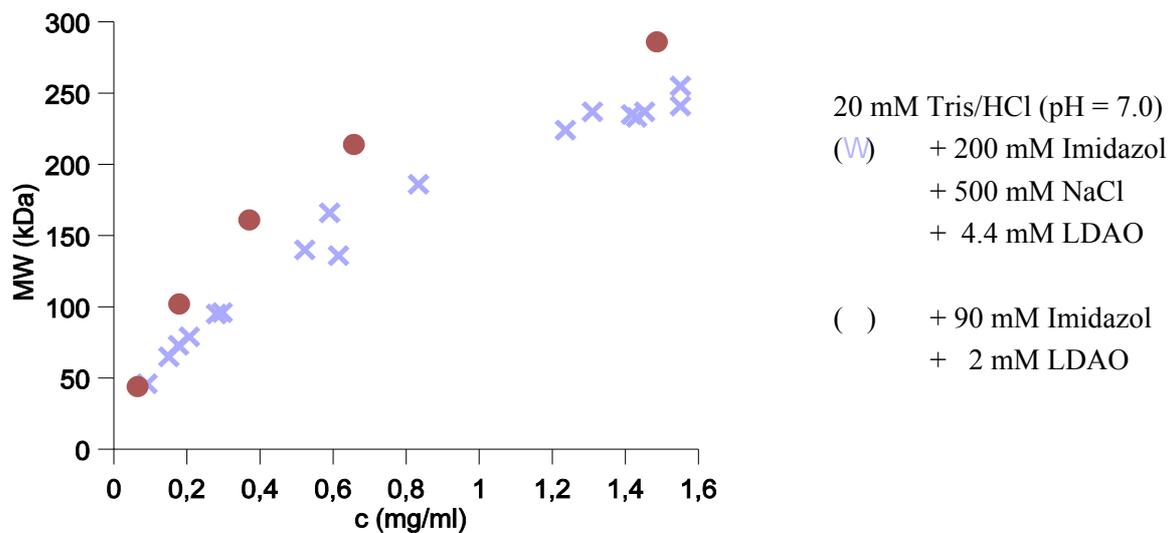
#### 4.2.5.2 Das Oligomerisierungsproblem der H<sub>6</sub>-BTL-2

Durch Messung der dynamischen Lichtstreuung (DLS) wurde nun das Aggregationsverhalten der H<sub>6</sub>-BTL-2 während des Konzentrierungsvorgangs untersucht. Dabei wurde die Abhängigkeit des durch die DLS berechneten Molekulargewichtes von der Proteinkonzentration der H<sub>6</sub>-BTL-2 beobachtet und aus dem apparenten Molekulargewicht auf den Oligomerisierungsgrad zurückgeschlossen.

Für die Konzentrierungen in einer Proteinstammlösung aus 20 mM Tris/HCl (pH = 7.0) + 200 mM Imidazol + 500 mM NaCl + 4.4 mM LDAO bzw. 20 mM Tris/HCl (pH = 7.0) + 90 mM Imidazol + 2 mM LDAO ist die Abhängigkeit des Molekulargewichtes von der Proteinkonzentration der H<sub>6</sub>-BTL-2 in Abbildung 4.19 dargestellt.

Der Verlauf und der Endpunkt der Zunahme des Oligomerisierungsgrads weisen bei den beiden unterschiedlichen Konzentrierungspuffern keine wesentlichen Unterschiede auf. Für die konzentrierte H<sub>6</sub>-BTL-2 wird im ersten bzw. zweiten Puffer ein Radius von  $(6.3 \pm 2.0)$  nm bzw.  $(6.7 \pm 1.9)$  nm und ein Molekulargewicht von 255 kDa bzw. 286 kDa (globulärer Auswertungsmodus) berechnet. Die *baseline* beträgt 1.001 bzw. 1.002 und der *SOS-Fehler* 3.202 bzw. 2.861. Es zeigt sich also, daß das berechnete Molekulargewicht während der Konzentrierung deutlich zunimmt und die H<sub>6</sub>-BTL-2 somit zu größeren Verbänden oligomerisiert. Während der Konzentrierung liegt aber bei jeder Messung eine homogene Enzymfraktion mit monomodaler Größenverteilung vor.

Die *baseline* und der *SOS-Fehler* sind zwei berechnete Größen, um die Qualität der Messung zu beurteilen. Die *baseline* leitet sich von der Vollständigkeit der Autokorrelationsfunktion ab. Der *SOS-Fehler* (*sum of squares*) gibt die Summe der mittleren quadratischen Fehler zwischen den gemessenen Rohdaten und den an die Autokorrelationsfunktion angepaßten Daten an. Für eine monomodale Verteilung sollte der Wert der *baseline* kleiner als 1.005, der Wert des *SOS-Fehlers* kleiner als 5 und zusätzlich die Standardabweichung des Radius kleiner als 30 % sein.



**Abbildung 4.19:** Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrads der H<sub>6</sub>-BTL-2 von der Proteinkonzentration. Die Ergebnisse stellen jeweils den Mittelwert von 30-50 Messungen dar.

Wie aus den DLS-Messungen ersichtlich, lag die H<sub>6</sub>-BTL-2 im konzentrierten Zustand als Oligomer mit definierter Zusammensetzung vor und wies offensichtlich somit die für die Kristallisation erforderliche Mikrohomogenität auf. Da die Kristallisation dennoch nicht reproduzierbar war (s. Kap. 4.2.6.1), konnten eine ausreichende Proteinkonzentration und Mikrohomogenität der H<sub>6</sub>-BTL-2 zwar als notwendige, aber nicht als hinreichende Bedingung für eine erfolgreiche Kristallisation gelten. Es ist daher anzunehmen, daß die Aggregation der H<sub>6</sub>-BTL-2-Monomere zu größeren Verbänden das eigentliche Hindernis bei der Kristallisation darstellt und zu einer schnellen Präzipitation und zu einer Verhinderung einer reproduzierbaren Kristallisation führt.

Aus diesem Grund wurde versucht die Interaktionen zwischen den einzelnen Monomeren der H<sub>6</sub>-BTL-2 und zwischen den Monomeren und Lösungsmittelmolekülen zu manipulieren, um die Oligomerisierung während der Konzentrierung zu verhindern. Für die Lösung dieses Problems bot sich die Verwendung folgender chemischer Substanzklassen an:

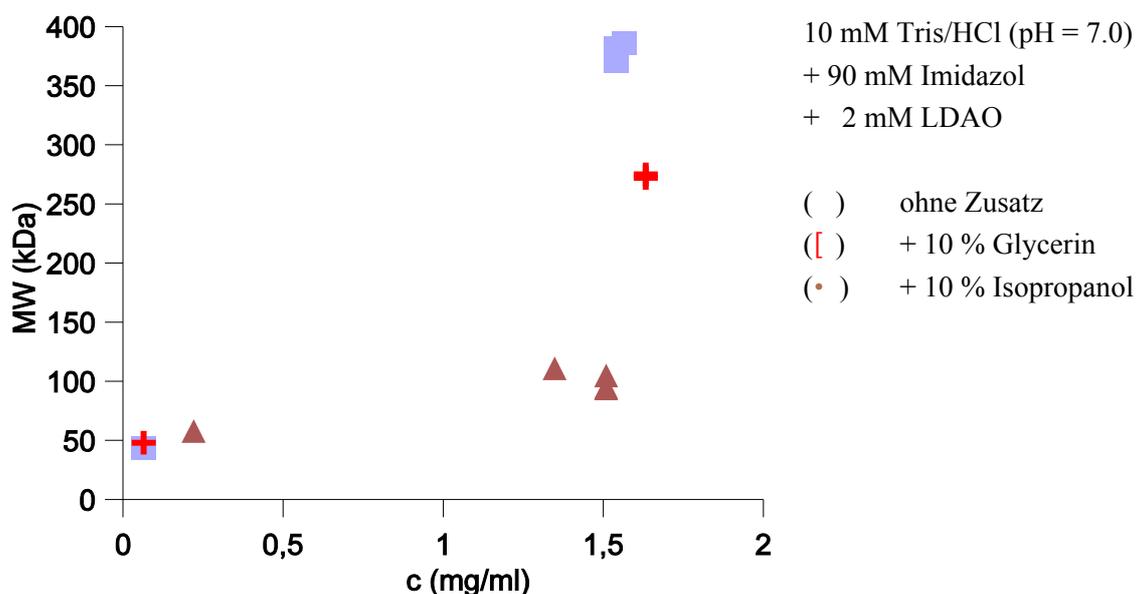
- & Salze
- & (chaotrope) Detergenzien
- & Polyole
- & elektrostatisch-wirkende Alkohole

Die bei den unter 4.2.5.1 aufgeführten Konzentrierungsversuchen verwendeten Salze NaCl und Imidazol sowie die Detergenzzusätze OGP, Natriumcholat und LDAO konnten -wie gezeigt- eine Oligomerisierung der H<sub>6</sub>-BTL-2-Monomere zu größeren Verbänden nicht verhindern. Die verwendeten Salze und Detergenzien waren daher nicht geeignet das Aggregationsproblem zu lösen.

Im folgenden wurde deshalb der Einfluß verschiedener Alkohole und Polyole auf das Aggregationsverhalten der H<sub>6</sub>-BTL-2 untersucht.

In einem ersten Versuch wurde der Unterschied des Aggregationsverhalten der H<sub>6</sub>-BTL-2 untersucht, die zum einen ohne einen weiteren Zusatz in einer Proteinstammlösung aus 10 mM Tris/HCl (pH = 7.0) + 90 mM Imidazol + 2 mM LDAO konzentriert wurde und zum anderen mit einem Zusatz von 10 % (v/v) Glycerin bzw. 10 % (v/v) Isopropanol versetzt wurde.

Aus der in Abbildung 4.20 dargestellten Abhängigkeit des Molekulargewichtes von der Proteinkonzentration ist zu erkennen, daß der Glycerin-Zusatz nur zu einer leichten Verringerung der Aggregatbildung führt. Der Zusatz von Isopropanol hingegen führt zu einer deutlichen Erniedrigung des Molekulargewichtes der konzentrierten H<sub>6</sub>-BTL-2. Für die konzentrierte H<sub>6</sub>-BTL-2 wird ohne einen weiteren Zusatz ein Molekulargewicht von 380 kDa, mit einem Zusatz von 10 % Glycerin von 275 kDa und mit einem Zusatz von 10 % Isopropanol von 100 kDa berechnet.

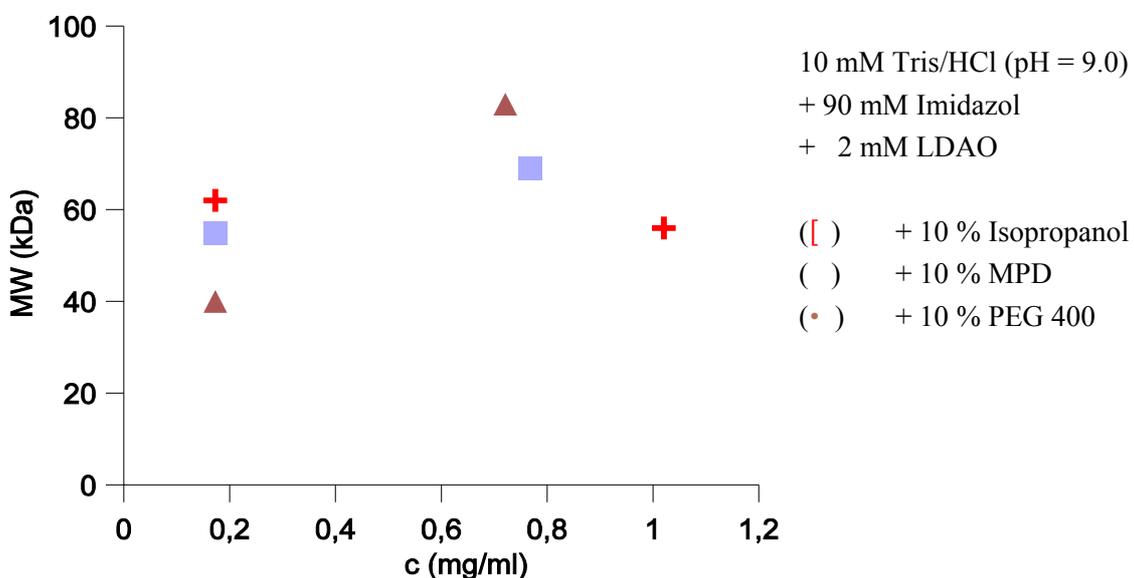


**Abbildung 4.20:** Einfluß von Glycerin und Isopropanol auf den Oligomerisierungsgrad der H<sub>6</sub>-BTL-2. Die Ergebnisse stellen jeweils den Mittelwert von 30-50 Messungen dar. Der Puffer der Proteinstammlösung enthielt 10 mM Tris/HCl (pH = 7.0) + 90 mM Imidazol + 2 mM LDAO (□), bzw. + 10 % Glycerin (△), bzw. + 10 % Isopropanol (×).

Es wurde nun weiter untersucht, ob die Polyole MPD und PEG 400 sich ähnlich verhalten wie das Triol Glycerin oder ob sie eher wie der Alkohol Isopropanol zu einer deutlichen Verringerung bzw. Verhinderung der Aggregation der H<sub>6</sub>-BTL-2 führen. Für diese Untersuchungen wurden jeweils Zusätze von 10 % MPD, PEG 400 und Isopropanol zu der Proteinstammlösung aus 10 mM Tris/HCl (pH = 9.0) + 90 mM Imidazol + 2 mM LDAO vor der Konzentrierung hinzugefügt.

Mit einem PEG 400-Zusatz wird für die konzentrierte H<sub>6</sub>-BTL-2 ein Radius von (4.0 ± 2.4) nm, ein Molekulargewicht von 83 kDa, eine *baseline* von 1.004 und ein *SOS*-Fehler von 22.037 berechnet. Mit einem MPD-Zusatz wird für die konzentrierte H<sub>6</sub>-BTL-2 ein Radius von (3.7 ± 1.2) nm, ein Molekulargewicht von 69 kDa, eine *baseline* von 1.002 und ein *SOS*-Fehler von 5.532 berechnet. Bei einem Isopropanol-Zusatz ergibt sich hingegen für die H<sub>6</sub>-BTL-2 eine monomodale Größenverteilung mit einem Radius von (3.4 ± 0.5) nm, einem Molekulargewicht von 56 kDa, einer *baseline* von 1.000 und einem *SOS*-Fehler von 0.612.

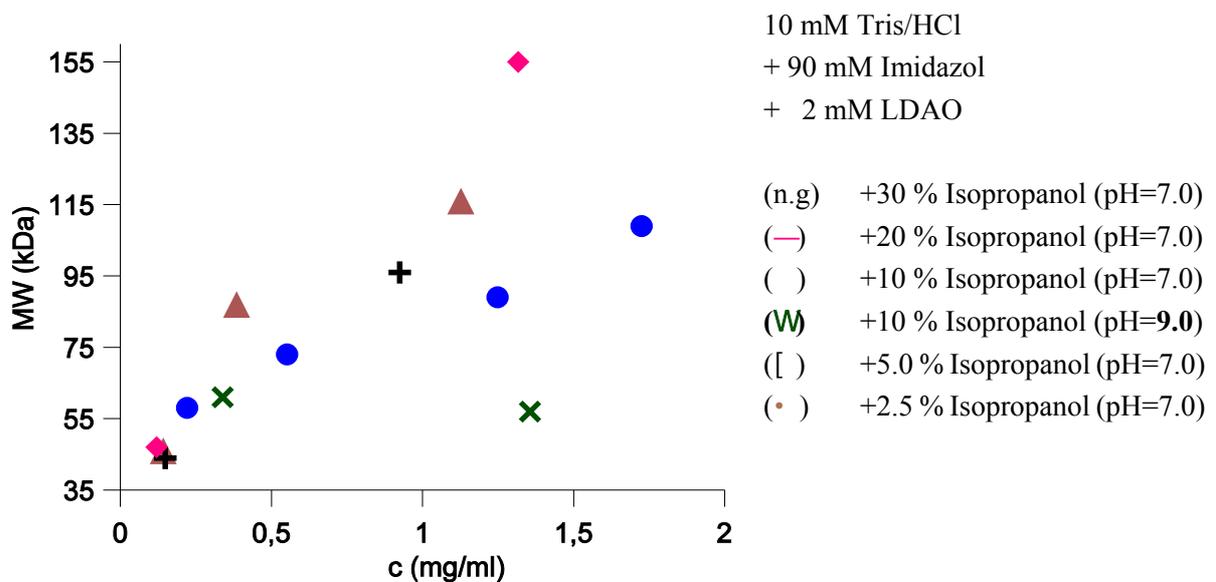
Aus den in Abbildung 4.21 dargestellten Molekulargewichten ist zu erkennen, daß der Zusatz von PEG 400 und im höheren Maße der Zusatz von MPD eine Aggregation der H<sub>6</sub>-BTL-2 stärker verhindert als Glycerin, aber nicht wie Isopropanol verhindern kann. Desweiteren sind die bei der dynamischen Lichtstreuung gemessenen und berechneten Parameter sowie Standardabweichungen bei einem Zusatz von MPD und PEG 400 deutlich schlechter als bei einem Isopropanol-Zusatz.



**Abbildung 4.21:** Einfluß von Isopropanol, MPD und PEG 400 auf den Oligomerisierungsgrad der H<sub>6</sub>-BTL-2. Die Ergebnisse stellen jeweils den Mittelwert von 30-50 Messungen dar. Der Puffer der Proteinstammlösung enthielt 10 mM Tris/HCl (pH = 9.0) + 90 mM Imidazol + 2 mM LDAO + 10 % MPD ( ), bzw. + 10 % Isopropanol ( ), bzw. + 10 % PEG 400 (•).

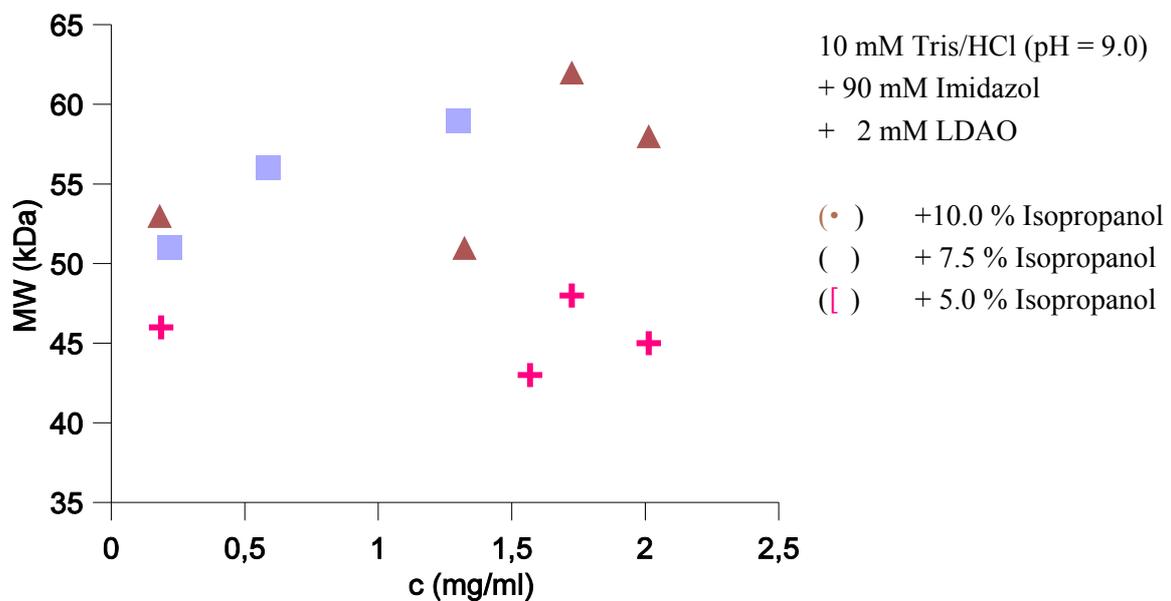
Da Isopropanol das Additiv der Wahl zu sein schien, wurde Isopropanol im Konzentrationsbereich von 2.5 bis 30 % dem Proteinpuffer aus 10 mM Tris/HCl + 90 mM Imidazol + 2 mM LDAO zugefügt. Die Zunahme des Oligomerisierungsgrads in Abhängigkeit von der Konzentration ist in Abbildung 4.22 dargestellt.

Dabei zeigt sich deutlich, daß bei einer Isopropanol-Konzentration zwischen 5 und 10 % und einem pH-Wert von 7.0 nur eine geringe Tendenz zur Oligomerisierung zu beobachten ist. Bei einer Isopropanol-Konzentration von 10 % und einem pH-Wert von 9.0 scheinen sogar auch in konzentrierter Form nur Monomere vorzuliegen. Dies zeigt, daß neben der Verwendung von Isopropanol auch der pH-Wert das Aggregationsverhalten der H<sub>6</sub>-BTL-2 beeinflusst und eine Erhöhung des pH-Wertes von 7.0 auf 9.0 (bei gleichbleibender Isopropanol-Konzentration) die Aggregation noch stärker verringert bzw. verhindert.



**Abbildung 4.22:** Einfluß der Isopropanol-Konzentration und des pH-Wertes auf den Oligomerisierungsgrad der H<sub>6</sub>-BTL-2. Die Ergebnisse stellen jeweils den Mittelwert von 30-50 Messungen dar. Der Puffer der Proteinstammlösung enthielt 20 mM Tris/HCl (pH = 7.0/9.0) + 90 mM Imidazol + 2 mM LDAO sowie 2.5-30 % Isopropanol.

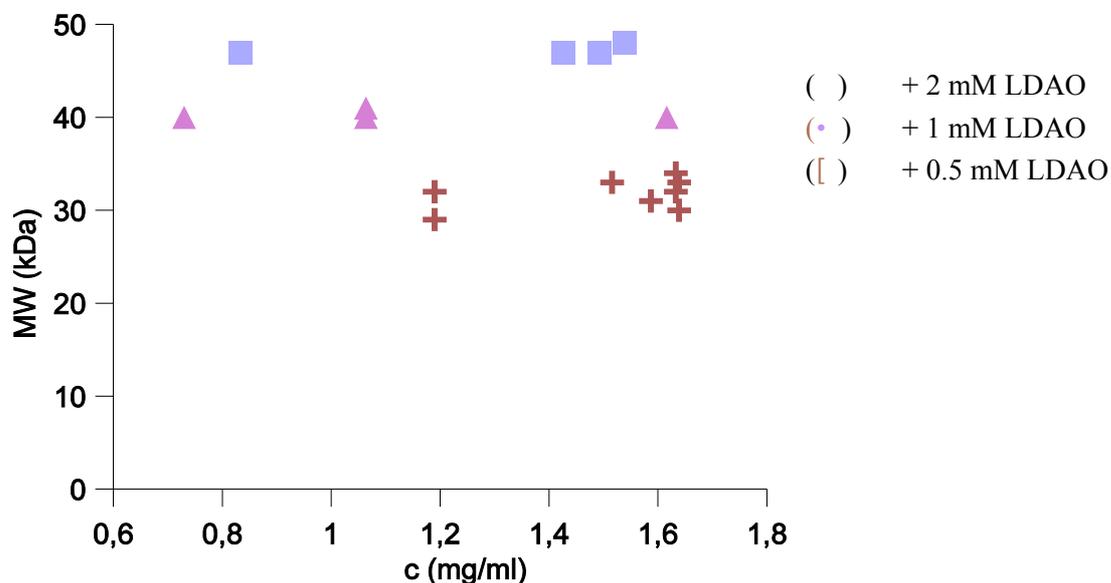
Bei einer genaueren Untersuchung des Oligomerisierungsverhaltens der  $H_6$ -BTL-2 in einem Konzentrationsbereich von 5 bis 10 % Isopropanol und einem pH-Wert von 9.0 konnte bei einer Konzentration von 7.5 und 10 % eine leichte Tendenz zur Dimerisierung beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 5 % lag die  $H_6$ -BTL-2 nur in Monomerform vor (Abbildung 4.23). Für die in 5 % Isopropanol konzentrierte  $H_6$ -BTL-2 wurde ein Radius von  $(3.1 \pm 0.8)$  nm und ein Molekulargewicht von 45 kDa berechnet. Die *baseline* beträgt 1.001 und der *SOS*-Fehler 1.369. Somit kann festgestellt werden, daß mit einem Zusatz von 5 % Isopropanol bei einem pH-Wert von 9.0 die  $H_6$ -BTL-2 in Monomerform konzentriert werden kann.



**Abbildung 4.23:** Einfluß der Isopropanol-Konzentration auf den Oligomerisierungsgrad der  $H_6$ -BTL-2 bei einem pH-Wert von 9.0. Die Ergebnisse stellen jeweils den Mittelwert von 30-50 Messungen dar. Der Puffer der Proteinstammlösung enthielt 20 mM Tris/HCl (pH = 9.0) + 90 mM Imidazol + 2 mM LDAO sowie 5-10 % Isopropanol.

Durch mehrfaches Umpuffern wurde nach dem Konzentrieren die Konzentration an Imidazol und LDAO verringert. Nach dem ersten Umpufferungsschritt enthielt der Puffer der konzentrierten Proteinstammlösung 10 mM Tris/HCl (pH = 9.0) + 45 mM Imidazol + 1 mM LDAO. In diesem Puffer wurde für die konzentrierte H<sub>6</sub>-BTL-2 ein Radius von (3.2 ± 0.5) nm und ein Molekulargewicht von 40 kDa berechnet. Die *baseline* betrug 1.001 und der *SOS-Fehler* 0.726. Nach dem zweiten Umpufferungsschritt enthielt der Puffer der konzentrierten Proteinstammlösung 10 mM Tris/HCl (pH = 9.0) + 20 mM Imidazol + 0.5 mM LDAO. In diesem Puffer wurde für die aufkonzentrierte H<sub>6</sub>-BTL-2 nur noch ein Radius von (2.6 ± 0.7) nm und ein Molekulargewicht von 30 kDa berechnet. Die *baseline* betrug 1.002 und der *SOS-Fehler* 1.914. Die Änderung der berechneten Molekulargewichte während der Umpufferung sind in Abbildung 4.24 dargestellt.

Es zeigt sich, daß das Molekulargewicht der H<sub>6</sub>-BTL-2 nach der ersten Umpufferung 8 kDa und nach der zweiten Umpufferung 17 kDa niedriger ist als das in der nicht-umgepufferten Lösung mit 48 kDa (Radius:(3.2 ± 0.7) nm, *baseline*: 1.001, *SOS-Fehler*: 0.845).



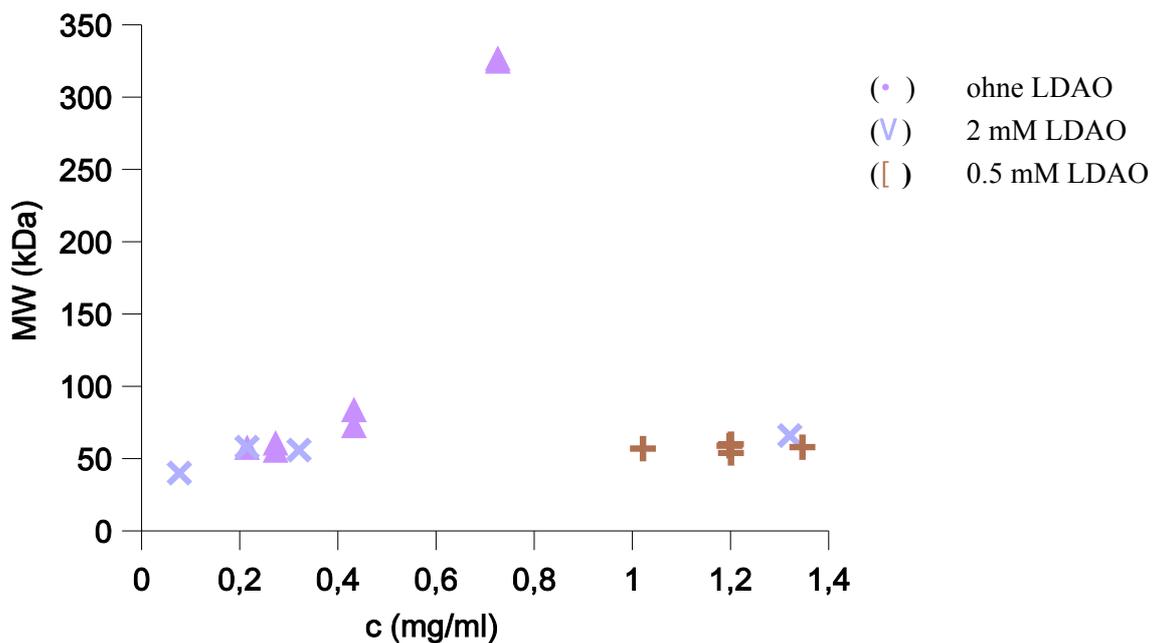
**Abbildung 4.24:** Änderung des Oligomerisierungsgrads der H<sub>6</sub>-BTL-2 bei der Umpufferung. Die Ergebnisse stellen jeweils den Mittelwert von 30-50 Messungen dar. Der Puffer der Proteinstammlösung enthielt 20 mM Tris/HCl (pH = 9.0) + 90 mM Imidazol + **2 mM LDAO** + 5 % Isopropanol (□), bzw. 20 mM Tris/HCl (pH = 9.0) + 45 mM Imidazol + **1 mM LDAO** + 5 % Isopropanol (△), bzw. 20 mM Tris/HCl (pH = 9.0) + 20 mM Imidazol + **0.5 mM LDAO** + 5 % Isopropanol (×).

Die kritische Micellenkonzentration (*cmc*) von LDAO beträgt 2 mM. Bei einem Molekulargewicht von 229.4 g/mol pro LDAO-Monomer und einer Anzahl von 73 Monomeren pro Micelle ergibt sich für eine Micelle ein Molekulargewicht von 16.7 kDa (Ducruix et al., 1999). Bei den bis zur Umpufferung durchgeführten Messungen lag die LDAO-Konzentration bei 2 mM und somit im Bereich der Micellenbildung. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß ein H<sub>6</sub>-BTL-2-Monomer mit einer LDAO-Micelle einen Komplex gebildet hat, der sich erst nach der Umpufferung und der damit verbundenen Verringerung der LDAO-Konzentration und dem Zerfall der LDAO-Micelle auflöst. Somit wurde bei den Messungen der dynamischen Lichtstreuung bis zur Umpufferung ein Komplex gemessen, der 17 kDa größer ist als das eigentliche H<sub>6</sub>-BTL-2-Monomer. Der globuläre Auswertungsmodus, bei dem für den Komplex aus H<sub>6</sub>-BTL-2 und LDAO ein Molekulargewicht um 48 kDa und für das H<sub>6</sub>-BTL-2-Monomer ein Molekulargewicht von 31 kDa berechnet wurde, kann somit nicht das passende Modell für die H<sub>6</sub>-BTL-2 sein. Vielmehr entspricht ein Auswertungsmodus mit einem Hämolegumin-Modell dem bekannten Molekulargewicht von 44 kDa.

Da LDAO keine Rolle bei der Konzentrierung zu spielen schien, wurde in einem weiteren Versuch versucht, die H<sub>6</sub>-BTL-2 nur mit Isopropanol ohne einen LDAO-Zusatz in einem Proteinpuffer aus 10 mM Tris/HCl (pH = 9.0) + 90 mM Imidazol + 5 % Isopropanol zu konzentrieren (Abbildung 4.25). Dabei zeigte sich deutlich, daß schon bei einer Proteinkonzentration von 0.5 mg/ml eine deutliche Oligomerisierung zu beobachten war. Wurde die Proteinlösung aber vor der Konzentrierung zusätzlich mit einem 2 mM LDAO-Zusatz versetzt, oligomerisierte die H<sub>6</sub>-BTL-2 nicht mehr. Nach der Konzentrierung konnte der LDAO-Zusatz wieder entfernt werden, ohne daß die H<sub>6</sub>-BTL-2 oligomerisierte.

Dies bedeutet, daß für eine Konzentrierung in Monomerform neben einem Isopropanol-Zusatz LDAO während des Konzentrierungsvorgangs benötigt wird, aber nicht für die Stabilisierung im konzentrierten Zustand.

Der oben postulierte Zerfall des H<sub>6</sub>-BTL-2/LDAO-Komplexes konnte bei diesem Experiment während der Umpufferung nicht beobachtet werden. Dies könnte damit erklärt werden, daß bei dem beschriebenen Experiment eine H<sub>6</sub>-BTL-2-Charge verwendet wurde, die schon ohne einen LDAO-Zusatz gereinigt wurde. Dies würde bedeuten, daß sich der H<sub>6</sub>-BTL-2/LDAO-Komplex zum einen während der Reinigung gebildet hat und zum anderen nicht durch einen späteren LDAO-Zusatz erzeugt werden kann.



**Abbildung 4.25:** Einfluß von LDAO auf den Oligomerisierungsgrad der H<sub>6</sub>-BTL-2. Die Ergebnisse stellen jeweils den Mittelwert von 30-50 Messungen dar. Der Puffer der Proteinstammlösung enthielt 20 mM Tris/HCl (pH = 9.0) + 90 mM Imidazol + 5 % Isopropanol (•), bzw. + 2 mM LDAO (∇), bzw. + 0.5 mM LDAO (⊕).

Neben dem Zusatz von Isopropanol und der Verwendung von LDAO wurde die Wirkung von 100 mM der nicht-detergierend wirkenden Sulfobetaine NDSB 195 und NDSB 210 getestet. Dabei zeigte sich, daß durch den Zusatz von NDSB 195 bzw. 201 die Löslichkeit der H<sub>6</sub>-BTL-2 deutlich auf 3.4 mg/ml bzw. 3.8 mg/ml erhöht werden konnte. Weitere Untersuchungen zum Einfluß der Sulfobetaine auf das Oligomerisierungsverhalten der H<sub>6</sub>-BTL-2 wurden an dieser Stelle noch nicht durchgeführt.

## 4.2.6 Kristallisation der H<sub>6</sub>-BTL-2

### 4.2.6.1 Kristallisation der oligomerisierten H<sub>6</sub>-BTL-2

Für die Kristallisationsversuche der oligomerisierten H<sub>6</sub>-BTL-2 wurden die in folgenden Protein-stammlösungen konzentrierte H<sub>6</sub>-BTL-2 verwendet:

- & 20 mM Tris/HCl (pH = 8.5) + 100/500 mM NaCl + 1 % (w/v) Na-cholat
- & 20 mM Tris/HCl (pH = 8.5) + 50/200 mM Imidazol
- & 50 mM Tris/HCl (pH = 7.0) + 200 mM Imidazol + 500 mM NaCl + 0.1 % (w/v) LDAO

Um die Bedingungen zu ermitteln, bei der die H<sub>6</sub>-BTL-2 kristallisiert, wurden nach den *Screening*-Methoden von Jancarik und Kim (1991) und Cudney et al. (1994) faktorielle *Screens* mit 196 Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet (*Screen 1*, *Screen 2*, *Screen 1 lite*, *Screen 2 lite*, Hampton Research). Für die Reproduktion und Optimierung der Kristallisation(sversuche) sowie für die Suche nach neuen Kristallisationsbedingungen wurden durch Variation des pH-Wertes und der Fällungsmittelkonzentration systematische Kristallisationsansätze durchgeführt. Für das *Screening* wurde die *sitting-drop*-Variante der Dampfdiffusionsmethode bei 293 K angewendet. Dabei wurden 2-6 µl Proteinlösung mit 2-3 µl Reservoirlösung versetzt. Die Konzentration der Proteinlösung betrug 1.5 bis 2 mg/ml. Bei diesen Versuchen wurden ungefähr 1.500 Kristallisationsansätze durchgeführt. Bei einer Vielzahl dieser Ansätze präzipitierte die H<sub>6</sub>-BTL-2 in diffuser Form. Die Präzipitation konnte durch eine Verringerung der verwendeten Fällungsmittelkonzentration in den jeweiligen Reservoirlösungen (*lite-Screens*) sowie durch die Verwendung des Detergenzes Lauryldimethylaminoxid (LDAO) verringert werden.

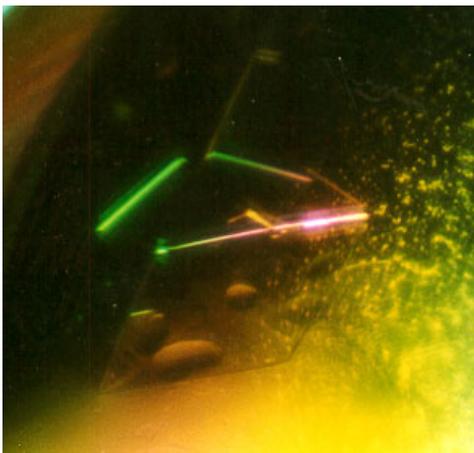
Eine Kristallisation der H<sub>6</sub>-BTL-2 gelang dabei aus folgenden Lösungen:

- & 10 % Ethanol + 1.5 M NaCl innerhalb von sechs Wochen
- & 5 % Isopropanol + 0.1 M HEPES (pH = 7.5) + 10 % PEG 4000 + 1 % Octyl-β-D-glucopyranosid innerhalb von 2 Stunden

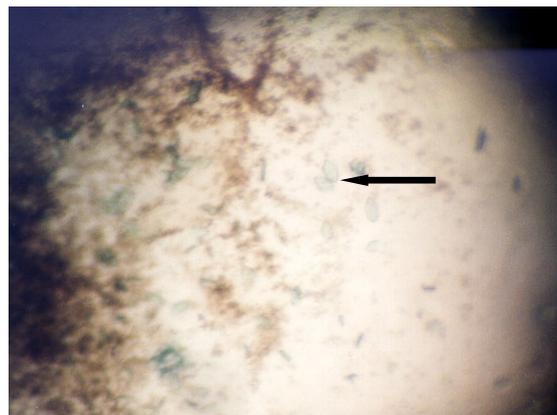
Bilder der erhaltenen Kristalle sind in Abbildung 4.26 dargestellt. Eine Reproduktion der Kristallisation gelang leider nicht. Für die Durchführung eines Röntgenbeugungsexperimentes (s. Kap. 4.2.7.1) konnten aufgrund der Größe nur die erstgenannten Kristalle verwendet werden.

Bei den Kristallisationsansätzen bildeten sich eine Vielzahl weiterer Kristalle. Um zu entscheiden, ob es sich bei den gefundenen Kristallen um Proteinkristalle handelte oder nicht, wurde versucht die Kristalle mit der Proteinfärbelösung *IzIt* anzufärben, was nicht gelang. Eine Auswahl der Kristalle wurde für verschiedene Röntgenbeugungsexperimente verwendet. Dabei wurden proteinuntypische Reflexmuster mit wenigen, weitauseinanderliegenden Reflexen erhalten, aus denen sich z.B. die Gitterkonstanten  $a \cdot 150 \text{ \AA}$ ,  $b \cdot 20 \text{ \AA}$  und  $c \cdot 10 \text{ \AA}$  für die untersuchten Kristalle berechnen ließen. Diese Merkmale wiesen darauf hin, daß es sich bei diesen Kristallen um Salz- und/oder Detergenzkristalle handelte.

a) Kristallplättchen (mit Polarisationsfilter)



b) Kristallplättchen (angefärbt mit *IzIt*)



c) verwachsene Kristallcluster (mit Polarisationsfilter)



**Abbildung 4.26:** Kristalle der oligomerisierten  $H_6$ -BTL-2.

#### 4.2.6.2 (Quasi-) Kristallisation der monomeren H<sub>6</sub>-BTL-2

Für die Kristallisationsversuche der monomeren H<sub>6</sub>-BTL-2 wurde die in der folgenden Protein-stammlösung konzentrierte H<sub>6</sub>-BTL-2 verwendet:

20 mM Tris/HCl (pH = 9.0) + 20 mM Imidazol + 0.5 mM LDAO + 5 % Isopropanol

Um die Bedingungen zu ermitteln, bei der die monomere H<sub>6</sub>-BTL-2 kristallisiert, wurden nach den *Screening*-Methoden von Jancarik und Kim (1991) und Cudney et al. (1994) 98 Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet. Für das *Screening* wurde die *sitting-drop*-Variante der Dampfdiffusionsmethode bei 293 K angewendet. Dabei wurden 2 µl Proteinlösung mit 2 µl Reservoirlösung versetzt. Die Konzentration der Proteinlösung betrug 2 mg/ml. Die verwendeten Reservoirlösungen wurden bei jedem Ansatz mit 5 % Isopropanol versetzt.

Eine erste reproduzierbare Quasikristallisation gelang dabei aus einer Lösung mit 30 % PEG 1500 + 5 % Isopropanol innerhalb von wenigen Stunden. Für die Optimierung der Kristallisation wurden neun PEGs mit unterschiedlicher Größe (400-20.000 Da) und variierender Konzentration (5-45 %) bei unterschiedlichen pH-Werten (4.6-9.0) verwendet. Zusätzlich wurde der Einfluß von 72 verschiedenen Detergenzien (*detergent screens* 1-3) und 72 unterschiedlichen Additiven (*additive screens* 1-3) sowie einer Temperaturänderung (4°C, 12°C, 20°C, 25°C, 37°C) auf die Kristallisation untersucht.

Dabei konnten in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Reservoirlösung neben der Präzipitation und Phasentrennung der Protein- und der Reservoirlösung sowohl die Bildung von Quasikristallen ohne scharfe Formen als auch die Bildung von Kristallen mit klarer Form und scharfen Ecken und Kanten beobachtet werden. Überraschend war hierbei die gelartige Konsistenz aller gefundenen (Quasi-) Kristalle, welche die Montage und die anschließende Röntgendiffraktionsmessung verhinderte. Bilder der erhaltenen (Quasi-) Kristalle sind in Abbildung 4.27 dargestellt. Die besten Kristallisationsbedingungen wurden bei Raumtemperatur gefunden und waren wie folgt:

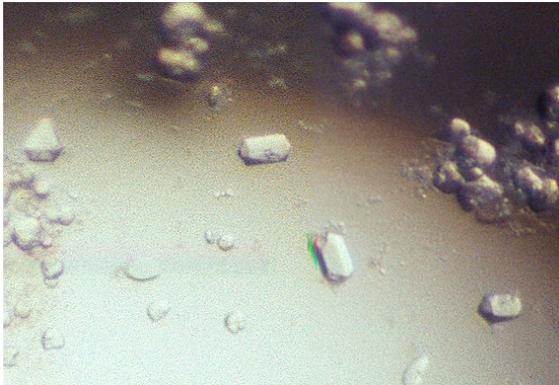
25-35 % PEG 1500 + 5 % Isopropanol + 4 % Acetonitril

25-35 % PEG 1500 + 5 % Isopropanol + 3 % MPD

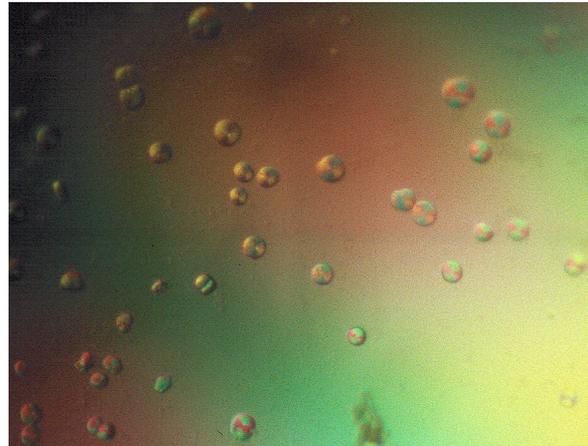
25-35 % PEG 1500 + 5 % Isopropanol + 4 % tert. Butanol

Um eine erhöhte mechanische Stabilität der H<sub>6</sub>-BTL-2-Kristalle zu erhalten, wurde versucht eine Quervernetzung der einzelnen Monomere durch eine durch Glutardialdehyd vermittelte kovalente Verknüpfung zu erreichen (Govardhan, 1999). Dabei wurde das flüchtige Glutardialdehyd auf den Rand der Kristallisationsbrücke neben dem Tropfens pipettiert. Leider lösten sich die (Quasi-) Kristalle nach Zugabe des Glutardialdehyds innerhalb weniger Stunden wieder auf.

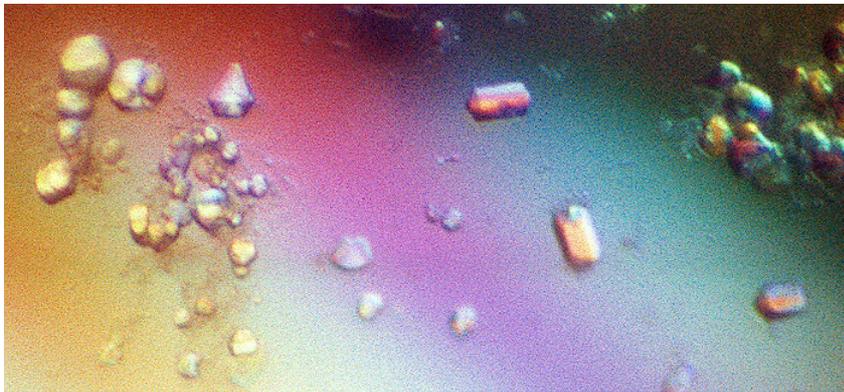
a) (Quasi-) Kristalle (ohne Polarisationsfilter)



b) Quasikristalle (mit Polarisationsfilter)



c) (Quasi-) Kristalle aus a) (mit Polarisationsfilter)

**Abbildung 4.27:** Kristalle der monomeren H<sub>6</sub>-BTL-2.

Die H<sub>6</sub>-BTL-2 weist das Phänomen der Interphasenaktivierung auf (Schmidt-Dannert, 1994). Daher ist davon auszugehen, daß die H<sub>6</sub>-BTL-2 eine Lid-Struktur besitzt, die das aktive Zentrum bedeckt (s. Kap. 1.3). Durch die Inhibierung der H<sub>6</sub>-BTL-2 mit dem Inhibitor Diethyl-p-Nitrophenylphosphat (E 600) wurde versucht eventuelle flexible Bereiche in der Lid-Struktur zu fixieren. Bei E 600 handelt es sich um ein nicht- hydrolysierbares Substratanalogon, das eine Phosphorsäureesterbindung anstatt der Carbonsäureesterbindung besitzt, welche nicht durch Lipasen gespalten werden kann. Durch die Zugabe von E 600 wurde die Lipase fast vollständig deaktiviert (Restaktivität: 1 U/ml). Die Ergebnisse der durchgeführten Kristallisationsansätze unterschieden sich aber nicht von den bisherigen Versuchen und führten zu keiner Verbesserung der Kristallisation.

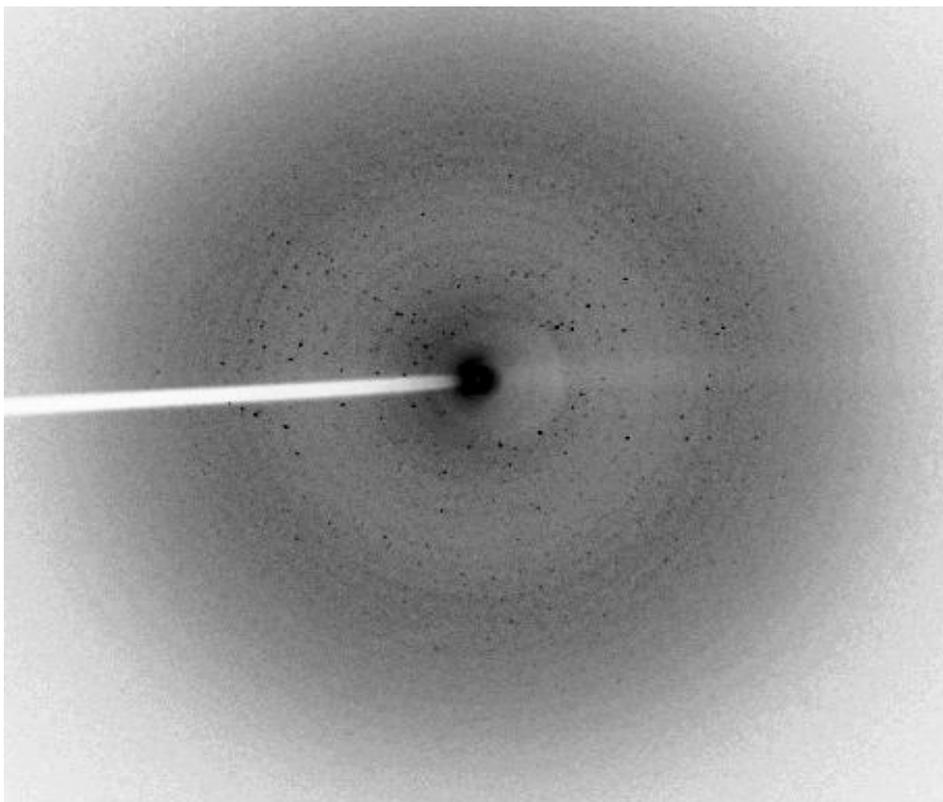
## 4.2.7 Röntgendiffraktometrie

### 4.2.7.1 Röntgendiffraktometrie der oligomernierten $H_6$ -BTL-2 -Kristalle

Für die Messung eines Diffraktionsdatensatzes wurden Kristalle, die unter der folgenden Kristallisationsbedingung gewachsen waren, verwendet (s. Kap. 4.2.6.1):

10 % Ethanol + 1.5 M NaCl

Dieser erste Testdatensatz wurde bei Raumtemperatur an einer Drehanode der Fa. Nonius und einer MacScience Bildspeicherplatte mit der im Institut befindlichen Röntgenanlage gemessen. Das Bild einer Beugungsaufnahme ist in Abbildung 4.28 dargestellt.



**Abbildung 4.28:** Beugungsaufnahme eines primitiv orthorhombischen Kristalls der  $H_6$ -BTL-2. Die Daten wurden mit  $Cu-K\alpha$ -Strahlung unter Verwendung einer Nonius-Drehanode, eines MAC-XOS Doppelspiegelmonochromators und einer MacScience Bildspeicherplatte aufgenommen.

Meßbedingungen: Temperatur: 293 K, Kristall-Detektor-Abstand: 150 mm, Drehung pro Aufnahme:  $1^\circ$ , Belichtungszeit pro Aufnahme: 1200 sec.

Die bei der Röntgenmessung erhaltenen Daten wurden mit XDISPLAY F, DENZO und SCALEPACK aus dem HKL-Software-Paket (Otwinowski und Minor, 1997) und weiteren Programmen aus dem CCP4-Paket (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) prozessiert. Dabei wurden die Daten zunächst mit DENZO indiziert und integriert und anschließend mit SCALEPACK skaliert.

Die H<sub>6</sub>-BTL-2 kristallisierte in der primitiv orthorhombischen Raumgruppe *P222* mit den folgenden Gitterparametern:

Kristallsystem: primitiv orthorhombisch (*P222*)  
 Gitterkonstanten  $a = 56.4 \text{ \AA}$ ,  $b = 73.5 \text{ \AA}$ ,  $c = 127.4 \text{ \AA}$   
 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

Der Datensatz konnte in der höchsten Auflösungsschale bis zur einer Auflösung von  $3.3 \text{ \AA}$  mit einem  $R_{\text{sym}}$ -Wert von 50.5 % und einem Signal-Rausch-Verhältnis von  $I/\sigma = 2.0$  ausgewertet werden. Die Mosaizität betrug  $0.8^\circ$ . Die Statistik des Datensatzes ist in Tabelle 4.13 dargestellt

## 4.2.8 Bestimmung der Raumgruppe

Die Bestimmung der genauen Raumgruppe ergab sich aus der Skalierung der Daten und der Untersuchung der systematischen Auslöschungen einzelner Reflexe. Hierbei zeigte sich, daß die für die Raumgruppen *P222*<sub>1</sub> bzw. *P2*<sub>1</sub>*2*<sub>1</sub>*2* speziellen Reflektionsbedingungen mit  $l = 2n$  für *h0l* und  $l = 2n$  für *0kl* bzw.  $h + k = 2n$  für *hk0* nicht erfüllt wurden. Somit kamen nur die Raumgruppen *P222* und *P2*<sub>1</sub>*2*<sub>1</sub>*2*<sub>1</sub> als richtige Lösungen in Frage. Für die Raumgruppe *P222* existieren keine allgemeinen oder speziellen Reflektionsbedingungen. Für die Raumgruppe *P2*<sub>1</sub>*2*<sub>1</sub>*2*<sub>1</sub> gelten die allgemeinen Bedingungen  $h = 2n$  für *h00*,  $k = 2n$  für *0k0* und  $l = 2n$  für *00l*.

Für die Unterscheidung zwischen *P222* und *P2*<sub>1</sub>*2*<sub>1</sub>*2*<sub>1</sub> waren leider nur eine begrenzte Anzahl an Reflexen mit den *hkl*-Tripeln *h00* (3), *0k0* (13) und *00l* (5) vorhanden. Aus diesen Reflexen konnte auf die Raumgruppe *P2*<sub>1</sub>*2*<sub>1</sub>*2*<sub>1</sub> als Raumgruppe geschlossen werden, die drei Schraubenachsen besitzt. In Tabelle 4.14 sind die Ergebnisse der Unterscheidung zwischen den Raumgruppen *P222* und *P2*<sub>1</sub>*2*<sub>1</sub>*2*<sub>1</sub> dargestellt.

Wellenlänge [Å]	1.5148
Raumgruppe	<i>P</i> 222
Zellkonstanten	56.4 Å b = 73.5 Å c = 127.4 Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Auflösungsbereich [Å]	100-3.30
Anzahl der Observationen	20 365
Anzahl der Observationen ( $I / \sigma \geq 1$ )	18 671
Anzahl unabhängiger Reflexe	7713
Multiplizität	2.6
Multiplizität (erste Schale; [Å])	2.7 (100-7.11)
Multiplizität (letzte Schale; [Å])	2.6 (3.42-3.30)
$I / \sigma$	4.6
$I / \sigma$ (erste Schale)	8.3
$I / \sigma$ (letzte Schale)	2.0
Vollständigkeit [%]	91.7
Vollständigkeit [%] (erste Schale)	84.4
Vollständigkeit [%] (letzte Schale)	89.6
$R_{\text{sym}}$ [%]	25.1
$R_{\text{sym}}$ [%] (erste Schale)	13.0
$R_{\text{sym}}$ [%] (letzte Schale)	50.5

**Tabelle 4.13:** Statistik des nativen Datensatzes der H<sub>6</sub>-BTL-2. Die Messung sollte ursprünglich lediglich zur Überprüfung des Streuvermögens der erhaltenen Proteinkristalle dienen. Da eine Indizierung aber möglich erschien, wurde diese mit den vorhandenen Daten durchgeführt.

allgemeine Reflektionsbedingung	gemessene mittlere Intensitäten	
h00 mit $h = 2n$	$h = 2n$	$I/\sigma_I = 0.78$
	$h = 2n$	$I/\sigma_I = -0.60$
0k0 mit $k = 2n$	$k = 2n$	$I/\sigma_I = 1.92$
	$k = 2n$	$I/\sigma_I = -0.70$
00l mit $l = 2n$	$l = 2n$	$I/\sigma_I = 2.24$
	$l = 2n$	$I/\sigma_I = 0.13$

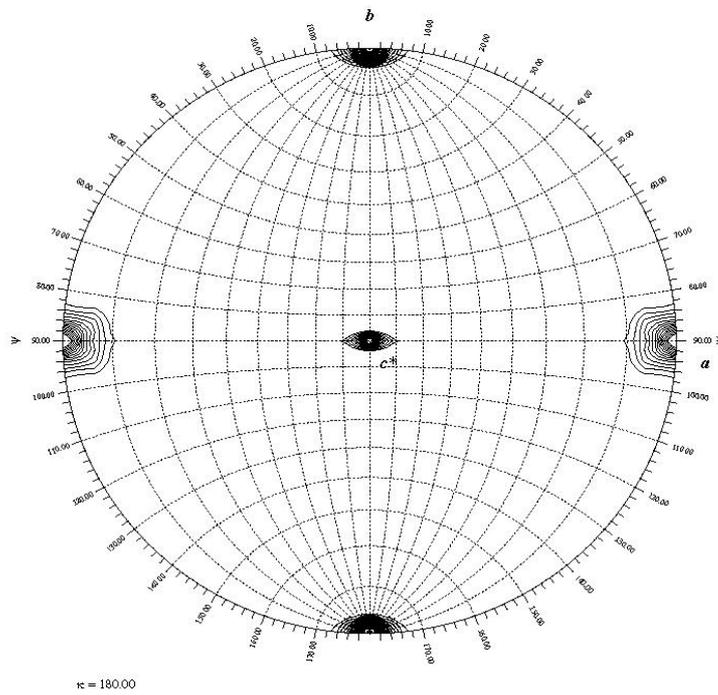
**Tabelle 4.14:** Bestimmung der genauen Raumgruppe. Dargestellt sind die allgemeinen Reflektionsbedingungen für die Raumgruppe  $P2_12_12_1$  und die gemessenen mittleren Intensitäten der jeweiligen Reflexe.

## 4.2.9 Untersuchungen der Kristallpackung

Die Berechnung der Packungsdichte des Kristalls der oligomerisierten H<sub>6</sub>-BTL-2 wurde mit dem Programm MATTHEWS\_COEF (CCP4, 1994; Matthews, 1968) durchgeführt. Unter der Annahme, daß sich ein Monomer in der asymmetrischen Einheit befindet und mit einer berechneten Proteindichte von 1.34 %, ergab sich für die Packungsdichte der Kristallpackung ein sinnvoller  $V_M$ -Wert von 2.99 Å<sup>3</sup>/Da und ein Lösemittelanteil von 58 %.

## 4.2.10 Rechnungen zur Selbstrotationsfunktion

Aus der Untersuchung der Kristallpackung hatte sich ergeben, daß sich wahrscheinlich ein Monomer in der asymmetrischen Einheit befindet. Deshalb sollten in der Selbstrotationsfunktion neben den kristallographischen Achsen keine weiteren nicht-kristallographischen Achsen vorhanden sein. Um dies zu überprüfen wurden mit GLRF (Tong & Rossmann, 1997) Selbstrotationsfunktionen im Bereich von  $\kappa = 0-360^\circ$  berechnet. Dabei wurden wie erwartet die drei zweizähligen kristallographischen Achsen bei  $\kappa = 180^\circ$  und keine weiteren NCS-Achsen gefunden. Die Karte der Selbstrotationsfunktion bei  $\kappa = 180^\circ$  ist in Abbildung 4.29 dargestellt.



**Abbildung 4.29:** Karte der Selbstrotationsfunktion bei  $\kappa = 180^\circ$  für die H<sub>6</sub>-BTL-2. Es wurden Daten von 20 bis 3 Å für die Berechnung verwendet.



# 5. Diskussion

## 5.1 Die R-ADH-Lb-G37D

### 5.1.1 Reinigung und Kristallisation der R-ADH-Lb-G37D

Für die R-ADH-Lb-G37D konnte ein vierstufiges Reinigungsprotokoll entwickelt werden, welches die Reinigung der R-ADH-Lb-G37D bis zur Homogenität ermöglicht. Dieses neue Protokoll besitzt gegenüber der bisherigen Reinigungsstrategie, die für das Wildtyp-Enzym entwickelt wurde (Riebel, 1996) und dann auf die Mutante übertragen wurde (Weitz, persönliche Mitteilung) eine Reihe von Vorteilen:

1. Die Ausbeute bezogen auf die Gesamtaktivität ist deutlich höher (11.5 % zu 2.2 %).
2. Die Ausbeute bezogen auf die Enzymmenge ist höher (2.5 % zu 1.6 %).
3. Der Reinigungsfaktor ist deutlich höher (4.7 zu 1.4).
4. Das die Aktivität verringernde Ammoniumsulfat wurde bei der Reinigung durch Natriumsulfat ersetzt, welches die Aktivität nicht beeinflusst.
5. Das neuentwickelte Protokoll ist leicht reproduzierbar.

Die erzielte Reinheit der R-ADH-Lb-G37D und R-ADH-Lb waren vergleichbar gut. Die Kristallisation der R-ADH-Lb-G37D erfolgte hingegen innerhalb von sechs Stunden bis zu einer Woche und war damit deutlich kürzer als der unter vergleichbaren Bedingungen für den Wildtyp beschriebene Zeitraum von zwei bis drei Monaten (Müller, 2000). Neben einer Erhöhung der Proteinkonzentration von 15 mg/ml (R-ADH-Lb) auf 21 mg/ml (R-ADH-Lb-G37D) innerhalb der bei der Kristallisation verwendeten Proteinstammlösung kann dies durchaus auf den Verzicht des die R-ADH-Lb und R-ADH-Lb-G37D inaktivierenden Ammoniumsulfats während der Reinigung zurückgeführt werden. Zusätzlich scheint die Homogenität auf der Ebene der Aggregation bei der durch das neue Protokoll gereinigten R-ADH-Lb-G37D besser zu sein als bei der R-ADH-Lb, wie Messungen der dynamischen Lichtstreuung zeigten.

Der Versuch der Co-Kristallisation eines ternären Komplexes der Wildtyp-R-ADH-Lb mit oxidiertem Substrat (Acetophenon) und oxidiertem Cofaktor (NADP) verlief bisher nicht zufriedenstellend (Müller, 2000). Unter Verwendung des reduzierten Substrates R,S-Phenylethanol in Kombination mit dem oxidierten oder reduzierten Cofaktor NAD(H) konnte hingegen die Kristallisation des ternären Komplexes der R-ADH-Lb-G37D erreicht werden.

Interessanterweise unterscheidet sich die für den Komplex des Wildtyps beschriebene optimale Kristallisationsbedingung sowohl in Bezug auf die verwendete Fällungsmittelkonzentration als auch auf den pH-Wert deutlich von der gefundenen Kristallisationsbedingung für den ternären Komplex der Mutante. Für die erfolgreiche Kristallisation des ternären Komplexes der R-ADH-Lb-G37D wird eine 4 % höhere Fällungsmittelkonzentration und ein 2 bis 2.5 Einheiten niedrigerer pH-Wert verwendet als bei der R-ADH-Lb. Die für die R-ADH-Lb als optimal beschriebenen Kristallisationsbedingungen sowie die erfolgreichen Kristallisationsbedingungen der RADH-Lb-G37D sind wie folgt:

- R-ADH-Lb-G37D:  
35 % PEG 400 + 0.1 M HEPES/NaOH (pH = 7.0) + 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
+ 50 mM Phenylethanol + 25 mM NADH/NAD  
  
25 % PEGMME 550 + 0.1 M HEPES/NaOH (pH = 6.5-7.0) + 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
+ 50 mM Phenylethanol + 25 mM NADH/NAD
- R-ADH-Lb:  
21 % PEGMME 550 + 0.1 M Tris/HCl (pH = 8.9) + 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
+ 30-50 mM Acetophenon + 10-25 mM NADP

### 5.1.2 Röntgendiffraktometrie der R-ADH-Lb-G37D

Für den ternären Komplex der R-ADH-Lb-G37D konnten vier verschiedene Datensätze gemessen werden, deren Qualität jeweils zufriedenstellend war. In der höchsten Auflösungsschale konnten diese Datensätze bis 1.78, 1.55, 1.10 und 1.05 Å gemessen werden und liegen damit bei den beiden letztgenannten im atomaren Bereich. Das Signal-Rausch-Verhältnis betrug dabei 4.3, 1.5, 9.4 und 5.2. Hieraus ist ersichtlich, daß das Streuvermögen der Kristalle bei den hochauflösenden Aufnahmen, die am *European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)* in Grenoble aufgenommen wurden, noch nicht erschöpft war und die Aufnahme noch höher aufgelöster Daten möglich gewesen wäre. Ein gutes Streuvermögen wiesen schon die Kristalle des R-ADH-Lb-Wildtyps auf, von denen am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY) in Hamburg ein Datensatz bis 0.99 Å aufgenommen werden konnte (Müller, 2000).

Die Kristalle der vier ternären Komplexe kristallisierten alle in der Raumgruppe *I222* und wiesen mit  $a = 55.73 \pm 0.13$  Å,  $b = 79.76 \pm 0.09$  Å,  $c = 112.85 \pm 0.13$  Å und  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  nahezu identische Gitterparameter auf. Der ebenfalls in der Raumgruppe *I222* kristallisierte Wildtyp der R-ADH-Lb weist sehr ähnliche Gitterparameter mit  $a = 55.99$  Å,  $b = 80.11$  Å und  $c = 114.59$  Å auf (Müller, 2000).

### 5.1.3 Strukturlösung und Verfeinerung der Strukturen

Für die Strukturlösung der R-ADH-Lb-G37D mittels molekularen Ersatzes wurde der Wildtyp der in der Raumgruppe *I*222 kristallisierten R-ADH-Lb als Suchmodell verwendet. Dabei wurden für die in der Raumgruppe *P*1 kristallisierte R-ADH-Lb-G37D zunächst die notwendigen Kreuzrotations- und Translationsrechnungen sowie eine Starre-Körper-Verfeinerung durchgeführt, um das Suchmodell innerhalb der Elementarzelle korrekt zu positionieren. Bei der ausschließlich mit CNS\_SOLVE durchgeführten Strukturverfeinerung führte besonders die Erzeugung der zwei innerhalb der Elementarzelle liegenden Tetramere und der Wassereinbau zu einer deutlichen Verringerung der R-Werte und somit zu einer Verbesserung des Strukturmodells. Zu Beginn der Verfeinerung war der Bereich von Aminosäure 35 bis 46 schlecht in die 2fofc-Elektronendichte des Monomers eingepaßt und wurde daher manuell in O angepaßt. Nach einer mit *simulated annealing* durchgeführten Verfeinerung war der genannte Bereich aber wieder aus der Elektronendichte entfernt. Erst durch den folgenden Verfeinerungsschritt ohne *simulated annealing* konnte der Strukturbereich zufriedenstellend in die Dichte eingebaut werden. Die Erzeugung der Tetramere wurde zunächst mit strikten stereochemischen Zwängen (*constraints*, Bränden et Jones, 1990) durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß innerhalb der einzelnen Monomeren die Bereiche von Aminosäure 35 bis 46 und 185 bis 210 nicht vernünftig in die 2fofc-Elektronendichte eingepaßt waren. Durch den Übergang zur Einführung flexibler stereochemischer Randbedingungen (*restraints*, Hendricksen et Konnert, 1980), die innerhalb bestimmter Grenzen eine in den verschiedenen Monomeren unabhängige Beweglichkeit einzelner Bereiche zuläßt, konnte keine Besserung erreicht werden. Erst durch die gesamte Herausnahme dieser flexiblen Bereiche aus den *constraints* und *restraints* konnte eine sinnvolle Einpaßung in die Elektronendichte erzielt werden. Der Einbau von alternativen Konformationen wurde nicht durchgeführt, da diese - sofern sie überhaupt vorlagen- bei der einer Auflösung von 2.2 Å nicht detektiert werden konnten.

Bei der Strukturlösung der in der Raumgruppe *I*222 kristallisierten, ternären Komplexe wurden die Kreuzrotations- und Translationsrechnungen nicht durchgeführt und die Koordinaten des ebenfalls in der Raumgruppe *I*222 kristallisierten Wildtyps sofort im ersten Verfeinerungsschritt verwendet. Da sich im Gegensatz zu der in *P*1 kristallisierten R-ADH-Lb-G37D nur ein Monomer in der asymmetrischen Einheit befindet, erübrigte sich die Berücksichtigung der nicht-kristallographischen Symmetrie (*constraints/restraints*). Die Verfeinerungen wurden zunächst mit CNS\_SOLVE begonnen und dann mit REFMAC weitergeführt. Im Unterschied zu REFMAC ist mit CNS\_SOLVE keine anisotrope Verfeinerung der Temperaturfaktoren und keine Generierung von lokalisierten Wasserstoffatomen möglich, so das diese zunächst nicht durchgeführt wurden. Bei den ersten Verfeinerungsschritten mit CNS\_SOLVE wurden bei allen

Datensätzen neben manuellen Anpassungen der Proteinstruktur erst die Mutation,  $Mg^{2+}$ -Ionen und Wasser sowie NADH und Substrat (Acetophenon oder Phenylethanol) eingebaut.

Im Gegensatz zum Datensatz bis zu einer Auflösung von 1.78 Å konnten bei den Datensätzen bis zu einer Auflösung von 1.55, 1.10 und 1.05 Å alternative Konformationen detektiert und eingebaut werden. Die Datensätze bis 1.55, 1.10 und 1.05 Å wurden, im Gegensatz zum Datensatz bis 1.78 Å, bei den Verfeinerungen mit REFMAC mit anisotropen Temperaturfaktoren verfeinert. Eine anisotrope Verfeinerung ist bei Strukturen mit einer Auflösung höher als 1.5 Å möglich (Kleywegt, 2000). Am Ende der Strukturverfeinerungen wurden bei den Datensätzen bis 1.78 und 1.55 Å für das Substrat, den Cofaktor und für die alternativen Konformationen die Besetzungsfaktoren angepaßt, da insbesondere für den Cofaktor deutlich erhöhte Temperaturfaktoren beobachtet wurden und für das Substrat und den Cofaktor nur schlechte 2fofc-Elektronendichten vorhanden waren. Insgesamt ergaben sich hierbei für die vier verschiedenen Strukturen die in Tabelle 5.1 aufgeführten Besetzungs- und Temperaturfaktoren für NADH und Phenylethanol/Acetophenon. Hierbei ist ersichtlich, daß Substrat und Cofaktor in der Regel einen hohen Besetzungsfaktor aufweisen. Allerdings ist das NADH bei den Datensätzen bis 1.78 Å und 1.55 Å nur zu 70 % besetzt.

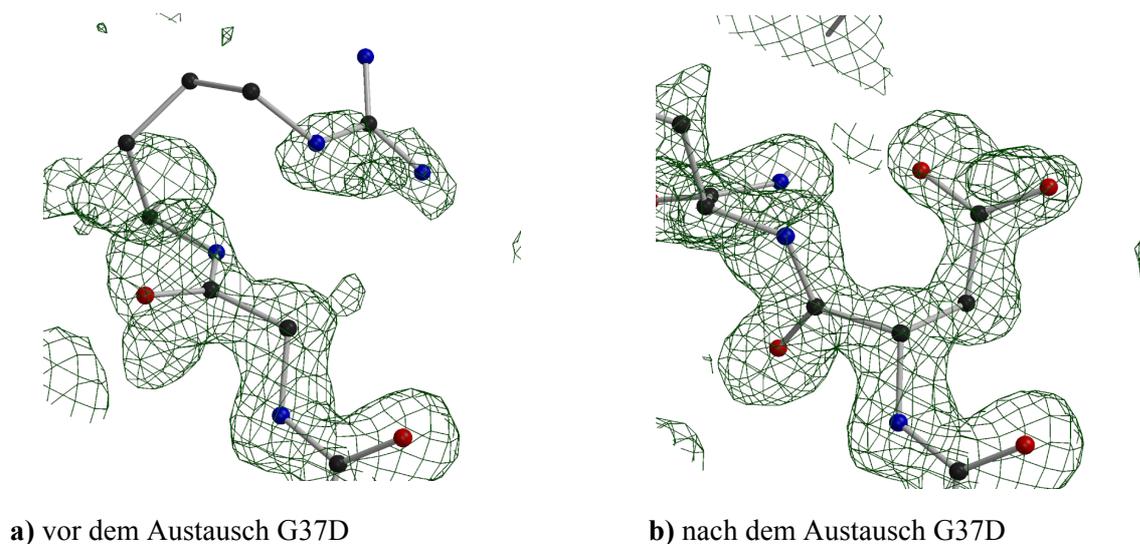
## 5.1.4 Die Struktur der R-ADH-Lb-G37D

### 5.1.4.1 Einbau der Mutation

In der 2fofc-Elektronendichte der ersten Verfeinerungszyklen war deutlich erkennbar, daß das an der Position 37 liegende Glycin die vorhandene Elektronendichte nicht ausfüllt und fälschlicherweise die Seitenkette des Arg38 in diesen Dichtebereich eingebaut worden war (Abbildung 5.1). Daher wurde nach dem ersten Verfeinerungszyklus an der Position 37 die Aminosäure Glycin gegen Aspartat ausgetauscht, so daß die Aminosäuresequenz der R-ADH-Lb-G37D vorliegt. Mit der mutierten Struktur wurden die weiteren Verfeinerungsschritte durchgeführt. In der 2fofc-Elektronendichte ist nun zu erkennen, daß die mutierte Struktur mit einem Aspartat an Position 37 gut in die Elektronendichte eingepaßt ist.

		1.78 Å	1.55 Å	1.10 Å	1.05 Å
NADH	Besetzungsfaktor	0.68	0.68	1.00	1.00
	Temperaturfaktor	42.9	40.8	65.1	65.7
Phenylethanol	Besetzungsfaktor	1.00	0.90	1.00	1.00
	Temperaturfaktor	53.0	49.3	48.2	46.7

**Tabelle 5.1:** Besetzungs- und Temperaturfaktoren für NADH und Phenylethanol/Acetophenon in der Struktur des ternären Komplexes. Die Berechnungen erfolgten mit den CNS-Skripten *qgroup* und *bindividual*.

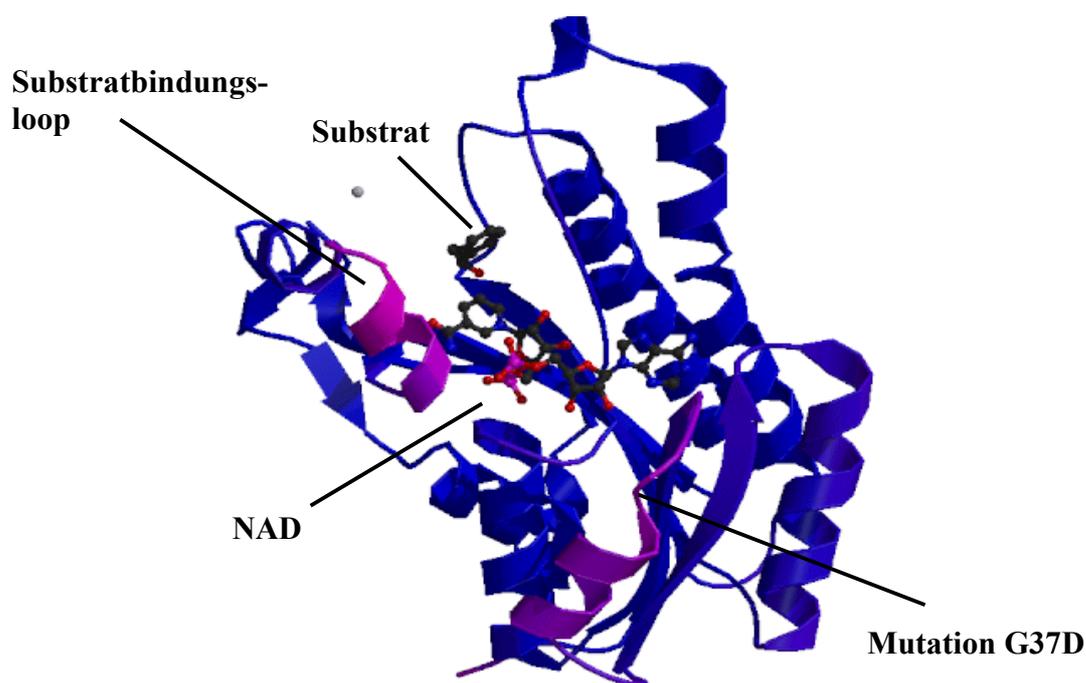


**Abbildung 5.1:** Struktur und Elektronendichte der R-ADH-Lb-G37D bei  $1\sigma$  vor (a) und nach (b) Austausch von Glycin gegen Aspartat an der Position 37. Die Abbildungen wurden mit BOBSCRIPT und RENDER erstellt.

#### 5.1.4.2 Bewegliche Bereiche innerhalb der Proteinstruktur

Um die beweglichen Bereiche und Aminosäuren innerhalb der Struktur des Apoenzyms und des ternären Komplexes der R-ADH-Lb-G37D zu bestimmen, wurde nach Regionen mit erhöhten Temperaturfaktoren gesucht. In Abbildung 5.2 ist die Struktur des ternären Komplexes der R-ADH-Lb-G37D bei einer Auflösung von  $1.05 \text{ \AA}$  mit einer Anfärbung nach isotropen Temperaturfaktoren dargestellt. Es zeigt sich, daß neben dem schon vom Wildtyp bekannten flexiblen Oberflächenloop von Aminosäure 192 bis 201, der sich in der Nähe des Substrats befindet, und dem N-terminalen Serin zusätzlich weitere Bereiche eine erhöhte Mobilität aufweisen, die sich in der Umgebung des Cosubstrats befinden. Dies wird besonders im Bereich von Aminosäure 35 bis 45, in der sich die Mutation an Position 37 befindet sichtbar. In Tabelle 5.2 ist eine Übersicht über die Verteilung der Temperaturfaktoren innerhalb der Strukturen der vier ternären Komplexe dargestellt.

Es zeigt sich, daß das Substrat und im höheren Maße das Cosubstrat im Vergleich zur Peptidhauptkette stark erhöhte Temperaturfaktoren aufweisen, was die erhöhte Flexibilität innerhalb der Bindungsregion verdeutlicht. Die Bereiche mit erhöhten Temperaturfaktoren weisen weiterhin eine deutliche Tendenz zur Bildung multipler Konformationen auf (s. Kap. 5.1.4.5).



**Abbildung 5.2:** Anfurung der Sekundurstrukturanteile des ternären Komplexes der R-ADH-Lb-G37D nach isotropen Temperaturfaktoren. Bereiche mit niedrigen Temperaturfaktoren sind blau und Bereiche mit hohen Temperaturfaktoren sind rot angefärbt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

	1.78 A	1.55 A	1.10 A	1.05 Å
Hauptkette	11.72	14.31	9.51	10.49
Seitenkette	14.28	16.22	11.08	11.96
gesamte Kette	12.91	15.19	10.25	11.17
Wasser	31.18	34.44	29.36	32.39
Phenylethanol	53.04	49.31 *	46.22	46.97
NADH	42.89 **	40.78 **	65.13	65.69

\* Die Besetzungsfaktoren für Phenylethanol wurden auf 0.90 gesetzt.

\*\* Die Besetzungsfaktoren für NADH wurden auf 0.68 gesetzt.

**Tabelle 5.2:** Übersicht über die Verteilung der Temperaturfaktoren innerhalb der Strukturen der vier ternären Komplexe. Die einzelnen Werte wurden mit *bavarage* berechnet.

### 5.1.4.3 Bereiche mit alternativen Konformationen

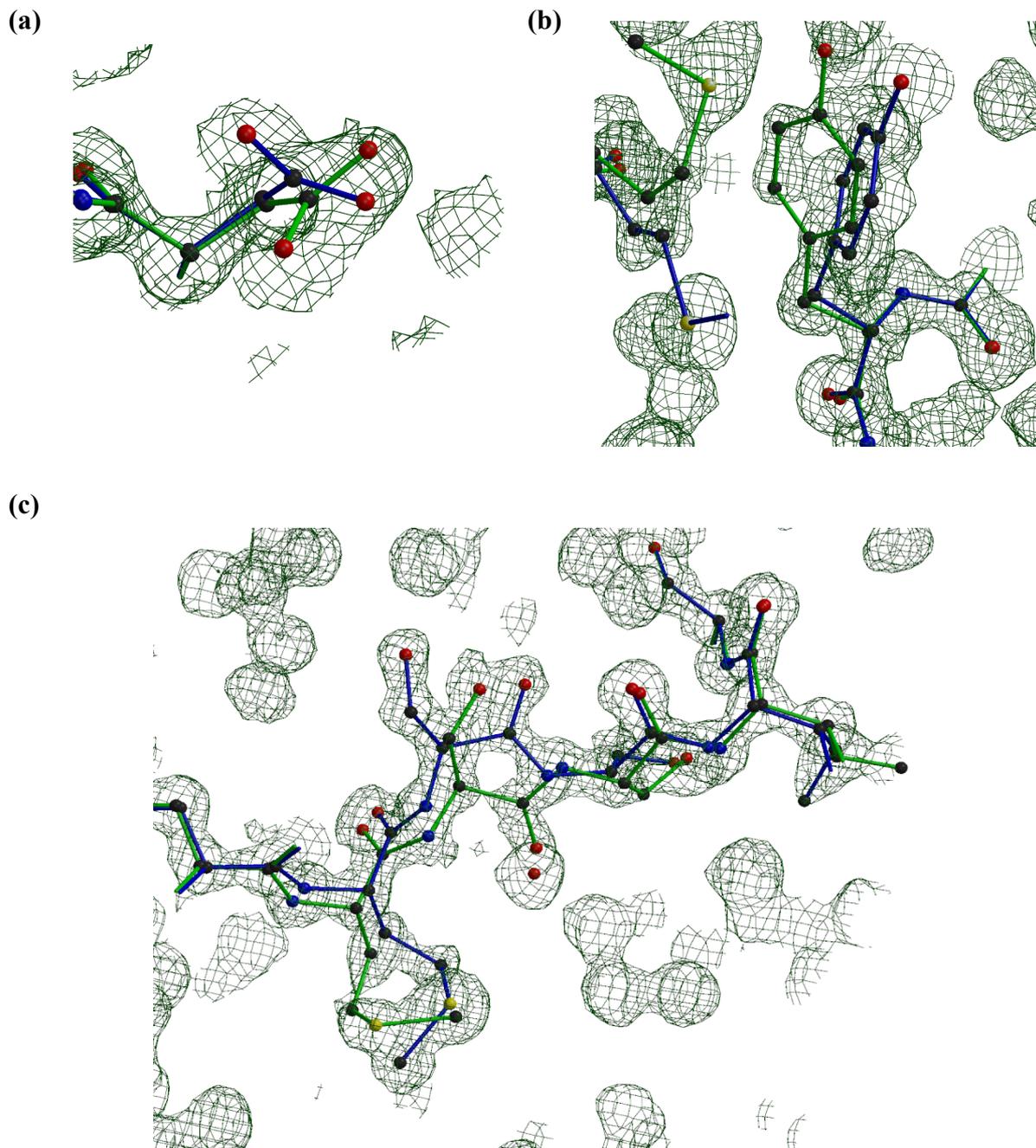
Für die komplette oder partielle Detektion alternativer Konformationen ist eine möglichst hohe Auflösung notwendig. Bei den Datensätzen bis zu einer Auflösung von 2.2 und 1.78 Å konnten daher keine alternativen Konformationen bestimmt werden. In der höheraufgelösten Struktur bei 1.55 Å und in den hochaufgelösten Strukturen bei atomarer Auflösung (1.10 und 1.05 Å) konnten hingegen Aminosäuren mit alternativen Konformationen bestimmt werden. Da der Einbau einer alternativen Konformation an einer bestimmten Stelle auch einen Einfluß auf die stereochemische Anordnung der Aminosäuren in der unmittelbaren Nachbarschaft ausübt, wurden jeweils die Aminosäuren vor und hinter der alternativen Konformation ebenfalls alternativ eingebaut.

In den Strukturen mit atomarer Auflösung konnten 29 Aminosäurereste in diskreter Unordnung bestimmt werden. Es zeigt sich, daß alternative Konformationen vor allem im Bereich der Substrat- und Kosubstratbindungsstelle auftreten. Dies sind die Bereiche um Asp37, welches mit der Adeninribose des NADH wechselwirkt, der gesamte Haupt- und Seitenkettenbereich von Asn139 bis Glu144 in der Nähe des Pyrophosphates und Aminosäurereste des Substratbindungsloops (z.B. Tyr189 und Met205). In Abbildung 5.3 sind die genannten Bereiche dargestellt. Die größte Anzahl an alternativen Konformationen weist die Aminosäure Methionin auf.

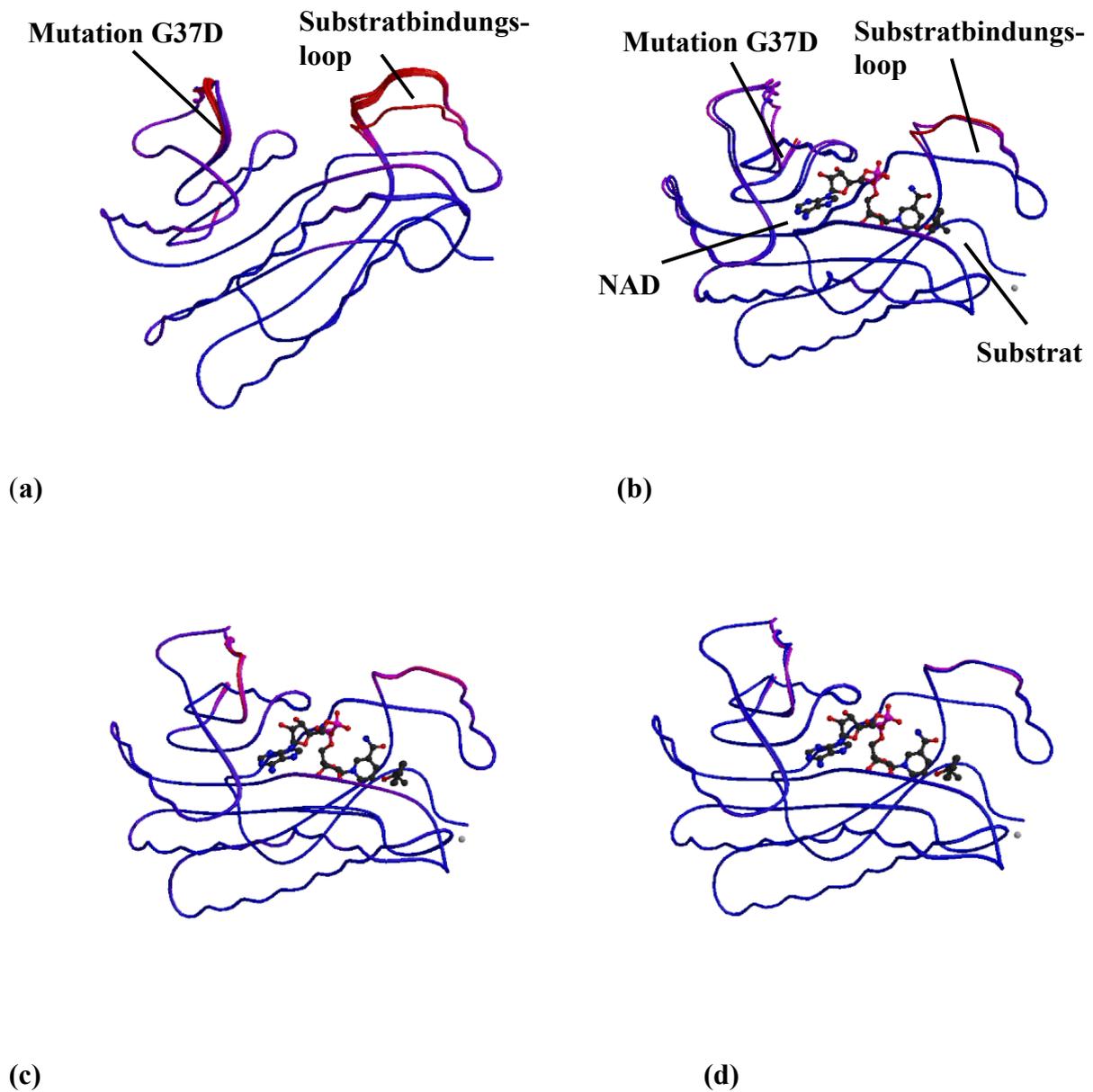
### 5.1.4.4 Vergleich der verschiedenen Strukturen der R-ADH-Lb-G37D

Um Unterschiede zwischen den verschiedenen Strukturen der R-ADH-Lb-G37D zu finden, wurden mit PROFIT (McLachlan, 1982) die mittleren Abweichungen der C $\alpha$ -Atome berechnet (Tabelle 5.3) und die Strukturen der einzelnen Monomere superpositioniert (Abbildung 5.4). Dabei wurden Vergleiche zwischen folgenden Gesamtstrukturen durchgeführt:

- a) den acht in der Raumgruppe *P*1 kristallisierten R-ADH-Lb-G37D-Untereinheiten des Apoenzyms
- b) den in der Raumgruppe *I*222 kristallisierten R-ADH-Lb-G37D-Strukturen des ternären Komplexes
- c) dem Apoenzym und dem ternären Komplex
- d) den hochaufgelösten Strukturen der R-ADH-Lb-G37D-Mutante und des R-ADH-Lb-Wildtyps



**Abbildung 5.3:** Bereiche des ternären Komplexes der R-ADH-Lb-G37D mit alternativen Konformationen. (a) Asp37 bei  $1.0\sigma$ , (b) Tyr189 und Met205 bei  $0.7\sigma$  und (c) Asn139 bis Asp144 bei  $1.0\sigma$ . Die Abbildungen wurden mit BOBSCRIPT und RENDER erstellt.



**Abbildung 5.4:** Superposition verschiedener R-ADH-Lb-G37D-Strukturen. (a) die acht Untereinheiten des Apoenzym, (b) die vier Strukturen des ternären Komplexes, (c) das Apoenzym und der ternäre Komplex, (d) der ternäre Komplex der R-ADH-Lb-G37D-Mutante und der R-ADH-Lb-Wildtyp. Die Monomere wurden nach isotropen Temperaturfaktoren angefärbt. Bereiche mit niedrigen Temperaturfaktoren sind blau und Bereiche mit hohen Temperaturfaktoren sind rot angefärbt. Die Abbildungen wurden mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

Vergleich	RMS-Wert
ternärer Komplex: Strukturen bei 1.10 und 1.05 Å	0.090
ternärer Komplex: Strukturen bei 1.05 und 1.55 Å	0.122
ternärer Komplex: Strukturen bei 1.55 und 1.78 Å	0.141
Apoenzym: Monomer A und Monomer B (2.2 Å)	0.281
Apoenzym (2.2 Å) und ternärer Komplex (1.05 Å)	0.345
Wildtyp (0.99 Å) und Mutante (1.05 Å)	0.384

**Tabelle 5.4:** Zusammenfassung der mit PROFIT ermittelten mittleren Abweichungen der C $\alpha$ -Atome (RMS-Abweichungen) der verschiedenen Strukturen.

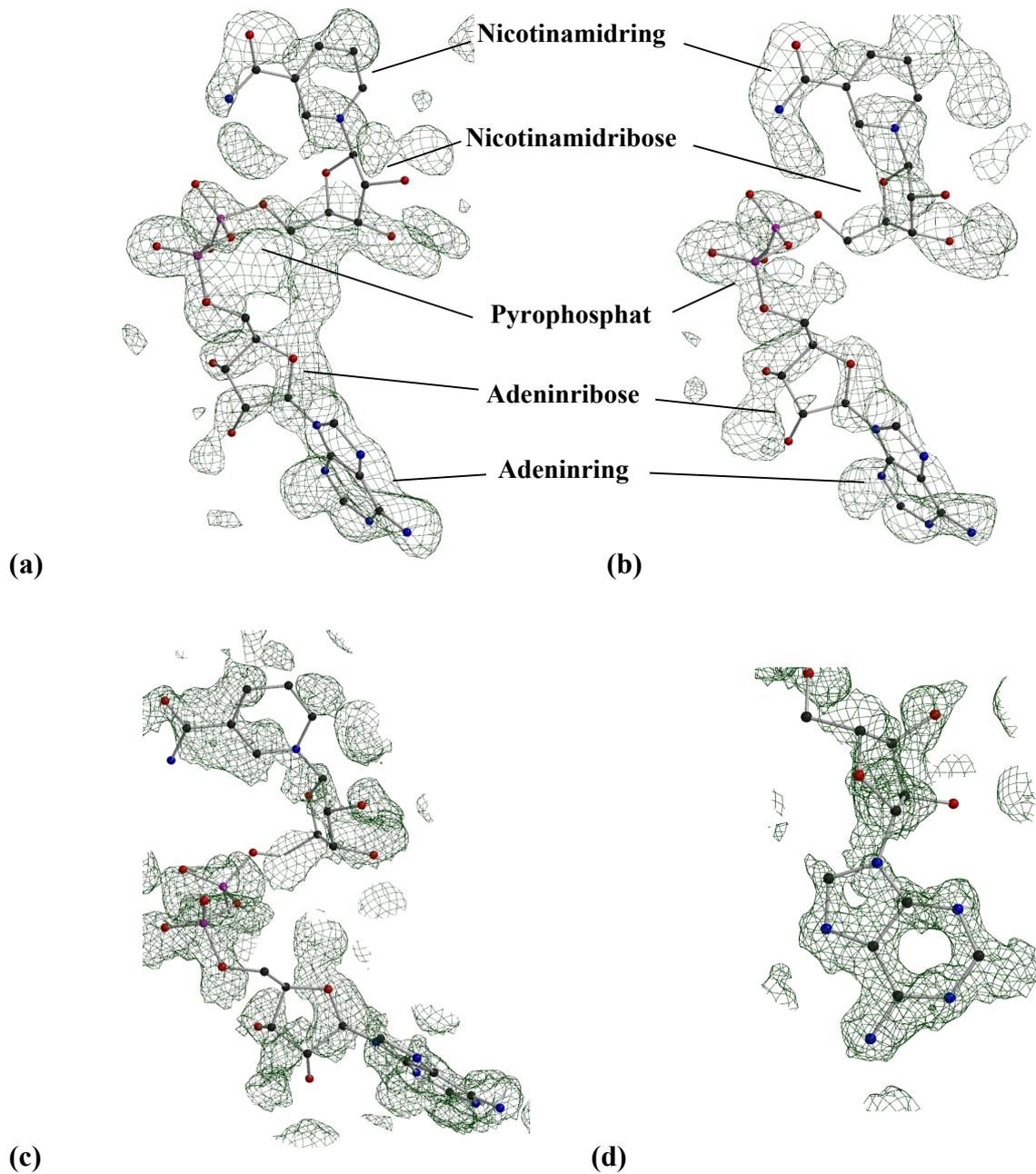
Die Superposition der verschiedenen Strukturen zeigt, daß die größten Abweichungen in den Bereichen von Aminosäure 35 bis 46, in der sich die Mutation an Position 37 befindet und von Aminosäure 192 bis 201 im Bereich des flexiblen Oberflächenloops zu finden sind. Hierbei sind die Unterschiede zwischen den vier ternären Komplexen der R-ADH-Lb-G37D sehr klein, was durch die geringen RMS-Werte von 0.090 bis 0.141 deutlich wird. Die verschiedenen Untereinheiten des Apoenzym sowie das Apoenzym und der ternäre Komplex weisen demgegenüber untereinander deutlich höhere strukturelle Unterschiede auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß eine Fixierung des flexiblen Oberflächenloops und der Cosubstratbindungsregion erst durch die Bindung von Substrat und Cofaktor vollständig erfolgt. Die größten strukturellen Unterschiede weisen der Wildtyp der NADP(H)-abhängigen R-ADH-Lb und die mit einer dualen Cosubstratspezifität ausgestattete Mutante auf. Hierbei sind die Unterschiede in dem Bereich am größten, der für die Cosubstratspezifität verantwortlich ist.

#### 5.1.4.5 Die Anordnung des Substrats und Cosubstrats im ternären Komplex der R-ADH-Lb-G37D

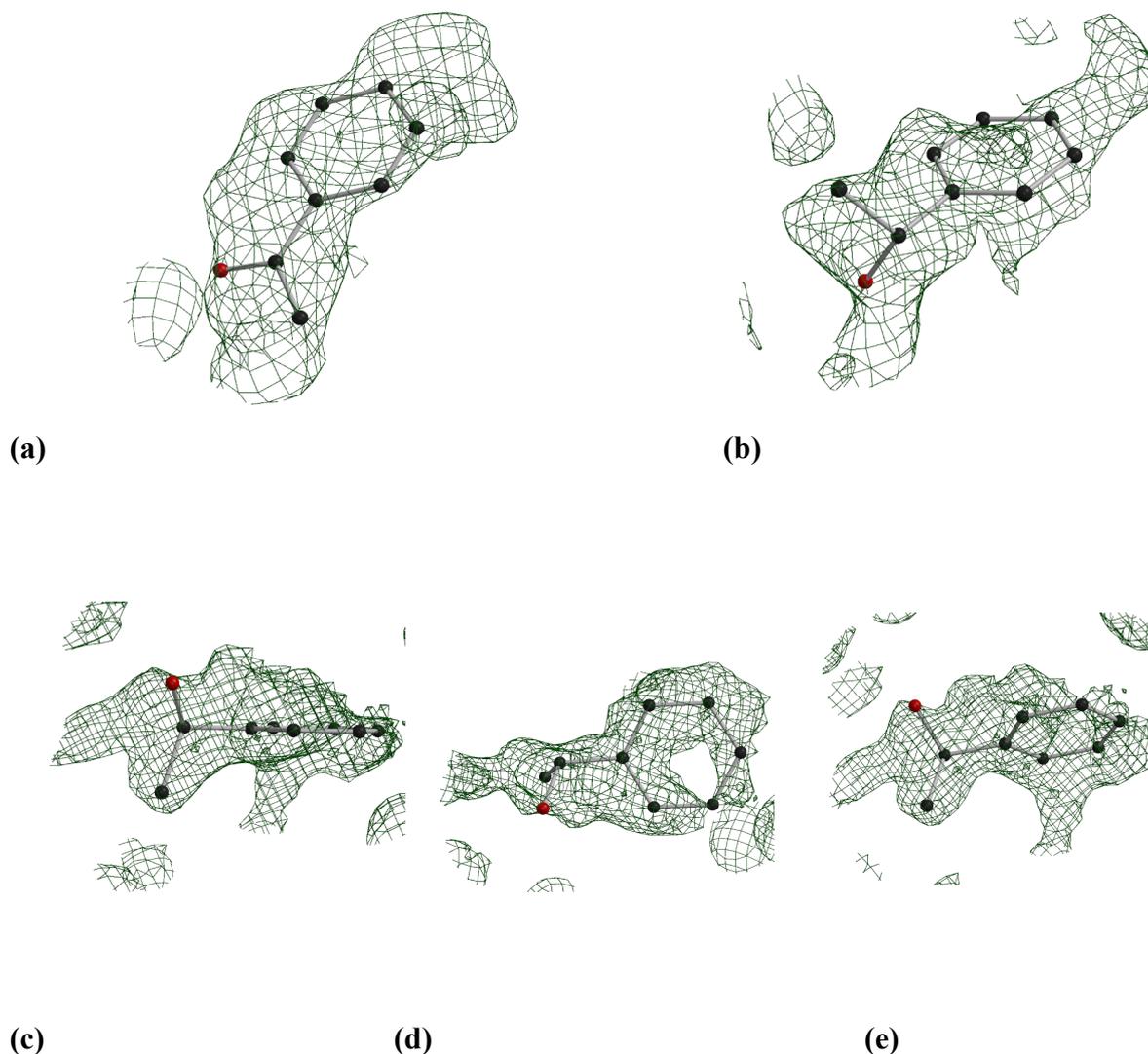
Bei der Strukturlösung des ternären Komplexes wurden zuerst die Datensätze bis zu einer Auflösung von 1.78 und 1.55 Å bearbeitet. Bei beiden Strukturen zeigten sich im Bereich des aktiven Zentrums nur schwache 2foc-Elektronendichten und hohe Temperaturfaktoren (bei einer angenommenen Besetzung von 100 %) für das Substrat und den Cofaktor. Durch die Erstellung von *omit*-Dichtekarten konnten aber für das Substrat und den Cofaktor *omit*-Dichten gefunden werden, in denen Phenylethanol und NADH lokalisiert werden konnte (Abbildung 5.5 a, b; Abbildung 5.6 a, b).

Bei der später durchgeführten Strukturlösung bei atomarer Auflösung (1.10 und 1.05 Å) konnten erfreulicherweise 2fofc-Elektronendichten für den Cofaktor gefunden werden, die bei einer Konturierung von  $0.5\sigma$  das NADH größtenteils umgaben und somit die einzelnen Bestandteile des NADH-Moleküls sinnvoll angeordnet werden konnten (Abbildung 5.5 c, d). Für das Substrat konnte eine 2fofc-Elektronendichte gefunden werden, die das Substrat bei einer Konturierung von  $0.6\sigma$  fast vollständig umgab (Abbildung 5.6 c).

Durch den Vergleich mit den erstgenannten Strukturlösungen zeigte sich, daß der Einbau von Phenylethanol und NADH dort prinzipiell korrekt durchgeführt wurde und nur der Ribose- und Nicotinamidring an einem Ende des NADH-Moleküls noch nicht richtig orientiert war. Schwache 2fofc-Elektronendichten für das Substrat und den Cofaktor wurden auch innerhalb weiterer binärer und/oder ternärer Komplexe anderer SDR-Proteine beobachtet. Auch dort konnte erst durch die Erstellung von *omit*-Dichtekarten die Anordnung im ternären Komplex bestimmt werden (z.B. Hülsmeier et al., 1998). Für die Beschreibung und Interpretation des ternären Komplexes werden im folgenden Abschnitt die Ergebnisse der hochaufgelösten Datensätze vorgestellt. Die im folgenden verwendete Nomenklatur für die Atome des Coenzym und für das Ribose-*puckering* sind der IUPAC-IUB-Beschreibung für Polynucleotide entnommen (IUPAC-IUB *Joint Commission on Biochemical Nomenclature*, 1983).



**Abbildung 5.5:** omit-Dichtekarten des NADH bei 1.78 Å (a,  $3\sigma$ ) und 1.55 Å (b,  $3\sigma$ ) bzw. 2fofc-Elektronendichtekarte bei 1.05 Å (c, d,  $0.7\sigma$ ). Die Abbildungen wurden mit BOBSCRIPT und RENDER erstellt.



**Abbildung 5.6:** *omit*-Dichtekarten des Phenylethanol bei 1.78 Å (a, 3 $\sigma$ ) und 1.55 Å (b, 3 $\sigma$ ) bzw. 2fofc-Elektronendichtekarte bei 1.05 Å (c, d, e, 0.5 $\sigma$ ). Die Abbildungen wurden mit BOBSCRIPT und RENDER erstellt.

#### 5.1.4.6 Der Bereich der Cosubstratbindung der R-ADH-Lb-G37D

Die in Abbildung 5.5 dargestellten *omit*- und 2fofc-Elektronendichten für den Cofaktor NADH zeigen, daß die Position von NADH innerhalb des ternären Komplexes sinnvoll bestimmt werden kann. Der NADH-Ligand der R-ADH-Lb-G37D bindet dabei an das für SDR-Proteine typische Nucleotidbindungsmotiv, das aus einer Rossmann-Faltung besteht. Innerhalb des NADH sind der Adenin- und Nicotinamidring fast senkrecht zu der Ebene des jeweiligen benachbarten Riboseringes angeordnet, was zu einer *anti*-Konformation des Adeninringes und einer *syn*-Konformation des Nicotinamidringes führt. Diese *syn*-Konformation, bei der die A-Seite des

Ringes zum Protein und die B-Seite zum aktiven Zentrum zeigt, wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem N7N-Atom des Nicotinamidringes und dem O1N-Atom des Pyrophosphates stabilisiert. Beide Riboseringe sind nicht planar und zeigen ein <sup>2</sup>E (C2'-endo)-puckering, d.h. vier Atome des Ringes befinden sich innerhalb der Ringebene des *envelope* und das fünfte Atom (C2') ist außerhalb der Ebene auf derselben Seite wie das am Ring benachbarte C5'-Atom (*endo*) angeordnet.

Um den Grad der Ausdehnung des Coenzym anzugeben, wird gewöhnlich der Abstand zwischen dem C6A-Atom des Adeninringes und dem C2N-Atom des Nicotinamidringes in *syn*-Konformation berechnet (Rossmann et al., 1975). Der Wert für diesen Abstand beträgt im ternären Komplex der R-ADH-Lb-G37D 13.75 Å und befindet sich damit im Wertebereich, der auch für andere SDR-Proteine angegeben wird (z.B. Glucose Dehydrogenase mit 14.1 Å; Yamamoto et al., 2001).

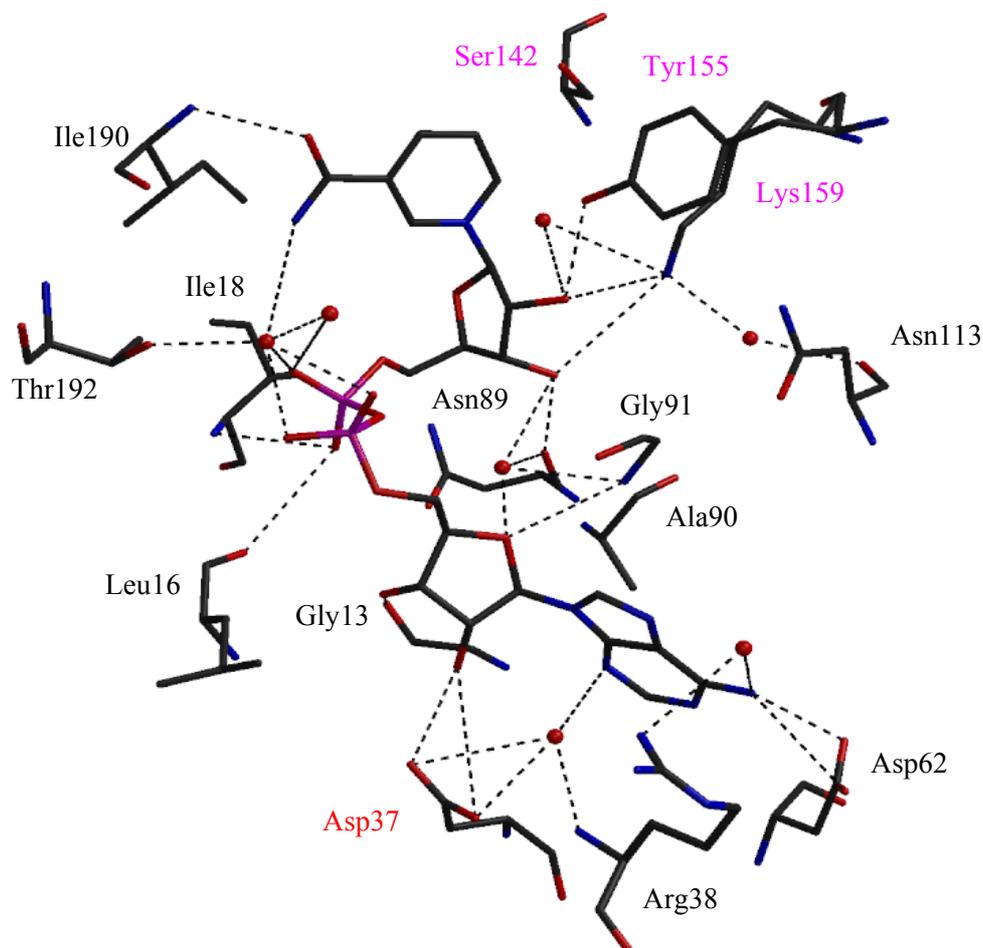
Die Fixierung des NADH an der Cosubstratbindungsstelle erfolgt über zwölf direkte und acht wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zwischen dem Adeninring, dem Adeninriboseteil, dem Pyrophosphatteil und dem Nicotinamid-Nucleosid-Teil mit der Proteinoberfläche der R-ADH-Lb-G37D. Hierbei bindet der Adenosin-Ribose-Teil an das Rossmann-Faltungsmotif. Die Pyrophosphatdomäne ist in der Glycin-reichen Region von Gly13 bis Gly19, die einen *turn* bildet, gebunden. Die Sequenz dieses in allen SDR-Proteinen vorkommenden Motifs ist Gly-X-X-X-Gly-X-Gly. Der Nicotinamidring ragt weit in die hydrophobe Tasche der Substratbindungsstelle hinein und wird durch Wasserstoffbrücken an der Enzymoberfläche gebunden. Die Fixierung des NADH in der Cosubstratbindungsregion ist in Abbildung 5.7 dargestellt.

Die Fixierung des Adeninringes erfolgt über zwei Wasserstoffbrücken zwischen dem N6A-Atom des Adeninringes und den Sauerstoffatomen der Seitenkette des Asp62 (Abstand: 2.59 und 3.45 Å) und über drei mögliche wasservermittelte (W271) Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem N3A-Atom des Adenins und den beiden Sauerstoffatomen der Seitenkette des Asp37 (Abstand: 2.78 und 3.48 Å) bzw. dem Stickstoffatom des Arg38 (Abstand: 2.66 Å). Weiterhin könnte eine Wechselwirkung zwischen dem N6A-Atom und der Seitenkette des Arg38 über ein Wassermolekül (W152) vermittelt werden. Zusätzlich ist eine Fixierung des Adeninringes über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Arg38 und Ala90 denkbar.

Die Fixierung des Riboseteils erfolgt über die drei Sauerstoffatome O2', O3' und O4'. Wasserstoffbrücken werden zwischen dem O2'-Atom und der Seitenkette des Asp37 (Abstand: 3.07 und 4.41 Å) sowie dem O3'-Atom und der Aminosäure Gly13 (Abstand: 2.78 Å) gebildet. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung bildet sich zwischen dem O4'-Atom und dem N-Atom von Gly91 (Abstand: 3.42 Å). Über das Wasser W535 (Abstand: 2.14 Å) ist ebenfalls eine Wechselwirkung zum Stickstoff des Gly91 möglich (Abstand: 2.95 Å).

Die Fixierung des Pyrophosphates erfolgt neben den beiden direkten Wasserstoffbrücken zwischen dem O2N-Atom und der Hauptkette von Ile18 und Leu16 (Abstand: 3.11 und 3.52 Å) über mehrere über W536 vermittelte Wasserstoffbrücken (Abstand: O1A: 2.80, O2A: 2.77 und O1N: 3.34 Å) zur Seitenkette des Thr192 (Abstand: 2.74 Å).

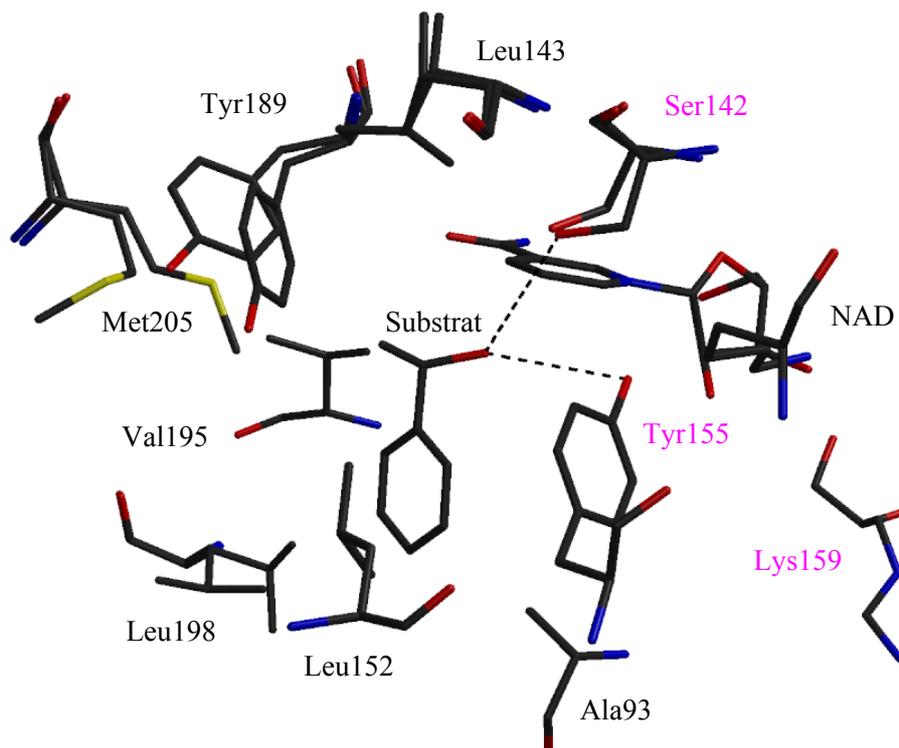
Der Nicotinamid-Nucleosid-Teil wird durch vier direkte Wasserstoffbrücken zwischen dem O2\*- und O3\*-Atom des Riboseringes und den Aminosäuren Asn89, Tyr155 und Lys159 (Abstand: 2.39, 2.60, 3.58 und 3.93 Å) sowie durch eine direkte Wasserstoffbrücke zwischen dem O7N-Atom des Nicotinamidringes und des Stickstoffatoms von Ile190 (Abstand: 2.95 Å) stabilisiert. Weitere wasservermittelte Bindungen sind zwischen dem O2\*-Atom (über W122) mit Lys159 möglich. Hierbei kann eine Stabilisierung des Lys159 durch eine wasservermittelte Wasserstoffbrücke über W48 (Abstand: 2.73 Å) zu der Seitenkette des Asn113 (Abstand: 2.68 Å) möglich sein.



**Abbildung 5.7:** Fixierung des NADH an der Cosubstratbindungsstelle. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Wassermoleküle werden durch rote Kugeln symbolisiert. Die Mutation G37D und die katalytische Triade sind farblich dargestellt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

### 5.1.4.7 Die Substratbindungsstelle der R-ADH-Lb-G37D

Das Substrat der R-ADH-Lb-G37D liegt in einer Tasche, die sich mit aus den für SDR-Proteine konservierten Aminosäurebereichen Met140 bis Leu152, Tyr155, Lys159 und Val185 bis Tyr189 zusammensetzt. Die Fixierung des Phenylethanol erfolgt sowohl durch elektrostatische als auch hydrophobe Wechselwirkungen (Abbildung 5.8). Zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem O15-Atom des Substrats und der Seitenkette des Tyr155 (Abstand: 3.24 Å) und Ser142 (Abstand: 4.04 Å) fixieren den hydrophilen Alkoholteil. Eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenkette des Glu144 und dem O15-Atom konnte in dem Datensatz bis 1.55 Å beobachtet werden, bei dem das Glu144 als alternative Konformation vorlag. Der aromatische Ring des Substrats wird durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Ala93, Leu143, Leu152, Tyr155, Lys159, Tyr189, Val195, Leu198 und Met205 fixiert, die einen hydrophoben Spalt bilden. Von den für die Fixierung verantwortlichen Resten treten Ser142, Leu143, Tyr189, Leu198 und Met205 in alternativen Konformationen auf, was für die erhöhte Flexibilität der Substratbindungsregion spricht.



**Abbildung 5.8:** Fixierung des Phenylethanol in der Substratbindungsstelle. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Alternative Konformationen sind abgebildet. Die katalytische Triade ist farblich dargestellt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

### 5.1.4.8 Das aktive Zentrum und der Reaktionsmechanismus der R-ADH-Lb-G37D

Das aktive Zentrum der R-ADH-Lb-G37D setzt sich aus dem Nicotinamidring des NAD/NADH und den drei bei SDR-Proteinen stark konservierten Aminosäuren Ser142, Tyr155 und Lys159 zusammen, welche die katalytische Triade bilden. Hierbei ist das für SDR-Proteine typische Motif Tyr-X-X-X-Lys zu beobachten. Der Abstand zwischen Tyr155 und dem O15-Atom des Substrats beträgt 3.24 Å. Das Ser142 hat einen Abstand von 4.04 Å zum O15-Atom des Phenylethanol. Es ist davon auszugehen, daß das Ser142 zusammen mit dem Tyr155 für die Fixierung des Substrats in der für die Reaktion erforderlichen Orientierung verantwortlich ist und daß das Tyr155 zusätzlich als Säure-Base-Katalysator der Reaktion wirkt.

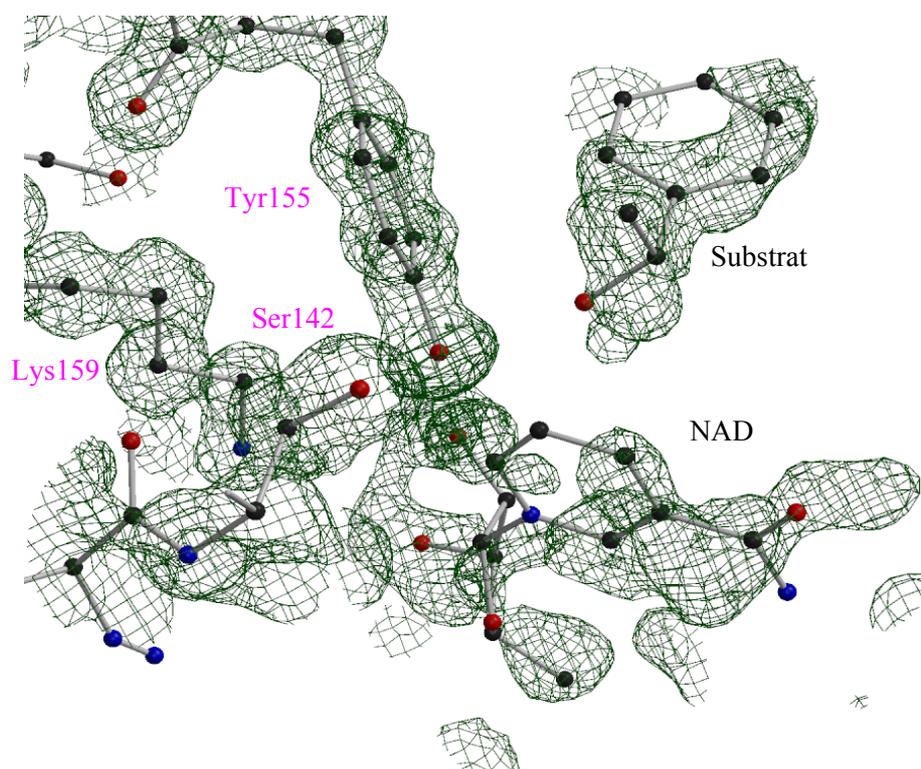
Da das konservierte Lysin keinen unmittelbaren Kontakt zum Substrat hat (Abstand: 7.17 Å), wird davon ausgegangen, daß es mittelbar an der Katalyse beteiligt ist. Zum einen ist es möglich, daß die positiv geladene Seitenkette des Lys159 den pK<sub>S</sub>-Wert der aromatischen Hydroxylgruppe des Tyr155 verringert und somit eine Deprotonierung zum Alkoholat erleichtert (Breton et al., 1996; Tanaka et al., 1996b). Dies scheint sinnvoll und notwendig zu sein, da eine Deprotonierung der Hydroxylgruppe des Tyr155 sowohl während der Reduktionsreaktion bei einem pH-Optimum von 6.5 als auch bei der Oxidationsreaktion bei einem pH-Optimum von 8.0 (Riebel, 1996) zunächst nicht möglich erscheint, da die aromatische Alkoholgruppe einen pK<sub>S</sub>-Wert von 10.1 besitzt (Stryer, 1994). Zum anderen kann davon ausgegangen werden, daß das im Reaktionsverlauf gebildete Tyrosinat-Anion durch den terminalen Stickstoff von Lys159 stabilisiert wird. Die mögliche Wasserstoffbrücke zwischen dem NZ-Atom des Lys159 und dem O-Atom des Tyr155 hat dabei eine Länge von 4.03 Å; dieser Abstand ist der bisher kürzeste der bei SDR-Proteinen beobachtet wurde. Eine weitere Stabilisierung des Tyr155 ist durch eine wasservermittelte Wasserstoffbrücke über W122 (3.97 Å) zu der Seitenkette des Lys159 (3.46 Å) möglich. Hierbei scheint das Wassermolekül ebenso die kationische Form des Lysinrestes zu stabilisieren, wie es auch bei einigen anderen SDR-Proteinen beobachtet wurde (Liao et al., 2001; Benach et al., 1998). Die Aufgabe des Lys159 bei der Fixierung des Riboseringes des NADH wurde schon beschrieben (s. Kap. 5.1.4.6). Eine Übersicht des aktiven Zentrums ist in den Abbildungen 5.9 und 5.10 dargestellt.

Für den Reaktionsmechanismus der reversiblen Oxidation des Phenylethanol mit NAD zu Acetophenon und NADH lassen sich folgende Teilreaktionen formulieren, die für andere SDR-Proteine schon in ähnlicher Weise postuliert wurden (z.B. Breton et al., 1996; Tanaka et al., 1996b).

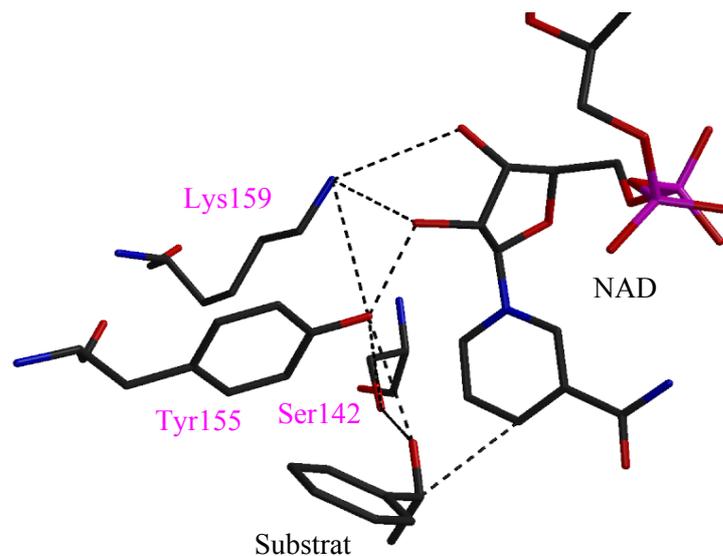
In der ersten Teilreaktion wird die phenolische Gruppe des Tyr155 deprotoniert, indem ein Proton abstrahiert und auf ein umgebendes Lösungsmittelmolekül übertragen wird. Dieser Protonentransfer könnte auf das Wassermolekül W122 erfolgen, welches einen Abstand von 3.97 Å zur OH-Gruppe des Tyr155 aufweist. Das deprotonierte Tyrosinat-Anion wird nun neben der schon erwähnten Seitenkette des Lys159 durch eine Wasserstoffbrücke zum Ser142

stabilisiert. Der Abstand zwischen der OH-Gruppe des Tyr155 und der OH-Gruppe des Ser142 beträgt hierbei 4.10 Å. Das Tyronisat-Anion greift nun nucleophil am H-Atom der aromatischen Hydroxylgruppe des Phenylethanol-Anions an und abstrahiert unter Bildung eines Phenylethanolat-Anions seinerseits ein Proton. Der Abstand zwischen dem Sauerstoff-Atom des Tyrosinat-Anions und dem O15-Atom des Substrats beträgt 3.24 Å.

In einer zweiten Teilreaktion greift das Wasserstoffatom am C14-Atom des Phenylethanolat-Anions nucleophil an das partiell positivierte C4N-Atom des mesomeriestabilisierten Nicotinamidringes an und leitet damit den Hydridtransfer vom Phenylethanolat-Anion auf das NAD in pro-4S-Orientierung ein, der zur Bildung von Acetophenon und NADH führt. Der Abstand zwischen dem C14-Atom des Substrats und dem C4N-Atom des NAD beträgt 3.29 Å.



**Abbildung 5.9:** 2fofc-Elektronendichtekarte des aktiven Zentrums bei 1.05 Å (0.8 $\sigma$ ). Die katalytische Triade ist farbig dargestellt. Die Abbildung wurde mit BOBSCRIPT und RENDER erstellt.



**Abbildung 5.10:** Übersicht über das aktive Zentrum. Dargestellt ist die katalytische Triade (Ser142, Tyr155, Lys159), der Nicotinamid-Ribose-Teil des NADH und das Substrat. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

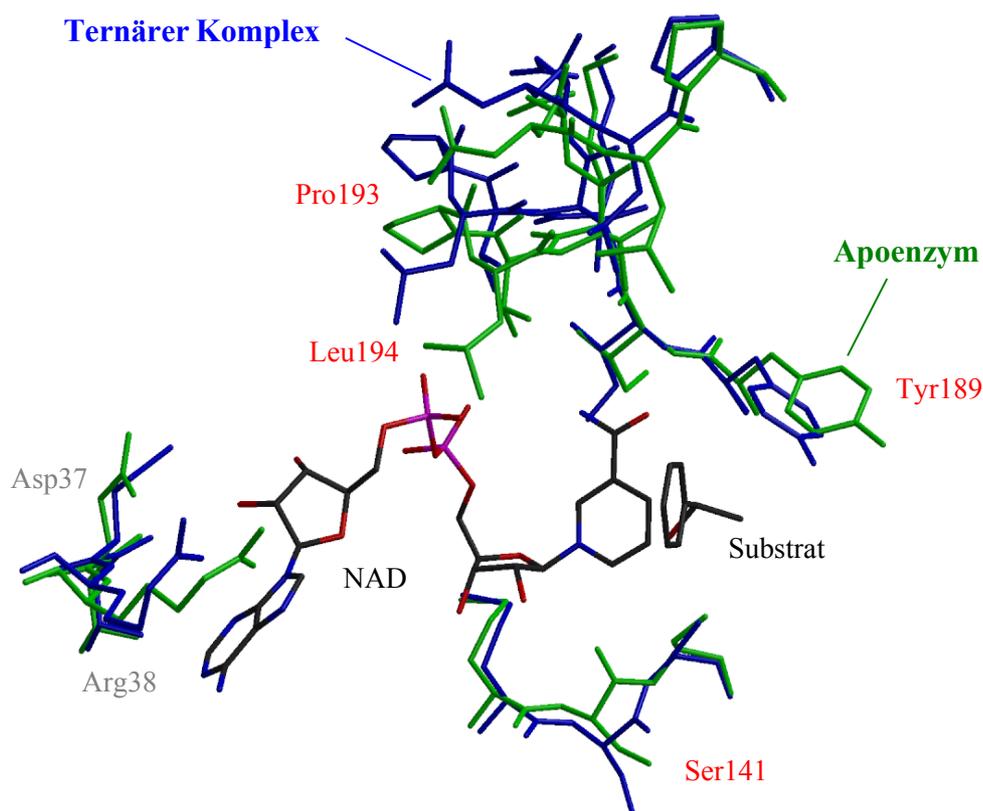
Bei einigen SDR-Proteinen wird eine cosubstrat-, aber vorallem substratbindungsinduzierte Konformationsänderung im Bereich des flexiblen Oberflächenloops von Aminosäure 192 bis 201, des sogenannten Substratbindungsloops, beobachtet (z.B. Tanaka et al., 1996). Um zu überprüfen, ob es bei der Bindung von Phenylethanol und NADH bei der R-ADH-Lb-G37D zu einem ähnlichen Phänomen kommt, wurden die acht Untereinheiten des Apoenzyms mit den Strukturen des ternären Komplexes superpositioniert und die Bereiche des Substratbindungsloops und der Cofaktorbindungsstelle miteinander verglichen. Bei diesen Vergleichen wurde ein Monomer (Monomer C) des Apoenzyms nicht berücksichtigt, da es eine extrem schwache 2fofc-Elektronendichte im Bereich des Oberflächenloops besaß. Bei den restlichen sieben Monomeren konnten untereinander und im Vergleich zum ternären Komplex Unterschiede beobachtet werden.

Strukturelle Unterschiede traten um den flexiblen Bereich des Asp37 und Arg38 auf, welche die Cosubstratspezifität der R-ADH-Lb-G37D determinieren, zeigten aber keinen eindeutigen Trend um Apoenzym und ternären Komplex zu unterscheiden. Im Bereich von Tyr189 bis Pro199 (Oberflächenloop) und um Ser141 (Cosubstratbindungsregion) konnte hingegen ein deutlicher Trend beobachtet werden, der auf eine strukturelle Umordnung während der Substrat- und Cofaktorbindung hindeutet. Hierbei war bei fünf der sieben berücksichtigten Monomeren des Apoenzyms eine starke und bei zwei Monomeren eine weniger deutliche Verschiebung des Oberflächenloops zu erkennen. Die dabei bei den Monomeren des Apoenzyms beobachtete Wegbewegung des Oberflächenloops von der Cosubstratbindungsregion betrug bezüglich des

Pro193 und Leu194 zwischen 2.4 und 3.3 Å und stellt dadurch vermutlich den für NADH notwendigen Platzbedarf zur Verfügung.

Die beobachtete Annäherung des Tyr189 an das Substrat um bis zu 2.5 Å im ternären Komplex weist auf die Funktion dieses Restes bei der Substratfixierung hin. Da im ternären Komplex das Tyr189 in alternativer Konformation vorlag, deutet dies darauf hin, daß die Substratbindungsregion nicht vollständig besetzt ist und sich die gebundene und ungebundene Form der R-ADH-Lb-G37D überlagern. Die strukturellen Unterschiede zwischen den einzelnen Untereinheiten des Apoenzyms weisen darauf hin, daß die Fixierung des flexiblen Oberflächenloops und der Cosubstratbindungsregion erst durch die Bindung von Substrat und Cofaktor vollständig erfolgt. In Abbildung 5.11 ist die Superposition des ternären Komplexes mit einer exemplarisch ausgewählten Untereinheit (Monomer G) des Apoenzyms dargestellt.

Ein endgültiger Beweis für das Vorliegen einer substratinduzierten Konformationsänderung sollte allerdings durch die Untersuchung der Struktur des Apoenzyms erfolgen, welche zum einen eine vergleichbar hohe Auflösung wie der ternäre Komplex besitzt und zum anderen auch in der Raumgruppe *I*222 kristallisiert.



**Abbildung 5.11:** Superposition der R-ADH-Lb-G37D-Strukturen des Apoenzyms und des ternären Komplexes. Gezeigt sind die Bereiche von Tyr189 bis Pro199 des Substratbindungsloops und Bereiche der Cofaktorbindung um Asp37, Arg38 und Ser141. Das Apoenzym (Monomer G) ist grün, der ternäre Komplex (bei 1.05 Å) blau dargestellt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

#### 5.1.4.9 Die Cosubstratspezifität der R-ADH-Lb-G37D

Der Wildtyp der R-ADH-Lb zeigt eine eindeutige Spezifität für NADP(H) (Müller, 2000). Durch den Austausch der Aminosäure Glycin 37 gegen Aspartat konnte die Spezifität dahingehend verändert werden, daß die R-ADH-Lb-G37D eine duale Cosubstratspezifität zeigt. Die Spezifität für NAD(H) ist dabei aber deutlich bevorzugt, da sie gegenüber NADP(H) um den Faktor 4 höher liegt (2.2 U/ml zu 0.5 U/ml). Im Vergleich zum NADP(H)-abhängigen Wildtyp ist die spezifische Aktivität der R-ADH-Lb-G37D in Bezug auf NAD(H) um den Faktor 10 geringer (14.5 U/mg zu 149.4 U/mg).

Bei der Bindung des NAD(H) an die R-ADH-Lb-G37D ergibt sich im Gegensatz zum Wildtyp-Protein eine starke Wechselwirkung zwischen dem O2'-Atom der Ribose und der Seitenkette des Asp37, die zu einer neuen Wasserstoffbrückenbindung mit einer Länge von 2.76 Å führt und somit zu einer Stabilisierung des Enzym-NAD-Komplexes beiträgt. Die Wechselwirkung zwischen der 2'-Phosphatgruppe des NADP(H) und der Seitenkette des Arg38, wie sie bei der NADP(H)-Bindung an den Wildtyp entsteht, ist demzufolge nicht mehr vorhanden.

Nach dem Austausch von Gly37 gegen Aspartat scheint eine gleichzeitige Anordnung von NADP(H) wie beim Wildtyp-Protein und der neu eingeführten Seitenkette sterisch und elektrostatisch ungünstig, da es zu einer Abstoßung der zweifach negativ geladenen 2'-Phosphatgruppe am NADP(H) und der negativ geladenen Seitenkette des Asp37 kommt. Möglich muß diese Anordnung aber sein, da eine gewisse Restaktivität mit NADP(H) vorhanden ist. Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der 2'-Phosphatgruppe und der R-ADH-Lb-G37D werden dabei wahrscheinlich über die beim Wildtyp bekannte Wasserstoffbrücke zur Seitenkette des Arg38 stattfinden.

Bei den meisten SDR-Proteinen, die NADP(H) bevorzugen, werden zwei negative Ladungen der 2'-Phosphatgruppe durch zwei positiv geladene Seitenketten, mit denen die Bildung von Wasserstoffbrücken möglich ist, ausgeglichen. Eine dieser basischen Seitenketten ist ein konserviertes Arginin, welches auf dem *turn* nach dem  $\beta$ B-Strang lokalisiert ist. Der zweite positiv geladene Rest ist in der Regel ein Lysin oder Arginin, welches sich in der vierten Position der glycinreichen Consensus-Region GXXXGXXG des Dinucleotidbindungsmotifs befindet. Eine Ausnahme bildet hier die Struktur der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase, wo die basische Seitenkette innerhalb der Consensus-Region fehlt und durch die Interaktion der 2'-Phosphatgruppe mit einem Lys195 innerhalb der flexiblen *Loop*-Region kompensiert wird (Breton et al., 1996) sowie die Struktur der Glucosedehydrogenase (Yamamoto et al., 2001) und auch des Wildtyps der R-ADH-Lb (Müller et al., 2001), bei der eine basische Seitenkette des Arg39 bzw. Arg38 für die Kompensation der negativen Ladungen der 2'-Phosphatgruppe und der Bestimmung der NADP(H)-Spezifität ausreicht.

Bei den meisten SDR-Proteinen, die NAD(H) bevorzugen, ist im Bereich der Adeninribose ein saurer Aspartat- oder Glutamatrest lokalisiert, der mit einer oder beiden Hydroxylgruppen am O2'- bzw. O3'-Atom der Ribose elektrostatisch wechselwirkt. An den beiden Positionen, an

denen bei den NADP(H)-abhängigen SDR-Proteinen basische Aminosäuren lokalisiert sind, treten hier völlig unterschiedliche Reste auf, die nicht einheitlich klassifiziert werden können. Ein Austausch des Aspartatrestes durch eine polare Seitenkette wie Asparagin führte zu einer dualen Cosubstratspezifität, der Austausch des Aspartatrestes durch eine große hydrophobe Seitenkette (Asp37Ile) führt zum Verlust der katalytischen Aktivität (Chen et al., 1991). Der Einbau einer Aminosäure mit positiv geladener Seitenkette (z.B. Ala44Arg) erhöht die Cofaktorspezifität für NADP(H) (Chen et al., 1994). Bei der NADP(H)-abhängigen Carbonylreduktase aus Mäuselunge zeigte sich, daß der Austausch des Thr38 durch Aspartat zu einer erhöhten NAD(H)-Abhängigkeit führte (Nakanishi et al., 1997).

Durch die oben genannten Beobachtungen bei verschiedenen SDR-Proteinen sowie durch das Vorhandensein einer NADP(H)-Abhängigkeit für die R-ADH-Lb und einer dualen Cosubstratabhängigkeit für die R-ADH-Lb-G37D könnte sich eine Regel für die Cosubstratspezifität der R-ADH-Lb ableiten lassen, die man auf weitere Mitglieder der SDR-Gruppe übertragen könnte. Dabei wird die Cosubstratspezifität der R-ADH-Lb für NADP(H) und NAD(H) nicht zusammen durch das Vorliegen oder Nicht-Vorliegen einer bestimmten Aminosäure an derselben Stelle im Protein determiniert, sondern durch das Vorhandensein von bestimmten Aminosäuren an unterschiedlichen Stellen im Enzym bestimmt. Für die R-ADH-Lb würde dies bedeuten, daß das Vorhandensein eines basischen Restes (hier: Arg38) und das Nicht-Vorhandensein eines sauren Restes (hier: Asp37) zu einer reinen NADP(H)-Abhängigkeit führt. Genau dies wird für den Wildtyp beobachtet, der das Arg38, aber nicht das Asp37 besitzt. Das Vorhandensein sowohl eines basischen Restes (hier: Arg38) und eines sauren Restes (hier: Asp37) müßte zu einer dualen Cosubstratspezifität führen. Bei der Mutante R-ADH-Lb-G37D, bei der ohne Veränderung des Arg38 das Gly37 gegen Aspartat ausgetauscht wurde, kann genau diese duale Spezifität beobachtet werden. Das dabei die Spezifität für NAD(H) deutlich höher ist als für NADP(H) läßt sich leicht durch die schon beschriebene sterische Hinderung der 2'-Phosphatgruppe der Ribose durch die Seitenkette des neu eingefügten Asp37 erklären. Für eine reine NAD(H)-Abhängigkeit müßte die R-ADH-Lb folglich einen sauren Rest an der Position 37 (Asp37) besitzen und dürfte keine basische Seitenkette (Arg38) an der Position 38 aufweisen. Um die letztgenannte These zu überprüfen, müßten Doppelmutanten der R-ADH-Lb hergestellt werden, bei denen das Gly37 gegen Aspartat und das Arg38 gegen eine bei anderen NAD(H)-abhängigen SDR-Proteinen an dieser Position vorkommende nicht-basische, (häufig) hydrophobe Aminosäure ausgetauscht werden. Dies könnten z.B. Isoleucin oder Valin sein, so daß eine Doppelmutante der Art R-ADH-Lb-G37D-R38V die formulierte Hypothese stützen müßte.

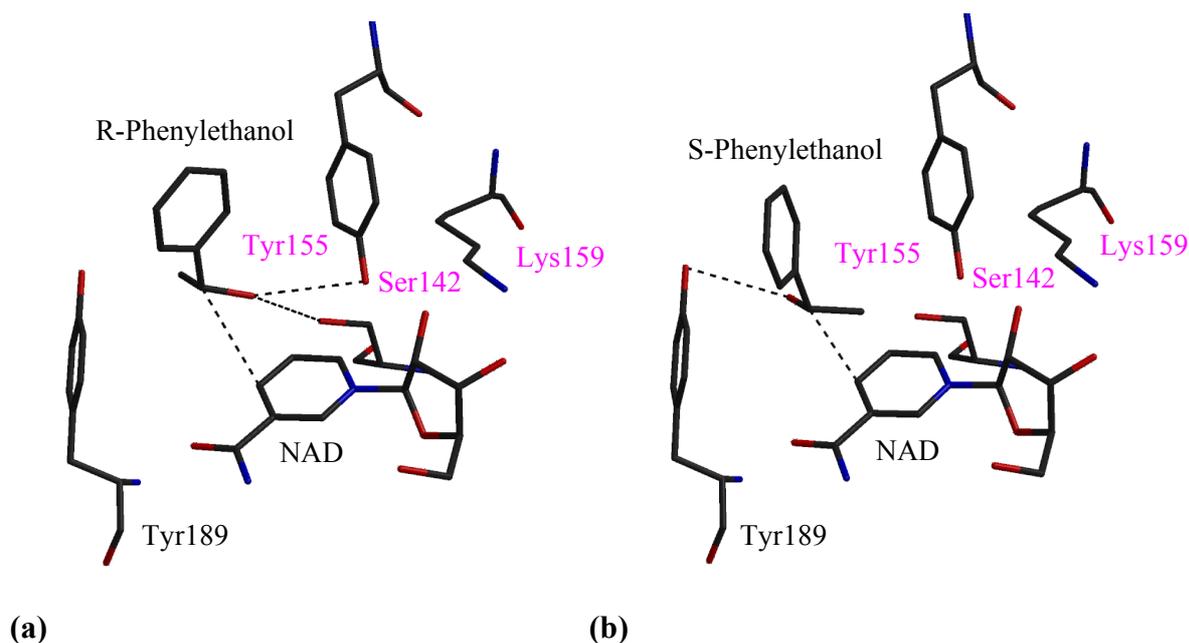
	Arginin	Aspartat	NADP(H)	NAD(H)
1AH1, 1AHH, 1FMC		Asp42		NAD(H)
1A4U, 1B14, 1B15, 1B16, 1B2L		Asp37		NAD(H)
1BDB		Asp36		NAD(H)
1CWU				NAD(H)
1E3S, 1E3W, 1E6W		Asp41		NAD(H)
1FK8, 1FJH		Asp32		NAD(H)
1GCO	(Arg39)			NAD(H)
1GEG		Asp33		NAD(H)
2HSD, 1HDC		Asp37		NAD(H)
1DHR		Asp40		NAD(H)
1HDR		Asp37		NAD(H)
1CYD	Arg39		NADP(H)	
1EDO	Arg27		NADP(H)	
1G0N, 1G0O, 1YBV, 1DOH	Arg39		NADP(H)	
1H5Q	Arg21, Arg43		NADP(H)	
1HU4	Arg37		NADP(H)	
1FXS, 1BSV	Arg36		NADP(H)	
1JA9, 4HNR	Arg38		NADP(H)	
1NAS	Arg18, Arg43		NADP(H)	
1A27	Arg37		NADP(H)	
1AE1	Arg53		NADP(H)	
2AE2, 2AE1	Arg41		NADP(H)	

**Tabelle 5.5:** Abhängigkeit der Cofaktorspezifität vom Vorhandensein einer Aspartat- oder Argininseitenkette im Bereich der Cofaktorbindungsstelle. Die mit NAD(H) gekennzeichneten Enzyme sind überwiegend NAD(H)-abhängig, die mit NADP(H) gekennzeichneten überwiegend NADP(H)-abhängig. Der für die 1GCO aufgeführte Argininrest ist vom Cofaktor abgewandt und wechselwirkt nicht mit NAD(H). Die verwendeten PDB-Kürzel sind in Kapitel 1.2.2 erklärt.

Der in Tabelle 5.5 dargestellte Vergleich der unterschiedlichen SDR-Strukturen unterstützt die formulierte These und zeigt, daß die Aminosäurereste Aspartat und Arginin eine herausragende bzw. ausschließliche Bedeutung bei der Festlegung der Cofaktorspezifität besitzen. Es ist zu erkennen, daß bei allen NAD(H)-abhängigen Proteinen (mit Ausnahme von 1CYU und 1GEG) ein negativer Aspartatrest vorhanden ist, der mit den Hydroxylgruppen am O2'- bzw. O3'-Atom der Ribose des NAD(H) wechselwirken kann und bei allen NADP(H)-abhängigen Proteinen ein positiver Argininrest vorhanden ist, der die negativen Ladungen der 2'-Phosphatgruppe des NADP(H) kompensieren kann.

#### **5.1.4.10 Die Substrat- und Stereospezifität der R-ADH-Lb-G37D**

Die R-ADH-Lb-G37D zeigt eine eindeutige Stereospezifität in Bezug auf die von ihr umgesetzten Substrate. So werden nur Alkohole mit R-Konfiguration, aber nicht mit S-Konfiguration, am chiralen C<sub>α</sub>-Kohlenstoffatom umgesetzt. In Abbildung 5.12 ist das aktive Zentrum aus dem Nicotinamidring des NAD und den Resten von Ser142, Tyr155 und Lys159 dargestellt. Wird nun das Substrat R-Phenylethanol in der Substratbindungsstelle angeordnet (5.12, a), kann es zu der in Abschnitt 5.1.4.8 beschriebenen konstruktiven Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym kommen, durch die der Reaktionsablauf der Substrat-Oxidation ermöglicht wird. Befände sich dagegen S-Phenylethanol im aktiven Zentrum (5.12, b) und würde es so angeordnet, daß der für die Oxidation notwendige Hydridtransfer stattfinden könnte (Abstand C14 zu C4N: 3.38 Å), wäre keine konstruktive Wechselwirkung mit der katalytischen Triade möglich. Der Abstand zwischen dem O15-Atom des S-Phenylethanol und dem O-Atom des Tyr155 würde 5.36 Å und der Abstand zum O-Atom des Ser142 4.41 Å betragen. Zusätzlich würde die Alkoholgruppe des Substrats in die vom aktiven Zentrum abgewandten Richtung und die bei der Reaktion nicht beteiligte Methylgruppe in Richtung des aktiven Zentrums weisen. Die einzige neue Wechselwirkung, die sich zwischen dem Substrat und der R-ADH-Lb-G37D bilden könnte, wäre eine Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylgruppe des Substrats und der Seitenkette des bei der Reaktion nicht beteiligten Tyr189 (Abstand: 3.30 Å).



**Abbildung 5.12:** Stereospezifität der R-ADH-Lb-G37D. Übersicht über das aktive Zentrum. Dargestellt ist die katalytische Triade (Ser142, Tyr155, Lys159), der Nicotinamid-Ribose-Teil des NADH und das Substrat R-Phenylethanol (a) und das nicht umsetzbare Stereoisomer S-Phenylethanol (b). Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die Abbildungen wurden mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

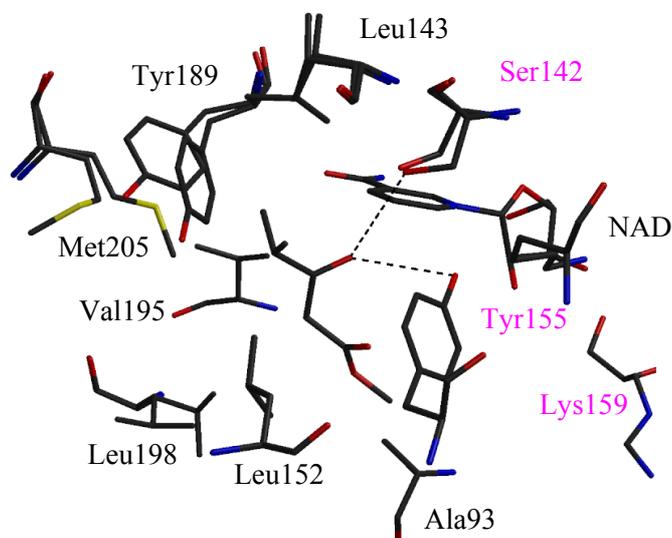
Für die R-ADH-Lb-G37D wurden bisher noch keine umfassenden Untersuchungen in Bezug auf die Substratspezifität durchgeführt. Für den Wildtyp der R-ADH-Lb liegen hingegen Untersuchungen der Substratspezifität vor, bei denen die Änderung der Umsetzung unterschiedlicher Ketone,  $\beta$ -Ketoester und Ketonensäuren in Relation zu dem Substrat Acetophenon (Aktivität = 100 %) getestet wurden (Riebel, 1996). Dabei wurden Enzymaktivitäten bestimmt, die als Grundlage für die folgende Diskussion dienen sollen. Die Signifikanz der dort beschriebenen Unterschiede kann leider nicht bewertet werden, da weder Standardabweichungen noch  $\chi^2$ -Werte bestimmt wurden. Es kann daher auch nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei den präsentierten Ergebnissen um singuläre Einzelmessungen handelt, die nicht notwendigerweise die realen Verhältnisse widerspiegeln. Die dort angegebenen berechneten  $v_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte können leider nicht in die Überlegungen miteinbezogen werden, da diese Werte fälschlicherweise nicht unter Cosubstratsättigung gemessen wurden und somit keinerlei Aussagekraft besitzen.

Für den Wildtyp der R-ADH-Lb ist davon auszugehen, daß eine ähnliche Anordnung des Substrats im aktiven Zentrum vorhanden ist wie bei der R-ADH-Lb-G37D, da das aktive Zentrum bei beiden Strukturen fast identisch ist. Daher scheint es legitim für die R-ADH-Lb-G37D eine ähnliche Substratspezifität anzunehmen wie für die R-ADH-Lb.

Beide Reste an der Carbonylgruppe des Substrats können recht unterschiedlich sein. Dabei muß nicht wie oft behauptet, ein Rest eine Methylgruppe sein. Vielmehr kann an dieser Stelle auch eine Methylen-, n-Propyl- oder Isopropylgruppe angeordnet sein. Eine bevorzugte Umsetzung erfolgt aber mit einem Keton, welches eine Methyl- oder Methylengruppe an dieser Stelle besitzt. So erfolgt die Umsetzung von 4-Oxo-pentansäureethylester (R = Methylrest) mit einer Aktivität von 92 %, die von 3-Oxo-4-methylpentansäureethylester (R = Isopropylrest) nur mit 59 %. Wären die Substrate so angeordnet wie R-Phenylethanol, dann würde der Raumbedarf für eine Isopropylgruppe im Vergleich zu einer Methylgruppe so groß zu sein, daß die Anordnung des Substrats nicht optimal erfolgen kann. Der Abstand zwischen der Isopropylgruppe und der Seitenkette des Tyr189 und Glu144 wäre bei einer für den Hydridtransfer notwendigen Anordnung so gering, daß es zu einer sterischen Hinderung kommen würde. Möglich muß diese Anordnung aber sein, da eine enzymatische Umsetzung stattfinden kann.

Der zweite Rest kann sehr variabel sein und besteht aus einem aliphatischen oder aromatischen Ester mit unterschiedlicher Kettenlänge, einer ringförmigen Cycloalkylgruppe, einer Acylgruppe oder einem aromatischen Ringsystem. Dabei nimmt innerhalb einer Meßreihe die Aktivität des Enzyms mit zunehmender Länge der Alkylkette im zweiten Rest ab. So sinkt die Aktivität bei der Umsetzung von Acetessigsäurealkylestern mit steigender Kettenlänge von 117 % beim Methylester (Abbildung 5.13) über 109 % beim Ethylester auf 64 % beim Butylester und beim Pyruvatalkylestern von 200 % für Pyruvatmethylester auf 167 % beim Pyruvatethylester. Bei den Aktivitäten von 3-Oxo-valeriansäuremethylester und 3-Oxo-valeriansäureethylester kann kein Unterschied beobachtet werden. Diese Beispiele zeigen, daß sich der genannte Effekt erst bei dem Übergang zur Butyl- und wahrscheinlich auch zur Propylgruppe deutlich auswirkt. Der Raum für eine sinnvolle geometrische Anordnung muß für alle Seitenketten gegeben sein. Anscheinend schwächt aber eine lange und damit flexible Seitenkette die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der hydrophoben Substratbindungstasche, da eine sterische Hinderung auftreten kann.

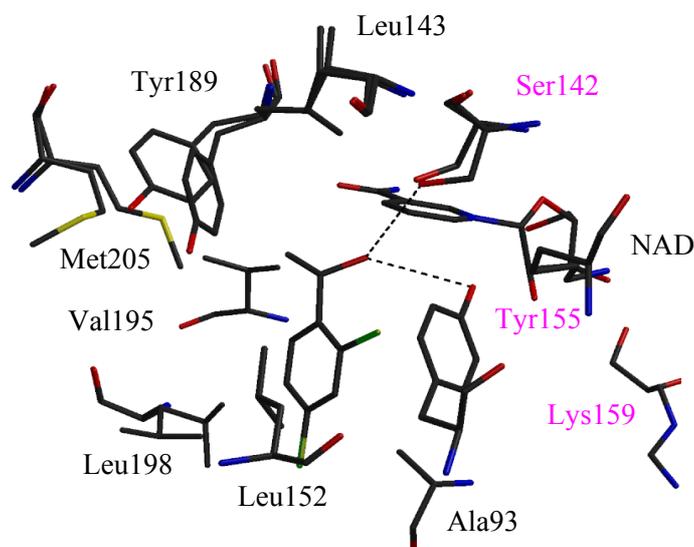
Diese Hypothese wird weiterhin dadurch unterstützt, daß die Umsetzung von Acetessigsäurebenzylester mit einer höheren Aktivität (126 %) verläuft als bei den anderen Acetessigsäurealkylestern. Die zwar voluminöse, aber im Gegensatz zur Butylkette sehr starre Benzylgruppe, führt dabei zu einer offensichtlich stabileren Anordnung in der Substratbindungstasche. Dies läßt sich weiterhin dadurch erhärten, daß auch die Umsetzung mit dem Substrat 2-Methylcyclohexanon eine sehr hohe Aktivität von 192 % besitzt. Der vorliegende Sechsring besitzt zwar die Möglichkeit zur Konformationsänderung, wird aber wahrscheinlich in der energetisch günstigsten Sesselkonformation vorliegen und somit ebenfalls eine relative Rigidität besitzen. Je kleiner und/oder rigider der Rest also ist, desto besser wird das Substrat umgesetzt. Eine maximale enzymatische Aktivität wird daher bei der Umsetzung mit Pyruvatmethylester und 2-Methylcyclohexanon beobachtet.



**Abbildung 5.13:** Mögliche Anordnung von Acetessigsäurealkylestern im aktiven Zentrum der R-ADH-Lb-G37D. Gezeigt ist die Anordnung von Acetessigsäuremethylester. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die katalytische Triade ist farbig dargestellt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

Ausgehend vom Substrat Acetophenon wurden eine Reihe von mono- und disubstituierten Derivaten untersucht. Bei allen monosubstituierten Acetophenonen außer 4-Chlor-Acetophenon verringerte sich die Aktivität deutlich. Bei den disubstituierten Derivaten war diese Tendenz noch stärker ausgeprägt.

Da der aromatische Ring des Substrats durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Ala93, Leu143, Leu152, Tyr155, Tyr189, Val195, Leu198 und Met205 fixiert wird, ist ersichtlich, daß durch die Einführung einer oder zwei neuer, womöglich polarer Gruppen am aromatischen Ring (z.B. F, Br, I, CN, OH, NO<sub>2</sub>), die hydrophoben Wechselwirkungen teilweise gestört und somit die Substratbindung geschwächt wird, was durch die vorliegenden Daten bestätigt wird. So beträgt die Aktivität für die Umsetzung von 2,4-Dichloroacetophenon nur 2.1 %. Die mögliche Anordnung dieses kaum umgesetzten Substrats im aktiven Zentrum ist in Abbildung 5.13 dargestellt. Theoretisch sollten die  $K_m$ -Werte dieser Substrate deutlich geringer sein als beim Vergleichssubstrat Acetophenon. Bei weitergehenden Untersuchungen sollte daher eine vernünftige Bestimmung der  $v_{max}$ - und  $K_m$ -Werte für die unterschiedlichen Substrate erfolgen, um die formulierten Überlegungen zu untermauern.

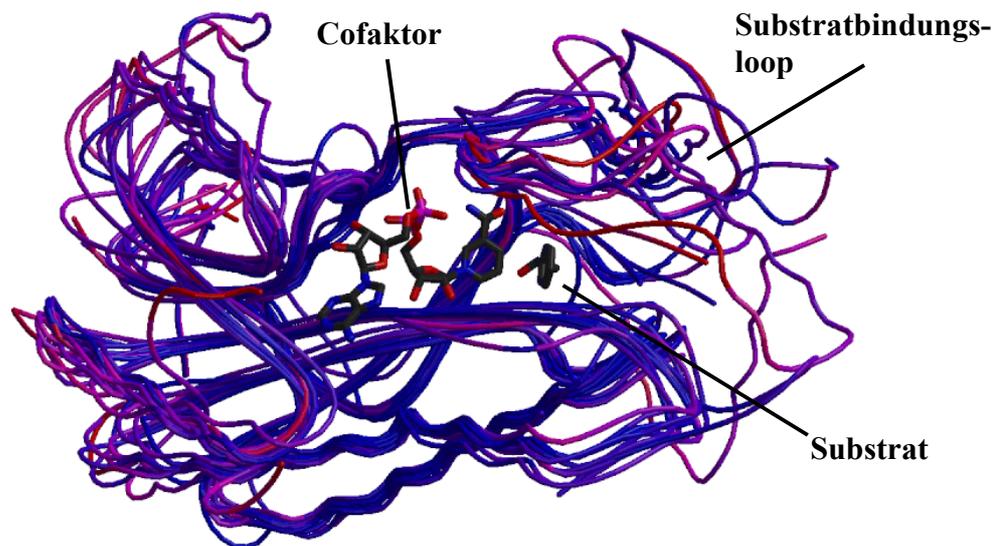


**Abbildung 5.14:** Mögliche Anordnung von 2,4-Dichlorophenylethanol im aktiven Zentrum der R-ADH-Lb-G37D. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die katalytische Triade ist farbig dargestellt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

#### 5.1.4.11 Vergleich der R-ADH-Lb-G37D mit anderen SDR-Proteinen

Die R-ADH-Lb-G37D gehört zu der Familie der *short chain dehydrogenases/reductases* (SDR-Proteine) und weist die für diese Familie typischen strukturellen Eigenschaften auf. Die dreidimensionalen Strukturen von mehr als 20 Mitgliedern der SDR-Familie konnten bisher bestimmt werden. Die Strukturaufklärung von zwölf binären und neun ternären Komplexen gelang dabei zusätzlich. Trotz der geringen Sequenzidentität von weniger als 30 % weist die dreidimensionale Struktur dieser Enzyme deutliche Ähnlichkeiten in Bezug auf die Faltung, die intramolekularen Kontaktstellen, die Nucleotidbindungsstelle und das aktive Zentrum auf. In Abbildung 5.15 sind die Gesamtstrukturen von sieben SDR-Proteinen, welche als ternäre Komplexe kristallisiert wurden, mit der Struktur der R-ADH-Lb-G37D superpositioniert.

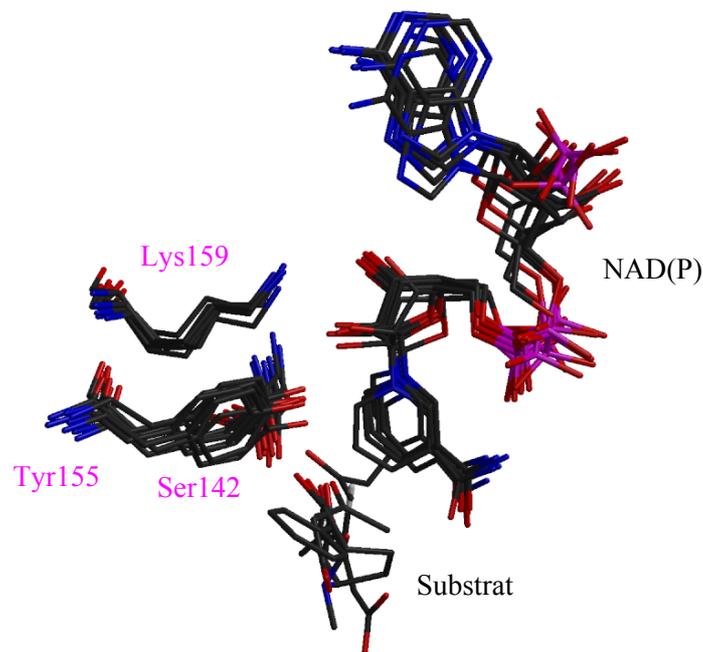
Die R-ADH-Lb-G37D besitzt wie alle SDR-Strukturen die Nucleotidbindungsstelle, die aus einer Rossmann-Faltung besteht. Dabei bilden  $\beta\alpha\beta$ -Untereinheiten ein zentrales sechssträngiges paralleles  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ A,  $\beta$ B,  $\beta$ C,  $\beta$ D,  $\beta$ E,  $\beta$ F), das auf beiden Seiten von umliegenden  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ B und  $\alpha$ C sowie  $\alpha$ D,  $\alpha$ E und  $\alpha$ F) flankiert wird. Bei allen SDR-Proteinen ist diese Rossmann-Faltung am C-terminalen Ende durch mindestens eine weitere  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ G) und ein siebtes paralleles  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ G) verlängert. Eine Verkürzung dieser Rossmann-Faltung kann bei den Strukturen der  $3\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/Carbonylreduktase, der Dihydropterinreduktase und der GDP-Fucosesynthetase beobachtet werden, bei denen die Helix  $\alpha$ C fehlt und das Faltblatt  $\beta$ C nur (noch) in rudimentärer Form vorliegt.



**Abbildung 5.15:** Superposition verschiedener SDR-Strukturen, die als ternäre Komplexe aufgeklärt wurden. Die Monomere wurden nach isotropen Temperaturfaktoren angefärbt. Bereiche mit niedrigen Temperaturfaktoren sind blau und Bereiche mit hohen Temperaturfaktoren sind rot angefärbt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

Bei der Struktur der  $3\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/Carbonylreduktase liegt zusätzlich zwischen dem  $\beta$ E-Faltblatt und der  $\alpha$ F-Helix eine aus 28 Aminosäuren bestehende Insertion vor, die eine  $\alpha$ -helikale Subdomäne bildet und in keiner anderen bekannten SDR-Proteinstruktur vorliegt.

Die Superposition des aktiven Zentrums, des Cofaktors und des Substrats des ternären Komplexes der R-ADH-Lb-G37D mit sieben bekannten ternären Komplexen von SDR-Proteinen (Abbildung 5.16) zeigt, daß sich das aktive Zentrum der R-ADH-Lb-G37D wie bei allen bekannten SDR-Proteinen aus den stark konservierten Aminosäuren Serin, Tyrosin und Lysin zusammensetzt, welche die katalytische Triade bilden. Hierbei ist das für SDR-Proteine typische Motif Tyr-X-X-X-Lys zu beobachten. Zusätzlich ist die Anordnung von NAD(H) in der R-ADH-Lb-G37D fast identisch mit der Anordnung von NAD(H) oder NADP(H) bei anderen SDR-Proteinen. Innerhalb des NAD(H) oder NADP(H) liegt der Adeninring in einer *anti*-Konformation und der Nicotinamidring in einer *syn*-Konformation vor. Die Riboseringe sind nicht planar und zeigen wie bei der R-ADH-Lb-G37D ein  ${}^2$ E (*C2'-endo*)-*puckering*. Die Orientierung des Nicotinamidringes im aktiven Zentrum ist in allen Komplexen praktisch identisch. Die Anordnung der unterschiedlichen Substrate ist bezüglich der Orientierung der Hydroxyl- oder Carbonylgruppe sowie des  $\alpha$ -C-Atoms, welches am Hydridtransfer teilnimmt, relativ ähnlich. Es ist somit sehr wahrscheinlich, daß alle SDR-Proteine einen ähnlichen Reaktionsmechanismus besitzen sollten.



**Abbildung 5.16:** Superposition des aktiven Zentrums ternärer SDR-Strukturen. Dargestellt ist die katalytische Triade (Ser142, Tyr155, Lys159), der Cofaktor NAD(P) und die unterschiedlichen Substrate. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

In vielen SDR-Strukturen ist der flexible Oberflächenloop, der sogenannte Substratbindungsloop, der aus den Aminosäuren 188 bis 213 besteht, fast vollständig ungeordnet, wenn der Cofaktor und das Substrat nicht gebunden sind. Durch die Bindung des Cofaktors wird ein kleiner Teil des Loops stabilisiert, aber erst nach der Bindung des Substrats zeigt der Loop eine definierte, häufig helikale Konformation ( $\alpha$ FG1 und  $\alpha$ FG2). Diese substratinduzierte Stabilisierung des Loops ist z.B. bei der  $7\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase mit einer Bewegung um bis zu 8.5 Å verbunden (Tanaka et al, 1996).

Beim Wildtyp der R-ADH-Lb (Müller, 2000) und der Mutante R-ADH-Lb-G37D konnte die Konformation des Oberflächenloops beim Apoenzym auch ohne vorherige Substrat- und Cofaktorbinding bestimmt werden, wies aber bei der R-ADH-Lb-G37D eine erhöhte Mobilität und strukturelle Unterschiede zwischen den einzelnen Untereinheiten auf (s. Kap. 5.1.4.8). Der Vergleich zwischen dem ternären Komplex und dem Apoenzym der R-ADH-Lb-G37D wies darauf hin, daß eine substrat- und cosubstratinduzierte Konformationsänderung des Substratbindungsloops vorliegen könnte (s. Kap. 5.1.4.8).

Die Flexibilität des Substratbindungsloops erklärt das relativ weite Substratspektrum der SDR-Proteine im allgemeinen und das der R-ADH-Lb-G37D im speziellen. Die bei der R-ADH-Lb-G37D beobachtete hohe Flexibilität bzw. Mobilität des Cofaktors und des Substrats bzw. die nicht vollständige Besetzung der Cofaktor- und/oder Substratbindungsstelle wurde auch bei verschiedenen anderen SDR-Proteinen beobachtet, scheint aber kein allgemeines Merkmal der

SDR-Familie zu sein (Tabelle 5.6 und 5.7). Wie aus diesen Tabellen zusätzlich ersichtlich, ist der in dieser Arbeit aufgeklärte ternäre Komplex der R-ADH-Lb-G37D der erste Komplex innerhalb der SDR-Familie, der in atomarer Auflösung gelöst werden konnte.

Protein	Auflösung [Å]	Kette	Wasser	Cofaktor
1B14	2.40	25.9	22.2	<b>49.7</b>
1AHH	2.30	33.9	35.9	40.7
1E3S	2.00	18.5	n.b.	21.6
1AE1	2.40	19.7	26.9	16.9
1GCO	1.70	20.1	32.2	19.2
1EDO	2.30	35.2	51.2	28.6
1H5Q	1.50	50.2	31.7	53.1
1HDR	2.50	10.2	31.7	25.3
1DHR	2.30	28.3	31.9	14.2
1FXS	2.20	30.5	38.2	39.5
1HU4	2.30	31.0	28.1	20.6
1FK8	1.95	18.4	30.1	<b>49.3</b>

**Tabelle 5.7:** Übersicht über die Verteilung der Temperaturfaktoren innerhalb der bekannten binären Komplexe der SDR-Familie. Die einzelnen Werte wurden mit *bavarage* berechnet.

1B14: Alkoholdehydrogenase aus *Drosophila lebanonensis* (Benach et al., 1999); 1AHH: 7 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase aus *E. coli* (Tanaka et al., 1996a); 1E3S: 3-Hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase aus Rattenhirn (Powell et al., 2000); 1AE1: Tropininreduktase I und II aus *Datura stramonium* (Yamashita et al., 1999); 1GCO: Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* (Yamamoto et al., 2000); 1EDO:  $\beta$ -Keto-Acyl-Carrierprotein-Reduktase aus *Brassica napus* (Fisher et al., 2000); 1H5Q: Mannitoldehydrogenase aus *Agaricus Bisporus* (Horer et al., 2001); 1HDR: Dihydropteridinreduktase aus Rattenleber (Varughese et al., 1992); 1DHR: Dihydropteridinreduktase aus Mensch (Su et al., 1993); 1FXS: GDP-Fucosesynthetase aus *E. coli* (Rosano et al., 2000) (Somers et al., 1998); 1HU4: Carbonylreduktase/20 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase aus Schwein (Ghosh et al., 2001); 1FK8: 3 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/Carbonylreduktase aus *Comamonas testosteroni* (Grimm et al., 2000).

Protein	Auflösung [Å]	Kette	Wasser	Cofaktor	Substrat
R-ADH-Lb-G37D	1.05	11.2	32.4	<b>65.7</b>	<b>46.9</b>
1B15 *	2.20	24.6	28.6	21.9	21.9
1B16 *	1.40	10.4	21.5	21.5	21.5
1B2L *	1.60	10.3	19.1	10.2	10.2
1AH1	2.30	33.1	35.9	<b>57.7</b>	<b>49.5</b>
1FMC	1.80	27.6	38.6	26.7	30.0
1E3W	1.40	18.6	33.9	16.4	<b>35.6 (0.5)***</b>
1E6W	1.70	18.7	30.9	14.1	<b>53.6</b>
1A27	1.90	31.6	42.4	<b>38.4 (0.5)***</b>	<b>74.3</b>
2AE2	1.90	17.9	32.3	13.1	24.4
1CWU	2.50	28.5	30.9	24.3	21.8
1NAS	1.25	23.6	63.9	18.1	<b>40.7</b>
1CYD	1.80	13.9	26.9	11.8	22.3
1JA9 **	1.50	13.9	28.4	12.1	12.9
1HDC **	2.20	18.8	14.5	ohne	25.9
1GEG **	1.70	15.1	20.0	13.2	15.7
1YBV **	2.80	26.7	n.b.	21.2	21.2
1DOH **	2.10	26.0	33.0	24.4	18.2
1G0N **	2.00	25.4	32.3	25.8	<b>53.1</b>
1G0O **	1.70	14.8	27.6	14.9	16.9

**Tabelle 5.6:** Übersicht über die Verteilung der Temperaturfaktoren innerhalb der bekannten ternären Komplexe der SDR-Familie. Die einzelnen Werte wurden mit *bavarage* berechnet. Die verwendeten PDB-Kürzel sind in Kapitel 1.2.2 erklärt.

\* Die Enzyme wurden jeweils mit einem Addukt aus Cofaktor und Substrat kristallisiert (NAD-Aceton, NAD-Pentanon, NAD-Cyclohexanon).

\*\* Die Proteine wurden mit Inhibitor kristallisiert.

\*\*\* Die Besetzungsfaktoren wurden auf 0.5 (halbmaximale Besetzung) verringert.

Es gibt einige SDR-Proteine, bei denen die Co-Kristallisation von SDR-Proteinen mit Substrat und Cosubstrat bzw. das *Soaken* eines binären Komplex-Kristalls aus Enzym und NAD(H)/NADP(H) mit Substrat oft nicht zur Bildung und/oder Kristallisation des ternären Komplexes zu führen schien (Ghosh et al., 1995; Grimm et al., 2000). Hierbei könnte die enzymatische Reaktion aber auch so schnell abgelaufen sein, daß das Substrat sehr schnell umgesetzt wurde und sofort wieder aus dem aktiven Zentrum diffundiert ist.

Aus diesem Grunde wäre es sinnvoll zeitaufgelöste Strukturstudien für die R-ADH-Lb-G37D durchzuführen, bei denen die Substratumsetzung so verlangsamt ist, daß die Umsetzungsrate länger ist als die Rate der Diffusion des Substrats und Cofaktors ins aktive Zentrum und die Rate der Ligandenbindung zusammen. Für einen Proteinkristall mit einer durchschnittlichen Kantenlänge von 0.1-0.3 mm kann die Besetzung der Hälfte aller möglichen Bindungsstellen durch einen Liganden innerhalb einer Minute erfolgen (Hajdu et al., 2000). Die Umsetzungsrate müßte also länger als eine Minute sein, um eine Anhäufung von Reaktionsintermediaten im Übergangszustand zu erzielen. Dieses *intermediate trapping* kann durch die Verwendung von Mutanten, veränderten Substraten, Inhibitoren oder auch durch die gezielte Änderung von pH-Wert, Druck oder Temperatur vereinfacht werden. Eine weitere Möglichkeit zur Verlangsamung oder Abstopfung der enzymatischen Reaktion ist das *cryo-freezing*. Dabei kann durch die Verwendung von flüssigem Propan oder Ethan und Abkühlungsraten von bis zu 100.000 K/s die enzymatische Reaktion im Proteinkristall innerhalb von Millisekunden beendet werden.

## 5.2 Die H<sub>6</sub>-BTL-2

Für die H<sub>6</sub>-BTL-2 war es gelungen ein Reinigungsprotokoll zu entwickeln und das Aggregationsproblem, welches eine reproduzierbare Kristallisation verhindert, zu lösen. Eine Konzentrierung in Monomerform bis zu einer maximalen Konzentration von 2 mg/ml sowie eine reproduzierbare (Quasi-) Kristallisation konnten erzielt werden, aber die (Quasi-) Kristalle aufgrund der gelartigen Konsistenz und geringer Größe nicht für Röntgendiffraktionsmessungen verwendet werden. Durch die Verwendung der Sulfobetaine NDSB 195 und NDSB 201 konnte die Konzentration der H<sub>6</sub>-BTL-2 auf bis zu 3.4 bzw. 3.8 mg/ml erhöht werden. Eine Verbesserung der Kristallisation konnte dennoch nicht erreicht werden. Eine eingehendere Untersuchung des Einflusses der Sulfobetaine auf das Oligomerisierungsverhalten der H<sub>6</sub>-BTL-2 durch Messung der dynamischen Lichtstreuung wäre hierbei durchaus sinnvoll, da die Verwendung dieser Sulfobetaine z.B. beim Transkriptionsregulator *CysB* eine Erhöhung der Konzentration von 1.5 mg/ml auf 5 mg/ml und dadurch erst eine erfolgreiche Kristallisation ermöglichte (Koen et al., 2001).

Aufgrund der umfangreichen Kristallisationsversuche und der schlechten Kristallisierbarkeit der H<sub>6</sub>-BTL-2 scheint es aber eher angebracht Veränderungen innerhalb der Lipase selbst durchzuführen, um z. B. den hydrophoben Charakter der Lipase zu verringern und somit die Tendenz zur Oligomerisierung zu erniedrigen (s. Kap. 7.2).

Die Strukturlösung der H<sub>6</sub>-BTL-2 auf Grundlage des gemessenen Datensatzes des oligomerisierten Enzyms durch molekularen Ersatz war nicht möglich, da keine (ausreichend) homologen Kristallstrukturen bekannt waren. Die Sequenzidentitäten mit in der PDB (Bernstein et al., 1977) abgelegten Strukturen ist in Tabelle 5.7 dargestellt. Dabei ist eine maximale Sequenzidentität mit der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (Kim et., 1997; Lang et al., 1997) zu finden, die aber nur 38 von 166 Aminosäuren (22 %) der aus 388 Aminosäuren bestehenden H<sub>6</sub>-BTL-2 umfaßt. Da nicht auszuschließen ist, daß trotz geringer Sequenzidentität die Faltung der H<sub>6</sub>-BTL-2 und anderer schon bekannter Lipase-Strukturen ähnlich ist, könnte der Versuch unternommen werden mit einer Auswahl bekannter Lipase-Strukturen einen molekularen Ersatz durchzuführen.

	2LIP	1CVL	1TAH	1E58	1EX9
Sequenzidentität	38 / 166 (22 %)	38 / 166 (22 %)	38 / 166 (22 %)	18 / 37 (48 %)	23 / 117 (27 %)

**Tabelle 5.7:** Übersicht über die Sequenzidentität der H<sub>6</sub>-BTL-2 und anderer bekannter Lipase-Strukturen. 2LIP: Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (Kim et al., 1997; Lang et al., 1997); 1CVL: Lipase aus *chromobacterium viscosum*; (Lang et al., 1996); 1TAH: Lipase aus *Pseudomonas glumae* (Noble et al., 1993); 1E58: Phosphoglyceratmutase (Bond et al., 2001); 1EX9: Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* (Nardini et al., 2001). Die Alignierungen wurden mit PSI-BLAST (Altschul et al., 1997) durchgeführt.

Bei Lipasen, deren Strukturen bisher noch nicht aufgeklärt sind, weist die H<sub>6</sub>-BTL-2 die höchste Sequenzidentität auf mit der Lipase aus *Staphylococcus hyicus* (LIP\_STAHY; Goetz et al., 1985; van Oort et al., 1989), der Lipase aus *Staphylococcus epidermidis* (LIP\_STAEP; Farrell et al., 1993) und der Lipase aus *Staphylococcus aureus* (LIP\_STAAU; Lee et al., 1986; Rollof et al., 1992). Eine Übersicht über diese drei Lipasen ist in Tabelle 5.8 gegeben.

	Anzahl AS	MW [kDa]	Sequenzidentität
H <sub>6</sub> -BTL-2	388	44	388 / 388 (100 %)
LIP_STAHY	641	77	137 / 388 ( 35 %)
LIP_STAEP	688	71	127 / 386 ( 32 %)
LIP_STAAU	690	76	125 / 366 ( 34 %)

**Tabelle 5.8:** Übersicht über zur H<sub>6</sub>-BTL-2 homologen Lipasen. LIP\_STAHY: Lipase aus *Staphylococcus hyicus*; LIP\_STAEP: Lipase aus *Staphylococcus epidermidis*; LIP\_STAAU: Lipase aus *Staphylococcus aureus*. AS = Aminosäure; MW = Molekulargewicht. Die Alignierungen wurden mit PSI-BLAST (Altschul et al., 1997) durchgeführt.



## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei biotechnologisch interessante Enzyme röntgenkristallographisch untersucht.

Die Mutante R37D der R-spezifischen Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (R-ADH-Lb-G37D) gehört zu der Familie der *short chain dehydrogenases/reductases* (SDR-Proteine). Im Gegensatz zum NADP(H)-abhängigen Wildtyp-Protein, weist die Mutante eine duale Cosubstratspezifität auf.

Für die Reinigung des Enzyms wurde eine neue Reinigungsstrategie entworfen mit der die R-ADH-Lb-G37D bis zur Homogenität gereinigt werden konnte. In Anlehnung an die bekannten Kristallisationsbedingungen des Wildtyps und die Versuche einen Enzym-Substrat-Komplex zu kristallisieren, wurde ein ternärer Komplex aus Enzym, Substrat und Cofaktor in der innen-zentriert orthorhombischen Raumgruppe *I*222 kristallisiert und vier Datensätze mit einer Auflösung von 1.78 Å, 1.55 Å, 1.10 Å und 1.05 Å und damit in atomarer Auflösung gemessen. Die Struktur der R-ADH-Lb-G37D wurde mittels der Methode des Molekularen Ersatzes mit dem Wildtyp als Suchmodell gelöst. Die Struktur wurde mit den Daten der hochaufgelösten Datensätze auf kristallographische R-Werte von  $R_{work} = 15.6\%$  bzw.  $17.8\%$  und  $R_{free} = 16.7\%$  bzw.  $18.6\%$  verfeinert.

Die Struktur des Apoenzyms wurde mit Diffraktionsdaten bis zu einer Auflösung von 2.20 Å gelöst und auf kristallographische R-Werte von  $R_{work} = 22.0\%$  und  $R_{free} = 24.9\%$  verfeinert.

Bei den Strukturen bis zu einer Auflösung von 1.78 Å und 1.55 Å konnte die Anordnung des Cofaktors und des Substrates im aktiven Zentrum mit Hilfe von *omit*-Dichtekarten bestimmt werden. Diese Anordnung wurde durch 2fofc-Elektronendichtekarten der Strukturen der hochaufgelösten Datensätze bestätigt.

Die für die Katalyse notwendigen, bei SDR-Proteinen konservierten Aminosäuren Ser142, Tyr155 und Lysin159 sowie der typische für SDR-Proteine vorgeschlagene enzymatische Reaktionsmechanismus konnte dabei bestätigt werden.

Die im Vergleich zum Wildtyp bevorzugte Cosubstratspezifität der R-ADH-Lb-G37D für NAD(H) konnte durch eine neue Wechselwirkung zwischen dem Asp37 und der 2'-Hydroxylgruppe der Adenosinribose des NAD(H) und einer elektrostatisch-sterischen Hinderung zwischen dem Asp37 und der 2'-Phosphatgruppe des Adenosinteils des NADP(H) erklärt werden.

Aus dem Vergleich mit anderen SDR-Proteinen ließ sich eine allgemeine Regel für die Cofaktorspezifität postulieren. Hierbei scheint das Vorhandensein eines Arginin-Restes eine NADP(H)-Spezifität und das Vorhandensein eines Aspartat-Restes eine NAD(H)-Spezifität festzulegen. Das gleichzeitige Vorliegen von Arginin und Aspartat im Bereich der Adeninribose des Cofaktors führt zu einer dualen Cofaktorspezifität.

Die eindeutige R-Stereospezifität bei der Umsetzung chiraler Substrate und die für den Wildtyp bekannten Substratspezifitäten konnten durch die Anordnung des Substrats Phenylethanol im aktiven Zentrum und durch die Wechselwirkungen innerhalb der hydrophoben Substratbindungstasche erklärt werden.

Der Vergleich zwischen dem ternären Komplex und dem Apoenzym läßt darauf schließen, daß der bei SDR-Proteinen bekannte flexible Substratbindungsloop erst durch die Bindung von Substrat und Cofaktor vollständig fixiert wird. Während der Substrat- und Cofaktorbindung scheint eine induzierte Umlagerung dieses Substratbindungsloops stattzufinden, die bei einzelnen Aminosäureresten innerhalb dieser Region zu einer Verschiebung von bis zu 3 Å führt.

Die thermoalkalophile Lipase aus *Bacillus thermocatenuatus* ist ein lipolytisches Enzym, welches im Vergleich zu anderen bekannten Lipasen mit 44 kDa ein hohes Molekulargewicht besitzt. Für das His-getaggte Protein konnten ein einstufiges und ein zweistufiges Reinigungsprotokoll entwickelt werden mit denen das Enzym bis zur Homogenität gereinigt werden konnte. Untersuchungen des Aggregationsverhaltens mittels dynamischer Lichtstreuung zeigten, daß die Lipase, die einen Anteil von 33 % an hydrophoben Aminosäuren besitzt, zu einer starken Oligomerisierung während der Konzentrierung neigt und daher schon bei geringen Konzentrationen aggregiert und auch präzipitiert.

Kristallisationsversuche dieser oligomerisierten Lipase führten zu einer nicht-reproduzierbaren Kristallisation und zur Röntgendiffraktionsmessung eines ersten nativen Datensatzes bis zu einer Auflösung von 3.3 Å. Für das in der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  kristallisierte Enzym zeigte sich durch die Berechnung der Packungsdichte und Rechnungen zur Selbstrotationsfunktion, daß ein Monomer in der asymmetrischen Einheit der kristallographischen Einheitszelle vorlag. Eine Strukturlösung auf Grundlage des gemessenen Datensatzes durch molekularen Ersatz war nicht möglich, da keine homologen Kristallstrukturen bekannt waren.

Durch die Zugabe von 5 % Isopropanol konnte die Oligomerisierung der Lipase während der Konzentrierung verhindert werden und die Lipase in Monomerform konzentriert und reproduzierbar (quasi-) kristallisiert werden. Die gelartige Konsistenz dieser Kristalle verhinderte aber eine Röntgendiffraktionsmessung.

# 7 Ausblick

## 7.1 Die R-ADH-Lb-G37D

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen die Struktur des ternären Komplexes der R-ADH-Lb-G37D in atomarer Auflösung zu bestimmen und die Verhältnisse in der Substrat- und Cofaktorbindungsstelle sowie im aktiven Zentrum zu beschreiben. Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte zunächst die Strukturaufklärung des in der Raumgruppe *I*222 kristallisierten Apoenzyms mit einer vergleichbar hohen Auflösung wie beim ternären Komplex erreicht werden, um abschließend zu überprüfen, ob es bei der Substrat- und Cofaktorbindung zu einer induzierten Umlagerung einzelner Aminosäurebereiche (z.B. des Substratbindungsloops) kommt.

Zusätzlich sollte die systematische Kristallisation weiterer ternärer Komplexe durchgeführt werden, bei denen andere Substrate außer Phenylethanol verwendet werden. Dabei bieten sich Substrate wie Pyruvatmethylester und Methylcyclohexanon an, die durch die R-ADH-Lb-G37D besser umgesetzt werden als Phenylethanol, und daher zu einer festeren Anordnung bzw. Bindung im aktiven Zentrum führen könnten.

Interessant wäre weiterhin die Kristallisation unter Verwendung von NADP(H) anstatt NAD(H), um die Unterschiede zwischen der NADP(H)- und NAD(H)-Bindung an der Cosubstratbindungsstelle der R-ADH-Lb-G37D zu untersuchen.

Um die duale Cosubstratspezifität der R-ADH-Lb-G37D in eine reine NAD(H)-Abhängigkeit zu ändern und um die postulierte Regel für die Cosubstratspezifität zu überprüfen, sollten Doppelmutanten der R-ADH-Lb hergestellt werden, bei denen das Glycin 37 gegen Aspartat und das Arginin 38 gegen eine bei anderen NAD(H)-abhängigen SDR-Proteinen an dieser Position vorkommende nicht-basische Aminosäure ausgetauscht werden. Dies könnten z.B. Doppelmutanten der Art R-ADH-Lb-G37D-R38V sein.

Schließlich wäre es sinnvoll die Substratspezifität der R-ADH-Lb-G37D zu verändern. Hierbei sollten Mutationen der hydrophoben Aminosäuren innerhalb der Substratbindungsregion durchgeführt werden. Insbesondere Tyr189 und Leu152 würden sich dabei für einen Austausch anbieten.

## 7.2 Die H<sub>6</sub>-BTL-2

Eine reproduzierbare Kristallisation der H<sub>6</sub>-BTL-2 und die Herstellung von Kristallen, die eine für Röntgendiffraktionsmessungen notwendige Qualität und Konsistenz besitzen, ist bisher leider nicht gelungen. Da auf Ebene der Kristallisation eine Vielzahl von unterschiedlichen

Strategien nicht zum Erfolg führte, wäre es vielmehr sinnvoll auf einer früheren Ebene Änderungen vorzunehmen, die im weiteren Verlauf die Kristallisation positiv beeinflussen könnten.

Daher würde es sich anbieten durch umfassende Mutagenesestudien und systematische Aminosäureaustausche insbesondere von hydrophoben Aminosäureseitenketten den hydrophoben Charakter der Lipase zu verringern und somit die Tendenz zur Oligomerisierung zu erniedrigen. Weiterhin würde sich anbieten, einzelne Domänen des Enzyms zu entfernen und den Einfluß dieser Veränderungen auf das Kristallisationsverhalten zu beobachten.

Zusätzlich sollten ausgehend von der H<sub>6</sub>-BTL-2 unterschiedliche Konstrukte produziert werden, bei denen der *His-tag* durch eine Schnittstelle entfernt werden kann oder durch einen anderen *tag* ersetzt ist.

Auf der Stufe der Kristallisation würde sich dann im weiteren anbieten Lipase-Inhibitor-Komplexe mit Derivaten des Lipase-Inhibitors 1,2-Dialkylcarbamoylglycero-3-O-p-nitrophenylalkylphosphonaten (Lang et al., 1998) herzustellen.

# Anhang

## A.1 Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden zwei biotechnologisch interessante Enzyme untersucht. Von der Mutante G37D der R-spezifischen Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* wurde die Kristallstruktur eines ternären Komplexes aus Enzym, Substrat und Cofaktor in atomarer Auflösung mittels molekularen Ersatzes aufgeklärt. Als Suchmodell wurde der NADP(H)-abhängige Wildtyp der Alkoholdehydrogenase verwendet und das Strukturmodell bis zu einem R-Wert von  $R_{\text{free}} = 16.7\%$  verfeinert. Die Anordnung des Cofaktors und des Substrats im aktiven Zentrum konnte bestimmt und der für diese Enzymgruppe enzymatische Reaktionsmechanismus bestätigt werden. Die Struktur des ternären Komplexes zeigt die für die Mitglieder der kurz-kettigen Dehydrogenase/Reduktase-Familie typische Anordnung von Substrat und Cofaktor und weist die für die Katalyse notwendigen, konservierten Aminosäuren Ser142, Tyr155 und Lys159 auf. Die im Vergleich zum Wildtyp bevorzugte Cosubstratspezifität für NAD(H) anstatt NADP(H) kann durch eine neue Wechselwirkung zwischen dem Asp37 und der 2'-Hydroxylgruppe der Adenosinribose des NAD(H) und einer sterischen Hinderung zwischen Asp37 und der 2'-Phosphatgruppe des Adenosinteils des NADP(H) erklärt werden. Die eindeutige R-Stereospezifität bei der Umsetzung chiraler Substrate läßt sich aus der Anordnung des Substrats im aktiven Zentrum ableiten.

Die thermoalkalophile Lipase aus *Bacillus thermocatenuatus* konnte gereinigt und nicht-reproduzierbar kristallisiert werden. Ein nativer Röntgendiffraktionsdatensatz konnte bis zu einer Auflösung von 3.3 Å gemessen werden. Untersuchungen des Aggregationsverhaltens mittels dynamischer Lichtstreuung zeigten, daß die Lipase zu einer starken Oligomerisierung während der Konzentrierung neigt, welche die reproduzierbare Kristallisation verhindert. Durch die Zugabe von 5 % Isopropanol konnte die Aggregation verhindert, die Lipase in Monomerform konzentriert und reproduzierbar (quasi-) kristallisiert werden.

## A.2 Abstract

In this Ph.D.-thesis two biotechnologically interesting enzymes were investigated. The crystal structure of a ternary complex of a mutant of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* with substrate and cofactor has been determined at atomic resolution by means of molecular replacement. The wildtype of the alcohol dehydrogenase was used as a search model and the 3D-structure was refined to a final  $R_{\text{free}}$ -factor of 16.7 %. The arrangement of the cofactor and substrate in the active site was clearly defined and the derived enzymatic reaction mechanism could be rationalized. The structure of the ternary complex shows an arrangement of the substrate and cofactor similar to those of other short chain dehydrogenase/reductase enzymes and features the conserved catalytic residues Ser142, Tyr155 and Lys159 in the active site. The elevated cosubstrate specificity of NAD(H) over NADP(H) in comparison to the wildtype could be explained with a new interaction between the hydroxyl group of the adenosine ribose moiety of NAD(H) and the side chain of Asp37 and an unacceptably close contact of Asp37 with the 2'-phosphate group of the adenosine moiety of NADP(H). The R-stereospecificity of the conversion of chiral substrates could be rationalized by the arrangement of the substrate in the active site.

The thermoalcalophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus* was purified and non-reproducibly crystallized. A first native data set was collected up to 3.3 Å. Investigations of the aggregation behaviour using dynamic light scattering revealed a strong oligomerization upon concentration, which disturbs reproducible crystallization. Adding 5 % isopropanol yielded in the concentration of monomeric lipase and a reproducible (quasi-) crystallization.

### A.3 Lebenslauf

09.01.1972	geboren in Schüttorf (Niedersachsen) Staatsangehörigkeit deutsch
1978 - 1982	Grundschule
1982 - 1991	Gymnasium in Köln-Porz
11.06.1991	Allgemeine Hochschulreife
01.08.1991 - 31.10.1992	Zivildienst
WS 92/93 - SS 97	Studium der Chemie
Januar 1997 - September 1997	Anfertigen der Diplomarbeit in Fach Chemie in Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. D. Schomburg und Prof. Dr. U. I. Flügge an der Universität zu Köln Thema: "Charakterisierung plastidärer Transportprozesse, Biochemische und physiologische Analyse transgener Tabaklinien mit einer Antisense-Repression des chloroplastidären Triose-Phosphat Phosphat-Translokator"
30.09.1997	Abschluß des Diplomstudiums (Chemie)
WS 95/96 - WS 97/98	Studium der Biologie
Dezember 1997 - März 1998	Anfertigen der Diplomarbeit in Fach Biologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. I. Flügge an der Universität zu Köln Thema: "Die Kontrolle des chloroplastidären Triose-P/Phosphat-Translokators (TPT) auf metabolische Flüsse in transgenen Tabakpflanzen"
26.03.1998	Abschluß des Diplomstudiums (Biologie)
seit Mai 1998	Anfertigen der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Schomburg an der Universität zu Köln

## A.4 Veröffentlichungen über die Diplomarbeiten

CHäusler, R. E., Schlieben, N. H., Schulz, B., Flügge, U.I. (1998)

Compensation of decreased triose phosphate/phosphate translocator activity by accelerated starch turnover and glucose transport in transgenic tobacco.

*Planta* **204** (3), 366-376.

CHäusler, R. E., Schlieben, N. H., Nicolay, P., Fischer, K., Fischer, K. L., Flügge, U. I. (2000)  
Control of carbon partitioning and photosynthesis by the triose phosphate/phosphate translocator in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum L.*). I. Comparative physiological analysis of tobacco plants with antisense repression and overexpression of the triose phosphate/phosphate translocator.

*Planta* **210** (3), 371-382.

CHäusler, R. E., Schlieben, N. H., Flügge, U. I. (2000)

Control of carbon partitioning and photosynthesis by the triose phosphate/phosphate translocator in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*). II. Assessment of control coefficients of the triose phosphate/phosphate translocator.

*Planta* **210** (3), 383-390.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Aminosäuresequenz der R-ADH-Lb-G37D	9
1.2	Karte des Expressionsvektors pT <sub>1</sub>	13
1.3	Aminosäuresequenz der H <sub>6</sub> -BTL-2	14
4.1	Chromatogramme der R-ADH-Lb-G37D	43
4.1	Chromatogramme der R-ADH-Lb-G37D	44
4.2	SDS-Gel der erhaltenen R-ADH-Lb-G37D-Fraktionen	46
4.3	Massenspektrum eines MALDI-TOF-Experimentes	47
4.4	Massenspektrum eines ESI-MS-Experimentes der R-ADH-Lb-G37D	47
4.5	Kristalle des ternären Komplexes der R-ADH-Lb-G37D	51
4.6	Hochaufgelöste Beugungsaufnahme	53
4.7	Ausschnitt der hochaufgelösten Beugungsaufnahme	53
4.8	Karten der Selbstrotationsfunktionen	57
4.8	Elektronendichte des Aminosäurerestes Tyr155	66
4.9	Ramachandran-Diagramm der endverfeinerten Struktur	67
4.10	Chromatogramme der H <sub>6</sub> -BTL-2	70
4.11	<i>pH-scouting</i> -Versuche bei der Kationenaustausch-Chromatographie	72
4.12	Chromatogramme der H <sub>6</sub> -BTL-2 bei unterschiedlichen pH-Werten	74
4.13	Chromatogramm der H <sub>6</sub> -BTL-2	74
4.14a	SDS-Gele der 2-Schritt-Reinigung der H <sub>6</sub> -BTL-2	76
4.14b	SDS-Gel der 1-Schritt-Reinigung der H <sub>6</sub> -BTL-2	77
4.15	Natives und IEF-Gel der gereinigten H <sub>6</sub> -BTL-2	77
4.16	Massenspektrum eines MALDI-TOF-Experimentes der H <sub>6</sub> -BTL-2	78
4.17	CD-Spektrum der H <sub>6</sub> -BTL-2 bei T = 20°C	79
4.18	Schmelzkurve der H <sub>6</sub> -BTL-2 bei einer Wellenlänge von $\lambda = 210$ nm	80
4.19	Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrads von der Proteinkonzentration	83
4.20	Einfluß von Glycerin und Isopropanol auf den Oligomerisierungsgrad	84
4.21	Einfluß von Isopropanol, MPD und PEG 400 auf den Oligomerisierungsgrad	85
4.22	Einfluß der Isopropanol-Konzentration und des pH auf die Oligomerisierung	86
4.23	Einfluß der Isopropanol-Konzentration auf den Oligomerisierungsgrad	87
4.24	Änderung des Oligomerisierungsgrads der H <sub>6</sub> -BTL-2 bei der Umpufferung	88
4.25	Einfluß von LDAO auf den Oligomerisierungsgrad	90
4.26	Kristalle der oligomerisierten H <sub>6</sub> -BTL-2	92
4.27	Kristalle der monomeren H <sub>6</sub> -BTL-2	94
4.28	Beugungsaufnahme eines primitiv orthorhombischen Kristalls der H <sub>6</sub> -BTL-2	95
4.29	Karte der Selbstrotationsfunktion bei $\kappa = 180^\circ$ für die H <sub>6</sub> -BTL-2	99

5.1	Struktur und Elektronendichte der R-ADH-Lb-G37D . . . . .	105
5.2	Anfärbung der Sekundärstrukturanteile des ternären Komplexes . . . . .	106
5.3	Bereiche mit alternativen Konformationen . . . . .	108
5.4	Superposition verschiedener R-ADH-Lb-G37D-Strukturen . . . . .	109
5.5	<i>omit</i> -Dichtekarten des NADH bzw. 2fofc-Elektronendichtekarten . . . . .	112
5.6	<i>omit</i> -Dichtekarten des Phenylethanol bzw. 2fofc-Elektronendichtekarten . . . . .	113
5.7	Fixierung des NADH an der Cosubstratbindungsstelle . . . . .	115
5.8	Fixierung des Phenylethanol in der Substratbindungsstelle . . . . .	116
5.9	2fofc-Elektronendichtekarte des aktiven Zentrums . . . . .	118
5.10	Übersicht über das aktive Zentrum . . . . .	119
5.11	Superposition der R-ADH-Lb-G37D-Strukturen . . . . .	120
5.12	Stereospezifität der R-ADH-Lb-G37D . . . . .	125
5.13	Mögliche Anordnung von Acetessigsäurealkylestern im aktiven Zentrum . . . . .	127
5.14	Mögliche Anordnung von 2,4-Dichlorphenylethanol im aktiven Zentrum . . . . .	128
5.15	Superposition verschiedener SDR-Strukturen . . . . .	129
5.16	Superposition des aktiven Zentrums ternärer SDR-Strukturen . . . . .	130

# Tabellenverzeichnis

3.1	Verwendete Geräte .....	28
3.2	Sonstige Materialien .....	29
3.3	Computerprogramme .....	30
3.4	Meßparameter der Diffraktionsexperimente an der institutseigenen Drehanode ...	38
3.5	Meßparameter der hochaufgelösten Datensätze am <i>ESRF</i> .....	38
4.1	Zusammenfassung der verschiedenen Reinigungsschritte der R-ADH-Lb-G37D ..	45
4.2	Erfolgreiche Kristallisationsbedingungen der R-ADH-Lb-G37D .....	50
4.3	Statistiken der verschiedenen Datensätze. ....	55
4.4	Wichtigste Schritte der Strukturverfeinerung des Apoenzyms .....	61
4.5	Wichtigste Schritte der Strukturverfeinerung des ternären Komplexes (1.78 Å). ...	62
4.6	Wichtigste Schritte der Strukturverfeinerung des ternären Komplexes (1.55 Å). ...	63
4.7	Wichtigste Schritte der Strukturverfeinerung des ternären Komplexes (1.10 Å) ...	64
4.8	Wichtigste Schritte der Strukturverfeinerung des ternären Komplexes (1.05 Å) ...	65
4.9	Statistik der mit PROCHECK berechneten $\Phi/\Psi$ -Torsionswinkelverteilung .....	67
4.10	Zusammenfassung der verschiedenen Reinigungsschritte für die H <sub>6</sub> -BTL-2 .....	71
4.11	Zusammenfassung der Ergebnisse der Reinigung für die H <sub>6</sub> -BTL-2 .....	75
4.12	Ermittelte Sekundärstrukturanteile der H <sub>6</sub> -BTL-2. ....	79
4.13	Statistik des nativen Datensatzes der H <sub>6</sub> -BTL-2 .....	97
4.14	Bestimmung der genauen Raumgruppe .....	98
5.1	Besetzungs- und Temperaturfaktoren .....	104
5.2	Temperaturfaktoren innerhalb der Strukturen der vier ternären Komplexe. ....	106
5.4	Mit PROFIT ermittelte mittlere Abweichungen der C $\alpha$ -Atome .....	110
5.5	Abhängigkeit der Cofaktorspezifität .....	123
5.7	Temperaturfaktoren innerhalb der bekannten binären Komplexe der SDR-Familie. 131	
5.6	Temperaturfaktoren innerhalb der bekannten ternären Komplexe der SDR-Familie 132	
5.7	Sequenzidentität der H <sub>6</sub> -BTL-2 und anderer bekannter Lipase-Strukturen .....	135
5.8	Übersicht über zur H <sub>6</sub> -BTL-2 homologen Lipasen .....	135



# Literaturverzeichnis

- Albalat, R., Gonzales-Duarte, G., Atrian, S. (1992) Protein engineering of *Drosophila* alcohol dehydrogenase. The hydroxyl group of Tyr152 is involved in the active site of the enzyme. *FEBS Lett.* **308** (3), 235-239.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Andersson, A., Jordan, D., Schneider, G., Lindqvist, Y. (1996) Crystal structure of the ternary complex of 1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase from *Magnaporthe grisea* with NADPH and an active-site inhibitor. *Structure* **4** (10), 1161-1170.
- Anderson, K. M., Hovmöller, S. (2000) The protein content in crystals and packing coefficients in different space groups. *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* **56**, 789-790.
- Andrade, M. A., Chacon, P., Merelo, J. J., Moran, F. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from uv circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng.* **6** (4), 383-390.
- Arnold, F. H., Volkov, A. A. (1999) Directed evolution of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 54-59.
- Arpigny, J. L., Jaeger, K. E. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* **343** (1), 177-183.
- Auerbach, G., Herrmann, A., Gütllich, M., Fischer, M., Jacob, U., Bacher, A., Huber, R. (1997) The 1.25 D crystal structure of sepiapterin reductase reveals its binding mode to pterins and brain neurotransmitters. *EMBO* **16** (24), 7219-7230.
- Azzi, A., Rehse, P. H., Zhu, D.-W., Campbell, R. L., Labrie, F., Lin, S.-X. (1996) Crystal structure of human estrogenic 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase complexed with 17 $\beta$ -estradiol. *Nat. Struct. Biol.* **3** (8), 665-668).
- Bauer, A. J., Rayment, I., Frey, P. A., Holden, H. M. (1992) The molecular structure of UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli* determined at 2.5 D resolution. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **12**, 372-381.
- Benach, J., Atrian, S., Gonzales-Duarte, R., Ladenstein, R. (1998) The Refined Crystal Structure of *Drosophila lebanonensis* Alcohol Dehydrogenase at 1.9 D Resolution. *J. Mol. Biol.* **282**, 383-399.

- Benach, J., Atrian, S., Gonzales-Duarte, R., Ladenstein, R. (1999) The Catalytic Reaction and Inhibition Mechanism of *Drosophila* Alcohol Dehydrogenase: Observation of an Enzyme-bound NAD-ketone Adduct at 1.4 Å Resolution by X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* **289**, 335-355.
- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., Tasumi, M. (1977) The protein data bank: a computer based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* **112** (3), 535-542.
- Bergfors, T. M. (1999) Protein Crystallization. *International University Line*, La Jolla, California, USA.
- Blundell, T. L., Johnson, L. N. (1976) Protein Crystallography. *Academic Press*, New York.
- Boesten, W. H. J., Moody, H. M., Roos, E. C. (1996) Process for the recovery of ampicillin from enzymatic acylation of 6-aminopenicillanic acid. *Chemferm*, Patent Nr. WO.9639376, Niederlande.
- Bond, C. S., White, M. F., Hunter, W. N. (2001) High-Resolution Structure of the Phosphohistidine-Activated Form of *Escherichia Coli* Cofactor-Dependent Phosphoglycerate Mutase. *J. Biol. Chem.* **276**, 3247-3253.
- Bourne, Y., Martinez, C., Kerfelec, B., Lombardo, D., Chapus, C., Cambillau, C. (1994) Horse pancreatic lipase. The crystal structure refined at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **238** (5), 709-732.
- Borras, T., Persson, B., Jörnvall, H. (1989) Eye lens zeta-crystallin relationships to the family of long-chain alcohol/polyol dehydrogenases. Protein trimming and conservation of stable parts. *Biochem.* **28** (15), 6133-6139.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L., Menge, U. (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343** (6260), 767-70.
- Bränden, C.-I., Jones, T. A. (1990) Between objectivity and subjectivity. *Nature* **343**, 687-698.
- Breton, R., Housset, D., Mazza, C., Fontecilla-Camps, J. C. (1996) The structure of a complex of human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and NADP<sup>+</sup> identifies two principal targets for the design of inhibitors. *Structure* **4** (8), 905-915.

- 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 Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54** (5), 905-921.
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Huge-Jensen, B., Patkar, S. A., Thim, L. (1991) A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **351** (6326), 491-494.
- Brzozowski, A. M., Savage, H., Verma, C. S., Turkenburg, J. P., Lawson, D. M., Svendsen, A., Patkar, S. (2000) Structural Origins of the Interfacial Activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* Lipase. *Biochem.* **39**, 15071-15082.
- CCP4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50** (5), 760-763.
- Chen, Z., Lee, W. R., Chang, S. H. (1991) Role of aspartic acid 38 in the cofactor specificity of *Drosophila* alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **202** (2), 263-267.
- Chen, Z., Jiang, J. C., Lin, Z. G., Lee, W. R., Baker, M. E., Chang, S. H. (1993) Site-specific mutagenesis of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: evidence for involvement of tyrosine-152 and lysine-156 in catalysis. *Biochem.* **32** (13), 3342-3346.
- Chen, Z., Tsigelny, I., Lee, W. R., Baker, M. E., Chang, S. H. (1994) Adding a positive charge at residue 46 of *Drosophila* alcohol dehydrogenase increases cofactor specificity for NADP<sup>+</sup>. *FEBS Letters* **356**, 81-85.
- Cols, N., Marfany, G., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R. (1993) Effect of site-directed mutagenesis on conserved positions of *Drosophila* alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.* **319**, 90-94.
- Cudney, B., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y., McPherson, A. (1994) Screening and Optimization Strategies for Macromolecular Crystal Growth. *Acta Cryst. D***50**, 414-423.
- Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M., Derewenda, Z. S. (1992) Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochem.* **31** (5), 1532-1541.
- Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Yamaguchi, S., Joerger, R., Haas, M. J., Derewenda, Z. S. (1994) Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Eng.* **7** (4), 551-557.
- Dordick, J. S. (1991) *Biocatalysts for Industry*. Plenum Press, New York.
- Ducruix, A., Giege, R. (1999) Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, *Oxford University Press*, Oxford.

- Egloff, M. P., Sarda, L., Verger, R., Cambillau, C., van Tilbeurgh, H. (1995) Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase. *Protein Sci.* **4** (1), 44-57.
- Eklund, H., Horjales, E., Lörnvall, H., Bränden, C.I., Jeffery, J. (1985) Molecular aspects of functional differences between alcohol and sorbitol dehydrogenases. *Biochem.* **24**, 8005-8012.
- Elander, R. P. (1987) *Basic Biotechnology*. (Herausgeber: Bu'lock, J., Kristiansen, B.), Academic Press.
- Ensor, C. M., Tai, H. H. (1991) Site-directed mutagenesis of the conserved tyrosine 151 of human placental NAD<sup>+</sup>-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase yields a catalytically inactive enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176** (2), 840-845.
- Ensor, C. M., Tai, H. H. (1994) Bacterial expression and site-directed mutagenesis of two critical residues (tyrosine-151 and lysine-155) of human placental NAD<sup>+</sup>-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1208** (1), 151-156.
- Ensor, C. M., Tai, H. H. (1996) Site-directed mutagenesis of the conserved serine 138 of human placental NAD<sup>+</sup>-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase to an alanine results in an inactive enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 330-333.
- Enzelberger, M. M., Minning, S., Schmid, R. D. (2000) Designing new metal affinity peptides by random mutagenesis of a natural metal-binding site. *J. Chromatogr. A.* **898** (1), 83-94.
- Esnouf, R. M., (1997) BOBSCRIPT: An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graph. Model* **15**, 132-134, 112-113.
- Faber, K. (1997) *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*. Springer, Berlin.
- Farrell, A. M., Foster, T. J., Holland, K. T. (1993) Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 267-277.
- Fisher, M., Kroon, J. TM, Martindale, W., Stuitje, A. R., Slabas, A. R., Rafferty, J. B. (2000) The X-ray structure of *Brassica napus*  $\beta$ -keto acyl carrier protein reductases and its implications for substrate binding and catalysis. *Structure Fold. Des.* **8** (4), 339-347.
- Goetz, F., Popp, F., Korn, E., Schleifer, K. H. (1985) Complete nucleotide sequence of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* cloned in *Staphylococcus carnosus*. *Nucleic Acids Res.* **13**, 5895-5906.
- Ghosh, D., Weeks, C. M., Grochulski, P., Duax, W. L., Erman, M., Rimsay, R., Orr, J. C. (1991) Three-dimensional structure of holo  $3\alpha,20\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: A member of a short-chain dehydrogenase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10064-10068.

- Ghosh, D., Erman, M., Waarzak, Z., Duax, W. L., Pangborn, W. (1994a) Mechanism of inhibition of  $3\alpha,20\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase by a licorice-derived steroidal inhibitor. *Structure* **15**, 973-980.
- Ghosh, D., Wawrzak, Z., Weeks, C. M., Duax, W. L., Erman, M. (1994b) The refined three-dimensional structure of  $3\alpha,20\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and possible roles of the residues conserved in short-chain dehydrogenases. *Structure* **2** (7), 629-640.
- Ghosh, D., Pletnev, V.Z., Zhu, D. W., Wawrzak, Z., Duax, W. L., Pangborn, W., Labrie, F., Lin, S. X. (1995) Structure of human estrogenic  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase at 2.20 Å resolution. *Structure* **15**, 503-13.
- Ghosh, D., Erman, M., Sawicki, M., Lalam P., Weeksm D. R., Lim N., Pangbornm W., Thiel, D. J., Jörnvall, H., Gutierrezm R., Eyzaguirrem J. (1999) Determination of a protein structure by iodination: the structure of iodinated acetylxylylan esterase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55** (4), 779-784.
- Ghosh, D., Sawicki, M., Pletnev V., Erman, M., Ohno, S., Nakajin, S., Duax, W. L. (2001) Porcine Carbonyl Reductase. *J. Biol. Chem.* **276** (21), 18457-18463.
- Goodhue, C. T. (1982) *Microbial Transformations of Bioactive Compounds*. (Herausgeber: Rosazzam, J. P.), CRC.
- Govardhan, C. P. (1999) Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Curr. Opin. Biotech.* **10**, 331-335.
- Greenfield, N. J. (1996) Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.* **234**, 351-362.
- Grimm, C., Maser, E., Möbius, E., Klebe, G., Reuter, K., Ficner, R. (2000) The Crystal Structure of  $3\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Carbonyl Reductase from *Comamonas testosteroni* Shows a Novel Oligomerisation Pattern within the Short Chain Dehydrogenase/Reductase family. *J. Biol. Chem.* **275** (52), 41333-41339.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Cygler, M. (1994a) Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci.* **3** (1), 82-91.
- Grochulski, P., Bouthillier, F., Kazlauskas, R. J., Serreqi, A. N., Schrag, J. D., Ziomek, E., Cygler, M. (1994b) Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochem.* **33** (12), 3494-3500.
- Havsteen, B. H., Castellanos, R. V., Molina, M., Meseguer, M., Valero, E., Garcia-Moreno, M. (1992) Kinetic theory of action of lipases. *J. Theor. Biol.* **157**, 523-533.
- Hajdu, J., Neutze, R., Sjörgen, T., Edman, K., Szöke, A., Wilmouth, R., Wilmot, C. M. (2000) Analyzing protein functions in four dimensions. *Nat. Struct. Biol.* **7** (11), 1006-1011.

- Hendricksen, W. A., Konnert, J. H. (1980) Stereochemically restrained crystallographic least-square refinement of macromolecular structures. *Biomolecular structure, function, conformation and evolution*, Herausgeber: Srinivasan, R., Pergamon Press, Oxford.
- Horer, S., Stoop, J., Mooibroek, H., Baumann, U., Sassoon, J.. (2001) The Crystallographic Structure of the Mannitol 2-dehydrogenase NADP<sup>+</sup> binary complex from *Agaricus bisporus*. *J Biol Chem.* **276** (29), 27555-27561.
- Hummel, W. (1997) *Frontiers in Biosensorics*.(Herausgeber: Scheller, F., Fedrowitz, J., Schubert, F.), *Birkhäuser*.
- Hummel, W. (1999) Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *TIBTECH* **17**, 487-492.
- Hülsmeier, M., Hecht, H.-J., Niefind, K., Hofer, B., Eltis, L. D., Timmis, K. N., Schomburg, D. (1998) Crystal structure of *cis*-biphenyl-2,3-dihydrodiol-2.3-dehydrogenase from a PCB degrader at 2.0 Å resolution. *Protein Sci.* **7**, 1286-1293.
- Inoue, T., Sunagawa, M., Mori, A., Imai, C., Fukuda, M., Takagi, M., Yano, K. (1989) Cloning and sequencing of the gene encoding the 72-kilodalton dehydrogenase subunit of alcohol dehydrogenase from acetobacter acetii. *J. Bacteriol.* **171** (6), 3115-3122.
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (1983). *Eur. J. Biochem.* **131**, 9-15.
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol.* **53**, 315-351.
- Jaeger, K. E., Reetz, M. T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16** (9), 396-403.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Koch, H. B., Ferrato, F., Dijkstra, B. W. (1993) Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **332**, 143-149.
- Jancarik, J., Kim, S.-H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallisation of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411.
- Jensen, V. J., Rugh, S. (1987) Industrial scale production and application of immobilized glucose isomerase. *Methods Enzymol.* **136**, 356-370.
- Johnson, W. C. Jr. (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* **7** (3), 205-214.
- Jörnvall, H., Höög, J.-O., Persson, B. (1999) SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Letters* **445**, 261-264

- Jörnvall, H., Perrson, B., Jeffery, J. (1981) Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties crossrelate the different enzyme activities within each type. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **78** (7), 4226-4230.
- Jörnvall, H., Perrson, B., Jeffery, J. (1987) Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases: The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **167** (2), 195-201.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzales-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D. (1995) Short-chain dehydrogenases /reductases (sdr). *Biochem.* **34** (18), 6003-6013.
- Jörnvall, H., von Bahr-Lindström, H., Jany, K.-D., Ulmer, W., Fröschle, M. (1984) Extended superfamily of short alcohol-polyol-sugar dehydrogenases: structural similarities between glucose and ribitol dehydrogenases. *FEBS Lett.* **165**, 190-196.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* **27** (2), 110-119.
- Kang, S. T., Rhee, J. S. (1989) Effect of solvents on hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in reverse phase system. *Biotechnol. Lett.* **11** (1), 37-42.
- Kaplan, D. L., Dordick, J. S., Gross, R. A., Swift, G. (1998) Enzymes in polymer science: an introduction. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **684**, 2-16.
- Khmelnitsky, Y. L., Welch, S. H., Dlark, D. S., Dordick, J. S. (1994) Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 2647-2648.
- Kiefer, P. M., Varughese, K. I., Su, Y., Xuong, N. H., Chang, C. F., Gupta, P., Bray, T., Whiteley, J. M. (1996) Altered structural and mechanistic properties of mutant dihydropteridine reductases. *J. Biol. Chem.* **271** (7), 3437-3444.
- Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y., Suh, S.W. (1997) The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* **5** (2), 173-185.
- Klibanov, A. M. (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**, 241-246.
- Kraulis, P. J. (1991) MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **24**, 946-950.
- Kraut, J. (1977) Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 331-358.
- Krook, M., Marekov, L., Jörnvall, H. (1990) Purification and structural characterization of placental nad(+)-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. The primary structure reveals the enzyme to belong to the short-chain alcohol dehydrogenase family. *Biochem.* **29** (3), 738-743.

- Lalonde, J., Navia, M. A., Margolin, A. L. (1997) Crosslinked enzyme crystals of lipases as catalysts for kinetic resolution of acids and alcohols. *Methods Enzymol.* **286**, 443-464.
- Lang, D., Hofmann, B., Haalck, L., Hecht, H. J., Spener, F., Schmid, R. D., Schomburg, D. (1996) Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 refined at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **259** (4), 704-717.
- Lang, D., Mannesse, M., De Haas, G., Verheij, H., Dijkstra, B. (1998) Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur. J. Biochem.* **254**, 333-340.
- Lang, D. A., Mannesse, M. L. M., De Haas, G., Verheij, H. M., Dijkstra, B. W. (unveröffentlicht) Structural Evidence for the Chiral Regio Selectivity of the Lipase from *Pseudomonas* Spec. Atcc 21808.
- 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. Cryst.* **26**, 283-291.
- Lawson, D. M., Brzozowski, A. M., Rety, S., Verma, C., Dodson, G. G. (1994) Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling. *Protein Eng.* **7** (4), 543-550.
- Lee, C. Y., Iandolo, J. J. (1986) Lysogenic conversion of *staphylococcal lipase* is caused by insertion of the bacteriophage L54a genome into the lipase structural gene. *J. Bacteriol.* **166**, 385-391.
- Liao, D.-I., Basareb, G. S., Gatenby, A. A., Valent, B., Jordan, D. B. (2001) Structures of Trihydroxynaphthalene Reductase-Fungicide Complexes: Implications for Structure-Based Design and Catalysis. *Structure* **9**, 19-27.
- Liao, D.-I., Thompson, J. E., Fahnestock, S., Valent, B., Jordan, D. B. (2001) A Structural Account of Substrate and Inhibitor Specificity Differences between Two Naphthol Reductases. *Biochem.* **40**, 8696-8704.
- Lohse, P., Lohse P., Chahrokh-Zadeh, S., Seidel, D. (1997) Human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase and human gastric lipase: site-directed mutagenesis of Cys227 and Cys236 results in substrate-dependent reduction of enzymatic activity. *J. Lipid Res.* **38** (9), 1896-1905.
- Longhi, S., Czjzek, M., Lamzin, V., Nicolas, A., Cambillau, C. (1997) Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis. *J. Mol. Biol.* **268** (4), 779-799.
- Longhi, S., Mannesse, M., Verheij, H. M., De Haas, G. H., Egmond, M., Knoops-Mouthuy, E., Cambillau, C. (1997) Crystal structure of cutinase covalently inhibited by a triglyceride analogue. *Protein Sci.* **6** (2), 275-286.

- Luic, M., Tomic, S., Lescic, I., Ljubovic, E., Sepac, D., Sunjic, V., Vitale, L., Saenger, W., Kojic-Prodic, B. (2001) Complex of *Burkholderia Cepacia* Lipase with Transition State Analogue of 1-Phenoxy-2-Acetoxybutane, Biocatalytic, Structural and Modelling Study. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3964-3973.
- Luyten, M. A., Bur, D., Wynn, H., Parris, W., Gold, M., Friesen, J. D., Jones, J. B. (1989). *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 6800-6804.
- Marekov, L., Krook, M., Jörnvall, H. (1990) Prokaryotic 20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is an enzyme of the 'short-chain, non-metalloenzyme' alcohol dehydrogenase type. *FEBS Lett.* **266**, 51-54.
- Martinez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G., Cambillau, C. (1992) *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature* **356** (6370), 615-618.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.
- Mazza, C., Breton, R., Housset, D., Fontecilla-Camps, J. C. (1998) Unusual Charge Stabilization of NADP<sup>+</sup> in 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **273** (14), 8145-8152.
- McLachlan, A. D. (1982) Rapid comparison of protein structures. *Acta Cryst. A Found. Crystallogr.* **38**, 871-873.
- McPherson, A. (1990) Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.* **189**, 1-23.
- Merritt, E. A. (1999) Expanding the model: anisotropic displacement parameters in protein structure refinement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55** (6), 1109-1117.
- Merritt, E. A., Bacon, D. J. (1997) Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Meth. Enzymol.* **277**, 505-524.
- Misset, O., Gerritse, G., Jaeger, K. E., Winkler, U., Colson, C., Schanck, K., Lesuisse, E., Dartois, V., Blaauw, M., Ransac, S. (1994) The structure-function relationship of the lipases from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *Protein Eng.* **7** (4), 523-529.
- Müller, J. (2000). Röntgenstrukturanalyse der R-spezifischen Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* bei 0.99 D und röntgenkristallographische Untersuchungen an der D-Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis*. *Inaugural-Dissertation*, Universität zu Köln.
- Mulchiak, A. M., Theisen, M. J., Essigmann, B., Benning, C., Garavito, M. (1999) Crystal structure of SQD1, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant sulfolipid headgroup donor UDP-sulfoquinovose., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (23), 13097-13102.

- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Dodson, E. J. (1997) Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum- Likelihood Method. *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240-255.
- Nardini, M., Dijkstra, B. W. (1999) Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9** (6), 732-737.
- Nardini, M., Lang, D. A., Liebeton, K., Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W. (2000) Crystal structure of *pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* **275** (40), 31219-31225.
- Nagasawa, T., Yamada, H. (1990) Application of nitrile converting enzymes for the production of useful compounds. *Pure Appl. Chem.* **62**, 1441-1444.
- Nakajima, K., Yamashita, A., Akama, H., Nakatsu, T., Kato, H., Hashimoto, T., Oda, J., Yamada, Y. (1998) Crystal structure of two tropinone reductases: different reaction stereospecificities in the same protein fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (9), 4876-4881.
- Nakajin, S., Takase, N., Ohno, S., Toyoshima, S., Baker, M. E. (1998) Mutation of tyrosine-194 and lysine-198 in the catalytic site of pig 3-alpha/beta,20-beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem J.* **334** (3), 553-557.
- Nakanishi, M., Matsuura, K., Kaibe, H., Tanaka, N., Nonaka, T., Mitsui, Y., Hara, A. (1996) Switch of Coenzyme Specificity of Mouse Lung Carbonyl Reductase by Substitution of Threonine 38 with Aspartic Acid. *J. Biol. Chem.* **4**, 2218-2222.
- Niefind, K., Riebel, B., Müller, J., Hummel, W., Schomburg, D. (2000). Crystallization and preliminary characterization of R-alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* **56**, 1696-1698.
- Noble, M. E. M., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R., Frenken, L. G. J. (1993) The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* **331**,123-128.
- Nordling, E., Oppermann, U. C., Jörnvall, H., Persson, B. (2001) Human type 10 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: molecular modelling and substrate docking. *J. Mol. Graph. Model.* **19** (6), 514-20, 591-593.
- Obeid, J., White, P. C. (1992) Tyr-179 and Lys-183 are essential for enzymatic activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188** (1), 222-227.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L. (1992) The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Prot. Eng.* **5** (3), 197-211.

- Oppermann, U. C., Filling, C., Berndt, K. D., Persson, B., Benach, J., Ladenstein, R., Jornvall, H. (1997) Active site directed mutagenesis of 3 $\beta$ /17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase establishes differential effects on short-chain dehydrogenase/reductase reactions. *Biochem.* **36** (1), 34-40.
- Oppermann, U. C., Filling, C., Jornvall, H. (2001) Forms and functions of human SDR enzymes. *Chem. Biol. Interact.* **130-132** (1-3), 699-705.
- Otagiri, M., Kurisu, G., Ui, S., Takusagawa, Y., Ohkuma, M., Kudo, T., Kusunoki, M. (2001) Crystal Structure of *meso*-2,3-Butandiol Dehydrogenase in a Complex with NAD<sup>+</sup> and Inhibitor Mercaptoethanol at 1.7 Å Resolution for Understanding of Chiral Substrate Recognition Mechanisms. *J. Biochem.* **129**, 205-208.
- Otwinowski, Z., Minor, W. (1997) Processing of X-Ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Meth. Enzym.* **276**, 307-326.
- Park, O., Kim, D. Y., Dordick, J. S. (2000) Enzyme-catalyzed synthesis of sugar-containing monomers and linear polymers. *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 208-216.
- Persson, B., Jörnvall, H. (1994) A super-family of medium-chain dehydrogenases / reductases (mdr). Sub-lines including zeta-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductase enoyl reductases, vat-1 and other proteins. *Eur. J. Biochem.* **226** (1), 15-22.
- Persson, B., Krook, M., Jörnvall, H. (1991) Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur. J. Biochem.* **200**, 537-543.
- Pokora, A. R., Cyrus, W. L. (1987) Phenolic developer resins. *The Mead Corp.*, Dayton, Ohio: US Patent-Nr. 4647952.
- Powell, A. J., Read, J. A., Banfield, M. J., Gunn-Moore, F., Yan, S. D., Lustbader, J., Stern, A. R., Stern, D. M., Brady, R. L. (2000) Recognition of Structurally Diverse Substrates by Type II 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (HADH II)/Amyloid- $\beta$  Binding Alcohol Dehydrogenase (ABAD). *J. Mol. Biol.* **303**, 311-327.
- Price, A. C., Rock, C. O., White, S. W. (unveröffentlicht) Crystal Structure of  $\beta$ -Ketacyl [Acyl Carrier Protein] Reductase from *E. coli*.
- Provencher, S. W., Glöckner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochem.* **20** (1), 33-37.
- Puranen, T. J., Poutanen, M. H., Peltoketo, H. E., Vihko, P. T., Vihko, R. K. (1994) Site-directed mutagenesis of the putative active site of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Biochem J.* **304** (1), 289-293.

- Rafferty, J. B., Simon, J. W., Baldock, C., Artymiuk, P. J., Baker, P. J., Stuitje, A. R., Slabas, A. R., Rice, D. W. (1995) Common themes in redox chemistry emerge from the X-ray structure of oilseed rape (*Brassica napus*) enoyl acyl carrier protein reductase. *Structure* **3** (9), 927-938.
- Ramachandran, G. N., Sasisekharan, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **23**, 283-438.
- Reid, M. F., Fewson, C. A. (1994) Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Cri. Rev. Microbiol.* **20** (1), 13-56.
- Riebel, B. (1996) Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung neuer mikrobieller NAD(P)-abhängiger Alkoholdehydrogenasen. *Inaugural-Dissertation*, Universität Düsseldorf. *Hoch lebe Köln!*
- Rollof, J., Normark, S. (1992) In vivo processing of *Staphylococcus aureus* lipase. *J. Bacteriol.* **174**, 1844-1847.
- Rosano, C., Izzo, G., Sturla, L., Bisso, A., Tonetti, M., Bolognesi, M. (2000a) The high resolution structure of GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose epimerase/reductase. *Croatica Chem. Acta*.
- Rosano, C., Bisso, A., Izzo, G., Tonetti, L. S., De Flora, A., Bolognesi, M. (2000b) Probing the Catalytic Mechanism of GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose Epimerase/Reductase by Kinetic and Crystallographic Characterization of Site-specific Mutants. *J. Mol. Biol.* **303**, 77-91.
- Rossmann, M. G., Liljas, A., Bränden, C.-I., Babaszak, L. J. (1975) Evolutionary and structural relationship among dehydrogenases. In: *The Enzymes*, 61-102, *Academic Press*, New York.
- Roujeinikova, A., Sedelnikova, S., de Boer, G.-J., Stuitjes, A. R., Slabas, A. R., Rafferty, J. B., Rice, D. W. (1999) Inhibitor Binding Studies on Enoyl Reductase Reveal Conformational Changes Related to Substrate Recognition. *J. Biol. Chem.* **274** (43), 30811-30817.
- Ru, M. T., Dordick, J. S., Reimer, J. A., Clark, D. S. (1999) Optimizing the salt-induced activation of enzymes in organic solvents: effects of lyophilization time and water content. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 233-241.
- Rua, M., L., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A., Schmid, R., D. (1997) Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *J. Biotech.* **56**, 89-102.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Gauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**, 258-268.

- Schmidt-Dannert, C. (1994) Thermophile Lipasen aus *Bacillus thermocatenuatus*: Screening, Reinigung, Charakterisierung, Klonierung. *Inaugural-Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.
- Schomburg, D., Reichelt, J. (1988) BRAGI: A Comprehensive Protein Modeling Program System. *J. Mol. Graphics* **6**, 161-165.
- Schrag, J. D., Cygler, M. (1997) Lipases and alpha/beta hydrolase fold. *Methods Enzymol.* **284**, 85-107.
- Schrag, J. D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., Hecht, H. J., Schmid, R., Schomburg, D., Rydel, T. J., Oliver, J. D., Strickland, L. C., Dunaway, C. M., Larson, S. B., Day, J., McPherson, A. (1997) The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* **5** (2), 187-202.
- Schrag, J. D., Li, Y. G., Wu, S., Cygler, M. (1991) Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* **351** (6329), 761-764.
- Schulze, B., Broxterman, R., Shoemaker, H, Boesten, W. (1998) Review of biocatalysis in the production of chiral fine chemicals. *Spec. Chem.* **18**, 244-246.
- Schwartz, M. F., Jörnvall, H. (1976) Structural analyses of mutant and wild-type alcohol dehydrogenases from *drosophila melanogaster*. *Eur. J. Biochem.* **68** (1), 159-168.
- Somers, W. S., Stahl, M. L., Sullivan, F. X. (1998) GDP-fucose synthetase from *Escherichia coli*: structure of a unique member of the short-chain dehydrogenase/reductase family that catalyses two distinct reactions at the same active site. *Structure* **6** (12), 1601-1612.
- Sreerama, N., Woodym R. W. (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* **209** (1), 32-44.
- Stammers, D. K, Ren, J., Leslie, K., Nichols, C. E., Lamb, H. K., Cocklin, S., Dodds, A., Hawkins, A. R. (2001) The structure of the negative transcriptional regulator NmrA reveals a structural superfamily which includes the short-chain dehydrogenase/reductases. *EMBO J.* **20** (23), 6619-6626.
- Stemmer, W. P. C. (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reasement *in vitro* recombination for molecular evolution. *Nature* **370**, 389-391.
- Stryer, L. (1994) *Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
- Su, Y., Varughese, K. I., Xuong, N. H., Bray, T. L., Roche, D. J., Whiteley, J. M. (1993) The Crystallographic Structure of a Human Dihydropteridine Reductase NADPH Binary Complex Expressed in *Escherichia coli* by a cDNA Constructed from Its Rat Homologue. *J. Biol. Chem.* **268** (36), 26836-26841.
- Swanson, B. A., Frey, P. A. (1993) Identification of lysine 153 as a functionally important residue in UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli*. *Biochem.* **32** (48), 13231-13236.

- Tanaka, N., Nonaka, T., Nakkanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A., Mitsui, Y. (1996a) Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 Å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase / reductase family. *Structure* **4** (1), 33-45.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Tanabe, T., Yoshimoto, T., Tsuru, D., Mitsui, Y. (1996b) Crystal structures of the binary and ternary complexes of 7  $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochem.* **35** (24), 7715-7730.
- Thoden, J. B., Frey, P. A., Holden, H. M. (1996) High-resolution X-ray structure of UDP-galactose 4-epimerase complexed with UDP-phenol. *Protein Sci.* **5**, 2149-2161.
- Tong, L., Rossmann, M. (1997) Rotation Function Calculations with GLRF Program. *Meth Enzym.* **276**, 594-611.
- Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S., Jones, T. A. (1994) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **2** (4), 293-308.
- Uppenberg, J., Ohrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T., Jones, T. A. (1995) Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochem.* **34** (51), 16838-16851.
- Vallee, B. L., Auld, D. S. (1990) Active-site zinc ligands and activated H<sub>2</sub>O of zinc enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 220-224.
- van Aalten, D. M. F., Bywater, R., Findlay, J. B. C., Hendlich, M., Hooft, R. W. W., Vriend, G. (1996) PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules. *J. Comp. Aid. Mol. Des.* **10**, 255-262.
- van Oort, M. G., Deveer, A. M. T. J., Dijkman, R., Tjeenk, M. L., Verheij, H. M., de Haas, G. H., Wenzig, E., Gotz, F. (1989) Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochem.* **28**, 9278-9285.
- van Tilbeurgh, H., Egloff, M. P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R., Cambillau, C. (1993) Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* **362** (6423), 814-820.
- van Pouderoyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.-E., Dijkstra, B. W. (2001) The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal  $\alpha/\beta$  Hydrolase Fold Enzyme. *J. Mol. Biol.* **309**, 215-226.
- Varughese, K. I., Skinner, M. M., Whiteley, J. M., Matthews, D. A., Xuong, N. H. (1992) Crystal structure of rat liver dihydropteridine reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6080-6084.

- Verschueren, K. H., Addy, C., Dodson, E. J., Wilkinson, A. J. (2001) Crystallization of full-length CysB of *Klebsiella aerogenes*, a LysR-type transcriptional regulator. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57** (2), 260-262.
- Westhead, D. R., Slidel, T. W., Flores, T. P., Thornton, J. M. (1999) Protein structural topology: Automated analysis and diagrammatic representation. *Protein Sci.* **8**, 897-940.
- Wichmann, R., Wandres, C., Bückmann, A. F., Kula, M. R. (1981) Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme Membrane Reactor with Simultaneous NAD(H)-Regeneration. *J. Biotechnol.* **23**, 2789-2802.
- Winberg, J. O., Brendskag, M. K., Sylte, I., Lindstad, R. I., McKinley-McKee, J.S. (1999) The catalytic triad in *Drosophila* alcohol dehydrogenase: pH, temperature and molecular modelling studies. *J. Mol. Biol.* **294** (2), 601-616.
- Winkler, F. K., D'Arcy, A., Hunziker, W. (1990) Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343** (6260), 771-774.
- Winkler, U. K., Stuckmann, M. (1979) Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **138** (3), 663-670.
- Yamamoto, K., Kurisu, G., Kusunoki, M., Tabata, S., Urabe, I., Osaki, S. (2001) Crystal Structure of Glucose Dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IWG3 at 1.7 Å Resolution. *J. Biochem.* **129**, 303-312.
- Yamamoto, K., Kusunoki, M., Urabe, I., Tabata, S., Osaki, S. (2000) Crystallization and preliminary X-ray analysis of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IWG3. *Acta Cryst.* **D56**, 1443-1445.
- Yamashita, A., Kato, H., Wakatsuki, S., Tomizaki, T., Nakatsu, T., Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y., Oda, J. (1999) Structure of Tropinone Reductase-II Complexed with NADP<sup>+</sup> and Pseudotropine at 1.9 Å Resolution: Implication for Stereospecific Substrate Binding and Catalysis. *Biochem.* **38**, 7630-7637.

