Strukturuntersuchungen zum Reaktionsmechanismus an der Alkylsulfatase AtsK aus *Pseudomonas putida* S-313

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Ilka Müller
aus Ottweiler

Göttingen 2003

D 7

Referent: Prof. G.M. Sheldrick, PhD

Korreferent: Prof. Dr. Isabel Usón Finkenzeller

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2003

Inhalt

1 Einleitung ... 7
1.1 Die Alkylsulfatase AtsK ... 7
1.2 Die nicht-Häm-Fe(II)-α-ketoglutarsäureabhängige Dioxygenase AtsK ... 8
1.2.1 Der Katalysemechanismus der α-ketoglutarsäureabhängigen Dioxygenasen ... 9
1.2.2 Ungekoppelte Kosubstratoxidationen und Selbsthydroxylierung ... 10
2 Fragestellung ... 11
3 Theoretische Grundlagen ... 13
3.1 Kristallographische Grundlagen ... 13
3.1.1 Strukturlösung ... 13
3.1.2 Dichtemodifikation ... 17
3.1.3 Strukturverfeinerung ... 20
3.2 Röntgenabsorptionsspektroskopie ... 24
3.2.1 EXAFS ... 26
3.2.2 Möglichkeiten von XAS ... 27
4 Experimentelles ... 29
4.1 Kristallisation ... 29
4.2 *Soaking*-Experimente ... 31
4.2.1 Anaerobes *soaking* ... 32
4.2.2 Schweratomderivate ... 32
4.3 AtsK-Ligand-Komplexe ... 33
4.3.1 Eisenkomplexe ... 34
4.3.2 Sulfatester-Komplexe ... 35
4.3.3 Sulfonat-Komplex ... 35
4.3.4 NO-Komplex ... 35
4.3.5 αKG-Decarboxylierung im Kristall ... 36
4.4 Datensammlung ... 38
4.5 Strukturlösung ... 39
4.5.1 Anomale Dispersion und Isomorphe Differenzen ... 40
4.5.2 Schweratompositionen und nicht-kristallographische Symmetrie ... 41
4.5.3 Berechnung der Proteindichte ... 43
4.5.4 Generation des Proteinmodells ... 43
4.5.5 Strukturlösung der AtsK-Komplexe ... 44
4.6 Strukturverfeinerung ... 44

4.7 Evaluation der Strukturmodelle ... 46
4.8 Generation der Abbildungen ... 46
4.9 XAS ... 47
5 Ergebnisse ... 48
5.1 Struktur der Alkylsulfatase AtsK ... 48
5.1.1 Tertiärstruktur ... 48
5.1.2 Quartärstruktur ... 51
5.1.3 Vergleich der Monomere ... 52
5.2 Die aktive Tasche der AtsK ... 56
5.2.1 *apo*-AtsK ... 64
5.2.2 Na-αKG-AtsK-Komplex ... 66
5.2.3 Fe-αKG-AtsK-Komplex ... 68
5.2.4 Na-αKG-Hexylsulfat-Komplex ... 69
5.2.5 Fe-αKG-Substrat-AtsK-Komplexe ... 72
5.2.6 Vergleich der Substrate ... 76
5.2.7 Fe-αKG-Heptylsulfonat-Komplex ... 77
Succinat-AtsK-Komplexe ... 79
5.2.8 Na-Succinat-AtsK-Komplex ... 80
5.2.9 Fe-Succinat-AtsK-Komplex ... 81
5.2.10 Na-Succinat-Substrat-AtsK-Kokristallisation ... 84
5.2.11 Na-Succinat-Hexylsulfat-AtsK-Kokristallisation ... 84
5.2.12 Na-Succinat-Butylsulfat-AtsK-Kokristallisation ... 85
5.2.13 Fe-Succinat-Substrat-AtsK-Komplex ... 86
5.2.14 Die ungekoppelte αKG-Decarboxylierungsreaktion im Kristall ... 87
5.2.15 $P2_12_12_1$ vs $I2_12_12_1$ ... 95
5.3 Röntgenabsorptionsspektroskopie ... 96
5.4 Vergleich mit anderen aKG-abhängigen Dioxygenasen ... 98
6 Diskussion ... 105
6.1 Substrate der AtsK: Sulfatester vs. Sulfonate ... 105
6.2 Der Katalysemechanismus ... 107
6.3 Ungekoppelte Kosubstratoxidation und Selbsthydroxylierung ... 114
7 Zusammenfassung ... 119
8 Ausblick ... 122
9 Literaturverzeichnis ... 123
Anhang ... 130

Abkürzungsverzeichnis

% (*w/w*)	% *weight-weight* (Gewichtsprozent)
αKG	α-Ketoglutarsäure
Abb.	Abbildung
AKG	Dreibuchstabencode für α-Ketoglutarsäure
ANS	Anthocyanidinsynthase
AtsK	Alkylsulfatase
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotron-Stahlung
CAS	Clavaminatsynthase
CC	*correlation coefficient* (Korrelationskoeffizient)
CSD	*Cambridge Structural Database* (Strukturdatenbank für organische und metallorganische Verbindungen)
C-terminal	carboxyterminal
DAOCS	Deacetylcephalosporinsynthase
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron
DOAC/DAC	Deacetyl/Deacetoxycephalosporinsynthase
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESR	Elektronenspinresonanz
et al.	*et alii* (lat.: und andere)
EXAFS	*extended X-ray absorption fine structure* (Feinstruktur des Röntgenabsorptionsspektrums nach der Absorptionskante)
F_c	berechneter Strukturfaktor
FFT	Fast Fourier Transformation
F_o	beobachteter Strukturfaktor
fom	figure of merit
kDa	Kilodalton
M	molar, mol/l
MAD	*multiple anomalous diffraction* (Multiple anomale Dispersion)
mM	10^{-3} mol/l
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MR	*molecular replacement* (Methode des molekularen Ersatzes)
ncs	*non-crystallographic symmetry* (nicht-kristallographische Symmetrie)
N-terminal	aminoterminal

P3H	Prolyl-3-hydroxylase
PATFOM	Patterson figure of merit
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
P_i	Phosphat
PMF	Patterson minimum function
SAS	single anomalous scattering (Anomale Dispersion)
SDS	*sodium dodecyl sulfate* (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese)
SIN	Dreibuchstabencode für Succinat
SIR	single isomorphous replacement (Isomorpher Ersatz)
SIRAS	*single isomorphous replacement anomalous scattering* (Isomorpher Ersatz kombiniert mit anomaler Dispersion)
SSIS	*sulfate-starvation induced stimulon* (Sulfatmangel-induziertes Stimulon)
SSUD	Sulfonatmonooxygenase aus *Pseudomonas putida*
SSUE	FMN-Reduktase aus Pseudomonas putida
Succ	Succinat (Salz der Bersteinsäure)
TauD	Taurin/α-Ketoglutarsäure-Dioxygenase
TfdA	2,4-Dichlorophenoxyessigsäure/α-Ketoglutarsäure-Dioxygenase
TLS	Tensoren zur Beschreibung der anisotropen Bewegung einer starren Gruppe
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
VitC	Vitamin C; Ascorbinsäure
XANES	*X-ray absorption-near edge structure* (Feinstruktur des Röntgenabsorptionsspektrums an der Absorptionskante)
XAS	*X-ray absorption spectroscopy* (Röntgenabsorptionsspektroskopie)

1 Einleitung

1.1 Die Alkylsulfatase AtsK

Die Alkylsulfatase AtsK gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die in Abwesenheit der bevorzugten bakteriellen Schwefelquellen Sulfat, Cystein oder Thiocyanat von *Pseudomonas putida* S-313 synthetisiert werden. Man bezeichnet diese für den Schwefelmetabolismus wichtige Gruppe von Proteinen als SSIS (*sulfate-starvation induced stimulon*) (KAHNERT UND KERTESZ, 2000). Neben Enzymen, die Schwefel aus Sulfatestern und Sulfonaten freisetzen, beinhaltet das SSIS auch Transportproteine und Regulatoren (siehe **Abb. 1**). Bei *Pseudomonas putida* S-313 handelt es sich um ein Klärschlammisolat, welches durch das SSIS im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien in der Lage ist, eine Vielzahl unterschiedlicher organischer Sulfatester und Sulfonate in seinem Schwefelmetabolismus zu nutzen.

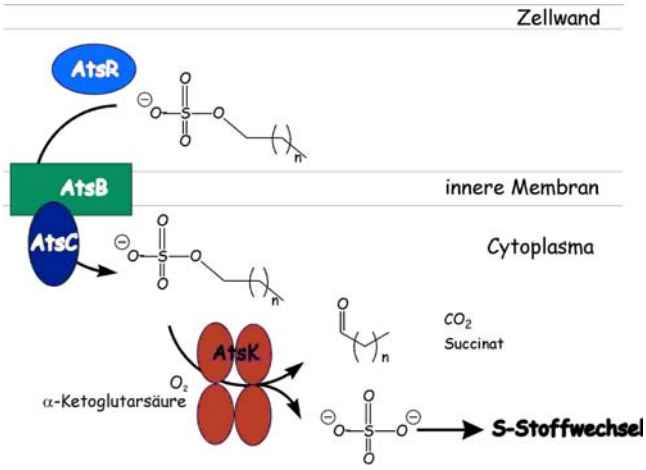


Abb. 1 Zusammenspiel der an der Alkylsulfataufnahme und -umsetzung beteiligten Enzyme des SSIS. Nicht gezeigt ist das Protein SftR, welches die ats-Gene zur Expression der Enzyme AtsK und AtsB stimuliert. Bei AtsR handelt es sich um ein periplasmatisches Bindeprotein, AtsB ist die an die ATPase AtsC gekoppelte Membrankomponente, die die Aufnahme der Sulfatester in das Cytoplasma steuert. Im Cytoplasma setzt das aktive Tetramer der AtsK das Sulfat aus dem Sulfatester frei. (KAHNERT UND KERTESZ, 2000; KAHNERT, 2002).

In aeroben Böden und in Klärschlamm kommt Schwefel statt als anorganisches Sulfat hauptsächlich organisch gebunden in Form von Sulfonaten (C-SO_3H) und Sulfatestern (C-O-SO_3H) vor. Diese Schwefelderivate sind sowohl xenobiotischen als auch natürlichen Ursprungs. Anthropogene Quellen für Sulfatester sind Tenside wie beispielsweise SDS (*sodium dodecyl sulfate*). Sulfatierte Verbindungen biologischer Herkunft stellen häufig Ausscheidungsprodukte dar. Somit wird verständlich, weshalb man Organismen wie *Pseudomonas putida* S-313, die

neben der Nutzung von anorganischem Sulfat Wege zum Einbeziehen von organischen Schwefelderivaten in ihren Stoffwechsel entwickelt haben, aus Klärschlamm isolieren konnte, aber auch in unkontaminierten aeroben Böden findet.

Weiterhin sind auch Bakterien bekannt, die organische Schwefelverbindungen als Kohlenstoffquelle nutzen. Bei diesen Organismen erfolgt die Spaltung der Sulfatester über eine enzymkatalysierte Hydrolyse (DODGSON, 1982).

Weiterhin wurden Arylsulfatasen untersucht, bei denen die Spaltung der Sulfatester über eine Proteinsulfatesterzwischenstufe verläuft. Diese Zwischenstufe bildet sich durch den nucleophilen Angriff einer Formylglycingruppe auf das Substrat, wie Röntgenstrukturuntersuchungen gezeigt haben (BOLTES, 2001). Bei dieser Spaltung des Arylsulfates wird der Arylrest als Alkohol freigesetzt. Der Formylglycinrest entsteht durch die Modifikation von Cystein- oder Serinseitenketten (SCHMIDT. 1995; SELMER, 1996; MIECH, 1998; DIERKS, 1998). Die enge Verwandtschaft zwischen bakteriellen und eukaryotischen Arylsulfatasen dieser Art konnte durch Röntgenstrukturuntersuchungen nachgewiesen werden (VON BÜLOW, 2001).

Bei der Alkylsulfatase AtsK handelt es sich um eine nicht-Häm-Fe(II)-α-ketoglutarsäureabhängige Dioxygenase, die die Sulfatesterbindung oxidativ spaltet (QUADRONI, 1999; KAHNERT UND KERTESZ, 2000). Während der Katalyse an einem Eisenzentrum überträgt die Alkylsulfatase AtsK je ein Sauerstoffatom von molekularem Sauerstoff auf den Cofaktor α-Ketoglutarsäure und das C_α-Atom des Sulfatesters. Dabei geht der Sulfatester in ein Halbacetal über und es werden weiterhin Bernsteinsäure und Kohlendioxid aus der α-Ketoglutarsäure freigesetzt. Anschließend reagiert das Halbacetal unter Abspaltung von Sulfat weiter zum Aldehyd. Hierbei stellt sich die Frage, wieso – wenn es sich bei Alkylsulfaten tatsächlich um die natürlichen Substrate von AtsK handelt – das Enzym die Spaltung dieser Alkylsulfate nicht über eine Hydrolyse vollzieht. Der Organismus beschreitet mit der oxidativen Spaltung einen für die Zelle vergleichsweise gefährlichen Reaktionweg, da reaktive Radikalintermediate auftreten.

1.2 Die nicht-Häm-Fe(II)-α-ketoglutarsäureabhängige Dioxygenase AtsK

Allgemein ist die unkatalysierte Reaktion von organischen Substraten mit Sauerstoff thermodynamisch bevorzugt aber kinetisch gehemmt, da sie zum einen *spin*-verboten ist und zum anderen das Ein-Elektronen-Reduktionspotential von O_2 gering ist. Daher muss der molekulare Sauerstoff im Regelfall aktiviert werden. Zur Aktivierung dient bei allen mononuklearen nicht-Häm-Eisenproteinen eine *high spin*-Eisensauerstoffspezies (SOLOMON, 2000). In der nativen Form der Enzyme liegt im aktiven Zentrum ein Eisen(II)-Ion vor. Das

Eisenion wird bei den α-ketoglutarsäureabhängigen Dioxygenasen durch die Aminosäuretriade His-X-Asp/Glu-X_n-His koordiniert. Die Aminosäuretriade ist in einen sogenannten *jelly roll*-Zylinder eingebettet. Dieser ist in seiner Struktur, nicht aber in seiner Sequenz, konserviert. Neben der Eisenbindungstriade und dem *jelly roll*-Zylinder können zwar weitere konservierte Motive bei den verschiedenen α-ketoglutarsäureabhängige Dioxygenasen gefunden werden, eine Sequenzhomologie zwischen ihnen existiert aber ebenfalls nicht. Es kann damit von einer convergenten Entstehung dieser Enzymfamilie ausgegangen werden.[1]

Neben den α-ketoglutarsäureabhängigen Dioxygenasen sind drei weitere Gruppen von nicht-Häm-Eisenproteinen bekannt, die ebenfalls das 2-His-1-Carboxylat-Motiv zur Eisenbindung nutzen (LANGE UND QUE, 1998; QUE, 2000). Die pterinabhängigen Dioxygenasen sind an der Synthese von Neurotransmittern wie L-Dopa im zentralen Nervensystem von Vertebraten beteiligt, indem sie unter Verwendung von Tetrahydrobiopterin als Kosubstrat aromatische Aminosäuren hydroxylieren (FLATMARK UND STEVENS, 1999). Die Rieske-Dioxygenasen übertragen ohne Einbeziehung eines Kosubstrates in einer Vier-Elektronen-Oxidation NADH-vermittelt beide Sauerstoffatome des O_2 auf Arendoppelbindungen (KAUPPI, 1998). Die extradiolspaltenden Catecholdioxygenasen spalten *ortho*-Dihydroxyphenylringe ebenfalls in einer Vier-Elektronen-Übertragungsreaktion (SENDA, 1996; HAN, 1995; KITA, 1999; SUGIMOTO, 1999). Damit kann das 2-His-1-Carboxylat-Motiv als ein weiteres, in der Natur immer wiederkehrendes bioanorganisches Fe-Motiv neben die Häm-Gruppe und die Eisen-Schwefel-Cluster gestellt werden. Die Bedeutung der α-ketoglutarsäureabhängigen Dioxygenasen wird auch daran sichtbar, dass beispielsweise im Genom der *Arabidopsis thaliana* 64 putative Gene für Enzyme dieser Gruppe gefunden wurden.

1.2.1 Der Katalysemechanismus der α-ketoglutarsäureabhängigen Dioxygenasen

Die α-ketoglutarsäureabhängigen Dioxygenasen katalysieren eine breite Palette von Oxidationen an nicht aktivierten CH-Bindungen. Es kann sich bei den Reaktionen um Hydroxylierungen, Einführungen von Mehrfachbindungen oder oxidative Ringerweiterungsreaktionen handeln (QUE UND HO, 1996; SCHOFIELD, 1999). Trotz der unterschiedlichen Arten der Substratoxidation durch die α-ketoglutarsäureabhängigen Dioxygenasen scheint ein gemeinsamer Katalysemechanismus, basierend auf spektroskopischen und kristallographischen Untersuchungen, postuliert werden zu können. Ein erster Vorschlag zum Katalysemechanismus wurde aus Untersuchungen an der Prolylhydroxylase abgeleitet

[1] In Tabelle 15 im Anhang sind die im Rahmen dieser Arbeit diskutierten α-ketoglutarsäureabhängigen Dioxygenasen unter Angabe ihrer Funktion und weiterführender Literatur aufgelistet.

(HANAUSKE-ABEL UND GÜNZLER, 1982). Weitere spektroskopische Untersuchungen und die Kristallstruktur der DAOCS (VALEGÅRD, 1997) führten zur Entwicklung eines gemeinsamen Mechanismus für die α-ketoglutarsäureabhängigen Dioxygenasen (Übersicht: SCHOFIELD UND ZHANG, 1999). Er geht von der Bildung eines Fe(II)-α-Ketoglutarsäure-Substrat-O_2-Komplexes aus, der bei der Decarboxylierung der α-Ketoglutarsäure in eine Fe(IV)=O-Spezies übergeht. Diese Spezies oxidiert in einem weiteren Schritt das Substrat, wobei Eisen erneut die Oxidationsstufe (II) annimmt und bereit für den nächsten Katalysezyklus ist. Dabei bleibt offen, wann die Abspaltung des gebildeten CO_2 erfolgt und wieso in den Fällen, in denen das Substrat hydroxyliert wird, das eingebaute Sauerstoffatom nicht von O_2 stammt.
Da bei der Kristallstrukturanalyse eine Struktur nur in einem räumlichen und in der Regel auch zeitlichen Mittel bestimmt werden, können kurzlebige Zwischenstufen, im Falle der AtsK vor allem Radikalintermediate, au diese Weise nicht nachgewiesen werden. Als Alternative können stabile Analoga dieser Zwischenstufen, beispielsweise ein NO-Komplex anstelle der O_2-Spezies, untersucht werden.

1.2.2 Ungekoppelte Kosubstratoxidationen und Selbsthydroxylierung

Für verschiedene α-ketoglutarsäureabhängige Dioxygenasen ist bekannt, dass es zu oxidativen Modifikationen ihrer Seitenketten kommen kann (RYLE UND HAUSINGER, 2002). Beispielsweise wird bei der 2,4-Dichlorphenoxyessigester-Dioxygenase die Hydroxylierung von Trp112 beobachtet (LIU, 2001); und im Falle der Taurindioxygenase TauD konnte die Hydroxylierung von Tyr73 nachgewiesen werden (RYLE, 2003a). Die physiologische Relevanz dieser Autoxidationen könnte in einer Schutzfunktion des Enzyms liegen. Denn kommt es zu einer von der Substratbindung abgekoppelten Decarboxylierung der α-Ketoglutarsäure, treten reaktive Intermediate auf, die in der Folge auch das Proteinrückgrat schädigen könnten, was durch die Hydroxylierung einer Seitenkette verhindert werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Kristallstruktur des Fe-Succinat-AtsK-Komplexes bestimmen werden, in dem eine Tyrosinseitenkette an das Metall koordiniert. Anhand dieses Komplexes sollen die ungekoppelte Kosubstratoxidation und die Selbsthydroxylierung eingehend diskutiert werden. Ein Schutzmechanismus über die Selbsthydroxylierung ist im Falle der AtsK vielleicht auch der Grund, warum der Organismus keinen Nachteil durch die oxidative Spaltung aliphatischer Sulfatester gegenüber einer Hydrolyse von Sulfatestern erleidet.

2 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit röntgenographischen Untersuchungen an der Alkylsulfatase AtsK aus dem Bakterium *Pseudomonas putida* S-313.

Die Struktur eines Proteins kann sich in Gegenwart von unterschiedlichen Liganden verändern. Diese Variationen können sich auf kleine Bereiche wie eine Metallbindestelle beschränken oder zur Neuorientierung ganzer Gruppen von Aminosäuren führen. Durch eine detaillierte Beschreibung und Interpretation der dazugehörenden Bewegungen können Rückschlüsse auf den Katalysemechanismus gezogen werden. Vergleiche von Strukturen verwandter Proteine helfen, übergeordnete Prinzipien zu finden.

Die vorliegende Probe der AtsK enthält das *apo*-Enzym, da bei der Proteinaufreinigung unter eisenfreien Bedingungen gearbeitet wurde. Unter diesen Voraussetzungen konnten im Falle anderer Enzyme dieser Familie entweder durch die Wahl von geeigneten Kristallisationsbedingungen oder durch *soaking*-Experimente, bei denen der Proteinkristall in einer eisenhaltigen Lösung getränkt wird, neben Kristallen des *apo*-Enzyms auch solche mit Eisen im aktiven Zentrum erhalten werden. Über Co-Kristallisation und *soaking*-Experimente wurde dort weiterhin die Darstellung von Protein/Ligand-Komplexen erreicht. Obwohl für die α-ketoglutarsäureabhängigen Dioxygenasen von einem gemeinsamen Katalysemechanismus ausgegangen wird, ist es schwierig, diesen aus der Vielzahl von Komplexen unterschiedlicher Enzyme dieser Familie abzuleiten. Bislang konnten bei den kristallographisch untersuchten Enzymen nur von wenigen Zwischenstufen Kristallstrukturen erhalten werden. Für die Clavaminatsynthase CAS liegen mit der *apo*-Struktur, dem Fe-α-Ketoglutarsäure-Komplex, einem Fe-α-Ketoglutarsäure-Substrat-Komplex, einem Fe-α-Ketoglutarsäure-Substratanalogon-Komplex und einem Fe-α-Ketoglutarsäure-Substrat-NO-Komplex die meisten Strukturen für ein einzelnes Enzym vor (ZHANG, 2000, ZHANG, 2002) (siehe auch Tabelle 8 in Kapitel 5.4 und Tabelle 15 im Anhang). Diese Komplexe sollen für die AtsK ebenfalls kristallographisch untersucht werden. Darüber hinaus sollen weitere Komplexe, die Aufschluss über den Katalysemechanismus und die Rolle der einzelnen Agitatoren der Katalyse geben, strukturell charakterisiert werden. Durch den Vergleich dieser Strukturen soll schließlich ein Katalysemechanismus postuliert werden.

Weiterhin soll die Interaktion des Proteins mit dem Substrat untersucht werden und, davon abgeleitet, mögliche alternative Substrate für die AtsK diskutiert werden. Es soll ferner geklärt

werden, ob die in einigen der AtsK-Komplexe beobachtete Erhöhung der Symmetrie im Kristall, die bei der Koordination durch verschiedene Liganden an das Enzym zur Änderung der Raumgruppe führt, auf eine konformationelle Umgestaltung des Proteins in bestimmten Regionen zurückzuführen ist. Neben den Resultaten der Röntgenstrukturanalyse sollen die Ergebnisse der röntgenabsorptionsspektroskopischen (XAS) Analyse der AtsK vorgestellt werden. Im Vergleich mit spektroskopischen Untersuchungen an verwandten Enzymen soll die für einige der αKG-abhängigen Dioxygenasen beschriebene, von der Substratbindung abgekoppelte Oxidation des Kosubstrats diskutiert werden.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Kristallographische Grundlagen

3.1.1 Strukturlösung

Die bei einem Beugungsexperiment gemessenen Reflexintensitäten I(hkl) entsprechen dem Quadrat der Amplitude des Strukturfaktors **F**(hkl). Um aus den Strukturfaktoren über eine Fouriersynthese die Elektronendichteverteilung im Kristall zu berechnen, müssen neben den Strukturfaktoramplituden auch ihre Phasen bekannt sein. Das Unvermögen, die relativen Phasen direkt zu messen, wird als das Phasenproblem der Röntgenstrukturanalyse bezeichnet. Zur Lösung des Phasenproblems können unterschiedliche Methoden eingesetzt werden, nachfolgend sollen jedoch nur die Methoden, über die das erste Modell der Alkylsulfatase AtsK erhalten wurde, beschrieben werden (GIACOVAZZO, 2000; BLOW, 2002, DRENTH, 1999; ROSSMANN UND ARNOLD, 2001).

3.1.1.1 Isomorpher Ersatz

Von isomorphem Ersatz spricht man, wenn in einem Kristall ein oder mehrere Atome gegen ein oder mehrere andere (schwerere) Atome ersetzt wurden und der Rest der Struktur im Kristall unverändert bleibt. Beim Austausch von Wasser gegen ein schweres Element wie Quecksilber ändert sich die Zahl der Elektronen im gesamten Proteinkristall nur wenig (im ‰-Bereich). Da die zusätzlichen Elektronen aber an der jeweiligen Atomlage konzentriert sind, ändern sich die Strukturfaktoren und damit die gemessenen Intensitäten der Reflexe signifikant.

Für die Strukturfaktoren des nativen ($\mathbf{F}_P$) und des derivatisierten ($\mathbf{F}_{HP}$) Kristalls gilt der Zusammenhang

$$\mathbf{F}_{HP} = \mathbf{F}_P + \mathbf{F}_H \qquad (1)$$

wobei mit $\mathbf{F}_H$ die Strukturfaktoren der Schweratomsubstruktur bezeichnet werden. Da $\mathbf{F}_H$ klein gegenüber $\mathbf{F}_P$ und $\mathbf{F}_{HP}$ ist, haben letztere fast immer das gleiche Vorzeichen. Für zentrosymmetrische Reflexe berechnen sich die Strukturfaktoramplituden für die Schweratompositionen $|F_H|$ aus denen der nativen $|F_P|$ und der Derivatstruktur $|F_{HP}|$ nach der Gleichung für den isomorphen Ersatz

$$|F_H| = |F_{HP}| - |F_P| \qquad (2)$$

Im nicht-zentrosymmetrischen Fall gibt diese Differenz den minimalen Wert für $|F_H|$ an.

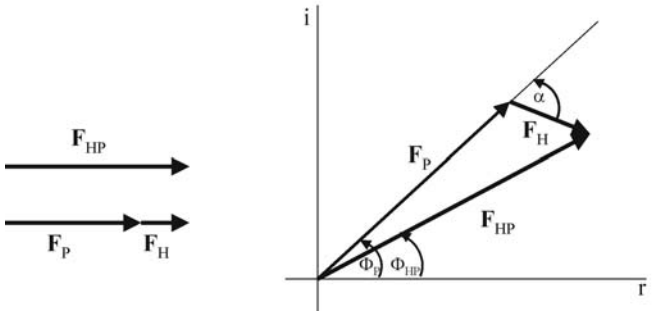


Abb. 1 Graphische Darstellung der Methode des isomorphen Ersatzes für zentrosymmetrische (links) und nicht-zentrosymmetrische (rechts) Strukturfaktoren.

Je stärker die Phasen von nativer und Derivatstruktur voneinander abweichen, desto größer wird $|F_H|$.

Die Gleichung für den isomorphen Ersatz gilt jedoch nur streng, wenn native und Derivatstruktur exakt isomorph sind. In der Praxis können die Zellen der beiden Strukturen voneinander abweichen. Ein Kriterium, das zur Abschätzung der Isomorphie der Datensätze herangezogen werden kann, ist R_{int}

$$R_{\text{int}} = \frac{\sum_N \left| |\mathbf{F_{HP}}| - |\mathbf{F_P}| \right|}{\sum_N |\mathbf{F_P}|} \qquad (3)$$

Für identische Strukturen liegt der Wert für R_{int} unter 5%. Derivate, die für eine Strukturlösung über isomorphen Ersatz geeignet sind, weisen meist einen R_{int} von 10-30% auf. Vergleicht man die Elementarzellen der Strukturen, sollten die Zellkanten um nicht mehr als 1.5% voneinander abweichen, damit die Gleichung für den isomorphen Ersatz ihre Gültigkeit behält.

Mit der Kenntnis der Schweratomsubstruktur ergeben sich zwei Möglichkeiten für die Proteinphasen (siehe Abb. 3).

3.1.1.2 Anomale Streuung

Die elastische Streuung f_o von Röntgenstrahlen an der Elektronenhülle eines Atoms liefert den größten Beitrag zum Gesamtstreufaktor f. Dabei ändert die reflektierte Welle ihre Frequenz verglichen mit der einfallenden Welle nicht und der Phasenwinkel zwischen beiden Wellen beträgt π. Je näher die Energie der einfallenden Röntgenstrahlung der Energie an einer Absorptionskante kommt, desto größer wird der Anteil der inelastischen Streuung. Diese sogenannte anomale Streuung tritt auf, wenn das Röntgenquant vom Atom zunächst absorbiert wird. Erfolgt die Emission ohne Zeitverzögerung, ist die emittierte Welle mit der Welle der

elastischen Streuung in Phase, der resultierende Streufaktor f' entspricht dem Realteil der anomalen Streuung. Bei einer Emission mit Zeitverzögerung ist die ausfallende Welle relativ zu f_o phasenverschoben, man spricht vom Imaginärteil der anomalen Streuung.
Der atomare Streufaktor berechnet sich dann nach

$$f = f_o + f'(\lambda) + if''(\lambda) \qquad (4)$$

Der Realteil der anomalen Streuung kann positiv oder negativ sein, der Imaginärteil ist immer positiv und der Phasenwinkel zwischen ihnen beträgt, wenn im Kristall nicht verschiedene Schweratome nebeneinander enthalten sind, + $\pi/2$.
Die anomale Streuung hat zur Folge, dass die Friedelgegenteile F^+ und F^- azentrischer Reflexe nicht mehr identisch sind.

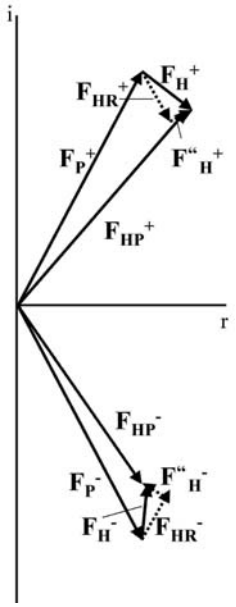


Abb. 2 Argand-Diagramm zur Darstellung der Proteinstrukturfaktoren in Abwesenheit (F_P^+ und F_P^-) und Anwesenheit (F_{HP}^+ und F_{HP}^-) eines anomal streuenden Atoms. F_{HR} bezeichnet den Realteil, F''_H den dazu um $\pi/2$ phasenverschobenen Imaginärteil der Streuung am Schweratom. F_{HR} und F''_H addieren sich zum Gesamtstreufaktor F_H des Schweratoms.

Allerdings ist die Differenz zwischen ihnen in Abhängigkeit von der Art des Schweratoms und der Wellenlänge meist kaum stärker als das Hintergrundrauschen der Messung, so dass eine hohe Redundanz der Daten erforderlich ist, um die anomalen (Bijvoet-) Differenzen exakt zu bestimmen. Da man zwar $2F_H''^+$ berechnen kann, aber statt der Strukturfaktoren $\mathbf{F}_{HP}^+$ und $\mathbf{F}_{HP}^-$ nur deren Beträge aus der Messung erhält, ergeben sich auch hier zwei Möglichkeiten für die Phasenwinkel von $\mathbf{F}_{HP}^+$ und $\mathbf{F}_{HP}^-$ (siehe Abb. 3).

3.1.1.3 SIRAS - Kombination von isomorphem Ersatz und anomaler Streuung

Sowohl bei der Strukturlösung durch isomorphen Ersatz als auch durch anomale Streuung erhält man zwei mögliche Sätze von Phasenwinkeln für die Struktur. Die Informationen zu den Phasenwinkeln aus beiden Methoden sind komplementär und erlauben die eindeutige Bestimmung der Phasenwinkel.

Aus gemessenen Intensitäten für den nativen und den Derivatdatensatz und den tabellierten Werten von f' und f'' für das anwesende Schweratom bei der verwendeten Wellenlänge können mit Hilfe einer Harker-Konstruktion die Amplitude von F_{HN} (Strukturfaktor des Schweratoms ohne anomalen Streubeitrag) sowie die Differenz α der Phasen von F_{HN} und F_{HP} berechnet werden.

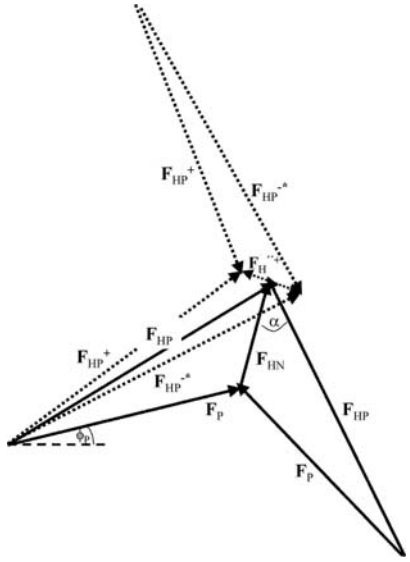


Abb. 3 Die Zweideutigkeit der Phasen, die sowohl im Fall der Phasenbestimmung durch SIR (durchgezogene Linien) als auch im Falle von SAS (gestrichelte Linien) besteht, wird durch die Kombination der beiden Methoden aufgehoben.

Um den Phasenwinkel ϕ_{HN} und damit auch die Phasen der Derivat- bzw. nativen Struktur zu erhalten, muss zunächst die Schweratomsubstruktur bestimmt werden.

$$\alpha = \phi_{HN} - \phi_{HP} \qquad (5)$$

Das Programm SHELXD (USÓN UND SHELDRICK, 1999) verwendet dazu die Methode des *dual space recycling*. Dabei wird auf der Ebene der normalisierten Strukturfaktoren gearbeitet. Zunächst wird entsprechend der Anzahl vermuteter Schweratome ein Satz von N Schweratomen generiert (willkürlich in der Zelle verteilt oder in Übereinstimmung mit der Pattersonfunktion) und im reziproken Raum die Phasen berechnet und verfeinert. Nachdem die schlechtesten 60%

der Phasen verworfen wurden, werden die verbliebenen Phasen mit Hilfe der Tangensformel erweitert. Aus diesen Phasen und den Schweratomstrukturfaktoramplituden $|F_{HN}|$ wird eine Elektronendichtekarte berechnet. Den stärksten Maxima der Elektronendichte werden Atompositionen zugewiesen, davon willkürlich 30% gelöscht und die restlichen Atome als Startsatz für den nächsten Zyklus eingesetzt. Es werden bei jedem Strukturlösungsversuch 2N Zyklen durchlaufen. Die Güte der gefundenen Struktur wird über einen Korrelationskoeffizienten CC zwischen E_o und E_c bewertet (FUJINAGA UND READ, 1987), der für eine eindeutig gelöste Struktur bei über 35% liegt.

$$CC = 100 \frac{\left(\Sigma wE_o E_c \Sigma w - \Sigma wE_o \Sigma wE_c\right)}{\left\{\left[\Sigma wE_o^2 \Sigma w - \left(\Sigma wE_o^2\right)\right]\left[\Sigma wE_c^2 \Sigma w - \left(\Sigma wE_c^2\right)\right]\right\}^{1/2}} \quad (6)$$

Für jedes Atompaar wird aus den Kreuzvektoren die *Patterson minimum function* PMF berechnet. Der Mittelwert von PMF liefert als PATFOM (Patterson *figure-of-merit*) ein weiteres Gütekriterium, nach dem korrekte Lösungen erkannt werden können. Anders als der Korrelationskoeffizient CC liefert der PATFOM nur relative Werte; für die besten Lösungen sind aber auch CC und PATFOM fast immer die höchsten eines Satzes von möglichen Lösungen.

Wurden die richtigen Schweratompositionen gefunden, können daraus die Strukturfaktoren $\mathbf{F}_{HN}$ und die Phasen berechnet werden und mit Hilfe einer Harkerkonstruktion die Phasen für die Proteinstruktur bestimmt werden.

3.1.2 Dichtemodifikation

Die nach der Strukturlösung vorliegende Elektronendichtekarte ist häufig von schlechter Qualität, was eine eindeutige Modellierung der Polypeptidkette erschwert oder verhindert. Zudem sind die Phasen oft nur für einen begrenzten Auflösungsbereich bekannt. Um die Qualität der Phasen zu verbessern und den Auflösungsbereich zu erweitern, kann man sich allgemein der für die Elektronendichte von Makromolekülkristallen geltenden Eigenschaften bedienen. Diese Eigenschaften resultieren zum einen aus der unterschiedlichen Verteilung und Höhe der Elektronendichte in Protein- bzw. Lösemittelbereichen. Zum anderen sind sie Folge von nicht-kristallographischer Symmetrie, welche die Abhängigkeit der Elektronendichten unterschiedlicher Bereiche der asymmetrischen Einheit voneinander bedingt. Diese allgemeinen Eigenschaften sind unabhängig von der genauen Anordnung der Atome im Kristall. Sie werden zur sogenannten Dichtemodifikation im Rahmen von *solvent flattening*, *histogram matching* und *ncs-averaging* berücksichtigt und führen zur Restriktion der Phasenwinkel auf bestimmte

Werte. Bei der Dichtemodifikation wird für einen kleinen Auflösungsbereich aus den Startphasen eine Elektronendichtekarte berechnet und entsprechend dieser *constraints* verändert. Aus der modifizierten Elektronendichte werden die resultierenden Phasen und Amplituden berechnet, letztere mit den gemessenen Amplituden verglichen, die Übereinstimmung als Kriterium zur Gewichtung der Phasen verwendet und die verbesserten Phasen zur Berechnung einer neuen Elektronendichtekarte verwendet. Die Dichtemodifikation wird so lange wiederholt, bis keine weitere Verbessung der Elektronendichtekarte mehr erreicht wird. In den weiteren Schritten kann die Auflösung stufenweise ausgedehnt werden. Außerdem ist es möglich, im Laufe des Modellaufbaus eine Dichtemodifikation durchzuführen. Mit der Kenntnis eines Teils des Modells kann man den schon bekannten Phasen die sich aus dem Modell berechnenden hinzufügen und dadurch den Startsatz von Phasen für die Dichtemodifikation erhöhen.

3.1.2.1 Solvent Flattening

Ein Proteinkristall besteht zu 30-70% aus Wasser. Neben geordneten Wassermolekülen, die an das Protein koordinieren, liegt der größte Teil dieses Wassers ungeordnet in Lösemittelkanälen zwischen den Proteinmolekülen vor. Damit unterscheidet sich die Elektronendichteverteilung der Lösemittelregion grundsätzlich von der der Proteinregion. Die Unordnung der Wassermoleküle resultiert in einer niedrigen und gleichmäßigen Elektronendichte. Im Proteinbereich treten hingegen diskrete Maxima auf und die mittlere Elektronendichte ist hier höher als die im Lösemittelbereich. Legt man ein dreidimensionales Gitter über die Elektronendichtekarte und bestimmt die Höhe der Elektronendichte an den Gitterpunkten, so ist die Variation zwischen zwei Punkten im Proteinbereich hoch, im Bereich der ungeordneten Wassermoleküle niedrig (WANG, 1985). Auf diese Weise kann man die Elementarzelle in Protein- und Lösemittelbereich aufteilen und die Höhe der Elektronendichte im Lösemittelbereich auf ein konstant niedriges Niveau bringen.

Solvent flattening trägt vor allem zur Verbesserung der Phasen bei niedriger Auslösung und beim Vorliegen eines hohem Lösemittelanteils bei.

3.1.2.2 *Histogram Matching*

Da sich die Konnektivität der Atome von Protein zu Protein nicht unterscheidet, treten unabhängig von der Konformation und der genauen Sequenz eines Proteins Gemeinsamkeiten zwischen seiner und der Elektronendichteverteilung anderer Proteine auf. Die Häufigkeitsverteilung von Elektronendichtemaxima (Dichtehistogramm) ist unabhängig von der genauen räumlichen Struktur und, wie systematische Untersuchungen gezeigt haben, nur durch die Auflösung, den Gesamttemperaturfaktor $B_{overall}$ und den Phasenfehler bestimmt. Setzt man

daher $B_{overall}$ auf einen bestimmten Wert und vergleicht die Histogramme von Strukturen gleicher Auflösung, kann man daraus den Phasenfehler abschätzen und damit die Elektronendichtekarte verbessern (LUNIN, 1988). *Histogram matching* kann, einbezogen in einen iterativen Prozess, bei der Erweiterung von Phasen von niedriger zu hoher Auflösung angewandt werden, da es vor allem im Bereich hoher Auflösung zur Verbesserung der Phasen beiträgt (ZHANG, 1997), aber auch bei einer Dichtemodifikation ohne Phasenerweiterung trägt *histogram matching* zur Verbesserung der Elektronendichtekarte bei (Cowtan, 1994).

3.1.2.3 *ncs Averaging*

Man spricht von nicht-kristallographischer Symmetrie (ncs), wenn in der asymmetrischen Einheit mehrere Kopien eines Moleküls vorliegen. Sie wird als *proper ncs* bezeichnet, wenn es sich bei den die Kopien ineinander überführenden Symmetrieoperatoren um eine geschlossene Gruppe handelt und diese also einer Punktgruppe angehören. Das ist beispielsweise der Fall, wenn sich zwei Moleküle über eine zweizählige Achse ineinander überführen lassen. Der umgekehrte Fall, dass die Symmetrieoperatoren nicht zu einer Punktgruppe zusammengefasst werden können, wird *improper ncs* genannt. Sind die Moleküle beispielsweise in einer Helix angeordnet, werden die Moleküle durch eine Schraubenachse ineinander überführt, die keine Punktgruppe bildet. Ob nicht-kristallographische Symmetrie im Kristall auftritt, kann aus der *self rotation function* abgeleitet werden. Die Pattersonfunktionen der unterschiedlichen Kopien unterscheiden sich nicht in der Vektorverteilung sondern nur in der Orientierung. Daher wird die Pattersonfunktion berechnet und mit einer zweiten, rotierten Pattersonfunktion in Deckung gebracht. Entspricht beim Vorliegen von zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit der Drehwinkel zwischen den beiden Pattersonfunktionen dem, der die über die *ncs* verwandten Moleküle ineinander überführt, kommt es zur maximalen Überlagerung der Vektoren.

Kennt man die Symmetrieoperation zwischen den N Kopien eines Moleküls in der asymmetrischen Einheit, erhält man redundante Information, die systematische Fehler korrigiert und das Signal/Rauschen-Verhältnis um $N^{1/2}$ verbessert. Das *ncs-averaging* wird im realen Raum durchgeführt. Es dürfen nur die Bereiche der Elektronendichtekarte, die von den einzelnen Molekülen eingenommen werden und auf die sich sie nicht-kristallographische Symmetrie anwenden lässt, gemittelt werden (VELLIEUX UND READ, 1997; ZHANG, 2001). Man grenzt diese Bereiche mit Hilfe einer Maske ein. Die Maske kann nach der Strukturlösung mittels molekularem Ersatz schon bekannt sein oder aus den Lagen der Schweratompositionen oder einer ersten Elektronendichte bestimmt werden. Die Mittelung über nicht-kristallographische Symmetrie trägt um so stärker zur Verbesserung der Phasen vor allem in niedrigen Auflösungsbereich bei, je größer die Zahl der miteinander verwandten Moleküle ist.

3.1.3 Strukturverfeinerung

Unabhängig von der verwendeten Methode liegt nach der Strukturlösung meist ein unvollständiges und fehlerhaftes Modell der Struktur vor. Ziel einer Strukturverfeinerung ist es, das Atommodell bestmöglich mit den Messdaten in Einklang zu bringen. Im reziproken Raum kann dies auf der Ebene der Strukturfaktoren $\mathbf{F}_{hkl}$ oder der Strukturfaktorquadrate $\mathbf{F}_{hkl}^2$ geschehen. Letzteres bietet den Vorteil, dass $\mathbf{F}_{hkl}^2$ den gemessenen Intensitäten entsprechen und dass alle Daten, inklusive denen mit negativen Werten, verwendet werden können. Die Gewichtung von $\mathbf{F}_{hkl}^2$ und die Standardabweichungen der Verfeinerungsparameter entsprechen eher den Ungenauigkeiten der experimentellen Daten als die entsprechenden Werte bei der Verwendung der Strukturfaktoren $\mathbf{F}_{hkl}$. So können die Standardabweichungen $\sigma(\mathbf{F}_{hkl})$ schlecht oder gar nicht aus $\sigma(\mathbf{F}_{hkl}^2)$ abgeleitet werden, wenn $\mathbf{F}_{hkl}^2$ sehr klein oder negativ ist.

Bei der Verfeinerung im reziproken Raum werden die Amplituden und Phasen des Modells berechnet und so variiert, dass die aus dem Modell berechneten Strukturfaktorquadrate $\mathbf{F}_{calc}^2$ bestmöglich mit den über die gemessenen Intensitäten gegebenen Strukturfaktorquadraten $\mathbf{F}_{obs}^2$ übereinstimmen. Im realen Raum wird das Modell (manuell) der Elektronendichteverteilung angepasst. Als Parameter gehen in die Verfeinerung die Atompositionen und die Temperaturfaktoren ein. Es ist darauf zu achten, dass die Zahl der Parameter die Zahl der Daten nicht übersteigt, da das System sonst unterbestimmt ist. Daher können neben den gemessenen Intensitäten bzw. den daraus abgeleiteten Strukturfaktorquadraten $\mathbf{F}_{obs}^2$ zusätzliche Informationen in die Verfeinerung einbezogen werden, die als Bedingungen entweder innerhalb einer bestimmten (geschätzten) Standardabweichung (*restraints*) oder exakt (*constraints*) für das Modell gelten sollen. Durch Verwendung von *restraints* kann beispielsweise chemisches Wissen über die Molekülgeometrie eingesetzt werden, wodurch die effektive Zahl der Daten steigt. Diesen *restraints* liegen als Richtwerte Bindungslängen und -winkel zugrunde, die bei der Röntgenstrukturanalyse an Kleinmolekülen gefunden wurden (ENGH UND HUBER, 1991). Die Zahl der Parameter kann durch den Einsatz von *constraints* erniedrigt werden. In beiden Fällen erhöht sich das Daten/Parameter-Verhältnis. Das Einbeziehen zusätzlicher Informationen und das Einschränken der Zahl der Parameter wird um so wichtiger, je größer die Struktur und je niedriger die Auflösung der Daten ist.

Durch die Verfeinerung nur eines statt der sechs anisotropen Auslenkungsparameter kann die Zahl der zu verfeinernden Parameter erniedrigt werden. Um trotzdem Librations- und Translationseffekte zu berücksichtigen, können im Rahmen einer sogenannten TLS-Verfeinerung der Auslenkungsparameter von mehreren zu einer starren Gruppe zusammengefassten Atomen verfeinert werden (WINN, 2001). Pro starrer Gruppe werden 20 Parameter verfeinert. Diese Gruppen können sich auf kleine Bausteine wie einzelne

Aminosäuren oder Aminosäureseitenketten beziehen oder mit sinkender Auflösung auf eine größere Gruppen wie Helices oder ganze Proteindomänen.

Die Zahl der Parameter kann weiterhin verringert werden, wenn man die Atompositionen nicht mehr einzeln sondern in Gruppen zusammengefasst verfeinert (*rigid body refinement*). Dieses Verfahren wendet man nicht nur bei sehr geringer Auflösung an, wenn zur Verfeinerung der einzelnen Atompositionen nicht genügend Daten zur Verfügung stehen, sondern auch zu Beginn einer Strukturverfeinerung, wenn die genaue Orientierung des Modells nach der Strukturlösung über den molekularen Ersatz gefunden werden soll.

Weiterhin kann das Vorliegen mehrerer Kopien eines Moleküls in der asymmetrischen Einheit in Form von ncs-*restraints* zur Verbesserung des Daten/Parameterverhältnisses ausgenutzt werden.

Im Modell der Proteinstruktur sind die Wassermoleküle enthalten, die in geordneter Weise an das Protein koordinieren. Die Wassermoleküle, die ungeordnet in den Wasserkanälen des Kristalls vorliegen, werden darin nicht berücksichtigt. Da sie aber vor allem im Bereich niedriger Auflösung zu den Strukturfaktoren beitragen, werden ihre Strukturfaktoren nach dem Babinet'schen Prinzip berechnet und in $\mathbf{F}_{calc}$ einbezogen. Nach diesem Prinzip haben die Strukturfaktoren eines bestimmten Bereiches der Elementarzelle die gleichen Amplituden wie die der restlichen Zelle, die Phasen der Strukturfaktoren für die beiden Regionen sind einander aber entgegengesetzt.

Zur mathematischen Durchführung der Strukturverfeinerung werden der *maximum likelihood*-Ansatz oder die *least squares*-Methode eingesetzt. Bei der *least squares*-Methode werden die Parameter des Modells so variiert, dass die berechneten Strukturfaktoren bzw. Strukturfaktorquadrate bestmöglich mit den Messdaten übereinstimmen und damit auf der Basis von $\mathbf{F}^2$

$$Q=\Sigma_{hkl} w_2(\mathbf{F}_{obs}^2 - \mathbf{F}_{calc}^2)^2 \qquad (7)$$

minimal wird. Dies ist gegeben, wenn $\partial Q/\partial u_j = 0$, wobei u_j die Atomparameter repräsentiert. Die Lösung des Gleichungssystems über eine Taylorreihe kann man in der Matrizennotation angeben.

$$[\mathbf{A}]\times[\boldsymbol{\varepsilon}]=[\mathbf{b}] \qquad (8)$$

Die Elemente $\boldsymbol{\varepsilon}_i$ des Vektors [$\boldsymbol{\varepsilon}$] entsprechen den Werten, um die die Startwerte u_s geändert werden müssen, um Q zu minimieren. Der Vektor [**b**] enthält die Werte von $\partial Q/\partial u_j$ als Elemente. Die Zahl der Reihen bzw. Spalten der Normalmatrix [**A**] entspricht der Zahl der zu verfeinernden Parameter. Damit ist die Berechnung der zur Minimierung von Q

durchzuführenden Parameterveränderungen bei großen Strukturen sehr rechenintensiv. Bei einer Verfeinerung nach der *conjugate gradient*-Methode wird die Zahl der Matrixelemente erniedrigt und die Rechenzeit dadurch verringert, dass nur die Diagonalelemente und die Elemente, die *restraints* beinhalten, bei der Lösung der Normalgleichungen berücksichtigt werden. Voraussetzungen für die Anwendung des *least squares*-Ansatzes sind, dass systematische Fehler für $\mathbf{F}_{obs}$ ausgeschlossen werden können und von einer Gauss'schen Verteilung von $|\mathbf{F}_{obs}|$ um den tatsächlichen Strukturfaktor ausgegangen werden kann. Aus statistischen Gründen muss weiterhin die Zahl der Daten sehr viel größer als die der Parameter sein. Das Einbeziehen von *restraints* und *constraints* zur Verbesserung des Daten/Parameter-Verhältnisses ist bei Proteinstrukturen mittlerer Auflösung (minimal benötigte Auflösung: 2.5 Å) unerlässlich. Problematisch kann diese Methode beim Vorliegen eines in größeren Teilen unkompletten Modells werden, da neu eingefügte Teile im Modell stark von den schon vorhandenen abhängen (*model bias*). Ein Vorteil der *least squares*-Methode ist, dass aus den Elementen der inversen Matrix $[\mathbf{A}^{-1}]$ die Standardabweichungen der Parameter u_j berechnet werden können.

Beim Ansatz des *maximum likelihood* wird die Wahrscheinlichkeit, mit dem vorhandenen Modell tatsächlich die beobachten Daten zu finden, maximiert. Diese Methode ist nicht auf das Vorliegen einer Gauss'schen Fehlerverteilung der experimentellen Strukturfaktoramplituden $|F_{obs}|$ angewiesen und lässt sich auch bei Strukturen von niedriger Auflösung einsetzen.

Die Wahrscheinlichkeit $p(x;|F_{obs}|)$, mit der bei den vorliegenden Daten $|F_{obs}|$ die Parameter x das Modell beschreiben, lässt sich unter Verwendung des Bayes Theorem schreiben als

$$p(x;|F_{obs}|) = p(x)L(x;|F_{obs}|) \quad (9)$$

wobei *p(x)* die Wahrscheinlichkeitsverteilung der schon vor dem Experiment bekannten Parameter ist, wozu beispielsweise strukturelle *restraints* gehören. x kann durch $\mathbf{F}_{calc}$ ersetzt werden, da der Strukturfaktor $\mathbf{F}_{calc}$ direkt aus den Parametern berechnet werden kann.

Geht man davon aus, dass die Fehler der einzelnen Reflexe unabhängig voneinander sind, kann man die Wahrscheinlichkeit für alle Reflexe **L** aus dem Produkt der Einzelwahrscheinlichkeiten berechnen

$$\mathbf{L} = \Pi_{\mathbf{h}}\, p(\mathbf{F}_{\mathbf{h}}(calc);\, |F_{\mathbf{h}}(obs)|) \qquad (10)$$

Ein Vorteil der Methode gegenüber dem *least squares refinement* besteht darin dass experimentelle Phaseninformationen in die Verfeinerung einfließen können, was die Zahl der Observablen erhöht. Außerdem ist die Methode beim Vorliegen eines unvollständigen Modells

robuster gegenüber *model bias*. Anders als die *least squares*-Methode erlaubt dieses Verfahren die Berechnung von Standardabweichungen für die einzelnen Parameter nicht.

Bei der Verfeinerung nähert man sich der Zielfunktion der Verfeinerung, d.h. den Parametern des Modells, die am besten mit den Messdaten übereinstimmen, schrittweise an. Dazu können verschiedene numerische Methoden gewählt werden, zu denen *conjugate-gradient minimization* und *simulated-annealing* gehören. Die *conjugate gradient* Methode ist ein iterativer Prozess, der einen großen Konvergenzradius besitzt und bei dem die Zahl der benötigten Zyklen bis zur Konvergenz maximal der Zahl der Parameter entspricht. *Simulated annealing* bezeichnet die Simulation eines Ensembles von Strukturen, die unter den definierten Bedingungen (Temperatur und Druck) energetisch erlaubt sind. Um das Ensemble zu generieren, lässt man für kurze Zeit die Kraft, die auf elektrostatischer Wechselwirkung mit den Atomen in der Umgebung zurückzuführen ist, auf ein Atom wirken. Je höher die Temperatur des Systems ist, desto höher ist die kinetische Energie der Atome und um so höhere energetische Barrieren zwischen möglichen Konformationen können überwunden werden. Damit besitzt diese Methode einen noch größeren Konvergenzradius. Nach dem Erhöhen der Temperatur zur Überwindung von Barrieren wird sie stufenweise erniedrigt, um ein neues Minimum zu erreichen, das im Idealfall dem globalen Minimum entspricht. Grobe Fehler, die beispielweise nach der Strukturlösung durch molekularen Ersatz im Startmodell vorhanden sind, können so behoben werden, da lokale Minima leichter verlassen werden können. *Simulated annealing* wird daher oft zu Beginn einer Strukturverfeinerung eingesetzt.

Um die Qualität des Modells abschätzen zu können, wird die Übereinstimmung von gemessenen und berechneten Strukturfaktoramplituden als R-Wert angegeben:

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left\| F_o \right| - k \left| F_c \right\|}{\sum_{hkl} \left| F_o \right|} \qquad (11)$$

Eine Überinterpretation der Daten bei geringem Daten/Parameter-Verhältnis führt zu einer Erniedrigung des R-Wert, weshalb er als kein von der Verfeinerung unabhängiges Gütekriterium darstellt. Daher wurde zusätzlich der R_{free}-Wert zur Kreuzvalidierung eingeführt. Er berechnet sich aus etwa 5% der Daten (Testsatz), die nicht zur Strukturverfeinerung verwendet wurden (BRÜNGER, 1992). Der R_{free} ist dadurch unabhängig von der Verfeinerung. Dieser Testsatz umfasst zufällig über den ganzen Auflösungsbereich gesammelte Reflexe. Beim Vorliegen von nicht-kristallographischer Symmetrie müssen die Reflexe für den Testdatensatz in dünnen Auflösungsschalen ausgewählt werden, damit beide Datensätze unabhängig

voneinander sind. Wird das Modell verändert, sollten sowohl R_{work} als auch R_{free} sinken. Der R_{free}-Wert beträgt etwa das 1.2-fache des R_{work}; ist die Differenz größer oder sinkt bei der Verfeinerung nur der R_{work}, ist von einer Überinterpretation der Daten auszugehen und das Modell erneut zu prüfen.

3.2 Röntgenabsorptionsspektroskopie

Trifft Röntgenstrahlung auf Materie, so wird sie wie jede andere elektromagnetische Strahlung absorbiert und gestreut. Die Röntgenabsorptionsspektroskopie (*X-ray absorption spectroscopy*, XAS) beschäftigt sich nur mit dem Absorptionsprozess. Dabei wird die Energie eines auf ein Atom treffenden Röntgenquants auf ein Elektron einer inneren Schale übertragen. Dieses wechselt in der Folge in einen energetisch höherliegenden und damit weniger stark gebundenen Zustand. Liegt der neue Zustand unterhalb der Seriengrenze, führt der gemäß den Auswahlregeln erfolgende Übergang des angeregten Elektrons in eine andere Schale zu einer charakteristischen Struktur des Absorptionsspektrums im Energiebereich kurz vor der Absorptionskante. Die Absorptionskante wird erreicht, wenn das Röntgenquant die minimale Energie, die zum Übergang in das Kontinuum jenseits der Seriengrenze nötig ist, auf das Elektron überträgt. Dabei wird das Atom ionisiert. Wird mehr Energie, als zur Ionisierung nötig ist, übertragen, kommt es zur Emission eines Photoelektrons, dessen kinetische Energie dem Differenzbetrag zwischen der übertragenen und der Ionisierungsenergie ist. Die Wellenlänge dieser sogenannten DeBroglie-Welle ist damit umgekehrt proportional zur Energie der auftreffenden Röntgenstrahlung. Liegt das absorbierende Atom (Absorber) nicht isoliert sondern von anderen Atomen (Streuer) umgeben vor, kann das Photoelektron an diesen gestreut werden. Interferenz zwischen dieser gestreuten mit der vom Absorber ausgehenden Welle führen zu einer Veränderung des Absorptionskoeffizienten verglichen mit dem des isolierten Absorbers (siehe Abb. 4).

Der Teil des Röntgenabsorptionsspektrums vor der Absorptionskante beinhaltet Informationen über die elektronische Struktur des Atoms, die wiederum von seiner chemischen und geometrischen Umgebung abhängt. Man bezeichnet diesen Bereich des Spektrums als XANES-Region (XANES = *X-ray absorption-near edge structure*).

Aus der energetischen Lage der Absorptionskante kann die Oxidationsstufe des Absorbers abgeleitet werden, da die Ionisierungenergie eines Atoms mit steigender Oxidationsstufe zunimmt.

Die quasiperiodischen Modulationen des Spektrums oberhalb der Absorptionskante, die bei isolierten Atomen nicht auftreten, liefern radiale strukturelle Informationen über die Zahl, die Art und den Abstand der dem Absorber benachbarten Atome. Man spricht von der EXAFS-

Region des Spektrums (EXAFS = *extended X-ray absorption fine structure*).

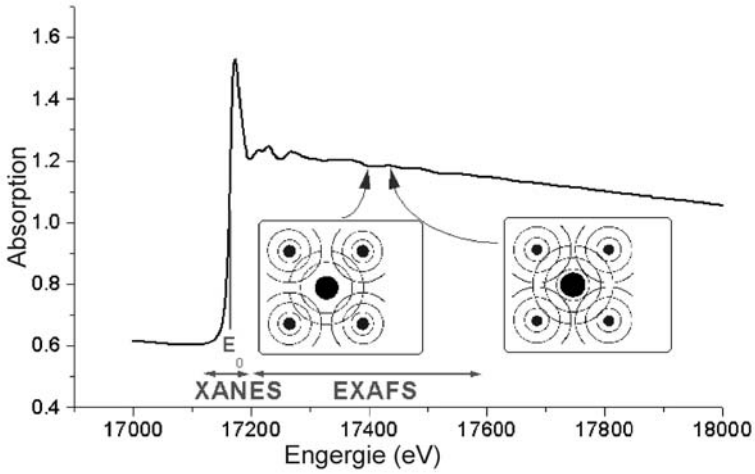


Abb. 4 Darstellung eines XAS. Der Bereich in der Nähe der Absorptionskante ($E \approx E_0$) wird als XANES-Region, der hinter der Absorptionskante als EXAFS-Region bezeichnet. Das Zustandekommen der EXAFS-Modulationen ist für den Fall von destruktiver (links) und konstruktiver (rechts) Interferenz zwischen der vom Absorber ausgehenden und den von den Streuern zurückkommenden DeBroglie-Wellen gezeigt.

Bei der Interpretation der XAS-Daten werden nur die durch die Gegenwart von Nachbaratomen hervorgerufenen Veränderungen in der Absorption untersucht. Die auch bei dem isoliert vorliegenden Absorber auftretende Absorption muss zuvor vom gemessenen Spektrum subtrahiert werden. Die Subtraktion des atomaren Hintergrunds wird in der EXAFS-Region und dem Bereich vor der Absorptionskante durch Anpassen einer Polynomfunktion über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt. Der Hintergrund vor der Absorptionskante wird auf den gesamten Spektrenbereich extrapoliert. Im XANES-Bereich gelten die zur Berechnung des atomaren Absorptionsspektrums gemachten Näherungen nicht mehr und weiterhin können Relaxations- und Anregungsprozesse nicht quantitativ erfasst und beschrieben werden, weshalb die Berechnung des atomaren Hintergrunds im XANES-Bereich weniger präzise als im EXAFS-Bereich ist. Aus diesem Sachverhalt resultiert die empirische Trennung des XAS-Spektrums in XANES- und EXAFS-Region. Die Interpretation des Bereichs vor der Absorptionskante wird in der Regel semi-quantitativ über den Vergleich mit bekannten Spektren durchgeführt. In letzter Zeit wurden jedoch auch Methoden zur quantitativen Auswertung der XANES-Region vor allem von Messungen an sehr verdünnten Lösungen oder Echtzeitexperimenten entwickelt und getestet, die jenseits der Möglichkeiten einer EXAFS-Analyse liegen (BENFATTO, 2003).

Die Auswertung der EXAFS-Region erfolgt quantitativ über den Vergleich mit dem aus einem Modell der Struktur berechneten EXAFS-Spektrum.

3.2.1 EXAFS

Bevor die Analyse der EXAFS-Daten erläutert wird, soll zunächst auf das Zustandekommen der EXAFS-Modulationen im Absorptionsspektrum eingegangen werden.

Den Modulationen des Absorptionskoeffizienten liegt eine Interferenz zwischen der vom Absorber ausgehenden und der von der am Nachbaratom gestreuten DeBroglie-Welle zugrunde. In der Modulation des Absorptionskoeffizienten sollte daher in Abhängigkeit von der Energie Informationen über die Struktur der Elektronendichte der streuenden Atome kodiert sein.

Wird die Energie der Röntgenstrahlung und damit auch die Wellenlänge der DeBroglie-Welle variiert, trägt jedes benachbarte Atom zu einer sinusförmigen Variation des Absorptionskoeffizienten bei, das beobachtete EXAFS-Spektrum ist die Überlagerung der Sinus-Wellen aller streuenden Atome. Eine Sinus-Welle ist charakterisiert durch ihre Frequenz, ihre Amplitude und ihre Phase. In Kenntnis dieser Eigenschaften kann für jeden Streuer die Atomart und der Abstand zum Absorber bestimmt werden und – wenn auch mit geringerer Genauigkeit – die Zahl der benachbarten Atome.

Observable		Information
Frequenz	→	Abstand
Amplitude	→	Koordinationszahl
Phase	→	Atomart

Zunächst soll die Beziehung zwischen Frequenz und Abstand abgeleitet werden. Bei gegebener DeBroglie-Wellenlänge benötigt das Photoelektron für die Strecke zwischen den Atomen um so mehr Perioden, je länger diese Strecke ist. Je größer die Entfernung, desto weniger muss sich die Wellenlänge des Photoelektrons ändern, um einen kompletten Interferenzzyklus zu durchlaufen. Mit größeren Atomabstand ändert sich die Modulation des Absorptionskoeffizienten also öfter, d.h. um so größer wird die Frequenz der die EXAFS-Variation beschreibenden Sinus-Welle.

Die Beziehung zwischen der Amplitude der EXAFS-Sinus-Welle und der Zahl der Atome leitet sich daher ab, dass sich die Wellen zweier identischer Atome, die sich im gleichen Abstand zum Absorber befinden, addieren und die Amplitude verdoppelt wird. Über die Anordnung der Atome zueinander kann allerdings keine Aussage gemacht werden, da das EXAFS-Spektrum nur radiale Information enthält (die Koordinationsgeometrie kann allerdings mit der Analyse der XANES-Region abgeleitet werden).

Der Zusammenhang zwischen Phase und Atomart liegt darin begründet, dass am benachbarten Atom nicht nur elastische sondern auch inelastische Streuung erfolgt. Die inelastische Streuung führt zu einer Phasenverschiebung der gestreuten Welle relativ zum der Welle der elastischen Streuung; Amplitude und Wellenlänge der DeBroglie-Welle bleiben unverändert. Das Ausmaß

der Phasenverschiebung ist bei gegebener Wellenlänge abhängig von der Atomart des Streuers. Die Atomart lässt sich außerdem aus der Amplitude der EXAFS-Welle ableiten, da ein Atom ein um so besserer Streuer ist, je größer die es umgebende streuende Elektronendichte ist.
Bei der EXAFS-Messung werden allerdings nicht die Sinus-Wellen der Modulationen, die aus der Streuung an den benachbarten Atomen resultieren, gemessen, sondern lediglich die Absorption von Röntgenstrahlen durch die Probe. Der Absorptionskoeffizient, der sich aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergibt, enthält neben dem XAS-Koeffizienten für das zu untersuchende Atom einen Hintergrundbeitrag, der aus der Absorption durch andere Atome in der Probe resultiert. Da man den Hintergrundbeitrag nicht messen kann, wird der Messkurve sowohl im Bereich vor der Absorptionskante als auch im Bereich hoher Energie eine Funktion angepasst, welche die Hintergrundabsorption bestmöglich nachahmen soll. Die Daten werden weiterhin um die berechneten Absorptionskoeffizienten des freien Atoms reduziert und so normalisiert, dass die EXAFS-Modulation unabhängig von der Dicke der Probe und Inhomogenitäten der Lösung auf einer "pro absorbierendes Atom"-Basis vorliegt. Üblicherweise wird die EXAFS-Modulation nicht als Funktion der Energie sondern des Wellenvektors des Photoelektrons $k=2\pi/\lambda_e$ angegeben und weiterhin mit k^3 gewichtet, um die Abschwächung bei hoher Energie zu kompensieren. Eine Fouriertransformation dieses Spektrums liefert eine Frequenzanalyse. Über diesen Zusammenhang zwischen Frequenz und Abstand erfolgt eine Aufspaltung der Koordinationssphäre des Absorbers in Gruppen von Nachbaratomen mit gleichem Abstand zum Absorber. Eine Zerlegung der frequenzabhängigen Spektren in die einzelnen Koordinationsschalen und anschließende Rücktransformation liefert die EXAFS-Modulation für jede einzelne Koordinationssphäre. Die Auswertung dieser Einzelfunktionen ist nicht direkt, sondern nur im Vergleich mit den für ein hypothetisches Modell berechneten EXAFS-Daten möglich. Problematisch hierbei ist, dass sich die theoretischen Daten dem Modell um so besser anpassen, je mehr Schalen von koordinierenden Atomen in das hypothetische Modell eingefügt werden. Allerdings bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass das Modell der echten Struktur näher kommt. Die Untersuchung einer unbekannten chemischen Verbindung hängt daher sowohl von der statistischen Analyse der Daten als auch der strengen Berücksichtigung einer sinnvollen Geometrie für das Modell ab.

3.2.2 Möglichkeiten von XAS

Die XAS-Analyse ist in der Lage, die Umgebung von Atomen in einem Radius von bis zu 5 Å zu untersuchen. Da sich die XAS-Spektren aller Atome einer Atomsorte überlagern, sollte das zu untersuchende Element nur mit einer einzigen definierten Umgebung in der Probe vorliegen.

Der Energiebereich der Röntgenstrahlung, der von den erhältlichen Monochromatoren abhängt, erlaubt die Untersuchung der K-Kanten von Phosphor bis Zinn und die der L-Kanten der schwereren Elemente.

Die eingesetzte Probe kann sowohl fest als auch flüssig sein. Messungen unter Verwendung von Röntgenquellen an Synchrotronanlagen der dritten Generation erlauben Konzentrationen des zu untersuchenden Elementes im 10^2 μM-Bereich. Dies macht beispielsweise die Untersuchung von Metalloproteinen in der Zelle möglich.

Bei der Bestimmung der chemischen Umgebung des absorbierenden Atoms erreicht die Abstandsanalyse eine Genauigkeit vergleichbar mit der bei der hochaufgelösten Röntgenstrukturanalyse (± 0.02 Å). Die Zuordnung der Atomtypen erlaubt für leichte Elemente keine Unterscheidung benachbarter Elemente des Periodensystems, bei schwereren Elementen (ab Calcium) liegt die Ungenauigkeit sogar bei Z=±3. Eine noch größere Ungenauigkeit tritt bei der Bestimmung der Koordinationszahl auf, wobei Abweichungen im Bereich von ± 25% auftreten können (NATOLI, 2003; GEORGE, 1998).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Vergleich von XAS-Spektren ähnlicher Strukturen sicher die eindeutige Bestimmung der Oxidationszahl des Elementes erlaubt. Die weitere Analyse hängt stark von der Qualität der Daten sowie der Anzahl von Daten vergleichbarer Verbindungen oder den Informationen aus ergänzenden Untersuchungen wie der Röntgenstrukturanalyse ab.

4 Experimentelles

4.1 Kristallisation

Die zur Kristallisation verwendete Proteinlösung enthielt das Protein in eisenfreier Form (*apo*-AtsK) und wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Kertesz, *University of Manchester*, in zwei Chargen zur Verfügung gestellt. Die Proben enthielten neben dem Protein 20 mM Tris/HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7.5 und Spuren von Na_2SO_4. Die Proteinkonzentration der ersten Probe lag bei 1.5 mg/ml und wurde zur Kristallisation auf 16-18 mg/ml erhöht (MÜLLER, 2001). Die zweite Probe wurde in einer Konzentration von 40 mg/ml geliefert und zur Kristallisation mit 20 mM Tris/HCl-Puffer (pH=7.5) auf 20 mg/ml verdünnt. Zur Verifizierung der Reinheit wurde jeweils eine SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Silberfärbung durchgeführt. Die Lösungen konnten bei –84°C mehrere Monate ohne Beeinträchtigung der Kristallisationseigenschaften gelagert werden. Um mehrfaches Auftauen und Einfrieren zu vermeiden, wurden die Proben nach dem Einstellen der optimalen Proteinkonzentration in Portionen zu 50 µl abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so aliquotierten Lösungen konnten direkt zur Kristallisation eingesetzt werden.

Für sämtliche Kristallisationsansätze wurde die *hanging drop*-Methode verwendet. Dazu wurden 2 µl Proteinlösung mit 2 µl Reservoirlösung auf einem siliconisierten Glasplättchen überschichtet und dieses als Abdeckung auf einer mit 0.5 ml Reservoirlösung gefüllten Kammer einer Zellkulturplatte mit hochviskosem Siliconfett als Abdichtungsmasse angebracht.

Aus Vorarbeiten (MÜLLER, 2001) waren die Bedingungen zur Kristallisation der *apo*-AtsK aus der ersten Probe bekannt (siehe Tabelle 1). Zur Kryoprotektion konnten bei der Kristallisation der Lösung 30% (*w/w*) PEG 400 oder 30% (*w/w*) MPD zugesetzt werden, die beste Reproduzierbarkeit und eine ausreichende Kristallqualität wurden mit 30% (*w/w*) Glycerin erzielt. Die Kryoprotektion dient dazu, sekundäre Strahlenschäden auch bei längeren Messzeiten mit hochintensiver Röntgenstrahlung gering zu halten (GARMAN UND SCHNEIDER, 1997).

Citrat kann über seine Carboxylfunktionen mit der α-Ketoglutarsäure (αKG) in der aktiven Tasche der AtsK um die αKG-Bindestelle konkurrieren und andererseits erschwert seine chelatisierende Wirkung das Einführen von Fe(II) an die AtsK durch Tränken (*soaking*). Daher wurde ein kompletter Ersatz von Citrat angestrebt. Kristalle des AtsK-αKG-Komplexes konnten durch das Austauschen des Citratpuffers gegen einen αKG-Puffer erhalten werden. Acetat verfügt ebenfalls über eine Carboxylatgruppe, die es zur Bindung an die αKG-

Koordinationsstelle der AtsK befähigt. Das Acetat wurde darum gegen Natriumsulfat ersetzt.

Tabelle 1 Kristallisationsbedingungen für Probe 1

	Puffer (pH=5.6)	Salz	PEG 4000 % (*w/w*)	weitere Zusätze % (*w/w*)
apo-AtsK	25 mM Na-Citrat	25-75 mM NaOAc	7-8	30% Glycerin
oder	25 mM Na-Citrat	25-50 mM Na_2SO_4	7-8	30% Glycerin
αKG-AtsK	50 mM Na-α-Ketoglutarat	50 mM Na_2SO_4	10	30% Glycerin
Succ-AtsK	25 mM Na-Succinat	50 mM Na_2SO_4	9	30% Glycerin

Analog dazu konnten unter Verwendung eines Succinat-Puffers (pH=5.6) ein AtsK-Succinat-Komplex erhalten werden. Es sei bemerkt, dass die pK_s-Werte von α-Ketoglutarsäure und Bernsteinsäure niedriger sind als der von Zitronensäure, so dass das αKG-System und das Succinat-System bei einem pH-Wert von 5.6 keine Puffer im engeren Sinn sind.
Es wurden weitere für pH 5.6 geeignete Puffer in unterschiedlichen Konzentrationen getestet, unter diesen Bedingungen wurde jedoch kein Kristallwachstum beobachtet.

Tabelle 2 Kristallisationsbedingungen für Probe 2

	Puffer pH=5.6	Salz	PEG 4000 % (*w/w*)	weitere Zusätze
αKG-AtsK	10 mM Na-Ketoglutarat	50 mM Na_2SO_4	18	30% (*w/w*) Glycerin
αKG-AtsK & Na-$C_6H_{13}OSO_3$	25 mM Na-Ketoglutarat	50 mM Na_2SO_4	18	30% (*w/w*) Glycerin 2 mM Hexylsulfat
Succ-AtsK	175 mM Na-Succinat	25 mM Na_2SO_4	15	30% (*w/w*) Glycerin
Succ-AtsK & Na-$C_6H_{13}OSO_3$	175 mM Na-Succinat	25 mM Na_2SO_4	15	30% (*w/w*) Glycerin 2 mM Hexylsulfat

Die αKG-AtsK und Succinat-AtsK-Komplexe konnten unter leicht veränderten Additivkonzentrationen auch mit der zweiten Probe der AtsK erhalten werden (siehe Tabelle 2). Zusätzlich wurden mit dieser Probe Substrat-Kokristallisationen durchgeführt. Dazu wurde den Kristallisationslösungen jeweils 2 mM n-Hexylsulfat zugefügt.

4.2 *Soaking*-Experimente

Soaking bezeichnet das Tränken von Kristallen in Lösungen mit Additiven, die durch Diffusion in den Kristall eindringen. Dabei variieren sowohl die Dauer des Tränkens als auch die Konzentration der in den Kristall einzulagernden Stoffe stark. *Quick-soak*-Experimente werden in der Proteinkristallographie zur Generation von Schweratomderivaten eingesetzt (DAUTER, 2000). Dabei liegen die Schweratomionen, die sowohl kationischer (z.B. Seltenerdmetallionen) als auch anionischer (z.B. Iodid) Natur sein können, in Konzentrationen von 1-2 M vor und die Kristalle werden nur für wenige Sekunden in der Schweratomlösung getränkt. Üblicherweise liegen dann im Kristall 10-30 Schweratome pro Polypeptidkette vor, wodurch der Anteil der anomalen Streuung signifikant wird, auch wenn die Besetzung der Lagen reduziert ist. Nachteil dieser Methode ist es, dass sich die Kristalle durch diese enorme Änderung der Umgebung häufig zersetzen. Eine alternative Vorgehensweise ist das Tränken der Kristalle über einige Stunden bis Tage in einer Lösung, die nur wenige mM des entsprechenden Schweratoms enthält. Da sich die Ionenstärke der Lösung in einem geringeren Ausmass als bei den *quick-soak*-Experimenten ändert, werden die Kristalle weniger stark belastet. Um die Änderung der Umgebungsbedingungen zu verzögern, kann die Schweratomkonzentration auch stufenweise erhöht werden. In diesen Experimenten setzt man meist Metallkationen ein, die eine hohe Affinität zu Schwefel haben (z.B. Quecksilber). Dabei werden in der Regel weniger Schweratome pro Peptidkette eingelagert als bei *quick-soak*-Experimenten mit anionischen Schweratomen, bei denen die Schweratome weniger spezifisch, dafür aber an vielen Stellen binden. Dies kann durch eine höhere Besetzung der Schweratomlagen ausgeglichen werden kann.

Daneben werden *soaking*-Experimente auch zur Darstellung von Proteinkomplexen eingesetzt, wenn beispielsweise die Kristallisation eines Proteins in Gegenwart des einzuführenden Liganden nicht gelingt. Am Beispiel der AtsK kann gezeigt werden, dass sowohl Edukt- als auch Produktkomplexe sowie stabile Katalysezwischenstufen auf diese Weise dargestellt werden können. Setzt die Bindung von Liganden eine Konformationsänderung im Protein voraus, kann der Kristall bei genügend hohem Kristallwasseranteil trotzdem unversehrt bleiben. Die Annahme, dass die Besetzung der Liganden bei *soaking*-Experimenten niedriger als die bei Kokristallisationen ist, wurde im Falle der AtsK nicht bestätigt. *Soaking*-Experimente haben für die Fe(II)-Komplexe der AtsK den Vorteil, dass sie einfacher unter Sauerstoffausschluss durchzuführen sind als anaerobe Kokristallisationen, für die eine spezielle Apparatur erforderlich wäre.

4.2.1 Anaerobes *soaking*

Mit anaerobem *soaking* wird hier das Tränken von Kristallen in einer sauerstofffreien Lösung unter Argonatmosphäre bezeichnet. Das Verfahren wurde angewendet, um bei der Darstellung von Fe-AtsK-Komplexen die Oxidation von in der *soaking*-Lösung enthaltenem Fe(II) durch Luftsauerstoff zu verhindern.

Dazu wurde eine eisenfreie Lösung zunächst unter Vakuum entgast und für 2 min mit Argon gespült. Anschließend wurde Fe(II) in Form von Mohrschem Salz ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) zugesetzt. Diese Lösung wurde in ein mit Argon gespültes Reservoir einer *sitting drop*-Kristallisationsplatte gegeben (siehe Abb. 5). Unter Argonstrom wurde ein geeigneter Kristall in diese Lösung überführt und das Reservoir mit einem Deckgläschen verschlossen, wobei hochviskoses Siliconfett als Abdichtungsmaterial diente.

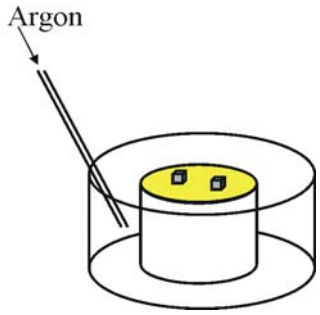


Abb. 5 Anordnung zum anaeroben *soaking*. Die entgaste Lösung wird in das Reservoir der Kristallisationsplatte gegeben. Die Kristalle werden mit Hilfe einer Schleife aus der Mutterlauge in diese Lösung transferiert. Dabei wird die Kammer kontinuierlich mit Argon gespült und anschließend mit einem Deckgläschen und Siliconfett zur Abdichtung luftdicht verschlossen.

4.2.2 Schweratomderivate

Zur Darstellung von Schweratomderivaten wurden die *apo*-AtsK-Kristalle in der Mutterlauge mit einer Lösung überschichtet, die neben den Kristallisationszusätzen in entsprechender Konzentration unterschiedliche Mengen an Schweratomionen enthielt. Die *apo*-AtsK-Kristalle zersetzten sich bei *quick-soak*-Experimenten mit Iodiden (NaI, KI) in Konzentrationen zwischen 0.5 und 2 M sofort. Beim Tränken der Kristalle über wenige Stunden in einer Lösung, in der die Iodidkonzentration bei 50 mM lag, traten keine sichtbaren Veränderungen an den Kristallen auf. Schlechte Reflexprofile als auch mangelnde Auflösung bei Beugungsexperimenten mit diesen Kristallen verhinderten jedoch eine Datensammlung. Weitere *soaking*-Experimente wurde unter Verwendung einer ganzen Reihe verschiedener Salze unterschiedlicher Schwermetallionen durchgeführt. In Gegenwart geringer Mengen von Gd^{3+}, Fe^{2+} und Hg^{2+} blieben die Kristalle in ihrer Morphologie auch über einen längeren Zeitraum (> 24 h) unversehrt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 *Soaking*-Experimente unter Verwendung verschiedener Schwermetallsalze

Metallsalz	Konzentration	*Soak*-Dauer	Bemerkungen
$Gd(NO_3)_3$	1mM	2 Wochen	Gd bindet nicht an das Protein
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	5 mM	40 h	aerobe Bedingungen Fe bindet nicht an das Protein
$HgCl_2$	3 mM	48 h	10 Hg-Lagen pro AtsK-Tetramer

Bei den in einer Fe(II)-Lösung getränkten Kristallen fielen eine braun-gelbe Färbung der Lösung und ein braunes Präzipitat auf, was auf die Bildung von Fe(III) in der Lösung durch Reaktion von Fe(II) mit Luftsauerstoff hindeutet.

4.3 AtsK-Ligand-Komplexe

Neben der *apo*-Form der AtsK sollten auch die Strukturen verschiedener Katalysezwischenstufen kristallographisch bestimmt werden. Kinetische Untersuchungen an einem verwandten Protein (HOLME, 1975) haben gezeigt, dass im ersten Schritt der Katalyse, der Bildung des initialen Substrat-Komplexes, zunächst Fe(II) an das Protein koordiniert. Nach der anschließenden Einlagerung von αKG bindet das Substrat an die aktive Tasche, bevor die Katalysekaskade mit der Koordination von molekularem Sauerstoff startet. Diese Kinetik für die AtsK vorausgesetzt, wurde versucht, einen Fe(II)-AtsK-Komplex herzustellen. Weiterhin sollte neben Eisen zusätzlich αKG eingelagert werden und schließlich sollten auch Fe(II)-αKG-Substrat-Komplexe unter Verwendung einer Reihe aliphatischer Sulfatester hergestellt werden. Und schließlich wurde versucht, einen Fe(II)-αKG-Substrat-NO-Komplex als Analogon zum Sauerstoffkomplex zu erhalten.

Im weiteren Verlauf der Katalyse erfolgt nach der Anlagerung von molekularem Sauerstoff an das Eisen die Decarboxylierung des Kosubstrats, wobei eine kurzlebige Fe(IV)=O-Spezies gebildet wird (PRICE, 2003). Gleichzeitig werden Succinat und Kohlendioxid, welches vermutlich als erster Ligand vom Eisen abdiffundiert (HOLME, 1975; RYLE, 2003b), freigesetzt. Das Substrat bleibt zunächst unverändert. Um diese Zwischenstufe zu charakterieren, wurde ein Fe-Succinat-Substrat-Komplex untersucht. Durch einen Vergleich dieser Struktur mit der Fe(II)-αKG-Substrat-Struktur könnte geklärt werden, ob das gebildete Succinat strukturelle Veränderungen an der aktiven Tasche induziert.

Zwei der Nebenreaktionen der Katalyse durch die Fe(II)-αKG-abhängigen Dioxygenasen wurden eingehend untersucht. Dabei handelt es sich zum einen um die von der Substratbindung abgekoppelte Decarboxylierung der αKG (LIU, 2001; SAARI UND HAUSINGER, 1998) und zum

andern um die Selbsthydroxylierung der Enzyme, welche sich der abgekoppelten Decarboxylierung anschließen kann (RYLE UND HAUSINGER, 2002). Für die AtsK wurde daher versucht, die abgekoppelte Decarboxylierung im Kristall ablaufen zu lassen und das Produkt strukturell zu charakterisieren.

4.3.1 Eisenkomplexe

Die Kokristallisation von Fe(II) in Form von Mohrschem Salz ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) unter aeroben Bedingungen führte unabhängig von der übrigen Zusammensetzung der Mutterlauge innerhalb weniger Stunden zur Ausfällung eines gallertartigen, braunen Niederschlages, bei dem es sich um $Fe_2O_3 \cdot xH_2O$ handelt. Die unter diesen Bedingungen gewachsenen Kristalle enthalten kein Eisen. Daher wurde versucht, den Fe(II)-AtsK-Komplex durch *soaking* unter Sauerstoffausschluss herzustellen.

Dazu wurden Kristalle, die unter Verwendung des Na-Citrat-Puffers gewachsen waren, in eine anaerobe, in ihren Zusätzen der Mutterlauge entsprechenden und zusätzlich 2-5 mM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ enthaltende Lösung gebracht (experimentelle Anordnung wie in Abb. 5 gezeigt). Unter diesen Bedingungen wurden die Kristalle unter Schutzgasatmosphäre für wenige Stunden bis mehrere Tage inkubiert. Wie Messungen an diesen Kristallen zeigten, konnte auch auf diese Weise kein Fe(II)-AtsK-Komplex erhalten werden. Grund dafür könnte die im Vergleich zur Eisenkonzentration mit 25-50 mM hohe Citratkonzentration sein, so dass durch Bildung von Eisencitrat kein freies Fe(II) zur Bindung an das Protein zur Verfügung steht. Ersetzt man bei Kristallisation und *soaking* den Citrat- gegen einen αKG-Puffer, kann ein Fe(II)-αKG-AtsK-Komplex erhalten werden.

Soaking von in einem Succinatpuffer gewachsenen Kristallen in einer Fe(II)-haltigen Lösung war unter den oben beschriebenen anaeroben Bedingungen bedingt möglich. Da an den Kristallen bei der Überführung aus der Mutterlauge in die eisenhaltige Lösung (1-2.5 mM) sofort Risse sichtbar wurden, wurde die Durchführung leicht abgewandelt, indem die Kristalle zunächst in eine anaerobe, eisenfreie Lösung überführt wurden und die Eisenkonzentration unter Schutzgasatmosphäre über einen Zeitraum von 1-6 h stufenweise in Schritten von 0.25 mM auf 1-2.5 mM Fe^{2+} erhöht wurde. Ein Reißen der Kristalle setzte aber auch bei dieser Vorgehensweise in fast allen Fällen ein und es wurde nur ein einziger für die Datensammlung geeigneter Kristall erhalten. Das Zersetzen der Kristalle kann, wie die Verfeinerung der Struktur zeigte, mit strukturellen Veränderungen am Protein erklärt werden.

4.3.2 Sulfatester-Komplexe

Als Substrate der AtsK wurden aliphatische Sulfatester charakterisiert. Verschiedene dieser Substrate konnten sowohl durch Kokristallisation als auch *soaking* in die aktive Tasche der AtsK eingeführt werden. Für die Herstellung der Fe-αKG-Substrat-Komplexe durch *soaking* wurde, wie oben beschrieben, eine anaerobe Lösung hergestellt, die neben den Zusätzen der Mutterlauge 1-2 mM Mohrsches Salz enthielt. In Gegenwart von αKG gewachsene Kristalle wurden darin unter Schutzgasatmosphäre für 12-48 h inkubiert. Anschließend wurde die Substratkonzentration in Stufen von 0.5-1 mM auf 5-10 mM gebracht und unter anaeroben Bedingungen für weitere 24-96 h inkubiert. Die Substrate n-Butyl-1-sulfat, n-Hexyl-1-sulfat, 2-Ethylhexyl-1-sulfat und n-Octyl-1-sulfat wurden in Form ihrer Natriumsalze eingesetzt.

Um Fe-Succinat-Substratkomplexe herzustellen, wurden die in Gegenwart von Succinat gewachsenen Kristalle zunächst für wenige Stunden anaerob in einer substrathaltigen Lösung getränkt. Dafür wurden die Sulfatester n-Butyl-1-sulfat und n-Hexyl-1-sulfat verwendet. Anschließend wurde der Lösung 2 mM Fe(II) in 0.5 mM-Schritten zugefügt.

Die Kristalle zersetzten sich schon nach kurzer Zeit sowohl in Gegenwart von αKG als auch von Succinat in über der Hälfte der Ansätze. Nur wenige Kristalle zeigten keine äußerlichen Veränderungen. Im Falle der Fe-αKG-Octylsulfat-Komplexe konnte gar kein für ein Beugungsexperiment geeigneter Kristall erhalten werden.

Bei diesen *soaking*-Experimenten trat außer bei der Verwendung von n-Butylsulfat unabhängig vom verwendeten Puffer eine Raumgruppenänderung an den Kristallen auf. Unter Verkleinerung der asymmetrischen Einheit gingen die Kristalle von der Raumgruppe $P2_12_12_1$ nach $I2_12_12_1$ über, wodurch nur noch zwei statt vier Kopien des Proteins in der asymmetrischen Einheit vorliegen.

4.3.3 Sulfonat-Komplex

Zur Einführung eines aliphatischen Sulfonates in den Kristall wurde wie bei den oben beschriebenen Sulfatester-Komplexen zunächst unter anaeroben Bedingungen ein Fe(II)-*soaking*-Experiment für 3 h durchgeführt und anschließend 1.25 mM n-Heptylsulfonat als Natriumsalz zugegeben und die Kristalle für weitere 12 h unter Sauerstoffausschluss inkubiert. Wie bei den Sulfatester-Komplexen trat auch hier eine Raumgruppenänderung von $P2_12_12_1$ nach $I2_12_12_1$ auf.

4.3.4 NO-Komplex

An den Fe-αKG-Sulfatester-Komplex sollte NO als O_2-Analogon angelagert werden, um die Position zu bestimmen, über die Sauerstoff an den Eduktkomplex bindet. Für dieses Experiment

wurde die gleiche *sitting drop*-Anordnung wie für die Fe-*soaking*-Experimente verwendet. Zunächst wurde der Eduktkomplex mit 2-Ethyl-1-hexylsulfat vorbereitet. Anschließend wurden je 300 µl einer 1 M HCl und einer 1 M $NaNO_2$-Lösung im Reservoir des *sitting drop*-Gefäßes gemischt (siehe Abb. 6). Gemäß

$$2\ NO_2^- + H^+ \rightarrow NO_3^- + NO$$

disproportioniert Nitrit dabei zu Nitrat und Stickstoffmonoxid, welches über die Gasphase an den Fe-Protein-Komplex diffundieren kann.

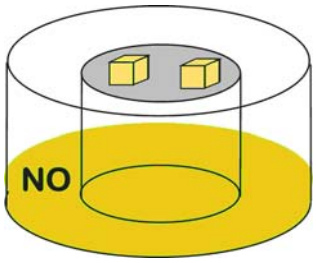


Abb. 6 Anordnung zur Durchführung eines NO-*soaking*-Experiment. Wie beim in Abb. 5 gezeigten Experiment zum anaeroben *soaking* wird die Tränklösung zunächst entgast, in das obere Reservoir gegeben und die Kristalle in diese transferiert. Dabei wird die Kammer mit Argon gespült. Im unteren Reservoir werden Salzsäure und Nitritlösung gemischt und die Kammer luftdicht verschlossen.

Die Kristalle färbten sich unter diesen Bedingungen nach etwa 2 h gelb. In etwa der Hälfte der Fälle zersetzten sich die Kristalle. Die so erhaltenen, äußerlich bis auf die Farbe unveränderten Kristalle zeigten jedoch keine Beugungseigenschaften und somit konnte kein Datensatz eines NO-Komplexes gesammelt werden.

4.3.5 αKG-Decarboxylierung im Kristall

Für einige αKG-abhängige Dioxygenasen (TauD, TfdA, siehe Details in Kapitel 5.4) ist bekannt, dass es auch in Abwesenheit von Substrat zur Bindung von molekularem Sauerstoff an Eisen und nachfolgender Decarboxylierung der αKG kommen kann. Diese Reaktion verläuft sehr viel langsamer als die an die Substratbindung gekoppelte Decarboxylierung, weshalb sie in Gegenwart von Substrat nur in geringem Maße beobachtet wird.

Wenn mit dieser ungekoppelten Kosubstratoxidation keine signifikante strukturelle Änderung der Proteinkonformation verbunden ist, sollte es möglich sein, diese Reaktion auch im Kristall ablaufen zu lassen. In der resultierenden Struktur sollte dann Succinat anstelle von αKG in der aktiven Tasche zu finden sein. Ob das außerdem gebildete Kohlendioxid in der aktiven Tasche verbleibt oder vom Eisen abgespalten wird, ist nicht bekannt. Es wäre denkbar, dass es entweder in Form von CO_2 oder CO_3^{2-} an das Eisen gebunden ist. Bei der Decarboxylierung der αKG werden zwei Elektronen übertragen, der molekulare Sauerstoff liefert jedoch vier Oxidationsäquivalente. Eine sich unmittelbar an die Decarboxylierung der αKG anschließende

Folgereaktion ist zwingend notwendig. Welche Produkte nach der Übertragung der übrigen beiden Elektronen vorliegen, ist jedoch nicht zweifelsfrei geklärt. Für TfdA konnte gezeigt werden, dass mindestens zwei Folgeprodukte auftreten, von denen sich eines durch Ascorbinsäure reaktivieren lässt (SAARI und HAUSINGER, 1998). Wie für TfdA und auch für TauD gezeigt werden konnte, ist eine der Folgereaktionen die Hydroxylierung einer aromatischen Proteinseitenkette, welche zu einer nicht durch Ascorbinsäure reaktivierbaren Spezies führt (LIU, 2001; RYLE, 2003a). Von der Kristallstruktur des sauerstoffexponierten Fe-αKG-AtsK-Komplexes werden Einblicke in die zur Deaktivierung des Proteins führenden Nebenreaktionen erwartet.

Zur Darstellung eines im Kristall aus Fe(II)-αKG-Atsk gebildeten Fe(II)-Succinat-Atsk-Komplexes wurde ein in αKG-Puffer gewachsener Kristall durch Erniedrigung der Pufferkonzentration in 5 mM-Schritten in eine αKG-freie Lösung gebracht. Dadurch sollte ein Verdrängen des bei der Decarboxylierung der αKG gebildeten, im Vergleich mit dem Kosubstrat schwächer an die aktive Tasche gebundenen Succinats durch αKG verhindert werden. Danach wurde die Eisenkonzentration stufenweise in 0.25 mM-Schritten auf 2 mM Fe(II) erhöht. Die Kristalle zeigten sich empfindlich sowohl gegenüber Erniedrigung der Pufferkonzentration als auch gegenüber Erhöhung der Eisenkonzentration. Aus diesem Grunde wurde neben der vollständigen Entfernung des Puffers auch versucht, in ein anderes Puffersystem zu wechseln. Dieses sollte im gleichen pH-Bereich einsetzbar sein und seine Komponenten weder Eisen komplexieren noch über Carboxylatgruppen an die aktive Tasche des Proteins binden können. Verwendete man einen $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ -Puffer bei pH 5.6, wofür die Konzentration an αKG in der Mutterlauge stufenweise in Schritten von 5 mM entfernt und die des Puffersystems $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ bis zu einer Endkonzentration von 25 mM entsprechend erhöht wurde, zeigten die Kristalle bei langsamem Wechsel in das Puffersystem keine äußerlichen Veränderungen. Die Kristalle konnten anschließend mit 1 mM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ versetzt werden. Nach 24 h wurden die Kristalle für wenige Stunden dem Luftsauerstoff ausgesetzt. Aus Studien an TfdA (SAARI UND HAUSINGER, 1998) ist bekannt, dass ein Teil des in Abwesenheit von Substrat durch die ungekoppelte Decarboxylierung von αKG inaktivierten Enzyms durch Ascorbinsäure reaktiviert werden kann. Daher wurde ein zweites Experiment mit Pufferaustausch analog zu dem oben beschriebenen durchgeführt, wobei die *soak*-Lösung neben 1 mM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ noch 2 mM Ascorbinsäure enthielt. Die Ascorbinsäure konnte im Kristall nicht nachgewiesen werden. Die weitere Auswertung der Messdaten ergab, dass auch hier Phosphat die αKG aus ihrer Bindestelle verdrängt hatte und somit die ungekoppelte Decarboxylierung im Kristall nicht nachgewiesen werden konnte. Beide

phosphathaltigen Strukturen liegen in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ vor und unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

In einem weiteren Versuch wurde der αKG-Puffer in Schritten von 5 mM ersatzlos aus der Lösung entfernt und anschließend wie oben beschrieben ein Fe(II)-*soaking*-Experiment durchgeführt. Anschließend wurde die Lösung für einige Stunden dem Luftsauerstoff ausgesetzt. Die bei dieser Vorgehensweise erhaltenen Kristalle zeigten eine Veränderung der Raumgruppe von $P2_12_12_1$ nach $I2_12_12_1$ und lieferten Daten bis zu einer Auflösung von 3.7 Å. Die Qualität der Elektronendichte in der aktiven Tasche war so gering, dass offen blieb, ob Eisen an das Protein koordinierte.

Da nicht auszuschließen war, dass die αKG in Abwesenheit von Eisen nur lose an das Protein bindet und es bei der Entfernung von αKG aus der Mutterlauge schon vor dem Tränken in einer Fe-Lösung zur Entfernung des Kosubstrates aus der aktiven Tasche gekommen war, wurden Kristalle, die in einer 25 mM αKG-Lösung gewachsen waren, unter anaeroben Bedingungen in einer 2.5 mM Fe(II)-Lösung für 12 h getränkt und anschließend für 36 h Luftsauerstoff ausgesetzt. Die zuvor farblosen Kristalle nahmen in Gegenwart von Sauerstoff eine starke gelbe Färbung an, was bei den beiden zuvor beschriebenen Experimenten nicht erfolgt war. Auch hier wurde eine Raumgruppenänderung von $P2_12_12_1$ nach $I2_12_12_1$ beobachtet.

4.4 Datensammlung

Die Datensammlung erfolgte an einem Einkreisdiffraktometer mit einer Cu-Drehanode der Firma Bruker, die mit einem *max flux*-Spiegelsystem der Firma Osmic und einem MAR345 *image plate*-Detektor kombiniert war (im folgenden mit MAR abgekürzt). Die Kristalle wurden bei einer Temperatur von 100K gemessen.

Weiterhin wurden zur Datensammlung die Strahleinrichtungen BW7B und X11 am Speichering DORIS der EMBL-Außenstelle c/o DESY in Hamburg und die Strahleinrichtung BL2 der Proteinstrukturfabrik c/o BESSY in Berlin benutzt. BW7B und BL2 waren mit einem MAR345-*image plate* Detektor ausgestattet, an X11 kam ein MARCCD Detektor zum Einsatz. Die Messtemperatur betrug an allen Strahleinrichtungen ebenfalls 100 K.

Daten zu den einzelnen Messungen sind in den Tabelle 9 -Tabelle 11 im Anhang gezeigt.

Die Zellbestimmung und Integration der Daten wurde mit dem Programm DENZO (OTWINOWSKI UND MINOR, 1997) vorgenommen, die Skalierung der Daten erfolgte mit SCALEPACK (OTWINOWSKI UND MINOR, 1997) und alternativ SADABS (SHELDRICK, 1996). Um SADABS verwenden zu können, mussten das Format der aus der Integration mit DENZO erhaltenen Daten zunächst mit dem Programm X2SAD (SHELDRICK, 2003) angepasst werden. Hatte während der Datensammlung am Synchrotron eine Injektion stattgefunden, wirkte sich

diese auf die Intensität der Reflexe und damit den R_{int} aus. Das Programm X2SAD ist in der Lage, den Datensatz an dieser Stelle zu spalten, was eine bessere Skalierung der Daten ermöglicht. Allerdings gehen dadurch die Reflexe verloren, die durch diese Spaltung in jedem der Datenpakete nur teilweise erfasst waren, was sich in einer verringerten Vollständigkeit der Daten zeigt. Darauf wurde bei Vergleich und Auswahl der Daten zur weiteren Bearbeitung nach der Skalierung mit SCALEPACK und alternativ SADABS geachtet. Der Vergleich der Datensätze sowie die Bestimmung der Raumgruppe und die Aufteilung der Daten in Arbeits- und Referenzdatensatz wurde mit dem Programm XPREP (SHELDRICK, 1997) durchgeführt. Die Reflexe des Referenzdatensatzes, die etwa 5% aller Reflexe ausmachen, wurden aufgrund von nicht-kristallographischer Symmetrie in dünnen Auflösungsschalen, sogenannten *thin shells*, ausgewählt. Es wurden bei allen Datensätzen exakt die gleichen Reflexe verwendet. Der aus diesem Teil der Daten berechnete R_{free} konnte damit zum Vergleich der Datensätze untereinander herangezogen werden.

4.5 Strukturlösung

Zur Strukturlösung bietet sich bei Makromolekülen eine Reihe von möglichen Wegen an. Etwa 30% aller Proteine enthalten in ihrer nativen Form Metallatome. Wählt man die Wellenlänge bei der Datensammlung an Kristallen eines solchen Proteins so, dass die anomalen Differenzen signifikant sind, kann man die Struktur unter Ausnutzung der anomalen Streuung lösen. Die anomale Streuung von Schwefel, der in Form von Cystein und Methionin in vielen Proteinen vorliegt, kann ebenfalls zur Strukturlösung genutzt werden (DAUTER, 1999). Existiert aus Strukturuntersuchungen an sequenzhomologen Proteinen ein geeignetes Strukturmodell, kann die Struktur ohne Einbeziehung weiterer Datensätze über die Methode des molekularen Ersatzes (*molecular replacement*, MR) gelöst werden (ROSSMANN UND BLOW, 1962). Bei dem Modell kann es sich auch um ein NMR-Modell des Proteins selbst handeln.

Durch biochemische Experimente können weiterhin im Protein enthaltene Methionine gegen Selenomethionine ausgetauscht werden und die Phasen unter Verwendung anomaler Differenzen (z.B. über *multiwavelength anomalous diffraction*, MAD) bestimmt werden. Da für die AtsK kein geeignetes Strukturmodell für MR existierte und das Enzym weder Cystein noch Methionin enthält, war eine Strukturlösung nur über eine Derivatisierung mit Schweratomen möglich. Dazu wurden, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, verschiedene Schweratom-*soaks* durchgeführt und schließlich ein Quecksilberderivat erhalten.

4.5.1 Anomale Dispersion und Isomorphe Differenzen

Die isomorphen Differenzen für den Hg-Datensatz sind in Abb. 7 gezeigt.

```
Anomalous signal/noise ratios (1.0 is random). The first line is based on
input sigmas, the second on variances of F+ and F:
Inf-8.0 - 6.0 - 5.1 - 4.9 - 4.7 - 4.5 - 4.3 - 4.1 - 3.9 - 3.7 - 3.5 - 3.3 A
 1.67  1.55  1.44  1.46  1.42  1.34  1.33  1.33  1.32  1.29  1.25  1.16
 81.0  Neighbors used on average for F+/F- local scaling
 Rint(anom) =   0.0813  before and   0.0814  after local scaling
```

Abb. 7 Auszug aus XPREP: Die anomalen Differenzen sind bis zu einer Auflösung von 3.5 Å zu erkennen; das Verhältnis von Signal zum Rauschen ist jedoch nicht stark ausgeprägt.

Das schlechte Signal/Rausch-Verhältnis kann zum Teil auf die geringe Redundanz der Daten zurückgeführt werden, die nur 1.9 beträgt. Der Versuch, allein die anomale Dispersion zur Bestimmung der Schweratomsubstruktur mit dem Programm SHELXD (USÓN UND SHELDRICK, 1999) zu nutzen, gelang nicht. Ein Vergleich mit dem an BW7B gemessenen Datensatz der *apo*-AtsK zeigt, dass die Zellkanten von denen des Hg-Datensatzes maximal um 0.5% abweichen (siehe Tabelle 4) und die Kristalle somit als isomorph betrachtet werden können. Der R_{int} für die Skalierung dieser Datensätze aufeinander weist jedoch auf eine geringe Isomorphie hin. Beim Vergleich mit anderen, wie Hg-Derivat unter Verwendung von Cu-K_{α}-Strahlung gemessenen Datensätzen, fand sich für den Kristall aus dem in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Gd-*soak*-Experiment der beste R_{int} für die Skalierung, obwohl die Zellen dieser beiden Datensätze größere Differenzen aufweisen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4 Vergleich der Zellen der verschiedenen Datensätze sowie des R_{int} für die Skalierung der Datensätze der *apo*-AtsK und des Gd-*soaks* auf den des Hg-Derivat.

Datensatz	a [Å]	b [Å]	c [Å]	$\alpha=\beta=\gamma$	R_{int}
Hg-Derivat	72.213	145.311	159.369	90°	-
apo-AtsK	72.242	145.344	159.457	90°	0.4506 vor und 0.4517 nach *local scaling*
Gd-Soak	71.738	145.488	158.912	90°	0.3045 vor und 0.2961 nach *local scaling*

Bei der Kombination der Gd-*soak*- und des Hg-Derivat-Datensatzes in einem SIRAS-Experiment konnten mit dem Programm SHELXD (USÓN und SHELDRICK, 1999) zehn Schweratompositionen gefunden werden, wobei die Standardparameter für SHELXD beibehalten worden waren und als Zielwert für die Zahl der Quecksilberatome acht angegeben worden war. Die Korrelationskoeffizienten für die beste Lösung lagen bei 29.84 für alle und 19.70 für die schwachen Daten, der PATFOM lag bei 10.13. Diese Werte liegen im unteren

Bereich dessen, was für eine gelöste Struktur erwartet wird und es war zunächst nicht eindeutig, dass die Schweratomsubstruktur tatsächlich richtig bestimmt war.

4.5.2 Schweratompositionen und nicht-kristallographische Symmetrie

Die aus den besten Lösungen für acht zu bestimmende Quecksilberlagen erhaltenen Schweratompositionen wurden mit einem für Versuchszwecke geschriebenen Programm gemittelt. Die dazugehörigen Kreuzvektoren sind in Abb. 8 dargestellt. Zur Untersuchung auf nicht-kristallographische Symmetrie wurden die gefundenen Hg-Positionen durch das Programm XP graphisch dargestellt und ihre Symmetrieäquivalente erzeugt. Aus biochemischen Arbeiten war bekannt, dass die AtsK als Tetramer aktiv ist. Auch erhält man einen Wert von vier Monomeren pro asymmetrischer Einheit für die AtsK-Kristalle, wenn man bei dem Elementarzellvolumen von 1672325 $Å^3$ und einer Kettenlänge von 301 Aminosäuren einen Platzbedarf von 140 $Å^3$ pro Aminosäure und einen Wasseranteil von 60% annimmt (MATTHEWS, 1968).

		Hg1	Hg2	Hg3	Hg4	Hg5	Hg6	Hg7	Hg8	Hg9	Hg10
1	43.5										
	17.1										
2	42.9	21.4									
	14.3	14.2									
3	81.8	30.3	35.1								
	0.0	10.9	14.6								
4	44.0	26.2	13.2	32.7							
	17.4	1.7	18.3	13.4							
5	42.2	21.2	24.8	48.1	21.2						
	12.4	13.8	13.5	7.6	7.3						
6	83.2	47.7	32.5	37.5	31.9	29.9					
	10.2	3.6	10.4	12.4	6.3	0.0					
7	78.4	32.0	38.4	33.9	29.3	35.2	41.6				
	4.4	3.9	23.2	5.7	9.0	3.9	7.7				
8	78.3	35.1	29.3	41.6	37.9	31.7	33.9	34.7			
	19.5	16.8	10.0	3.5	11.2	2.4	5.5	13.0			
9	73.6	43.9	46.0	26.3	46.0	43.5	26.2	27.2	27.4		
	36.4	23.4	11.0	11.3	13.3	13.8	19.2	8.1	6.2		
10	77.5	46.3	43.8	27.6	43.7	46.0	27.5	26.0	26.3	7.9	
	15.8	10.2	25.1	15.9	15.1	8.4	20.8	7.7	3.8	0.0	

Abb. 8 Kreuzvektoren aus den bei der Phasenberechnung gemittelten Schweratomlagen. In der ersten Spalte ist die Nummer des jeweiligen Maxima, in der zweiten der Abstandsvektor zwischen einem Atom und seinen Äquivalenten, in den übrigen Spalten die Kreuzvektoren zwischen dem durch die Zeile und dem durch die Spalte definierten Atom angegeben. Der obere Zahlenwert gibt den Anstand der Lagen, der untere die Höhe der *Patterson minimum function* an.

Zudem zeigt die *self rotation function* mit κ=180° zwei deutliche Maxima (siehe Abb. 9), aus denen die Punktgruppe D_2 für die Moleküle der asymmetrischen Einheit abgeleitet werden konnte. Daher wurde zunächst von der Koordination zweier Hg-Atome pro AtsK-Monomer ausgegangen und nach ncs zwischen den ersten acht der zehn Hg-Positionen gesucht. Schließlich konnten über eine 2_1-Achse die Symmetrieäquivalente von Hg2, Hg5, Hg6 und Hg8

erzeugt und in Übereinstimmung mit der *self rotation function* mit den übrigen Hg-Atomen über drei aufeinander senkrecht stehende zweizählige Achsen in Relation gesetzt werden (siehe Abb. 10).

Durch eine Überlagerung der äquivalenten Atomlagen über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit dem Programm LSQKAB (KABSCH, 1976) erhielt man Rotations- und Translationskomponenten der ncs-Matrix zur Überführung der Quecksilberpositionen ineinander. Die NCS wird auch von den Hg-Atomen Hg9 und Hg10 erfüllt, die genau auf einer der Drehachsen liegen.

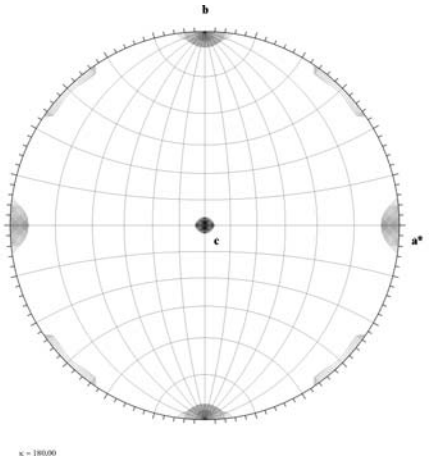


Abb. 9 *Self rotation function* der AtsK mit κ=180° zur Untersuchung auf zweizählige, nicht-kristallographische Symmetrie, durchgeführt mit dem Programm GLRF (TONG UND ROSSMANN, 1990). Der Auflösungsbereich wurde auf 10-4 Å beschränkt und ein Integrationsradius von 25 Å eingesetzt. Die Konturierung wurde in Schritten von 2% ausgehend von der niedrigsten Konturierungsstufe von 35% des Maximums vorgenommen.

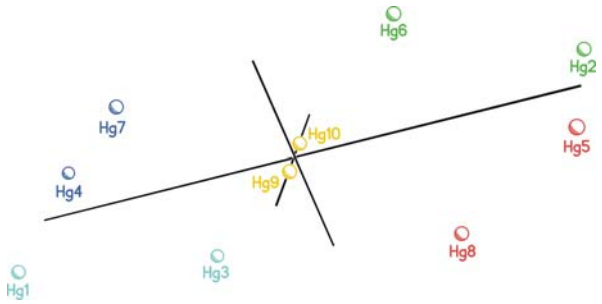


Abb. 10 Über nicht-kristallographische 222-Symmetrie verwandte Hg-Atompositionen mit den aus der *self rotation function* abgeleiteten unabhängigen Drehachsen. Die für die Atome verwendeten Farben sind denen in Abb. 8 angepasst, wobei die Atome gleicher Farbe jeweils den beiden an ein Proteinmonomer koordinierenden Hg-Atome entsprechen. Eine Ausnahme bilden die gelb dargestellten Hg-Atome, die sich an der Kontaktfläche der vier zum Tetramer zusammengelagerten Monomere befinden.

4.5.3 Berechnung der Proteindichte

Die erste Elektronendichtekarte wurde unter Verwendung der Positionen Hg1-Hg10, den nativen unter Verwendung von Cu-K_α-Strahlung gesammelter Daten und den F_A-Daten über eine Harker-Konstruktion (HARKER, 1956) berechnet (SHELDRICK, 2001). Bis auf eine Unterscheidung von Lösungsmittel- und Proteinregion war keine Interpretation dieser Dichte möglich. Zur Verbesserung der Dichte wurde *solvent flattening* kombiniert mit *histogram matching* und ncs-*averaging* unter Verwendung des Programms DM (COWTAN, 1994) durchgeführt. Dadurch verbesserte sich die Qualität der Phasen stark (siehe Abb. 10). Gleichzeitig wurde der am Synchrotron gemessene native Datensatz einbezogen und die Auflösung dadurch schrittweise von 3.8 auf 1.9 Å erweitert, so dass man in der damit berechneten Elektronendichtekarte neben sekundären Strukturmerkmalen auch Proteinseitenketten erkennen konnte.

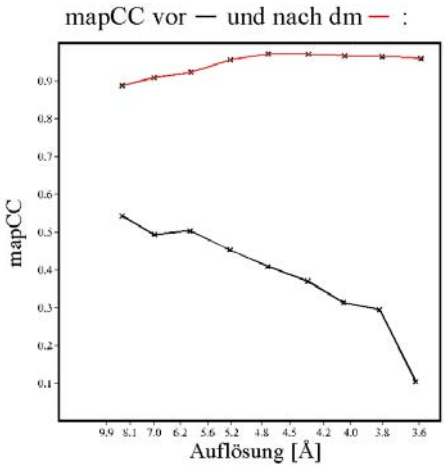


Abb. 11 Die *map*-Korrelationskoeffizienten mapCC vor und nach der Dichtemodifikation durch DM aufgetragen gegen die Auflösung.

4.5.4 Generation des Proteinmodells

Das Programm ARP/wARP (PERRAKIS, 1999) wurde zunächst benutzt, um die Hauptketten für die vier Moleküle der asymmetrischen Einheit in der Dichte zu plazieren. Danach bestand das Modell aus 934 Aminosäuren in 16 Ketten (*connectivity index* 0.96, R-Wert 18.1%). Danach wurden ebenfalls mit dem Programm ARP/wARP unter Einbeziehung der Aminosäuresequenz die Seitenketten in das Modell eingefügt. Schließlich wurde das erhaltene Modell unter Verwendung des Programms XtalView (MCREE, 1999) manuell auf mögliche Fehler geprüft und wenn nötig falsche Fragmente entfernt und fehlende Aminosäuren eingebaut. Dazu wurde eine gewichtete Elektronendichtekarte verwendet, die aus den aus DM erhaltenen Phasen berechnet worden war. Das Model enthielt 962 Aminosäuren in 23 Ketten.

4.5.5 Strukturlösung der AtsK-Komplexe

Wie die *apo*-Form der AtsK lagen auch der Na-αKG-AtsK-Komplex, der Fe-αKG-AtsK-Komplex, der Fe-αKG-n-Butylsulfat-AtsK-Komplex, der Phosphatkomplex, der Na-Succinat-Komplex und der Na-Succinat-Butylsulfatkomplex in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ vor. Zur Strukturlösung konnte in diesen Fällen das Modell der *apo*-Form als starre Gruppe für eine erste Verfeinerung mit den Programmen REFMAC5 (MURSHUDOV, 1997) oder CNS (BRÜNGER, 1998) benutzt werden. Dabei wurde jedes der vier Monomere der asymmetrischen Einheit als eigene starre Gruppe definiert. Bei derVerfeinerung Ausschließlich Translation und Rotation dieser Gruppen waren erlaubt. Der Auflösungsbereich wurde auf 8-4 Å begrenzt und die Seitenketten der Aminosäuren, bei denen eine Änderung ihrer Lage relativ zu der in der *apo*-Atsk zu erwarten war, aus dem *rigid body* Model entfernt. Dabei handelte es sich überwiegend um die Aminosäuren der aktiven Tasche, die direkt an der Metall-, Kosubstrat- und Substrat-Bindung beteiligt sind (His108, Asp110, Thr135, His214, His264, Arg275, Arg279). Dies diente zur Vermeidung von *model bias* in der Region des Proteins, wo die größten strukturellen Veränderungen zu erwarten waren. *Model bias* entsteht, wenn die Phasen eines bekannten Modells mit den gemessenen Amplituden zur Berechnung der Elektronendichtekarte verwendet werden. Die Elektronendichte spiegelt statt der Struktur der zu untersuchenden Verbindung die des eingesetzten Modells wider, da die Phasen den größeren Beitrag zur Gestalt der Dichte beitragen.

Zur Strukturlösung der Komplexe, die in der Raumgruppe $I2_12_12_1$ vorlagen, wurden zunächst über *molecular replacement* die beiden Monomere der asymmetrischen Einheit mit dem Programm MOLREP (VAGIN UND TEPLYAKOV, 1997) positioniert. Es wurde eine MR-Suche für zwei Monomere mit Standard-Rotations- und Translationsfunktion mit dem in der aktiven Tasche modifizierten Monomer A der *apo*-AtsK als Modell durchgeführt. Die höchste Auflösung wurde auf 4 Å begrenzt, die niedrigste auf 10 Å und der *cut-off*-Radius auf 25 Å gesetzt. Es ergaben sich ein Korrelationskoeffizient von 0.617 und ein R-Wert von 41.4% für die beste Lösung.

4.6 Strukturverfeinerung

Die Strukturverfeinerung wurde für alle Strukturen mit dem Programm REFMAC5 (MURSHUDOV, 1997) durchgeführt. Zunächst wurden die vier bzw. zwei Monomere des initialen Modells bei reduzierter Auflösung (4 Å) als starre Gruppe verfeinert, anschließend wurde mit dem Programm CNS (BRÜNGER, 1998) eine Verfeinerung über *simulated annealing* unter Verwendung von *torsion angle dynamics* bei voller Auflösung durchgeführt. Dies sollte grobe Fehler im Modell beheben, der Einsatz von *torsion angle dynamics* verringerte die Zahl

der Parameter und sollte eine Überinterpretation der Daten verhindern. Alternativ wurde nach der Verfeinerung der vier Monomeren als starre Gruppen eine *maximum likelihood*-Verfeinerung der Atomkoordinaten und der isotropen Auslenkungsparameter mit REFMAC5 bei voller Auflösung durchgeführt. Bei dieser Verfeinerung wurden *restraints* auf die Atomparameter angewendet und *solvent flattening* durchgeführt. Die durch CNS und REFMAC5 erhaltenen Modelle wurden hinsichtlich ihrer Geometrie und der Übereinstimmung mit der Elektronendichtekarte verglichen und das bessere Modell zur weiteren Verfeinerung eingesetzt. Bei der Struktur der *apo*-AtsK, die mit 1.9 Å die höchste Auflösung zeigte, wurde auf eine Mittelung aller Monomere in der asymmetrischen Einheit im Rahmen eines ncs-*averaging* verzichtet. Bei den Strukturen, die eine Auflösung höher als 2.4 Å aufwiesen, wurde ein ncs-*averaging* durchgeführt, wobei die Koordinaten der Atome und die Auslenkungsparameter innerhalb einer Standardabweichung von 0.5 Å bzw. 2 $Å^2$ gleich sein sollten. Bei den Strukturen mit niedrigerer Auflösung wurden die Werte für die Standardabweichung auf 0.05 Å bzw. 0.5 $Å^2$ verringert. Nach jedem Verfeinerungsschritt wurde das Modell manuell mit dem Programm XtalView (MCREE, 1999) gegen eine bei 1σ konturierte, sigmaA-gewichtete $2mF_o$-DF_c und eine bei $\pm 2.5\sigma$ konturierte F_o-F_c Elektronendichtekarte angeglichen. Wassermoleküle wurden sowohl manuell als auch durch XtalView entsprechend der Differenzelektronendichte in das Modell eingefügt. Nach einer anschließenden Verfeinerung wurde ihre Lage sowie ihre Auslenkungsparameter überprüft, die in der Größenordnung der B-Werte für die Proteinseitenketten liegen sollten.

Die Metallatome Fe und Na wurden manuell platziert und ihre Besetzung angepasst. Die Modelle der Heterogruppen α-Ketoglutarsäure, n-Hexyl-1-sulfat und Succinat wurden den Datenbanken CDS (ALLEN, 1991; KENNARD und ALLEN, 1993) und PDB (BERNSTEIN, 1977) entnommen, geometrische *restraints* auf Bindungslängen und -winkel für die Verfeinerung festgelegt, Lage und Torsionswinkel manuell der Elektronendichte angepasst sowie die Besetzung ihrer Lagen bestimmt. Das Modell für 2-Ethylhexyl-1-sulfat wurde aus den Koordinaten von n-Hexyl-1-sulfat erzeugt, da die Struktur nicht aus den Datenbanken erhältlich war und Versuche zur Kristallisation der Substanz fehlschlugen. Während der Verfeinerung wurden Teile der fehlenden *loops*, die in der Elektronendichte erkennbar waren, modelliert.

Für das Modell der *apo*-AtsK wurden die Wasserstoffatome bei der Berechnung der Strukturfaktoren mit einbezogen.

Im Anhang sind in Tabelle 12 die Daten der Verfeinerungen angegeben. In einigen Fällen konnte die Struktur aufgrund verschiedener Ursachen nicht zweifelsfrei interpretiert oder verfeinert werden. Daher sind in Tabelle 13 die Ergebnisse der unvollständigen Verfeinerungen

für die übrigen Datensätze angegeben. Darin wird auch auf die Probleme bei Interpretation der Elektronendichtekarte verwiesen.

4.7 Evaluation der Strukturmodelle

Zur Überprüfung der Proteinstrukturen wurden die Programme PROCHECK (LASKOWSKI, 1993) und WHAT IF (VRIEND, 1990) eingesetzt. PROCHECK vergleicht die Geometrie des Modells mit denen von Proteinstrukturen hoher Auflösung aus der PDB, WHAT IF prüft zusätzlich auf unerlaubte Interaktionen zwischen symmetrieverwandten Molekülen oder Wassermolekülen im Rahmen eines Packungstests.

Mit Hilfe des Ramachandran-Plots (RAMACHANDRAN UND SASSIEKHARAN, 1968) wurden die Torsionswinkel der Hauptketten graphisch dargestellt. Dabei werden die Torsionswinkel ψ (C_{i-1}-N_i-C_i^{α}-C_i) und φ (N_i-C_i^{α}-C_i-N_{i+1}) gegeneinander aufgetragen. Für Proteine wurden klar bevorzugte Kombinationen der beiden Winkel gefunden, so dass das Diagramm in vier verschiedene Regionen eingeteilt werden kann (bevorzugt, erlaubt, großzügigerweise erlaubt, nicht erlaubt). Bei Winkelkombinationen, die in der großzügig erlaubten Region liegen, treten erste abstoßende interatomare Wechselwirkungen auf, die jedoch durch andere anziehende Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen ausgeglichen werden können. In den Strukturen der AtsK-Komplexe weichen nur Leu212 (großzügigerweise erlaubt) und Lys53 (nicht erlaubt) von den für Proteine üblichen Winkelkombinationen ab, die Elektronendichte für diese Aminosäuren spricht jedoch für diese unüblichen Winkel.

Die nicht-kristallographische Symmetrie wurde bei den AtsK-Komplex-Strukturen von REFMAC5 während der Verfeinerung als *restraints* eingesetzt. Bei der ohne ncs-*restraints* verfeinerten *apo*-Struktur konnte die ncs am Ende der Verfeinerung zur Überprüfung des Modells genutzt werden.

Der Vergleich der Monomere in der asymmetrischen Einheit mit Hilfe des Programms ESCET (SCHNEIDER, 2002) in Hinblick auf bewegliche und starre Regionen im Protein wurde nur für die Struktur der *apo*-AtsK durchgeführt, da durch den Einsatz von ncs-*restraints* bei der Verfeinerung aller anderen Strukturen die Monomere in der asymmetrischen Einheit strukturell nicht mehr als unabhängig zu betrachten sind. Eine Interpretation dieser Ergebnisse erfolgt nachfolgend bei der Strukturbeschreibung.

4.8 Generation der Abbildungen

Die gezeigten Abbindungen der Strukturen wurden mit den Programmen BobScript (ESNOUF, 1997), MolScript (KRAULIS, 1991), XtalView (MCREE, 1999) und Raster3D erzeugt. Die mit

Hilfe von BobScript dargestellten Elektronendichtekarten wurden mit Hilfe des Programmes SHELXPRO (SHELDRICK, 1996) berechnet.

4.9 XAS

Für die XAS-Messung wurde die auch zur Kristallisation eingesetzte Probe 1 der AtsK verwendet. Neben dem Enzym lagen darin 20 mM Tris/HCl-Puffer (pH=7.5) und Spuren von $NaSO_4$ vor. Die Proteinkonzentration betrug 0.6 mM. Dieser Lösung wurde Fe^{2+} in Form von Mohrschem Salz und αKG (pH=5.6) in einem molaren Verhältnis von Eisen zu Protein bzw. αKG von 0.9 zugesetzt. Die Fe^{2+}/αKG-Stammlösung war zuvor unter anaeroben Bedingungen hergestellt worden. Diese Lösung wurde für einige Minuten inkubiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die XAS-Messung erfolgte bei 20K.

5 Ergebnisse

5.1 Struktur der Alkylsulfatase AtsK

Zur Diskussion der Faltung der AtsK wird im folgenden von der *apo*-Struktur ausgegangen, da sie die höchste Auflösung aufweist und sich die Faltung des Proteins durch Koordination verschiedener Liganden nicht grundlegend ändert, sondern nur kleine Bereiche auf diese reagieren. Darauf wird anschließend in den entsprechenden Unterkapiteln eingegangen.

5.1.1 Tertiärstruktur

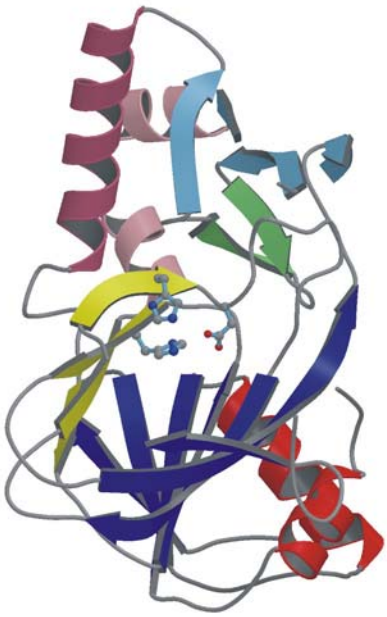


Abb. 12 *Cartoon*-Darstellung der Struktur der AtsK. β-Faltblätter sind durch Pfeile repräsentiert, α-Helices durch Spiralen. Bereiche ohne definierte Sekundärstruktur wurden als Schleifen dargestellt. Die Aminosäuren der Eisenbindestelle sind durch die *ball-and-stick*-Darstellung hervorgehoben.

In Abb. 12 ist die Struktur in *Cartoon*-Darstellung gezeigt, Abb. 13 gibt das Topologiediagramm wieder. Im Zentrum der Struktur befindet sich das für die Enzymfamilie der αKG-abhängigen Dioxygenasen charakteristische *jelly roll*-Motiv. Es besteht aus zwei β-Faltblättern, die sich zu einem Zylinder anordnen, der an der oberen Seite breit genug ist, um Liganden darin zu binden, nach unten aber eng wird, so dass er nicht als Kanal für Wasser oder Substrate der Katalyse geeignet ist. Die Stränge β1, β2, β3, β14, β6, β16 und β4 bilden das größere Faltblatt (blau dargestellt), das kleinere setzt sich aus den antiparallelen Strängen β5,

β15, β7 und β13 zusammen (gelb dargestellt). Wie man in Abb. 12 erkennen kann, ist das große β-Faltblatt gedreht und die Anordnung der Faltblätter bis auf die Stränge β2 und β3 antiparallel.

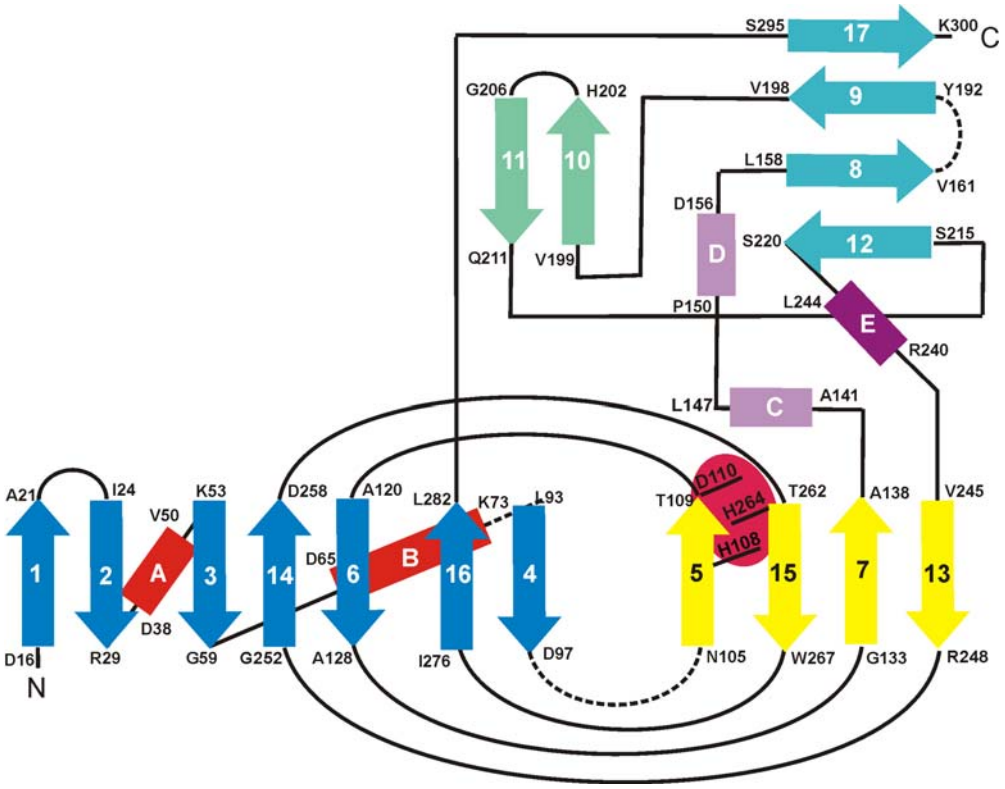


Abb. 13 Das Topologiediagramm gibt die Struktur der AtsK schematisch wieder. Die Farben sind denen in Abb. 12 angepasst. Bereiche, für die keine Aminosäuren im Modell modelliert werden konnten, sind gestrichelt dargestellt.

Der sieben Aminosäuren lange *loop*, der die Stränge β4 und β5 und damit die beiden Faltblätter verbindet, kann nicht in der Elektronendichtekarte lokalisiert werden. Das große Faltblatt wird von den α-Helices αA und αB (rot dargestellt) flankiert. Vergleichbare flankierende Helices treten bei allen bekannten Dioxygenasestrukturen auf, ihre Rolle ist wahrscheinlich eine strukturelle. Ein Teil des *loops*, der die Helix αB mit dem β-Strang β4 verbindet, ist ebenfalls fehlgeordnet und die vier Aminosäuren His81, Pro82, Thr83 und Val84 können nicht modelliert werden. Neben dieser unter den αKG-abhängigen Dioxygenasen strukturell konservierten Domäne des Proteins findet sich eine zweite Domäne, die zwischen Ala138 und Val245 in die Sequenz insertiert ist. Ausgehend von den β-Strängen β7 und β13 setzt sie sich aus drei α-Helices (αC, αD und αE) und zwei antiparallelen Faltblättern (β10, β11 bzw. β9, β8, β12) zusammen, die aus zwei bzw. drei β-Strängen gebildet werden. Das zweite β-Faltblatt wird antiparallel von β17 des C-Terminus flankiert. Weitere Wechselwirkungen zwischen den beiden Domänen werden durch eine Reihe von Salzbrücken (Glu207-Lys53, Glu146-Arg23, Glu285-

Arg200 und Asp258-His202) und Wasserstoffbrücken (Arg23-Glu146, Arg23-Asn243, Ser106-His214, Trp107-His214, Glu211-Arg260, Thr112-His 196, Thr112-His 162, Phe113-Thr297, Glu115-Thr297, Arg200- Glu285 und His202-Asp258) vermittelt. Ein 24 Aminosäuren langer *loop* zwischen den β-Strängen β8 und β9 von Tyr166-Thr190 konnte für die *apo*-Struktur nicht modelliert werden. Nur in der Struktur des Fe-Succinat-Komplexes wurden die Aminosäuren Tyr166-Ala169 in der Elektronendichtekarte als *loop* über dem offenen Ende des *jelly roll*-Zylinders sichtbar. Die Art der Koordination sowie seine Rolle werden in Kapitel 5.2.9 näher erläutert.

Da die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren alle in der konservierten ersten Domäne lokalisiert sind, könnte die Funktion der zweiten Domäne in der Bildung des biologisch aktiven Tetramers liegen (siehe Kapitel 5.1.2). Strukturvergleiche mit der Insertion und den in der Proteindatenbank PDB (BERMAN, 2000) deponierten Strukturen mit dem Programm DALI (HOLM und SANDER, 1996) haben eine Homologie zu den Insertionen bei den αKG-abhängigen Dioxygenasen[2] TauD, CAS und GAB aufgezeigt. Im Falle von TauD kann man von einer großen strukturellen Verwandtschaft sprechen, die Homologie zwischen den Insertionen von AtsK und TfdA und CAS ist nur gering. Es wurden keine analogen Regionen in Proteinen gefunden, die nicht zu den αKG-abhängigen Dioxygenasen gehören. Bei TauD vermittelt die Insertion die Bildung des biologisch aktiven Oligomers, bei dem es sich in diesem Fall um ein Dimer handelt (O´BRIEN, 2003). Die Struktur des Proteins GAB, welches in Lösung als Tetramer vorliegt, liefert einen weiteren Beleg für die Rolle der zweiten Domäne als Oligomerisierungsfläche. Die Helices der zweiten Domäne sind an der Bildung eines Tetramers beteiligt, das anders als im Falle der AtsK kristallographische vierzählige Symmetrie aufweist. Zwei Tetramere sind im Kristall jeweils so angeordnet, dass sie ein *face-to-face*-Dimer bilden. Die Monomere der beiden einander gegenüberliegenden Tetramere wechselwirken über ihre C-Termini miteinander (CHANCE, 2002)[3]. Die Clavaminatsynthase CAS liegt in Lösung als Monomer vor (JANC, 1995) und auch im Kristall wurden keine Wechselwirkungen zwischen den Helices der zweiten Domäne mit denen benachbarter Proteinmoleküle beobachtet.

Die aktive Tasche befindet sich an der offenen Seite des *jelly roll*-Zylinders. In der Kristallstruktur grenzt sie direkt an den Lösungsmittelbereich. Da jedoch die beiden fehlgeordneten *loops* zwischen Ala80 und Pro85 und Glu165 und Tyr191 nahe der aktiven Tasche positioniert sind, ist es möglich, dass sie die aktive Tasche unter physiologischen

[2]Die Strukturen anderer α-ketoglutarsäureabhängiger Dioxygenasen werden in Kapitel 5.4 eingehend diskutiert.

[3]Dem widersprechend wird das Oligomer im Kristall von den Autoren als Tetramer beschrieben und die Verknüpfung zweier Tetrameren zu einem Dimer von Tetrameren nicht erwähnt.

Bedingungen während der Katalyse abdecken. Eine entsprechende Orientierung dieser flexiblen Aminosäure wurde aber in keiner der AtsK-Substrat-Strukturen nachgewiesen.

Wie in vielen Proteinstrukturen können auch bei der AtsK einige terminale Aminosäuren aufgrund ihrer großen Beweglichkeit nicht modelliert werden. Da hier die fehlenden zwölf Aminosäuren am N-Terminus sowie die letzte Aminosäure der Sequenz nicht in unmittelbarer Nähe der aktiven Tasche positioniert sind, ist eine Beteiligung an der Enzymkatalyse nicht zu erwarten.

Allgemein werden in Enzymen neben Salzbrücken, Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen auch Schwefelbrücken zwischen Cysteinen zur Stabilisierung der Tertiärstruktur eingesetzt. Die AtsK enthält keine schwefelhaltigen Aminosäuren und damit auch keine Schwefelbrücken. Wahrscheinlich ist das Fehlen dieser Aminosäuren darauf zurückzuführen, dass es sich bei der AtsK um ein Enzym handelt, das unter Schwefelmangel gebildet wird. Der Einbau von schwefelhaltigen Aminosäuren würde sich unter diesen Bedingungen nachteilig auf die maximale Enzymproduktion auswirken und scheint daher evolutionär nicht begünstigt.

5.1.2 Quartärstruktur

Aus Gelfiltrationsexperimenten ist bekannt, dass die Masse der aktiven Spezies der AtsK mit 121 kDa der eines Tetramers entspricht (KAHNERT UND KERTESZ, 2000). Die *self rotation function* für die *apo*-Form der AtsK zeigt, dass auch im Kristall ein Tetramer mit 222-Symmetrie vorliegt. Seine Struktur ist in Abb. 14 dargestellt.

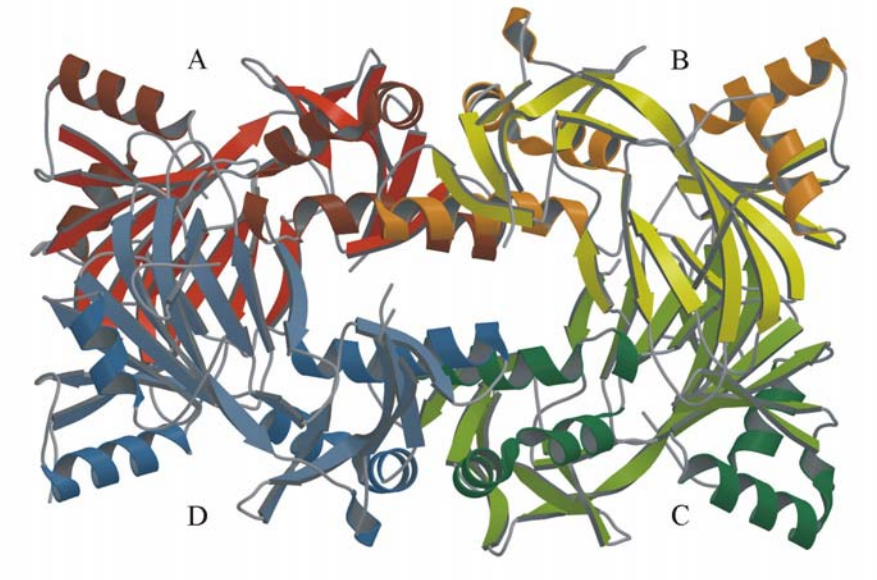


Abb. 14 *Cartoon*-Darstellung des biologisch aktiven Tetramers der AtsK. Zur Bezeichnung der Monomere siehe Text.

Das Enzym besitzt zur Bildung der aktiven Spezies zwei Kontaktstellen. Zum einen bilden zwei der Helices der zweiten Domäne Salzbrücken (αD(**A**) und αD(**B**): Glu153(**A**)-Lys157(**B**), Glu153(**B**)-Lys157(**A**)) bzw. Wasserstoffbrücken (αE(**A**) und αE(**B**): Asp226(**A**)-His237(**B**), His229(**A**)-His229(**B**), Asp226(**B**)-His237(**A**)) miteinander aus und der Kontakt wird zusätzlich über hydrophobe Wechselwirkungen in dem durch die vier Helices eingeschlossenen Raum stabilisiert. Gleiches gilt für die beiden Monomere **C** und **D**.

Zum anderen wechselwirken die Monomere **A** und **D** und entsprechend **B** und **C** über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den beiden inneren Strängen im kleineren β-Faltblatt des *jelly roll*-Zylinders und dem *loop* zwischen β13(**A**,**D**) und αE(**A**,**D**) miteinander und es treten sowohl direkte (jeweils Pro19-Arg248, Gly22-Asp269, Asn105-Glu242, Glu242-Tyr265, Glu242-Asp268, Thr244-Arg246) als auch wasservermittelte Wasserstoffbrücken zwischen den *jelly roll*-Zylindern der Monomere auf.

Durch diese Anordnung der Monomere entsteht im Inneren des Tetramers ein Hohlraum von 7 x 14 x 37 $Å^3$ zwischen His229 **A** und **D** bzw. **B** und **C**, Gln228 **A** und **D** bzw. **B** und **C** sowie Ser106 **A** und **D** bzw. **B** und **C**, der jedoch nur von zwei Seiten gegen das äußere Lösungsmittel abgeschirmt ist. Die Oberfläche dieses Hohlraums ist polar. Die sich an sie anlagernden Wassermoleküle sind zwischen den verschiedenen AtsK-Strukturen weitgehend konserviert. Die Verbindungsstelle der Monomere **A** und **B** bzw. **C** und **D** wird durch die Aminosäuren Gln228 und His229 der jeweiligen Monomere beschrieben. Im Quecksilberderivat der AtsK koordinieren Hg9 und Hg10 an diese Aminosäuren, von wo aus auch die aktive Tasche des Proteins zugänglich ist. Ob die Bindestelle an Gln228 und His229 dem Enzym als Speicherort für Metallkationen dient, ist fraglich, da in den eisenhaltigen Strukturen an diesen Stellen kein Eisen gefunden wurde. Allerdings sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, dass der flexible, im Modell nicht vorhandene *loop* zwischen Glu165 und Tyr191 lang genug ist, um sowohl an die aktive Tasche als auch in den Hohlraum zu koordinieren und einen aktiven Stofftransport dazwischen zu ermöglichen.

5.1.3 Vergleich der Monomere

Vergleicht man die Strukturen eines Proteins in unterschiedlichen Umgebungen, sei es nun der Vergleich unabhängiger Monomere in der asymmetrischen Einheit eines Kristalls oder die Struktur des Enzyms in unterschiedlichen Kristallformen, kann man flexible und starre Bereiche zuteilen. Überlagert man die starren Bereiche aus den einzelnen Strukturen, kann man die Flexibilität des Proteins untersuchen. Das zum Vergleich der Monomere benutzte Programm ESCET (SCHNEIDER, 2002) sucht die starren Teile des Moleküls über die Unterschiede in den interatomaren Abständen. Das Programm berücksichtigt bei der Zuordnung zu starren und

flexiblen Regionen außerdem die unterschiedliche Güte der verglichenen Strukturen. Die Güte der Werte für die interatomaren Abstände wird dabei ausgehend von der Zahl und Vollständigkeit der Daten, des R- bzw. R_{free}-Wertes, der maximalen Auflösung und der Zahl der vollständig besetzten Lagen über eine modifizierte Form des *diffraction-component precision index* DPI (CRUICKSHANK, 1999) unter Einbeziehung der B-Werte der einzelnen Atome berechnet. Dies hat gegenüber einer einfachen Überlagerung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate den Vorteil, dass das Ergebnis unabhängig davon ist, welcher Teil des Moleküls als starre Gruppe definiert und superpositioniert wurde und dass die Ungenauigkeit der Messung berücksichtigt wird.

Bei der Verfeinerung der *apo*-Form der AtsK wurde, wie in Kapitel 0 beschrieben, aufgrund der guten Auflösung der Struktur von 1.9 Å auf die Anwendung von ncs-*restraints* verzichtet. Daher sind die Modelle der vier Monomere der asymmetrischen Einheit voneinander unabhängig.

```
These statistics are based on 236 atoms found in all atom sets to be analysed.

AL[1][apo-AtsK_A] <esd> = 0.074 +/- 0.020  from 0.044 to 0.196 > 254 sel.
AL[2][apo-AtsK_B] <esd> = 0.075 +/- 0.020  from 0.047 to 0.198 > 255 sel.
AL[3][apo-AtsK_C] <esd> = 0.087 +/- 0.027  from 0.048 to 0.192 > 242 sel.
AL[4][apo-AtsK_D] <esd> = 0.099 +/- 0.036  from 0.046 to 0.226 > 244 sel.

==> The following residues form a conformationally invariant region:
A16-A36,A44-A62,A71-A76,A78-A79,A104-A148,A150-A164,A192-A273,
A279-A292,A294-A299

Pairwise Comparison of entire models:
Threshold value of lolim = 2.00.
The first line gives the mean coordinate uncertainties in Angstroems.
The current analysis is based on 236 atoms found in all atom sets to
be analysed.

                 apo-AtsK_A      apo-AtsK_B      apo-AtsK_C      apo-AtsK_D
 <esd> [A]          0.07            0.07            0.09            0.10
apo-AtsK_A                        * 99.3*           97.8            96.0
apo-AtsK_B                                          97.5            96.7
apo-AtsK_C                                                        * 98.1*
```

Abb. 15 Auszüge aus der Protokoll-Datei des Programms ESCET beim Vergleich der vier Monomere der asymmetrischen Einheit der *apo*-Form der AtsK. Als Untergrenze für die fehlergewichteten Abstandsdifferenzen wurde 2σ verwendet. Basierend auf dem DPI sind im oberen Teil die mittleren Standardabweichungen für die Atomkoordinaten angegeben, weiterhin wurde die Zahl der Aminosäuren (bzw. der Cα-Atome) pro Monomer angegeben. Nachfolgend sind die Aminosäuren aufgelistet, die Teile starrer Gruppen sind. Im unteren Teil findet sich eine Kreuztabelle zum Vergleich der Monomere untereinander. Monomer A und B sowie C und D können als annähernd gleich angesehen werden.

In Abb. 15 ist ein Auszug aus der Protokoll-Datei des Progammes ESCET dargestellt. Es zeigte sich, dass die Güte der Modelle für die vier Monomere unterschiedlich ist. Die Monomere A und B sind etwa vergleichbar bezüglich B-Werte und Vollständigkeit des Modells und insgesamt deutlich besser als die Monomere C und D.

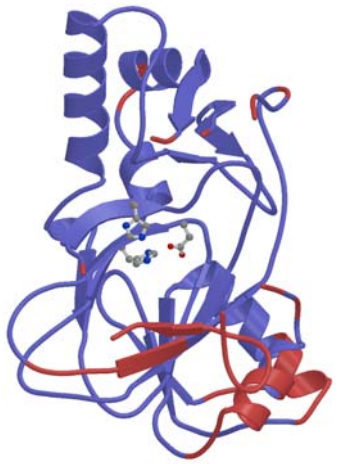


Abb. 16 Cartoon-Darstellung der Struktur der AtsK. Bereiche mit geringer Flexibilität sind blau, solche mit hoher Flexibilität rot dargestellt. Die Unterschiede zwischen den vier unabhängigen Monomere der asymmetrischen Einheit der *apo*-Form der AtsK sind auf kleine Teile des Proteins beschränkt.

In der *Cartoon*-Darstellung des Proteins in Abb. 16 wurden die flexiblen Regionen des Proteins in rot hervorgehoben. Die beweglichsten Teile des Proteins sind die sich an den *jelly roll*-Zylinder anlagernden α-Helices **A** und **B**, die nicht an der Ausbildung des Tetramers beteiligt sind und im Kristall an den Lösungsmittelbereich grenzen.

Weiterhin wurde das jeweils beste Modell einiger AtsK-Komplexe untereinander verglichen. Der Grund, warum nicht alle untersuchten Komplexe in den Vergleich einbezogen wurden, liegt in der Ungenauigkeit der Modelle. Die Ungenauigkeit der Bindungslängen und -winkel ist im Falle der Strukturen niedriger Auflösung so hoch, dass diese Strukturen bei einem Vergleich untereinander als identisch im Rahmen der Messungenauigkeit angesehen werden.Wie in der Kreuztabelle in Abb. 17 erkennbar, kann man die Strukturen der AtsK-Komplexe in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe ist strukturell mit der *apo*-Form der AtsK verwandt, die zweite Gruppe umfasst den Fe-αKG-Substrat- und den Fe-Succinat-Komplex, die einen größeren Unterschied zu der *apo*-Form aufweisen. Der Na-αKG-Hexylsulfatkomplex (AL[7]) muss formal zu beiden Gruppen gezählt werden, da die Ungenauigkeit der Atomkoordinaten keine Zuordnung erlaubt. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind jedoch sehr gering, da – bei einer Untergrenze von 3σ für signifikante Abweichungen der Strukturen – alle Komplexe als gleich anzusehen sind. In Abb. 18 sind die flexiblen Bereiche des Enzyms im Vergleich der verschiedenen Komplexe graphisch dargestellt. Wie schon im Vergleich der vier Monomere der asymmetrischen Einheit der *apo*-AtsK wird die Beweglichkeit des an Lösungsmittelbereiche grenzenden Teils des *jelly roll*-Zylinders und der angelagerten Helix deutlich. Weiterhin variiert die Lage der Aminosäuren, die an den fehlenden *loop* zwischen Glu165 und Tyr191 grenzen. Dies kann einerseits auf eine wichtige Rolle der Aminosäuren in

diesem *loop* hindeuten. Andererseits muss berücksichtigt werden, dass die Qualität der Elektronendichte zu diesen Bereich hin abnimmt und es in der Folge während der Verfeinerung zur Fehlinterpretation gekommen sein kann.

```
These statistics are based on 247 atoms found in all atom sets to be analysed.

AL[1][apo-AtsK]         <esd> = 0.075 +/- 0.020  from 0.044 to 0.164 -> 254 sel.
AL[2][Fe_αKG]           <esd> = 0.145 +/- 0.041  from 0.089 to 0.298 -> 253 sel.
AL[3][Fe_αKG_substrat] <esd> = 0.127 +/- 0.030  from 0.082 to 0.253 -> 254 sel.
AL[4][Na_αKG]           <esd> = 0.124 +/- 0.035  from 0.078 to 0.273 -> 254 sel.
AL[5][Fe_succ]          <esd> = 0.354 +/- 0.070  from 0.229 to 0.569 -> 261 sel.
AL[6][Na_succ]          <esd> = 0.134 +/- 0.033  from 0.083 to 0.304 -> 254 sel.
AL[7][Na_αKG_substrat] <esd> = 0.299 +/- 0.057  from 0.204 to 0.497 -> 250 sel.

==> The following residues form a conformationally invariant region:
A15-A63,A68-A79,A105-A109,A112-A148,A150-A160,A192-A213,A216-A222,A225-A274,A280-A298.

Pairwise Comparison of entire models:
Threshold value of lolim = 1.50
The first line gives the mean coordinate uncertainties in Angstroems.
The current analysis is based
on 247 atoms found in all atom sets to be analysed.

                AL[1]     AL[2]     AL[3]     AL[4]     AL[5]     AL[6]     AL[7]

 <esd> [A]      0.08      0.15      0.13      0.12      0.35      0.13      0.30
   AL[1]                * 99.0*     90.2    * 98.8*     95.9    * 98.8*   * 99.1*
   AL[2]                            94.3    * 99.9*     96.0    * 99.2*   * 99.5*
   AL[3]                                      93.9    * 99.9*     93.3    * 99.3*
   AL[4]                                              96.1    * 99.5*   * 99.7*
   AL[5]                                                        95.6    * 99.0*
   AL[6]                                                                * 99.5*
```

Abb. 17 Auszüge aus der Protokoll-Datei des Programms ESCET beim Vergleich der jeweils besten Monomere der asymmetrischen Einheit verschiedener Komplexe der AtsK. "Fe_αKG_substrat" bezeichnet den Fe-αKG-2-Ethylsulfat-Komplex, "Na_αKG_substrat" den Na-αKG-Hexylsulfat-AtsK-Komplex. Als Untergrenze für die fehlergewichteten Abstandsdifferenzen wurde 1.5σ verwendet. Basierend auf dem DPI sind im oberen Teil die mittleren Standardabweichungen für die Atomkoordinaten angegeben, weiterhin wurde die Zahl der Aminosäuren (bzw. der Cα-Atome) pro Struktur angegeben. Nachfolgend sind die Aminosäuren aufgelistet, die Teile starrer Gruppen sind. Im unteren Teil findet sich eine Kreuztabelle zum Vergleich der Strukturen untereinander.

Abb. 18 Cartoon-Darstellung der Struktur der AtsK. Bereiche mit geringer Variation zwischen den verglichenen AtsK-Strukturen sind blau, solche mit strukturellen Veränderungen >1.5σ rot dargestellt.

5.2 Die aktive Tasche der AtsK

Die aktive Tasche der AtsK lässt sich in die Eisen- und Kosubstratbindestelle sowie die Substratbindestelle unterteilen. Die Aminosäuren, die das Eisenatom koordinieren, folgen in allen Dioxygenasen dem Muster His-X-Asp/Glu-X_n-His. Sie wurden nach dem Vergleich der Primärstruktur von TauD, TfdA und AtsK aus dem Organismus *Pseudomonas aeruginosa* für die hier beschriebene AtsK aus *Pseudomonas putida* S-313 mit His108, Asp110 und His162 angegeben (KAHNERT und KERTESZ 2000). Mit der Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass statt His162 His264 an der Eisenbindestelle beteiligt ist. Die an der αKG- und der Substratbindung beteiligten Aminosäuren waren für AtsK nicht durch biologische Experimente charakterisiert worden. Somit war neben der Bestimmung der Struktur der AtsK in der nach der Expression und Aufreinigung vorliegenden *apo*-Form auch die verschiedener αKG- und Substrat-Komplexe von Interesse.

Da nicht bekannt ist, ob es sich bei den Sulfatestern um die natürliche Substrate der AtsK handelt, wurden von der Struktur der Substrat-Koordinationsstelle Hinweise zur Substratpalette erwartet.

Röntgenstrukturanalysen wie die in dieser Arbeit durchgeführten sind für sich alleine genommen nicht in der Lage, dynamische Prozesse während der Katalyse aufzulösen. Indirekt kann aber über die Untersuchung der verschiedenen stabilen Zwischenstufen oder von Analoga der instabilen Zwischenstufen die Reaktionsdynamik abgeleitet werden. Daher wurde zunächst die *apo*-Form der Atsk untersucht und nachfolgend die Struktur des Fe-αKG-, Fe-αKG-Substrat- bzw. des Fe-αKG-Substrat-NO-Komplexes (als O_2-Komplexanalogon) bestimmt, um den Ablauf der Bildung des aktiven Sauerstoffkomplexes zu untersuchen. Nach kinetischen Untersuchungen an einem verwandten Protein (HOLME, 1975) läuft die Bindung von Eisen vor der Koordination von αKG an das Enzym ab. Der Fe-AtsK-Komplex konnte nicht erhalten werden, da das Eisen durch die Komplexbildung mit Citrat maskiert wird und nicht für die Bindung an das Protein zur Verfügung steht.

Im weiteren Verlauf der Katalyse treten Radikalzwischenstufen und eine Fe(IV)=O-Spezies auf, deren Lebensdauer zu kurz für die Bestimmung der Kristallstruktur ist. Die nächsten kristallographisch fassbaren Intermediate der Katalyse sind die succinathaltigen Komplexe, die die Enzymzwischenstufe nach der Decarboxylierung des Kosubstrates darstellen. Hierzu wurden Kristalle untersucht, die in Anwesenheit von Succinat anstelle von αKG gewachsen waren und in die nachfolgend durch Tränken Fe(II) bzw. Fe(II) und Substrat eingeführt worden war. Weiterhin sollte der Ablauf einer Nebenreaktion analysiert werden, die bei einigen Enzymen der Familie in Abwesenheit von Substrat abläuft und während der, unter

Deaktivierung des Proteins, αKG in Succinat umgewandelt wird. Dazu wurden die Strukturen der Fe-αKG-AtsK- und der Fe-Succinat-AtsK-Komplexe mit der Struktur eines Kristalls, der nach dem Tränken in einer Fe(II)-Lösung unter Schutzgasatmosphäre Luftsauerstoff ausgesetzt worden war, verglichen.
Letztlich wurden von allen Fe-haltigen Komplexen auch die Na-Analoga untersucht, um die strukturelle Funktion des Eisens zu bestimmen.

Im folgenden sollen diese verschiedenen Kristallstrukturen beschrieben und mit der Ligandenbindung einhergehende Änderungen am Enzym hervorgehoben werden.
Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in den graphischen Darstellungen nur die Aminosäuren, nicht aber die einzelnen Atome beschriftet. Die Benennung der Atome kann Abb. 19 entnommen werden, in dem der Aufbau der aktiven Tasche skizzenhaft dargestellt ist.

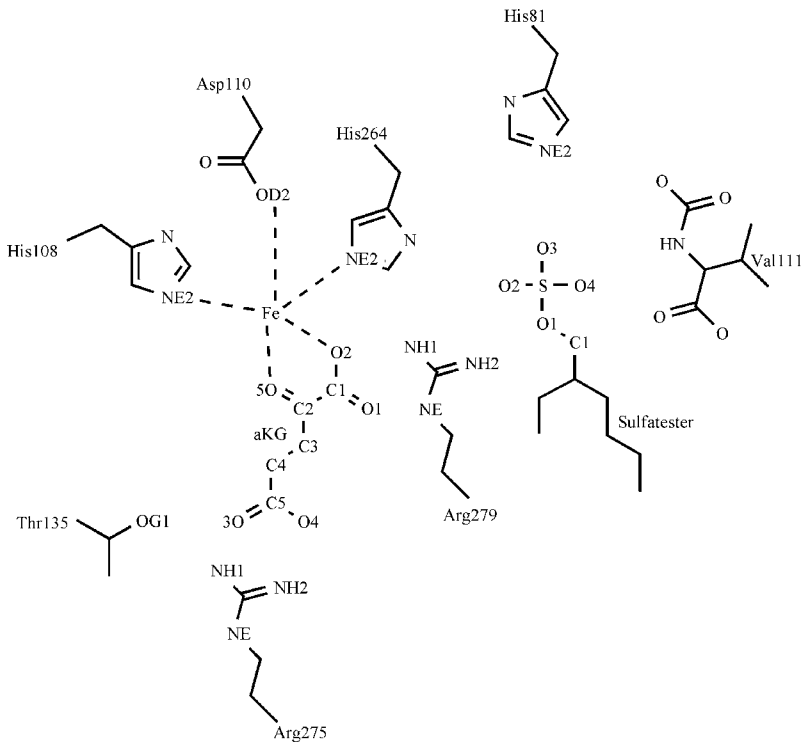


Abb. 19 Skizzenhafte Darstellung des Aufbaus der aktiven Tasche von AtsK mit Fe, αKG und 2-Ethylhexylsulfat zur Verdeutlichung der Atomnomenklatur.

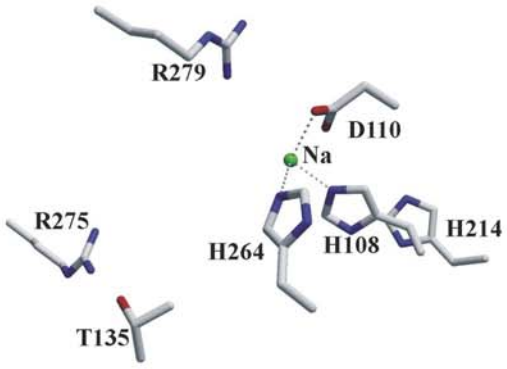
Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung der im folgenden beschriebenen Strukturen mit den wichtigsten, Besonderheiten darstellenden Eigenschaften sowie den bei der Interpretation der Daten auftretenden Probleme. Abb. 20 gibt die Struktur der Eisen- und Kosubstratbindestelle der in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Komplexe in einer Übersicht wieder.

Tabelle 5 Angaben zur Struktur der verschiedenen AtsK-Komplexe

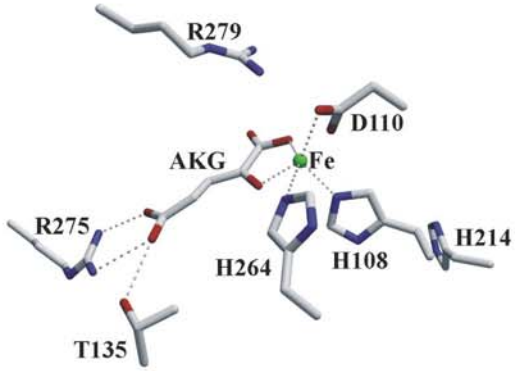
AtsK-Struktur	Besondere Eigenschaften	Probleme
apo-AtsK-Struktur	Auflösung: 1.89 Å Raumgruppe: $P2_12_12_1$ His 214 in Richtung His108 orientiert	Ligand (Citrat/Acetat ?) in Kosubstratbindestelle nicht modellierbar
Na-αKG-AtsK-Struktur	Auflösung: 2.1 Å, Raumgruppe: $P2_12_12_1$ planare αKG-Konformation Na ist fünffach koordiniert αKG-Koordination führt zum Umklappen von His214 weg von His108	
Fe-αKG-AtsK-Struktur	Auflösung: 2.05 Å, Raumgruppe: $P2_12_12_1$ nicht-planare αKG-Konformation Fe ist oktaedrisch koordiniert	Fe-Ligand-Abstände variieren stark
Na-αKG-Hexylsulfat-Struktur	Auflösung: 2.7 Å, Raumgruppe: $I2_12_12_1$ αKG koordiniert nicht über Carbonylgruppe an Fe Substratbindung führt zur Fixierung von His81	Substratmolekül nur in einem der Monomeren und mit reduzierter Besetzung zu modellieren
Fe-αKG-2-Ethylhexylsulfat-AtsK-Struktur	Auflösung: 2.05 Å, Raumgruppe: $I2_12_12_1$ Eisen ist fünffach koordiniert	beide Enantiomere des Substrates koorinieren an das Protein, so dass die Lage von C2 schlecht definiert ist
Fe-αKG-Hexylsulfat-AtsK-Struktur	Auflösung: 2.25 Å, Raumgruppe: $I2_12_12_1$ Koordination von Hexylsulfat ist wahrscheinlich	Sulfatester kann nicht in Elektronendichte an Substrat-bindestelle eingebaut werden
Fe-αKG-Butylsulfat-AtsK-Struktur	Auflösung: 2.07 Å, Raumgruppe: $P2_12_12_1$ Butylsulfat bindet nicht an AtsK	
Fe-αKG-Heptyl-sulfonat-Struktur	Auflösung: 3.1 Å, Raumgruppe: $I2_12_12_1$ Heptylsulfonat koordiniert an die Sulfatbindestelle	positive Differenzelektronendichte in der Umgebung des Sulfonates kann nicht interpretiert werden, sie ist vermutlich Resultat der Koordination durch einen oder mehrere der flexiblen *loops*
Na-Succinat-AtsK-Struktur	Auflösung: 2.15 Å, Raumgruppe: $P2_12_12_1$ His214 in Richtung His108 orientiert	

Fortsetzung Angaben zur Struktur der verschiedenen AtsK-Komplexe

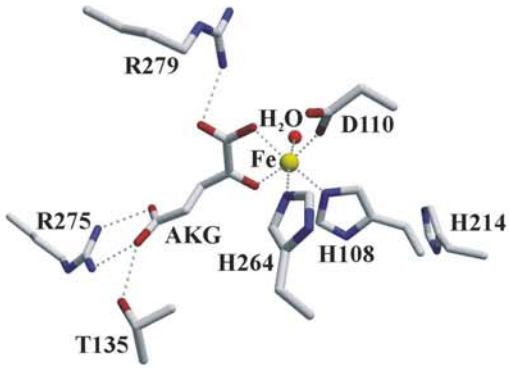
AtsK-Struktur	Besondere Eigenschaften	Probleme
Fe-Succinat-AtsK-Struktur	Auflösung: 2.15 Å, Raumgruppe: $P2_12_12_1$ Tyr168 koordiniert an das Eisen Tyr166-Ala169 sind sichtbar (vorher Teil des flexiblen *loops* zwischen Glu165 und Tyr191)	
Na-Succinat-Hexylsulfat-AtsK-Struktur	Auflösung: 3.1 Å, Raumgruppe: $I2_12_12_1$	Hexylsulfatmoldekül nur in Monomer A und mit verminderter Besetzung modellierbar
Na-Succinat-Butylsulfat-AtsK-Struktur	Auflösung: 3.3 Å, Raumgruppe: $P2_12_12_1$ Butylsulfat bindet nicht an AtsK	
Fe-Succinat-Hexylsulfat-AtsK-Struktur	Auflösung: 3.3 Å, Raumgruppe: $P2_12_12_1$ Tyr168 koordiniert an Fe	möglicherweise liegt eine Fehlordnung zwischen dem Hexylsulfat-Komplex und der Tyr-Koordination vor
αKG-Decarboxy-lierung (P_i-Puffer)	Auflösung: 2.9 Å, Raumgruppe: $P2_12_12_1$ Phosphapuffer verdrängt αKG aus Bindestelle	
αKG-Decarboxy-lierung (P_i-Puffer & VitC)	Auflösung: 2.6 Å, Raumgruppe: $P2_12_12_1$ kein VitC an AtsK gebunden	
αKG-Decarboxy-lierung (ohne Puffer)	Auflösung: 3.7 Å, Raumgruppe: $I2_12_12_1$	Auflösung zu niedrig zur Modellierung von Liganden im Bereich der aktiven Tasche
αKG-Decarboxy-lierung (αKG-Puffer)	Auflösung: 2.6 Å, Raumgruppe: $I2_12_12_1$	Inhalt der aktiven Tasche kann nicht eindeutig. Mögliche Liganden: a) Succinat und Carbonat b) Fehlordnung zwischen αKG und Succinat c) Lagefehlordung von αKG



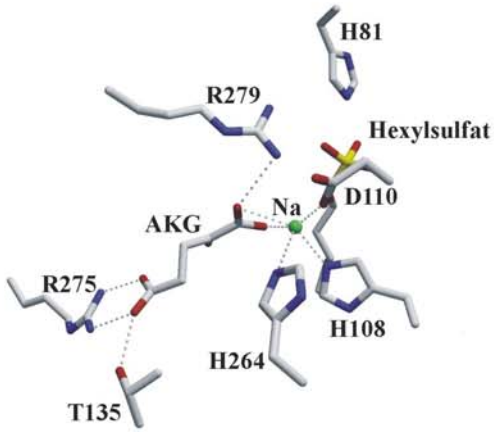
apo-AtsK



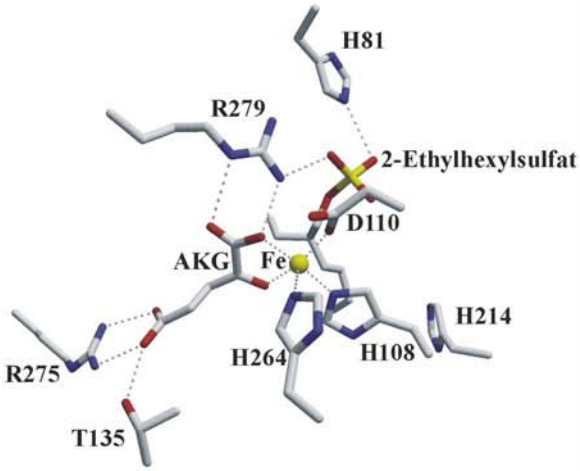
Na-αKG-AtsK-Komplex



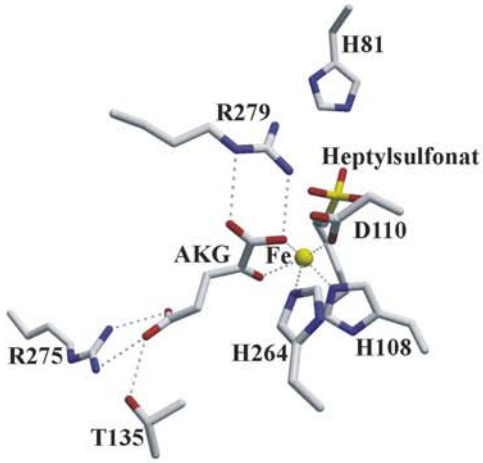
Fe-αKG-AtsK-Komplex



Na-αKG-Hexylsulfat-AtsK-Komplex

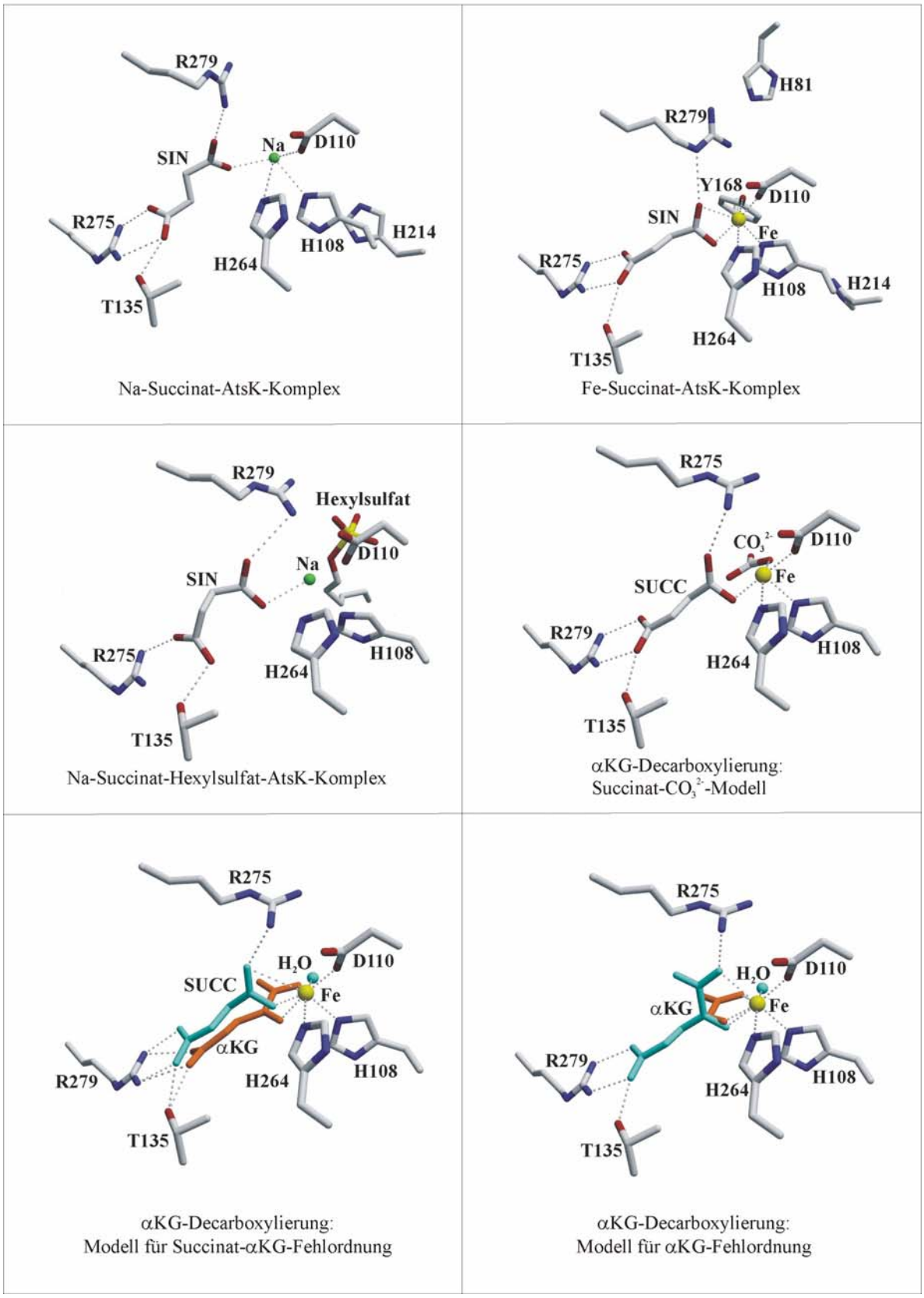


Fe-αKG-2-Ethylhexylsulfat-AtsK-Komplex



Fe-αKG-Heptylsulfonat-AtsK-Komplex

Abb. 20 Darstellung der Struktur der aktive Tasche der nachfolgend beschriebenen AtsK-Komplexe.



Fortsetzung Abb. 20 Darstellung der Struktur der aktive Tasche der nachfolgend beschriebenen AtsK-Komplexe.

5.2.1 *apo*-AtsK

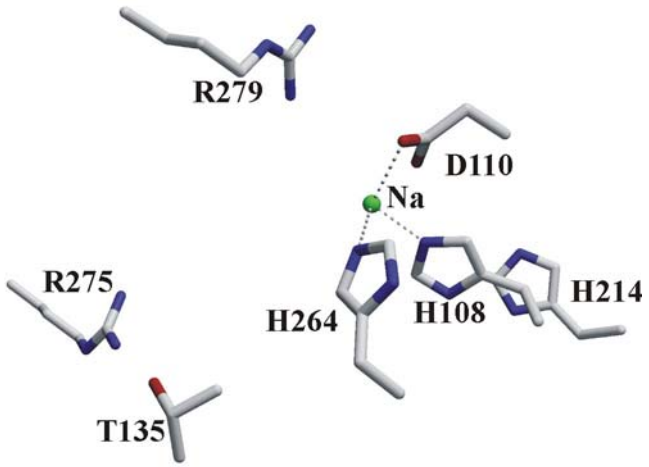


Abb. 21 Struktur der Fe- und αKG-Bindestelle der *apo*-Form der AtsK. Die Eisenbindestelle ist mit Na besetzt, ein Ligand für die Kosubstratbindestelle konnte nicht modelliert werden.

Kristalle der *apo*-Atsk wurden aus einer Proteinprobe erhalten, die in Abwesenheit von Eisen exprimiert und aufgereinigt worden war. Sie liegen in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ vor und die Daten umfassen einen Auflösungsbereich von 20-1.89 Å. Im Vergleich mit den Strukturen anderer αKG-abhängiger Dioxygenasen und mit Hilfe der biochemischen Vorarbeiten konnte die Lage zwischen den Aminosäureseitenketten von His108, Asp110 und His264 als Eisenbindungsstelle identifiziert werden. An dieser Stelle lag positive Differenzelektronendichte vor, in die aufgrund der Abwesenheit von Eisenionen in der Lösung ein Wassermolekül eingefügt wurde. Die Abstände der verfeinerten Lage zu den koordinierenden Proteinatomen variierten zwischen den einzelnen Monomeren stark und es wurden Werte zwischen 2.2 und 3.1 Å gefunden, wobei der Mittelwert für die Histidinkoordination bei je 2.6 Å und die Aspartatkoordination bei 2.4 Å lag (vergleiche hierzu Tabelle 6). Der Vergleich mit typischen Wasserstoffbrücken, die in der Regel um 2.8 Å lang sind und die zigarrenförmige Elektronendichte um das Wassermolekül legten nahe, dass statt des Wassermoleküls in einigen Fällen ein Metallkation an die Eisenbindestelle koordiniert. Das einzige in der Kristallisationslösung vorhandenen Metallion war Natrium. Eine Besetzungsfehlordnung zwischen Wasser und Natrium ließ sich jedoch nicht zufriedenstellend modellieren. Daher wurde an dieser Stelle nur ein teilbesetztes (50-70%) Natriumatom in das Modell eingefügt (siehe Abb. 21), was den gefundenen Bindungslängen besser Rechnung trägt, eine Koordination von Wasser an die Eisenbindestelle aber nicht ausschließen soll.

Tabelle 6 Na-Proteinabstände in den vier unabhängigen Monomeren der *apo*-AtsK-Struktur.

apo-AtsK	His108(Nε2)-Na (Å)	Asp110(Oδ1)-Na (Å)	His264(Nε2)-Na (Å)
Monomer A	2.60	2.24	2.27
Monomer B	2.84	2.35	2.19
Monomer C	2.63	2.76	3.11
Monomer D	2.37	2.27	2.65

Ein vollbesetztes Wassermolekül an dieser Stelle wurde in der Kristallstruktur der *apo*–DAOCS (VALEGÅRD, 1998) modelliert, was mit den deutlich längeren Abstände zu den Proteinseitenketten übereinstimmt (His183-H_2O 4.4 Å, Asp185-H_2O 2.3 Å und His243-H_2O 3.3Å).

Weitere positive Differenzelektronendichte wurde zwischen der Eisenbindestelle und Arg275 an der Unterseite der aktiven Tasche gefunden (siehe Abb. 22).

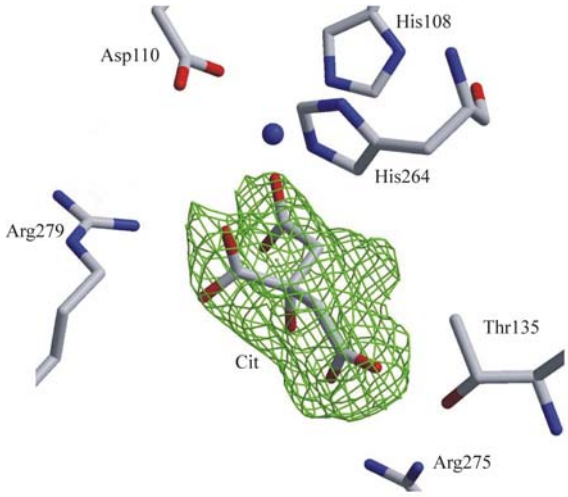


Abb. 22 Differenzelektronendichte F_o-F_c (konturiert bei 2.5 σ) in der aktiven Tasche zwischen der His-X-Asp-X_n-His-Eisenbindestelle und der Unterseite der aktiven Tasche im Monomer B der *apo*-AtsK-Struktur. Das Citratmolekül wurde manuell in die Elektronendichte eingefügt.

Die Form der Elektronendichte deutet auf eine Koordination von Carboxylatgruppen an die Argininseitenkette Arg275 sowie an das Natriumatom hin. Da sowohl Citrat- als auch Acetationen in der Kristallisationslösung vorhanden waren, handelt es sich vermutlich um eine lose Koordination durch diese Additive in unterschiedlichen Anteilen, denn eine Modellierung allein von Citrat an dieser Stelle konnte die Güte des Modells nicht verbessern.

5.2.2 Na-αKG-AtsK-Komplex

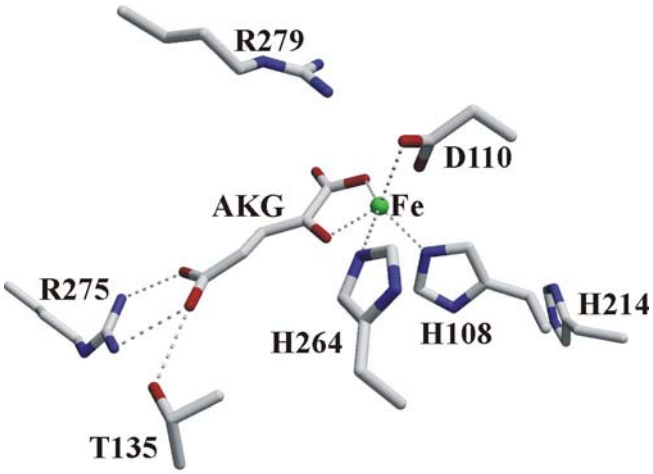


Abb. 23 Struktur der Fe- und αKG-Bindestelle im Na-αKG-AtsK-Komplex. Die Eisenbindestelle ist mit Na besetzt, das Kosubstratmolekül lagert sich mit einer annähernd planaren Konformation an das Metallion und das Protein an.

Die Kristalle des Na-αKG-AtsK-Komplexes liegen in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ vor und die Auflösung der Daten liegt bei 2.1 Å. Die Kristallstruktur zeigt, dass es sich bei der oben beschriebenen Tasche zwischen dem Metallion und der Seitenkette von Arg275 um die Kosubstratbindestelle handelt (siehe Abb. 23). Die α-Ketoglutarsäure koordiniert mit ihrem Oxocarboxylatende über AKG(O2) und AKG(O5) an das Metallion, bei dem es sich wie in der *apo*-AtsK-Struktur ebenfalls um ein Natriumatom handelt, wie vergleichbare Bindungslängen (nicht gezeigt) bestätigen. In der oktaedrischen Koordinationssphäre des Natriums orientiert sich die αKG dabei so, dass ihre Carboxylgruppe trans-ständig zu His264 und die Carbonylgruppe gegenüber Asp110 zu liegen kommt. Dabei bleibt die sechste Koordinationstelle gegenüber His108 frei. Nur in Monomer B konnte an dieser Stelle geringe positive Differenzelektronendichte gefunden werden (siehe Abb. 24). Die Abwesenheit eines sechsten Liganden könnte dadurch erklärt werden, dass es aufgrund der reduzierten Ladung im Vergleich zu Fe(II) zu einer Akkumulation von negativer Ladung am Natriumatom und damit nicht zur Bindung von Wasser kommt. Dies wird auch durch die Form des Differenzelektronendichtemaxima am Natrium in Monomer B nahegelegt, die eher der einer Carboxylgruppe ähnelt.

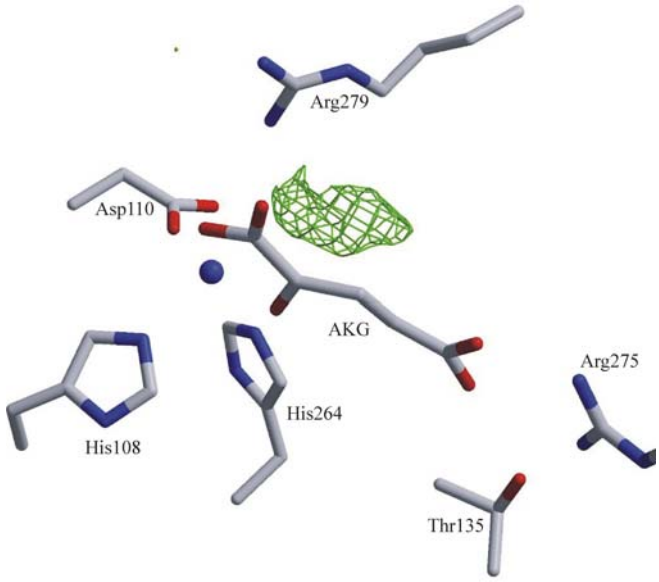


Abb. 24 Ausschnitt aus der aktiven Tasche der Na-αKG-AtsK-Struktur mit der Differenzelektronendichte F_o-F_c (konturiert bei 2.5σ) für die zweite Lage der α-Carboxylgruppe der αKG.

Es handelt sich dabei vermutlich um ein Resultat einer Fehlordnung der an das Natrium koordinierenden Carboxylgruppe der αKG, deren Auslenkungsparameter höher als die der übrigen Atome der αKG sind. Diese Fehlordnung scheint in den anderen Monomeren weniger stark ausgeprägt zu sein und führt dort nur zu einer verzerrten Elektronendichte an den Natriumpositionen; modelliert werden konnte diese Fehlordnung aber in keinem Fall.

An der Unterseite der aktiven Tasche bildet die αKG über AKG(O3) und AKG(O4) eine Salzbrücke zu Arg275 und über AKG(O3) eine Wasserstoffbrücke zu Thr135 (Oγ1) aus. Dies führt zu einer quasiplanaren Konformation des Kosubstratmoleküls. Die Besetzungen der Natrium- und Kosubstratpositionen variieren zwischen 70 und 100%, bei der Verfeinerung wurden sie in den einzelnen Monomeren gleich gesetzt.

Das dem an das Eisen koordinierende His108 benachbarte His214 am Rand der aktiven Tasche reagiert auf die Koordination durch αKG mit einer Änderung der Seitenkettenlage, obwohl der Abstand zwischen der αKG und His214 mit 6.7 Å zur ursprünglichen und 9 Å zur neuen Lage zu groß für eine direkte Interaktion ist. Andere Aminosäureseitenketten oder koordinierende Wassermoleküle, die als Mediatoren zwischen His214 und der αKG eine indirekte Wechselwirkung ermöglichten, sind nicht im Modell enthalten. Eine Einbeziehung der fehlenden *loops* in eine entsprechende Interaktion kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Durch die Neuorientierung von His214 entsteht eine hydrophobe Tasche, die unspezifisch genug ist, um, gemäß dem breiten Substratspektrum, eine Reihe unterschiedlich langer aliphatischer Seitenketten verschiedener Sulfatestern einzubetten.

5.2.3 Fe-αKG-AtsK-Komplex

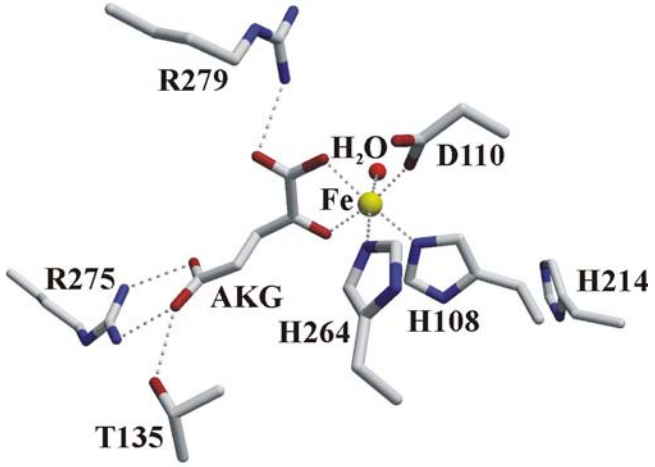


Abb. 25 Struktur der Fe- und αKG-Bindestelle des Fe-αKG-AtsK-Komplexes. Die Eisenbindestelle ist mit Fe besetzt, die Konformation des Kosubstratmoleküls hat sich gegenüber der im Na-αKG-Atsk-Komplex geändert. Als sechster Ligand koordiniert ein Wassermolekül an das Eisenion.

Dieser Komplex wurde durch anaerobes Tränken von in Gegenwart von αKG gewachsenen Kristallen in einer Fe(II)-Lösung hergestellt. Die Kristalle liegen in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ vor und die Daten reichen bis zu einer Auflösung von 2.05 Å. Wie zuvor das Natriumatom wird hier das Eisenatom von His108(Nε2), Asp110(Oδ1) und His264(Nε2) koordiniert (siehe Abb. 25). Diese Aminosäuren ändern ihre Lage durch den Austausch des Kations kaum. Die Bindungen zum Eisen verkürzen sich im Vergleich mit denen zum Natrium um durchschnittlich etwa 0.2 Å und liegen bei Werten zwischen 1.9 und 2.5 Å (nicht gezeigt). Die αKG koordiniert auch hier über das Carboxyl- und das Carbonylsauerstoffatom (AKG(O2) und AKG(O5)) an das Eisen. Die sechste Position der oktaedrischen Koordinationssphäre des Eisens ist durch ein Wassermolekül besetzt.

Der Unterschied zum Na-αKG-AtsK-Komplex besteht in der Konformation der αKG. Die Carboxylgruppe am Eisen ist um 90° gedreht und die αKG besitzt keine planare Anordnung mehr. Durch die Konformationsänderung ist die αKG in der Lage, neben den auch im Na-Komplex gefundenen, eine weitere Wasserstoffbrücke über das Carboxylsauerstoffatom AKG(O1) mit Arg279(Nχ2) auszubilden. Die Position der Carboxylgruppe in der Eisenkoordinationssphäre befindet sich nun gegenüber His108. An dieser Stelle deutet im Na-αKG-AtsK-Komplex Differenzelektronendichte auf eine minderbesetzte zweite Lage der αKG

hin. Die Koordinationsstelle der im Natriumkomplex dazugehörigen ersten Lage der αKG gegenüber His264 wird im Fe-Komplex von einem Wassermolekül besetzt.

His214 ist wie in der eisenfreien Struktur so angeordnet, dass eine hydrophobe Tasche in der Nähe der Eisenkoordinationsstelle entsteht. Das manifestiert Untersuchungen (HOLME, 1975), wonach bei αKG-abhängigen Dioxygenasen die Kosubstratbindung der Substratbindung vorausgeht und – wie hier für den Fall der AtsK gezeigt – die Substratbindung möglicherweise vorbereitet.

5.2.4 Na-αKG-Hexylsulfat-Komplex

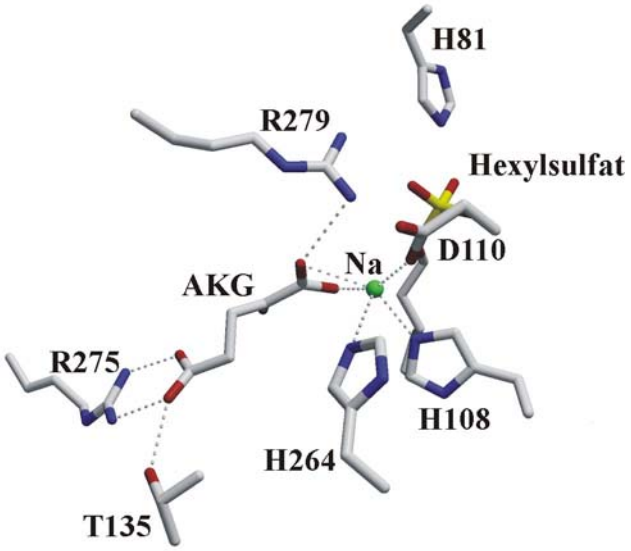


Abb. 26 Struktur der Fe- und αKG-Bindestelle im Na-αKG-Substrat-AtsK-Komplex. Die Eisenbindestelle ist mit Na besetzt, das Kosubstratmolekül lagert sich anders als im Na-αKG-AtsK- oder Fe-αKG-AtsK-Komplex nur mit einem Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe an AKG(C1) an das Metallion an. In der Verlängerung der sechsten Koordinationsstelle gegenüber His264 lagert sich das Substratmolekül an.

Bei dem Na-αKG-Hexylsulfat-Komplex handelt es sich um einen durch Kokristallisation von AtsK mit αKG und Hexyl-1-sulfat erhaltenen Komplex, der in der Raumgruppe $I2_12_12_1$ vorliegt. Die Erhöhung der Symmetrie reduziert die Zahl der unabhängigen Kopien der AtsK im Kristall von vier auf zwei. Obwohl die Güte der Elektronendichte in der aktiven Tasche durch die geringe Auflösung der Daten von nur 2.7 Å begrenzt ist, kann man die Lage der Sulfatgruppe des Substrates im Monomer A gut erkennen (siehe Abb. 27). Die Verfeinerung der Struktur mit einem Wassermolekül an dieser Stelle lieferte für das Sauerstoffatom im Vergleich mit den Proteinatomen viel zu geringe Auslenkungsparameter, die für die Hexylsulfatatome hingegen sind mit den übrigen vergleichbar, wenn man von einer Besetzung der Substratposition von

60% ausgeht. Die Lage des aliphatischen Restes konnte mit Hilfe der σA-Elektronendichtekarte bestimmt werden. Im zweiten Monomer ist die Besetzung der Lage so gering, dass ein Substratmolekül an dieser Stelle nicht in das Modell einbezogen wurde.

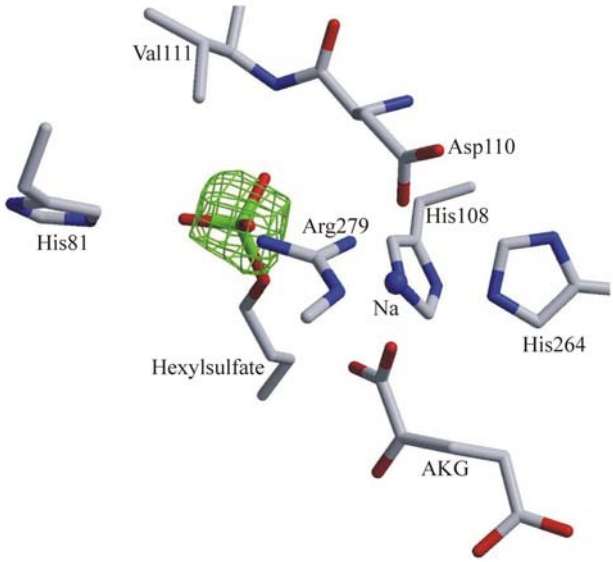


Abb. 27 Ausschnitt aus der aktiven Tasche der Na-αKG-Hexylsulfat-AtsK-Struktur. Differenzelektronendichte F_o-F_c (konturiert bei 2.5 σ) für das Modell ohne Substrat ist nur für die Sulfatgruppe des Substrates zu erkennen.

In der Eisenbindestelle befindet sich auch in dieser Struktur ein Natriumatom, an welches die αKG koordiniert (siehe Abb. 26). Die Anwesenheit von Substrat im Kristall führt, verglichen mit dem substratfreien Na-αKG-AtsK-Komplex, in beiden Monomeren zu einer Änderung der αKG-Konformation, die der im Fe-αKG-AtsK-Komplex entspricht. Aufgrund der reduzierten Besetzung der Substratlage wurde auch die Besetzung der dazugehörigen αKG-Konformation auf 60% vermindert. Die zweite Lage der αKG, die der im Na-αKG-AtsK-Komplex entspricht, kann nicht modelliert werden. Gut definiert ist die Lage der Carboxylgruppe des Kosubstratmoleküls, die an der Unterseite der aktiven Tasche an Arg275 und Thr135 koordiniert. Weiterhin klar erkennbar ist, dass die α-Carboxylgruppe der αKG nicht mehr wie im Na-αKG-AtsK-Komplex über eines der Sauerstoffatome aus der Position gegenüber His264, sondern über beide Sauerstoffatome jeweils trans-ständig zu His108 und Asp110 an das Natriumatom koordiniert. Die neue Orientierung der αKG erlaubt die Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken zu Arg279 durch AKG(O1) an Arg279(Nχ1) und Arg279(Nε). Das im Na-αKG-AtsK-Komplex gegenüber Asp110 an das Natriumatom angelagerte Carbonylsauerstoffatom der αKG ist hier aus der Koordinationssphäre des Natriumatoms verdrängt. Die Carbonylgruppe bildet keine alternativen Wasserstoffbrücken zum Protein oder zu Wassermolekülen aus. Die durch die damit einhergehende Beweglichkeit des mittleren Teils

der αKG nicht fixierte Molekülkonformation ist der Grund für eine nur schemenhaften Elektronendichte in diesem Bereich.

Die freie Koordinationsstelle am Natrium gegenüber His264 bleibt unbesetzt und in ihrer Verlängerung lagert sich das Substratmolekül mit dem verbrückenden Sauerstoffatom O1 als dem Natrium nächstes Substratatom in einem Abstand von 3.7 Å an. Damit ist das zu oxidierende Kohlenstoffatom C2 des Substratmoleküls 4.8 Å von der Eisenbindestelle entfernt. Weiterhin bildet das Substratmolekül über die endständigen Sauerstoffatome Wasserstoffbrücken mit His81(Nε2), Val111(N) und Arg279(Nχ2) aus. His81 wird in dieser Struktur erstmals als Teil des flexiblen *loops* zwischen Ala80 und Pro85 in der Elektronendichtekarte erkennbar, die übrigen Aminosäuren des *loops* lassen sich nicht modellieren. Arg279 ändert für die Substratbindung und die αKG-Koordination seine Seitenkettenkonformation leicht, die Position der Hauptkette um Val111 bleibt völlig unverändert.

Der aliphatische n-Hexylrest des Substrates ragt in Richtung der Tasche, die, wie im Fall des Na-αKG-AtsK-Komplexes beschrieben, durch die Umorientierung der Seitenkette von His214 infolge der Kosubstratbindung zwischen His108 und His214 entstanden. Allerdings ist die Lage der Seitenkette von His214 hier nicht zu erkennen, was ebenfalls auf die nicht voll besetzte Substratlage zurückzuführen ist. Eine Orientierung der Seitenkette entsprechend der in der *apo*-Struktur, also in Richtung der Seitenkette von His108, kann für den hier beschriebenen Na-αKG-Hexylsulfat-Komplex ausgeschlossen werden, da dann die Van-der-Waals-Radien der Seitenketten- und Substratatome überlappen würden.

5.2.5 Fe-αKG-Substrat-AtsK-Komplexe

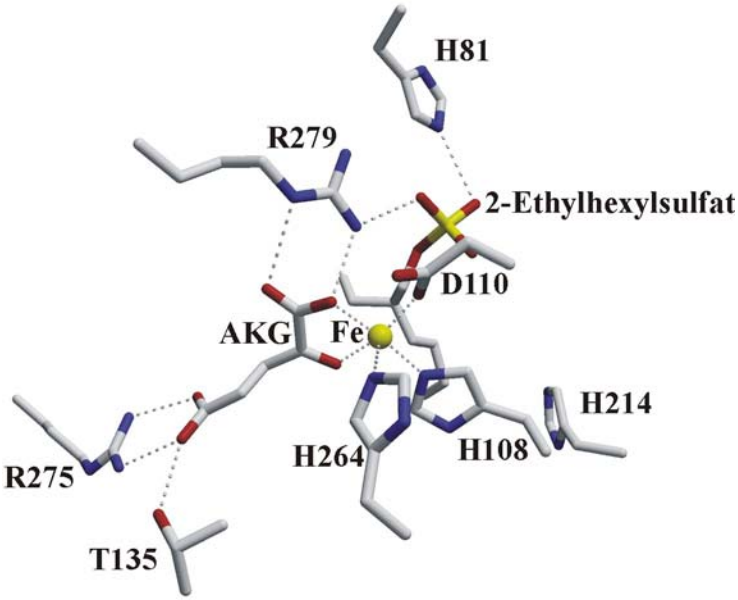


Abb. 28 Struktur der Fe- und αKG-Bindestelle im Fe-αKG-2-Ethylhexylsulfat-AtsK-Komplex. Die Eisenbindestelle ist mit Fe besetzt, das Kosubstratmolekül lagert sich in der gleichen Konformation wie im Fe-αKG-AtsK-Komplex an das Metallion an. In der Verlängerung der sechsten Koordinationsstelle gegenüber His264 befindet sich wie im Na-αKG-Substrat-Komplex das Substratmolekül. Es koordiniert jedoch nicht direkt an das Eisen. In trans-Position zu His264 ist im Fe-αKG-AtsK-Komplex ein Wassermolekül an das Eisen koordiniert. Hier bleibt das Metall koordinativ ungesättigt.

Für die AtsK sind mehrere Strukturen von potentiellen Fe-αKG-Substratkomplexen untersucht worden. Es wurden die Substrate 2-Ethyl-1-hexylsulfat, 1-Hexylsulfat und 1-Butylsulfat eingesetzt und Datensätze unterschiedlicher Qualität erhalten (siehe Tabelle 5). Der Kristall, der in einer 2 mM 1-Butylsulfat-Lösung getränkt worden war, lag anders als die übrigen Kristalle in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ statt $I2_12_12_1$ vor. Hier nicht gezeigt sind Daten einer Messung von in Gegenwart von αKG und 1-Butylsulfat gewachsenen Kristallen ($P2_12_12_1$, Auflösung: 2.9 Å) und die kristallographischen Daten einer Messung des Fe-αKG-Hexylsulfat-Komplexes bei Cu-K_α-Wellenlänge ($I2_12_12_1$, Auflösung: 3.1 Å). Die Struktur der in Gegenwart von Butylsulfat gewachsenen Kristallen liefert die gleichen Ergebnisse wie die der mit Butylsulfat getränkten Kristalle. Im Falle des 2-Ethyl-1-hexylsulfat-Komplexes ist eine eindeutige Interpretation der Elektronendichtekarte in der aktiven Tasche möglich und ausgehend davon soll die Substratbindung beschrieben werden. Die Elektronendichtekarte der übrigen Komplexe lassen eine Interpretation nur soweit zu, dass im Falle des 1-Butylsulfat-Experimentes eine Substratbindung ausgeschlossen werden kann und dass sich das Modell für den 2-Ethyl-1-hexylsulfat-Komplex und die Elektronendichtekarte des 1-Hexylsulfat-Komplexes im Bereich

der Substratbindestelle überlagern (siehe Abb. 29, links), die Verfeinerung des Substrats aber keine befriedigenden Ergebnisse liefert.

Tabelle 7 Daten zu den untersuchten Fe-αKG-Substrat-Komplexen der AtsK. Alle Datensätze wurden an der Strahlquelle X11 des DORIS-Speicherings an der EMBL-Außenstelle in Hamburg gesammelt.

Substrat:	2-Ethyl-1-hexylsulfat	1-Hexylsulfat	1-Butylsulfat
Auflösung	25-2.05	25-2.25	25-2.07
Zelle [Å]	a=72.03 b=141.89 c=161.72	a=71.98 b=142.06 c=161.35	a=71.87 b=145.67 c=157.56
Raumgruppe	$I2_12_12_1$	$I2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Zahl der gemessenen Reflexe	270566	178328	526475
Zahl der unabhängigen Reflexe	51154	39451	101060
Vollständigkeit der Daten äußere Auflösungsschale	99.1 % 97.0 % (2.15-2.06)	99.9 % 99.4 % (2.35-2.25)	99.9 % 99.5 % (2.20-2.07)
R_{merge} äußere Auflösungsschale	0.057 0.321	0.052 0.621	0.049 0.285
mittleres I/sigma(I) äußere Auflösungsschale	13.5 4.34	16.0 2.0	21.9 3.5

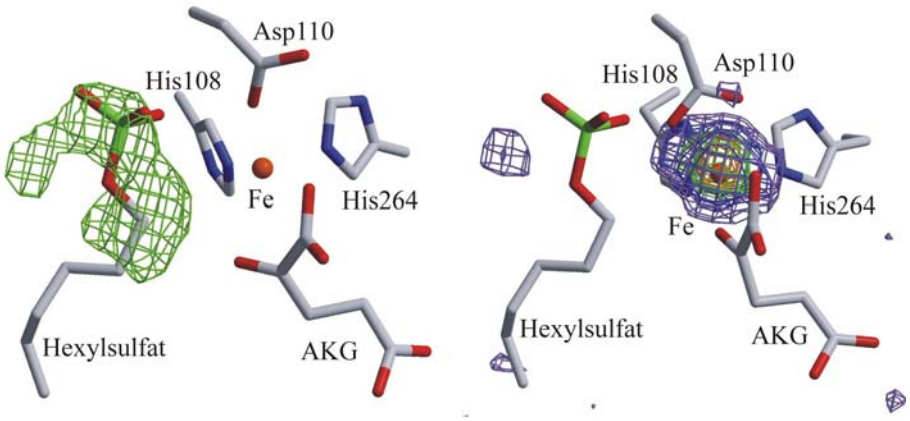


Abb. 29 links: Differenzelektronendichte F_o-F_c (konturiert bei 2.5σ) und das Proteinmodell für den potentiellen 1-Hexylsulfatkomplex für den am Synchrotron gemessenen Datensatz. Das Hexylsulfatmolekül wurde entsprechend der Lage des Substratmoleküls im 2-Ethylhexylsulfatkomplex positioniert. rechts: Der anomalen Elektronendichtekarte (Konturlevel: 2σ (hellblau), 3σ (blau), 4σ (grün) und 5σ (orange)) des mit Cu-K_α-Stahlung gemessenen Datensatzes ist die Lage des Eisenatoms, nicht aber die des Schwefelatoms zu entnehmen.

Es wurde daher versucht, die Anwesenheit von Substrat über die anomale Streuung von Schwefel nachzuweisen. Dazu wurde der bei Cu-K_α-Wellenlänge gemessene Datensatz verwendet (siehe Abb. 30). Die Redundanz der Daten lag bei 4.5 (Friedelpaare gemittelt). Das anomale Signal von Schwefel beträgt bei dieser Wellenlänge 0.56 Elektronen, was die Intensität

der gemessenen Reflexe um etwa 1% ändert. Das erklärt, warum in der anomalen Elektronendichtekarten, die aus den anomalen Differenzen und den um 90° gedrehten Phasen des finalen Modells der Struktur berechnet wurde, kein Schwefelsignal gefunden werden kann. Auch wenn die Bindung von Hexylsulfat damit nicht nachgewiesen werden kann, kann sie umgekehrt aber auch nicht ausgeschlossen werden.

```
Estimation of SAS delta-F values
Local scaling employed with radius of 0.1572 reciprocal Angstroms

Anomalous signal/noise ratios (1.0 is random).  The first line is based on
input sigmas, the second on variances of F+ and F-:

 Inf - 8.0 - 6.0 - 5.0 - 4.7 - 4.5 - 4.3 - 4.1 - 3.9 - 3.7 - 3.5 - 3.3 - 3.1 A

    1.58  1.34  1.31  1.21  1.29  1.18  1.25  1.31  1.28  1.30  1.29  1.25
    2.38  1.51  1.34  1.25  1.29  1.22  1.20  1.32  1.25  1.23  1.18  1.15

    37.8  Neighbors used on average for F+/F- local scaling
 Rint(anom) =   0.0740  before and   0.0758  after local scaling
```

Abb. 30 Ausschnitt aus der Protokoll-Datei des Programms XPREP: Die anomalen Differenzen sind im gesamten Auflösungsbereich zu erkennen; das Verhältnis von Signal zum Rauschen ist jedoch nur in der niedrigsten Auflösungsschale stark ausgeprägt, aber bis 3.5 Å nutzbar.

Die 2-Ethyl-1-hexylsulfat-Bindung erfolgt wie in der entsprechenden eisenfreien Na-αKG-Hexylsulfat-Struktur über die terminalen Sauerstoffatome des Sulfatesters an His81(Nε2), Val111(N) und Arg279(Nχ2) (siehe Abb. 31).

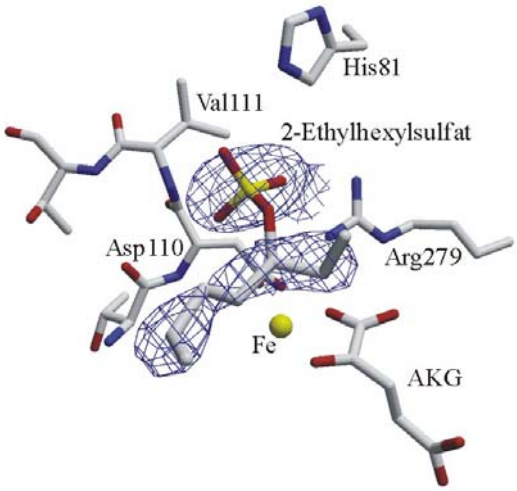


Abb. 31 Substratbindestelle im Fe-αKG-2-Ethylhexylsulfat-AtsK-Komplex mit σA-Elektronenedichtekarte (konturiert bei 1σ).

Die Sulfatgruppe ist hier aber verglichen mit der Lage im eisenfreien Komplex so um 0.7 Å vom Eisen weg verschoben, dass nicht mehr das verbrückende Sauerstoffatom O1 des Substrats sondern das zu oxidierende Kohlenstoffatom C2 dem Metall mit einem Abstand von 3.4 Å am

nächsten ist. Obwohl das Substrat auch hier nicht direkt an das Eisen koordiniert, verändert sich die Umgebung des Eisens verglichen mit der im Fe-αKG-AtsK-Komplex. Die Anlagerung des Substratmoleküls von der gegenüber His264 liegenden Seite verdrängt das in der Fe-αKG-AtsK-Struktur an dieser Stelle koordinierende Wassermolekül. Der Raum zwischen Substrat und Eisen ist zu klein, um darin ein Wassermolekül anzulagern, wenngleich eine leichte Veränderung der Substratposition zum Zwecke der Wasserbindung möglich wäre. Vermutlich vermindert das Wassermolekül im Fe-αKG-Komplex durch die Absättigung der oktaedrischen Koordination des Metalls die Affinität des Eisens zu molekularem Sauerstoff. Damit schützt es das Molekül vor unerwünschten Nebenreaktionen wie der von der Substratbindung abgekoppelten Oxidation des Kosubstratmoleküls und ihren Folgereaktionen durch reaktive Intermediate. Umgekehrt erhöht die Fünffachkoordination des Eisens dessen Affinität zu Sauerstoff. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die sechste Koordinationsstelle nicht in allen untersuchten Substratkomplexen anderer αKG-abhängiger Dioxygenasen unbesetzt blieb und an der entsprechenden Stelle ein Wassermolekül modelliert wurde (siehe Kapitel 5.4).

Untersucht man die durch die Substratbindung hervorgerufenen strukturellen Änderungen am Enzym, stellt man wie auch bei der αKG-Substrat-Struktur fest, dass sich die Position der Hauptkette um Val111 bei der Substratbindung nicht ändert und lediglich ein an Val111(N) koordinierendes Wassermolekül durch das Substrat verdrängt wird. Für die Substratbindung ändert Arg279 seine Seitenkettenkonformation leicht. Die an das Substrat koordinierende Aminosäure His81 ist in den substratfreien Strukturen als Teil eines flexiblen *loops* (His81-Val84) nicht in der Elektronendichtekarte erkennbar und seine Lage hat sich, verglichen mit der Position im eisenfreien αKG-Substratkomplex, mit 1.1 Å deutlich stärker als die des Substrates verschoben. Die übrigen Aminosäuren des *loops* zwischen His81 und Pro85 und die Aminosäuren zwischen Asp97 und Arg103 sowie Glu165 und Tyr191 sind auch in dieser Struktur nicht modellierbar. Allerdings wird nahe des verbrückenden Sauerstoffatoms im Substratmolekül eine auf eine Carboxylgruppe hindeutende Differenzelektronendichte sichtbar, die in der αKG-Substrat-Struktur nicht zu erkennen ist. Eine entsprechende Proteinseitenkette könnte aus dem langen fehlenden *loop* zwischen Glu165 und Tyr191 stammen, lässt sich jedoch nicht modellieren. Eine nur schwache Koordination an dieses vierte Sauerstoffatom des Substrates könnte gleichzeitig verhindern, dass Sulfat, welches bei der Katalyse gebildet wird und bei der Kristallisation in Konzentrationen von bis zu 75 mM eingesetzt wurde, fest an die aktive Tasche bindet und diese blockiert.

Der verzweigte aliphatische Rest des Substrats lagert sich in der hydrophoben Tasche an, die durch das Umklappen der Seitenkette von His214 auch in den übrigen αKG-haltigen Strukturen gebildet wurde. Bei dem 2-Ethyl-1-hexylsulfat handelt es sich um ein chirales Molekül, das im

Experiment in racemischer Form eingesetzt worden war. Dass das Enzym nicht zwischen den beiden Enantiomeren unterscheidet, ist an den hohen B-Werten für das chirale Zentrum C2 zu erkennen. Dieser Befund entspricht der Tatsache, dass das Enzym eine breite Vielfalt von Sulfatestern spaltet.

Die durch die Substratkoordination gegenüber der substratfreien Struktur veränderte Konformation der Arg279-Seitenkette führt dazu, dass Arg279 neben der Wasserstoffbrücke zum Substrat zwei Wasserstoffbrücken zwischen Arg279(Nχ2) und AKG(O2) sowie Arg279(Nε) und AKG(O1) zum Kosubstrat ausbilden kann. Diese stärkere Bindung an die αKG könnte den initialen Schritt der Katalyse, die Decarboxylierung des Kosubstrates, unterstützen. Gleichzeitig mit Arg279 ändert Thr281 seine Konformation, um weiterhin eine Wasserstoffbrücke mit der Argininseitenkette ausbilden zu können. Die Konformationsänderung von Thr281 nimmt jedoch keinen Einfluss auf weitere Aminosäuren oder koordinierende Wassermoleküle.

5.2.6 Vergleich der Substrate

Das Ergebnis, dass das verzweigte 2-Ethylhexylsulfat am stärksten an den Fe-αKG-AtsK-Komplex bindet und die Affinität über das Hexylsulfat zum Butylsulfat so weit abnimmt, dass letzteres nicht in den Komplex eingeführt werden kann, ist konsistent mit den Ergebnissen kinetischer Untersuchungen, wonach 2-Ethylhexylsulfat von den betrachteten Substraten den größten K_m-Wert aufweist.

Andererseits kann zwar von n-Hexylsulfat durch Kokristallisation ein Na-αKG-Substratkomplex erhalten werden, ein analoger Komplex mit 2-Ethylhexylsulfat ist auf diese Weise aber nicht zugänglich. Grund dafür mag zum einen die Abwesenheit von Eisen sein, dessen Bindung an das Protein während der Katalyse der Substratbindung vorausgeht. Andererseits könnte es, wenn es sich bei dem verzweigten Sulfatester um ein besseres Substrat handelt, zu so starken Veränderungen an der Proteinkonformation kommen, dass der Komplex nicht mehr unter den gegebenen Bedingungen kristallisiert.

Die Möglichkeit einer größeren konformationellen Änderung am Protein bei der Substratbindung wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass sich die Kristalle beim Einsatz von Octylsulfat im Rahmen eines *soaking*-Experimentes sofort zersetzten.

5.2.7 Fe-αKG-Heptylsulfonat-Komplex

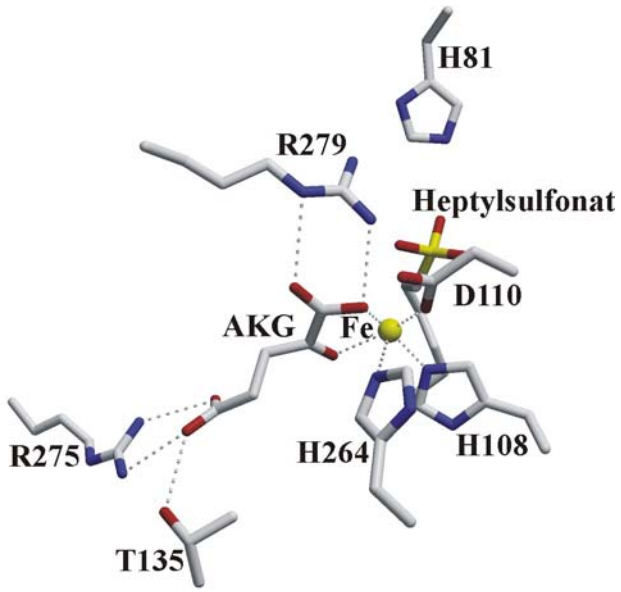


Abb. 32 Struktur der Fe- und αKG-Bindestelle im Fe-αKG-Heptylsulfonat-AtsK-Komplex. Die Eisenbindestelle ist mit Fe besetzt, das Sulfonatmolekül lagert sich ähnlich wie das Sulfatmolekül in der Fe-αKG-2-Ethylhexylsulfat-AtsK-Struktur in die aktive Tasche ein.

Ausgehend von den Sulfatkomplexen von AtsK, bei denen in die Koordination des Substrats durch das Protein vor allem die terminalen Sauerstoffatome des Sulfatesters und nur in untergeordnetem Maße das verbrückende Sauerstoffatom involviert sind, wurde vermutet, dass auch AtsK in der Lage ist, Sulfonate in der aktiven Tasche zu binden. Diese Vermutung wird durch die Struktur der Fe(II)-αKG-abhängigen Dioxygenase TauD unterstützt, in der die Koordination der Sulfonatgruppe des Substrats (2-Aminoethansulfonsäure = Taurin) die gleiche wie die der Sulfatester in den AtsK-Komplexen ist (ELKINS, 2002).

Untersuchungen hinsichtlich der Fähigkeit von AtsK, aliphatische Sulfonate nicht nur zu binden sondern auch zu spalten, waren zunächst nicht durchgeführt worden, da Versuche mit unterschiedlichen Nährmedien gezeigt hatten, dass die Alkylsulfatase AtsK in *Pseudomonas putida* S-313 in Anwesenheit von aliphatischen Sulfatestern als Schwefelquelle aufreguliert ist, in Gegenwart von aliphatischen Sulfonaten jedoch nur das Enzymsystem SsuD/SsuE verstärkt exprimiert wird. Da aber die mit AstK strukturell eng verwandte Taurinoxigenase TauD die aliphatische Sulfonatgruppe in Taurin spaltet, sind prinzipiell auch Sulfonate als Substrate für AtsK denkbar. Taurin selbst wird jedoch nicht durch AtsK in Sulfit und den Aminoaldehyd gespalten, was unter Umständen auf die Aminogruppe in Taurin zurückgeführt werden kann, die möglicherweise die für die Katalyse notwendige Orientierung des Substrates zum Eisenzentrum verhindert oder gar die Bindung an die aktive Tasche ausschließt.

Um die Fähigkeit von AtsK, Sulfonate an die aktive Tasche zu binden, zu untersuchen, wurde die Struktur eines Kristalls, der in Gegenwart von αKG gewachsen und anschließend unter anaeroben Bedingungen in einer 2.5 mM Fe(II)- und nachfolgend in einer schrittweise auf 2 mM gebrachten Heptylsulfonatlösung getränkt worden war, bis zu einer Auflösung von 3.1 Å bestimmt. Die Kristalle lagen in der Raumgruppe $I2_12_12_1$ vor. Diese Veränderung ist ein erstes Indiz für die Bindung des Heptylsulfonates an das Protein. Wie in Abb. 32 zu erkennen ist, gleicht die Anordnung der Aminosäureseitenketten im Bereich der aktiven Tasche sehr stark der im Fe-αKG-Sulfatester-Komplex. In der Tat konnte an der Sulfatbindestelle zwischen His81, Val111 und Arg279 in beiden Monomeren der asymmetrischen Einheit positive Differenzelektronendichte gefunden werden, die zu hoch für ein koordinierendes Wassermolekül, wie es in der Fe-αKG-AtsK-Struktur vorliegt, war. Es ließ sich in beiden Monomeren der asymmetrischen Einheit ein Heptylsulfonatmolekül in diese Elektronendichte einfügen. Die Besetzung der Sulfonatlage wurde im ersten Monomer auf 60% reduziert. Die Position der Sulfonatgruppe unterscheidet sich von der der Sulfatgruppe im Sulfatester-AtsK-Komplex. Das Schwefelatom des Sulfonats ist um 1.2 Å verschoben, wodurch das an den Schwefel gebundene Kohlenstoffatom das dem Eisen nächste Atom ist. Der Abstand zwischen Eisen und C1 des Sulfonats ist mit etwa 3 Å kürzer als der zwischen Fe und C1 im Sulfatesterkomplex. Durch diese Verschiebung des Substrats ändern sich auch die Lagen der an die Sulfonatgruppe koordinierenden Seitenketten von His81 und Arg279 gegenüber dem Sulfatkomplex. Die Hauptkette bleibt an der Stelle des koordinierenden Val111 aber unverändert. Ein Vergleich mit der Struktur des TauD-Taurin-Komplexes ergibt, dass die Sulfonatgruppe des Taurins weniger stark in die entsprechende Richtung verschoben ist.

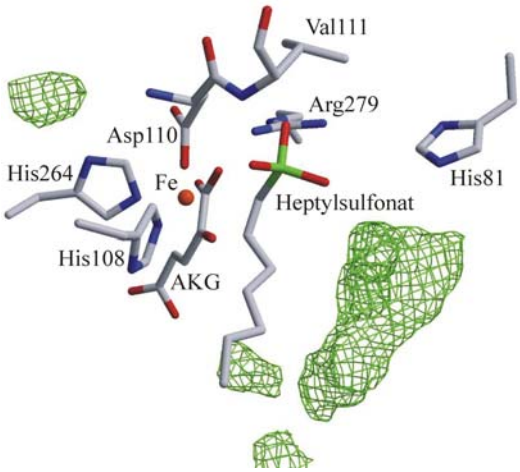


Abb. 33 Ausschnitt der aktiven Tasche des Fe-αKG-Hepltylsulfonat-AtsK-Komplexes. Nach dem Einfügen des Sulfonats in das Modell tritt weitere Differenzelektronendichte F_o-F_c (konturiert bei 2.5σ) nahe des Substrates im an den Lösemittel grenzenden Bereich auf.

Im Monomer A wurde keine weitere Differenzelektronendichte gefunden, in Monomer D trat weitere Dichte auf, die das Sulfonat gegenüber dem Lösungsmittelbereich abschirmt (siehe Abb. 33). In diesem Bereich des Proteins kommen alle drei fehlenden *loops* (80-85, 97-103, 165-191) als "Deckel" über dem Sulfonat in Frage. Es war aber nicht möglich, eine Sequenzabfolge in der Elektronendichte zu erkennen und damit einem der fehlenden *loops* die fixierende Funktion zuzuweisen.

Succinat-AtsK-Komplexe

Die oben diskutierten Komplexe stellen Zwischenstufen der enzymatischen Katalyse vor der Bindung von molekularem Sauerstoff an das Eisen und damit vor Beginn der Oxidationskaskade dar. Nachfolgend werden Succinatkomplexe erörtert, die den Katalysekomplex nach der Decarboxylierung der αKG – auch der von der Substratbindung abgekoppelten – strukturell beschreiben. Dabei muss berücksichtigt werden, dass das Succinat hier nicht während einer Enzymkatalyse im Kristall entstanden, sondern durch Kokristallisation eingeführt worden ist. Diese Komplexe müssen damit nicht zwangsläufig der Struktur der entsprechenden Katalysezwischenstufen entsprechen, vor allem, da kein Carbonat in der Lösung vorhanden und nicht bekannt ist, wann das bei der αKG-Oxidation entstehende Kohlendioxid vom Eisen wegdiffundiert. Da aber auch bei anderen Enzymen der Familie noch kein im Kristall gebildetes Intermediat beschrieben wurde, kann nur auf die Strukturen dieser künstlich erzeugten Intermediatanaloga zurückgegriffen werden. Dass die Rekonstruktion von Katalyseintermediaten der αKG-abhängigen Dioxygenasen auf diese Weise prinzipiell möglich ist, haben Untersuchungen an TauD gezeigt. Darin wurden unterschiedliche TauD-Ligand-Komplexe sowohl auf dem direkten Weg der Reaktion als auch durch Zusammenfügen der einzelnen Komponenten der Katalysezwischenstufen hergestellt. Sie zeigten die gleichen UV/VIS-spektroskopischen Charakteristika (RYLE, 2003b).

5.2.8 Na-Succinat-AtsK-Komplex

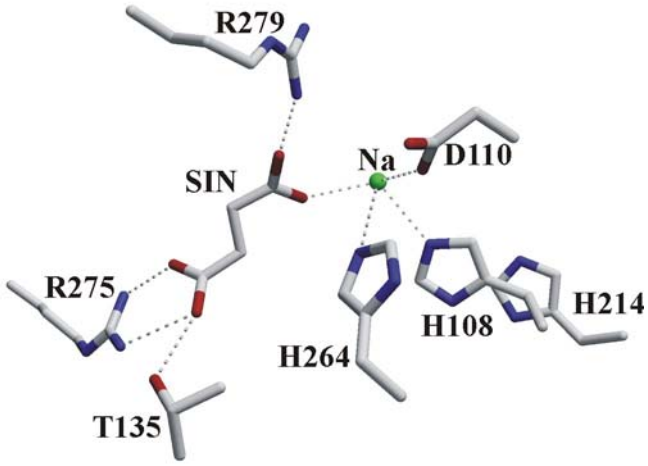


Abb. 34 Struktur der Fe- und αKG-Bindestelle im Na-Succinat-AtsK-Komplex. Die Eisenbindestelle ist mit Na, die αKG-Bindestelle mit einem Succinatmolekül besetzt.

Die Kristalle dieses Komplexes wurden durch Kokristallisation erhalten. Sie liegen in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ vor und es wurden Daten bis 2.15 Å gesammelt. Wie in den übrigen Strukturen, bei denen die Kristalle in Abwesenheit von Eisen präpariert wurden, befindet sich auch im Succinat-AtsK-Komplex ein Natriumatom in der Eisenbindestelle (siehe Abb. 34).

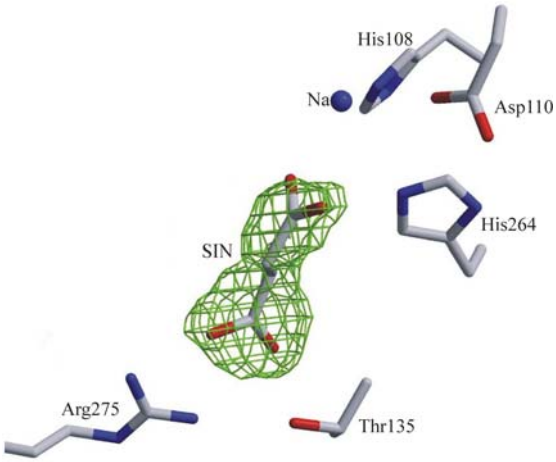


Abb. 35 In der Differenzelektronendichtekarte F_o-F_c (konturiert bei 2.5σ) im Bereich der aktiven Tasche der Na-Succinat-AtsK-Struktur ist die Koordination eines Succinatmoleküls in die Kosubstratbindestelle klar zu erkennen.

Das Succinatmolekül lagert sich wie die αKG an der Unterseite der aktiven Tasche an Arg275 und Thr135 und an der Oberseite an das Metallkation an. Da Succinat im Vergleich zu αKG ein

um ein C-Atom verkürztes Grundgerüst hat, wird durch die vergleichsweise feste Bindung an Arg275 und Thr135 die Bindung zum Natrium geschwächt. Anders als die αKG in der αKG-Substrat-AtsK-Struktur koordiniert das Succinat nur über ein Sauerstoffatom der Carboxylgruppe (SIN(O1)) in dem vergleichsweise großen Abstand von 2.6 Å an das Natriumatom. Weiterhin bildet diese Carboxylgruppe eine Wasserstoffbrücke zu Arg279(Nχ2) über SIN(O2) aus. Eine zweite Wasserstoffbrücke dieses Succinatsauerstoffatoms zu Arg279 analog der zwischen AKG(O1) und Arg279(Nε) gefundenen ist aufgrund der geänderten Seitenkettenkonformation von Arg279 nicht mehr möglich. Ein weiterer Unterschied zur αKG-AtsK–Struktur und auch zur Fe-αKG-Substrat-AtsK-Struktur ist die Orientierung der Seitenkette von His214, die hier wieder wie in der *apo*-Struktur zu His108 hingewendet ist. Die fehlenden Aminosäuren im Modell entsprechen denen in den oben beschriebenen substratfreien Strukturen, insbesondere der fehlende *loop* zwischen Ala80 und Pro85 kann nicht modelliert werden.

5.2.9 Fe-Succinat-AtsK-Komplex

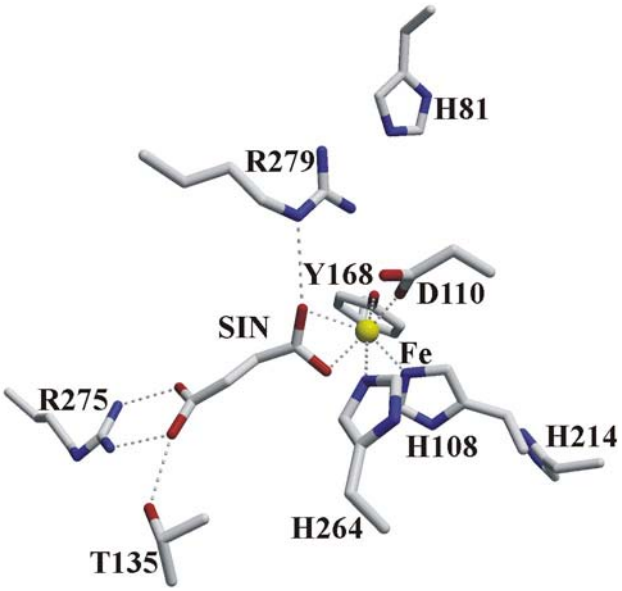


Abb. 36 Struktur der Fe- und αKG-Bindestelle im Fe-Succinat-Komplex. An das Eisenion lagert sich Tyr168 aus dem langen flexiblen *loop* zwischen Glu165 und Tyr191 an.

Die Kristalle des Fe-Succinat-AtsK-Komplexes, die durch Tränken von in Gegenwart von Succinat gewachsenen Kristallen in einer Fe^{2+}-Lösung unter anaeroben Bedingungen erzeugt wurden, liegen wie die Fe-αKG-Substratkomplexe in der Raumgruppe $I2_12_12_1$ vor und liefern Daten bis zu einer Auflösung von 2.9 Å. Trotz dieser moderaten Auflösung ist die

Elektronendichte für die aktive Tasche klar definiert und sowohl die Proteinseitenketten als auch die Liganden sind darin eindeutig zu erkennen (siehe Abb. 37).

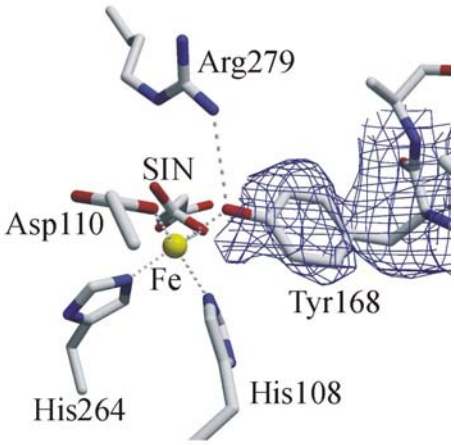


Abb. 37 Ausschnitt aus der aktiven Tasche des Fe-Succinat-AtsK-Komplexes. Die SigmaA-Elektronendichte für das an das Eisen koordinierende Tyr168 ist bei 1σ konturiert.

Die Lage des Eisenatoms zwischen His108, Asp110 und His264 ist voll besetzt. Die Bindungslängen sowie die Lage der Aminosäureseitenketten sind mit denen in den Fe-αKG-haltigen Strukturen vergleichbar. Das Succinatmolekül lagert sich wie im eisenfreien Komplex in der Unterseite der aktiven Tasche an Arg275 und Thr135 über eine seiner Carboxylgruppen an. Die andere Carboxylgruppe koordiniert an das Eisen, wobei sich die Konformation des Succinats so gegenüber der im Na-Komplex ändert, dass beide Sauerstoffatome mit Bindungslängen von 2.0 und 2.3 Å gegenüber His108 und Asp110 an das Metall koordinieren. Zum Vergleich der Atompositionen von Succinat und αKG wurde die Succinat-Struktur mit der Fe-αKG-AtsK-Struktur überlagert. Dabei zeigt sich, dass das Sauerstoffatom des Succinats, welches nach der enzymatischen Oxidation der αKG als ehemaliges Carbonylsauerstoffatom AKG(O5) im Molekül verbleibt, seine Lage nicht ändert. Das vom molekularen Sauerstoff auf AKG(C2) übertragene Sauerstoffatom befindet sich im Succinat an der Position des Kohlenstoffatoms AKG(C1), welches bei der Decarboxylierung abgespalten wird. Das weiter vom Eisen entfernte Sauerstoffatom des Succinats bildet eine Wasserstoffbrücke mit Arg279(Nε) aus, dessen Seitenkettenkonformation sich gegenüber der im Fe-αKG-Substrat-Komplex ändert. Die sechste Koordinationsstelle am Eisen, die in der Fe-αKG-Struktur von einem Wassermolekül besetzt ist und in der Fe-αKG-Substrat-Struktur frei bleibt, wird jetzt von Tyr168(Oχ) mit einem Abstand von 2.1 Å zum Eisen eingenommen. Im Falle von TauD wurde

die Hydroxylierung einer Tyr-Seitenkette im Fe-Succinat-TauD-Komplex beobachtet. Der entstandene Fe(III)-Catecholat-Komplex konnte mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie nachgewiesen werden (RYLE, 2003b). Bei der Darstellung des Fe-Succinat-AtsK-Komplexes wurde unter anearoben Bedingungen gearbeitet und die Elektronendichte um Tyr168 deutet nicht auf eine Hydroxylierung der Seitenkette in einer der meta-Positionen hin. Dass eine Oxidation des Komplexes zumindest teilweise stattgefunden hat, ist jedoch nicht auszuschließen. Diese Oxidation von Tyrosinseitenketten an einem Eisenzentrum ist jedoch nicht an eine Oxidation von Succinat gekoppelt. Eine Tyr-Radikalbildung tritt allgemein in Gegenwart von Sauerstoff oder anderen Oxidationsmitteln an Fe(II)-Tyr-Komplexen auf.

Tyr168 konnte als Teil des langen flexiblen *loops* zwischen Glu165 und Tyr191 in keiner der übrigen Strukturen modelliert werden. In dieser Struktur ist die Kette, die über dem offenen Ende des *jelly roll*-Zylinders liegt, bis zu Ala169 in der Elektronendichtekarte erkennbar. Die übrigen Aminosäuren des *loops* können nicht modelliert werden.

Auch in dieser Struktur ist His81 klar in der Elektronendichtekarte zu erkennen. Diese Aminosäure bildet über His81(Nε2) wahrscheinlich eine Wasserstoffbrücke mit Asp167(Oδ2) aus, deren Carboxylgruppe in der Fe-αKG-Substrat-Struktur als positive Differenzelektronendichte an dem verbrückende Sauerstoffatom des Sulfatesters erkennbar ist. Die Aminosäure Asp167 kann aber aufgrund fehlender Konnektivität zum Protein an dieser Stelle nicht in das Modell eingefügt werden.

His214 ist in dieser Struktur wie in den αKG-haltigen Strukturen von His108 weg orientiert. In der Mulde zwischen His81 und His214 lagern sich die Aminosäuren Glu165-Ala169 an, wobei die Tasche zwischen His108 und His214 jedoch nicht ausgefüllt wird und prinzipiell His214 auch His108 zugewandt sein könnte, ohne dass dies die Anlagerung der Aminosäuren Glu165-Ala169 verhindern würde.

Bis auf die oben beschriebenen Veränderungen an der aktiven Tasche ändert das Protein seine Struktur verglichen mit der Fe-αKG-Substrat-Struktur durch die Tyr168-Koordination an das Eisen nicht (siehe Abb. 17 Auszüge aus der Protokoll-Datei des Programms ESCET beim Vergleich der jeweils besten Monomere der asymmetrischen Einheit verschiedener Komplexe der AtsK. "Fe_αKG_substrat" bezeichnet den Fe-αKG-2-Ethylsulfat-Komplex, "Na_αKG_substrat" den Na-αKG-Hexylsulfat-AtsK-Komplex. Als Untergrenze für die fehlergewichteten Abstandsdifferenzen wurde 1.5σ verwendet. Basierend auf dem DPI sind im oberen Teil die mittleren Standardabweichungen für die Atomkoordinaten angegeben, weiterhin wurde die Zahl der Aminosäuren (bzw. der Cα-Atome) pro Struktur angegeben. Nachfolgend sind die Aminosäuren aufgelistet, die Teile starrer Gruppen sind. Im unteren Teil findet sich eine Kreuztabelle zum Vergleich der Strukturen untereinander.).

5.2.10 Na-Succinat-Substrat-AtsK-Kokristallisation

Ein Datensatz zu den in Gegenwart von Succinat und Butylsulfat gewachsenen Kristallen ($P2_12_12_1$) wurde unter Verwendung von Cu-K_α-Strahlung bis zu einer Auflösung von 2.9 Å gesammelt, die Qualität der Daten nimmt jedoch schon ab einer Auflösung von 3.3 Å rapide ab. Von einem Kristall, der in Gegenwart von Succinat und Hexylsulfat gewachsen war und in der Raumgruppe $I2_12_12_1$ vorlag, wurden ebenfalls unter Verwendung von Cu-K_α-Strahlung Daten bis zu einer Auflösung von 3.1 erhalten. Die Elektronendichte ist in beiden Strukturen die im Vergleich mit den oben beschriebenen Komplexen am wenigsten gut definierte, weshalb auf detaillierte Angaben zur Geometrie verzichtet werden muss und nur prinzipielle Unterschiede zu den anderen Strukturen diskutiert werden können.

5.2.11 Na-Succinat-Hexylsulfat-AtsK-Kokristallisation

Die Darstellung des Komplexes durch Kokristallisation von AtsK mit Succinat und Hexylsulfat sollte, vor allem, da die Zugänglichkeit der aktiven Tasche nicht durch Packungseffekte limitiert ist, zu einer vollen Besetzung der Substratbindestelle mit Hexylsulfat führen. Allerdings spricht die Höhe der Differenzelektronendichtemaxima an der Substratbindestelle wie schon beim Na-αKG-Hexylsulfat-AtsK-Komplex für die Koordination durch Wasser anstatt durch Hexylsulfat. Die Auslenkungsparameter für das Sauerstoffatom des Wassers sind deutlich niedriger als die der Proteinatome, weshalb statt Wasser ein Hexylsulfatmolekül in reduzierter Besetzung eingefügt wurde. In den substratfreien Komplexen ist die Lage von His81 nicht zu erkennen. In der hier untersuchten Struktur ist sie der Elektronendichte jedoch zu entnehmen. Da die Seitenkette von His81 in der Fe-αKG-2-Ethylhexylsulfat-Struktur an die Sulfatgruppe des Substrats koordiniert, deutet dieser Befund ebenfalls auf das Vorliegen von Hexylsulfat im Kristall hin. In Monomer A ist die Besetzung der Substratlage auf 60% begrenzt. In Monomer D ist sie so gering, dass das Hexylsulfat wie auch im Na-αKG-Hexylsulfat-AtsK-Komplex an dieser Stelle nicht modelliert werden konnte. In Anlehnung an kinetische Studien (HOLME, 1975), laut denen sich die Substratbindung der Fe- und αKG-Bindung anschließt, kann davon ausgegangen werden, dass Eisen die Affinität von Substrat an die aktive Tasche erhöht und die unvollständige Besetzung der Substratposition vermutlich auf die Abwesenheit von Eisen zurückgeführt werden kann.

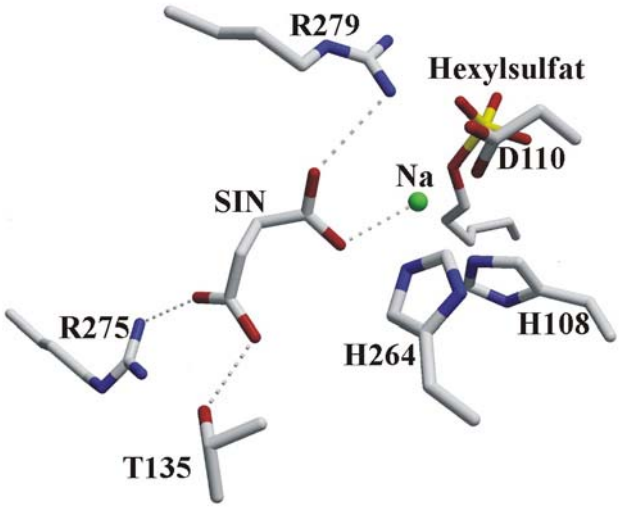


Abb. 38 Struktur der Fe- und αKG-Bindestelle im Na-Succinat-Hexylsulfat-Komplex. Die Eisenbindestelle ist durch ein Natriumion besetzt, Succinat füllt die Kosubstratbindestelle aus. Das Hexylsulfatmolekül lagert sich wie im entsprechenden αKG-haltigen Komplex an.

Die Koordination von Natrium und Succinat durch die Seitenketten in der aktiven Tasche entspricht im Rahmen der Meßgenauigkeit der in der Na-Succinat-AtsK-Struktur, allerdings ist die Seitenkettenkonformation von Arg279 leicht variiert, um gleichzeitig eine Wasserstoffbrücke zu Succinat und zur Sulfatgruppe des Substrats auszubilden. Die Sulfatgruppe des Substrates ist weiterhin wie in der αKG-Fe-Substrat-AtsK-Struktur an Val111 und His81 koordiniert. Die Lage der Seitenkette von His214 ist in der Elektronendichtekarte nicht zu erkennen.

Auch in diesem Komplex treten die Fixierung von His81 und die Raumgruppe $I2_12_12_1$ gemeinsam auf.

5.2.12 Na-Succinat-Butylsulfat-AtsK-Kokristallisation

Die Fe/Kosubstratbindestelle ist auch hier durch Na und Succinat besetzt und die Geometrie entspricht der in der Na-Succinat-Hexylsulfat-AtsK-Struktur. Dass die Kristalle nicht wie in dieser in der Raumgruppe $I2_12_12_1$ sondern $P2_12_12_1$ vorlagen, deutete auf die Koordination von Wasser statt Substrat als Ligand an die Substratbindestelle hin. Weiterhin zeigt die Elektronendichte im Bereich der Seitenkette von His214, dass diese in Richtung His108 orientiert ist, was einer Substratbindung entgegenwirkt.

Es lässt sich anders als im oben beschriebenen Na-Succinat-Hexylsulfat-AtsK-Komplex der positiven Elektronendichte zwischen Arg279 und Val111 ein Wassermolekül zuordnen. Der Befund, dass Butylsulfat somit weder durch Tränken noch durch Kokristallisation in den

Succinat-AtsK-Komplex eingeführt werden konnte, unterstützt die schon bei den αKG-AtsK-Komplexen geäußerte Vermutung, dass es sich bei Butylsulfat um ein vergleichsweise schlechtes Substrat der AtsK handelt und das natürliche Substrat in seiner Struktur möglicherweise stärker Hexyl- und 2-Ethylhexylsulfat ähnelt.

5.2.13 Fe-Succinat-Substrat-AtsK-Komplex

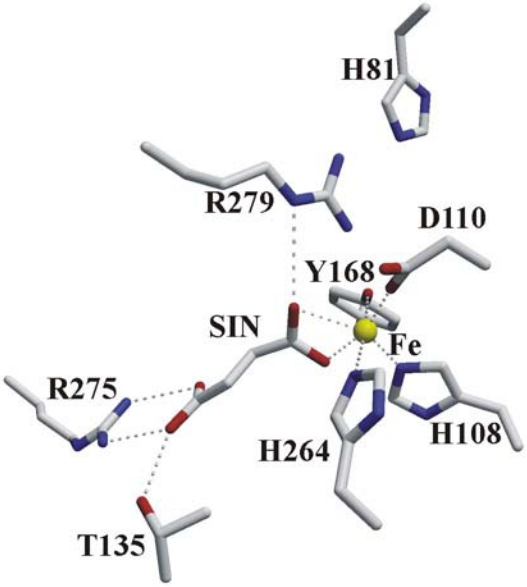


Abb. 39 Struktur der Fe- und αKG-Bindestelle nach dem Fe-Succinat-Hexylsulfat-*soaking*-Experiment. Die Fehlordnung zwischen Substrat und Tyr168 kann nicht modelliert werden. Es wurden nur die ersten Aminosäuren des flexiblen *loops* zwischen Glu165 und Tyr191 mit reduzierter Besetzung in das Strukturmodell einbezogen.

Kristalle, die in Gegenwart von Succinat und 1-Hexylsulfat gewachsen waren, lagen schon vor dem Tränken unter anaeroben Bedingungen in einer Fe(II)-Lösung in der Raumgruppe $I2_12_12_1$ vor. Die Qualität der Kristalle verschlechterte sich beim Tränken stark, was sich in unscharfen Reflexprofilen äußerte, die Auflösung war mit 2.75 Å dennoch vergleichsweise hoch. Die Koordination und Konformation des Succinats entsprechen denen im Fe-Succinat-AtsK-Komplex und auch die Lagen der Aminosäureseitenketten im Bereich der aktiven Tasche sind innerhalb der Genauigkeit beider Strukturen identisch. Das Eisen ist wie in dem zuvor beschriebenen Fe-Succinat-Komplex durch Tyr168 koordiniert. Da die Besetzung des Substrates im eisenfreien Na-Succinat-Hexylsulfat-AtsK-Komplex in einem Monomer nur bei 50% liegt und im anderen Monomer gar nicht zu modellieren ist, wäre es möglich, dass das Tyr168 das Substrat nicht verdrängt hat, sondern nur in den Fällen an das Eisen koordiniert, in denen kein Substrat gebunden hat. Da Tyr168 und das Substrat an der gleichen Seite an das Eisen angelagert sind, kann bei vorliegender Qualität der Elektronendichte nicht ausgeschlossen

werden, dass in untergeordnetem Maße auch Hexylsulfat an die aktive Tasche gebunden ist. In der Elektronendichte an der Substratbindestelle ist der im Fe-Succinat-AtsK-Komplex sehr ähnlich. In Monomer D konnten die Aminosäuren Tyr166 bis Ser170 mit der Seitenkette von Tyr168 an Eisen koordinierend eingebaut werden. In Monomer A konnten diese Aminosäuren mit auf 60% reduzierter Besetzung in das Modell eingefügt werden. Eine Fehlordnung zwischen Substrat und *loop* konnte bei der gegebenen Auflösung nicht modelliert werden.

5.2.14 Die ungekoppelte αKG-Decarboxylierungsreaktion im Kristall

Von den αKG-abhängigen Dioxygenasen TauD und TfdA ist bekannt, dass die αKG-Decarboxylierung auch in Abwesenheit von Substrat erfolgen kann. Diese ungekoppelte Kosubstratoxidation der αKG führt zur Deaktivierung des Enzyms. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist deutlich geringer als die der an die Substratbindung gekoppelten Oxidation der αKG, weshalb sie in Gegenwart von Substrat nur in untergeordnetem Maße abläuft. Für TfdA konnte gezeigt werden, dass in einer Lösung, die das Protein, Fe(II), αKG aber kein Substrat enthielt, nach 30 min 90% des vorhandenen an das Protein gebundenen Eisens mit Sauerstoff unter Bildung einer Fe(III)-Spezies reagiert hatte. Gleichzeitig war αKG in etwa äquimolarem Verhältnis zu Succinat umgesetzt worden (LIU, 2001). Somit wäre, wenn diese Reaktion in analoger Weise auch im Falle der AtsK stattfindet, ein ausreichender Teil der αKG und des Eisens oxidiert worden, um in der Eletronendichte der Kosubstratbindestelle entstandenes Succinat von nicht umgesetzter αKG unterscheiden zu können. Das entstehende Succinat könnte dann als direkter Nachweis für die erfolgte Reaktion betrachtet werden. Ob das abgespaltene CO_2 an Eisen gebunden bleibt, in Carbonat umgewandelt wird oder sofort abdiffundiert, ist nicht bekannt. Über die Natur der übrigen bei der ungekoppelten Decarboxylierung entstehenden Nebenprodukte liegen bislang ebenfalls keine Informationen vor. Es scheinen sich der Decarboxylierung der αKG jedoch mindestens zwei alternative Folgereaktionen anzuschließen, denn die Reaktivierung der durch diese ungekoppelte Decarboxylierung inaktivierten AtsK mit Ascorbinsäure gelingt nicht vollständig.

Bei der Durchführung der ungekoppelten αKG-Decarboxylierung im Kristall wurde von in Gegenwart von αKG gewachsenen Kristallen ausgegangen. Um eine nachträgliche Substitution von entstehendem Succinat durch sich in der Lösung befindende αKG zu verhindern, wurden die Kristalle zunächst in eine αKG-freie Lösung transferiert, die im ersten Fall ein Phosphatpuffersystem und im zweiten Fall keinen Puffer enthielt. Beim Austausch des αKG-Puffers gegen ein $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$-Puffersystem wurde davon ausgegangen, dass einmal an das

Protein gebundene αKG nicht mehr aus der aktiven Tasche dissoziiert und dass Phosphat ein zu schwacher Ligand ist, um die αKG aus der Koordinationsstelle zu verdrängen. Während des anschließenden Fe(II)-*soaks* sollte sich Eisen an den αKG-AtsK-Komplex anlagern. Beim Kontakt mit Luftsauerstoff sollte im Verlauf der Decarboxylierung Succinat gebildet werden und in der aktiven Tasche verbleiben.

Es wurde ein Datensatz eines unter αKG / Phosphatpufferaustausch hergestellten Kristalls, der in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ vorlag, bis zu einer Auflösung von 2.9 Å gesammelt. Die Auswertung der Messdaten ergab, dass Phosphat statt Succinat bzw. αKG an der Unterseite der αKG-Bindetasche an Arg275 und Thr135 koordinierte und auf diese Weise keine ungekoppelte Decarboxylierung im Kristall nachgewiesen werden konnte.

```
A
Estimation of SAS delta-F values
Local scaling employed with radius of 0.1572 reciprocal Angstroms

Anomalous signal/noise ratios (1.0 is random).  The first line is based on
input sigmas, the second on variances of F+ and F-:

 Inf - 8.0 - 6.0 - 5.0 - 4.0 - 3.8 - 3.6 - 3.4 - 3.2 - 3.0 - 2.8 - 2.6 - 2.4 A

    1.38  1.33  1.28  1.23  1.22  1.13  1.18  1.11  1.13  1.01  0.97  0.83
    1.70  1.43  1.36  1.27  1.22  1.11  1.10  1.06  1.06  0.97  0.88  1.14

    33.8  Neighbors used on average for F+/F- local scaling
 Rint(anom) =   0.0966  before and   0.0989  after local scaling

B
Estimation of SAS delta-F values
Local scaling employed with radius of 0.1559 reciprocal Angstroms

Anomalous signal/noise ratios (1.0 is random).  The first line is based on
input sigmas, the second on variances of F+ and F-:

 Inf - 8.0 - 6.0 - 5.0 - 4.5 - 4.3 - 4.1 - 3.9 - 3.7 - 3.5 - 3.3 - 3.1 - 2.9 A

    1.19  1.24  1.21  1.20  1.25  1.20  1.22  1.31  1.24  1.23  1.24  1.13
    1.23  1.21  1.13  1.18  1.18  1.16  1.14  1.17  1.11  1.10  1.11  1.05

    75.2  Neighbors used on average for F+/F- local scaling
 Rint(anom) =   0.1250  before and   0.1262  after local scaling
```

Abb. 40 Auszug aus XPREP: **A** Die anomalen Differenzen für den Fe-Succinat-AtsK-Komplex und den nach dem Austausch des αKG-Puffers gegen ein Phosphatpuffersystem und **B** in einer Fe(II)-Lösung getränkten AtsK-Komplex. In Datensatz A hebt sich das anomale Signal bis zu einer Auflösung von 3.8 Å etwas stärker als im Datensatz B vom Rauschen ab, es ist jedoch in beiden Fällen gering. Die Redundanz (Fiedelpaare gemittelt) beträgt bei Datensatz A 4.5, bei Datensatz B 5.2.

Der Versuch, den αKG-Puffer ersatzlos aus der Lösung zu entfernen, lieferte Kristalle, für die Daten bis zu einer maximalen Auflösung von 3.7 Å gesammelt werden konnten und die in der Raumgruppe $I2_12_12_1$ vorlagen. Die Elektronendichte war im Bereich der aktiven Tasche nicht interpretierbar und selbst die Frage, ob Eisen an das Protein koordiniert, konnte nicht beantwortet werden. Der Datensatz war unter Verwendung von Cu-K_α-Strahlung gemessen

worden. Bei dieser Wellenlänge (1.5418 Å) sollte die anomale Streuung am Eisen ein messbaren Unterschied in den Intensitäten der Friedelgegenteile bewirken (siehe **Abb. 40**).
Daher wurden die anomalen Differenzen und die um 90° verschobenen Phasen des Modells, das nach dem *simulated annealing* vorlag, kombiniert, um die anomalen Phasen zu berechnen. Die daraus erhaltene Elektronendichtekarte zeigte im Bereich der Eisenbindestelle keine sich vom Untergrund abhebenden Dichtemaxima (siehe **Abb. 41**).

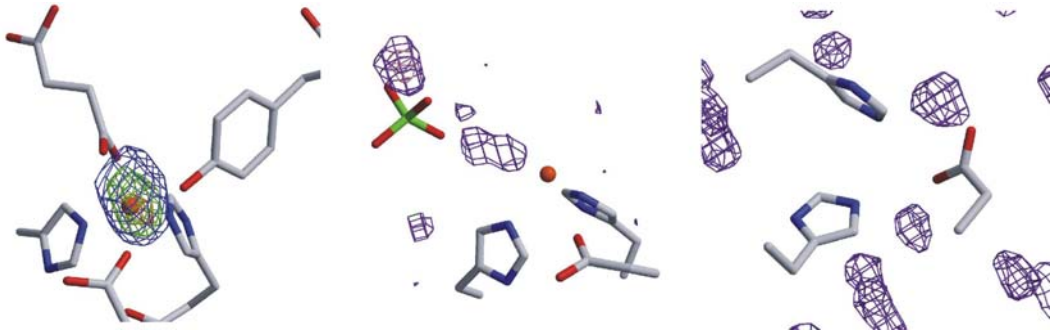


Abb. 41 links: In der anomalen Elektronendichtekarte des Fe-Succinat-Komplexes, (Konturlevel: 6σ (blau),8σ(grün) und 10σ(orange)) ist die Position des Eisens klar zu erkennen. mittig: Die anomale Elektronendichtekarte für die phosphathaltige Struktur ist bei 2σ (violett) und 3σ (rosa) konturiert, die Position des Eisens setzt sich darin nicht ab. rechts: Die anomale Elektronendichtekarte für die pufferfreie Struktur ist bei 2σ konturiert.

Grund dafür könnte zum einen sein, dass Eisen nicht an die aktive Tasche der AtsK bindet, wenn keine αKG vorliegt. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, wenn man berücksichtigt, dass für die αKG-abhängigen Dioxygenasen DAOCS, P3H und GAB Kristallstrukturen mit Eisen aber ohne αKG in der aktiven Tasche vorliegen (siehe Kapitel 5.4) und Phosphat mit Eisen keinen stabilen Komplex bildet, der das Eisen maskiert. Andererseits könnte die Ursache für das Fehlen von anomaler Elektronendichte an der Eisenbindestelle im sehr unvollständigen Strukturmodell liegen, in dem vor allem im Bereich der aktiven Tasche die Seitenketten fehlen und in das keine Wassermoleküle eingefügt sind. Dass die nicht eindeutig interpretierbare anomale Elektronendichtekarte aus der geringen Redundanz der Daten sowie dem schwachen anomalen Signal des Eisens resultiert, kann im Vergleich mit dem Datensatz des Fe-Succinat-AtsK-Komplexes, der in Redundanz, Auflösung und Qualität vergleichbar ist, ausgeschlossen werden.
Die Ergebnisse der beiden Messungen legen nahe, dass die αKG in Abwesenheit von Eisen reversibel an das Protein gebunden ist und durch andere Liganden verdrängt werden kann. Daher wurde in einem dritten Versuch die αKG vor der Einführung von Eisen nicht aus der Lösung entfernt. Unter diesen Bedingungen muss davon ausgegangen werden, dass das bei der ungekoppelten Kosubstratoxidation gebildete Succinat durch den Überschuss an αKG in der Lösung verdrängt werden kann, sofern die aktive Tasche nach erfolgter Decarboxylierung der αKG nicht durch eine Konformationsänderung des Proteins unzugänglich geworden ist. Die

Kristalle wurden nach dem Tränken in einer Fe(II)-Lösung unter Argonatmosphäre Luftsauerstoff ausgesetzt, wobei sich die zuvor farblosen Kristalle intensiv gelb färbten und sich die Raumgruppe von $P2_12_12_1$ nach $I2_12_12_1$ änderte. Im Beugungsexperiment lieferten die Kristalle zwar leicht unscharfe Reflexprofile, aber Daten von guter Qualität bis zu einer Auflösung von 2.6 Å.

In der Differenzelektronendichte für die Proteinseitenketten im Bereich der aktiven Tasche ist zu erkennen, dass sich die Koordination des Eisens durch das Protein nicht von der im unter anaeroben Bedingungen erhaltenen Fe-αKG-AtsK-Komplex unterscheidet und auch die Seitenkette von His214 die gleiche Konformation einnimmt. Einzig die Lage der Seitenkette von Arg279 ist nicht zu erkennen. Die Differenzelektronendichte im Bereich der Kosubstratbindestelle zeigt nicht wie erwartet die Form von Succinat (siehe Abb. 42). Im unteren Bereich der Kosubstrat-Bindestelle ist die Elektronendichte gut definiert und man kann die Koordination einer Carboxylgruppe durch die Aminosäureseitenketten von Arg275 und Thr135 deutlich erkennen. Im oberen Bereich ist die Elektronendichte zu ausgedehnt für die Carboxylgruppe von Succinat. Es wurden im Rahmen der Verfeinerung verschiedene Liganden an dieser Stelle modelliert, eine eindeutige Interpretation der Elektronendichte, die in Einklang mit den durch das Experiment gegebenen Rahmenbedingungen stehen, ist jedoch nicht möglich. Daher sollen die getesteten Modelle im Folgenden vorgestellt und ihre Bedeutung für den Mechanismus der ungekoppelten Kosubstratdecarboxylierung diskutiert werden.

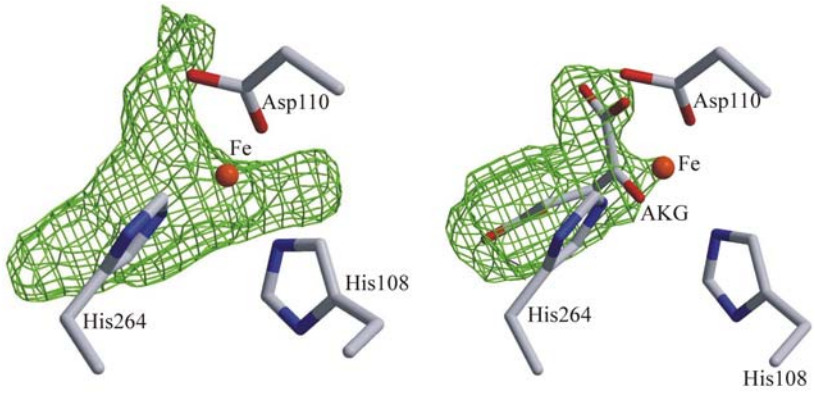


Abb. 42 links: Darstellung der positive Differenzelektronendichte (konturiert bei 2.5σ) im Bereich der αKG-Bindestelle in der nach aerobem Fe-αKG-*soak* erhaltenen Kristalle. rechts: Darstellung der positiven Differenzelektronendichte für die αKG im unter anaeroben Bedingungen erhaltenen Fe-αKG-AtsK-Komplex zum Vergleich.

Die Differenzelektronendichtekarten für die unter anaeroben und unter aeroben Bedingungen hergestellten Fe-αKG-AtsK-Komplexe sind in Abb. 42 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sie an der Koordinationsstelle gegenüber His264, die im unter anaeroben Bedingungen

hergestellten Fe-αKG-AtsK-Komplex von einem Wassermolekül besetzt ist, die Form einer Carboxylgruppe annimmt. Daher wurde zunächst versucht, neben Succinat ein Carbonatmolekül in das Modell einzufügen (siehe Abb. 43).

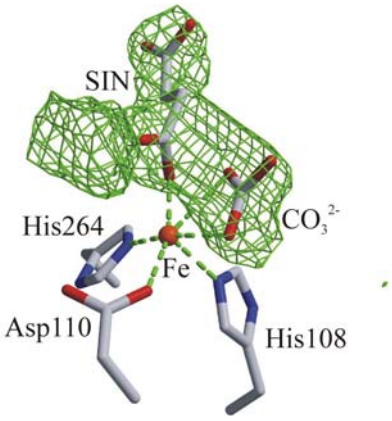


Abb. 43 Succinat und Carbonat wurden in die Kosubstratbindestelle der nach aerobem Fe-αKG-*soak* erhaltenen Struktur eingefügt. Die Differenzelektronendichtekarte für das Modell ohne Succinat und Carbonat ist in grün dargestellt (konturiert bei 2.5σ). Die nicht interpretierte Dichte im linken Teil resultiert aus der Koordination durch Arg279, für dessen Seitenkette keine eindeutige Konformation gefunden werden konnte.

Die Carbonatgruppe orientiert sich dabei so, dass eines der Sauerstoffatome an das Eisen koordiniert. Der Abstand zum Eisen ist mit dem zwischen der Asp110-Carboxylgruppe und dem Eisen vergleichbar (2.1 Å). Allerdings ist der Abstand dieses Sauerstoffatoms zum Succinat mit 2.0 Å zu kurz für eine Wasserstoffbrückenbindung. Allerdings muss bei der Abstandsanalyse berücksichtigt werden, dass die Auflösung der Struktur nur 2.6 Å beträgt und die angegebenen Abstände nur Größenordnungen angeben. Die Seitenkette von Arg279, die im Fe-Succinat-AtsK-Komplex an das Succinat koordiniert, kann in dieser Struktur nicht modelliert werden. Dieser Umstand kann nicht mit dem beschriebenen Modell erklärt werden. Neben diesen strukturellen Gründen sprechen mechanistische Aspekte gegen das Vorliegen von Succinat und Carbonat an dieser Stelle. Denn wie durch die unter anaeroben Bedingungen hergestellte Fe-αKG-AtsK-Struktur gezeigt, koordiniert die αKG so an das Eisen, dass die α-Carboxylgruppe gegenüber His108 liegt und von Arg279 koordiniert wird. Im Laufe der Decarboxylierung hätte also eine Umorientierung der αKG bzw. des entstandenen Carbonates hin zur Koordinationsstelle gegenüber His264 stattfinden müssen. Eine entsprechende Umorientierung vor der Abreaktion der gleichzeitig mit dem Kohlendioxid entstandenen Ferrylspezies würde die Zugänglichkeit des Eisens von der offenen Substratbindeseite her verringern, so dass das als Schutzschild gegen unkontrollierte Oxidationsreaktionen diskutierte Tyrosin nicht an das Eisen koordinieren könnte. Die Umorientierung des Carbonates nach erfolgter Reaktion der Ferrylspezies ist zwar denkbar, jedoch wurde in kinetischen Untersuchungen (HOLME, 1975)

gezeigt, dass CO_2 der erste Ligand ist, der während der Katalyse die Koordinationssphäre des Eisens verlässt.

Eine weitere Möglichkeit zur Interpretation der Elektronendichte ist eine Besetzungsfehlordnung zwischen Succinat und αKG (siehe Abb. 44).

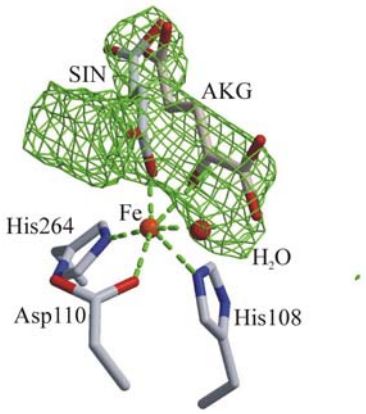


Abb. 44 Modell für eine Lagefehlordnung zwischen Succinat/Wasser und αKG in der anaeroben Fe-αKG-Struktur. Die Differenzelektronendichtekarte für das Modell ohne Succinat/Wasser und αKG ist in grün dargestellt (konturiert bei 2.5σ). Die nicht interpretierte Dichte im linken Teil resultiert aus der Koordination durch Arg279, für dessen Seitenkette keine eindeutige Konformation gefunden werden konnte.

Die αKG ist dabei nicht wie im unter anaeroben Bedingungen hergestellten Fe-αKG-AtsK-Komplex sondern wie im eisenfreien Na-αKG-AtsK-Komplex mit der α-Carboxylgruppe gegenüber His264 orientiert, was ein Resultat der geänderten Oxidationsstufe des Eisens sein könnte. Die Ergebnisse der XAS-Messung an der AtsK (siehe unten) legen nahe, dass das Eisen im Kristall in der Oxidationsstufe III vorliegt. Dies würde im übrigen auch die Farbänderung der Kristalle nach der Sauerstoffexposition von farblos zu gelb erklären.

Die Besetzung der Lagen von αKG und Succinat wurde mit Hilfe der Auslenkungsparameter angepasst. Sie liegt für die αKG bei 40% im ersten und 50% im zweiten Monomer.

Die Auslenkungsparameter für AKG(O2), welches die Eisenkoordinationsstelle gegenüber His264 besetzt, waren zunächst sehr viel niedriger als die der restlichen Atome des αKG-Moleküls. Daher wurde die Fehlordnung eines Wassermoleküls an dieser Position an die des Succinats gekoppelt. Die Distanz zwischen diesem Wassermolekül und dem Eisen verfeinert sich auf etwa 1.8 Å, was zu lang für den Abstand zu einem Wasser-, aber passend für den zu einem Hydroxylliganden ist. Das Vorliegen von einer Hydroxylgruppe und Succinat würde bedeuten, dass die ungekoppelte Decarboxylierung stattgefunden hat. An dieser Stelle muss jedoch wieder auf die moderate Auflösung und die dadurch bedingte Ungenauigkeit der angegebenen Bindungslängen hingewiesen werden. Da die Konformation der αKG anders als im entsprechenden unter anaeroben Bedingungen hergestellten Komplex ist, wird vermutet,

dass nach der Decarboxylierung Succinat durch ein sich in der Mutterlauge befindliches αKG-Molekül verdrängt worden ist. Ungeklärt bleibt, über welche Folgeprodukte die bei der Decarboxylierung intermediär entstandene Eisenoxospezies weiterreagiert hat. Da der *loop* zwischen Glu165 und Tyr191 weiterhin nicht modelliert werden kann, bleibt offen, ob dabei Tyr168 hydroxyliert wurde. Widersprüchlich zur Fe-Succinat-AtsK-Struktur ist, dass beim Vorliegen von Succinat in der aktiven Tasche Tyr168 nicht an das Eisen koordiniert. Dabei könnte es sich nach der Hydroxylierung durch die Eisenoxospezies sogar als Chelatligand anlagern, vor allem, da die Affinität von Sauerstoff zum verglichen mit Fe(II) lewissaureren Fe(III) erhöht ist.

Bei der Einbeziehung von αKG in das Modell mit einer Orientierung wie in der Na-αKG-AtsK-Struktur (siehe Abb. 45), also mit der α-Carboxylgruppe gegenüber His264 positioniert, ergaben sich für das Kosubstrat in den beiden Monomeren der asymmetrischen Einheit sehr unterschiedliche Abstände der an das Eisen koordinierenden Sauerstoffatome.

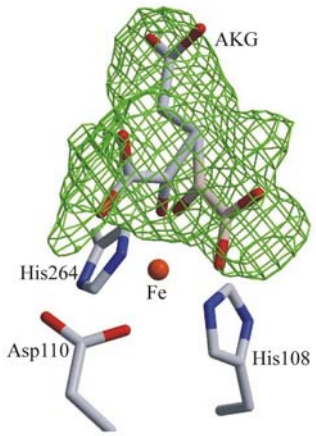


Abb. 45 Modell für eine Fehlordnung der Oxocarboxylgruppe der αKG über zwei Lagen in der anaeroben Fe-αKG-Struktur. Die Differenzelektronendichtekarte für das Modell ohne αKG ist in grün dargestellt (konturiert bei 2σ).

In einem Monomer ist das Sauerstoffatom der α-Carboxylgruppe der αKG mit 2.5 Å sehr weit vom Eisen entfernt und im anderen Monomer mit 1.5 Å sehr nahe am Eisen positioniert. Außerdem sind die B-Werte der α-Carboxylgruppe viel höher als die übrigen Atome des Moleküls, was in der anaeroben Fe-αKG-AtsK-Struktur nicht beobachtet worden war. Einerseits könnte dies auf eine Decarboxylierung der αKG hindeuten. Andererseits können die hohen B-Werte für die Atome der α-Carboxylgruppe auch durch eine Fehlordung der αKG

zwischen der in der anaeroben Fe-αKG-AtsK-Struktur beobachteten und der in der Na-αKG-AtsK-Struktur gefundenen Orientierung der α-Carboxylgruppe bedingt sein.

Modelliert man eine entsprechende Fehlordnung mit einer Besetzung der beiden Lagen im Verhältnis 60:40 im ersten bzw. 50:50 im zweiten Monomer, so ergibt sich für das an Eisen koordinierende Sauerstoffatom der αKG in der auch im Na-αKG-AtsK-Komplex gefundenen Orientierung ein auffallend niedriger B-Wert. Dies lässt sich dadurch erklären, dass an dieser Position in dem Teil der Monomere, in denen die αKG die alternative Konformation einnimmt, ein Wassermolekül als sechster Ligand an das Eisen angelagert ist. Wird dieses Wasser mit der entsprechenden Besetzung der Lage im Modell eingefügt, gleicht sich der isotrope Auslenkungsparameter des genannten Sauerstoffatoms der αKG denen der übrigen Atome im Molekül an. Die Änderung der αKG-Konformation in einem Teil der Proteinmoleküle relativ zu der im anaeroben Fe-αKG-AtsK-Komplex gefundenen könnte im Zusammenhang mit einer erfolgten ungekoppelten Decarboxylierung stehen. Da das dabei entstandene Succinat weniger stark an das Protein bindet als die αKG, könnte nach der Decarboxylierung eine Substitution des Succinats stattgefunden haben. In einem weiteren Experiment müsste daher geklärt werden, ob Succinat in der aktiven Tasche verbleibt, wenn nach dem anaeroben Fe-*soaking* der Kristalle in Gegenwart von αKG vor dem Wechsel zu aeroben Bedingungen einen Transfer des Kristalls in eine αKG-freie Lösung stattgefunden hat.
Dass die das Succinat substituierende αKG mit der αCOO-Gruppe nicht wieder in trans-Position zu His108, sondern in der planaren Konformation zu liegen kommt, könnte im Zusammenhang mit der geänderten Oxidationsstufe des Eisens stehen. Es wird nicht davon ausgegangen, dass es sich um eine Lagefehlordnung zwischen Fe und Na handelt, da die Auslenkungsparameter für die Eisenatome in beiden Monomeren denen der das Eisen umgebenden Aminosäureatome ähneln. Geht man von dieser Besetzung der Kosubstratbindestelle aus, stellt sich die Frage, warum sowohl im unter anaeroben Bedingungen hergestellten Fe-αKG-AtsK-Komplex als auch im Na-αKG-AtsK-Komplex der Kristall in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ vorliegt, hier aber in der innenzentrierten Form.

Ein Vergleich der Struktur mit der des unter anaeroben Bedingungen erhaltenen Fe-αKG-AtsK-Komplexes mit Hilfe des Programmes ESCET zeigt eine strukturelle Identität von 98.4% bei einem unteren Grenzwert für die fehlergewichteten Abstandsdifferenzen von 1.5σ. Dabei beschränken sich die nicht übereinstimmenden Regionen auf wenige, isolierte Aminosäuren in von der aktiven Tasche weit entfernten *loops*. Da die Ungenauigkeit der Atomparameter

aufgrund der niedrigen Auflösung vor allem bei dem unter aeroben Bedingungen hergestellten Komplex hoch sind, werden kleinere, aber signifikante Unterschiede, die womöglich im Bereich der aktiven Tasche auftreten, nicht berücksichtigt.

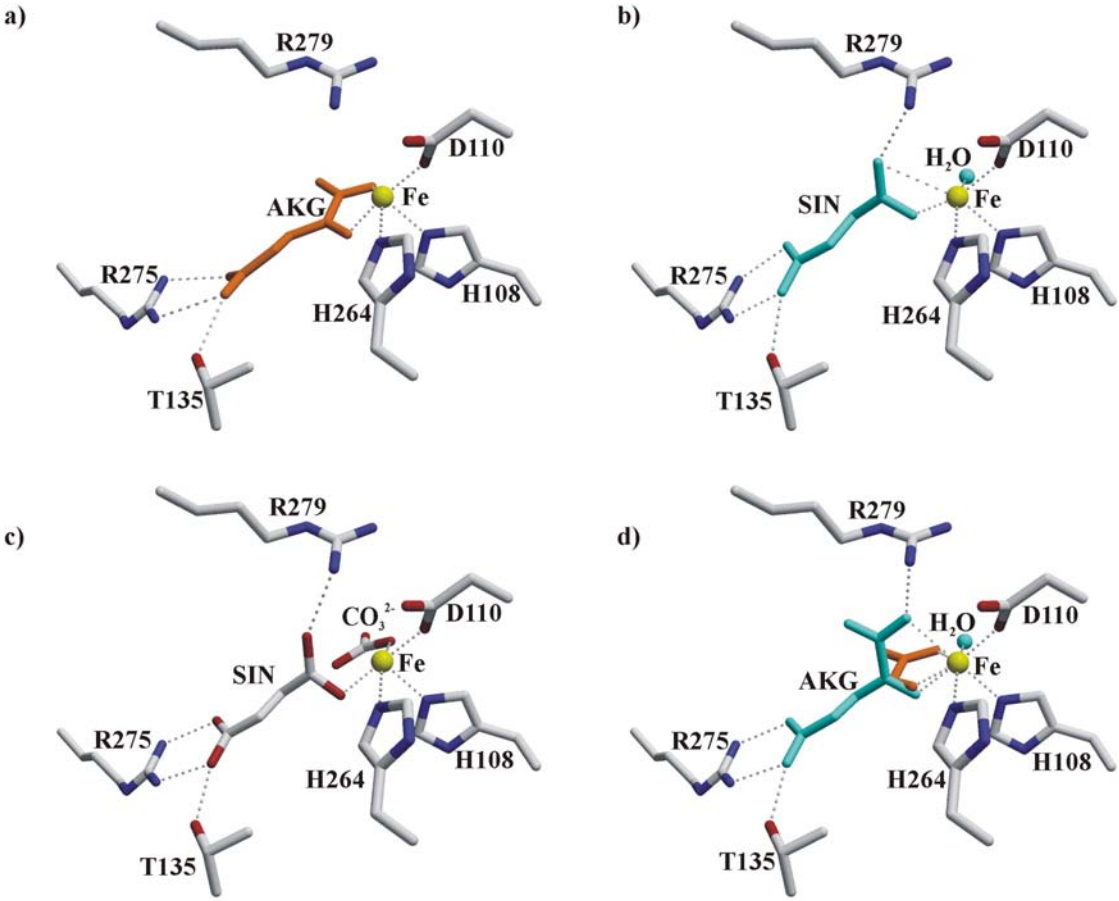


Abb. 46 In a) und b) sind die beiden Teile der Lagefehlordnung zwischen αKG und Succinat getrennt dargestellt. c) zeigt das Modell mit Succinat und Carbonat in der aktiven Tasche, d) zeigt das Modell der Fehlordnung zwischen zwei alternativen Lagen der αKG, in dem für eine der αKG-Lagen zusätzlich ein Wassermolekül in das Modell eingefügt wurde.

5.2.15 $P2_12_12_1$ vs $I2_12_12_1$

Die Fixierung der Aminosäure His81 ist die einzige Veränderung, die bei den in der Raumgruppe $I2_12_12_1$ vorliegenden Strukturen gegenüber denen in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ kristallisierten Komplexen beobachtet wird. Es liegt nahe, dass die Raumgruppenänderung hiermit zusammenhängt, auch wenn als Ausnahme davon in der Struktur des unter aeroben Bedingungen hergestellten Fe-αKG-AtsK-Komplexes die Lage von His81 nicht zu erkennen ist. Ob und wie die übrigen Aminosäuren Einfluss auf die Symmetrie im Kristall haben, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

5.3 Röntgenabsorptionsspektroskopie

Die Röntgenstrukturanalyse ist nicht in der Lage, direkte Aussagen über Oxidationsstufen von Metallen zu machen. Bei genügend hoher Auflösung der Struktur und damit Präzision der Atomabstände und der genauen Bestimmung der Umgebung (Koordinationszahl und Natur der Liganden) kann die Oxidationsstufe eines Atoms jedoch über die *bond valence*-Methode berechnet werden (MÜLLER, 2003). Die Strukturen der verschiedenen AtsK-Komplexe sind für eine entsprechende Analyse des Eisens nicht geeignet. Zum einen variieren die Bindungslängen zum Eisen zwischen den einzelnen Monomeren der asymmetrischen Einheit, zum anderen kann die Minderbesetzung von Liganden- und Eisenlagen nur grob beschrieben werden. Weiterhin wichtig wäre die Kenntnis über die Protolysestufen, die dafür benötigten Wasserstoffatompositionen können den vorliegenden Daten nicht entnommen werden.

Ein Experiment, das die Zuordnung der Oxidationsstufe direkt erlaubt, ist die Röntgenabsorptionsspektroskopie XAS.

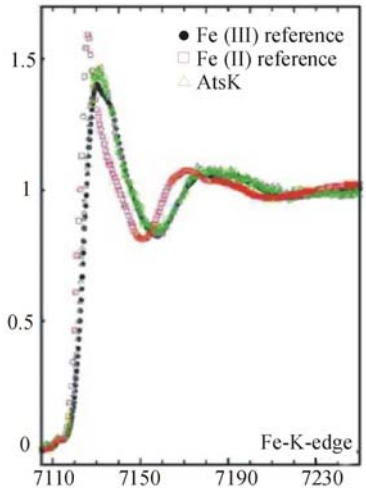


Abb. 47 Das XAS-Spektrum einer aeroben Lösung, die neben AstK noch Fe^{2+} und αKG enthielt (grün). Als Referenz für Eisen in der Oxidationsstufe III ist das Spektrum der oxidierten Form der humanen Tyrosinhydroxylase (schwarz) dargestellt. Als Referenz für Fe(II) ist das Spektrum der reduzierten Form der Tyrosinhydroxylase (rot) gezeigt. Es ist klar zu erkennen, dass in der AtsK-Probe Fe(III) vorliegt.

In Abb. 47 ist das XAS-Spektrum der AtsK im Vergleich mit dem von Eisen im aktiven Zentrum der humanen Tyrosinhydroxylase in reduzierter und oxidierter Form dargestellt (Meyer-Klaucke, 1996). Die AtsK-Probe enthielt neben dem Protein Eisen und αKG. Aus der Form des Spektrums in der XANES-Region kann abgeleitet werden, dass das Eisen unter den gegebenen Bedingungen in der Oxidationsstufe III vorliegt. Der EXAFS-Region ist zu entnehmen, dass das Eisen von den in der Kristallstruktur beschriebenen Aminosäuren koordiert ist und somit nicht frei in Lösung vorliegt. Weiterhin wurde beobachtet, dass bei Kristallisationen, bei denen dem Protein Fe(II) in unterschiedlichen Konzentrationen unter

aeroben Bedingungen zugesetzt worden war, in den Kristallstrukturen kein Eisen in der aktiven Tasche gefunden wurde. Der Kristallisationstropfen färbte sich nach wenigen Stunden gelb und ein brauner Niederschlag von Eisen(III)-oxid fiel aus, was darauf hindeutet, dass das Metall unter diesen Bedingungen in der wässrigen Lösung oxidiert wurde. Weiterhin zeigten Aktivitätstests, dass das Protein bei der Zugabe von Fe(III) statt Fe(II) das Substrat nicht umsetzen kann. Zusammenfassend bedeutet das, dass die AtsK nur Fe(II) aus der Lösung anlagert und reversibel binden kann. Fe(III) befindet sich nur dann in der aktiven Tasche, wenn es durch Oxidation von Fe(II) im Enzym gebildet wurde. Da bislang keine XAS-Messung für eine αKG-freie Probe der AtsK mit Fe(II) durchgeführt wurde, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden, ob Fe(II) bei der von der Substratbindung abgekoppelten Oxidation der αKG zu CO_2 und Succinat durch O_2 zu Fe(III) oxidiert wurde. Es sind jedoch für eine Reihe anderer Enzyme dieser Familie Nachweise für die von der Substratoxidation abgekoppelte αKG-Decarboxylationen beschrieben, die meist zur Inaktivierung des Enzyms durch Bildung von Fe(III) führen (SOLOMON, 2000). Der Mechanismus dieser Inaktivierung ist nicht bekannt, in vielen Fällen kann aber zumindest ein Teil der ursprünglichen Aktivität durch Wiederherstellung von Fe(II) zurückgewonnen werden, indem Ascorbat zugesetzt wird (RYLE. 2003a).

5.4 Vergleich mit anderen aKG-abhängigen Dioxygenasen

Bevor aus diesen Ergebnissen ein Katalysemechanismus für die AtsK abgeleitet wird, soll den zahlreichen Untersuchungen an anderen Vertretern dieser Enzymfamilie Rechnung getragen werden. Neben den Kristallstrukturen von DAOCS, CAS, ANS, P3H, TauD und GAB liegen auch spektroskopische Daten für diese und weitere Enzyme vor. Im folgenden werden zunächst die verschiedenen Kristallstrukturen vorgestellt und anschließend vor allem für TauD, dem der AtsK mit einer Sequenzhomologie von rund 30% engsten Verwandten dieser Enzymfamilie, Ergebnisse anderer Untersuchungsmethoden diskutiert.

In Tabelle 8 sind alle bekannten Kristallstrukturen von αKG-abhängigen Dioxygenasen und ihren Komplexen zusammengefasst. Allen Enzymen ist das *jelly roll*-Motiv gemein, welches die konservierte His-Asp/Glu-His-Eisenbindungstriade trägt. Im Falle von TauD (ELKINS, 2002), welche mit 30% die größte Sequenzhomologie zu AtsK aufweist, ist nicht nur diese zentrale Domäne, sondern die ganze Struktur der der AtsK sehr ähnlich (siehe Abb. 50). Unterschiede zwischen AtsK und TauD, aber auch den anderen Enzymen, treten vor allem im Bereich der die β-Faltblätter des *jelly roll*-Zylinders flankierenden α-Helices sowie in der zweiten, kleinen Domäne auf, die in AtsK vor allem für die Tetramerbildung wichtig ist. Bei dieser kleinen Domäne handelt es sich bei AtsK (141-243) und TauD (131-234) wie auch bei CAS(177-258) (ZHANG, 2000) und GAB(192-271) (CHANGE, 2002) um eine Insertion in der Sequenz. Auch bei TauD ist diese kleine Domäne an der Dimerisierung beteiligt. Die Suche nach dieser Insertion ähnlichen Strukturen zeigte, dass eine entsprechende Faltung nur bei den oben genannten Proteinen auftritt. Die Aminosäuren der zweiten Domäne sind bei DAOCS (VALEGÅRD, 1997), ANS (WILMOUTH, 2002) und P3H (CLIFTON, 2001) am C-terminalen Ende der Sequenz zu finden und umfassen etwa 40 Aminosäuren bei DAOCS und ANS und über 80 bei P3H.

Wie schon erwähnt, befindet sich die aktive Tasche bei allen Enzymen dieser Gruppe innerhalb des *jelly roll*-Zylinders und kann formal in zwei Bereiche unterteilt werden. Der erste Teil, der für die Eisen- und Kosubstratbindung verantwortlich ist, ist zwischen den Enzymen hoch konserviert. Der zweite, an der Substratbindung beteiligte Bereich unterscheidet sich erwartungsgemäß stärker. Der erste Teil besteht aus der His-X-Asp/Glu-X_n-His-Eisenbindungstriade und einem Arginin, das eine Salzbrücke zur γ–Carboxylgruppe der αKG ausbildet. Im Falle von AtsK, CAS und TauD bildet eine Threoninseitenkette, im Falle von DAOCS, ANS und GAB eine Serinseitenkette eine Wasserstoffbrücke zu einem der γ–Carboxylsauerstoffatome der αKG aus.

Tabelle 8. Zusammenfassung der für die Familie der αKG-abhängigen Dioxygenasen bekannten Kristallstrukturen

Protein	Faltung[1]	Enzymkomplexe[2]	OH[3]	αKG[4]	αKG koordinierende Aminosäuren γ-COO[5]	γ-COO	α-COO[6]	PDB-ID
AtsK	Insertion	*apo*-Enzym (1.9 Å)	+	-	T135	R275	R279	1oih
		+ Na, αKG, (2.07 Å)		p				1oij
		+ Fe, αKG, (2.2 Å)		np				1oii
		+ Fe, αKG, 2-Ethylhexyl-1-sulfat (2.05 Å)		np				1oik
DAOCS	C-Ext.	*apo*-Enzym (1.3 Å)	-	-	S260	R258	R162	1dcs
		+ Fe (1.5 Å)		-				1rxf
		+ Fe , αKG (1.5 Å)		p				1rxg
		+ Fe, Succinat, CO_2 (1.96 Å)		-				1e5h
		+ Fe, α-Ketohexansäure, (1.6 Å)		-				1hjf
		+ Fe, α-Ketopentansäure, (1.5 Å)						1hjg
CAS	Insertion	*apo*-Enzym (1.63 Å)	+ / -	-	T172	R293	R297	1ds0
		+ Fe, αKG (1.08 Å)		np				1ds1
		+ Fe, αKG, NAA (Substratanalogon für die Hydroxylierungsreaktion) (1.40 Å)	+	np				1dry
		+ Fe, αKG, Proclavaminsäure (Substrat der Ringschlussreaktion) (2.10 Å)	-	np				1drt
		+ Fe, αKG, DGP[7] (Substrat der Hydroxylierungs-reaktion), NO (O_2-Analogon) (1.54 Å)	+	p				1gvg

Fortsetzung Tabelle 8. Zusammenfassung der für die Familie der αKG-abhängigen Dioxygenasen bekannten Kristallstrukturen

Protein	Faltung	Enzymkomplexe	OH	áKG	αKG koordinierende Aminosäuren γ-COO	γ-COO	α-COO	PDB-ID
P3H	C-Ext.	*apo*-Enzym (2.3 Å)	+	-	H135	R168	R95, R97	1e5r
		+ Fe (2.4 Å)					oder R122	1e5s
ANS	C-Ext	*apo*-Enzym + áKG (2.1 Å)	-	p	S300	R298	N215	1gp4
		+ Fe, áKG, DHQ (Substrate) (2.2 Å)[8]		p				1gp5
		+ Fe, Succinat, Produkt (1.75 Å)		-				1gp6
Gab	Insertion	+ Fe (2.0 Å)	?	-	S188	R305	R309 oder R311	1jr7
TauD	Insertion	*apo*-Enzym (1.9 Å)	+	-	T126	R266	R270	1os7
		+ Fe, áKG (2.5 Å)		np				1otj
		+ Fe, áKG, Taurin (2.50 Å)		np				1gy9

[1] Die Faltung der Proteine unterteilt sich in zwei Domänen. Bei der kleineren Domäne kann es ich um eine Insertion oder eine C-terminale Extension der Sequenz handeln.
[2] Enzymkomplexe, für die eine Kristallstruktur bekannt ist (maximale Auflösung in Klammern).
[3] Hydroxylierung des Substrates während der Katalyse: + Ja, - Nein.
[4] Konformation der áKG: p planar, np nicht planar, - keine Daten verfügbar (siehe dazu auch Text).
[5] Wasserstoffbrückendonor für die γ-Carboxylgruppe der αKG, die über eine Salzbrücke an ein Arginin gebunden ist.
[6] Wasserstoffbrückendonor für die α-Carboxylgruppe der αKG, die an Fe koordiniert.
[7] Deoxyguanidinoproclavaminat
[8] Die Struktur wurde als Fe-αKG-Substrat-ANS-Komplex veröffentlich. Ein Vergleich mit der aus diesem Komplex nach Sauerstoffexposition gebildeten Fe-Succinat-Produkt-ANS-Komplex (1gp6) wirft jedoch Unstimmigkeiten auf. Zum einen sind die B-Werte der an das Eisen koordinierenden Carboxylgruppe der αKG größer als die der restlichen Atome im Molekül. Diese acide Gruppe bildet zudem Wasserstoffbrücken mit einer Carbonylgruppe des vermeintlichen Substrates aus (ein Wassermolekül anstelle der Carboxylgruppe in der Eisenkoordinationssphäre könnte sowohl die Wasserstoffbrücke als auch die schlechte Elektronendichte für die modellierte Carboxylgruppe erklären). Weiterhin ist der Abstand vom Eisen (6.26 Å) zu dem Kohlenstoffatom des Substrates, das während der Katalyse oxidiert werden soll, genauso groß wie der des Eisens zum entsprechenden Carbonylsauerstoffatoms in der Produktstruktur (6.22 Å). Der Abstand ist zu groß, um einen direkten Sauerstofftransfer vom Eisen zum Substrat zu erlauben. Letztlich ist es unwahrscheinlich, dass es beim Übergang vom Fe-αKG-Substrat- zum Fe-Succinat-Produkt-Komplex nicht wie hier beschrieben zu signifikanten Veränderungen an der Proteinstruktur kommt. Unter diesen Gesichtspunkten wird angenommen, dass es sich bei dem als Substratstruktur publizierten Komplex um die Produktstruktur handelt. Der Komplex wird im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter für die Diskussion zu einem gemeinsamen Katalysemechanismus berücksichtigt.

Ein Vergleich der aktiven Taschen der Enzyme lässt die Zuordnung weiterer konservierter Bereiche auch in den Fällen zu, in denen keine Metall- oder αKG-Komplexe erhältlich sind. Daher kann für P3H abgeleitet werden, dass H135 (die Seitenkettenlage entspricht der von Thr135 in der AtsK), His43 (die Seitenkettenlage entspricht der von Ser260 in DAOCS) oder Ser170 (CLIFTON, 2001) für die Ausbildung einer analogen Wasserstoffbrücke zur γ–Carboxylgruppe in Frage kommen. Eine Superposition der P3H-Struktur mit den erhältlichen αKG-Komplexen der anderen Enzyme legt nahe, dass His135 die Wasserstoffbrücke ausbildet, da His43 und Ser170 zu weit entfernt liegen (mehr als 5 Å). Neben der Salzbrücke zum Arginin scheint das Vorliegen dieser zweiten Verankerung der γ-Carboxylgruppe der αKG wichtig zu sein, wenngleich diese zweite Enzymseitenkette auf beiden Seiten des Kosubstratmoleküls lokalisiert sein kann. So bilden DAOCS und ANS über ihre Serinseitenketten eine Wasserstoffbrücke mit dem Sauerstoffatom der αKG aus, welches AKG(O4) in AtsK-Struktur entspricht. Alle anderen Enzyme lagern sich von der entgegengesetzten Seite über die Wasserstoffbrücke mit AKG(O3) an die αKG an.

Eine weitere konservierte Einheit der Kosubstratbindestelle ist ein Arginin (Arg279 in AtsK), das eine Wasserstoffbrücke zur α-Carboxylgruppe der αKG ausbildet. Nur im Falle von ANS liegt statt Arginin ein Asparagin (Asn215) an dieser Stelle vor. Arginin bzw. Asparagin scheinen wichtig für die richtige Orientierung der α-Carboxylgruppe der αKG in der Eisenkoordinationssphäre zu sein. Für AtsK, TauD, CAS, P3H und GAB befindet sich diese Koordinationsstelle in trans-Stellung zu His-X-Asp/Glu-X_n-His, wodurch die Position gegenüber dem zweiten Histidin der Triade für die Koordination durch ein Wassermolekül zur Verfügung steht.

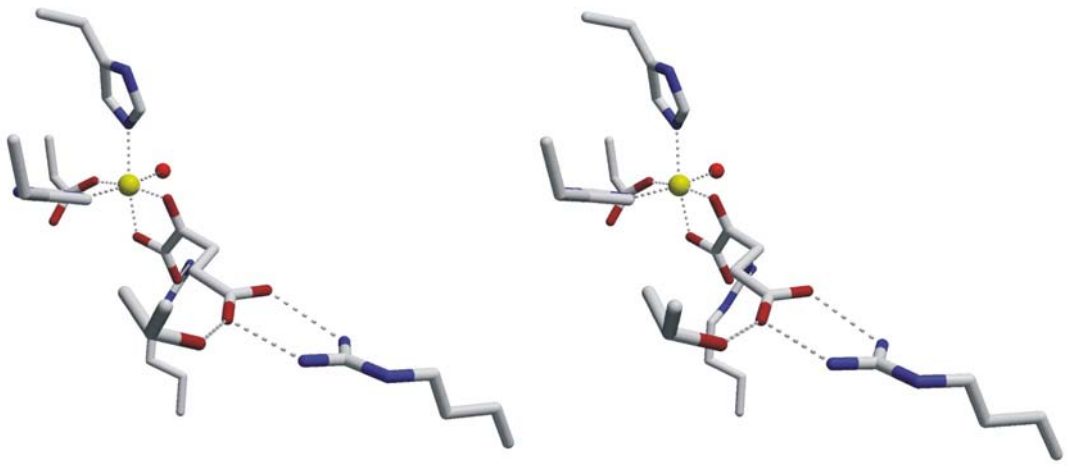


Abb. 48 Stereodarstellung zur Verdeutlichung der αKG-Konformation im Fe-αKG-AtsK-Komplex.

Diese Anordnung der αKG führt zu einer Konformation, in der die α-Carboxylgruppe um 50-90° aus der Ebene der übrigen Atome des Moleküls gedreht ist (siehe Abb. 48).

Im Falle der ANS, der DAOCS und des NO-Komplexes der CAS liegen alle Atome der αKG wie auch im Na-αKG-AtsK-Komplex annähernd in einer Ebene. Das führt dazu, dass in den Fe-αKG-Komplexen von ANS und DAOCS die α-Carboxylgruppe der αKG in der Eisenkoordinationssphäre gegenüber His-X-Asp/Glu-X_n-His liegt. Die sechste Koordinationsstelle befindet sich nun gegenüber His-X-Asp/Glu-X_n-His und wird von einem Wassermolekül besetzt (siehe Abb. 49).

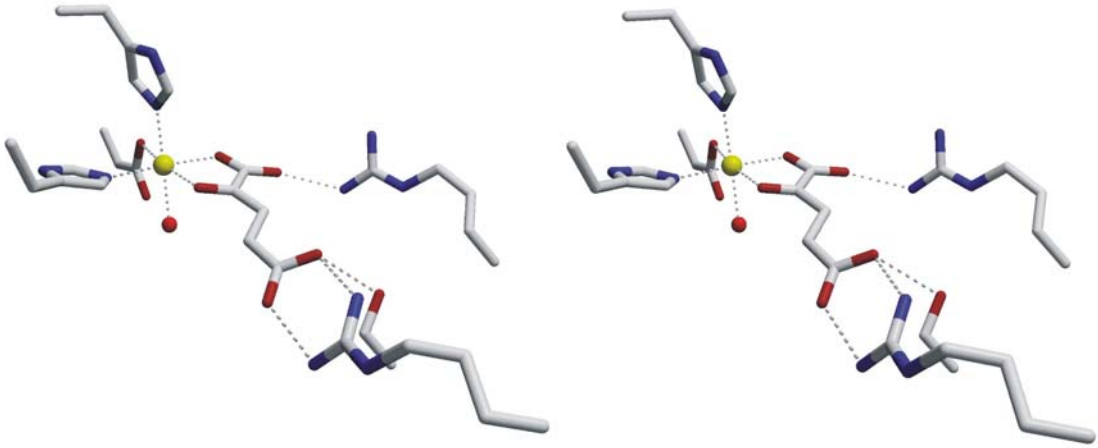


Abb. 49 Stereodarstellung zur Verdeutlichung der αKG-Konformation im Fe-αKG-DAOCS-Komplex.

Die besondere Rolle der an die α-Carboxylgruppe der αKG koordinierenden Arginin- bzw Asparaginseitenkette besteht in der Verbrückung von Fe/αKG-und Substratbindestelle. In den Fe-αKG-Substratkomplexen von AtsK, TauD und CAS bildet das entsprechende Arginin Wasserstoffbrückenbindungen sowohl mit αKG(O2) als auch der Carboxyl- bzw. Sulfat- und Sulfonatgruppe des Substrats aus. Das Substrat befindet sich in diesen Komplexen gegenüber His-X-Asp/Glu-X_n-His. Damit kann im Laufe der Katalyse molekularer Sauerstoff das im Fe-αKG-Komplex an dieser Stelle koordinierende Wasser ersetzen und nach der Decarboxylierung der αKG direkt mit dem Substratmolekül reagieren, ohne dass eine Umlagerung in der Eisenkoordinationssphäre stattfinden muss. Betrachtet man allerdings den Fe-αKG-Substrat-CAS-NO-Komplex als O_2-Komplexanalogon, kann eine Umlagerung während der Reaktion und damit ein alternativer Reaktionsmechanismus nicht ausgeschlossen werden.

Vergleicht man die Substratbindestellen von AtsK und TauD genauer, stellt man fest, dass obwohl in beiden Fällen ein Arginin, ein Histidin und ein Valin etwa an der gleichen Stelle der aktiven Tasche an der Sulfat- bzw. Sulfonatbindung beteiligt sind, sich die Lage der Substrate relativ zum Eisen in beiden Enzymen unterscheidet. Die SO_3-Einheit von Taurin ist im

Vergleich zum Sulfatester um etwa 0.5 Å verschoben und um 25° gedreht, so dass das an den Schwefel gebundene Kohlenstoffatom, welches im Verlauf der Katalyse hydroxyliert wird, das dem Eisen nächste Atom des Substratmoleküls ist. Im Sulfatester ist das ausgehend vom Schwefel übernächste Atom das dem Eisen nächste. Das vierte zu Wasserstoffbrücken befähigte Sauerstoffatom des Sulfatesters bildet zwar nur eine vergleichsweise schwache Wechselwirkung zum langen, flexiblen *loop* der AtsK über Asp167 aus, dies könnte aber zumindest ein Grund für die von der Taurin abweichende Orientierung des Sulfatesters in der aktiven Tasche sein.

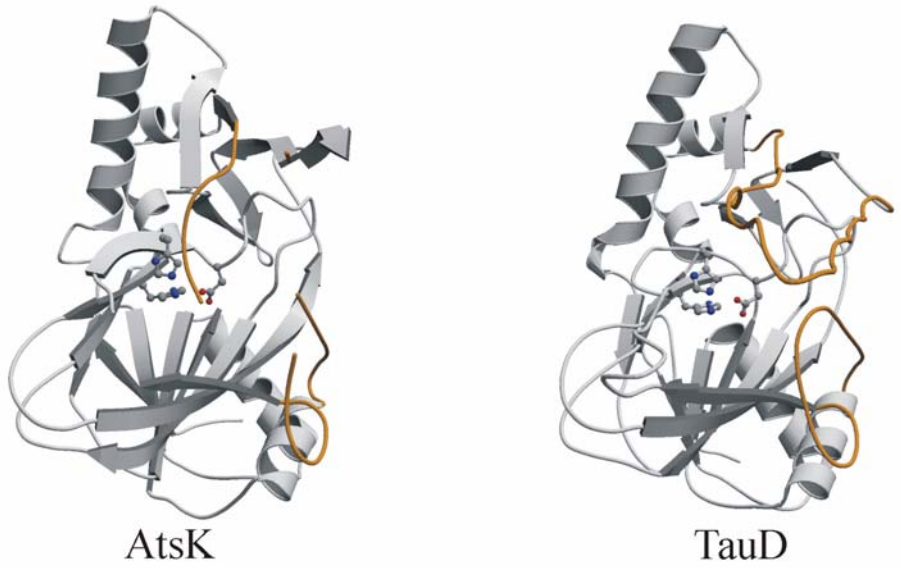


Abb. 50 *Cartoon*-Darstellungen von AtsK (Fe-Succinat-AtsK-Komplex, links) und TauD (rechts) zum Vergleich der Strukturen. Die Bereiche der beiden Proteine, die durch Konformationsänderungen auf die Substratbindung reagieren, sind orange hervorgehoben.

Für TauD konnte gezeigt werden, dass die Substratbindung an zwei Stellen des Proteins eine Konformationsänderung hervorruft. Zum einen verlagert sich der *loop* zwischen den Aminosäuren Leu60 und Asp80, in dem sich die Aminosäure His70 befindet, die direkt an der Sulfonatbindung beteiligt ist, in Richtung der aktiven Tasche und schirmt sie damit stärker ab. Weiterhin erfolgt eine Bewegung der beiden Helices zwischen Phe159 und Asn181. Obwohl die Aminosäuren der Helices weder direkt mit dem Substrat noch mit den Aminosäuren der aktiven Tasche noch mit denen des *loops* zwischen Leu60 und Asp80 interagieren, klappen die Helices bei der Substratbindung auf der Seite der aktiven Tasche über die der Öffnung des *jelly roll*-Zylinders. Diese gleiche Flexibilität scheint auch bei der AtsK aufzutreten, denn die nicht modellierbaren *loops* zwischen Ala80-Pro85 und Glu165-Tyr191 entsprechen diesen beiden Regionen in der TauD-Struktur. Ein möglicher Grund, warum diese Aminosäuren in der Substrat-Struktur der AtsK nicht modelliert werden konnten, könnte die niedrige Besetzung der Substratlage sein. Weiterhin könnten fehlende Bewegungsfreiheit im Kristall aufgrund von

Packungseffekten (die Substratmoleküle wurden durch *soak*-Experimente eingeführt) oder der Umstand, dass es sich bei den eingesetzten Substraten nicht um die natürlichen Substrate handelt, verantwortlich dafür sein.

Für die übrigen Enzyme liegt weder ein Substrat- noch ein Produkt-Komplex vor. Ein Vergleich der aktiven Taschen der Enzyme ermöglicht aber zumindest die Zuweisung potentieller Substratbindestellen im Falle von DAOCS und P3H.
In DAOCS koordiniert Arg162 analog Arg279 in der AtsK-Struktur an die α-Carboxylgruppe der αKG. Eine Wasserstoffbrücke zwischen Arg162 und der Carboxylgruppe des Substrates Penicillin N würde das Substrat so positionieren, dass sich die C-C-Bindung, an der im Laufe der Reaktion die oxidative Ringerweiterung stattfindet, an das Eisenzentrum anlagern kann.
Für P3H kommen drei verschiedene Argininseitenketten (Arg95, Arg97 and Arg122) als Linker zwischen dem Kosubstrat und dem Substrat in Betracht. Diese drei Arginine sind miteinander über Wasserstoffbrücken verbunden. Am wahrscheinlichsten kommt Arg122 die verbrückende Funktion zu. Arg95 und Arg97 liegen etwas weiter von der Kosubstratbindestelle entfernt, könnten aber über Wasserstoffbrücken in der Substratbindung involviert sein.

6 Diskussion

6.1 Substrate der AtsK: Sulfatester vs. Sulfonate

Die unter Schwefelmangel und in Gegenwart von Sulfatestern von *Pseudomonas putida* S-313 exprimierte Dioxygenase AtsK wurde hinsichtlich verschiedener aliphatischer Sulfatester als Substrate eingehend untersucht (KAHNERT UND KERTESZ, 2000). Die Kettenlänge der aliphatischen Reste geeigneter Sulfatester variiert zwischen drei und zwölf Kohlenstoffatomen, wobei auch Sulfatester mit verzweigten Resten umgesetzt werden. Die größten Werte für die Michaelis-Konstante K_m werden für Heptyl- und Octylsulfatester erreicht. Als Produkte der Sulfatesterspaltung wurden Sulfat und der jeweilige Aldehyd nachgewiesen. Demnach bildet sich bei der Oxidation des Substrates zunächst die an C1 hydroxylierte Spezies. Bei dieser Charakterisierung der AtsK konnte jedoch keine eindeutige Zuordnung eines natürlichen Substrats getroffen werden.

Kristallstrukturen von AtsK-Sulfatester-Komplexen konnten für Hexylsulfat und 2-Ethyl-hexylsulfat erhalten werden. Butylsulfat konnte im Kristall weder nach *soaking* noch nach Kokristallisation mit Butylsulfat nachgewiesen werden. Dies wird auf die durch die Michaelis-Konstante ausgedrückte niedrige Affinität der AtsK zu diesem Substrat zurückgeführt. Umgekehrt zersetzen sich die Kristalle beim *soaking* mit Octylsulfat, zu welchem AtsK eine gegenüber Hexylsulfat und 2-Ethyl-hexylsulfat hohe Affinität aufweist. Die Koordination von Octylsulfat führt am Enzym möglicherweise zu einer Konformationsänderung von so großem Ausmaß, dass diese außerhalb der durch den Kristallverband gegebenen Bewegungsfreiheit des Proteins liegt.

Die Kristallstrukturen der AtsK-Substrat-Komplexe zeigen eine mit dem TauD-Taurin-Komplex übereinstimmende Substratbindung. Bei Taurin handelt es sich um ein Sulfonat, welches von TauD zu Sulfit und Aminoacetaldehyd umgesetzt wird (EICHHORN, 1997). Obwohl im Vorfeld bekannt war, dass AtsK aus Taurin kein Sulfit freisetzt (KAHNERT UND KERTESZ, 2000), wurde versucht, die Struktur eines AstK-Sulfonat-Komplexes zu bestimmen. Im Rahmen eines *soaking*-Experimentes gelang es, Heptylsulfonat in die aktive Tasche der AtsK einzulagern. Die Koordination des Sulfonates durch das Enzym entspricht der bei den Sulfatestern beobachteten, die Lage des Moleküls ist jedoch relativ zum Eisen verschoben (siehe Kapitel 5.2.7). Dadurch wird das an das Schwefelatom gebundene Kohlenstoffatom das dem Eisen nächste Atom. Gleichzeitig verringert sich der Abstand zwischen Schwefel und Eisen. Nach der Bestimmung dieser Kristallstruktur wurde AtsK auf die Fähigkeit untersucht,

nicht nur aus Taurin, sondern auch aus anderen aliphatischen Sulfonaten Sulfit freizusetzen (TRALAU UND KERTESZ, persönliche Mitteilung). Dafür wurden Sulfonate mit Kettenlängen von 3-7 Kohlenstoffatomen eingesetzt. Sulfit konnte aber in keinem der Fälle als Produkt nachgewiesen werden. Statt dessen wurde bei allen Ansätzen die Freisetzung von Sulfat beobachtet (siehe Abb. 51).

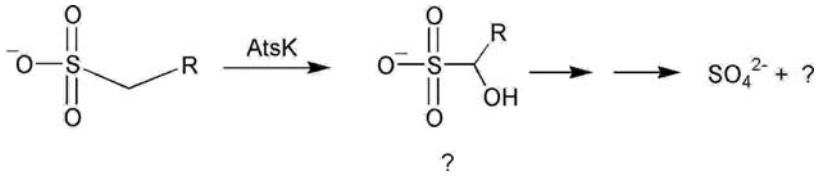


Abb. 51 Durch AtsK wird aus Sulfonaten Sulfat freigesetzt. Die Existenz des hier gezeigten Hydroxysulfonats als Katalyseintermediat ist nicht gesichert.

Vergleicht man die Menge an bei der Sulfonatspaltung freigesetztem Sulfat mit der bei der Hexylsulfatspaltung auftretenden, erhält man Werte von ca. 10% für Pentylsulfonat bis ca. 75% für Hexylsulfonat. Damit ist die Aktivität der AtsK gegenüber Sulfonaten vergleichbar mit der gegenüber den kurzkettigen Sulfatestern und etwa eine Größenordnung geringer als die gegenüber Heptyl- oder Octylsulfat. Auf welche Weise bei der Spaltung von Sulfonaten durch AtsK Sulfat gebildet wird, ist nicht bekannt. Weiterhin ist noch nicht geklärt, ob der aliphatische Rest wie auch nach der Sulfatesterspaltung als Aldehyd vorliegt. Legt man einen Mechanismus analog der Sulfatesterspaltung zugrunde, so sollte zunächst aus αKG Succinat und CO_2 und aus dem Sulfonat das entsprechende 1-Hydroxylsulfonat gebildet werden. Dieses sollte dann in Analogie zur Taurinspaltung durch TauD zu Sulfit und dem Aldehyd zerfallen. Nachfolgend müsste die Oxidation des Sulfits in einem zweiten Katalysezyklus erfolgen. Da kein Sulfit in der Lösung nachgewiesen werden konnte, muss dass das Sulfit bis zur Oxidation in der aktiven Tasche verbleiben. Nachdem Succinat durch αKG ersetzt wurde, kann das Enzym das Sulfit zu Sulfat oxidieren. Diese Reaktionsfolge könnte durch ein Experiment, bei dem der Verbrauch von αKG in Gegenwart von Sulfit gemessen wird, bestätigt werden. Alternativ könnte man die Menge der umgesetzten αKG bei der Spaltung von Sulfonaten gegenüber der bei der Sulfatesterspaltung umgesetzten Menge bestimmen. Weiterhin könnte ein Sulfit-AtsK-Komplex kristallographisch untersucht werden, wobei die Koordination von Sulfit an das Protein nicht zwangsläufig bedeutet, dass es von AtsK oxidiert werden kann. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die AtsK möglicherweise nur durch Interaktion mit dem bei der Sulfonatspaltung entstandenen Aldehyd in der Lage ist Sulfit zu oxidieren, frei in der Lösung vorliegendes jedoch nicht oxidieren kann.

Neben diesem Mechanismus, bei dem die Oxidation des Schwefels in einem der Sulfonatspaltung nachfolgenden Schritt stattfindet, ist ein weiterer denkbar, bei dem das Sauerstoffatom vom Eisen statt auf das Kohlenstoffatom C1 auf das Schwefelatom des Sulfonats übertragen wird. Dass dies prinzipiell möglich ist, konnte die Kristallstruktur des Sulfonat-Komplexes zeigen. Darin liegt der Eisen-Schwefel-Abstand mit etwa 3.9 Å in der gleichen Größenordnung wie der Eisen-Kohlenstoffabstand in der Fe-αKG-Sulfatester-Struktur. Im Anschluss an die Schwefeloxidation könnte es zu einer Umlagerung am Schwefelatom kommen, bei der ein Sulfatester entsteht, der entweder nachfolgend oxidiert oder hydrolytisch gespalten wird.

Da zum Ablauf der Sulfonatspaltung erst wenige Resultate vorliegen, wird der Katalysemechanismus für die AtsK im folgenden Kapitel nur am Beispiel der Sulfatesterhydroxylierung diskutiert. Der postulierte Mechanismus sollte jedoch auf den der Sulfonat- bzw. Sulfithydroxylierung übertragbar sein.

6.2 Der Katalysemechanismus

In Abb. 52 ist ein Reaktionsmechanismus für die αKG-abhängigen Dioxygenasen, abgeleitet vom von Hanauske-Abel *et al.* vorgeschlagenen Mechanismus (HANAUSKE-ABEL, 1982), in allgemeiner Form dargestellt. Ausgangszustand für die Katalyse ist der Fe(II)-αKG-Enzymkomplex. Wie kinetische Studien gezeigt haben (HOLME, 1975; RYLE, 1999), beginnt der Katalysezyklus mit der Koordination von Substrat an diesen Komplex. Im Falle der AtsK wird das Substrat über drei Wasserstoffbrückenbindungen zum Hauptkettenatom Val111(N) und den Seitenkettenatomen Arg279(Nχ2) und H81(Nε2) in der aktiven Tasche fixiert. Die Verdrängung des zuvor an das Eisen koordinierenden Wassermoleküls durch die Substratbindung trägt zur Aktivierung des Komplexes für die Sauerstoffbindung bei. Die fünffach-Koordination des Eisens scheint aber keine zwingende Voraussetzung für die Sauerstoffbindung zu sein, da bei einem der für die CAS untersuchten Substrat-Enzym-Komplexe auch nach der Substratbindung an das Protein ein Wassermolekül an das Eisen koordinierte (ZHANG, 2000). Wenn das Wassermolekül bei der Substratbindung immer noch am Eisen koordiniert bleibt, muss das Sauerstoffmolekül im nächsten Katalyseschritt (HOLME, 1975) den labilsten Liganden am Eisen verdrängen. Dass es sich dabei um das Wassermolekül handelt, lässt der Na-αKG-AtsK-Komplex vermuten. Anders als im entsprechenden Fe-αKG-AtsK-Komplex befindet sich in der Koordinationssphäre des gegenüber Eisen weniger positiv geladenen Natriumatoms kein Wassermolekül.

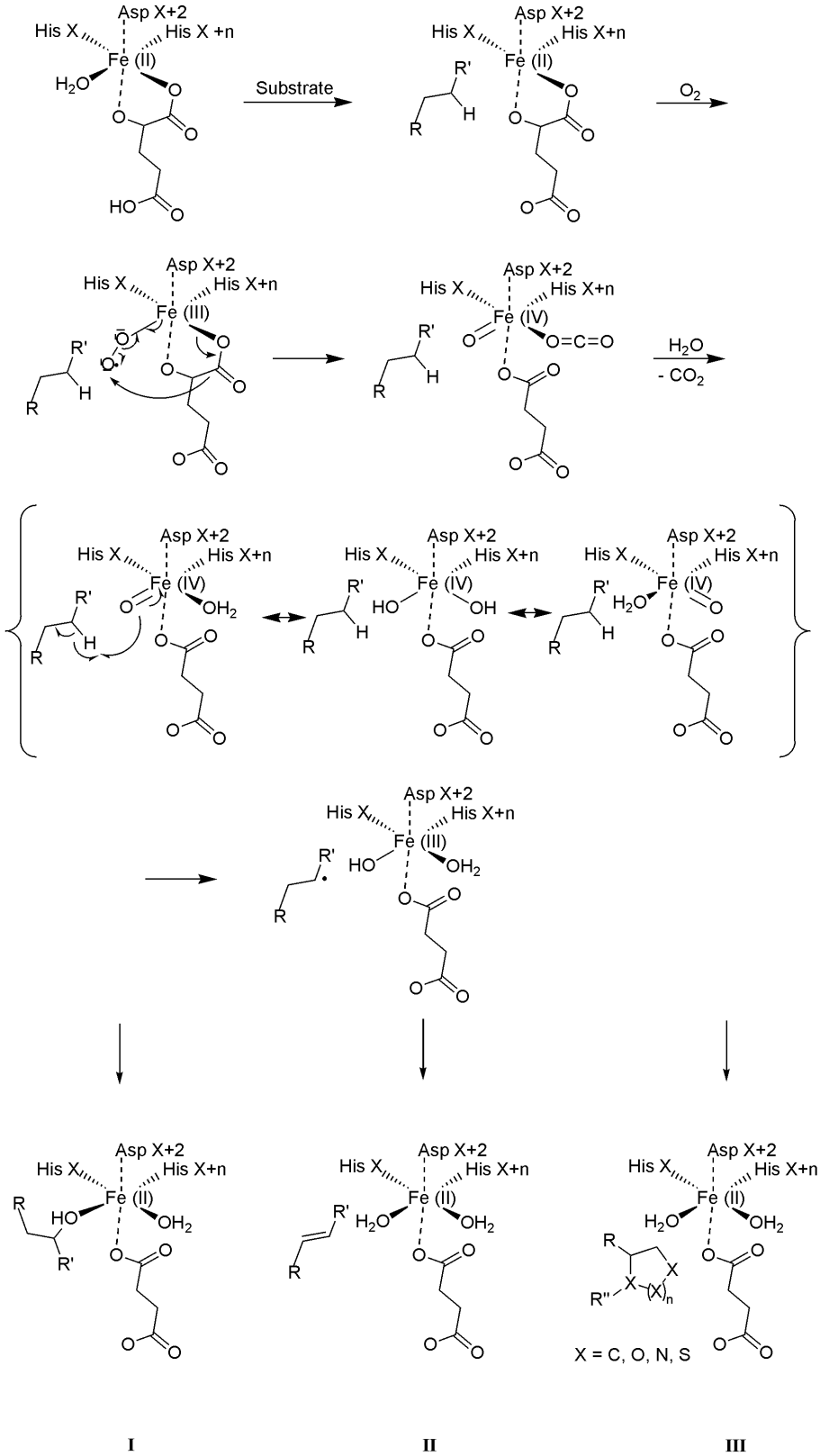


Abb. 52 Vorschlag für den Katalysemechanismus der αKG-abhängigen Dioxygenasen. Nach der Anlagerung von Substrat an den Fe(II)-αKG-Proteinkomplex startet mit der Koordination von Sauerstoff die Reaktionskaskade: Im ersten Schritt wird die αKG decarboxyliert und es entstehen Succinat und CO_2.

Ob die Substitution des gebildeten Kohlendioxids durch Wasser wie hier dargestellt abläuft, ist nicht geklärt. Da jedoch für einige Enzyme ein von Wasser stammendes Sauerstoffatom in den Produkten nachgewiesen werden konnte, ist die CO_2-Substitution wahrscheinlich. Die bei der Decarboxylierung entstandene Ferrylspezies Fe(IV)=O reagiert unter Protonenabstraktion mit dem Substrat. Dabei werden eine Radikalzwischenstufe und ein Fe(III)-OH-Komplex gebildet. Die Produktfreisetzung aus dem Radikal erfolgt über zwei alternative Wege, bei denen entweder ein OH-Radikal vom Eisen auf das Substrat übertragen wird oder ein weiteres Wasserstoffradikal abgespalten wird. Beide Wege führen zur Regeneration des Fe(II)-Enzymkomplexes.

Für CAS ist die Kristallstruktur des CAS-Fe(II)-αKG-Deoxyguanidinoproclavaminsäure-NO-Komplexes (ZHANG, 2002) bekannt. Desoxyguanidinoproclavaminsäure wird durch CAS hydroxyliert und zu Guanidinoproclavaminsäure umgesetzt. In diesem CAS-NO-Komplex bindet das Sauerstoffanalogon NO an der Unterseite der aktiven Tasche gegenüber dem Substrat an das Eisen. Diese Koordinationsstelle ist nicht von der zum Lösungsmittelbereich offenen Substratbindeseite her erreichbar. Die Autoren vermuten, dass das Sauerstoffmolekül die Bindestelle über einen hydrophoben Tunnel im Inneren des *jelly roll*-Zylinders erreicht, vorausgesetzt, dass NO und O_2 auf die gleiche Art an das Eisen koordinieren. Ein Vergleich mit der Fe-αKG-Substrat-Struktur der AtsK zeigt, dass Aminosäurenseitenketten das Innere des *jelly roll*-Zylinders ausfüllen. Eine Diffusion von O_2 durch diesen Zylinder ist unwahrscheinlich. Die Anlagerung des Sauerstoffmoleküls an das Eisen von der Substratseite her an die Koordinationsstelle, die zuvor durch Wasser besetzt wurde, ist dagegen möglich.

Nach der Anlagerung von Sauerstoff an das Eisen folgt im nächsten Schritt die Oxidation des Kosubstrates, bei der ein Sauerstoffatom auf AKG(C2) übertragen wird. Die αKG wird in der Folge unter Bildung von Succinat und CO_2 decarboxyliert. Dieser irreversible Schritt stellt vermutlich die Triebkraft bis zu diesem Punkt der Katalyse dar. Es ist wahrscheinlich, dass die an die α-Carboxylgruppe der αKG koordinierende Argininseitenkette (Asn im Falle von ANS) nach der Decarboxylierung Wasserstoffbrücken zum entstandenen CO_2 ausbildet. In den Substrat-Komplex-Strukturen von AtsK, CAS und TauD bildet diese Argininseitenkette neben der Wasserstoffbrücke zur αKG weitere zum Substrat aus. Dies und die Tatsache, dass diese Aminosäure unter den αKG-abhängigen Dioxygenasen konserviert ist, unterstützt die Vermutung, dass diese Aminosäure als Steuerungselement maßgeblich an der Katalyse beteiligt ist. Durch sie wird sichergestellt, dass die Decarboxylierung erst einsetzt, wenn das Substrat an das Enzym koordiniert.

Die durch die Abspaltung von CO_2 frei werdende Koordinationsstelle am Eisen könnte entweder von einem Wassermolekül oder im Falle einer zweizähnigen Koordination durch Succinat besetzt werden.

Das zweite Sauerstoffatom von O_2 verbleibt unter der Bildung einer kurzlebigen Fe(IV)=O-Spezies (PRICE, 2003) am Eisen. Das Ferrylintermediat Fe(IV)=O abstrahiert im nächsten

Schritt ein Wasserstoffatom vom Substrat und geht dabei unter Reduktion des Eisens in eine Fe(III)-OH-Spezies über. Sollte das Sauerstoffmolekül tatsächlich wie das NO-Molekül im CAS-Fe(II)-αKG-Deoxyguanidinoproclavaminsäure-NO-Komplex an das Eisen koordinieren, stellt sich an dieser Stelle die Frage, wie das Wasserstoffradikal von der Deoxyguanidinoproclavaminsäure auf das Sauerstoffatom am Eisen übertragen wird. In Abb. 53 sind die beiden alternativen Geometrien für den Komplex nach der Decarboxylierung dargestellt.

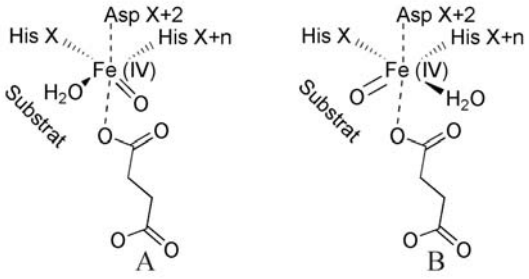


Abb. 53 Darstellung der alternativen Geometrien für den Fe(IV)=O-Succinat-Substrat-Komplex.

Im sich aus dem NO-analogen Komplex ergebenden Fall A liegt Sauerstoffatom sehr weit vom Substrat entfernt. In Komplex B ist eine Übertragung des Wasserstoffatoms ohne Änderung der Koordinationssphäre möglich. Nach der Wasserstoffübertragung reagiert das entstandene Substratradikal dann weiter zum Produkt (siehe Abb. 54 und Abb. 56).

Bei der Katalysereaktion von AtsK, TauD, P3H, ANS und dem ersten CAS-katalysierten Schritt der Clavaninsäuresynthese wird eine Hydroxylgruppe vom Eisen auf das Substrat übertragen (VIKLUND, 1999). Die im Falle von AtsK und TauD gebildeten primären Produkte Hydroxylsulfat und Hydroxylsulfonat zersetzen sich nachfolgend zum entsprechenden Aldehyd und Sulfat bzw. Sulfonat. Das Hydroxylierungsprodukt der ANS geht nachfolgend unter Wasserabspaltung in ein 1,2-Diketon über, welches über Keto-Enol-Tautomerie zu einem aromatischen System führt. Interessanterweise stammt das übertragene Sauerstoffatom in den hydroxylierten Produkten nicht ausschließlich von O_2 sondern auch von H_2O, wie Experimente mit isotopenmarkierten Reagenzien an anderen Dioxygenasen zeigen konnten (BALDWIN, 1991; SABOURIN UND BIEBER, 1982). Das Wassermolekül muss bei der Hydroxylübertragung mit dem Eisen in Kontakt stehen, wenn das gebildete Fe(III) nachfolgend wieder in Fe(II) übergehen und für den nächsten Katalysezyklus zur Verfügung stehen soll.

In Abb. 52 ist der Austausch von einem aus O_2 stammenden Sauerstoffatom gegen ein aus einem Wassermolekül stammendes Sauerstoffatom an der Ferrylspezies gezeigt. Alternativ ist der Austausch auch nach der Reaktion der Fe(IV)=O-Spezies mit dem Substratmolekül denkbar.

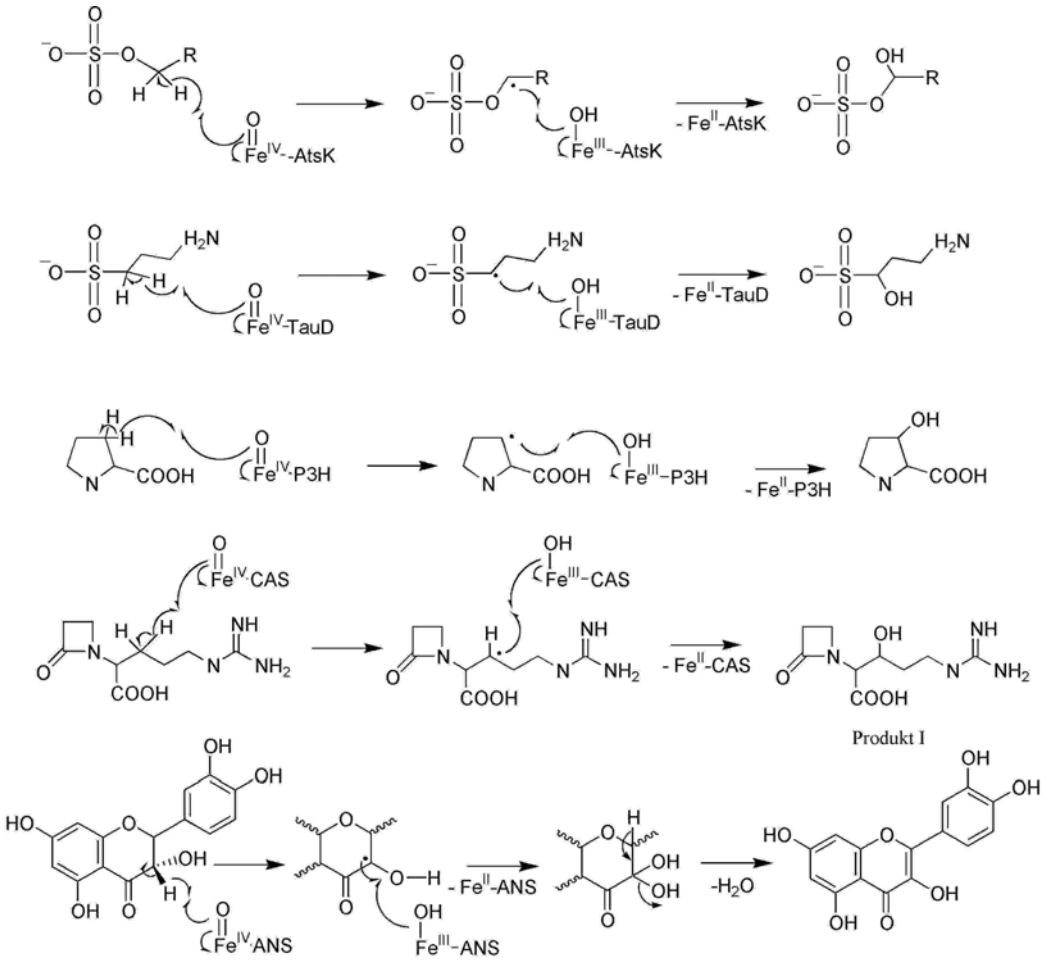


Abb. 54 Darstellung der Hydroxylierungsreaktionen, die durch die Enzyme AtsK, TauD, P3H, CAS und ANS katalysiert werden.

Eine Reaktion mit nicht an Eisen gebundenem Wasser würde erstens reaktive Spezies freisetzen, die zu unkontrollierten Folgereaktionen führen könnten und zweitens würde kein geschlossener Katalysezyklus durchlaufen. Eine solche von der Eisenreduktion abgekoppelte Hydroxylierung scheint vor allem für die Enzyme, die Hydroxylierungen katalysieren, als Nebenreaktion abzulaufen, da die Gegenwart des Reduktionsmittels Ascorbat durch Reduktion von inaktiven Fe(III)-Komplexen die Katalyserate erhöht (MORI, 1997). Wie diese Reaktivierung des Enzyms durch Ascorbinsäure abläuft, ist nicht bekannt (siehe Abb. 55).

Es ist nicht klar, ob die Ascorbinsäure das sich in der aktiven Tasche des deaktivierten Enzyms befindliche Fe(III) reduziert. Die Koordination von Ascorbinsäure, die eine Reduktion des Eisens in der aktiven Tasche erlauben würde, konnte bislang für keines der Enzyme nachgewiesen werden. Alternativ könnte sie auch das in der wässrigen Lösung durch Luftsauerstoff oxidierte Eisen reduziert. Die Konzentration des freien Fe(II) in der Lösung

bliebe dadurch konstant und Fe(II) stünde zur Substitution von an das Enzym gebundene Fe(III) zur Verfügung.

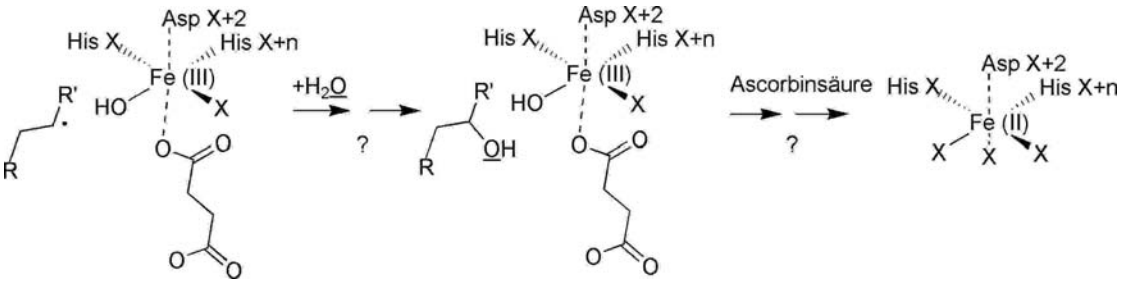


Abb. 55 Darstellung der von der Eisenreduktion abgekoppelte Hydroxylierung des Substrats. Durch Zusatz von Ascorbinsäure kann die inaktive Fe(III)-Spezies reaktiviert werden. Über den Mechanismus beider Reaktionen ist nichts bekannt.

Im Falle von DAOCS und dem zweiten und dritten Schritt der Clavaminatsynthese durch CAS schließen sich der ersten eine zweite Wasserstoffradikalabstraktion am Substrat durch die Fe(III)-OH-Spezies an. In der Folge erfährt das Substrat der DAOCS eine Ringerweiterung mit anschließender Entsättigung. CAS katalysiert im zweiten Schritt der Clavaminsäuresynthese eine Ringschlußreaktion und im dritten die Ausbildung einer Doppelbindung (siehe Abb. 56). Bei der Katalysereaktion der Deacetoxy/Deacetylcephalosporin-C-Synthase (DAOC/DAC-Synthase) aus *Cephalosporium acremonium*, die mit der DAOCS aus *Streptomyces clavuligerus* verwandt ist, wird ebenfalls nach der Ringerweiterung eine Doppelbindung an Penicillin N ausgebildet. Als Nebenreaktion wurde aber auch eine Hydroxylierung nach der Ringerweiterung beobachtet. Das dabei übertragene Sauerstoffatom stammt in Analogie zu den Hydroxylierungsprodukten der oben beschriebenen Enzyme nur zum Teil von O_2. Aufgrund der Sequenzidentität von 56% zwischen DAOCS und der DAOC/DAC-Synthase ist eine ähnliche Struktur und damit der gleiche Katalysemechanismus für die beiden Enzyme wahrscheinlich. Dies vorausgesetzt und die Beobachtung, dass CAS sowohl Hydroxylierungen als auch Oxidationen ohne Sauerstoffübertragung katalysiert, sprechen für einen gemeinsamen Mechanismus der enzymatischen Oxidation, bei dem der chemische Charakter des Substrats und der Zwischenprodukte über die Art der Oxidation entscheiden. Zwei alternative Mechanismen für die Reaktionen mit und ohne Sauerstoffübertragung können aber aufgrund dieser Beobachtungen nicht ausgeschlossen werden.

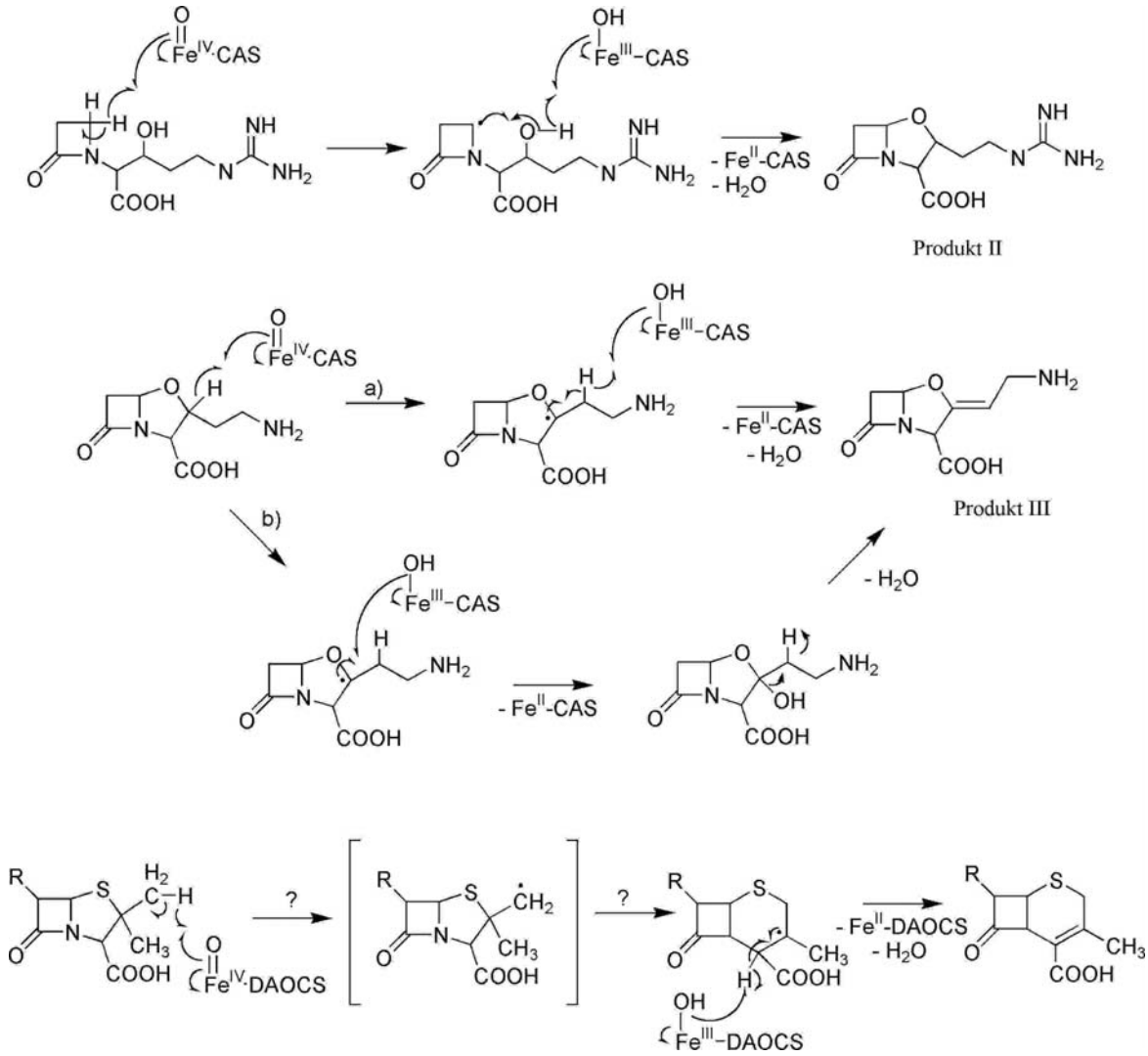


Abb. 56 Darstellung der Produktbildung ohne Hydroxidübertragung bei der Katalyse durch die Enzyme CAS und DAOCS. Im Falle von DAOCS führt die intramolekularen Reaktion des Substratradikals zu Ringerweiterung und Ausbildung einer Doppelbindung. Bei der zweiten von CAS katalysierten Stufe der Clavaminatsynthese unterliegt die Radikalspezies ebenfalls einer Zyklisierung, bei der dritten Stufe kommt es zur Ausbildung einer Doppelbindung. In diesen beiden Fällen ist es wahrscheinlich, dass der Verlauf der Reaktion dadurch gesteuert wird, dass das Substrat so an das Eisenzentrum angelagert ist, dass die Abspaltung eines weiteren Wasserstoffatoms durch die Fe(III)-OH-Spezies nur genau an einer Stelle des Moleküls erfolgt.

6.3 Ungekoppelte Kosubstratoxidation und Selbsthydroxylierung

Bei der ungekoppelten Kosubstratoxidation handelt es sich um die Decarboxylierung der αKG, die in Abwesenheit von Substrat erfolgt. Es entsteht eine Fe(III)-Spezies, die katalytisch inaktiv ist. Die ungekoppelte Kosubstratoxidation tritt in Gegenwart von Substrat nur in untergeordnetem Maße auf, da die Geschwindigkeit dieser Reaktion deutlich geringer als die der substratgekoppelten Oxidation ist. Die sehr viel größere Reaktionsgeschwindigkeit für die Sauerstoffbindung in Anwesenheit von Substrat lässt sich damit erklären, dass im substratfreien αKG-Fe-Enzym-Komplex anders als im entsprechenden Substratkomplex alle sechs Positionen der oktaedrischen Eisenkoordinationssphäre besetzt sind und Sauerstoff bei der Koordination an Eisen einen Liganden verdrängen müsste. Die Ergebnisse der XAS-Messung an der AtsK, nach denen das Eisen in der aktiven Tasche in Gegenwart von αKG und Sauerstoff und in Abwesenheit von Substrat von Fe(II) nach Fe(III) übergeht, legen nahe, dass auch im Falle von AtsK, neben der erwünschten an die Substratbindung und -oxidation gekoppelte, auch eine ungekoppelte Decarboxylierung der α-KG stattfinden kann.

Die ungekoppelte Decarboxyierung wurde für die Enzyme TauD und TfdA aus *Ralstonia eutropa* eingehend untersucht. TfdA katalysiert den ersten Abbauschritt des Herbizids 2,4-Dichlorophenoxyacetessigsäure über eine Hydroxylierung mit nachfolgender Halbacetalspaltung (FUKUMORI UND HAUSINGER, 1993). Sie zeigt sowohl mit TauD als auch mit AstK etwa 30% Sequenzhomologie, eine Kristallstruktur des Enzyms ist bislang nicht verfügbar. Mit Hilfe der Strukturen von TauD und CAS wurde eine Struktur für TfdA modelliert (ELKINS, 2002), die hier jedoch nicht weiter diskutiert wird. TfdA wird nachfolgend in die Diskussion einbezogen, da sie eine der durch spektroskopische Methoden am ausführlichsten untersuchte αKG-abhängige Dioxygenase ist, für die insbesondere die ungekoppelte αKG-Decarboxylierung studiert wurde (SAARI UND HAUSINGER, 1998).

Für P4H (MYLLYLÄ, 1984) konnte gezeigt werden, dass Ascorbinsäure auch nach der ungekoppelten Decarboxylierung der αKG zur Reaktivierung des Enzyms in der Lage ist. Im Falle von TauD und TfdA kann Ascorbinsäure die Inaktivierung der Enzyme in Gegenwart von Sauerstoff und Abwesenheit von Substrat nur teilweise umkehren. Diese Inaktivierung führt somit zu mindestens zwei Folgeprodukten (SAARI UND HAUSINGER, 1998). Bei der umkehrbaren Inaktivierung tritt vermutlich eine Oxidation des Eisens ohne Veränderungen am Protein oder Oxidation des Kosubstrates auf; mit der irreversiblen Inaktivierung könnte eine Autooxidation des Proteins verbunden sein. Die für TauD und TfdA nachgewiesene Hydroxylierung von Tyr- bzw. Trp-Seitenketten könnte Schutz vor unkontrollierten Radikalreaktionen der reaktiven Ferrylspezies bieten. Mutationsexperimente zeigten, dass bei

der TauD Tyr73 in DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin) umgewandelt und im Falle der TfdA Trp112 hydroxyliert wird (RYLE, 2003a, LIU, 2001). Im Rahmen von UV/VIS-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass ~33% von TauD bei Abwesenheit von Substrat an Tyr73 modifiziert werden (RYLE, 2003a), bei der TfdA gehen über 90% in den Autoxidationskomplex über (LIU, 2001). Entsprechende Untersuchungen existieren für AtsK nicht. Die Kristallstruktur des Fe-Succinat-AtsK-Komplexes, in der die Seitenkette von Tyr168 an das Eisen koordiniert, legt jedoch nahe, dass diese Aminosäure für eine solche Hydroxylierung zur Verfügung steht. Eine Anlagerung der Seitenkette im unter aeroben Bedingungen hergestellten Fe-αKG-Komplex wurde jedoch nicht beobachtet. Tyr168 entspräche in seiner Schutzfunktion Tyr73 in TauD, wenngleich die Lage der beiden Aminosäuren in der Sequenz nicht identisch ist. Tyr168(AtsK) liegt auf dem großen flexiblen *loop*, der den beiden α-Helices in der TauD-Struktur entspricht, die mit einem Umklappen in eine geschlossene Form auf die Substratbindung reagieren, jedoch nicht mit dem Substrat oder anderen Aminosäuren der aktiven Tasche interagieren. Tyr73(TauD) hingegen liegt auf dem kurzen flexiblen *loop*, der ebenfalls mit einer Umorientierung auf die Substratbindung reagiert und über eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Sulfonatgruppe und His70(TauD) als Analogon zu His81 in der AtsK-Struktur direkt an der Substratbindung beteiligt ist. Die gleichartige Funktion wird daraus abgeleitet, dass die Eisenkoordination durch das Tyr-OH von der Substratbindeseite aus erfolgt, auch wenn die Lage der beiden Tyr in der Sequenz unterschiedlich ist.

Im ersten Schritt der Autoxidation erfolgt vermutlich auf die gleiche Weise wie im normalen Reaktionszyklus die Decarboxylierung der αKG. Dabei wird ein Sauerstoffatom des molekularen Sauerstoffs auf die αKG übertragen und es entsteht die Ferrylspezies Fe(IV)=O, welche, wie im Rahmen von kinetischen Untersuchungen des Katalysemechanismus der TauD gezeigt, als kurzlebig und reaktiv angesehen werden muss (PRICE, 2003).

Über den Mechanismus des nachfolgenden Schrittes der Seitenkettenhydroxylierung ist bislang wenig bekannt. Markierungsexperimente mit $H_2{}^{18}O$ konnten für TauD (RYLE, 2003a) und TfdA (LIU, 2001) zeigen, dass bei der Hydroxylierung des Aromaten das übertragene Sauerstoffatom ausschließlich von Wasser und nicht von O_2 stammt. Liu *et al.* schlagen einen Mechanismus analog dem schon für die Substratoxidation diskutierten vor. Danach erfolgt die Äquilibrierung der Fe(IV)=O oder der Fe(III)-OH-Spezies mit Wasser, bevor es zur oxidativen Hydroxylierung des Aromaten kommt. Bei der Übertragung des OH-Radikals vom Eisen auf den Aromaten würde Eisen zu Fe(II) reduziert. Dem widerspricht die Beobachtung, dass TfdA nach der Selbsthydroxylierung als Fe(III)-O-Trp-TfdA vorliegt (LIU, 2001). Die Autoren bieten für diesen Widerspruch keine Erklärung. Ryle *et al.* schlagen nach entsprechenden Untersuchungen an TauD, bei denen ebenfalls ein Fe(III)-Komplex gefunden wurde, eine Oxidation des Eisens

nach der Bildung des Fe(II)-O-Tyr-TauD-Komplexes vor (RYLE, 2003a). Der Mechanismus dafür ist jedoch offen. Wenn die Hydroxylierung der aromatischen Seitenkette aber genau wie die der Substrate abläuft, sollte das Sauerstoffatom wie in den Produkten auch zum Teil vom molekularen Sauerstoff stammen, was allerdings nicht beobachtet wird.

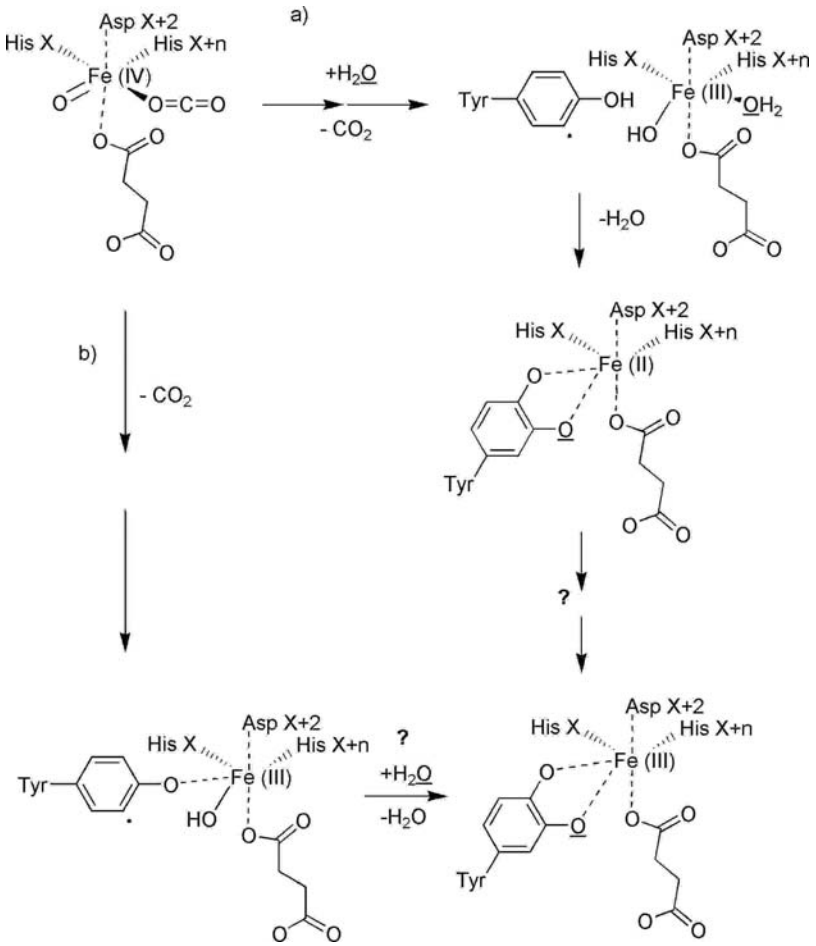


Abb. 57 Möglicher Mechanismus der Tyr-Hydroxilierung im Anschluss an die von der Substratbindung abgekoppelten α-KG-Decarboxylierung. In Markierungsexperimenten wurde gezeigt, dass der auf den Aromaten übertragene Sauerstoff ausschließlich von Wasser stammt. a) Bei einer Übertragung von OH durch das zuvor an Eisen koordinierte Wasser ginge Fe wieder in die reduzierte Form über. Da der Tyr-Komplex als Fe(III)-Komplex vorliegt, muss nachfolgend eine Oxidation des Eisens stattfinden. b) Ein nicht an Eisen gebundenes Wassermolekül reagiert mit dem Tyr-Radikal.

Alternativ wäre eine Einelektronen-Oxidation des Aromaten durch die Ferrylspezies denkbar, in deren Folge das entstandene Tyr- bzw. Trp-Radikal mit einem nicht an das Eisen koordinierten Wassermolekül reagiert. In der Folge träten weitere reaktive Spezies auf und die Selbsthydroxylierung böte keine Schutzfunktion.

Eine dritte Möglichkeit stellt das Abfangen freier OH-Radikale durch die aromatischen Seitenketten dar. In der aktiven Tasche von TauD liegen neben Tyr73 drei weitere aromatische

Aminosäuren (Tyr256, Trp248 und Trp128) in der Nähe des Metallzentrums vor. Wenn die Seitenkettenhydroxylierung über die Reaktion mit einem freien Radikal abläuft, sollte die Hydroxylierung aller aromatischen Seitenketten in der Nähe des Eisens beobachtet werden. TauD wurde hinsichtlich der Tyrosinhydroxylierung untersucht und es wurde ausschließlich die Hydroxylierung von Tyr73 nachgwiesen (RYLE, 2003a).

Weiterhin bleibt offen, warum die Aktivität des TfdA nach der Inaktivierung durch Behandlung mit dem Reduktionsmittel Dithionit und nachfolgender Dialyse gegen EDTA und Zusatz von Fe(II) zu 85±15% wiederhergestellt werden kann (LIU, 2001), wohingegen unter gleichen Bedingungen nur 60% der TauD-Aktivität zurückerhalten werden (RYLE, 2003a). Ersteres wird von Liu *et al.* so interpretiert, dass durch diese Behandlung Fe(III) durch Fe(II) ersetzt wird und die hydroxylierte Tryptophanseitenkette vom Eisen wegklappt, wodurch die Bindestelle für das Substrat wieder frei ist. *Ryle et al.* konnten zeigen, dass bei der Inaktivierung der TauD etwa ein Drittel der Enzyme an Tyr73 modifiziert werden, aber etwa 60% der inaktiven TauD durch Zusatz von Dithionit als Reduktionsmittel reaktiviert werden kann. Entgegen der Interpretation von Liu *et al.* deuten Ryle *et al.* die Beobachtungen an der TauD so, dass nur der durch einfache Oxidation des Eisens zu Fe(III)-TauD umgewandelte Teil der Enzyme und nicht der an Tyr73 modifizierte Teil eine Reaktivierung erfahren kann. Dies wäre dann der Fall, wenn Tyr73-OH nicht aus der Koordinationssphäre des Eisens verdrängt werden kann.

Ob die Verdrängung des modifizierten Aromaten vom Eisen durch andere Liganden möglich ist, hätte die Struktur des dem Luftsauerstoff ausgesetzten Fe-αKG-AtsK-Komplexes klären können. Der flexible *loop* zwischen Glu165 und Tyr191 und damit auch Tyr168 bzw. Tyr168-OH konnten aber nicht modelliert werden. Ausserdem ist nicht klar, ob überhaupt eine Decarboxylierung der αKG stattgefunden hat und in deren Folge die Hydroxylierung der Seitenkette von Tyr168 ablief. An diesem Punkt stellt sich die Frage, wieso, wenn im Laufe des anaeroben *soakings* tatsächlich Succinat gebildet wurde, die Tyr168-Seitenkette nicht wie in der Fe-Succinat-AtsK-Struktur an das Eisen koordiniert. Der Unterschied der beiden Strukturen liegt in der Gegenwart von αKG bei dem aeroben Fe-αKG-AtsK-Komplex. Die ungekoppelte αKG-Decarboxylierung vorausgesetzt, könnte die αKG das entstandene Succinat aus der aktiven Tasche verdrängt haben (wenn man das in Abb. 46 gezeigte Modell der αKG-Fehlordnung als die Struktur beschreibend ansieht). Nimmt die αKG die planare Koordination an, befindet sich das an das Eisen koordinierende Carboxylsauerstoffatom an der Substrat- respektive Tyr-OH-Bindestelle. Somit würde erklärt, warum Tyr168 in der aeroben Fe-αKG-AtsK-Struktur nicht an das Eisen koordiniert. Dies würde dazu führen, dass, wie auch für TfdA beobachtet, das Eisenatom wieder zugänglich wird und das Enzym reaktiviert werden könnte.

Für TauD und TfdA konnte gezeigt werden, dass Ascorbinsäure anstelle von Dithionit das Enzym nach der Selbsthydroxylierung nicht reaktivieren kann, weshalb die Reaktivierung des Enzyms *in vivo* keine Rolle zu spielen scheint.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt Einkristallstrukturanalyse und Röntgenabsorptions-spektroskopie an der Alkylsulfatase AtsK aus *Pseudomonas putida*. Die Ergebnisse werden mit Untersuchungen an anderen Enzymen, die wie AtsK ebenfalls zur Familie der nicht-häm-Fe(II)-αKG-abhängigen Dioxygenasen gehören, verglichen und ein gemeinsamer Katalysemechanismus diskutiert.

Die Kristallstruktur der *apo*-Form der AtsK wurde bis zu einer Auflösung von 1.89 Å bestimmt. Zur Strukturlösung wurde ein nativer Datensatz mit dem eines Quecksilberderivates im Rahmen eines SIRAS-Experiments kombiniert. In der asymmetrischen Einheit der in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ vorliegenden Kristalle befinden sich vier Kopien des Proteins, an die in der Derivatstruktur zehn Quecksilberatome koordinieren. Mit Hilfe der Schweratompositionen konnte die Struktur des Proteins gelöst werden und es lagen Phasen bis 3.8 Å vor. Zur Verbesserung der Qualität der Elektronendichte wurde eine Dichtemodifikation unter Verwendung der vorliegenden 222-nicht-kristallographischen Symmetrie und gleichzeitiger Phasenerweiterung auf die volle Auflösung durchgeführt. Zur Erzeugung des Proteinmodells wurde zunächst der Verlauf der Hauptkette in der Elektronendichtekarte ermittelt und anschließend Seitenketten und fehlende Aminosäuren eingebaut. Das Protein zeigt die für die Familie der Fe(II)-αKG-abhängigen Dioxygenasen charakteristische Faltung der Hauptdomäne, den von α-Helices flankierten *jelly roll*-Zylinder. Am Grenzbereich dieses Zylinders zum Lösemittelbereich ist ein Teil der Proteinkette nicht in der Elektronendichtekarte positionierbar, darunter ein 25 Aminosäuren langer *loop*. In der konservierte Eisenbindestelle, der His-X-Asp/Glu-X_n-His-Triade, befindet sich in der *apo*-Form der AtsK ein Natriumatom.
Weiterhin wurden verschiedene Komplexe der AtsK kristallographisch untersucht. Dabei konnte das Modell der *apo*-Struktur zur Phasenbestimmung verwendet werden. Zur Darstellung der Fe(II)-AtsK-Komplexe wurde eine Anordnung zur Durchführung von *soaking*-Experimenten unter anaeroben Bedingungen entwickelt. Die Strukturen vom Fe(II)-αKG-AtsK- und dem Fe(II)-αKG-2-Ethylhexylsulfat-AtsK-Komplex sind mit kinetischen Untersuchungen konsistent, wonach zunächst Eisen, αKG und Substrat an das Protein binden, bevor Sauerstoff an das Eisen koordiniert. Anhand der Kristallstrukturen konnte gezeigt werden, dass mit der Substratbindung die aktive Tasche durch Verdrängen eines Wasserliganden aus der Koordinationssphäre des Eisens, was in einer Fünffachkoordination des Metalls resultiert, für

die Anlagerung von molekularem Sauerstoff vorbereitet wird. Ein Vergleich der eisenhaltigen mit den eisenfreien (natriumhaltigen) Strukturen zeigt, dass das Metall nicht nur aufgrund der Redoxeigenschaften benötigt wird, sondern auch strukturell eine Rolle spielt. Die Struktur des Fe(II)-αKG-Heptylsulfonat-AtsK-Komplexes zeigt, dass AtsK auch in der Lage ist, Sulfonate zu binden. Nachfolgende Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität ergaben, dass AtsK aus Sulfonaten Sulfat freisetzt. Dies steht im Gegensatz zur Beobachtung bei der mit AtsK eng verwandten Taurinoxigenase TauD, das Aminosulfonat Taurin in Aminoacetaldehyd und Sulfit spaltet. Die Oxidation des Schwefels im Zuge der Sulfonatspaltung durch AtsK bedarf weiterer Untersuchungen.

Neben den αKG-AtsK-Komplexen wurden Succinat-AtsK-Komplexe untersucht. Succinat entsteht während der Katalyse durch die oxidative Decarboxylierung des Kosubstrates, die der Substratoxidation vorausgeht. Es ist jedoch nicht gelungen, die Struktur eines Fe-Succinat-Substrat-AtsK-komplexes zu bestimmen, da in Gegenwart von Eisen und Succinat die Aminosäure Ty168 aus dem langen flexiblen *loop* des *jelly roll*-Zylinders über die Substratbindestelle an das Eisen koordiniert. Wie mit der Struktur des Na-Succinat-Hexylsulfat-Komplexes gezeigt werden konnte, ist die Koordination durch die Tyrosinseitenkette so stark, dass bei einer Substitution des Natriums in der aktiven Tasche gegen Eisen das zuvor an der Substratbindestelle fixierte Substrat verdrängt wird.

Für die Fe(II)-αKG-abhängigen Dioxygenasen ist bekannt, dass die αKG auch in Abwesenheit von Substrat decarboxyliert werden kann. Für TauD wurde als eines der Folgeprodukte ein Fe(III)-Catecholatkomplex nachgewiesen, welcher durch Hydroxylierung einer Tyrosinseitenkette entsteht. Im Rahmen einer Untersuchung des Fe(II)-αKG-AtsK-Komplexes unter aeroben Bedingungen mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie konnte nachgewiesen werden, dass das Metall in der aktiven Tasche der AtsK in Form von Fe(III) vorliegt. Nachfolgend wurden Kristalle untersucht, die den Luftsauertstoff ausgesetzen Fe-αKG-AtsK-Komplex enthielten. Die Qualität der Elektronendichte im Bereich der Kosubstratbindestelle war für eine eindeutige Modellierung des Inhalts nicht hoch genug. Statt dessen werden drei Modelle diskutiert:

a) die Koordination von bei der Decarboxylierung der αKG entstandenem Succinat und Carbonat,

b) das Vorliegen von bei der Decarboxylierung der αKG entstandenem Succinat neben der einen Teil des Succinats verdrängenden αKG,

c) die Koexistenz von nicht decarboxylierter αKG und das bei der Decarboxylierung entstandene Succinat verdrängender αKG.

Die Untersuchung der Sulfatester- und Sulfonatkomplexe geben neue Impulse auf der Suche nach dem natürlichen Substrat der AtsK.

Die vorgestellten Ergebnisse ergänzen ferner die an anderen Fe(II)-αKG-abhängigen Dioxygenasen durchgeführten kristallographischen und spektroskopischen Untersuchungen. Die für die strukturell am besten charakterisierte α-ketoglutarsäureabhängige Dioxygenase CAS beschriebenen Strukturen konnte im Rahmen dieser Arbeit für die AtsK mit Ausnahme des NO-Komplexes ebenfalls kristallographisch bestimmt werden. Darüber hinaus wurden die Strukturen der entsprechenden eisenfreien AtsK-Komplexe sowie verschiedene Succinat-AtsK-Komplexe aufgeklärt. Somit kann die AtsK als die kristallographisch am eingehendsten untersuchte α-ketoglutarsäureabhängige Dioxygenase bezeichnet werden.

8 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die laufenden Untersuchungen zur Sulfonatspaltung werfen erneut die Frage nach dem natürlichen Substrat der AtsK auf. Wenn es gelänge, die bislang aufgrund einer Fehlordnung in der Kristallstruktur nicht modellierbaren Aminosäuren im Bereich der aktiven Tasche in einem geeigneten Komplex zu fixieren und dadurch modellierbar zu machen, ließe sich möglicherweise mehr zu den strukturellen Charakteristika geeigneter Substrate für die AtsK sagen. Daher soll versucht werden, die Kristallstrukturen weiterer Komplexe mit unterschiedlichen Sulfonaten und Sulfatestern aufzuklären. Dazu sollen Verbindungen mit funktionellen Gruppen eingesetzt werden, welche in der Lage sind, an die Seitenketten der sich nahe an der aktiven Tasche befindlichen fehlgeordneten Aminosäuren zu koordinieren und dadurch deren Flexibilität einzuschränken. Weiterhin soll die Struktur eines AtsK-Sulfit-Komplexes untersucht und in Kombination mit biochemischen Experimenten der Weg zur Sulfatfreisetzung aus Sulfonaten durch die AtsK aufgeklärt werden. Es ist denkbar, dass gleichzeitig Informationen zum generellen Katalysenmechanismus der α-ketoglutarsäureabhängigen Dioxygenasen geliefert werden.

Ziel weiterer Untersuchungen an der AtsK ist es, die Art der Koordination des bei der Decarboxylierung entstandenen Kohlendioxids und gleichzeitig seine Rolle bei der Katalyse zu klären. Zur Herstellung eines entsprechenden AtsK-Komplexes könnte der Kristallisationslösung Carbonat zugesetzt werden.

Neben diesen kristallographischen Ansätzen sollen verschiedene ESR-Experimente (ESR = Elektronenspinresonanz) an der AtsK durchgeführt werden. ESR beruht auf dem Vorliegen von ungepaarten Elektronen in der Probe, wie beispielsweise bei den Fe(III)-AtsK-Komplexen gegeben. Über die Untersuchung von Fe(II)-αKG-AtsK-Komplexen in Gegenwart von Sauerstoff könnten weitere Einblicke in die von der Substratbindung abgekoppelte α-Ketoglutarsäuredecarboxylierung gewonnen werden, wenn dabei - wie postuliert - Fe(III) gebildet wird. Die Kristallstruktur des Fe-Succinat-AtsK-Komplexes, in dem eine Tyrosinseitenkette an das Eisen koordiniert, legt zwar nahe, dass es auch bei der AtsK zu einer Selbsthydroxylierung kommen kann, nachgewiesen wurde diese Reaktion jedoch noch nicht. Die ESR-Spektroskopie ist in der Lage, die bei dieser Reaktion auftretende Tyrosylradikalzwischenstufe zu erfassen (SHI, 2000). Durch Messungen in flüssigem Helium könnte weiterhin der zeitliche Ablauf des Abbaus dieses Radikalintermediats verfolgt werden (RYLE, 2003a). Es ist geplant, die im Hause existierende ESR-Apparatur für entsprechende Experimente zu modifizieren.

9 Literaturverzeichnis

Allen, F.H., Davies, J.E., Galloy, J.J., Johnson, O., Kennard, O.,Macrea, C.E., Mitchell, E.M., Mitchell, G.F., Smith, J.M. und Watson, D.G. (1991) The development of versions 3 and 4 of the Cambridge Structural Database system. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 31, 187-204.

Baldwin, J.E., Adlington, R.M., Crouch, N.P., Schofield, C.J., Turner, N.J. und Aplin, R.T., (1991) Cephalosporin biosynthesis: A branched pathway sensitive to an isotope effect. *Tetrahedron*, **47**, 9881-9900.

Benfatto, M., Della Longa, S. und Natoli, C.R. (2003) The MXAN procedure: a new method for analysing the XANES spectra of metalloproteins to obtain structural quantitative information. *J. Synchrotron Rad.*, **10**, 51-57.

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

Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J., Meyer, E.E., Brice, M.D. Rodgers, J.R., Kennard, O., Shimanouchi, T. und Tasumi, M. (1977) Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.*, **112**, 535-542.

Blow, D. (2002) Outline of Crystallography for Biologists, Oxford University Press, Oxford.

Boltes, I., Czapinska, H., Kahnert, A., von Bülow, R., Dierks, T., Schmidt, B., von Figura, K., Kertesz, M. A. und Usón, I. (2001) 1.3 Å structure of Arylsulfatase from Pseudomonas aeruginosa establishes the catalytic mechanism of sulfate ester cleavage in the sulfatase family, *Structure*, **9**, 483-491.

Brünger, A.T. (1992) The Free R Value: A Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures, *Nature,* **355**, 472-474.

Brünger, A.T., Adams P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. und Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Cryst.*, **54**, 905-921.

Bugg, T.DH. (2001) Oxygenases: mechanisms and structural motifs for O_2 activation. *Curr. Op. Chem. Biol.*, **5**, 550-555.

Chance et al. (2002), Structural genomics: A pipeline for providing structures for biologists. *Protein Science*, **11**, 723-738.

Clifton, I.J., Hsueh, L.-C., Baldwin, J.E., Harlos, K. und Schoefield, C.J. (2001) Structure of proline 3-hydroxylase. *Eur. J. Biochem.*, 268, 6625-6636.

Collaborative Computational Project, Number 4 (CCP4) (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst.*, D **50**, 760-763.

Cowtan K. (1994) 'dm': An automated procedure for phase improvement by density modification. *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography*, **31**, 34-38.

Crowther, R.A. und Blow, D.M. (1967) A method of positioning a known molecule in an unknown crystal structure. *Acta Cryst.*, **23**, 544-548.

Cruickshank, D.W.J. (1999) Remarks about protein structure precision. *Acta Cryst.*, D**55**, 583-601.

Dauter, Z., Dauter, M., de La Fortell, E., Bricogne, G. und Sheldrick, G.M. (1999) Can anomalous signal of sulfur become a tool for solving protein crystal structures? *J. Mol. Biol.*, **289**, 83-92.

Dauter, Z., Dauter, M., Rajashankar, K.R. (2000) Novel approach to phasing proteins: dericatization by short cryo-soaking with halides. *Acta Cryst.* **D56**, 232-237.

Dierks, T., Miech, C., Hummerjohann, J., Schmidt, B., Kertesz, M. A., und von Figura, K. (1998) Posttranslational formation of formylglycine in prokariotic sulfatases by modifivation of either cysteine or serine, *J. Biol. Chem.*, **273**, 25560-25564.

Dodgson, K. S., White, G. F. und Fitzgerald, J. W. (1982) *Sulfatases of microbial origin*, CRC Press, Boca Raton.

Drenth, J. (1994) Principles of Protein X-Ray Crystallography, Springer-Verlag, New York.

Eichhorn, E., van der Ploeg, J.R., Kertesz, M.A. und Leisinger, T. (1997) Characterization of α-ketoglutarate-dependent Taurin Dioxygenase from *Escherichia coli*. *J. of Biol. Chem.*, **272**, 23031-23036.

Elkins, J.M., Ryle, M.J., Clifton, I.J., Dunning Hotopp, J.C., Lloyd, J.S., Burzlaff, N.I., Baldwin, J.E., Hausinger, R.P., Roach, P.L. (2002) X-ray crystal structure of *Escherichia coli* taurine/α-ketoglutarate dioxygenase complexed to ferrous iron and substrates. *Biochemistry*, 41, 5185-5192.

Engh, R.A. und Huber, R. (1991) Accurate bond and angel parameters for X-ray protein crystallography. *Acta Cryst.*, **A47**, 392-400.

Esnouf, R.M. (1997) An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *Journal of Molecular Graphics,* **15**, 132-134.

Flatmark, T und Stevens, R.C. (1999) Structural insights into the aromatic amino acid hydroxylases and their disease-released mutant forms. *Chem. Rev.*, **99**, 2137-2160.

Fujinaga, M. und Read, R.J.(1987), Experiences with a new translation-function program, *J. Appl. Cryst.*, **20**, 517-521.

Fukumori, F. und Hausinger, R.P. (1993) *Alicaligenes entropus* JMP134 "2,4-dichlorophnoxyacetate monooxygenase" is an 2-ketoglutarate-dependent dioxygenase. *J. Bacteriol.*, **175**, 2083-2086.

Garman, E.F. und Schneider, T.R. (1997) Macromolecular cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.*, **30**, 211-237.

George, G.N., Hedman, B. und Hodgson, K.O. (1998) An edge with XAS. *Nat. Struc. Biol.*, **5**, *Synchrotron supplement*, 645-647.

Giacovazzo, C., Monaco, H.L., Viterbo, D., Scordari, F., Gilli, G., Zanotti, G. und Catti, M. (2000) Fundamentals of Crystallography, 2. Aufl., University Press, Oxford.

Han, S., Eltis, L.D., Timmis, K.N., Muchmore, S.W. und Bolin, J.T. (1995), Crystal structure of biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB-degrading pseudomonad. *Science*, **270**, 976-980.

Hanauske-Abel, H.M. und Günzler, V.J. (1982) A stereochemical concept for the catalytic mechanism of prolylhydroxylase: application to classification and design of inhibitors. *J. Theor. Biol.*, **94**, 421-455.

Harker, D. (1956) The determination of the phases of the structure factors of noncentrosymmetric crystals by the method of double isomorphous replacement. *Acta. Cryst.*, **9**, 1-9.

Hegg, E.L., Whiting, A.K., Saari, R.E., McCracken, J., Hausinger, R.P. und Que, L. Jr. (1999) Herbicide-degrading α-keto acid-dependent enzyme TfdA: Metal coordination environment and mechanistic insights. *Biochemistry*, **38**, 16714-16726.

Holm, L. und Sander, C. (1993) Protein Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices. *J. Mol. Biol.*, **233**, 123-138.

Holme, E. (1975) A kinetic study of thymine 7-hydroxylase from *Neurospora crassa. Biochemistry*, **14**, 4999-5003.

Janc, J.W., Egan, L.A., Townsend, C.A. (1995) Purification and Characterisation of Clavaminate Synthase from *Streptomyces antibioticus*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 5399-5404.

Kabsch, W. (1976) A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Cryst.*, A **32**, 922-923.

Kahnert, A. und Kertesz, M. A., (2000), Characterization of a sulfur-regulated oxygenative alkylsulfatase from *Pseudomonas putida* S-313. *J. Biol. Chem.*, **275**, 31661–31667.

Kahnert, A., Mirleau, P., Wait, R. und Kertesz, M. A. (2002). The LysR-type regulator SftR is involved in soil survival and sulfate ester metabolism in *Pseudomonas putida*. *Env. Microbiol.*, **4**, 225-237.

Kahnert, A., Vermeij, P., Wietek, C., James, P., Leisinger, T. und Kertesz, M. A. (2000) The ssu locus playes a key role in organosulfur metabolism in *Pseudomonas putida* S-313. *J. Bacteriol.*, **182**, 2869-2878.

Kauppi, B., Lee, K. Carredani, E., Parales, P.E., Gibson, D.T., Eklund, H. und Ramaswamy, S. (1998) Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase, *Structure*, **6**, 571-586.

Kennard, O. und Allen, F.H. (1993) The Cambridge Crystallographic Data Centre. *Chem. Des. Autom. News*, **8**(1), 31-37.

Kertesz, M.A. und Kahnert, A. (2001) Organoschwefel-Metabolismus in Gram-negativen Bakterien. *BIOspektrum*, **4**, 325-329.

Kissinger, C.R., Gehlhaar, D.K. und Fogel, D.B. (1999) Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. *Acta Cryst*., **D55**, 484-491.

Kita, A., Kita, S., Fujsawa, I., Inaka, K., Ishida, T. Horiike, K., Nozaki, M. und Miki, K. (1999) An achetypical extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: the crystal structure of catechol 2,3-dioxygenase (meta-pyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2., *Structure Fold Des.*, **7**, 25-34.

Kraulis, P.J. (1991) Molscript: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structure. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 946-950.

Lange, S.J. und Que, L. Jr. (1998) Oxygen activating nonheme iron enzymes. *Curr. Op. Chem. Biol.*, **2**, 159-172.

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

Lee, H.-J., Lloyd, M.D., Harlos, K., Clifton, I.J., Baldwin, J.E. und Schofield, C.J. (2001) Kinetic and Crystallographic studies on deacetoxycephalosporin C synthase (DAOCS). *J. Mol. Biol.*, **308**, 937-948.

Liu, A., Ho, R.Y.N. und Que, L. Jr. (2001) Alternative reactivity of an α-ketoglutarate-dependent iron(II) oxygenase: Enzyme self-hydroxylation. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 5126-5127.

Lloyd, M.D., Lee, H.-J., Harlos, K., Zhang, Z.-H., Baldwin, J.E., Schofield, C.J., Charnock, J.M., Garner, C.D., Hara, T., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Valegård, K., Viklund, J.A.C., Hajdu, J., Andersson, I., Danielsson, Å and Bhikhabhai (1999) Studies on the active site of deacetoxycephalosporin C synthase. J. Mol. Biol., **287**, 943-960.

Lunin, V.Y. (1988) Use of the information on electron density distribution in macromolecules. *Acta Cryst*., **A44**, 144-150.

Matthews, B.W. (1968) Solvent content of Protein Crystals. *J. Mol. Biol*., **33**, 491-7.

McRee, D.E. (1993) Practical Protein Crystallography, Academic Press, San Diego, CA.

McRee, D.E. (1999) XtalView/Xfit – A versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. *J. Struct. Biol.* **125**, 156-165.

Merritt, E.A. und Bacon, D.J. (1997) Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods Enzymol*., **277**, 505-524.

Meyer-Klaucke W., Winkler H., Schünemann V., Trautwein A.X., Nolting H-F. und Haavik J. (1996) Mossbauer, electron-paramagnetic-resonance and X-ray-absorption fine-structure studies of the iron environment in recombinant human tyrosine hydroxylase. *Eur. J. Biochem.*, **241,** 432-439.

Miech, C., Dierks, T., Selmer, T. und von Figura, K. (1998) Arylsulfatase from Klebsiella pneumoniae carries a formylglycine generated from a serine, *J. Biol. Chem.*, **273**, 4835-4837.

Mori, H., Shibasaki, T., Yano, K. und Ozaki, A. (1997) Purification and cloning of a proline 3-Hydroxylase, a novel enzyme which hydroxylates free L-Proline to cis-3-Hydroxy-L-Proline. *J. of Bacteriology*, **179**, 5677-5683.

Müller, I. (2001) Röntgenstrukturuntersuchungen an siliciumorganischen Verbindungen und Vinamidinmetallkomplexen sowie Kristallisation einer Alkylsulfatase. Universität Göttingen, Fachbereich Chemie, Diplomarbeit.

Müller, P., Köpke, S. und Sheldrick, G.M. (2003) Is the bond-valence method able to identify metal atoms in protein structures? *Acta Cryst.*, D**59**, 32-37.

Murshudov, G.N., Vagin, A.A. und Dodson, E.J. (1997) Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst.*, D **53**, 240-255.

Myllylä, R. und Kivirikko, K.I. (1997) Characterization of the iron- and 2-oxoglutarate binding sites of human prolyl 4-hydroxylase. *Embo Journal*, **16**, 1173-1180.

Myllylä, R., Günzler, V., Hanauske-Abel, H.M. und Kivirikko, K.I. (1984) Ascorbate is consumed stoichiometrically in the uncoupled reactions catalyzed by prolyl 4-Hydroxylase and Lysyl Hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, **259**, 5403-5405.

Natoli, C.R. Benfatto, M., Della Longa, S. und Hatada, K. (2003) X-ray absorption spectroscopy: state-of-the-art analysis. *J. Synchrotron Rad.*, **10**, 26-42.

O'Brien, J.R., Schuller, D.J., Yang, V.S., Dillard, B.D., Lanzilotta, W.N. (2003) Substrate-induced conformational changes in *Escherichia coli* Taurine/α-ketoglutarate Dioxygenase and insight into the oligomeric structure. *Biochemistry*, **42**, 5547-5554.

Otwinowski, Z. und Minor, W. (1997) Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode, *Methods in Enzymology*, Volume **276**: Macromolecular Crystallography, part A, p. 307-326, 1997, C.W. Carter, Jr. and R.M. Sweet, Eds., Academic Press.

Perrakis, A., Morris, R.J.H. und Lamzin, V.S. (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Struct. Biol.*, **6**, 458-463.

Person, W.R., Wood, T., Zhang, Z. und Miller, W. (1997) Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics*, **46**, 24-36.

Price, J.C., Barr, E.W., Tirupati, B., Bollinger, J.M. und Krebs, C. (2003) The first characterization of a high-valent iron intermediate in the reaction of an α-ketoglutarate-dependent dioxygenase: A high-spin Fe(IV) complex in taurine/α-ketoglutarate dioxygenase (TauD) from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **42**, 7497-7508.

Quadroni, M., James, P., Dainese-Hatt, P. und Kertesz, M. A. (1999) Proteome mapping, mass spectrometric sequencing and reverse transcriptase-PCR for characterisation of the sulfate starvation-induced response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J. Biochem*. **266**: 986-996.

Que L Jr. (2000) One motif-many different reactions. *Nat Struct Biol.*,**7**(3),182-4.

Que, L. und Ho, R. Y. N. (1996) Dioxygen activation by enzymes with mononuclear non-heme iron active sites. *Chem. Rev.*, **96**, 2607-2624.

Ramachandran, G.N. und Sassiekharan, V. (1968) Conformation of polypetides and proteins. *Adv. Prot. Chem.*, **28**, 283-437.

Rossmann, M.G. und Arnold, E., (2002) International Tables for Crystallography, Volume F, Kluwer Academic Press, Dordrecht.

Rossmann, M.G. und Blow, D.M. (1962) The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst*., **15**, 24-31.

Ryle, M.J. und Hausinger R.P. (2002) Non-heme iron oxygenases. *Curr. Op. Chem. Biol.*, **6**, 193.

Ryle, M.J., Koehntop, K.D., Liu, A., Que, L. und Hausinger, R.P. (2003b) Interconversion of two oxidized forms of taurine/α-ketoglutarate dioxygenase, a non-heme iron hydroxylase: Evidence for bicarbonate binding. *PNAS*, **100**, 3790-3795.

Ryle, M.J., Liu, A., Muthukumaran, R.B., Ho, R.Y.N., Koehntop, K.D., McCracken, J., Que, L. Jr. und Hausinger, R.P. (2003a) O_2- and α-ketoglutarate-dependent tyrosyl radical formation in TauD, an α-ketoacid-dependent non-heme iron dioxygenase. *Biochemistry*, **42**, 1854-62.

Ryle, M.J., Padmakumar, R. und Hausinger, R.P. (1999) Stopped-flow kinetic analysis of *Escherichia coli* taurin/α-ketoglutarate dioxygenase: Interactions with α-ketoglutarate, taurine, and oxygen. *Biochemistry*, **38**, 15278-15286.

Saari, R.E. und Hausinger, R.P. (1998) Ascorbic acid-dependent turnover and reactivation of 2,4-dichorophenoxyacetic acid/α-ketoglutarate dioxygenase using thiophenoxyacetc acid. *Biochemistry*, **37**, 3035-3042.

Sabourin, P.J. und Bieber, L.L. (1982) Purification and characterization of an α-ketoisocaproate oxygenase of rat liver. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7468-7471.

Schmidt, B., Selmer, T., Ingendoh, A. und von Figura, K. (1995), A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency, *Cell*, 82, 271-278

Schneider, T.R. (2002) A genetic algorithm for identification of conformationally invariant regions in protein molecules. *Acta Cryst.*, D**58**, 195-208.

Schofield, C.J. und Zhang, Z. (1999) Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Current opinion in Structural Biology*, **9**, 772-731.

Selmer, T., Hallmann, A., Schmidt, B., Sumper, M. und von Figura, K. (1996) The evolutionary conservation of a novel protein modification, the conversion of cysteine to serinesemialdehyde in arylsulfatase from *Volvox carteri*, *Eur. J . Biochem.*, **238**, 341-345.

Senda, T., Sugiyama, K., Narita, H., Yamamoto, T., Kimbara, K., Fukuda, M., Sato, M., Yano, K. und Mitsui, Y. (1996), Three-dimensional structures of free form and three substrate complexes of an extradiol ring-cleaving type dioxygenase, the BphC enzyme from *Pseudomonas sp.* strain KS102. *J. Mol. Biol.*, **255**, 735-62.

Sheldrick, G.M. (1996) SADABS, program for empirical absorption correction of area detector data, Universität Göttingen.

Sheldrick, G.M. (1997) XP: Programm zur interaktiven, graphischen Darstellung von Molekulen, V. 5.10. © Bruker AXS.

Sheldrick, G.M. (1997) XPREP: Programm zur Bearbeitung von Beugungsdaten und Untersuchung reziproker Gitter V5.15. © Bruker AXS.

Sheldrick, G.M. (1998) SHELX: applications to macromolecules. *in: direct methods for solving macromolecular structures*, Ed Fortier, S., 401-411, Kluwer Academic Press, Dordrecht.

Sheldrick, G.M. (2001) SHELXMAD: Programm zur Analyse und Mittelung von Substrukturlösungen aus SHELXD und Berechnung experimenteller Phasen. *unveröffentlicht.*

Sheldrick, G.M. (2003) X2SAD. *unveröffentlicht*.

Shi, W., Hoganson, C.W., Espe, M., Bender, C.J. und Babcock, G.T. (2000) Electron paramagnetic resonance and Electron nuclear double resonance spectroscopic identification and characterization of the tyrosyl radicals in prostaglandin H synthase. *Biochemistry*, **39**, 4112-4121.

Solomon, E.I., Brunold, T.C., Davis, M.I., Kemsley, J.N., Lee, S-K., Lehnert, N., Neese, F., Skulan, A.J., Yang, Y-S. und Zhou, J. (2000) Geometric and electronic structure/function correlations in non-heme iron enzymes. *Chem. Rev.*, **100**, 235-349.

Sugimoto, K., Senda, T., Aoshima, H., Masai, E., Fukuda, M. und Mitsui, Y. (1999) Crystal structure of an aromatic ring opening dioxygenase LigAB, a protocatechuate 4,5-dioxygenase, under aerobic conditions, *Structure Fold Des.*, **7**, 935-965.

Tong, L. und Rossmann, M.G. (1990) The locked rotation function. *Acta Cryst*., **A46**, 783-92.

Tudermann, L., Myllylä, R. und Kivirikko, K.I. (1977) Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. *Eur. J. Biochem*, **80**, 341-348.

Usón, I. und Sheldrick, G.M. (1999) Advances in direct methods for protein crystallography. *Curr. Op. Struct. Biol.*, **9**, 643-648.

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

Valegård, K., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Lloyd, M.D., Hara, T., Ramaswamy, S., Perrakis, A., Thompson, A., Lee, H.-J., Baldwin, J.E., Schofield, C.J., Hajdu, J. und Andersson, I. (1997) Structure of a cephalosporin synthase. *Nature*, **394**, 805-809.

Vellieux, F.D.M. und Read, R.J. (1997) Noncrystallographic Symmetry Averaging in Phase Refinement and Extension. *in*: *Methods in Enzymology*, Ed Carter, C.W.Jr und Sweet, R.M., **277**, 53-64, Academic Press, San Diego.

Venkateswara, R. und Adams, E. (1978) Partial reaction of prolyl hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, **253**, 6327-6330.

Viklund, J.A.C., Hajdu, J., Andersson, I., Danielsson, Å. und Bhikhabhai, R. (1999) Studies on the active site of deacetoxycephalosporin C synthase. *J. Mol. Biol.*, **287**, 943-960.

von Bülow, R., Schmidt, B., Dierks, T., von Figura, K. und Usón, I., (2001) Crystal structure of an enzyme-substrate complex provides insight into the interaction between human Arylsulfatase A and its substrates during catalysis, *J. Mol. Biol.*, **305**, 269-277.

Vriend, G. (1990) WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph,*. **8**, 52-56.

Wang, B.C. (1985) Resolution of Phase Ambiguity in Macromolecular Crystallography. *in*: Wyckoff, H., Hirs, C.H.W., und Timasheff, S.N. (eds). (1985) Diffraction Methods for Biological Macromolecules. *Methods in Enzymology*, **115**. Academic Press, San Diego.

Wilmouth, R.C., Turnbull, J.J., Welford, R.W.D., Clifton, I.J., Prescott, A.G. und Schofield, C.J. (2002) Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure*, **10**, 93-103.

Winn, M., Isupov, M. und Murshudov, G.N. (2001) Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Cryst.*, **D57**, 122-133.

Zhang, K.Y.J., Cowtan, K. und Main, P. (1997) Combining Constraints for Electron-Density Modification. *in*: *Methods in Enzymology*, **277**, 53-64, Academic Press.

Zhang, K.Y.J., Cowtan, K. und Main, P. (2001) Phase improvement by iterative density modification. in: InternationalTables for Crystallography Volume F: Crystallography of Biological macromolecules. Editors: M.G. Rossmann and E. Arnold, 2001. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Zhang, Z.-H., Ren, J., Harlos, K., McKinnon, C.H., Clifton, I.J. und Schofield, C.J. (2002) Crystal structure of a clavaminate synthase-Fe(II)-2-oxoglutarate-substrate-NO-complex: evindence for metal centered rearrangements. *FEBS Letters*, 517, 7-12.

Zhang, Z.-H., Ren, J., Stammers, D.K., Baldwin, J.E., Harlos, K. und Schofield, C.J. (2000) Structural origins of the selectivity of the trifunctional oxygenase clavaminic acid synthase. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 127-133.

Zhou, J., Gunsior, M., Bachmann, B.O., Townsend, C.A. and Solomon, E. (1998) Substrate binding to the α-ketoglutarate dependent non-heme iron enzyme clavaminate synthase 2: Coupling mechanism of oxidative decarboxylation and hydroxylation. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 13539-13540.

Anhang

Tabelle 9 Kristallographische Daten für die *apo*-Form der AtsK, das Hg-Derivat, die Na-αKG- und Na-αKG-Substrat- und den Fe-αKG-Komplex.

	Nativ 1 (*apo* -Form) (Synchrotron)	Nativ 2 (*apo* -Form) (MAR)	Hg Derivat	Na-αKG Komplex	Fe-αKG-Komplex	Na-αKG-hexylsulfat-Komplex
Zelle [Å]	a=72.24	a=71.74	a=72.21	a=72.45	a=72.42	a=72.27
$\alpha = \beta = \gamma = 90°$	b=145.34	b=145.49	b=145.31	b=144.88	b=147.33	b=143.27
	c=159.46	c=158.91	c=159.37	c=160.69	c=158.57	c=160.73
Beamline/Gerät	BW7B	MAR	MAR	X11	X11	BL2
Raumgruppe	$P\,2_12_12_1$	$P\,2_12_12_1$	$P\,2_12_12_1$	$P\,2_12_12_1$	$P\,2_12_12_1$	$I\,2_12_12_1$
Auflösung [Å]	20-1.89	12-3.80	15-3.3	38.93-2.10	20-2.19	25-2.70
Zahl der gemessenen Reflexe	719684	109036	151676	472571	564785	116991
Zahl der unabhängigen Reflexe	134420	29248	45894	102501	86268	23312
Vollständigkeit %						
insgesamt:	99.9	94.5	98.0	98.8	97.5	100
äußere Auflösungsschale:	99.6 (1.9-2.0)	88.4 (3.8-3.9)	97.0 (3.3-3.4)	94.6 (2.2-2.07)	83.1 (2.3-2.19)	99.8 (2.8-2.7)
R_{merge}[1]						
insgesamt:	0.048	0.077	0.159	0.104	0.064	0.055
äußere Auflösungsschale:	0.357	0.128	0.344	0.410	0.452	0.438
mittleres I/sigma(I)						
insgesamt:	19.2	11.3	10.8	13.5	20.0	12.4
äußere Auflösungsschale:	4.32	5.97	6.51	3.06	5.10	2.51

Tabelle 10 Kristallographische Daten für die Fe-αKG-Substrat-Komplexe und die Fe-αKG-Komplexe zur Untersuchung der ungekoppelten αKG-Decarboxylierung.

	Fe-αKG-2-Ethyl-hexyl-sulfat-Komplex	Fe-αKG-Hexyl-sulfat-Komplex	Fe-αKG-Butyl-sulfat-Komplex	αKG-Decarboxy-lierung (Phosphat-Puffer)	αKG-Decarboxy-lierung (ohne Puffer)	αKG-Decarboxy-lierung (25 mM αKG)
Zelle [Å]	a=72.03	a=71.98	a=71.87	a=72.39	a=72.24	a=71.96
	b=141.89	b=142.06	b=145.67	b=144.62	b=145.34	b=144.422
$\alpha = \beta = \gamma = 90°$	c=161.72	c=161.35	c=157.56	c=160.60	c=159.46	c=160.09
Beamline/Gerät	X11	X11	X11	MAR	MAR	MAR
Raumgruppe	$I2_12_12_1$	$I2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$I2_12_12_1$	$I2_12_12_1$
Auflösung [Å]	25-2.05	2.25	2.07	2.90	3.70	2.60
Zahl der gemessenen Reflexe	270566	178328	526475	201668	69859	141608
Zahl der unabhängigen Reflexe	51154	39451	101060	37664	8986	25733
Vollständigkeit %						
insgesamt:	99.1	99.9	99.9	99.1	100	98.0
äußere Auflösungsschale:	97.0 (2.15-2.06)	99.4 (2.35-2.25)	99.5 (2.20-2.07)	98.5 (3.00-2.90)	98.8 (3.80-3.70)	85.2 (2.70-2.60)
R_{merge}[1]						
insgesamt:	0.057	0.036	0.030	0.092	0.082	0.053
äußere Auflösungsschale:	0.321	0.494	0.273	0.370	0.229	0.563
mittleres I/sigma(I)						
insgesamt:	13.5	16.0	21.9	10.3	10.3	14.47
äußere Auflösungsschale:	4.34	1.98	3.49	2.80	3.87	2.02

Tabelle 11 Kristallographische Daten für die Succinat-Komplexe und den Fe-αKG-Sulfonat-Komplex der AtsK.

	Fe-αKG-Heptyl-sulfonat-Komplex	Na-Succinat-Komplex	Na-Succinat-Hexylsulfat-Komplex	Na-Succinat-Butylsulfat-Komplex	Fe-Succinat-Komplex	Fe-Succinat-Hexylsulfat-Komplex
Zelle [Å]	a=71.75	a=72.51	a=72.14	a=72.35	a=72.26	a=71.97
	b=144.01	b=145.82	b=142.86	b=145.41	b=142.09	b=140.96
$\alpha = \beta = \gamma = 90°$	c=161.10	c=158.788	c=159.72	c=161.65	c=161.19	c=160.50
Beamline/Gerät	MAR	BL2	MAR	MAR	MAR	MAR
Raumgruppe	$I2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$I2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$I2_12_12_1$	$I2_12_12_1$
Auflösung [Å]	3.10	2.02	3.05	2.90	2.90	2.70
Zahl der gemessenen Reflexe	65882	628292	76779	306259	89777	149014
Zahl der unabhängigen Reflexe	15134	92306	15990	37808	18615	22668
Vollständigkeit %						
insgesamt:	97.4	100	99.1	100	99.4	99.1
äußere Auflösungsschale:	88.7 (3.20-3.10)	100 (2.02-2.15)	96.7 (3.15-3.05)	99.5 (3.0-2.9)	98.9 (3.0-2.9)	95.0 (2.8-2.7)
R_{merge}[1]						
insgesamt:	0.082	0.066	0.075	0.105	0.0613	0.0485
äußere Auflösungsschale:	0.486	0.273	0.446	0.505	0.2988	0.2461
mittleres I/sigma(I)						
insgesamt:	10.4	10.68	11.84	8.47	14.62	15.58
äußere Auflösungsschale:	2.06	3.60	2.22	2.01	3.56	3.87

Tabelle 12 Ergebnisse der Strukturverfeinerungen der verschiedenen AtsK-Komplexe

	apo -AtsK	Na-αKG-Komplex	Fe-αKG-Komplex	Na-αKG-hexylsulfat-Komplex	Fe-αKG-2-Ethyl-hexylsulfat-Komplex	Fe-αKG-Heptylsulfonat-Komplex
R-Wert (%)	17.0	19.1	19.5	21.0	19.9	19.4
Rfree-Wert (%)	19.1	21.5	22.0	27.12	26.5	22.1
Testdatensatz (%)	5.1	4.8	4.9	5.4222	4.9	5.0
RMS Bindungslängen (Å)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04
RMS Bindungswinkel (°)	1.7	1.6	1.7	1.9	1.7	3.2
Zahl der Proteinatome	7652	7710	7594	3777	3823	3760
Zahl der Wassermoleküle	760	694	574	100	246	172
mittlerer B-Wert Protein ($Å^2$)	29.0	34.3	33.8	57.6	49.0	57.6
mittlerer B-Wert Wasser ($Å^2$)	36.9	43.8	39.2	59.8	56.1	50.8
Zahl der Aminosäuren fehlende Aminosäuren						
Monomer A	254	254	253	239	240	242
	1-12;81-84;98-102;166-190;301	1-12;81-84;98-102;166-190;301	1-12;81-84;98-102;166-190;301	1-12;82-102;165-190;299-301	1-12;82-102;166-191;300;301	1-12;82-92;98-103;166-192;299-301
Monomer B	255	255	253	-	-	-
	1-12;81-84;98-102;166-190;301	1-12;81-84;99-102;166-190;301	1-12;81-84;98-102;166-190;301			
Monomer C	242	238	237	-	-	-
	1-12;80-92;97-102;166-191;300;301	1-12;80-102;166-190;300;301	1-13;80-102;166-191;300;301			
Monomer D	244	236	245	250	254	254
	1-12;80-89;98-103;165-191;300; 301	1-12;80-103;165-191;300;301	1-12;80-89;98-102;165-191;300;301	1-14;82-84;98-102;165-190;299-301	1-13;82-84;98-102;166-191;301	1-12;82-84;99-103;166-191;297-301

Fortsetzung Tabelle 12 Ergebnisse der Strukturverfeinerungen der verschiedenen AtsK-Komplexe

	Na-Succinat-Komplex	Fe-Succinat-Komplex	Na-Succinat-Hexylsulfat-Komplex	αKG-Decarboxylierung (Pi-Puffer)
R-Wert (%)	19.73	17.57	21.81	18.68
R_{free}-Wert (%)	22.22	26.28	29.46	24.00
Testdatensatz (%)	5.13	5.24	4.7844	5.2
RMS Bindungslängen (Å)	0.02	0.03	0.04	0.02
RMS Bindungswinkel (°)	1.927	2.910	3.623	1.928
Zahl der Proteinatome	7618	3934	3717	7650
Zahl der Wassermoleküle	611	308	81	404
mittlerer B-Wert Protein ($Å^2$)	30.6	47.7	73.9	40.6
mittlerer B-Wert Wasser ($Å^2$)	37.9	42.0	50.4	39.4
Zahl der Aminosäuren fehlende Aminosäuren				
Monomer A	254	249	243	252
	1-12;81-84; 98-102;166-190;301	1-12;82-92;98-101;170-191;299-301	1-12;82-92;98-102;166-192;299-301	1-12;81-84;98-102;166-190;299-301
Monomer B	255	-	-	253
	1-12;81-84;99-102;166-190;301			1-12;81-84;99-102;166-190;299-301
Monomer C	244	-	-	238
	1-12;80-90;97-102;166-191;300;301			1-12;80-102;166-191;300;301
Monomer D	244	261	252	236
	1-12;81-89;98-103;165-191;300;301	1-12;82-84;99-101;170-190;301	1-12;81-84;99-103;166-192;301	1-12;80-103;165-191;300;301

Tabelle 13 Zusammenfassung der Ergebnisse der vorläufigen Strukturverfeinerungen des Fe-αKG-Hexylsulfat-Komplexes sowie der Butylsulfat-Komplexe.

	Fe-αKG-Hexylsulfat-Komplex	Fe-αKG-Butylsulfat-Komplex	Na-Succinat-Butylsulfat-Komplex
R-Wert (%)	23.8	24.3	19.8
R_{free}-Wert (%)	27.5	27.3	25.0
Testdatensatz (%)	5.2	5.0	5.2
RMS Bindungslängen (Å)	0.04	0.02	0.03
RMS Bindungswinkel (°)	3.0	1.9	2.35
Zahl der Aminosäuren			
Monomer A	229	253	255
Monomer B	-	253	255
Monomer C	-	237	244
Monomer D	217	246	243
Zahl der Wassermoleküle	-	276	303
Probleme	positive Differenzelektronendichte im Bereich der Substratbindestelle bleibt uninterpretiert	positive Differenzelektronendichte im Bereich der Substratbindestelle bleibt uninterpretiert	positive Differenzelektronendichte im Bereich der Substratbindestelle bleibt uninterpretiert
	isotrope Verfeinerung der B-Werte nicht möglich insgesamt hohe B-Werte	Struktur entspricht der des Fe-αKG-Komplexes	Struktur entspricht der des Na-Succinat-Komplexes

Tabelle 14 Zusammenfassung der Ergebnisse der vorläufigen Verfeinerungen der verschiedenen Modelle der aeroben Fe-αKG-AtsK-Struktur sowie der αKG-Decarboxylierungsstrukturen in Gegenwart von Phosphat bzw. ohne Puffer.

	aerober Fe-αKG-AtsK-Komplex				
	Succinat-Carbonat-Modell	Succinat-αKG-Modell	αKG-Fehlordnung-Modell	αKG-Decarboxylierung (ohne Puffer)	αKG-Decarboxylierung (VitC+ohne Puffer)
R-Wert (%)	20.6	20.7	20.6	35.6	18.5
R_{free}-Wert (%)	25.2	25	25.0	48.3	23.0
Testdatensatz (%)	4.9	4.9	4.9	4.9	2.6
RMS Bindungslängen (Å)	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02
RMS Bindungswinkel (°)	2.2	2.3	2.3	1.8	1.9
Zahl der Aminosäuren					
Monomer A	234	234	234	Entspricht den Werten des Startmodells	258
Monomer B	-	-	-		253
Monomer C	-	-	-		238
Monomer D	244	244	244		236
Zahl der Wassermoleküle	177	213	177		343
Probleme	Die Modelle sind nur Vorschläge für die Struktur; eine eindeutige Interpretation der Elektronendichte ist nicht möglich			*simulated annealing*-Verfeinerung mit Hilfe des Programmes CNS	VitC bindet nicht an das Protein; die Struktur entspricht der der αKG-Decarboxylierung (ohne Puffer)

Tabelle 15 Zusammenfassung von Quelle und Funktion der im Text diskutierten Enzyme mit Verweis auf weiterführende Literatur.

Protein	Organismus	Funktion	weiterführende Literatur
ANS	*Arabidopsis thaliana*	Umwandlung von Leucocyanidin in Dihydroquercetin	WILMOUTH, 2002
AtsK	*Pseudomonas putida* S-313	Spaltung von Sulfatestern in Aldehyd und Sulfat	KAHNERT UND KERTESZ, 2000 KAHNERT, 2000 KAHNERT, 2002
CAS	*Streptomyces clavuligerus*	1) Hydroxylierung von Desoxyguanidinoproclavaminat 2) Ringschlussreaktion zur Umwandlung von Proclavaminsäure in Dihydroclavaminsäure (**1**) 3) Entsättigung von **1** zu Clavaminsäure	JANC, 1995 ZHOU, 1998 ZHANG, 2000 ZHANG, 2002
DAOC/DAC	*Cephalosporium acremonium* CO 728	1) Ringerweiterung inklusive Entsättigung von Penicillin N zu Deacetoxycephalosporin C (**2**) 2) Hydroxylierung von **2** zu Deacetylcephalosporin C	BALDWIN, 1991
DAOCS	*Streptomyces clavuligerus*	Ringerweiterung inklusive Entsättigung von Penicillin N zu Deacetoxycephalosporin C	VALEGÅRD, 1998 LLOYD, 1999 VIKLUND, 1999 LEE, 2001
GAB	*Escherichia coli*	nicht bekannt	CHANCE, 2002
P3H	*Streptomyces sp.* TH1	Hydroxylierung von freiem L-Prolin zu *cis*-3-Hydroxyprolin	MORI, 1997 CLIFTON, 2001
TauD	*Escherichia coli*	Spaltung von Taurin (2-Aminoethansulfonsäure) zu Aminoacetaldehyd und Sulfit	EICHHORN, 1997 ELKINS, 2002 RYLE, 2003a/b O'BRIEN, 2003 PRICE, 2003
TfdA	*Ralsonia eutropa*	Spaltung von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure zu 2,4-Dichlorphenol und Glyoxylat.	FUKUMORI UND HAUSINGER, 1993 SAARI, 1998 HEGG, 1999 LIU, 2001

Publikationen

Ilka Müller, Antje Kahnert, Thomas Pape, George M. Sheldrick, Wolfram Meyer-Klaucke, Thomas Dierks, Michael Kertesz und Isabel Usón (2003) Crystal structure of the alkylsulfatase AtsK: Insights into the catalytic mechanism of the Fe(II) α-ketoglutarate dependent dioxygenase superfamily. Eingereicht.

Oliver Schlörke, Philipp Krastel, Ilka Müller, Isabel Usón, Konrad Dettner und Axel Zeeck (2002) Structure and biosynthesis of cetoniacytone A, a cytotoxic aminocarba sugar produced by an endosymbiotic Actinomyces. *J. Antibiotics*, **55**, 635-642.

Uwe Klingebiel, Peter Neugebauer, Ilka Müller, Mathias Noltemeyer und Isabel Usón (2002) 2,5-Bis(di-tert-butylhydroxysilyl)furan as host molecule for potassium fluoride, H_2O, NH_3 and $MeNH_2$. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 876-885.

Jörg Prust, Kerstin Most, Ilka Müller, Andreas Stasch, Herbert W. Roesky und Isabel Usón (2001) Synthesis and Structures of vinamidine MnII, ZnII and CdII iodine derivatives. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1613-1616.

Jörg Prust, Kerstin Most, Ilka Müller, Eftichia Alexopoulos, Andreas Stasch, Isabel Usón und Herbert W. Roesky (2001) Synthesis and structures of β-diketoiminate complexes of magnesium. *Z. Anorg. Allg. Chem,*. **627**, 2032-2037.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2001 bis September 2003 unter der Leitung von Prof. G.M. Sheldrick am Lehrstuhl für Strukturchemie des Instituts für Anorganische Chemie der Universität Göttingen angefertigt.

Bei Prof. George M. Sheldrick möchte ich mich für die Aufgabenstellung, seine ständige Gesprächsbereitschaft und die sehr guten Rahmenbedingungen in der Abteilung bedanken.

Dr. Isabel Usón danke ich für die hilfreiche Betreuung und ihr Interesse an meiner Arbeit. Ich wünsche ihr alle Gute und viel Erfolg in Barcelona.

Bei Dr. Michael Kertesz möchte ich mich für die Einladung nach Manchester und seine Tipps und Tricks zur Proteinexpression und -reinigung bedanken. Für die herzliche Aufnahme und die Einarbeitung im Labor gilt mein Dank natürlich auch Frau Dr. Antje Kahnert.

Dr. Tewes Tralau danke ich für die Bereitstellung der Proteinproben und für die Untersuchungen an der AtsK.

Dr. Wolfram Meyer-Klaucke sei für die Einführung in die Röntgenabsorptionsspektroskopie und die Aufnahme des XAS-Spektrums der AtsK gedankt.

Mein Dank geht auch an alle meine Mitarbeiter. Qingjun und Jose möchte ich besonders für die lustige Zeit im Labor danken, Eftichia und Fabio danke ich für ihr stetes soziales Engagement. Thomas Pape danke ich für die unermüdliche Hilfe bei allen Fragen - nicht nur denen des KristallographInnenlebens.

Für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit geht mein Dank an Herrn Dr. Thomas Pape, Frau Dipl. Chem. Eftichia Alexopoulos, Herrn Dipl. Chem. Fabio Dall'Antonia, Frau Dipl. Chem. Christine Schlicker und nicht zuletzt an Herrn Dipl. Biol. Boris Adryan.

Meiner Familie möchte ich für dafür danken, dass ich immer auf sie zählen kann.

Persönliche Daten

Name	Ilka Müller
Geburtsdatum	8. Juli 1977
Geburtsort	Ottweiler
Familienstand	ledig

Studium und schulische Ausbildung

Juni 1996	Allgemeine Hochschulreife, Staatl. Gymnasium Kusel
Okt1996	Diplomstudiengang Chemie, Georg-August-Universität Göttingen
Nov 1998	Vordiplom Chemie, Georg-August-Universität Göttingen
Mai 2001	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Strukturchemie der Georg-August-Universität unter der Leitung von Prof. George M. Sheldrick, PhD: *Röntgenstrukturuntersuchungen an siliciumorganischen Verbindungen und Vinamidinmetallkomplexen sowie Kristallisation einer Alkylsulfatase* Abschluss: Diplom-Chemikerin

Promotion

Jun 2001- Nov 2003	Dissertation am Lehrstuhl für Strukturchemie der Georg-August-Universität Göttingen im Arbeitskreis von Prof. G.M. Sheldrick, PhD: *Strukturuntersuchungen zum Reaktionsmechanismus an der Alkylsulfatase AtsK aus Pseudomonas putida S-313*