

UNIVERSITÄT  
BAYREUTH

Kristallstruktur der Selen-abhängigen  
Nicotinat-Dehydrogenase aus  
*Eubacterium barkeri*

Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der  
Universität Bayreuth

Dissertation

vorgelegt von  
Nadine Wagener  
aus Wesel

Bayreuth im Dezember 2008

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 2005 bis Dezember 2008 im Fachbereich Biochemie/Proteinkristallographie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Holger Dobbek durchgeführt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.)

Tag der Einreichung der Dissertation: 07.01.2009

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 17.07.2009

Prüfungsausschuss:

Erster Gutachter: Prof. Dr. H. Dobbek

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. F.X. Schmid

Vorsitzender: Prof. Dr. C. Unverzagt  
Prof. Dr. S. Clemens

## Inhaltsverzeichnis 1

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Molybdän, Selen und ihre biologische Bedeutung	8
1.2 Molybdän- und Selen-haltige Enzyme	12
1.3 Die XOR-Familie	17
1.4 Nicotinat-Fermentation	20
1.5 Nicotinat-Dehydrogenase	23
1.6 Zielsetzung	25
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>26</b>
2.1 Chemikalien und Geräte	26
2.2 Mikrobielle Methoden	28
2.2.1 Medien	28
2.2.2 Kultivierung von <i>E. barkeri</i>	28
2.2.3 Zellaufbruch mit Ultraschall	29
2.3 Biochemische Methoden	29
2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	29
2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV-Absorption bei 280nm	30
2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.3.4 Coomassie-Färbung und Entfärbung	32
2.3.5 Reinigung der NDH	32
2.3.6 UV/Vis-Spektren	34
2.3.7 Oxidase-Aktivität	34
2.3.8 Hydroxylase-Aktivität	35
2.4 Kristallographische Methoden	35
2.4.1 Kristallisation	35
2.4.2 Tränken von Kristallen	36
2.4.3 Datensammlung, Kupfer-Anode und ESRF	36
2.4.4 Anomale Dispersion	37
2.4.5 Datenprozessierung und Datenreduktion	39
2.4.6 Pattersonsuche oder Molekularer Ersatz ( <i>Molecular Replacement</i> (MR))	40

---

2.4.7	Strukturverfeinerung und Modellbau	41
2.4.8	Strukturevaluierung und Darstellung der Struktur	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1	Kultivierung von <i>E. barkeri</i>	46
3.2	Reinigung	47
3.3	Aktivität	50
3.4	Inhibition	53
3.5	Kristallisation	55
3.6	Datensammlung und Strukturverfeinerung	57
3.7	Struktur	60
3.7.1	Überblick	60
3.7.2	Die Molybdopterin-Domäne	63
3.7.3	Der Molybdän Kofaktor	73
3.7.4	Das Aktive Zentrum	78
3.7.5	Die Substratbindetasche	81
3.7.6	Der Substratkanal	85
3.7.7	Die Kalzium-Bindestelle	87
3.7.8	Tränken der Kristalle mit Nicotinat	89
3.7.9	Die Flavin-Untereinheit	91
3.7.10	Die kleine Untereinheit	94
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
4.1	Wachstum	97
4.2	Reinigung und Aktivität	99
4.3	Vergleich mit anderen NDHs	100
4.4	Zyanid-Inhibition	101
4.5	Struktur	103
4.5.1	Kalzium-Bindestelle	103
4.5.2	Nitrat	105
4.5.3	Substratspezifität	107
4.5.4	Substratbindung	109
4.5.5	Stabilität des Kofaktors	113
4.5.6	Redoxzustand des Molybdäns	113
4.6	Reaktionsmechanismus	114
4.7	Einfluss des Selen	117

---

4.8	Bedeutung für den Organismus	120
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>122</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>134</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

Å	Ångström, $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
AOR	Aldehyd-Oxidoreduktase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin Triphosphat
BLAST	Basical local alignment search tool
°C	Grad Celsius
ChinOR	Chinolin-Oxidoreduktase
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CODH	Kohlenmonoxid-Dehydrogenase
Da	Dalton [g/mol]
ddH <sub>2</sub> O	aqua bidestilata
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSOR	DMSO-Reduktase
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	Elektronen Paramagnetische Resonanz
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
<i>f</i>	Streufaktor
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
HDFT:	hybrid density functional theory
HCl	Hydrochlorische Säure
HTH	Helix-turn-helix motif
K	Kelvin degree
K <sub>d</sub>	Dissoziations-Konstante
MAD	Multi-wavelength Anomale Dispersion
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
MCD	<u>M</u> olypterin <u>C</u> ytosin <u>D</u> inukleotid
MGD	<u>M</u> olypterin <u>G</u> uanosin <u>D</u> inukleotid
Mo	Molybdän
Moco	Molybdopterin-Kofaktor
Mr	Relative Molekularmasse
MR	Molecular replacement

---

NaCl	Natrium Chlorid
NAD	Nicotinamiddinukleotid
NADP	Nicotinamiddinukleotidphosphat
NAH	Nicotinic Acid Hydroxylase
NDH	Nicotinat-Dehydrogenase
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
NaOH	Natriumhydroxyd
NCS	Non-crystallographic symmetry
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PEG	Polyethylen Glycol
ppm	parts per million
OD	Optische Dichte
QOR	(engl.) Quinoline Oxidoreductase
r.m.s.d.	root-mean-square deviation
SAD	Single Anomalous Diffraction
SDS	Natrium Dodecylsulfat
Se	Selen
SO	Sulfid-Oxidasen
TCA	Trichloroaceticacid (Trichloressigsäure)
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetraethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
Trx	Thioredoxin
tRNA	transfer RNA
U	Unit
UV-vis	Ultraviolett visible
v/v	volume per volume
W	Wolfram
w/v	weight per volume
XDH	Xanthin-Dehydrogenase
XO	Xanthin Oxidase
XOR	Xanthin-Oxidoreduktase



## Zusammenfassung

*Eubacterium barkeri* ist ein gram-positives, anaerobes Bakterium, das zur Ordnung der Clostridien gehört. Es ist der einzige bekannte Organismus, der Nicotinat fermentativ zu Propionat, Acetat, CO<sub>2</sub> und NH<sub>4</sub><sup>+</sup> abbauen kann. Initiiert wird dieser Abbauweg durch eine Selen-abhängige Nicotinat-Dehydrogenase, die zur Familie der Molybdän-abhängigen Xanthin-Oxidoreduktasen gehört.

Xanthin-Oxidoreduktasen sind große, meist dimere Moleküle die ihr Substrat unter gleichzeitiger Oxidation hydroxylieren. Katalysiert wird diese Reaktion durch einen charakteristischen Molybdän-Kofaktor, der im Verlauf der Reaktion als Hydrid-Akzeptor, Proton-Donor und Hydroxyl-Donor fungiert. Die Elektronen werden vom Molybdän aus über eine kurze Elektronentransport-Kette, bestehend aus zwei [2Fe2S]-Zentren sowie häufig einem FAD-Molekül, auf einen externen Elektronenakzeptor übertragen.

Durch Wachstum auf Nicotinat-haltigem Medium wurde die NDH in *E. barkeri* exprimiert. Es wurden verschiedene Reinigungsstrategien entwickelt die, in Bezug auf Reinheit und Aktivität, den Anforderungen der jeweiligen Kristallisation angepasst waren. Die kurze Halbwertszeit des instabilen Enzyms konnte durch eine verkürzte Reinigung von wenigen Stunden auf mehrere Tage verlängert werden.

Die Kristallisation des sauerstoffempfindlichen Enzyms erfolgte unter anaeroben Bedingungen, durch die Methode der Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen. Die Struktur der NDH konnte bei 2,2 Å gelöst werden. Die NDH ist eine typische Xanthin-Oxidoreduktase mit einer dimeren Grundstruktur, sowie jeweils einer Molybdän-, Flavin- und Eisen-Schwefel-Untereinheit je Monomer.

Weiter war es möglich, das Enzym in aktiver Form, d.h. mit Selen-haltigem Molybdän-Kofaktor zu kristallisieren und seine Struktur bei 2,5 Å zu lösen. Der Nachweis des Selens erfolgte unter Verwendung der anomalen Streuung des Selens am ESRF.

Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass das Selen als endständiger Ligand des Molybdäns eine äquivalente Position einnimmt wie Schwefel im Kofaktor anderer Xanthin-Oxidoreduktasen. Die NDH ist die erste Nicotinat-Dehydrogenase, sowie die einzige Xanthin-Oxidoreduktase mit endständigem Selenoliganden, die bisher kristallisiert werden konnte. Letztlich handelt es sich auch um die erste Kristallstruktur eines Enzyms, dessen katalytisch involviertes Selen nicht in Form von Selenocystein Bestandteil des Proteins ist.

## Summary

*Eubacterium barkeri* is a gram-positive, anaerobic bacterium of the order Clostridiales. It is the only known organism that is able to ferment nicotinate to propionate, acetate, CO<sub>2</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. The first step of this pathway is catalysed by a seleno-dependent nicotinate dehydrogenase, a member of the molybdenum-dependent xanthine oxidoreductases.

Xanthine oxidoreductases are large, often dimeric molecules that hydroxylate their substrate under concomitant oxidation. The reaction is catalysed by a characteristic molybdenum cofactor that functions as hydride acceptor, proton donor and hydroxyl donor in the course of reaction. The electrons are transferred by a short electron transport chain, starting at the molybdenum cofactor followed by two [2Fe2S]-centers and commonly a FAD molecule, to an external electron acceptor.

The oxygen sensitive enzyme was crystallized by vapour diffusion hanging drop under anaerobic conditions. The structure of NDH was solved at 2.2 Å. NDH is a typical xanthine oxidoreductase with a dimeric organisation, each monomer consisting of one molybdo-, one flavin- and one iron-sulfur cluster containing subunit.

Further, the enzyme was crystallized with the selenium containing molybdenum cofactor still intact and its structure was solved at 2.5 Å. Selenium was detected by its anomalous dispersion at the ESRF.

It could be shown that selenium is bound as a terminal ligand to molybdenum and occupies an equivalent position as the terminal sulfido ligand in the cofactor of different xanthine oxidases.

NDH from *Eubacterium barkeri* is the first nicotinate dehydrogenase as well as the first xanthine oxidoreductase with a terminal seleno ligand that could be crystallised so far. It is the first crystal structure of an enzyme that contains selenium in the form of a nonselenocysteine ligand.

## 1. Einleitung

### 1.1 Molybdän, Selen und ihre biologische Bedeutung

Molybdän (Mo) ist ein Übergangsmetall der zweiten Reihe der Übergangsmetalle (4d). Es ist das einzige Element dieser Reihe mit biologischer Funktion und ist in der Erdkruste nur in Spuren von  $1 \cdot 10^{-3} \%$  vorhanden. Trotzdem ist Molybdän universell in nahezu allen Organismen vorhanden. Ihm werden eine bedeutende Rolle bei den globalen Kreisläufen des Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel zugeschrieben (Johnson, Rees et al., 1996), (Stiefel, 1997). Bisher sind über 50 Redoxprozesse unter Beteiligung von Molybdän bzw. Wolfram bekannt und untersucht worden (Hille, 1999). Sein Vorkommen erstreckt sich hierbei über alle Reiche des Lebens.

Der hohe Stellenwert für biologische Systeme ist auf zwei Eigenschaften zurückzuführen. Die gute biologische Verfügbarkeit trägt dazu bei, dass es ungeachtet seines geringen Vorkommens für alle Organismen zugänglich ist. So sind bei pH 7 viele Molybdän-Verbindungen, insbesondere jedoch seine hochvalenten Oxide, wie die als Molybdate bezeichneten Trioxide, gut wasserlöslich. Andere Elemente in diesem Bereich des Periodensystem zeigen dagegen unter physiologischen Bedingungen eine deutlich reduzierte Löslichkeit (Kaim und Schwederski, 1994).

Die zweite wichtige Eigenschaft besteht darin, mehrere verschiedene Oxidationszustände einnehmen zu können. Mögliche Oxidationszustände liegen zwischen +2 und +6, in biologischen Systemen werden auf Grund des Einflusses der Proteinliganden jedoch meist +4-, +5- und +6-Zustände bevorzugt (Kletzin und Adams, 1996). Der oxidierte +6-Zustand ist dabei der stabilste. Durch die Möglichkeit den intermediären +5-Zustand einnehmen zu können, bildet Molybdän einen guten Vermittler zwischen Redoxprozessen, an denen der Transfer eines oder zweier Elektronen beteiligt ist. Das Redoxpotential von biologisch aktivem Molybdän liegt im Bereich von  $-300$  mV und damit im physiologisch erlaubten Bereich (Kaim und Schwederski, 1994). Aus diesen Eigenschaften ergeben sich gegenüber den häufiger vorkommenden Metallen dieser Reihe katalytische Vorteile.

Mit deutlich geringerer Häufigkeit gibt es Enzyme, bei denen Wolfram die Funktion des Molybdäns übernimmt. In einigen Versuchen konnte gezeigt werden (L'vov, Nosikov et al., 2002), dass Wolfram auch in Molybdoenzymen in eingeschränkter Weise die Rolle des Molybdäns übernehmen kann, da seine chemischen und physikalischen Eigenschaften denen des Molybdän ähnlich sind. Häufig führt ein Austausch jedoch zur Inaktivität des betreffenden Enzyms. Von biologischer Relevanz scheint zu sein, dass Wolfram-Komplexe

schlecht wasserlöslich sind und ein höheres Redoxpotential besitzen (Normalpotentiale: Mo= -0,2 V; W= -0,09 V). Wolfram wurde bisher nur in Organismen gefunden, die unter anaeroben Bedingungen leben, die meisten davon sind thermophil oder hyperthermophil. Über ein Vorkommen in eukaryotischen Organismen ist nichts bekannt.

Ein Grund für ein erhöhtes Vorkommen unter extremen Bedingungen ist wahrscheinlich die erhöhte Wasserlöslichkeit von Wolfram-Komplexen, insbesondere der niedrig-valenten Sulfide, unter reduzierenden Bedingungen und hohen Temperaturen. Man nimmt an, dass dadurch eine verbesserte katalytische Aktivität in Folge des höheren Redoxpotentials für diese Organismen verfügbar wird. Sowohl synthetische Molybdän- als auch Wolfram-Komplexe zeigen eine hohe Sauerstoffempfindlichkeit. Während diese im Fall des Molybdäns durch einen Proteinliganden deutlich stabilisiert werden können, sind Wolfram-Komplexe auch im Protein sauerstoffempfindlich. Auf Grund dieser Befunde wurde Wolfram als evolutionärer Vorläufer des Molybdäns in Betracht gezogen (Abdel-Rassol,2003).

**Tabelle 1.1: Ausgewählte Eigenschaften von Schwefel, Selen, Molybdän und Wolfram.** Die jeweils stabilsten Oxidationsstufen eines Elements sind durch Fettdruck gekennzeichnet.

	Schwefel	Selen	Molybdän	Wolfram
Ordnungszahl	16	34	42	74
Gruppe, Periode, Block	16, 3, p	16, 4, p	6, 5, d	6, 6, d
Elektronenkonfiguration	[Ne]3s <sup>2</sup> 3p <sup>4</sup>	[Ar]3d <sup>10</sup> 4s <sup>2</sup> 4p <sup>4</sup>	[Kr] 4d <sup>5</sup> 5s <sup>1</sup>	[Xe] 4f <sup>14</sup> 5d <sup>4</sup> 6s <sup>2</sup>
Elektron je Schale	2, 8, 6	2, 8, 18, 6	2, 8, 18, 13, 12, 8, 18, 32, 12, 2	
Atommasse	32,065	78,96	95,94	183,84
Atomradius	100 pm	115 pm	145 pm	135 pm
Kovalenter Radius	102 pm	116 pm	145 pm	146 pm
Van der Waals Radius	180 pm	190 pm	-	-
Elektronegativität	2,58	2,48	2,16	2,36
Normalpotential	-0,48V	-0,924V	-0,2V	-0,09V
Oxidationszustände	±2, 4, <b>6</b>	±2, <b>4</b> , 6	2, 3, 4, 5, <b>6</b>	<b>6</b> , 5, 4, 3, 2
Vorkommen	0,05%	8 · 10 <sup>-5</sup> %	1 · 10 <sup>-3</sup> %	6 · 10 <sup>-3</sup> %

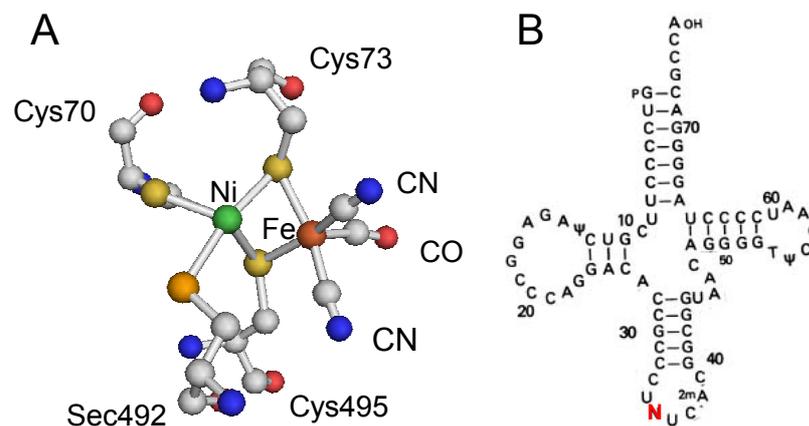
Selen gehört wie der Schwefel zu den Elementen der sechsten Hauptgruppe (Tab. 1.1). Schwefel ist in biologischen Systemen weit verbreitet. Sein Vorkommen erstreckt sich über alle biologisch relevanten Moleküle, wie Nukleinsäuren, Proteine, Fettsäuren und Lipide, Zucker, Kofaktoren, Hormone und Zellwände. Grund ist seine hohe chemische Vielseitigkeit und hohe Verfügbarkeit. Schwefel übernimmt strukturelle, katalytische und regulatorische Funktionen. Es kann in vielen verschiedenen Oxidationsstufen (+1 bis +6 alle) vorliegen, und ist in der Lage zu zahlreichen anderen Elementen (Metallen und Nicht-Metallen) Bindungen mit überwiegend kovalentem oder ionisch-koordinativem Charakter aufzubauen.

Das Vorkommen von Selen ist sowohl in biologischer als auch in geologischer Hinsicht deutlich geringer. In der Erdkruste ist Selen nur in geringen Konzentrationen von  $0,05 \cdot 10^{-3} \%$  vorhanden, die Häufigkeit seines Vorkommens entspricht damit dem des Goldes. Es tritt meist analog zu den schwefelhaltigen Verbindungen als Selenat, Selenit oder als Metalselenid auf. Seine Bioverfügbarkeit ist auf Grund der geringen Löslichkeit dieser Oxokomplexe eingeschränkt.

Selen wird zu den Halbmetallen gezählt, eine typische Eigenschaft ist eine lichtinduzierte Erhöhung seiner elektrischen Leitfähigkeit. Die Bindungen des Selens können sowohl kovalenten als auch ionischen Charakter besitzen. Seine chemischen und physikalischen Eigenschaften sind denen des Schwefel sehr ähnlich. Es kann wie dieser Oxidationszustände zwischen  $-2$ ,  $+4$  und  $+6$  einnehmen, wobei der  $+4$ -Zustand bevorzugt ist (Tab. 1.1). Ein deutlicher Unterschied zum Schwefel liegt in seinem geringeren Redoxpotential ( $S^{2-} = -0,48$  V;  $Se^{2-} = -0,924$  V), wodurch es schlechter reduzierbar wird als Schwefel (Tab. 1.1).

Obwohl biologisch schwer zugänglich, kommt Selen in allen drei Reichen des Lebens vor (Zhang und Gladyshev, 2007). Selen erfüllt in zwei Bereichen des Lebens wichtige Funktionen (Abb. 1.1). Die erste liegt in seinem Vorkommen in Nukleosid-Derivaten (z.B. als 5-Methylaminomethyl-2-Selenouridin in der tRNA<sup>Glu</sup> in *Clostridium sticklandii*) einiger tRNAs in der ersten Position des Anticodons. Diese Position bezeichnet die sogenannte „Wobble“-Position, die oft ungewöhnliche Nukleoside enthält. Man nimmt an, dass dies Auswirkungen auf die Codon-Erkennung hat und damit die Effizienz bestimmter mRNAs verändert wird. tRNAs, die 2-Thiouridin enthalten (Beispiel: *E. coli* tRNA<sub>2</sub><sup>Glu</sup>), interagieren bevorzugt mit Codons die Adenosin (Lysine, AAA; Glutamat, GAA) und nicht Guanosin (AAG and GAG) in der dritten Position des Codons (Ching, Alzner-Deweerd et al., 1985) enthalten. Uracil dagegen kann in dieser Position auch mit Guanosin wechselwirken. Die verringerte Interaktion von 2-Thiouridin mit Guanosin kann dadurch erklärt werden, dass die H-Brücke zwischen der 2-Thio-Gruppe und Guanosin im Vergleich zum herkömmlichen U-A-

Basenpaar schwächer ist (Yoshida, Takeishi et al., 1971). Im Weiteren sollte die Interaktion mit einer 2-Selenogruppe noch schwächer sein als die mit einer 2-Thiogruppe. Im Fall von *C. sticklandii* könnte somit die Translation des Glutamat-Codons GAG bevorzugt werden (Ching, Alzner-Deweerd et al., 1985).



**Abbildung 1.1:** Selen ist Bestandteil von Enzymen und Nukleinsäuren. A) Aktives Zentrum der [NiFeSe]-Hydrogenase aus *Desulfomicrobium baculatum* (Garcin, Vernede et al., 1999). Einer der sonst üblichen Cystein-Liganden ist durch ein Selenocystein (Sec492) ausgetauscht. CN=Zyanid, CO=Kohlenmonoxid, Ni= Nickel, Fe=Eisen B) tRNA<sup>Glu</sup> aus *C. sticklandii*. N (rot) bezeichnet 5-Methylaminomethyl-2-Selenouridin in der „Wobble“-Position des Anticodons.

Die zweite biologische Aufgabe liegt in seiner katalytischen Funktion, die meist durch die Aminosäure Selenocystein übernommen wird. Selenocystein wird auch als die 21igste Aminosäure bezeichnet (Bock, Forchhammer et al., 1991). Sie wurde 1973 (Flohe, Günzler et al., 1973) entdeckt und ihre Funktion in der Translationskodierung 1986 aufgeklärt (Chambers, Frampton et al., 1986). Selenocystein ist schlechter löslich als Cystein, es neigt unter oxidischen Bedingungen in erhöhtem Maße zur Bildung von Selenocystin und ist als Bestandteil einer Polypeptidkette deutlich sauerstoffempfindlicher. Viele Selenoenzyme werden daher unter hohem Sauerstoffpartialdruck inaktiviert.

In beiden oben genannten Fällen ist Selen kovalent in organische Materie eingebunden. Eine weitere katalytische Funktion erfüllt dieses Element in einer sehr kleinen Gruppe von Molybdän-abhängigen Enzymen, in denen es als terminaler Komplex-Ligand eines zentralen Molybdän Atoms auftritt. Diese Gruppe wird weiter unten noch genauer beschrieben.

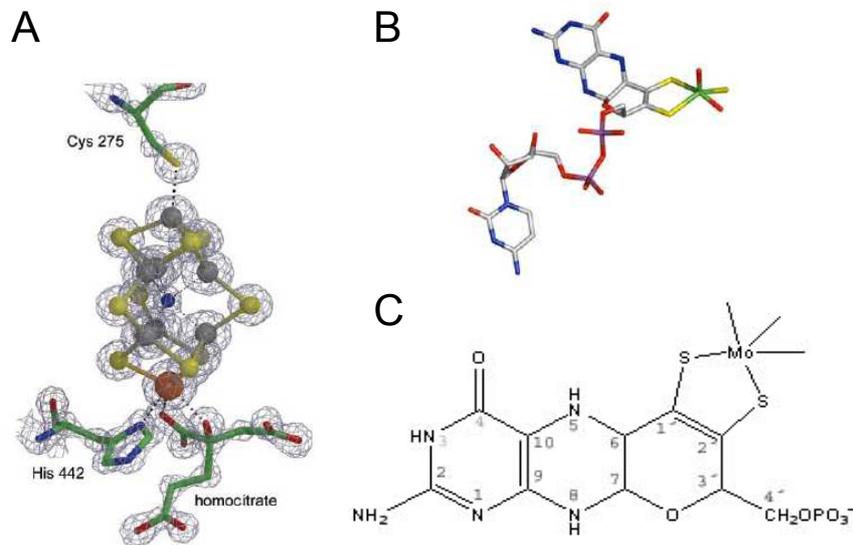
Auch in evolutionärer Hinsicht wurde Selen oft untersucht. Nahezu alle anorganischen Selenverbindungen sind unter anaeroben Bedingungen unlöslicher als unter oxischen (Reddy und Gloss, 1993), seine Verfügbarkeit unter reduzierenden Bedingungen ist daher noch weiter eingeschränkt. Dem steht gegenüber, dass Selenocystein deutlich sauerstoffempfindlicher ist als Cystein. Man nimmt an, dass Selen schon vor der Trennung der Reiche genutzt wurde, da alle Organismen zur Biosynthese von Selenophosphat ein homologes System verwenden (Romero, Zhang et al., 2005). Die Phyla mit dem größten Selenoproteom sind *Proteobacteria*, *Firmicutes* und *Spirochaetes*, die jedoch auch selenarme Organismen enthalten (Zhang und Gladyshev, 2005). Ursprünglich nahm man an, dass die Selen-haltigen Enzyme, ähnlich den Wolfram-haltigen, die evolutionär ältere Form der Thio-Oxidoreduktasen darstellen. Heute geht man jedoch zunehmend davon aus, dass sich der überwiegende Teil aller Selenoproteine aus Cystein-haltigen Homologen entwickelt hat (Zhang, Romero et al., 2006). Wahrscheinlich ist, dass sich infolge der Oxidation der Erdatmosphäre zunehmend effektivere Mechanismen zur Korrektur und Vermeidung oxidativer Schäden entwickelt haben. Auffallend ist die hohe Anzahl an Selenoproteinen mit antioxidativer Funktion (Berry, Banu et al., 1991; Morozova, Forry et al., 2003; Zavacki, Mansell et al., 2003).

Im allgemeinen wird eine erhöhte katalytische Aktivität Selen-haltiger gegenüber Schwefel-haltiger Enzyme angenommen. Der Vorteil einer besseren Katalyse scheint jedoch nicht ausschlaggebend zu sein, da auch bei eng verwandten Enzymen selen- oder schwefelhaltige Homologe scheinbar willkürlich ausgetauscht sein können. Die geologische Verfügbarkeit dagegen spielt bei der Verwendung von Selen eine große Rolle. So besitzen einige Familien Gene sowohl für selen- als auch schwefelhaltige Isoenzyme, deren Expression über die Konzentration von Selen reguliert wird. Selenreiche Ökosysteme weisen ein deutlich vergrößertes Selenogenom auf (Zhang, Fomenko et al., 2005).

## 1.2 Molybdän- und Selen-haltige Enzyme

Molybdän kommt als Kofaktor in zwei Enzymfamilien vor, den Nitrogenasen und den Molybdän-haltigen Oxidoreduktasen. Einziger Vertreter der ersten Familie sind die Nitrogenasen, die Molybdän in Form eines komplexen multinuklearen FeMo-Kofaktors (FeMoco) enthalten. Der Kofaktor wird über das terminale Eisen durch ein Cystein und über das Molybdän durch ein Histidin an das Protein gebunden. Ein Homocitrat Molekül stellt einen weiteren Liganden des Molybdäns dar, sodass das Molybdän eine nahezu quadratisch-pyramidale Koordinationsgeometrie aufweist (Abb. 1.2 A)(Einsle, Tezcan et al., 2002). In den

Nitrogenasen wird  $N_2$  am Molybdän in einer Azoferredoxin- und ATP-abhängigen Reaktion zu  $NH_3$  reduziert.



**Abbildung 1.2: Molybdän-haltige Kofaktoren.** A) Multinuklearer FeMo-Kofaktor der Nitrogenasen. Molybdän ist Teil eines komplexen Eisen-Schwefel Zentrums. Weitere Liganden sind ein Histidin, ein Cystein und ein Homocitrat. Quelle: Einsle et al., Science 2002. B) Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid (MCD) aus Bakterien. Cytosin kann gegen Guanosin, Adenosin, Inosin oder Derivaten ausgetauscht sein. C) Molybdopterin-Kofaktor (Moco) aus Eukaryoten. Der Pterin-Bereich ist identisch zu den Prokaryoten. Eukaryoten besitzen jedoch kein Dinukleotid, am C4' befindet sich hier nur eine Phosphatgruppe.

Die Familie der Molybdän-Oxidoreduktasen ist eine große und heterogene Familie, deren Vertreter in fast allen Organismen vorhanden sind und ein weites Spektrum der verschiedensten Reaktionen katalysieren. Gemeinsam ist ihnen allen (mit einigen Ausnahmen zum Beispiel der CODH aus *Oligotropha carboxidovorans* oder *Hydrogenophaga pseudoflava*), dass sie unter Spaltung einer C-H Bindung die Insertion eines Sauerstoffatoms in ihr Substrat katalysieren. Das Molybdän wechselt während der Katalyse zwischen der oxidierten Form (+6) und der reduzierten Form (+4). Diese Eigenschaft ermöglicht einen für diese Reaktion wichtigen Hydridtransfer auf das Metallzentrum.

Die Molybdän-Oxidoreduktasen lassen sich auf Grund ihrer Sequenz, ihres Reaktionsmechanismus und der Architektur des Molybdän-Kofaktors in vier Gruppen unterteilen, in die Xanthin-Oxidoreduktasen (XOR), die DMSO-Reduktase (DMSOR), die

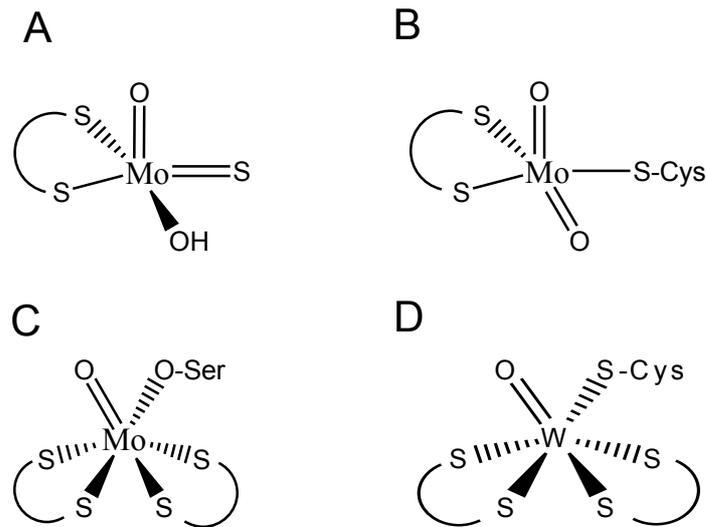
Sulfid-Oxidase (SO) und die Wolfram-abhängigen Aldehyd-Oxidoreduktasen (W-AOR) (Kisker, Schindelin et al., 1997).

Alle Familien enthalten das Molybdän (oder Wolfram) in Form eines so genannten Molybdopterin-Kofaktors (Moco = molybdopterin cofactor). Das Grundgerüst bildet ein bizyklisches Pterinderivat, das mit einem zusätzlichen Pyran-Ring substituiert ist. Der Kofaktor wird ohne Molybdän als MPT (metal-binding pterin) bezeichnet. Gelegentlich wird er auch als Pyranopterin bezeichnet, in Anlehnung an die Wolfram-abhängige AOR aus *Pyrococcus furiosus* (Chan, Mukund et al., 1995), deren Kristallstruktur als erstes Enzym dieser Familie gelöst wurde. Dadurch konnte auch die Struktur des Kofaktors zum ersten Mal beschrieben werden. Außerhalb seiner Proteinumgebung ist der Kofaktor extrem instabil und konnte weder gereinigt noch synthetisiert werden. Struktur und Biosynthese des Kofaktors sind in allen Organismen konserviert.

Der Pyranring besitzt in der 3'-Position noch eine phosphorylierte Seitenkette. Unterschiede in der Struktur des Kofaktors treten zwischen Eukaryota und Prokaryota auf. Eukaryota enthalten ausschließlich den in Abbildung 1.2 C dargestellten Kofaktor. Dagegen liegt der Kofaktor bei Bakterien und Archaea als Dinukleotid vor (Abb.:1.2 C). Der Ribonukleotid-Anteil ist meist ein Guanosin (MGD, Molypterin-Guanosin-Dinukleotid) oder Cytosin (MCD), seltener auch Adenin oder Uracil. Das Molybdän wird vom Kofaktor über die beiden Schwefel der Enedithiolat-Gruppe des Pyranringes koordiniert. Daneben wird Molybdän noch von weiteren Liganden koordiniert, die für die jeweilige Familie charakteristisch sind.

In der XOR-Familie, der Familie mit den meisten Vertretern, wird das Molybdän klassischerweise über drei weitere terminale Liganden, einem apikalen Oxoliganden, sowie einer äquatorialen Hydroxylgruppe, die auch „labile site“ genannt wird, und einer Sulfogruppe koordiniert (LmoOS-Einheit) (Abb. 1.3 A). Daraus ergibt sich eine quadratisch-pyramidale Geometrie der Molybdän-Koordinationsphäre. Eine Variation dieses Prinzips liegt im binuklearen Zentrum der CODH aus *Oligotropha carboxidovorans* vor (Dobbek, Gremer et al. 1999), bei der der Schwefel in Form eines  $\mu$ -Sulfido-Liganden das Molybdän mit einem Cu(I)-Atom verbindet.

Weitere Beispiele dieser Familie sind die Xanthin-Dehydrogenase/Oxidase (Huber, Hof et al., 1996), die 4-HBCR aus *Thauera aromatica* (Unciuleac, Warkentin et al., 2004), die Mo-Aldehyd-Oxidoreduktase (Mo-AOR, oder MOP für Molybdoprotein) aus *Desulfovibrio gigas* (Romão, Archer et al., 1995) oder die Chinolin-Oxidoreduktase (ChinOR) aus *Pseudomonas putida* (Bonin, Martins et al., 2004). XORs katalysieren die oxidative Hydroxylierung verschiedenster Aldehyde und Heterozyklen.



**Abbildung 1.3: Kofaktor-Architektur der vier Molybdän-Oxidoreduktasen Familien.** A) XOR-Familie B) SO-Familie C) DMSOR-Familie; O-Ser kann gegen S-Cys, Se-Cys oder OH ausgetauscht sein D) W-AOR-Familie; S-Cys kann gegen Se-Cys oder OH ausgetauscht sein.

Die Sulfid-Oxidase Familie besitzt zwei Oxoliganden ( $\text{LMoO}_2$ -Einheit), einen apikalen und einen äquatorialen, sowie einen Cysteinyl-Liganden. Beispiele sind die eukaryotische Sulfid-Oxidase und die assimilatorische Nitrat-Reduktase (Abb. 1.3 B). Sie katalysieren den Sauerstofftransfer zu oder von einem freien Elektronenpaar eines Substrat-Schwefel oder Stickstoffatoms (Kisker, Schindelin et al., 1997). Alle bisher beschriebenen Sulfid-Oxidasen sind eukaryotische Enzyme.

Die DMSO-Familie, ebenso wie die Wolfram-abhängigen Enzyme, enthalten je zwei Pterin-Liganden, einen sogenannten Bis(Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid) Molybdän-Kofaktor, sowie zwei weitere Liganden ( $\text{L}_2\text{MoOX}$ -Einheit) (Abb. 1.3 C). Dabei handelt es sich um einen Oxo- und einen Serin-Liganden, letzterer kann auch gegen ein Cysteinyl-, Selenocysteinyl- oder eine Hydroxylgruppe ausgetauscht sein. Vertreter der DMSO-Familie können in vielen verschiedenen Bakterien gefunden werden. Zu ihnen gehören die dissimilatorische Nitrat-Reduktase, Formiat-Dehydrogenase, Trimethylamin-N-oxid-Reduktase und die Biotin-Sulfoxid-Reduktase(n). Sie katalysieren Oxo-Transfer Reaktionen, generelle Redoxreaktionen oder andere komplexere Reaktionen (Hille, 1999).

Die W-Aldehyd-Oxidoreduktase Familie ist in Bezug auf Struktur und Funktion sehr divers. Sie wird daher oft noch einmal in zwei Unterfamilien, die Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase und die Formiat-Dehydrogenase (FDH)-Familie, unterteilt. Neben zwei

Moco-Liganden wird das Wolfram noch durch eine Oxogruppe und einen weiteren Liganden koordiniert, bei dem es sich um eine Hydroxylgruppe (Aldehyd Ferredoxin Oxidoreduktase), ein Cystein oder ein Selenocystein (FDH) handeln kann (Abb. 1.3 D).

Neben den Nitrogenasen und Molybdän-Oxidoreduktasen, die beide Molybdän zur Katalyse von Redoxreaktionen nutzen, gibt es noch weitere Enzyme die Molybdän binden können. Diese sind zum Teil ausführlich, teilweise noch sehr wenig charakterisiert. Es handelt sich dabei um Proteine, die an der Aufnahme und Transport von Molybdän (ModABCD,E) (Anderson, Palmer et al., 1997), der Biosynthese des Moco (Solomon, Shaw et al., 1999) oder der Regulation von Molybdän-abhängiger Genexpression (ModR) (Walkenhorst, Hemschemeier et al., 1995) beteiligt sind.

Die Einteilung von selenhaltigen Enzymen in Gruppen ist deutlich schwieriger, da das Auftreten von Selen nicht funktionell an bestimmte Enzymfamilien gekoppelt, sondern mosaikartig über diverse Familien und phylogenetische Stammbäume verteilt ist. Nahezu alle Selenoenzyme besitzen, wahrscheinlich wegen der ähnlichen Eigenschaften zum Schwefel, schwefelhaltige Homologe mit teilweise gleicher Funktion. Ausnahmen bilden die eukaryotische Glutathionperoxidase, die Säuger Thioredoxin Reduktase und die prokaryotische Glycin-Reduktase Selenoprotein A, von denen nur Selenocystein-haltige Isoformen bekannt sind (Gromer, Johansson et al., 2003; Zhang, Romero et al., 2006; Banerjee und Gladyshev, 2008). Scheinbar konnte der Austausch von Schwefel gegen Selen in der Evolution spontan und ungerichtet erfolgen und folgte häufig keinen erkennbaren Regeln. Selen scheint in Tieren, in Form der Glutathionperoxidase, dem ersten beschriebenen Selenoenzym (Flohe, Günzler et al., 1973), universell vertreten zu sein, dagegen sind mehrere Pilze und Bakterien bekannt, die kein Selenocystein verwenden. Innerhalb der prokaryotischen Phyla ist Selen ebenso unregelmäßig verteilt wie zwischen Organismen mit aerober oder anaerober Lebensweise.

Die Selenoenzyme lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Bei der ersten Gruppe handelt es sich um Enzyme, in denen Selen in Form der Aminosäure Selenocystein kovalent gebunden und somit ein integraler Bestandteil der Peptidkette ist. Die Anzahl der Mitglieder dieser Enzymfamilien ist hoch (Zhang, Romero et al., 2006), einige Beispiele sind Selenophosphat-Synthase, Selenoprotein W, Hydrogenasen, Prolin- Thioredoxin- oder Peroxiredoxin-Reduktase. Auffallend ist die hohe Zahl an katalysierten Redoxprozessen und anti-oxidativen Prozessen (Zhang, Fomenko et al., 2005).

Die zweite Gruppe bilden selenabhängige Molybdän-Oxidoreduktasen, bei denen Selen in zwei Familien auftreten kann. In Mitgliedern der DMSO-Reduktase Familie (FDH, Arsenit-Oxidase) stellt Selenocystein den sechsten Liganden des Molybdäns. Bei der zweiten und deutlich kleineren Gruppe handelt es sich um Vertreter der XOR-Familie, bei denen Selen als endständiger, zyanid-labiler Ligand des Molybdäns auftritt. Nur sechs dieser Enzyme sind bekannt, die Nicotinat-Dehydrogenase (*ebNDH*) und Xanthin-Dehydrogenase (*ebXDH*) aus *Eubacterium barkeri*, die Purin-Hydroxylase (*cpPH*) und XDH aus *Clostridium purinolyticum* (*cpXDH*) sowie die XDH aus *Clostridium acidurici* (*caXDH*) und *Clostridium cylindrosporum* (*ccXDH*) (Holcenberg und Stadtman 1969; Wagner und Andreesen 1979; Schröder, Rienhöfer et al., 1999; Self, Wolfe et al., 2003).

Die Anzahl der neu entdeckten Selenoproteine steigt ständig. Das mikrobielle Genom-Projekt der Sargassosee (Zhang, Fomenko et al., 2005) erbrachte gleich mehrere neue Familien. Sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Genomsequenzen lassen sich Selenocystein-haltige Enzyme mittlerweile recht gut über ihr jeweils charakteristisches SECIS-Element (SElenuCystein Insertion SequenCe), sowie über das Vorhandensein des Markerenzym Selenophosphat-Synthase (*SelD*), bestimmen (Zhang und Gladyshev, 2005). Letztere beiden gelten als unumgängliche Notwendigkeit für die Synthese von Selenocystein. Auf diese Weise lassen sich jedoch nur Selenocystein-haltige Enzyme finden. Posttranslational modifizierte Enzyme, wie im Fall der Molybdän-Oxidoreduktasen, können auf diese Weise nicht entdeckt werden. Da über die Insertion von Selen in den Molybdän-Kofaktor nichts bekannt ist, konnte auf genomischer Basis bisher nicht gezielt nach dieser Enzymgruppe gesucht werden. Möglicherweise trägt diese Einschränkung mit zur großen Differenz bekannter Vertreter beider Gruppen bei. Neuere Untersuchungen fanden jedoch eine Gruppe von Proteinen ohne bekannte Funktion oder bekannter Homologe, die in nahegelegenen Genbereichen von *SelD* gefunden wurden. Die Autoren vermuten in ihnen mögliche akzessorische Proteine, die zur Aktivierung selen-abhängiger Molybdän-Hydroxylasen wichtig sein könnten (Haft und Self, 2008). Unter diesen Umständen würde auch eine systematische Suche nach dieser Enzymgruppe möglich werden.

### 1.3 Die XOR-Familie

Vertreter der Xanthin-Oxidoreduktase Familie katalysieren die oxidative Hydroxylierung eines oder mehrerer Substrate unter gleichzeitiger Spaltung einer C-H-Bindung. Substrate sind häufig Aldehyde oder relativ aktivierte heterozyklische Verbindungen. Ausnahmen bilden beispielsweise die 4-HBCR aus *Thauera aromatica*, die eine reduktive

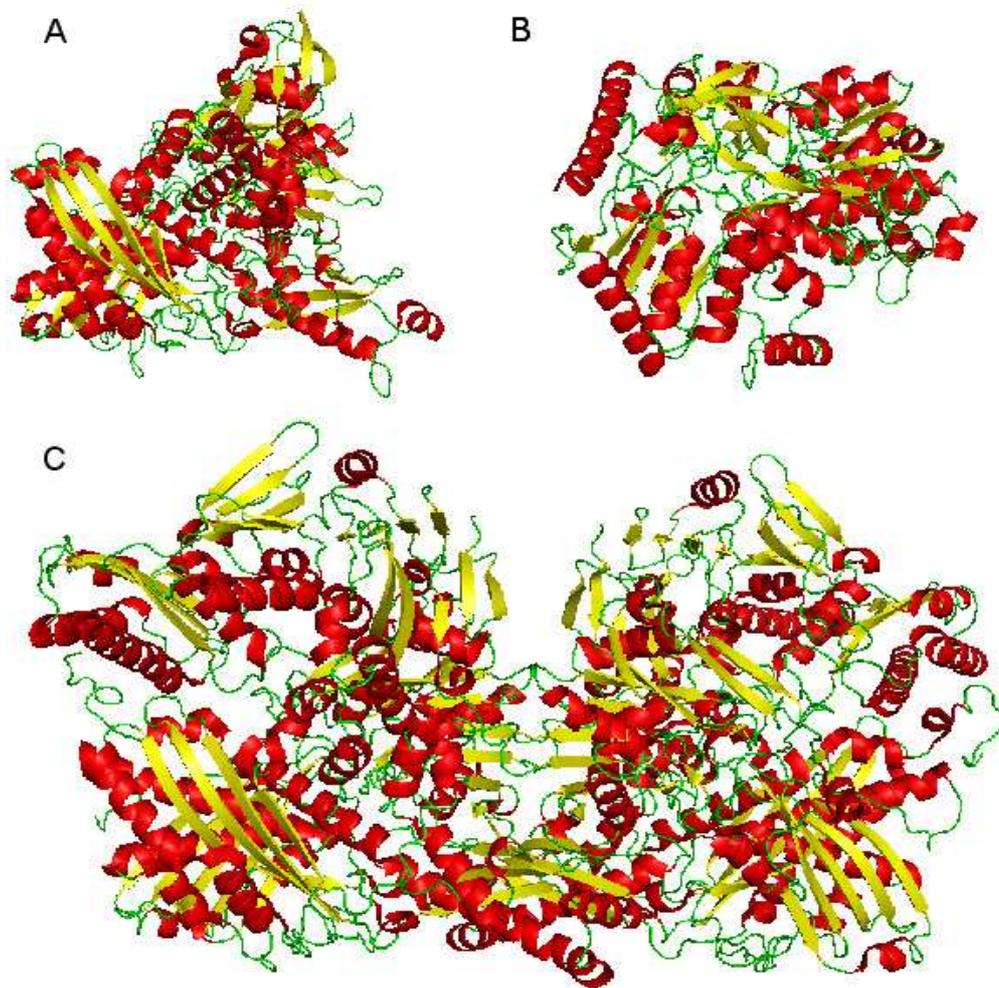
Dehydroxylierung von 4-Hydroxybenzoyl-CoA katalysiert, oder die CODH, die CO zu CO<sub>2</sub> oxidiert.

Interesse an diesen Enzymen besteht, da sie eine bekannte Reaktion, die Aktivierung eines C-Atoms durch Hydroxylierung und Spaltung einer C-H-Bindung, auf eine ungewöhnliche Weise katalysieren (Hille, 2006). Dieser Mechanismus unterscheidet sich fundamental von anderen Hydroxylierungen, zum einen weil bei diesen Enzymen Reduktionsäquivalente erzeugt und nicht wie üblich verbraucht werden, zum anderen weil die Quelle der eingefügten Hydroxylgruppe ein Wassermolekül aus dem Solvenz ist. Üblicherweise verwenden Mono- und Dioxygenasen molekularen Sauerstoff als Quelle für den eingefügten Sauerstoff.

Während der Katalyse bildet der Hydroxyligand durch einen nukleophilen Angriff auf ein C-Atom des Substrates eine kovalente Bindung zu diesem aus. Gleichzeitig erfolgt ein Hydridtransfer vom Substrat auf den Sulfidoliganden, wodurch es zu einer Reduktion des Molybdäns von +6 zu +4 kommt.

Die Elektronen verlassen das Molybdän in zwei Einzelschritten und der Sulfidoligand wird wieder deprotoniert. Der Hydroxyligand wird durch ein Wassermolekül aus dem Solvenz regeneriert, wodurch gleichzeitig das noch ans Molybdän gebundene Produkt verdrängt wird. Die Elektronen werden über verschiedene Redoxzentren, meist handelt es sich um zwei [2Fe2S]-Zentren und ein FAD-Molekül, an einen externen Elektronen-Akzeptor weitergeleitet.

Viele Vertreter dieser Familie weisen drei Domänen oder Untereinheiten auf (Abb. 1.4). Die C-terminale und größte Domäne bindet den Molybdän-Kofaktor, gefolgt von einer mittleren FAD-bindenden Domäne, die allerdings in einigen Enzymen durch eine Cytochrom-c-Domäne ersetzt sein oder ganz fehlen kann. Die FAD-bindende Domäne weist sequentielle und strukturelle Homologien zu den Vanillyl-Alkohol-Oxidasen (VAO) auf, einer Flavoproteinfamilie mit gemeinsamen, konserviertem FAD-Bindemotif (De Jong, Van Berkel et al. 2005). N-terminal liegt die kleinste Domäne, die zwei ungleiche [2Fe2S]-Zentren bindet. Das N-terminale [2Fe2S]-Zentrum (Typ-II) wird durch eine den pflanzlichen Ferredoxinen ähnliche Domäne gebunden. Das zweite (Typ-I) hingegen weist keine strukturellen Ähnlichkeiten zu anderen Protein-Familien auf und ist daher einzigartig für die Familie der XOR. Die vier Kofaktoren sind zu einer Kette angeordnet, die die Elektronen vom aktiven Zentrum (Moco), über die beiden Eisen-Schwefel Zentren zum FAD transportieren, um sie dann auf einen geeigneten Elektronenakzeptor zu übertragen. Dieser Grundaufbau ist nicht zwingend notwendig, verschiedenste Variationen sind bekannt.



**Abbildung 1.4:**        **Strukturen einiger Molybdän Hydroxylasen.** A) Mo-AOR (Romao, Archer *et al.*, 1995) B) W-AOR C) *btXDH*. Mo-AOR und *btXDH* weisen eine sehr ähnliche Struktur auf. Mo-AOR ist jedoch ein Monomer und es fehlt die FAD-bindende Domäne. Obwohl die W-AOR ähnliche Reaktionen wie Mo-AOR katalysiert, haben beide Enzyme keine strukturelle Ähnlichkeit.

Während diese Domänen bei Eukaryoten meist auf einem durchgehenden Peptidstrang liegen, sind die einzelnen Domänen bei Bakterien oft aber nicht immer in entsprechende funktionelle Untereinheiten unterteilt. Auch wenn die sequentiellen Gemeinsamkeiten teilweise sehr gering sind, weisen alle bisher gelösten Strukturen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf.

Als erster Vertreter der Molybdän-Oxidoreduktasen konnte die Kristallstruktur der W-abhängigen Aldehyd-Oxidoreduktase AOR aus *Pyrococcus furiosus* (Chan, Mukund *et al.*, 1995) gelöst werden. Es folgten Mo-AOR aus *Desulfovibrio gigas* (Romão, Archer *et al.*,

1995) (Abb. 1.4 A) und CODH aus *Oligotropha carboxydovorans* (Dobbek, Gremer et al., 1999).

#### 1.4 Nicotinat-Fermentation

*Eubacterium barkeri* ist ein strikt anaerobes Bodenbakterium der Ordnung Clostridiales (Cluster XV ATCC number 25849). Es wurde 1957 das erste Mal von Harary aus Sedimenten des Potomac Rivers (Washington, USA) isoliert (Harary, 1957) und 1972 von Stadtman ursprünglich als Vertreter der Gattung Clostridium beschrieben (Stadtman, Stadtman et al., 1972). Später wurde es dann auf Grund von 16S-rRNA Analysen in die Familie *Eubacteriaceae* reklassifiziert ((Collins, Lawson et al., 1994) (Willems und Collins, 1996)). Isolation erfolgte auf der bis heute einzigartigen Fähigkeit dieses Organismus Nicotinat fermentativ als C-Quelle zu nutzen.

Diese Fähigkeit spiegelt die charakteristische Stoffwechselvielfalt der *Clostridiales* wieder. Sie sind neben den Pseudomonaden die Gruppe mit der höchsten Diversität an verwertbaren Nährstoffen. Im Allgemeinen verfolgen Bakterien zwei Strategien um Nährstoffe nutzbar zu machen. Einmal die Verwertung vieler verschiedener Substrate (unspezifische Enzyme, gleichzeitige Expression mehrerer Stoffwechselwege), sowie die Spezialisierung auf „rare compounds“, also Verbindungen, die von den meisten Mikroorganismen nicht nutzbar gemacht werden können.

Nicotinat (Pyridin-3-Carboxylat (Niacin, Vitamin B<sub>3</sub>)) ist ein Pyridin-Derivat, das in der Natur meist als Bestandteil des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphats (NAD(P)) vorkommt. Es ist somit ein zentraler Bestandteil des Zellstoffwechsels aller Organismen. Viele höhere Organismen sind auf eine ergänzende Aufnahme des Provitamins B<sub>3</sub> durch die Nahrung angewiesen.

Der heteroaromatische Ring des Nicotinats kann unter aeroben Bedingungen problemlos durch Oxygenasen unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff gespalten werden. Akkumulation in der Umwelt tritt daher für gewöhnlich nicht auf. Das gleiche gilt für Derivate des Nicotinats wie Pflanzenalkaloide oder Picolinsäure (Bacillus-Sporen). Auch künstliche Derivate wie das Herbizid Paraquat akkumulieren nicht.

Der Abbau von Nicotinat erfolgt in Eukaryoten nur in Form reiner Stoffumwandlung, es findet keine Mineralisierung statt. Mikroorganismen hingegen besitzen die Fähigkeit, Nicotinat auch zur Energie und Nährstoffgewinnung zu nutzen. Dies kann sowohl unter aeroben wie anaeroben Bedingungen erfolgen. Nicotinat-abbauende Bakterien sind über alle Ordnungen verteilt. Die Mineralisierung von Nicotinat beginnt immer mit einer

Hydroxylierung des Nicotinats (meist in Position C6) durch eine Molybdän-abhängige Nicotinat-Dehydrogenase (NDH).

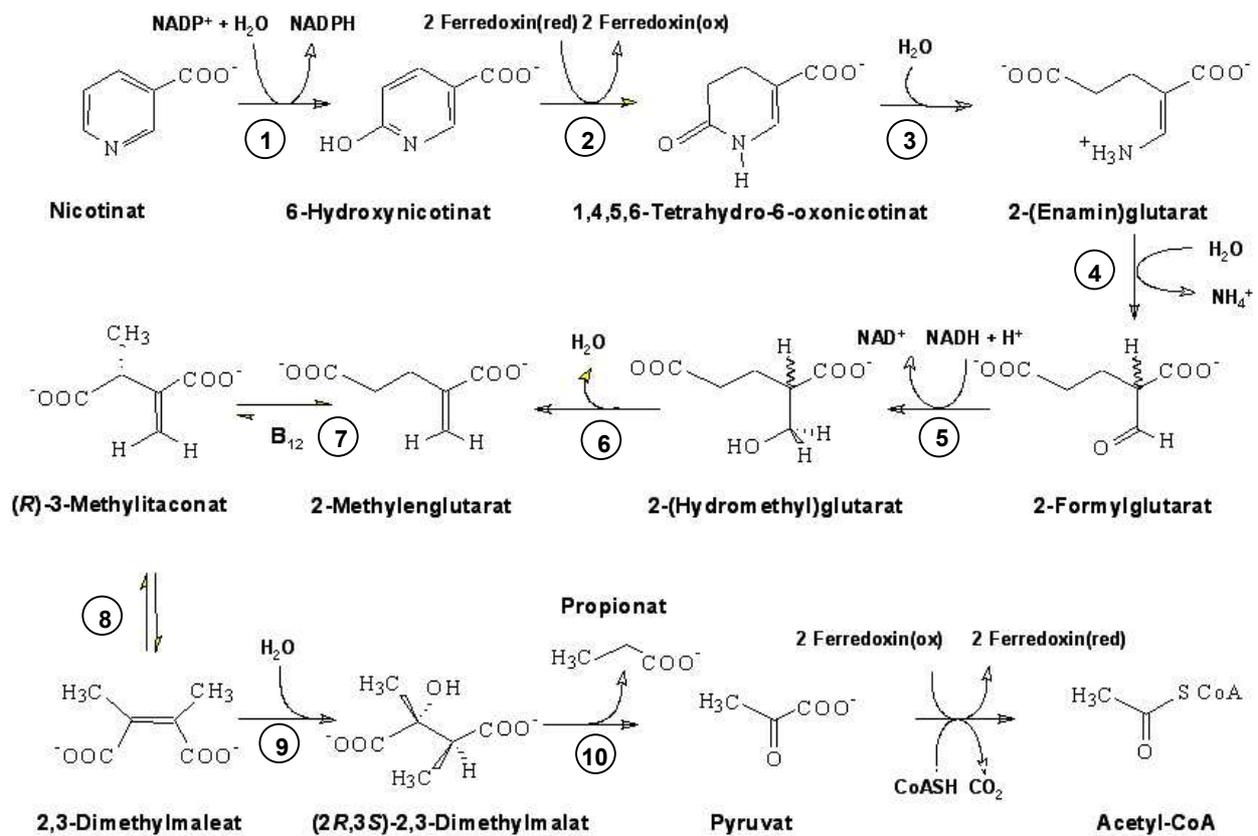
6-Hydroxynicotinat findet in der Lebensmittelindustrie als Vitaminzusatz und bei der Herstellung von Pestiziden durch *Achromobacter xylosoxidans*, *Serratia marcescens* oder *Pseudomonas fluorescens* Verwendung. Auch die industrielle Produktion von 6-Hydroxynicotinat erfolgt meist durch patentierte *P. fluorescens*- oder Bacillus-Stämme.

Der weitere Abbau des 6-Hydroxynicotinats ist an die Verfügbarkeit von Sauerstoff gekoppelt. In Pseudomonaden wird 6-Hydroxynicotinat oxidativ decarboxyliert (Jones und Hughes, 1972), in *Bacillus niacini* folgt eine weitere Hydroxylierung in Position C2 (Ensign and Rittenberg 1964). Unter mikroaerophilen oder fermentativen Bedingungen kommt es zu einer Ferredoxin-abhängigen Reduktion (Alhapel, Darley et al., 2006).

In *E. barkeri* liegen alle am Abbau von Nicotinat zu Pyruvat beteiligten Enzyme auf einem Operon. Das Operon kodiert daneben noch weitere Enzyme, die direkt oder indirekt an diesem Stoffwechselweg beteiligt sind, sowie mehrere offene Leseraster, deren Genprodukte noch nicht weiter charakterisiert werden konnten. Der Regulator NicR, der zur LysR-Familie gehört, befindet sich unmittelbar „*upstream*“ des Operons.

Die Regulation der Nicotinat-Fermentation ist noch weitestgehend ungeklärt, bekannt ist, dass die Anwesenheit von Nicotinat zur Expression führt. 6-Hydroxynicotinat akkumuliert zu Beginn der Kultivierung im Medium, die genauen Gründe sind ebenfalls nicht bekannt. Allerdings wurde angenommen, dass der Stoffwechselweg möglicherweise durch das erste Zwischenprodukt, 6-Hydroxynicotinat, und nicht direkt durch Nicotinat induziert wird. Viele Stoffwechselwege, die durch Regulatoren der LysR-Familie reguliert werden, folgen diesem Prinzip.

Die Fermentation von Nicotinat ist komplex und erfolgt in zehn enzymatischen Schritten. Ein Mol Nicotinat wird in jeweils ein Mol Acetat, Propionat, CO<sub>2</sub> und NH<sub>4</sub><sup>+</sup> abgebaut. Gewonnen werden dabei bis zu einem Mol ATP. Die Redoxbilanz bleibt ausgeglichen, die Oxidationen finden in Schritt 1 und bei der Synthese von Acetyl-CoA aus Pyruvat (Schritt 11) statt, die Reduktionen in Schritt 2 und 5 (Abb. 1.5). Das im letzten Schritt entstehende Pyruvat kann zur Gewinnung von ATP in die allgemeine Sequenz der Substratstufenphosphorylierung der Zelle eingefügt werden.



**Abbildung 1.5:** Nicotinat-Fermentation in *E. barkeri*. Nicotinat wird in zehn enzymatischen Schritten zu Acetat, Propionat, CO<sub>2</sub> und NH<sub>4</sub> gespalten. Aus dem Pyruvat können durch Substrat-Stufen-Phosphorylierung ein Mol ATP synthetisiert werden. 1) Nicotinat-Dehydrogenase (*ndhFSLM*); 2) 6-Hydroxynicotinat-Reduktase (*hnr*); 3) und 4) Enamidase (*ena*); 5) 2-(Hydroxymethyl)glutarat-Dehydrogenase (*hgd*); 6) 2-Hydroxymethylglutarat-Dehydratase (*hmd*); 7) Methylenglutarat-Mutase (*mgm*); 8) 3-Methylitaconat-delta-Isomerase (*mii*); 9) 2,3-Dimethylmalat-Dehydratase (*dmdAB*); 10) (2R,3S)-2,3-Dimethylmalat-Lyase (*dml*)

Ungewöhnliche Enzyme dieses Stoffwechselweges sind, neben der Nicotinat-Dehydrogenase, die Enamidase und die Methylenglutarat-Mutase.

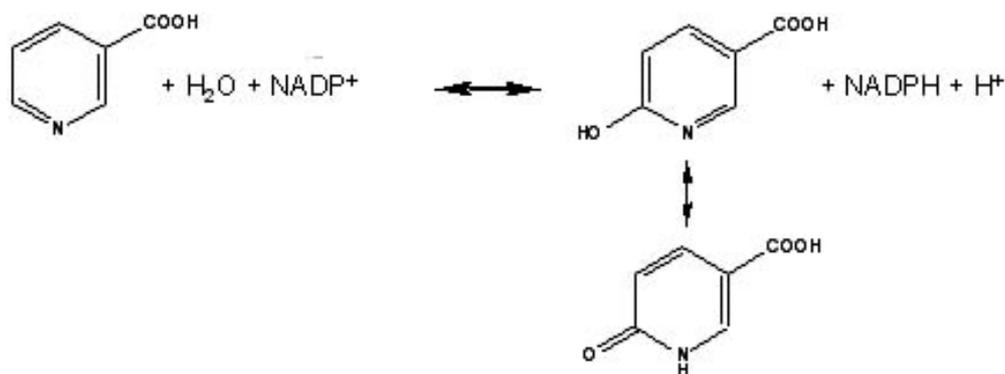
Die Enamidase ist ein Enzym mit binuklearen Ni-Fe Zentrum, das zur Familie der „ $\alpha/\beta$ -barrel“ Amidohydrolasen gehört. Katalysiert wird die Umwandlung von 2-(Enamin)glutarat zu 2-Formylglutarat. Charakteristisch für diese Familie ist die Hydrolyse von Amidbindungen (z.B. Dihydroorotase (Porter, Li et al., 2004)) oder die Eliminierung von Ammonium über ein chirales Carbinolamin-Intermediat (z.B. Cytosin-Deaminase (Ko, Lin et al., 2003)). Die Enamidase vereint beide dieser Eigenschaften indem sie durch eine Amid-Hydrolyse THON

in 2-(Enamin)glutarat und dieses durch eine Ammonium-Eliminierung in 2-Formylglutarat umwandelt.

Die Methylenglutarat-Mutase (Mgm) ist ein B<sub>12</sub>-abhängiges Radikalenzym, das die Restrukturierung des Kohlenstoffskeletts von 2-Methylenglutarat unter Bildung von Methylitaconat katalysiert (Stadtman, Stadtman et al., 1972). Mgm gehört zu den intramolekularen Transferasen (Mutasen), andere Vertreter sind Methylaspartat-Mutase oder Methylmalonyl-CoA-Mutase.

### 1.5 Nicotinat-Dehydrogenase

Wie bereits erwähnt wird der Nicotinat-Abbau durch die Nicotinat-Dehydrogenase (NDH) eingeleitet. NDH wird auch oft auch als Nicotinat-Hydroxylase (NAH, Nicotinic acid hydroxylase) bezeichnet. Sie gehört zur XOR-Familie und ist ein Dimer aus Heterotetrameren mit einer Molekularmasse von 320 kDa. Die tetramere Organisation ist ungewöhnlich, da es sich bei den meisten anderen bakteriellen XORs um Homodimere (A<sub>2</sub>) oder Dimere aus Heterodimeren (A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) und Heterotrimeren (A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>) handelt. NDH besteht aus einer Molybdän-Bindedomäne, die sich aus zwei Untereinheiten (Genprodukte von *nahLM*) zusammensetzt, einer FAD bindenden Untereinheit (*nahF*) und einer Eisen-Schwefel Zentren bindenden Untereinheit (*nahS*).



**Abbildung 1.6: Hydroxylierung von Nicotinat durch *ebNDH*.** Nicotinat wird an Position 6 hydroxyliert. Das Produkt tautomerisiert zum Pyridon, bei dem der aromatische Ring deutlich destabilisiert ist.

Wie andere Vertreter der XOR-Familie katalysiert die NDH die oxidative Hydroxylierung ihres Substrates Nicotinat zu 6-Hydroxynicotinat in Abhängigkeit von NADP<sup>+</sup> (Abb. 1.6). Es wird ein Mol NADPH erzeugt, das im fünften Schritt der Fermentation (Abb. 1.5) zur Reduktion eines Zwischenproduktes verbraucht wird.

Eigentlicher Grund der Hydroxylierung ist die Destabilisierung des aromatischen Ringes. Bei der analogen Umwandlung von Nicotinat zu 6-Hydroxynicotinat ist dies auf den ersten Blick weniger einsichtig. Das N-Heteroatom befindet sich immer noch in einer  $sp^2$ -hybridisierten Konfiguration, der aromatische Charakter des Systems ist daher kaum geschwächt. Das 6-Hydroxynicotinat liegt jedoch in thermodynamischem Gleichgewicht mit seinem Pyridon Tautomer. Bei letzterem ist der Stickstoff in der bevorzugten  $sp^3$ -hybridisierten Konfiguration, die einen größeren Grad an Elektronen-Delokalisierung erlaubt and dadurch zu einer Verringerung der aromatischen Stabilität führt. Die Pyridon-Form selber wird durch Resonanz-Energie der  $-N-C(=O)$ -Gruppe stabilisiert. Die nachfolgende Reaktion der 6-Hydroxynicotinat-Reduktase (*hnr*) erreicht durch Reduktion eine weitere Destabilisierung des Ringes.

Die NDH wurde das erste Mal 1969 gereinigt (Holcenberg und Stadtman, 1969). Charakterisierungen folgten von Dilworth und Stadtman (Dilworth, 1982); (Gladyshev, Khangulov et al., 1994; Gladyshev, Khangulov et al., 1996). Weiterführende Arbeiten fehlen, da diese durch die hohe katalytische Instabilität sowie die Inhomogenität der Reinigungen erschwert wurden (Gladyshev, Khangulov et al., 1996). Im Vergleich zu einigen anderen Selen-haltigen XORs scheint die NDH aus *E. barkeri* jedoch verhältnismäßig stabil zu sein (Wagner, Cammack et al., 1984). Neben der tetrameren Organisation fiel dieses Enzym noch durch drei weitere Merkmale auf, die es von den anderen Vertretern der XOR-Familie unterschied.

Die wohl auffallendste Eigenschaft war hierbei, dass der Kofaktor der NDH Selen enthielt, über seine strukturellen Eigenschaften war bisher jedoch nichts bekannt. NDH war das erste Enzym, in dem ein selenhaltiger Molybdän-Kofaktor beschrieben wurde. Nachgewiesen wurde der Selenoligand über EPR-spektroskopische Untersuchungen, bei dem im *as-isolated* Zustand ein als „*resting*“ Signal (Ruhesignal) bezeichnetes Signal auftrat, das einen ungewöhnlich hohen  $g$ -Wert von 2.025 (130 K, 7.8 mW) aufwies. Dieser Wert wurde als Hinweis auf eine Interaktion zwischen Molybdän und Selen interpretiert. Ein eindeutiger Nachweis erfolgte durch den Austausch des natürlichen Isotops gegen  $Se^{75}$  wodurch eine hyperfeine Spaltung des Ruhesignals auftrat. Ein eindeutiger Hinweis darauf, dass das Selen in direktem Kontakt zum Molybdän stehen musste. Der Selenoligand zeichnete sich durch

eine hohe zeitliche, thermische und sauerstoffabhängige Instabilität aus, die zur oben genannten katalytischen Instabilität führt. Die NDH war das erste und lange Zeit das einzige Enzym, für das ein Molybdän-Kofaktor mit einem labilen Selenoliganden nachgewiesen werden konnte.

Das Vorhandensein des Ruhesignals an sich war bereits ungewöhnlich, da XORs nach der Reinigung im oxidierten, nicht-paramagnetischen Mo(+VI)-Zustand vorliegen. Das Signal der *ebNDH* ähnelte dagegen dem sogenannten „*very rapid*“ Signal der Xanthin-Oxidoreduktasen, das für gewöhnlich als kurzlebiger Übergangszustand während der Katalyse auftritt und den Mo(+V) Zustand repräsentiert. Ein vergleichbares Verhalten konnte bisher nur bei wenigen Enzymen beschrieben werden. (CO-Oxidase aus *P.carboxydovorans* (Bray, George et al., 1983); XDH aus *Veillonella alcalescen* (Dalton, Lowe et al., 1976).

Ein dritter Unterschied zu anderen XORs bestand darin, dass die *ebNDH* nicht durch Zyanid inhibiert werden konnte. Üblicherweise führt Zyanid in XORs zu einer Abtrennung des terminalen Sulfoliganden in Form von Thiozyanid. Die entstehende sogenannte Desulfo-Form des Kofaktors resultiert in einer Inaktivierung des Enzyms. Auf Grund der Unempfindlichkeit der *ebNDH* gegenüber Zyanid, sowie der Resultate der EPR-Untersuchungen wurde gefolgert, dass die NDH ein aktives Zentrum mit einer neuartigen Architektur enthalten müsste (Self, Wolfe et al., 2003).

Auch die hohe Substratspezifität, die neben der *ebNDH* auch für die schwefelhaltigen Nicotinat-Hydroxylasen charakteristisch ist (Andreesen und Fetzner, 2002), macht dieses Enzym zu einem einzigartigen Vertreter dieser Enzymfamilie. Bisher lagen keine strukturellen Informationen über Nicotinat-Hydroxylasen bzw. Molybdän-Hydroxylasen mit einem labilen, endständigen Selen-Liganden vor.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Kristallisation und Strukturlösung der Selen-abhängigen Nicotinat-Dehydrogenase aus *E. barkeri*. Besonderes Interesse galt der Charakterisierung des aktiven Zentrums sowie des selen-haltigen Molybdän-Kofaktors, durch die sich mögliche Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus der *ebNDH* ziehen ließen.

Um aktives Enzym zu kristallisieren musste zunächst eine Reinigungsmethode entwickelt werden, unter deren Bedingungen die Stabilität des Enzym deutlich erhöht wurde. Mit Hilfe Röntgen-spektroskopischer MAD-Techniken sollte die Anwesenheit und Position Selens nachgewiesen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Chemikalien

<u>AppliChem:</u>	NADPH-Tetranatriumsalz, $\geq 96 \%$ , NADP <sup>+</sup> -Dinatriumsalz, $\geq 96 \%$ , Natriumnitrat, $\geq 96 \%$ , Nicotinsäure, $\geq 97 \%$ ,
<u>BMG:</u>	Ethanol unvergällt, Ethanol vergällt mit Petrolether, 98,90 %,
<u>Fluka:</u>	Di-Ammoniumcitrat, $\geq 96 \%$ , Ammoniumperoxodisulfat (APS), $\geq 98,0 \%$ , Ultra, D-(–)-2,3-Butandiol, $\geq 96,0 \%$ , purum, EDTA, DiNatriumsalz, $\geq 96 \%$ , Essigsäure, 100 %, p.a., Glycerin, wasserfrei, $\geq 99,5 \%$ , Ultra, Kaliumchlorid, $\geq 97 \%$ , Kaliumchlorid, $\geq 98 \%$ , Kaliumphosphat monobasisch, $\geq 99,5 \%$ , puriss. p.a., Magnesiumformiat, $\geq 96 \%$ , Mercaptoethanol MPD, Ultra Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, $\geq 99,0 \%$ , purum p.a., Polyethylenglykol 3350, Ultra, Pyronin G, Standard, für die Mikroskopie, Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V, $\geq 96 \%$ , Salzsäure, purum, $\sim 4 \text{ M}$ in Wasser, $M_r$ 36,46
<u>Riedel-de Haën:</u>	Bromphenolblau, Natriumchlorid, p.a.,
<u>Rießner Gase:</u>	Stickstoff
<u>Roth:</u>	Ethanol, $\geq 99,8 \%$ , p.a., Isopropanol, p.a., Natriumdodecylsulfat (SDS), $\geq 99 \%$ , ultra pure, Roti®-Mark Standard (Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE) Rotiphorese® Gel 30 (30 % (w/v) Acrylamid/ 0,8 % (w/v) N,N'-

Methylenbisacrylamid)  
 Rotisilon® A (flüssig),  
 Rotisilon® B (mittelviskos)  
*N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (TEMED), 99 %, p.a.,  
 Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) Pufferan,  $\geq 99,3$  %,
   
Serva: Serva Blue G (Coomassie Brilliantblau G-250)

### 2.1.2 Materialien

Amersham Biosciences: Chromatographie-Medien: Source 30Q  
 HiLoad™ 16/60 Superdex 200 prep grade  
 16 XK-Chromatographiesäulen

Amicon: Amicon 8200 Rührzelle

Biorad: CHT® CeramicHydroxyapatite

Brand: Plastibrand 1,5 ml halbmikro PS Einmal-Küvetten

Iwaki: Non-treated Microplates, 24-Well mit Deckel, 16 mm Durchmesser, steril, Polystyrol

### 2.1.3 Geräte

Amersham Biosciences: Electrophoresis Power Supply-EPS 601  
 Electrophoresis Power Supply-EPS 301  
 Äkta prime

Analytik Jena: Specord 30 Spektralphotometer  
 Specord 40 Spektralphotometer

Branson: Sonifier Cell Disruptor B15

Bruker AXS: Röntgenstrahlgenerator Nonius FR591

Eppendorf: eppendorf Centrifuge 5810R

marresearch GmbH: *image plate*-Detektor mar345dtb

Melag Medizintechnik: Autoklav Melag 23

Thermo Scientific NanoDrop™1000-Spektrometer

## 2.2 Mikrobielle Methoden

### 2.2.1 Medien

*E. barkeri* Minimalmedium:

20 g	Hefeextrakt
10 g	Nikotinsäure
0,1 mL	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O (10 mM)
1 mL	NaWO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (10 mM)
1 mL	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (10 mM)
4 g	NaHCO <sub>3</sub>
2 µg	Resazurin
1 g	Cystein
100 mL	10x Salzlösung
in 1 L H <sub>2</sub> O	

*E. barkeri* Komplexmedium:

25 g	Hefeextrakt
5 g	Pepton
0,125 g	Cystein (0,25 g in 3 mL)
0,25 g	Resazurin (100 mg/1 mL)
25 mL	10x Salzlösung
in 250 mL H <sub>2</sub> O	

*E. barkeri* 10x Salzmedium:

0,081 g	CaCl <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O
0,8 g	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O
1,82 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,42 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,8 g	NaCl
10 mL	FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O (20 mM)
5 g	L-CysteinHCl
in 1L H <sub>2</sub> O	

### 2.2.2 Kultivierung von *E. barkeri*

Kulturhaltung von *E. barkeri* erfolgte auf 50 mL Komplexmedium in 100 mL Serumflaschen, inokulierte Kulturen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Da es sich bei *E. barkeri* um ein sporenbildendes Bakterium handelt, war ein Überimpfen der Kultur nur alle drei Monate erforderlich.

Die Hauptkultur von *E. barkeri* erforderte mehrere Vorkulturen. 20 mL Komplexmedium wurden morgens mit einigen Mikroliter *E. barkeri* Stockkultur inokuliert und bei 37°C inkubiert (Vorkultur I). Am Abend desselben Tages wurden 10 mL der (exponentiell?) wachsenden Kultur zum Animpfen von 90 mL Komplexmedium verwendet. Inkubiert wurde diese Kultur für 24h bei 37°C (Vorkultur II). Am nächsten Tag erfolgte das Überimpfen auf

Nicotinat-Minimalmedium. 10 mL der Vorkultur wurden zum Animpfen von 90 mL Minimalmedium verwendet. Erneut wurde die Kultur für 24 h bei 37°C inkubiert (Vorkultur III). War das Anwachsen auf Minimalmedium erfolgreich, wurde die 100 mL Kultur am nächsten Tag vollständig zum Animpfen der eigentlichen Vorkultur von 900 mL Nicotinat-Minimalmedium verwendet. Auch diese wurde für 24 h bei 37°C inkubiert (Vorkultur IV). Zum Animpfen der 9 L Hauptkultur wurde die gesamte 1 L Vorkultur verwendet. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte über Nacht bei 27°C. Nach 12 h wurde die Kultur geerntet.

Alle Vorkulturen wurden in 50 mL Serumflaschen gehalten. Die Medien wurden vor dem Verwenden anaerobisiert. Dazu wurden die Serumflaschen bis maximal zur Hälfte mit Medium gefüllt und mit Butyl-Gummistopfen und Aluminium-Krempen verschlossen. Die Gläser wurden verschlossen autoklaviert und nach Öffnen des Autoklaven sofort mit Stickstoff bis zum Farbumschlag des Indikators von rot auf farblos begast. Die Medien waren für einige Wochen anoxisch. Inokulation der Kulturen erfolgte durch den Gummistopfen hindurch mit einer sterilen Kanüle.

### **2.2.3 Zellaufbruch mit Ultraschall**

5-10 g *E. barkeri* Zellen wurden in 50 mL Aufbruchspuffer (Puffer A) auf Eis resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Branson-Sonifier (Micro Tip; Duty Cycle 50 %, Output Control 5). Es wurden fünf Zyklen von jeweils 1,5 min Puls und 1,5 min Pause durchgeführt, um eine Überhitzung des Zellextraktes zu verhindern. Während des Aufbruchs wurde die ganze Zeit mit Stickstoff begast, um das Eindringen von Sauerstoff in den Zellextrakt zu vermeiden.

Darauf folgte eine Zentrifugation bei 18.000 rpm für 30 min bei 4°C (Sorvall RC 5B Plus-Kühlzentrifuge; SS34-Rotor).

## **2.3 Biochemische Methoden**

### **2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976) beruht darauf, dass sich bei Anlagerung des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau an ein Protein das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm verschiebt. 50 µL Probe (1:10 oder 1:50 in Aquadest verdünnt) wurde mit 950 µL Färbereagenz gemischt und 5 min

bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Absorptionsbestimmung erfolgte bei 595 nm. Die Konzentration wurde über eine BSA-Eichgerade im Konzentrationsbereich von 0 – 10 µg BSA bestimmt.

Färbereagenz: 100 mg Coomassie Brilliantblau G-250  
5 mL Ethanol  
10 mL 85 % Phosphorsäure  
in 100 mL Aqua bidest.

### **2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV-Absorption bei 280nm**

Proteine absorbieren auf Grund ihrer Tryptophan- Tyrosin- und Cystin-Reste Licht der Wellenlänge 280nm (Gill und von Hippel, 1989). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration über UV-Absorption wurde der molare Extinktionskoeffizient mit ProtParam (EXPASY) berechnet. Mit Hilfe dieses Koeffizienten ließ sich die Proteinkonzentration über die Absorption bei 280 nm an Hand des Lambert-Beerschen Gesetz berechnen.

### **2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Analyse/Bestimmung der Proteingröße, sowie zur Reinheitsüberprüfung wurden SDS-Polyacrylamid-Gele nach Laemmli verwendet. Die Gele hatten eine Polyacrylamid-Konzentration von 12%, da in diesem Konzentrationsbereich die Auftrennung von Proteinen mit einer Molekulargröße von 20 – 120 kDa am höchsten ist.

Zuerst wurden die für das Trenngel aufgeführten Komponenten gemischt und in eine vorbereitete Gießapparatur gegeben. Die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur und war nach einer Stunde beendet. Das Trenngel wurde während dieser Zeit mit einer dünnen Schicht Isopropanol überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach Entfernen des Isopropanols wurde ein 2 cm dickes Sammelgel gegossen, das zur besseren Sichtbarkeit der Probenaschen mit Pyronin-G gefärbt war.

Komponenten des Trenngels (100mL)	Volumina	Endkonzentrationen
Aqua bidest.	21 mL	
30 % (w/v) Acrylamid/ 0,8 % <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid	40 mL	12% (w/v)/0,32‰(w/v)
1 M Tris/HCl, pH 8,8	37,5 mL	375 mM
10 % (w/v) SDS	1 mL	0,1 % (w/v)
0,1 % (w/v) <i>N,N,N',N'</i> - Tetramethylethylendiamin (TEMED)	80µL	0,08 ‰ (w/v)
10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)	500µL	0,05 % (w/v)

Komponenten des Sammelgels (50mL)	Volumina	Endkonzentrationen
Aqua bidest.	36,5 mL	
30 % (w/v) Acrylamid/ 0,8% <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid	10 mL	6 %(w/v)/0,16 ‰(w/v)
1 M Tris/HCl, pH 6,8	2,5 mL	125 mM
10 % (w/v) SDS	500 µL	0,1 % (w/v)
2 mg/mL Pyronin G	500 µL	20 µg/mL
0,1 % (w/v) <i>N,N,N',N'</i> - Tetramethylethylendiamin (TEMED)	40 µL	0,08 ‰ (w/v)
10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)	500 µL	0,1 % (w/v)

Die Proteinproben (3-50 µL) wurden standardmäßig in 10 µL 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min in einem Wasserbad erhitzt.

Als Größenstandard wurden 10 µL des Roti® Marker STANDARD (Zusammensetzung: 200 kDa Myosin (Rind); 119 kDa β-Galactosidase (rekombinant aus *E. coli*); 66 kDa Serumalbumin (Rind); 43 kDa Ovalbumin (Huhn); 29 kDa Carboanhydrase; 20 kDa Trypsin Inhibitor (Soja) ; 14,5 kDa Lysozym (Huhn)) verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V im Sammelgel, sowie 150 V im Trenngel. Die Dauer des gesamten Laufs betrug annähernd 2,5 h.

4x SDS-Probenpuffer (ohne DTT):	40 % (v/v) Glycerin
	8 % (w/v) SDS
	0,4 % (w/v) Bromphenolblau
	0,2 M Tris-HCl, pH 6,8
10x Elektrophorese Laufpuffer:	144 g Glycin
	30 g Tris
	10 g SDS
	in 1 L Aqua dest.

### 2.3.4 Coomassie-Färbung und Entfärbung

Nach Beendigung des Elektrophorese-Laufs wurden die Gele in einer Coomassie-Lösung gefärbt und hierfür mindestens eine halbe Stunde auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Färbelösung entfernt, die Gele kurz mit Wasser abgewaschen und in einer Entfärbelösung erneut unter Schütteln inkubiert.

Färbelösung:	0,025 % (w/v) Coomassie Brilliantblau G-250
	10 % (v/v) Essigsäure
Entfärber:	10% (v/v) Essigsäure

### 2.3.5 Reinigung der NDH

Puffer A:	50 mM TrisHCl pH 7,8
	1 mM EDTA
	2 mM DTT
Puffer B:	50 mM TrisHCl pH 7,8
	500 mM NaCl
	1 mM EDTA
	2 mM DTT
Puffer C:	5 mM Kaliumphosphat pH 7,0
	1 mM DTT
Puffer D:	200 mM Kaliumphosphat pH 7,0
	1 mM DTT
Puffer E:	50 mM TrisHCl pH 7,8
	200 mM KCl
	1 mM EDTA
	2 mM DTT

### **Anionenaustauscher-Chromatographie**

Alle folgenden Schritte wurden, soweit nicht anders erwähnt, unter anaerober Atmosphäre (95% Stickstoff, 5% Wasserstoff) im Zelt durchgeführt. Als chromatographisches System wurde eine Äkta Prime (GE Healthcare) verwendet. Der zellfreie Extrakt wurde nach der Zentrifugation ( ~ 50 mL) auf eine Chromatographie-Säule mit Source-30Q-Material (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 27 mL aufgetragen und die Säule mit Puffer A bis zur Stabilisierung der Elutionsabsorption bei 280 nm gewaschen. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten von 0 bis 100% Puffer B in einem Elutionsvolumen von 300 mL. Die Flussrate betrug 5 mL/min, die Fraktionsgröße 3 mL. Die Fraktionen wurden mittels Oxidase-Enzymassay auf Vorhandensein der NDH überprüft. Vereinigt wurden die Fraktionen mit einer Volumenaktivität von mehr als 1,5 U/mL.

### **Hydroxyapatit-Säule**

Proteinfractionen wurden direkt ohne Umpufferung oder Konzentration auf eine Säule mit CHT<sup>®</sup>CeramicHydroxyapatite-Medium (BIO-RAD) und einem Säulenvolumen von 3 mL aufgetragen. Die Säule wurde zuerst mit Puffer A und dann mit Puffer C gewaschen. Es folgte ein Gradient von 30 mL von 0 bis 100% Puffer D. Die Flussrate betrug 2 mL/min, die Fraktionsgröße 1 mL. Die Fraktionen wurden erneut mittels Oxidase-Aktivitätsassay überprüft, die aktiven Fraktionen gesammelt und mit einer Amicon-Rührzelle auf Eis (Ausschlussgröße 30 kDa ) auf ein Volumen von 1,5 mL konzentriert.

### **Gelfiltration**

Zur abschließenden Gelfiltration wurde eine in Puffer E äquilibrierte Superdex-200<sup>®</sup>-Säule (HiLoad 16/60, prep grade; GE Healthcare) verwendet. Die Laufgeschwindigkeit betrug 0,5 mL/min, die Fraktionsgröße 0,5 mL. Nach Elution wurde die NDH auf 20 mg/mL konzentriert. Ein Großteil des gereinigten Enzyms wurde direkt verwendet, der Rest wurde bei -70°C in flüssigem Stickstoff gefroren oder bei 4°C gelagert.

Zur Lagerung wurde die NDH nicht umgepuffert, sondern im Elutionspuffer der Gelfiltration belassen. Eine hohe ionische Stärke gilt für NDHs als stabilisierend, deshalb enthielt der Lagerpuffer 200 mM KCl. In der Literatur werden zur Stabilisierung deutlich höhere Konzentrationen beschrieben, die jedoch auf Grund des Einflusses von Salz auf die Kristallisation (Synergistische Effekte) nicht verwendet werden konnten.

Ebenso soll die Zugabe von niedrigen Konzentrationen EDTA eine leicht aktivierende Wirkung haben. Dieser Effekt wurde darauf zurückgeführt, dass inhibitorische

Übergangsmetalle oder auch CO oder CN durch EDTA gebunden werden können (Holcenberg und Stadtman, 1969).

### 2.3.6 UV/Vis-Spektren

Absorptionsspektren wurden mit einem NanoDrop-1000 Photospektrometer (Thermo Scientific) aufgenommen, das die Vermessung von Proben mit einem Volumen von 2  $\mu\text{L}$  erlaubt. Der Messbereich lag zwischen 200 nm und 800 nm, die Messintervalle betragen 10 Sekunden. Die Konzentration der gemessenen Proben lag bei 2,5 mg/mL. Zur völligen Oxidation der NDH wurde Proben in Puffer E ohne Reduktionsmittel umgepuffert und für 15min außerhalb des Zelttes aerob inkubiert. Reduktion des Enzyms wurde durch die Zugabe von DT oder NADPH in 5-fachem molaren Überschuss erreicht.

Proben für substratreduziertes Enzym wurden mit 10 mM Nikotinat inkubiert und nach verschiedenen Zeitintervallen, die zwischen 10 min und 1,5 Stunden lagen, gemessen. Bereits nach wenigen Minuten konnte jedoch keine Absorptionsverstärkung in allen drei relevanten Absorptionsmaxima gemessen werden.

### 2.3.7 Oxidase-Aktivität

Die nicht-physiologische Oxidaseaktivität der NDH wurde unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Sie beruht auf einer Reduktion von Sauerstoff am Flavin und ist daher von den anderen Reaktionszentren unabhängig. Die Messung wurde durch Zugabe von Enzym gestartet. Die Oxidase-Aktivität wurde während der Reinigung verwendet um die Fraktionen mit NDH zu bestimmen. Der Nachweis erfolgte direkt über die Abnahme der NADPH Konzentration durch zeitabhängige Abnahme der Absorption bei 340 nm.

Volumen in Küvette	Substanz	Konzentration in Küvette
930 $\mu\text{L}$	100 mM KPP pH 7	93 mM
50 $\mu\text{L}$	3 mM NADPH	0,15 mM
20 $\mu\text{L}$	0,1-2 mg/mL NDH	x $\mu\text{M}$

### 2.3.8 Hydroxylase-Aktivität

Die Bestimmung der physiologisch wichtigen Hydroxylierung von Nicotinat wurde unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, um eine Rückoxidation mit Sauerstoff bzw. einer Inaktivierung der NDH zu verhindern. Gemessen wurde die Oxidation von Nicotinat am Molybdän-Zentrum einhergehend mit der Reduktion von NADP<sup>+</sup> am Flavin. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von NDH.

Volumen in Küvette	Substanz	Konzentration in Küvette
670 µL	100 mM KPP pH 7	67 mM
100 µL	1M Nicotinsäure pH 7	100 mM
100 µL	0,05 M DTT	5 mM
100 µL	10 mM NADP+	1 mM
25 µL	0,1-2 mg/mL NDH	-

## 2.4 Kristallographische Methoden

### 2.4.1 Kristallisation

Kristallisationsversuche erfolgten nach der Methode der Gasphasendiffusion. Reihenexperimente (Screening) wurden im sitzenden Tropfen und Optimierungen im hängenden Tropfen durchgeführt. Zum Screening wurden auf *sparse matrix sampling* (Jarmila & Kim, 1991) beruhende kommerzielle Screens (Index, PEG-Ion, Hampton research), sowie der „Precipitant Synergy Screen“ (Majeed, Ofek et al., 2003) verwendet.

Die Ansätze wurden in 96-Well-Platten durchgeführt, das Reservoir-Volumen betrug 90µL. 1µL Proteidlösung wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit Reservoir-Lösung gemischt und kurz gemischt.

Zur Optimierung wurden 24-Well-Platten verwendet, die durch Silicon und 16 mm breite Deckgläser verschlossen wurden. Das Reservoir-Volumen betrug standardmäßig 500 µL, die Tropfengröße lag zwischen 0,5-2 µL in einem Verhältnis von 1:1 von Protein- zu Reservoir-Lösung. Die zum Screening verwendete Proteinkonzentration lag bei 30 mg/mL, für die Optimierung wurden Konzentrationen zwischen 10-30 mg/mL eingesetzt. Alle Kristallisationsansätze wurden bei 17°C unter anaeroben Bedingungen (Formiergas: 5% H<sub>2</sub>, 95% N<sub>2</sub>) durchgeführt.

Die Messung der Kristalle erfolgte bei 100K. Um die Ausbildung von Wasserkristallen während des Frieren zu verhindern wurde Kristallisationslösung mit einer 1,5fachen Konzentration des Präzipitanz als Kryopuffer verwendet. Die Kristalle wurden in diesem Puffer gewaschen und eine Stunde inkubiert. Unmittelbar vor dem Frieren wurden die Kristalle kurz in Kryolösung, die zusätzlich 15% Butandiol enthielt, gegeben.

#### 2.4.2 Tränken von Kristallen

Auf Grund des hohen Solvenzgehalts sind Proteinkristalle von Lösungsmittelkanälen durchzogen, durch die kleinere Moleküle problemlos diffundieren können. Um einen Komplex zwischen Enzym und Substrat zu erhalten, wurden NDH-Kristalle der Reihe nach in Kristallisationslösungen getränkt, die fallende Konzentrationen an Nitrat enthielten (70 mM, 50 mM und 30 mM). Die Dauer der Inkubation betrug jeweils 1 h. Darauf folgte eine 1,5-stündige Inkubation in 10 mM Nicotinat (100 mM TrisHCl pH 7,8; % PEG3350; 30 mM Nitrat; 10 mM Nicotinat). Die Kristalle wurden in Cryolösung mit 10 mM Nicotinat gefroren.

#### 2.4.3 Datensammlung, Kupfer-Anode und ESRF

Native Datensätze wurden an einer Kupfer-Drehanode (Bruker-Nonius FR-591<sub>HF</sub>; Cu-K $\alpha$ -Strahlung der Wellenlänge 1.5418 Å; Mar345dtb Flächenzähler) gemessen, die Datensätze unter und oberhalb der K-Kante des Selens am ESRF (Beamline BM16, Grenoble). Messbereich und Oszillationswinkel wurden mit dem Programm Mosflm/STRATEGY (Ravelli, Sweet et al., 1997) berechnet. Der Drehwinkel ist von der Elementarzelle und der Mosaizität des Kristalls abhängig und darf eine bestimmte Obergrenze nicht überschreiten, da es ansonsten zur Überlagerung von im reziproken Gitter benachbarten Reflexen kommen kann. Der Messbereich wurde so gewählt, dass ein möglichst kompletter Datensatz mit bestmöglicher Redundanz aufgenommen werden konnte. Anfang und Ende sind von der Orientierung des Kristalls im Röntgenstrahl abhängig, der Umfang des gemessenen Bereichs von der Raumgruppe, da die Symmetrie der Kristallpackung in direkter Beziehung zur Symmetrie des reziproken Gitters steht.

Je höher die Symmetrie der Lauegruppe eines Kristalls ist, umso kleiner ist der Ausschnitt des reziproken Gitters, der für einen vollständigen Datensatz gemessen werden muss.

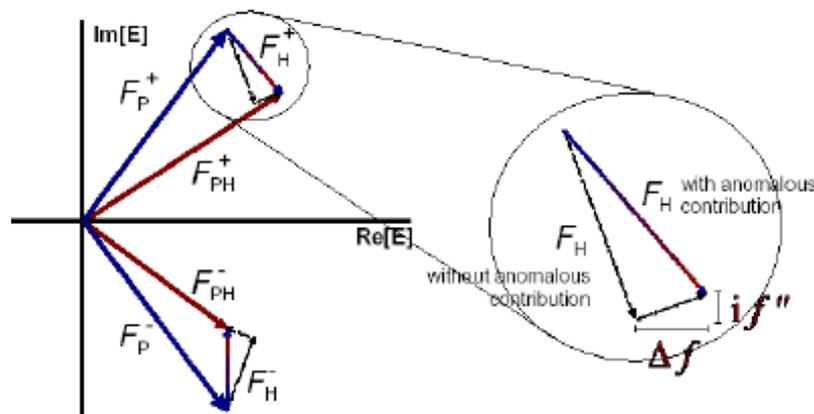
Für alle Datensätze wurde ein Bereich von 180° gemessen, mit einem Rotationswinkel von 0,2° oder 0,3° für die an der Kupfer-Anode gemessenen Datensätze und 0,5° für die Synchrotron-Datensätze.

### 2.4.4 Anomale Dispersion

Bei Schweratomen kommt es durch Röntgenstrahlen einer elementspezifischen Wellenlänge (Absorptionskante) zu einer kurzzeitigen Anregung von Elektronen in tiefer gelegenen Orbitalen. Ein Teil der Energie wird dabei absorbiert.

Der Streufaktor  $f$  eines Atoms ist im wesentlichen von der Elektronenanzahl und dem Streuwinkel relativ zum einfallenden Strahl abhängig. Allerdings kommen in geringem Ausmaß noch bestimmte Resonanz-Absorptions-Effekte hinzu. Den Hauptteil des Streufaktors liefert die Thomson-Streuung  $f_0$ . Röntgenquanten können jedoch auch (oberhalb eines bestimmten Energieniveaus) von den Elektronen eines Schweratoms absorbiert werden, was zu einer Anregung eines Elektrons aus einem niedriger gelegenen Orbital in ein höher gelegenes führt. Werden sie darauf ohne Energie oder Zeitverlust wieder re-emittiert, liefert dies den reellen Beitrag  $f' = f + \Delta f$ . Abhängig von der Wellenlänge können sie jedoch auch absorbiert und zeitlich verzögert wieder re-emittiert werden (inkohärente Strahlung). Der resultierende imaginäre Beitrag  $f''$  ist phasenverschoben. Beide zusammen ergeben die anomale Streuung. Sie stehen über die Kramers-Kronig-Gleichung in Zusammenhang.

$$f'(\omega) = \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{\omega' f''(\omega')}{\omega^2 - \omega'^2} d\omega' \quad \omega \text{ und } \omega': \text{Frequenz}$$



**Abbildung 2.0:** Argand-Diagramm des anomalen Streufaktors. Die anomale Streuung setzt sich aus einem reellen Teil  $f'$  und einem imaginären Teil  $f''$  zusammen. Der resultierende Phasenshift ist klein im Vergleich zu  $F_H^+$ , kann jedoch gegebenenfalls zur Bestimmung der Phase oder Lokalisation eines einzigen Atoms ausreichend sein.

Die Beiträge von  $f'$  und  $f''$  sind im allgemeinen klein, können aber bei einer elementsspezifischen Wellenlänge, die als Absorptionskante bezeichnet wird, deutlich verstärkt werden.

Auf Grund der Phasenverschiebung von  $f''$  weisen die Friedel-Paare unterschiedliche Intensitäten auf, d.h. Friedels Gesetz ist für anomale Streuer nicht gültig ( $hkl \neq -h-k-l$ ), d.h. die Reflexe haben noch identische Strukturfaktoramplituden und Phasenwinkel, aber ein umgekehrtes Vorzeichen. Mit Hilfe der unterschiedlichen Intensitäten (die Differenzen zwischen den beiden Friedel-Partnern werden Bijvoet-Differenzen genannt) lassen sich in einem MAD(*multiple wavelength anomalous dispersion*)-Experiment die Positionen der anomalen Streuer bestimmen und können z.B. zur Phasenbestimmung genutzt werden (Hendrickson, 1985; Drenth, 1994).

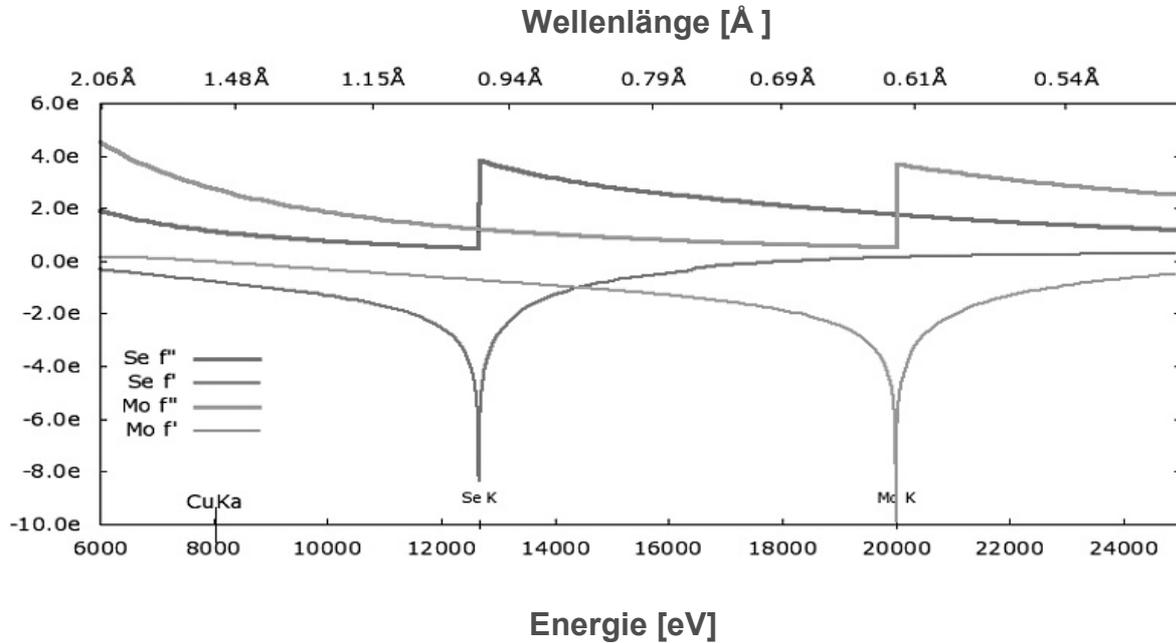
Zur Bestimmung der Positionen werden die anomalen Differenzen  $F_{ano}$  in eine Differenz-Pattersonfunktion eingesetzt. Die Pattersonfunktion  $P(u,v,w)$  stellt eine Fouriersynthese der Reflexintensitäten als Koeffizienten (Patterson, 1934) dar, die Maxima der Pattersonfunktion entsprechen den Abstandsvektoren der Atome in der Elementarzelle. Eine Kenntnis der Phasen ist nicht nötig. Eine Differenz-Pattersonfunktion lässt sich beispielsweise aus zwei Datensätzen mit und ohne anomalem Streubeitrag berechnen. In der Proteinkristallographie wird die Pattersonfunktion außer bei der Lokalisierung von anomalen Streuern noch bei der Suche nach Schweratomen oder für die MR-Methode eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde die anomale Streuung verwendet, um das Vorhandensein und die Position eines einzelnen Atoms (Selen) in der asymmetrischen Einheit zu bestimmen.

Die Absorptionskanten haben für jedes Element spezifische Werte, können jedoch in Abhängigkeit der jeweiligen Umgebung etwas variieren. Mit einem Fluoreszenz-Scan kann die genaue Position der Absorption, bzw. das Vorhandensein eines anomalen Streuers bestimmt werden. Dazu wird ein Kristall im Wellenlängenbereich einer zu erwartenden Absorptionskante gescannt, für gewöhnlich zwischen 5-20 keV.

Die Absorptionskante liegt bei einer Wellenlänge von 0.97945 Å (12657,80 eV). Üblicherweise werden für ein MAD-Experiment drei Datensätze bei Wellenlängen gemessen, die als *remote*-(entfernt von der Absorptionskante), *inflection*-(bei minimalem  $f''$ ) und als *peak*-(bei maximalem  $f''$ ) Bereich bezeichnet werden. Da das anomale Signal des Selen in dieser Arbeit nicht zur Phasenbestimmung herangezogen werden sollte, wurde nur zwei Datensätze (*inflection*-(unterhalb der Kante) und *peak*-Wellenlänge (oberhalb der Kante)) aufgenommen. Zur Berechnung des anomalen Signals für Selen wurde in dieser Arbeit nur

der Datensatz oberhalb der Kante herangezogen, ein Vorgehen, das auch für ein SAD-Experiment (single anomalous dispersion) Verwendung findet.



**Abbildung 2.1:** K-Absorptionskanten,  $f'$  und  $f''$  für die Elemente Selen und Molybdän. Die Selen-K-Kante liegt bei  $\lambda=0,9795 \text{ \AA}$  bzw.  $12,6578 \text{ keV}$ . Der anomale Beitrag bei dieser Wellenlänge entspricht für das Selen ungefähr  $4e^-$ . Der Beitrag des Molybdäns entspricht ungefähr  $1e^-$ .

## 2.4.5 Datenprozessierung und Datenreduktion

Die gemessenen Streubilder repräsentieren jeweils einen Schnitt durch die Ewald-Kugel und der sich dort befindlichen Reflexe hkl. Da die dreidimensionalen Reflexe nur in zwei Dimensionen erfasst werden können, muss das ursprüngliche Reflex-Profil rekonstruiert werden. Dieser als Integration bezeichnete Schritt wurde mit dem Programm XDS (Kabsch, 1993) durchgeführt.

Zunächst werden Reflexe identifiziert, mit denen die Orientierungsmatrix und die Raumgruppe bestimmt werden können. Es folgen die Bestimmung der Reflexprofile, Korrektur (in Bezug auf Absorption, Lorenzpolarisierung und anderer Faktoren) und Skalierung der Intensitäten, sowie Bestimmung und Verfeinerung der Elementarzellenparameter, Mosaizität, Kristallorientierung und Messgeometrie

(*postrefinement*). Das Ergebnis der Prozessierung sind die Intensitäten der integrierten Reflexe sowie deren Standardabweichungen.

Um messungsbedingte Variationen (schwankende Intensität des Röntgenstrahls, Strahlenschäden, Anisotropie des Kristalls) der Reflexintensitäten abzugleichen, müssen die (indizierten) Reflexe mit Hilfe des Programms XSCALE (Kabsch, 1993) durch Verwendung eines Skalierungsfaktors und eines auflösungsabhängigen Exponentialfaktors (intern) zueinander skaliert werden, so dass mehrfache Messungen eines Reflexes möglichst geringe Abweichungen von der gemittelten Intensität dieses Reflexes aufweisen. Nach der Skalierung werden die Intensitäten symmetrieäquivalenter Reflexe gemittelt und auf eine asymmetrische Einheit reduziert.

Die erhaltenen Intensitäten wurden mit dem Programm XDSCONV (Kabsch, 1993) in Strukturfaktoramplituden umgerechnet.

Als Maß für die Datenqualität wird oft der  $R_{sym}$  herangezogen, der ein Maß für die Übereinstimmung mehrfach gemessener, symmetrieverwandter Reflexintensitäten  $I(hkl)$  darstellt. Der  $R_{sym}$  ist allerdings stark von der Multiplizität abhängig und sollte daher durch die Einführung eines im Bezug auf die Redundanz gewichteten  $R_{meas}$  korrigiert werden. Weitere Qualitätskriterien sind die Vollständigkeit des Datensatzes, die mittlere Multiplizität, die möglichst groß sein sollte, um eine möglichst hohe Redundanz zu gewährleisten, sowie das Signal/Rausch-Verhältnis  $I/\sigma(I)$ , der Quotienten aus der mittleren Reflexintensität  $I$  und der zugehörigen Standardabweichung  $\sigma(I)$ .

#### **2.4.6 Pattersonsuche oder Molekularer Ersatz (*Molecular Replacement (MR)*)**

Da in Proteinkristallen die Atomanzahl in der Elementarzelle zu groß ist, ist eine Strukturlösung über eine direkte Patterson-Karte in den meisten Fällen nicht möglich. Eine alternative Methode zur experimentellen Phasenbestimmung ist der sogenannte Molekulare Ersatz. Hierbei kann unter geeigneten Umständen die Struktur eines strukturverwandten Proteins zur Bestimmung der Start-Phasen herangezogen werden. Diese wird als sogenanntes Suchmodell verwendet (Lattman, 1985; Rossmann, 1990). Das Modell sollte möglichst vollständig sein und die Sequenzidentität der beiden Protein-Moleküle mindestens 30% betragen. Bei dieser Methode zur Phasenbestimmung wird versucht, die Modell-Struktur in die korrekte Orientierung und Position in der Einheitszelle der unbekannt Struktur zu positionieren. Hierzu wird durch aufeinander folgende Rotations- und Translation-Funktionen nach Korrelationen ( $R$ -Wert) zwischen beobachteten und berechneten Patterson-Funktionen gesucht. Wird diese gefunden, können das Modell positioniert und die Phasenwinkel

berechnet werden. Über die Kombination mit den beobachteten Strukturfaktoramplituden wird dann die erste Elektronendichte-Karte berechnet.

Der Auflösungsbereich der Daten für die Rotationsuche muss experimentell für die zu lösende Struktur gewählt werden und liegt in der Regel im Bereich zwischen 3 und 10 Å. Reflexe niedrigerer Auflösung sind häufig nicht sehr gut bestimmt und können außerdem zu stark von Lösungsmittelbereichen in der Kristallpackung beeinflusst werden. Daten höherer Auflösung sind zu sensitiv für das Modell, da in ihnen schon zu viele Detailinformationen über die Struktur enthalten sind, die selbst bei sehr ähnlichen Proteinen starke Abweichungen voneinander zeigen können.

Die Rotationsfunktion findet als sogenannte Selbstrotationsfunktion auch bei der Suche nach nicht-kristallographischer Symmetrie Anwendung (NCS). Hierbei wird die Pattersonfunktion um einen bestimmten Winkel um die  $k$ -Achse rotiert und auf sich selbst abgebildet. Die Lage der  $k$ -Achse, wird dabei systematisch in  $f$  und  $w$  verlagert, für jede relative Orientierung wird die Rotationsfunktion  $R(fwk)$  berechnet.

Molekularer Ersatz wurde mit Hilfe des Programm PHASER (McCoy, Grosse-Kunstleve et al. 2007) durchgeführt. Als Suchmodell diente ein von der die Struktur der 4-Hydroxybenzoyl-CoA Reduktase (4-HBCR) aus *Thauera aromatica* (PDB accession code: 1RM6) abgeleitetes Modell.

Die 4-HBCR zeigte im BLAST (Altschul, Madden et al., 1997) gegen die Strukturdatenbank eine allgemeine Sequenzidentität von 23 %. Das „*Alignment*“ der beiden Sequenzen wurde mit dem Programm ClustalW (Aiyar 2000) erstellt. Alle nicht konservierten Aminosäuren wurden in der Sequenz der 4-HBCR gegen Alanin ausgetauscht. Das resultierende Suchmodell bestand dementsprechend zu 2/3 aus Alaninresten.

### 2.4.7 Strukturverfeinerung und Modellbau

Sobald die richtige Orientierung und Position des Suchmodells in der Einheitszelle gefunden sind, muss das resultierende initiale Modell weiter den experimentellen Daten angepasst werden, ein Vorgang der als Verfeinerung bezeichnet wird. Die Übereinstimmung der berechneten Strukturfaktoramplituden ( $F_{\text{calc}}$ ) und gemessenen Strukturfaktoramplituden ( $F_{\text{obs}}$ ) kann zu diesem Zeitpunkt noch bei 50% liegen.

Während der Verfeinerung werden durch abwechselnde Korrelations-Berechnungen und manueller Koordinaten-Manipulation, die Koordinaten und B-Faktoren (Temperaturfaktor, [ $\text{\AA}^2$ ]) des Modells langsam den experimentellen Daten angepasst, so dass eine möglichst hohe

Übereinstimmung der berechneten mit den gemessenen Strukturfaktoramplituden erzielt wird. Dazu existieren eine Reihe von Algorithmen, wie z.B. „least-square“ oder „maximum likelihood“ Verfahren, mit deren Hilfe die Korrelation zwischen Modell und experimentellen Daten vergrößert werden.

Alle Verfeinerungen wurden mit dem Programm-Paket CNS durchgeführt. Während der Verfeinerung muss darauf geachtet werden, dass die Anzahl der verfeinerten Parameter die Anzahl der gemessenen Parameter (Reflexe; abhängig vom Kristallaufbau, der Auflösungsgrenze und der Vollständigkeit der gemessenen Daten) nicht überschreitet. Der erste Schritt ist häufig eine sogenannte *rigid body* Verfeinerung, bei der Atomgruppen (zum Beispiel das ganze Molekül, einzelne Domänen oder Sekundärstrukturelemente) als starre Körper definiert und verfeinert werden. Dabei werden zunächst nur eine geringe Anzahl an freien Parametern eingeführt, die dann im Verlauf der Verfeinerung langsam erhöht werden sollte (Kleywegt und Jones, 1995). Es folgen *simulated annealing* und die Verfeinerung der einzelnen Atompositionen (Unterprogramm *minimize*). Schließlich erfolgt die Verfeinerung der B-Faktoren in Gruppen (*bgroup*) oder individuell (*bindividual*). Ein mittlerer B-Faktor von  $30 \text{ \AA}^2$  entspricht einem mittleren Verschiebungsquadrat von  $0.62 \text{ \AA}$ .

### **Verfeinerung von Temperaturfaktoren**

Auf Grund thermischer Bewegungen und statistischer Fehlorderungen der Atome im Kristall kommt es zu einer auflösungsabhängigen Änderung der Reflexintensitäten. Diese wird durch Temperaturfaktoren nach der Methode des kleinsten quadratischen Fehlers modelliert. Die Anzahl der verfeinerten Parameter richtet sich wieder nach der Anzahl der gemessenen Parameter und dadurch auch nach der Auflösungsgrenze der Daten. Bei Auflösungen oberhalb  $3 \text{ \AA}$  wird nur ein mittlerer B-Faktor für das gesamte Protein bestimmt, bei Auflösungen zwischen  $3 \text{ \AA}$  und  $2.5 \text{ \AA}$  werden dagegen meist zwei B-Faktoren pro Aminosäure verfeinert (jeweils ein B-Faktor für alle Atome der Hauptkette und der Seitenkette). Individuelle isotrope B-Faktoren lassen sich erst unterhalb einer Auflösung von etwa  $2.5 \text{ \AA}$  sinnvoll verfeinern. Dabei wird einschränkend angenommen, dass sich die B-Faktoren benachbarter Atome nicht beliebig stark voneinander unterscheiden. Bei einer Auflösung kleiner als  $1.5 \text{ \AA}$  können anisotrope thermische Bewegungen einzelner Atome verfeinert werden.

### **Molekulardynamik-Simulation (simulated annealing)**

Einen wesentlich höheren Konvergenzradius als die *least squares* Methoden besitzt die Molekulardynamik-Simulation. Hierbei werden den Modellatomen zunächst Anfangsgeschwindigkeiten zugeordnet, die einer Maxwell-Verteilung bei Temperaturen von 2000 bis 3000 K entsprechen. Die Temperatur des Systems wird anschließend in Schritten von 25 K erniedrigt. Auf Grund des hohen Konvergenzradius können Atome lokale Minima auch ohne manuelle Korrekturen verlassen.

Prinzipiell zeigen Verfeinerungsmethoden, die auf einem *maximum likelihood* Algorithmus basieren, einen größeren Konvergenzradius als *least squares* Methoden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die  $\sigma_A$ -Werte nur aus Reflexen des Testdatensatzes abgeschätzt werden, wodurch sich der *model bias* in  $(2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}})$ -Elektronendichtekarten verringert.

Bei der Lösung von Proteinstrukturen besteht das Problem, dass die Anzahl der beobachteten Parameter (Reflexe) deutlich geringer ist als die der zu optimierenden Parameter (Koordinaten, Temperaturfaktoren).

Um die Anzahl der zu verfeinernden Parameter einzuschränken werden beispielsweise Vorzugsorientierungen von Seitenketten (Bindungsabstände, Bindungswinkel, Chiralität oder Torsionswinkel) in die Verfeinerung mit einbezogen (Engh und Huber, 1991). Diese Einschränkungen (*restraints*) wirken dabei während der Verfeinerung wie zusätzliche, beobachtete Parameter.

Zur weiteren Reduktion der Parameter kann auch, wenn vorhanden, die Nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) herangezogen werden. NCS oder lokale Symmetrie bedeutet, dass innerhalb der asymmetrischen Einheit eine Form von Symmetrie auftritt, die nicht mit einer kristallographischen Symmetrie übereinstimmt. Zu Beginn der Verfeinerung wurden NCS mit hoher Gewichtung verwendet, die im Verlauf der Verfeinerung gelockert und später vollständig weggelassen wurden. Dies ist sinnvoll, da in den hochauflösenden Bereichen auch bei einem Homodimer kleine Unterschiede existieren, z.B. die Konformation einzelner Seitenketten.

Als Maß für die Qualität einer Proteinstruktur wird meist der kristallographische *R*-Faktor *R<sub>cryst</sub>* verwendet. Er gibt Auskunft über die Korrelation zwischen den gemessenen Strukturfaktoramplituden und den berechneten Strukturfaktoramplituden ( $F_{\text{calc}}$ ). Der *R*-Faktor alleine ist wenig aussagekräftig, da experimentelles Hintergrundrauschen durch fehlerhafte Modellparameter interpretiert werden kann, was zu einer nicht realistischen Senkung des *R*-Faktors führen kann (Überinterpretation; „overfitting“). Dies ist besonders bei

der Methode des Molekularen Ersatzes der Fall. Deshalb wird der sogenannte freie R-Faktor  $R_{free}$  (Brünger, 1992) über 5% zufällig gewählter Reflexe (Testdatensatz) berechnet. Wichtig ist, dass das Modell während der gesamten Verfeinerung gegen die übrigen 95 % der Reflexe berechnet wird. Der  $R_{free}$  für die Strukturaktoren des Modells wird gegen die speziell markierten 5 % Reflexe berechnet. Sinkt der R-Wert während einer Verfeinerung ab, der  $R_{free}$  sich jedoch nicht verändert oder ansteigt, liegt eine Überinterpretation der Elektronendichte vor.

Die Größe des  $R_{free}$  korreliert außerdem mit dem mittleren Fehler der Modellphasen und kann daher als Kriterium für den Fortschritt der Verfeinerung herangezogen werden (Kleywegt und Brünger, 1996). Die Differenz von R und  $R_{free}$  sollte 3-6% nicht überschreiten.

### **( $F_{obs}-F_{calc}$ )-Elektronendichtekarte**

Diese Karten zeigen die Differenz zwischen der Elektronendichte des Modells und der tatsächlichen Elektronendichte. Fehlende Bereiche des Modells werden als positive Differenzdichte dargestellt, falsch positionierte Bereiche mit negativer Differenzdichte. Die Differenzen sind ab einem Differenzdichteniveau von etwa drei Standardabweichungen der durchschnittlichen Elektronendichte ( $3 \sigma$ ) signifikant. Über diese Dichtekarten wurden fehlende Bereiche des Modells sowie Wasser und Ligandenmoleküle eingebaut.

### **( $2F_{obs}-F_{calc}$ )-Elektronendichtekarte**

Sie wird üblicherweise oberhalb eines Differenzdichteniveaus von etwa  $1 \sigma$  dargestellt und zeigt neben der Elektronendichte des Modells die Differenzdichte in voller Höhe. Diese Dichtekarten sind stark vom Modell beeinflusst (sogenannter *model-bias*) und eignen sich deshalb zur Modellierung nur in eingeschränkter Weise. Sie erleichtern allerdings die Interpretation der ( $F_{obs}-F_{calc}$ )-Karte, da sie das gesamte Modell und damit einen durchgehenden Elektronendichte-Strang zeigen.

Die Karten wurden mit dem Programm COOT (Emsley und Cowtan, 2004) dargestellt. Der Modellbau erfolgte ebenfalls mit diesem Programm.

### **Einbau von Wassermolekülen**

In alle nicht modellierten Elektronendichten über  $0.7 \sigma$  in der ( $2F_{obs}-F_{calc}$ )-Karte wurden Wassermoleküle eingebaut. Dabei mussten realistische Wassermoleküle einen Abstand von mindestens  $2.2 \text{ \AA}$  zu anderen Atomen aufweisen, sowie sich innerhalb eines  $2.2$  bis  $3.5 \text{ \AA}$  Radius zu einem Wasserstoffdonor- oder Akzeptor befinden.

### 2.4.8 Strukturevaluierung und Darstellung der Struktur

Die geometrische Qualität des Modells wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski, 1993) ermittelt.

Die Torsionswinkel  $\psi$  und  $\phi$  der Polypeptid-Hauptkette eines Proteins sind aufgrund sterischer Hinderungen zwischen Haupt- und Seitenkettenatomen für alle Aminosäuren (weniger für Glycin) starken Einschränkungen unterworfen. Ihre Verteilung wird im so genannten Ramachandran-Diagramm dargestellt (Ramachandran und Sassiakharan, 1968). Die Hauptkettentorsionswinkel werden hierbei durch PROCHECK in vier Bereiche eingeteilt, „energetisch günstig“, „erlaubt“, „zusätzlich erlaubt“ und „verboten“ ein. In gut verfeinerten Proteinstrukturen mit einer Auflösung von 2 Å oder besser sollten sich mindestens 90% der Aminosäuren im energetisch günstigen Bereich befinden.

Die mittleren quadratischen Abweichungen (*rmsd*) eines Proteinmodells von idealen Bindungslängen und Bindungswinkel (Energien) (Engh und Huber, 1991) wird ebenfalls berechnet. Da diese stereochemischen Parameter jedoch auch in den Zielfunktionen der verwendeten Verfeinerungsprogramme enthalten sind, ist die Aussagekraft über die generelle Richtigkeit einer Struktur allerdings eingeschränkt.

Zur graphischen Darstellung der Strukturmodelle und Elektronendichten wurde das Programm PyMOL (DeLano, 2002) verwendet.

Oberflächenberechnungen und Kontakte zwischen einzelnen Untereinheiten erfolgten über die MSD PISA-Homepage ([http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)).

Um strukturell homologe Proteine in der PDB-Datenbank zu finden wurde das Programm DALI (Holm, 1993) verwendet. Dali beruht auf dem Prinzip des „Secondary Structure Matching“ (Krissinel und Henrick, 2004).

### 3 Ergebnisse

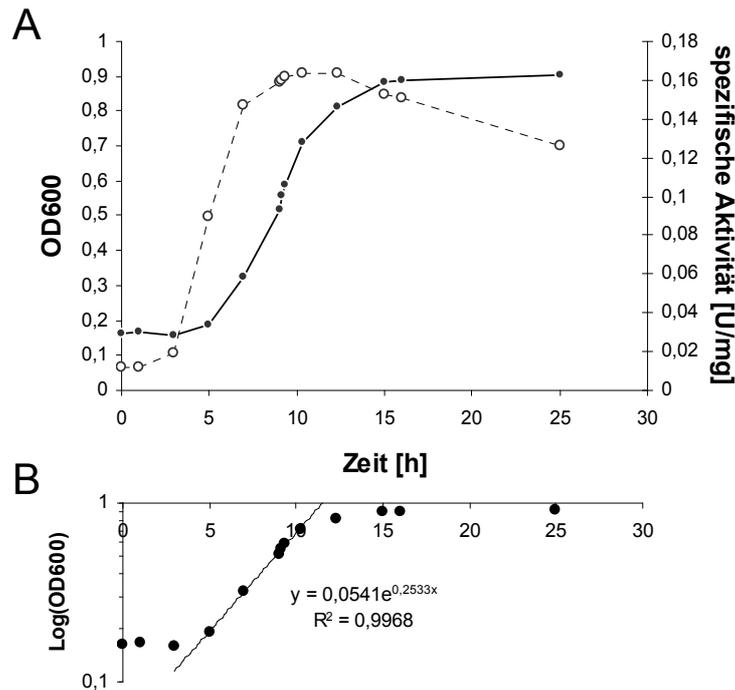
#### 3.1 Kultivierung von *E. barkeri*

Die Reinigung der NDH erfolgte aus Zellen des *E. barkeri*-Wildtyps (100-L-Fermentation, 2003, Marburg). Zusätzlich wurden noch in kleinerem Maßstab 10-L-Kulturen gezogen. Die Vorbereitung der Vorkulturen erfolgte wie unter Abs.2.2.2 beschrieben. Stöchiometrisch werden bei dieser Fermentation aus einem Molekül Nicotinat nur ein Molekül ATP gewonnen. *E. barkeri* ist darüber hinaus nicht in der Lage auf Nicotinat als alleiniger Nährstoffquelle zu wachsen, wodurch der Zusatz eines hohen Anteils LB-Mediums (50% der herkömmlichen Menge eines *E. coli* LB-Mediums) erforderlich wird. Das Wachstum auf LB-Medium ist auch ohne Zugabe von Nicotinat möglich, die Wachstumsrate und Zelldichte sind in diesem Fall jedoch geringer. Ob der Zusatz von LB-Medium eine weitere Kohlenstoff- bzw. Stickstoff-Quelle oder ein essentielles Vitamin bereitstellt, ist nicht bekannt.

Die Hauptkultur wurde mit Vorkultur IV in einem Verhältnis 1:10 angeimpft, eine bei anaeroben Kultivierungen häufig verwendete Methode. Durch die hohe Dichte wird gewährleistet, dass das Redoxpotential des frischen Mediums auf einen für das Wachstum notwendigen Wert gesenkt wird. Viele Clostridien bevorzugen ein Redoxpotential von  $E_0' = 150$  mV oder weniger.

Die  $OD_{595}$  betrug aus diesem Grund nach dem Animpfen bereits 0,14 - 0,16. In Abbildung 3.1 ist das Wachstum der Kultur gegen die Zeit dargestellt. Die exponentielle Phase ist gut am linearen Verlauf im Zeitraum zwischen fünf und zehn Stunden zu erkennen (Abb. 3.1 B). Die Wachstumsrate betrug 0,054. Auffallend ist die ungewöhnlich lange Lag-Phase von fünf Stunden. Die Kultur beendete ihr exponentielles Wachstum nach zehn Stunden und erreichte die stationäre Phase nach 15 Stunden. Die  $OD_{595}$  betrug 0,9, ein 10-L-Fermenter erbrachte damit eine Feuchtzellmasse von ungefähr 15 g. Geerntet wurden die Kulturen nach 15 Stunden.

In Abbildung 3.1 A sind neben der optischen Dichte auch die spezifischen Aktivitäten (Nicotinat-Hydroxylase Aktivität) der NDH im Zellextrakt aufgetragen. Innerhalb der ersten vier Stunden war kaum Enzymaktivität nachweisbar. Danach stieg die spezifische Aktivität noch vor Eintritt in die exponentielle Phase sprunghaft an. Maximale spezifische Aktivität war nach fünf Stunden zum Anfang der exponentiellen Phase erreicht, und blieb bis zum Ende der exponentiellen Phase stabil.



**Abbildung 3.1:** Wachstumskurve *E. barkeri*-Hauptkultur. Die Zellen wuchsen für einen Tag auf Nicotinat-Minimalmedium. A) zeigt das Wachstum der Kultur gemessen in der optischen Dichte bei 600 nm (OD600) sowie die Entwicklung der spezifischen Nicotinat-Hydroxylase-Aktivität im Zellextrakt (U/mg). B) Semilogarithmische Darstellung der Wachstumskurve

### 3.2 Reinigung

Die NDH wurde nach unterschiedlichen Strategien (Strategie 1-3) gereinigt, die sich in Reinheitsgrad und Aktivität voneinander unterschieden. Zusammenfassend wies Enzym, das nach Strategie 1 gereinigt wurde eine geringe Aktivität, dafür jedoch einen hohen Reinheitsgrad und eine relativ hohe Ausbeute auf (Tab. 3.1). Protein aus diesen Reinigungen wurde für „Screening“ und erste Optimierungen von Kristallen verwendet.

Der höchste Reinheitsgrad und die höchste spezifische Aktivität wurde mit Strategie 2 erreicht und zur weiteren Optimierung der Kristalle und der Messung von Absorptionsspektren verwendet (Tab. 3.1). Strategie 3 war eine kurze Reinigung, mit deutlich geringerem Reinheitsgrad. Auf Grund der schonenderen Reinigungsbedingungen war die NDH jedoch deutlich länger stabil (Abb. 3.3 B) als bei anderen Reinigungen und konnte für die Kristallisation von Enzym mit intaktem aktiven Zentrum verwendet werden.

**Tabelle 3.1: Reinigungstabelle der NDH Reinigung.** Alle Reinigungen wurden unter anaeroben Bedingungen im Zelt durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen wurden über Bradford ermittelt. Die Aktivitäten entsprechen der physiologischen Nicotinat-Hydroxylase Aktivität.

Strategie 1 (Dauer: 16h) Ausbeute: ~1mg

Reinigungsschritt	Volumen [mL]	Protein [mg]	Aktivität [U]	spez.Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungs- faktor
Zellfreier Extrakt	50	280	42	0,15	100	1
Source 30Q	18	7,2	25	3,5	60	23
Gelfiltration	5	1,2	17	14,3	41	95

Strategie 2 (18h) Ausbeute: ~0,8mg

Reinigungsschritt	Volumen [mL]	Protein [mg]	Aktivität [U]	spez.Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungs- faktor
Zellfreier Extrakt	50	265	37	0,14	100	1
Source 30Q	21	9	32	3,5	86	25
Hydroxyapatit	6	1,8	19	10,7	51	76
Gelfiltration	6	0,8	16	20,2	43	144

Strategie 3 (11h) Ausbeute: ~1,3mg

Reinigungsschritt	Volumen [mL]	Protein [mg]	Aktivität [U]	spez.Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungs- faktor
Zellfreier Extrakt	50	275	36	0,13	100	1
Source 30Q	21	9	29	3,2	80,6	24,6
Hydroxyapatit	6	1,8	20	11,1	55,6	85,4

Die Verwendung einer Source-30Q-Anionenaustauschersäule erwies sich als schonender Chromatographie-Schritt mit hoher Anreicherung. NDH eluierte in einem schmalen Bereich zwischen 280 mM und 320 mM NaCl und zeigte innerhalb der folgenden Stunden einen deutlich geringeren Aktivitätsverlust als es bei der Verwendung einer Phenylsepharose-Säule zu beobachten war (Werte nicht gezeigt). Auch die Werte anderer Autoren (Dilworth, 1982) zeigten einen starken Einbruch der Hydroxylase-Aktivität nach Verwendung einer hydrophoben Interaktionssäule. Die Anionenaustausch-Chromatographie über Source-30Q-Medium wurde deshalb immer als erster Reinigungsschritt verwendet.

Entscheidend bei der Verwendung der Hydroxyapatit-Säule war, dass die NDH nicht in den allgemein üblichen Phosphat-Puffer aufgenommen wurde, sondern das Auftragen im Elutionspuffer der vorhergegangenen Säule erfolgte. Nur unter diesen Bedingungen war es möglich, NDH an die Hydroxyapatit-Säule zu binden. Durch Elution mit steigender Phosphat-Konzentration kam es bereits bei 10 mM Phosphat zu einer Elution von 2/3 des Enzyms. Diese Fraktionen wiesen sowohl Oxidase als auch Hydroxylase-Aktivität auf. Anders verhielt

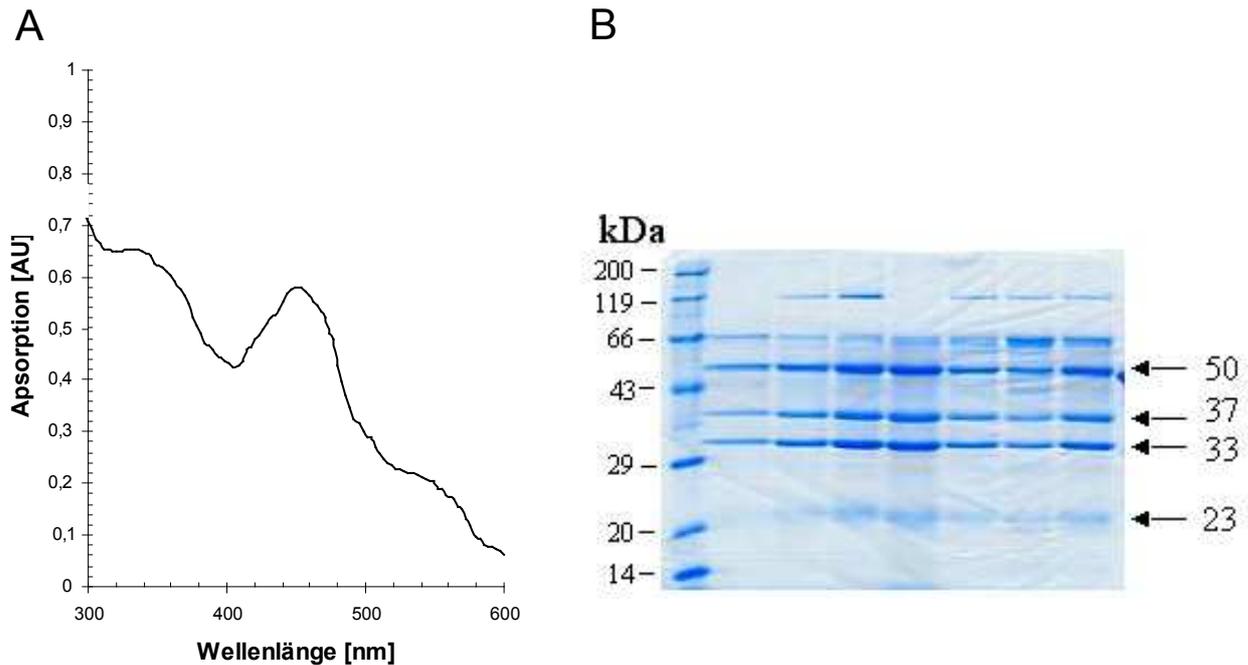
sich der restliche Teil des Enzyms, der erst bei Konzentrationen von 120 mM Phosphat eluiert werden konnte. Auch diese Fraktionen wiesen Oxidase-Aktivität auf, Überprüfung der Hydroxylase-Aktivität hingegen zeigte eine nahezu völlige Inaktivität der Molybdän abhängigen Komponente. Der relativ hohe Anstieg der spezifischen Aktivität im Vergleich zum Reinigungsfaktor (Tab. 3.1) deutet darauf hin, dass der Effekt der Hydroxyapatit-Säule eher auf eine Trennung von aktiver und inaktiver NDH beruht als einer Abtrennung von anderen Proteinen.

Für die Verwendung einer Gelfiltrationssäule (Superdex-200) erwies sich ein Puffer mit hohen KCl-Konzentrationen (Gladyshev, Khangulov et al., 1996) als geeignet. Die NDH eluierte entsprechend des berechneten Dimer-Molekulargewichts (290 kDa) bei 320 kDa.

Die Ausbeute betrug für 10 g *E. barkeri* Zellen (Nassgewicht) je nach verwendeter Strategie und Reinheitsgrad zwischen 0,8 und 1,3 mg (Tab. 3.1). Üblicherweise werden bei einer Reinigung aus einer nativen Quelle 50-100g Zellen verwendet, um verwertbare Mengen an Protein zu erhalten. Auf Grund der zeitlichen Instabilität der *eb*NDH und dem vollständigen Aktivitätsverlust durch Frieren in flüssigem Stickstoff (Gladyshev, Khangulov et al., 1996), wurde von der Reinigung größerer Mengen abgesehen.

Das SDS-Gel in Abbildung 3.2 zeigt die nach Strategie 2 gereinigte NDH. Zu erkennen ist neben den vier Untereinheiten der NDH noch eine Verunreinigung bei 66kDa. Die 120 kDa Bande ist wahrscheinlich ein Artefakt des SDS-Gels bzw. der Probenvorbereitung, da die entsprechende Bande nicht in allen Spuren zu sehen ist. Die 50 kDa-Bande entspricht dem Genprodukt NdhL, im weiteren als L-Untereinheit bezeichnet (L steht für die englische Bezeichnung large). Die 37 kDa-Bande entspricht der M-Untereinheit (NdhM; M = medium), die zusammen mit der L-Untereinheit die Molybpterin-bindende Domäne bilden. Die 33 kDa-Bande entspricht der F-Untereinheit (NdhF; F = Flavin) und die 23 kDa-Bande der S-Untereinheit (NdhS; S = small; [2Fe-2S]-Zentrum-bindende Untereinheit).

Abbildung 3.2 A zeigt das Spektrum einer gereinigten Probe. Es weist die für NDH typischen Absorptionsmaxima in den Bereichen 450 nm und 550 nm auf. Sie können dem FAD bzw. den beiden [2Fe2S]-Zentren zugeordnet werden. Das Molybdopterin ist auf Grund seiner geringen Absorptionseigenschaften nicht erkennbar und könnte nur durch ein Doppeldifferenzspektrum unter Verwendung eines geeigneten Substrates/Inhibitors nachgewiesen werden (Ryan, Ratnam et al., 1995). Die hohe Reinheitszahl (Verhältnis 280:450) von 4,6 kommt der eines vollständig gereinigten Proteins von 4,7 sehr nahe (Self, Wolfe et al., 2003). Das Verhältnis 450:550 von 2,8 deutet auf eine 1:2 Stöchiometrie von FAD zu [2Fe2S]-Zentren hin.



**Abbildung 3.2: Reinheitskontrolle der NDH.** A) UV-Vis Spektrum von 25 mg/mL NDH in 50 mM TrisHCl pH 7,8, 20 mM KCl, 1mM EDTA , 2 mM DTT. Das Probenvolumen betrug 2  $\mu$ L. Die Pfadlänge zur Aufnahme des Spektrums entsprach 0,2 mm (NanoDrop<sup>TM</sup>1000-Spektrometer, Thermo Scientific. B) SDS-Gel nach Beendigung der Reinigung 2. Aufgetragen wurden die Elutionsfraktionen der Gelfiltrationssäule. Verwendeter Größenmarker war der Roti-Standard. Die vier Untereinheiten der NDH sind entsprechend ihrer Molekulargröße markiert.

### 3.3 Aktivität

In Abbildung 3.3 B ist der zeitliche Verlauf der Enzymaktivität dargestellt. Die ersten Werte wurden unmittelbar nach Beendigung der Reinigung gemessen, und unterschieden sich, auf Grund der unterschiedlichen Reinheit der drei angewandten Strategien, deutlich voneinander. Unabhängig von der Reinigung kam es bei allen Proben zu einem starken Aktivitätsverlust innerhalb des ersten Tages. Im weiteren Verlauf waren deutliche Unterschiede zu erkennen. Bei Enzym aus Strategie 1 war nach einer Woche keine Aktivität mehr messbar. Enzym das nach Strategie 2 isoliert wurde, wies den größten Verlust an Aktivität auf. Die spezifische Aktivität fiel innerhalb eines Tages von 20 U/mg auf 3 U/mg. Eine leichte Restaktivität blieb jedoch für drei Wochen nachweisbar. Die höchste Stabilität im gleichen Zeitraum wies Probe 3 auf. Die anfängliche spezifische Aktivität dieser Reinigung war nur halb so hoch wie für Enzym aus Strategie 2, dies ist jedoch auf die starke Verunreinigung dieser Probe zurückzuführen. Ihre Aktivität fiel innerhalb des ersten Tages um nur 50% und blieb in den

ersten zehn Tagen nahezu konstant. Im weiteren Verlauf nahm die Aktivität langsam ab, betrug nach einem Monat allerdings immer noch 4,5 U/mg. Die Aktivität war nach anderthalb Monaten vollständig verloren.

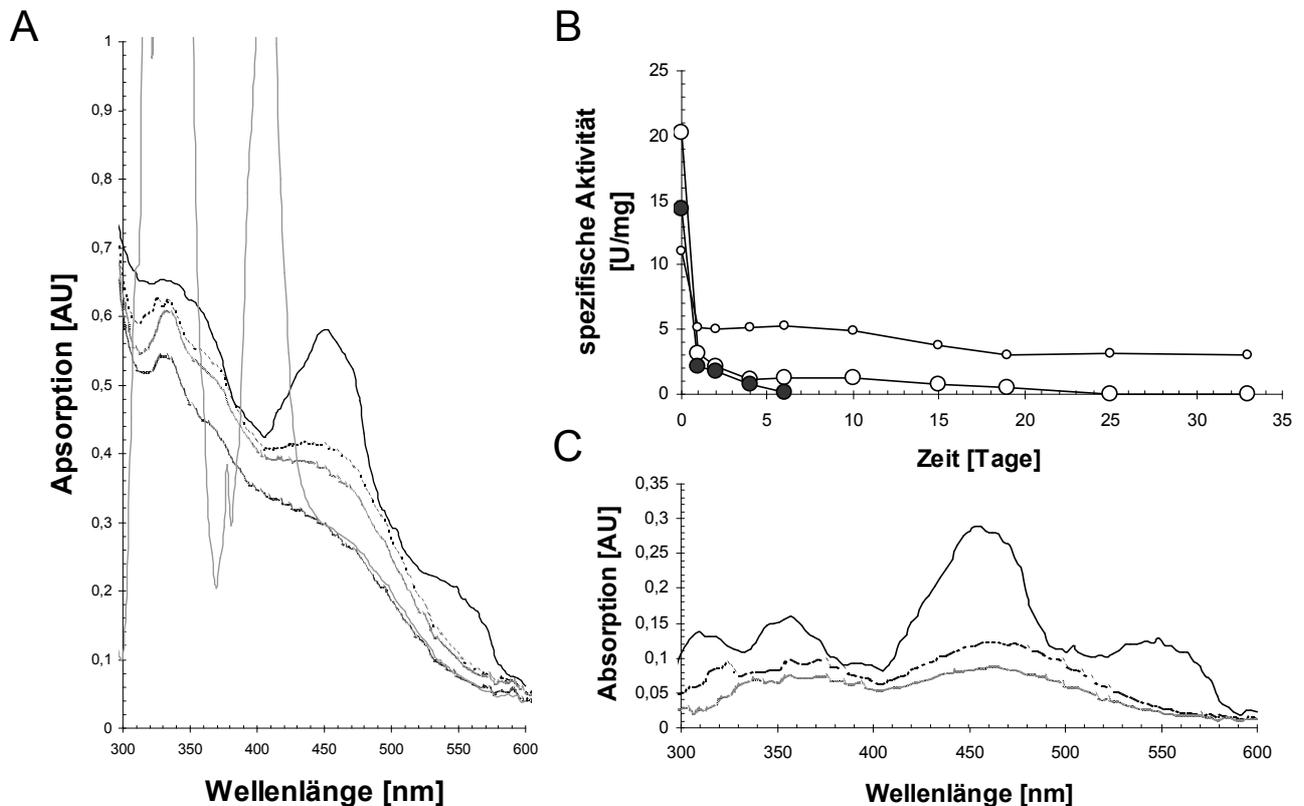
Extrapoliert ergab sich für die *eb*NDH anderer Arbeiten eine Maximalaktivität von 45U/mg (Gladyshev, Khangulov et al., 1996), die an Hand der gemessenen 20U/mg bis 35U/mg hergeleitet wurde. Unter der Annahme, dass die NDH während der Reinigung in gleichem Maße Aktivität verliert wie nach ihrer Beendigung, kann für diese Arbeit und Strategie 2 eine Maximalaktivität von 32U/mg extrapoliert werden. Diese läge jedoch immer noch deutlich unter den von Stadtman ermittelten Werten.

Um eine Abschätzung der noch aktiven Enzymfraktion zu erhalten, wurde ein Differenzspektrum erstellt. Dazu wurden Spektren von oxidiertem, *as isolated*, Nicotinat-reduziertem und DT-reduziertem Enzym gemessen. Diese Spektren, zusammen mit dem dazugehörigen Differenzspektrum, sind in Abbildung 3.3 A zu sehen. NDH besitzt vier redoxaktive Zentren, ein Flavin und ein Molybdän, die jeweils zwei Elektronen aufnehmen können, sowie zwei Eisen-Schwefel-Zentren, die jeweils ein Elektron aufnehmen können. Vollständig reduzierte NDH könnte demnach, ohne Vorhandensein eines geeigneten Elektronenakzeptors, maximal sechs Elektronen aufnehmen (was einem Zyklus von 3 Substratumsätzen entspräche). Auf Grund seines niedrigen Redoxpotentials ist DT in der Lage NDH über das Flavin vollständig zu reduzieren, das Spektrum wird in den Bereichen 450nm und 550nm nahezu deutlich gebleicht.

Außerdem konnte NDH vollständig mit NADPH reduziert werden. Dies war nötig, da die hohe Absorption des DT im Bereich vor 450 nm das Absorptionsspektrum des Enzyms vollständig überlagerte. NADPH wurde in einem Verhältnis NADPH : Enzym von 3,2 : 1 zugesetzt, um Einflüsse auf die Absorption bei 340 nm durch NADPH zu reduzieren. Trotzdem ist das Spektrum in diesem Bereich möglicherweise von reduziertem Nukleotid beeinflusst.

Da Nicotinat die NDH nur über das aktive Molybdän-Zentrum reduzieren kann, sollte das Ausmaß der Absorptionsänderung Aufschluss über die noch funktionsfähigen aktiven Zentren geben. Wie in Abbildung 3.3 A zu sehen ist, konnte durch Nicotinat keine vollständige Bleichung, weder für das *as isolated* noch für das luftoxidierte Enzym, erreicht werden. Nach 10 Minuten war die Reduktion beendet. Auch nach einer weiteren Stunde Inkubation war keine Absorptionsänderung mehr zu erkennen. Hinweise auf eine deutlich verzögerte Reaktion der NDH mit Nicotinat, wie in der Literatur beschrieben (Gladyshev, Khangulov et

al., 1996), konnten in dieser Arbeit weder beim oxidierten noch beim *as isolated* Enzym beobachtet werden.



**Abbildung 3.3: Bestimmung des Anteils an aktivem Protein.** A) UV-Vis Spektrum 25 mg/mL oxidiertes NDH in 50 mM TrisHCl pH 7,8, 20 mM KCl, 1mM EDTA, 2 mM DTT vor (----) und nach Zugabe von 10 mM Nicotinat. Nach (-·-·-) 5min, (·····) 10 min und (- - - -) NADPH Zugabe, grau 10 nM DT (Pfadlänge 0,2 mm). B) Entwicklung der spezifischen Nicotinat Nicotinat-Hydroxylase Aktivität; (—●—) Reinigungsstrategie 1, (—○—) Strategie 2, (—○—) Strategie 3. C) Differenzspektrum von A). Die Spektren wurden relativ zum NADPH Spektrum berechnet. (----) oxidiert, (-·-·-) 5 min Nicotinat reduziert, (·····) 10 min reduziert.

Über das Verhältnis der Absorption bei 450 nm von  $\text{Ox:Red}_{(\text{DT oder NADPH})}$  zu  $\text{Ox:Red}_{(\text{Nicotinat})}$  lässt sich eine Reduktion von 70,3 % errechnen. 30% des Enzyms scheinen zu diesem Zeitpunkt bereits inaktiv vorzuliegen. Die extrapolierte Maximalaktivität entspräche in diesem Fall ungefähr 29U. Die gleiche Berechnung über die Absorption der [2Fe2S]-Zentren ergibt einen ähnlichen Wert von 75% Restaktivität. Diese Werte kommen dem ermittelten Selengehalt von 80% (siehe Kap. 3.7.3) recht nahe.

XORs können oft nicht vollständig durch ihr physiologisches Substrat reduziert werden. In diesem Fall können nur vier Elektronen aufgenommen werden, da die elektronischen

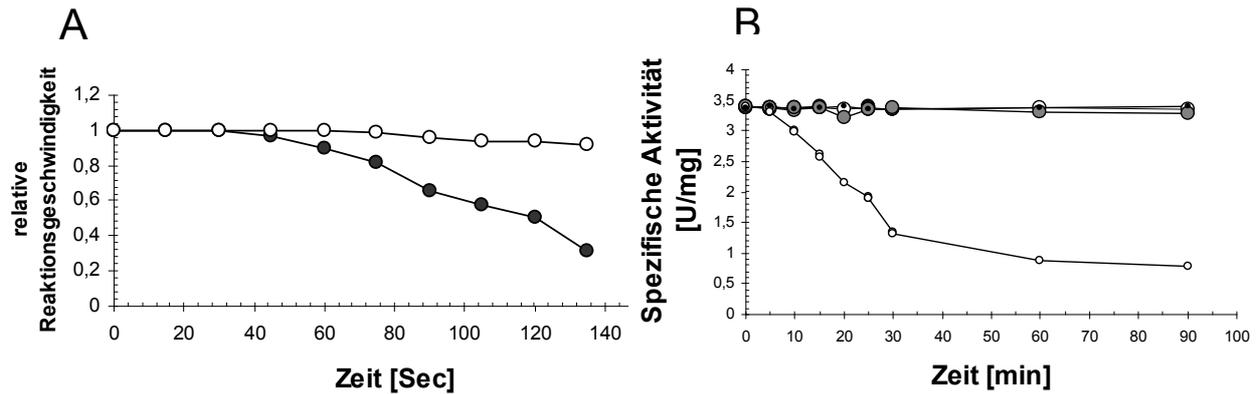
Verhältnisse der Redoxzentren die Aufnahme der letzten beiden Reduktionsäquivalente verhindern. Die vollständige Reduktion mit DT entspricht bei betreffenden Enzymen deshalb nicht dem physiologischen Zustand. In einem solchen Fall würde der Anteil an aktivem Enzym unterschätzt werden. Meist jedoch verläuft bei diesen Enzymen die Reduktion durch NADPH ebenfalls nicht vollständig. Da die NDH durch NADPH und DT gleichermaßen reduzierbar war, kann diese Möglichkeit wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

Die Differenzspektren verdeutlichen noch einmal den Vorgang der Absorptionsänderung nach Reduktion. Neben den Absorptionsmaxima des FAD und der [2Fe2S]-Zentren fallen in den Bereichen 310 nm und 350/360 nm noch zwei weitere kleine Maxima auf. Die Bedeutung dieser Maxima ist jedoch unklar. Dieser Bereich könnte durch überschüssiges NADPH oder Komponenten des Puffers beeinflusst sein. Da EDTA im Puffer enthalten war, könnten sich EDTA-Metal-Komplexe oder EDTA-Glutamat-Komplexe ausbilden. EDTA kann mit an der Oberfläche des Proteins gelegenen Glutamat-Resten oder ähnlichen Aminosäuren chelatorische, ringförmige Komplexe ausbilden, die bereits geringe Mengen an Schwermetallen mit hoher Affinität binden können. Beide Komplex-Formen absorbieren meist im Wellenlängenbereich von 300-350 nm. Das Vorhandensein von Eisen oder Molybdän aus den aktiven Zentren oder Verunreinigungen aus den verwendeten Chemikalien könnten einen Effekt dieser Größenordnung ( $\Delta A$  0,1-0,2) bewirken.

Die Absorption des Molybdäns liegt im Bereich zwischen 300-350 nm (Ryan, Ratnam et al., 1995), es ist allerdings auf Grund seines geringen Extinktionskoeffizienten durch ein einfaches Absorptionsspektrum nicht nachweisbar. Zwar wurde vermutet, dass Selen möglicherweise die Absorption des Molybdäns verstärken könnte, für einen eindeutigen Nachweis wäre jedoch ein Doppeldifferenzspektrum (Ryan, Ratnam et al., 1995) mit einem sehr langsamen Substrat nötig.

### 3.4 Inhibition

Bisher galt die NDH durch Zyanid als nicht inhibierbar, was sie innerhalb der XOR-Familie einzigartig machte (Self, Wolfe et al. 2003). Dieselben Autoren konnten ebenfalls zeigen, dass die Zugabe von Substrat zum Enzym die Sauerstoffempfindlichkeit deutlich erhöhte, die schnell zu einem völligen Aktivitätsverlust führte. Enzym ohne Substrat hingegen erwies sich als relativ sauerstoffstabil. Entsprechend dieser Ergebnisse könnte während der Katalyse ein Zustand eintreten, der deutlich labiler ist als der eines katalytisch nicht-aktiven Enzyms. Aus diesem Grund wurde versucht die NDH, durch Zyanid-Zugabe während der Katalyse, zu inhibieren.



**Abbildung 3.4: Inhibition der NDH durch Zyanid.** A) 1 mM Zyanid wurden direkt in den laufenden Enzym-Assay gegeben ( —●— ); Kontrolle ohne Zyanid ( —○— ). Die relative Reaktionsgeschwindigkeit wurde auf die maximale Geschwindigkeit ( - 0,7 / min ) dieser Probe bezogen. Die Messung wurde einen Tag nach Ende der Reinigung durchgeführt. B) Inhibition des gereinigten und oxidierten Enzyms durch 1mM Zyanid. NDH wurde vor der Aktivitätsmessung 1min mit Zyanid inkubiert. Oxidiert mit Zyanid ( —○— ), oxidiert ohne Zyanid ( —●— ), reduziert mit Zyanid (—●—), reduziert mit Zyanid ( —●— ). Die Assay-Dauer betrug 30 Sekunden.

Abbildung 3.4 zeigt die relative Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit zweier Proben mit und ohne Zyanidzusatz in Abhängigkeit der Zeit. Die anfängliche Absorptionsänderung betrug für beiden Proben ungefähr 0,7 pro Minute. Nach nicht ganz einer Minute begann sich die Reaktionsgeschwindigkeit der Probe mit Zyanid im Vergleich zur Kontrolle zu verringern. Sie sank von da an deutlich und betrug nach zwei Minuten nur noch 50%. Dagegen blieb die Rate der Kontrollprobe beinahe konstant. Die leichte Abnahme ist wahrscheinlich auf eine Abnahme der  $\text{NADP}^+$ -Konzentration bzw. eine Zunahme der inhibitorisch wirkenden NADPH-Konzentration zurückzuführen.

Zur weiteren Charakterisierung der Inhibierung durch Zyanid wurde untersucht, ob der Oxidationzustand des Enzyms möglicherweise Einfluss auf die Reaktion haben könnte. Während der Katalyse wechselt das Molybdän seinen Redoxzustand zwischen der reduzierten +4 und der oxidierten +6 Form. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist es für die *eb*NDH charakteristisch in teilweise reduziertem +5-Zustand gereinigt zu werden. Zwei Proben wurden deshalb für zehn Minuten an der Luft oxidiert. Danach folgte eine einstündige Inkubation im Zelt. Durch gelegentliches Rühren während dieser Zeit sollten letzte Reste von Sauerstoff in der Proteinlösung entfernt werden. Die beiden Proben mit teilweise reduziertem (*as isolated*) verblieben während dieser Zeit im Zelt.

Zu jeweils einer oxidierten und einer reduzierten Probe wurde Zyanidlösung mit einer 1 mM Endkonzentration zugegeben, zu den beiden anderen wurde eine entsprechende Menge Puffer gegeben. Der verwendete Puffer enthielt bei allen vier Proben kein Reduktionsmittel. Aktivität wurde in Abständen von fünf Minuten über einen Zeitraum von 90 Minuten gemessen. Die Kontrolle, reduziertes Enzym ohne Zyanid-Zusatz, zeigte während der Versuchsdauer keine Verringerung der Aktivität. Auch bei reduziertem Enzym mit Zyanidzusatz konnte keine Aktivitätsabnahme festgestellt werden. Eine leichte Abnahme von annähernd 9 % der Anfangsaktivität war für das oxidierte Enzym ohne Zyanidzusatz erkennbar. Diese Beobachtung stimmt mit denen früherer Untersuchungen überein (Gladyshev, Khangulov et al., 1996), bei denen kurzzeitiger Kontakt mit Sauerstoff relativ geringe Auswirkungen auf die Aktivität hatte. Auffallend war dagegen der Reaktionsverlauf des oxidierten Enzyms mit Zyanid-Zusatz. Nach zehn Minuten war bereits eine deutliche Aktivitätsabnahme erkennbar, die nach 90 Minuten zu einer nahezu vollständigen Inhibition führte. Die verbleibende Aktivität betrug zu diesem Zeitpunkt noch 20 %. Um eine Verfälschung der Werte durch den im vorangegangenen Absatz beschriebenen Effekt zu vermeiden, betrug die Dauer der Aktivitäts-Assays nur 30 Sekunden.

Auf Grund der Luftoxidation kann eine Beteiligung von molekularem Sauerstoff nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Versuche aus Abbildung 3.4 wurden dagegen unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Auch ohne Sauerstoff ist hier eine Inhibition durch Zyanid zu erkennen.

### 3.5 Kristallisation

Für die „Screening“-Experimente wurden der Index-Screen® (HamptonResearch), sowie der selbst hergestellte „Precipitant-Synergy Screen“ (Majeed, Ofek et al., 2003) verwendet. Es konnten zwei Bedingungen gefunden werden, unter denen Kristalle wuchsen. (Bed1: Synergy29 - 0,2 M NH<sub>4</sub>Citrat pH7,5 , 15% PEG3350, 20% Isopropanol; Bed2: Index92 - 0,1 M Magnesiumformiat, 15% PEG3350). Für beide Bedingungen wurden Optimierungen durchgeführt. Die erste Bedingung ergab relativ große, jedoch verwachsene Kristalle, die durch Optimierung zu gleichmäßig geformten Einkristallen heranwuchsen (Abb. 3.5 A). Sie waren für die weitere Verwendung jedoch ungeeignet, da mit ihnen auch nach weiteren Optimierungsversuchen keine höhere Auflösung als 3 Å erreicht werden konnte.

**Tabelle 3.2: Kristallisationsbedingungen der NDH.** Protein wurde vor der Kristallisation auf 30 mg/mL konzentriert und in 50 mM TrisHCl pH 7,8, 20 mM KCl, 1mM EDTA , 2 mM DTT gelagert. Die angegebenen Konzentrationen entsprechen den verwendeten Stocklösungen,. Zur Verdünnung wurde Lagerpuffer verwendet.

Kristallform	1	2	3
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>
Anfangsbedingungen	0,2 M NH <sub>4</sub> Citrat pH7,5 15% PEG3350 20% Isopropanol	0,1M MgFormiat 15% PEG3350	
Endbedingungen	0,1 M TrisHCl pH7,5 18% PEG3350 18% Isopropanol 0,02M NH <sub>4</sub> Citrat pH7,5	0,1M TrisHCl pH7,5 20% PEG3350 0,075M NaNitrat 1% MPD	0,1M TrisHCl pH7,5 20% PEG3350 0,075M NaNitrat 5% Glycerol
Konzentration	30 mg/mL	10 mg/mL	15 mg/mL

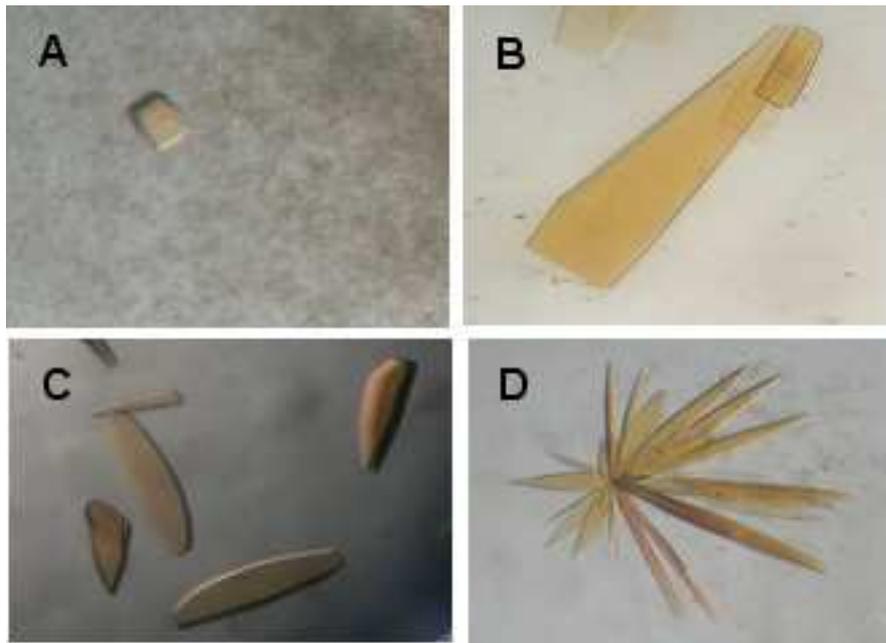
Kristalle aus Bedingung 2 hatten die Form von großen, jedoch verwachsenen bzw. rosettenförmigen Platten (Abb. 3.5 D). Optimierung führte zu keiner Veränderung der Kristallmorphologie, jedoch verringerten sich die Verwachsung deutlich. Das Streuverhalten konnte im Verlauf der Optimierung ebenfalls deutlich verbessert werden (Abb. 3.5 C). Kristalle wuchsen innerhalb von 2-9 Tagen, wobei die Kristalle bei denen die Nukleation später eintrat größer und gleichmäßiger waren. Die Platten hatten einen Durchmesser von 300 µm sowie eine dunkle orange-braune Färbung (Abb. 3.5).

Optimierte Kristalle aus Bedingung 2 (Tab. 3.2) zeigten Beugung der Röntgenstrahlung bis zu einer Auflösung von 1,9 Å (Kupfer-Drehanode, mar345dtb, marresearch GmbH), die Struktur dieses Kristalls konnte bis zu einer Auflösung von 2,2 Å bestimmt werden.

Im Hinblick auf die zeitliche Instabilität der NDH, in der Hoffnung einen möglichst hohen Selen-Gehalt im Kristall zu erhalten, wurde die Kristallisation mit Protein der Strategie 3 wiederholt. Auf Grund der hohen Verunreinigung dieser Proben durch andere Proteine veränderte sich die Nukleation deutlich. Die Kristalle zeigten häufig Verwachsungen und es kam zu einer verstärkten Präzipitation (Abb. 3.5B). Durch Anpassen der Bedingung konnte eine Nukleation teilweise über Nacht, meist aber innerhalb der nächsten drei Tage erreicht

werden. Kristalle, die sich später bildeten wurden nicht mehr verwendet. Das Streuverhalten verschlechterte sich jedoch erheblich, auch die am Synchrotron (BM16-ESRF, Grenoble) gemessenen Datensätze erreichten keine besserer Beugung als bis zu einer Auflösung von 2,5 Å.

Alle Datensätze wurden unter Cryobedingungen gemessen. Dazu wurde ein Gemisch aus 3 µL 1,2-Butandiol mit 17 µL Cryolösung (Mutterlösung mit 1,5x PEG3350 Konzentration) verwendet.



**Abbildung 3.5: Kristallmorphologie der NDH.** Die Morphologie der Kristalle waren sehr von den Kristallisationsbedingungen abhängig. Meist dominierte jedoch ein plattenförmiges Wachstum. A) Kristallform 1. B) Kristallform 3 C) Kristallform 2 Endbedingungen D) Kristallform 2, Anfangsbedingungen.

### 3.6 Datensammlung und Strukturverfeinerung

NDH kristallisierte unter allen Bedingungen in der primitiv-monoklinen Raumgruppe P21. 50% aller Proteinstrukturen in der PDB wurden ebenfalls in einer monoklinen Raumgruppe kristallisiert (Andersson und Hovmöller, 2000). Grund für diese Präferenz gegenüber anderen Raumgruppen ist wahrscheinlich die geringe Symmetrie und die hohe Variabilität des Wassergehalts innerhalb dieser Raumgruppe, der zwischen 30-70 % liegen kann. Dadurch bietet die P2-Gruppe eine große Vielzahl an möglichen Kristallkontakten.

Die asymmetrische Einheit der NDH-Kristalle wurde aus nur einem Dimer-Molekül gebildet. Dies konnte durch den Matthews Koeffizienten sowie durch eine Patterson-Selbstrotationsfunktion gezeigt werden. Die Zellkonstanten des Kristalls, der den Datensatz mit der höchsten Qualität lieferte, waren  $a=96,8 \text{ \AA}$   $b=71,8 \text{ \AA}$   $c=214,4 \text{ \AA}$   $\alpha=90^\circ$   $\beta=90,3^\circ$   $\gamma=90^\circ$ . Die Zellkonstanten der andern Kristalle wichen nur geringfügig von diesen Werten ab. Die Datensätze wiesen eine Vollständigkeit zwischen 95 – 98 % auf, die Mosaizität der Kristalle lag zwischen 0,2-0,3°. Der Matthews Koeffizient ergab einen Wert von  $2,3 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ . Er liegt für Proteine meist zwischen 1,7 und  $3,5 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  und entspricht bei einem Solvenzgehalt von 50% typischerweise 2,2. Damit konnte für die NDH ein Solvenzgehalt zwischen 45 – 47% angenommen werden.

Eine pBLAST-Suche in der PDB ergab die höchste Übereinstimmung mit der Sequenz der 4-Hydroxybenzoyl-CoA Reduktase (4HBCR; PDB-ID nativ 1SB3; PDB-ID NaCN-inhibiert) aus *Thauera aromatica*. Die Struktur der 4HBCR wurde deshalb als Model für die Phasenbestimmung durch Molekularen Ersatz verwendet. Dazu wurden nach einem Sequenzvergleich mit ClustalW alle nicht konservierten Reste gegen ein Alanin ausgetauscht. Die Patterson-Suche wurde im Auflösungsbereich 15 – 3 Å durchgeführt und ergab nach Ende der Translationsfunktion eine Lösung mit einem R-Wert von 51% und einem Korrelationskoeffizienten von  $cc= 59,3 \%$ . Eine nachfolgende rigid-body Verfeinerung konnte den R-Wert auf 42 % und den freien R-Wert auf 43 % senken, was die korrekte Lösung bestätigte. Trotz der relativ geringen Identität (23 %) des Suchmodels waren die Phasen geeignet, um daraus eine interpretierbare  $2F_{\text{obs}}F_{\text{calc}}$ -Karte zu berechnen.

Da die assymmetrische Einheit zwei Monomere umfasste, konnten während der Verfeinerung NCS-restrains verwendet werden, die im Verlauf der Verfeinerung zunächst gelockert und später vollständig weggelassen wurden. Durch abwechselnde Verfeinerungs- und Modelbauschritte wurde die Struktur schließlich auf die in Tabelle 3.3 angegebenen Werte verfeinert. Während der Verfeinerung erwiesen sich die „B-Gruppen“-Verfeinerung und simulated-annealing im Torsions-Modus als die effektivsten Methoden. Sowohl die Verfeinerung der individuellen B-Faktoren, als auch Positions-Minimierung ohne simulated annealing senkten die B-Faktoren kaum.

Der R-Wert der verfeinerten Struktur betrug 22,3 %, der freie R-Wert  $R_{\text{free}} = 26,4 \%$ . Für einen Datensatz von 2,2 Å Auflösung liegen beide damit in einem sinnvollen Bereich. Der R-Wert sollte ungefähr dem zehnfachen Wert der Auflösung entsprechen, der freie R-Wert liegt meist um 3-5 % höher als der R-Wert.

Tab.: 3.3 Statistik der Datensammlung und Verfeinerung.

Datensatz	nativ	above	below
<b>Datesammlung</b>			
Raumgruppe	P21 15.418	P21 0.9780	P21 0.9803
Wellenlänge			
UC Parameter			
a, b, c (Å)	96,8	99,5	99,5
b (Å)	71,8	71,9	71,9
c (Å)	214,4	215,7	215,7
$\alpha$ (°)	90	90	90
$\beta$ (°)	90,3	90,7	90,7
$\gamma$ (°)	90	90	90
Auflösung	2,2 666678 / 167821	2,5 396539 / 208277	2,5 360921 / 196213
Total/Unique Reflections			
Vollständigkeit	97,7(94,7)	99,2(97,6)	93,5(74,9)
Mosaizidität	0,3	0,3	0,5
(I)/sigma I	12.2 (3.1)	6.8 (2.4)	6.5 (1.5)
Rsym (%)	9.5 (42.8)	7.8 (31.0)	8.7 (44.8)
<b>Refinement</b>			
	30 - 2.1 (2.3-2.2)	30 - 2.5 (2.6- 2.5)	30 - 2.5 (2.6- 2.5)
Resolution			
R	22,3	26,7	*
R free	26,4	26,5	*
Moleküle/AsymUnit	2	2	2
Reste/AsymUnit	2402	2402	2402
Atome/AsymUnit	19292	18299	18299
Wasser/AsymUnit	961	*	*
Rmsd from ideal Geom			
Bindungslänge	0.006683	0,006702	*
Bindungswinkel	1,31841	1,2586	*
Ramachandran (%)			
Ideal (bevorzugt)	95,05	*	*
erlaubt	4,49	*	*
nicht erlaubt	0,42	*	*

$R_{\text{free}}$  wurde über zufällig ausgewählte 5% des Datensatzes berechnet

$R_s = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(h)}$ ;  $i$  unabhängige Beobachtungen der Reflexion  $h$

(I)/sigI: Signal-Rausch Verhältnis,  $I$  ist die Intensität und sig der geschätzte Fehler der Messung

Rmsd: root-mean-square deviation

Die Ramachandran-Auftragung zeigte mehr als 95,09 % der Aminosäure-Reste im optimalen Bereich, sowie 4,49 % im erlaubten Bereich, bei denen es sich zum Großteil um Glycine

handelte. Nur sieben der Reste (0,42 %) lagen im nicht erlaubten Bereich. Auffallend waren hierbei die beiden Arginine 351<sub>L</sub>. R351<sub>L</sub> befindet sich unmittelbar unterhalb des Molybdopterin-Kofaktors. Ein Einfluss des Kofaktors auf die Konformation dieses Restes kann daher nicht ausgeschlossen werden. Eine katalytische Funktion dieser Konformation kann daher nicht ausgeschlossen werden. Die Struktur ist bis auf die N-Termini der M-Untereinheiten vollständig.

Zur Charakterisierung des Selen-Liganden des Molybdäns wurde die anomale Streuung dieses Elements verwendet. Dazu wurden Datensätze vor und hinter der K-Absorptionskante des Selens (ESRF), zur Verstärkung des anomalen Signals gemessen. Ein für Selen typisches Fluoreszenz-Signal konnte nicht detektiert werden, da die NDH maximal zwei Selen-Atome in der asymmetrischen Einheit enthält. Theoretisch wären für eine eindeutige Detektion mindestens ein Selen Atom für je 10 kDa nötig gewesen (Teplova, Wilds et al., 2002).

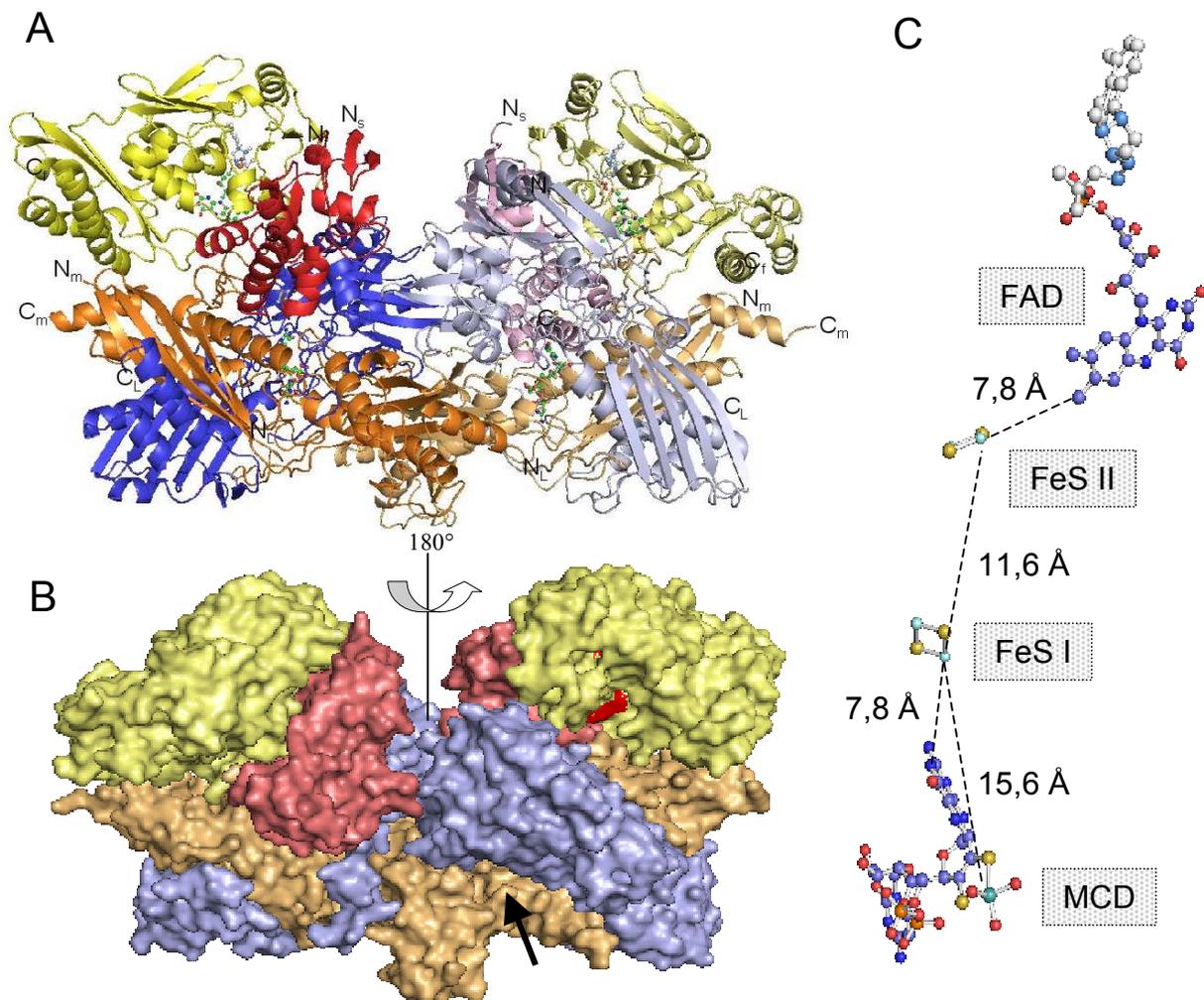
Selenreiche, junge Kristalle streuten deutlich schwächer als ältere Kristalle, ihre maximale Auflösung lag bei 2,5 Å für beide Datensätze (ESRF Grenoble, BM16). Über eine anomale Fourier-Differenz-Karte ließ sich die Stärke der anomalen Beugung in der Nähe des Molybdäns berechnen. Eine weitere Diskussion dieser Ergebnisse folgt in Kapitel 3.7.2.1. Der  $\sigma$ -Level der Differenz-Karte betrug 5,3, eine Verfeinerung des Selen-Atoms ergab eine Besetzung von etwa 80%.

## 3.7 Struktur der NDH

### 3.7.1 Überblick

Die Struktur der NDH ist denen anderer Vertreter der XOR- Familie sehr ähnlich. NDH ist ein großes Enzym mit einem Durchmesser von mehr als 150 nm x 100 nm x 70 nm. Die dem Solvenz zugängliche Oberfläche beträgt 75770 Å<sup>2</sup>, die Kontaktfläche zwischen den einzelnen Untereinheiten ist 45.770 Å<sup>2</sup>. Die Dimer-Kontaktfläche umfasst lediglich 1.365 Å<sup>2</sup>. NDH liegt sowohl in Lösung als auch im Kristall als Dimer aus Heterotetrameren (LMFS)<sub>2</sub> vor. Die beiden Dimer-Komponenten sind um 180° zueinander gedreht und um 40° Grad gegeneinander geneigt. Die Interaktion erfolgt Kopf-an-Kopf, wodurch das Enzym ein Schmetterling-ähnliches Aussehen erhält. Die vier Untereinheiten falten sich in drei übergeordnete Domänen, die jeweils einen bestimmten Kofaktor-Typ binden. Die Genprodukte NdhL (425 Aminosäure Reste, 50 kDa, L steht für „large“) und NdhM (330 Reste, 37 kDa, M = medium) bilden gemeinsam die Molybdopterin-bindende Domäne, NdhF (296 Reste, 33 kDa, F = FAD) faltet sich in die FAD-bindende Domäne und NdhS (157

Reste, 23 kDa, S = small) in die Eisen-Schwefel-Zentren Domäne. Der Kontaktbereich zwischen den beiden Protomeren wird hauptsächlich über Reste der M-Untereinheit gebildet.



**Abbildung 3.6: Struktur der NDH.** A) Bänderdarstellung des NDH-Dimers. Färbung des ersten Protomers: blau NdhL, orange NdhM, gelb NdhF und rot NdhS. Die Farben des zweiten Protomers sind entsprechend in Pastellfarben dargestellt. B) Oberfächendarstellung des Dimers. Der Pfeil deutet den Eingang zum Substratkanal an. Die zum Solvenz exponierte Oberfläche des FAD ist rot dargestellt. C) zeigt die Kofaktoren, ihre Abstände zueinander, sowie ihre Domänenzugehörigkeit. Die Kofaktoren sind als ball-and-stick Modell dargestellt.

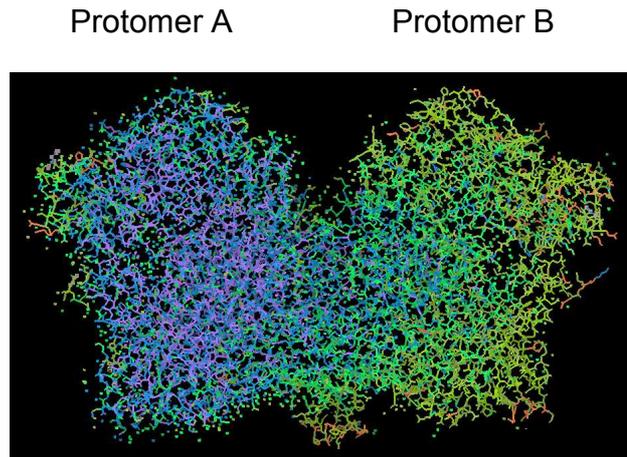
Jedes Protomer ist eine katalytisch unabhängige Einheit und enthält jeweils eine Elektronen-Transportkette (Abb. 3.6 C). Die vier Kofaktoren (MCD,  $2x[2Fe_2S]$ -Zentren, FAD) sind in einer nahezu geraden Linie angeordnet und überbrücken einen Abstand von 32 Å. Die Elektronentransportkette beginnt am Molybdopterin und verläuft über FeS-I und FeS-II bis zum FAD. Der geringste Abstand zwischen den Kofaktoren der beiden Dimere beträgt für die Molybdän-Kofaktoren 42 Å und ist damit so groß, dass eine direkte Interaktion der beiden Transportketten unwahrscheinlich erscheint. Die Abstände zwischen den einzelnen Kofaktoren liegen im für die XOR-Familie charakteristischen Bereich. Molybdän und FeS-I liegen 15,6 Å auseinander, ihre Entfernung zueinander ist damit etwas länger als der ermittelte Richtwert von 14 Å (Page et al., 1999). Im Allgemeinen wird angenommen, dass in Redoxenzymen ein direkter Elektronen-Transport durchs Kontinuum ohne Geschwindigkeitsverlust nur dann gegeben ist, wenn der Abstand der beiden Redoxzentren kleiner als 14 Å ist.

Sowohl das FAD und als auch das MCD sind mit ihrem Phosphat-Teil in typischen Bindemotiven verankert. Die katalytisch aktiven Zentren hingegen finden sich typischerweise in nicht strukturierten „*Coiled Coil*“ Bereichen. Die starren Sekundärstruktur-Elemente positionieren den Kofaktor, dagegen erlauben die „*Coiled Coil*“ Bereiche die für die Katalyse benötigte Flexibilität.

Der Molybdän-Kofaktor liegt tief eingebettet unterhalb der Enzymoberfläche. Der Pfeil in Abb. 3.6 B deutet den Eingang des Substratkanals an. Auch die beiden Eisen-Schwefel-Zentren liegen im Inneren des Moleküls verborgen. Nur das FAD ist mit der *si*-Seite deutlich zum Solvenz hin exponiert (rot in Abb. 3.6 B).

Die beiden Protomere unterscheiden sich strukturell kaum voneinander. Die r.m.s.d (root-mean-square-deviation der strukturell äquivalenten  $C_\alpha$ -Atome in einer „least-square“ basierten Überlagerung der Sekundärstruktur-Elemente) beträgt nur 0,3 Å für die Molybdän- und FeS-Domänen, bzw. 0,5 Å für die Flavinder Domäne.

Auffallend ist die Verteilung der B-Faktoren innerhalb des Moleküls. Sie liegen für Protomer A (Abb. 3.7), abgesehen von einigen weniger gut definierten Aminosäureresten an der Oberfläche, zwischen 5-50 Å<sup>2</sup> (Farben blau bis grün in Abb. 3.7). Protomer B weist mit 40-90 Å<sup>2</sup> (grün bis orange) deutlich höhere B-Faktoren auf, einzelne Reste an der Oberfläche erreichen sogar Werte größer als 100 Å<sup>2</sup> (rot). Nur im Bereich der Kontaktfläche zu Protomer A treten B-Faktoren zwischen 5-20 Å<sup>2</sup> auf. Demnach scheint Tetramer B weniger geordnet zu sein, die Elektronendichte insbesondere weit außen liegender Bereiche ist schlechter definiert.

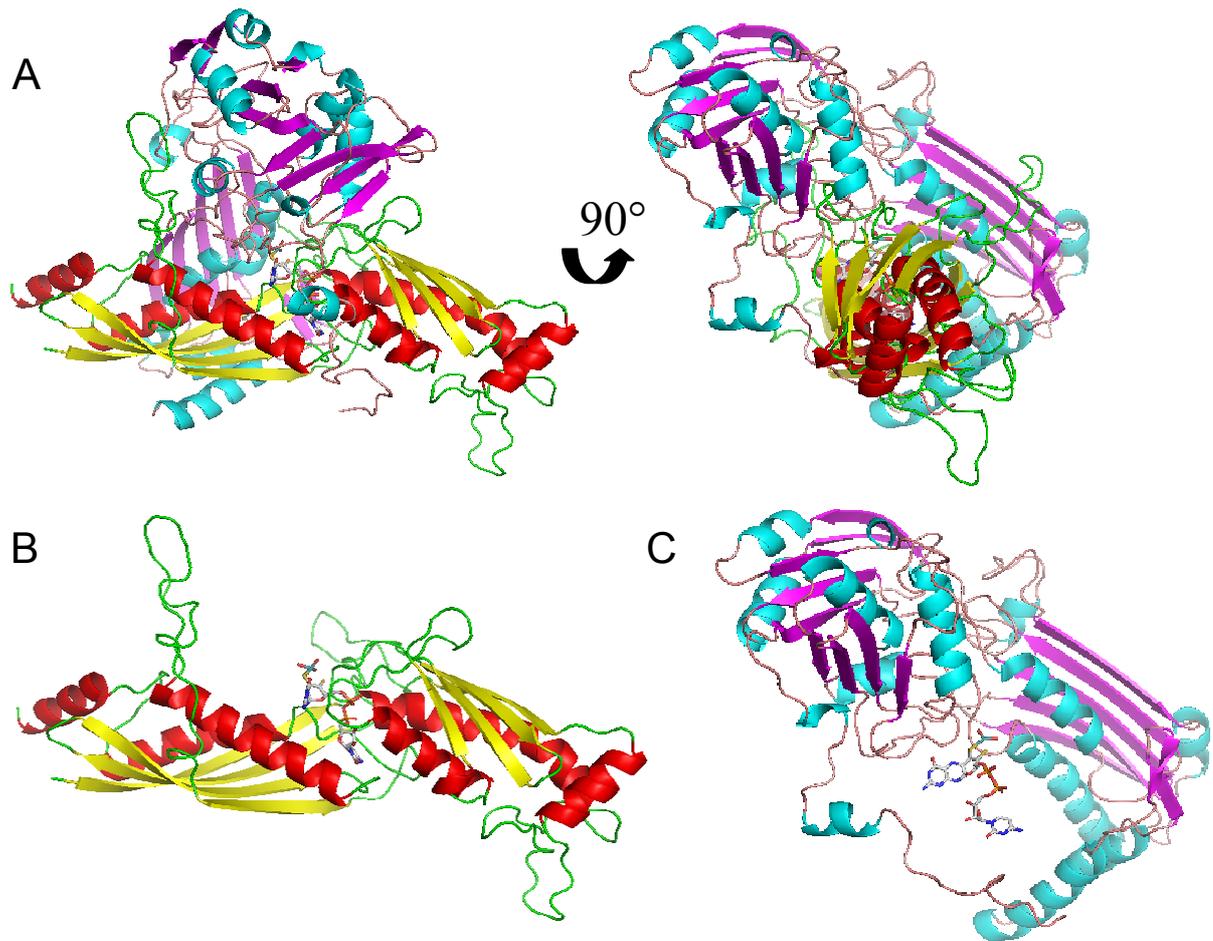


**Abbildung 3.7: Vergleich der B-Faktor Verteilung innerhalb Protomer A und B.** A) Farbliche Darstellung der B-Faktor Verteilung. Die Größe der B-Faktoren steigt mit zunehmender Wärme der Farben. Große Teile des ersten Protomers besitzen B-Faktoren kleiner  $30 \text{ \AA}^2$ , dagegen sind die B-Faktoren im zweiten Protomer deutlich höher.

Eine Erklärung für die unterschiedliche Ordnung der beiden Bereiche könnte in der Verteilung der Kristallkontakte zu finden sein. Im Gegensatz zu Protomer A weist Protomer B weniger Kristallgitter-Kontakte auf. Protomer A bildet zahlreiche Kristallkontakte im Bereich der Flavin-Untereinheit aus, an denen ein Großteil der Oberfläche beteiligt ist. Daneben gibt es noch weniger intensive Kontakte der L-Untereinheit (dem  $\beta$ -Faltblatt der C-terminalen Domäne) und der kleinen Untereinheit. Die gleichen Bereiche sind auch bei den Kristallkontakten in Protomer B beteiligt, sie treten jedoch deutlich weniger in Wechselwirkung miteinander, wodurch es wahrscheinlich zu einer geringeren räumlichen Stabilisierung kommt.

### 3.7.2 Die Molybdopterin-Domäne

Die Molybdopterin-Domäne ist herzförmig und besteht aus zwei Untereinheiten, der großen L-Untereinheit mit 425 Aminosäuren und der mittelgroßen M-Untereinheit mit 330 Aminosäuren. Sie sind den großen, Molybdopterin-bindenden Untereinheiten bzw. Domänen (80-85 kDa) der anderen Vertreter der XDH-Familie homolog. Die L-Untereinheit entspricht dabei den beiden N-terminalen Unterdomänen, die M-Untereinheit der C-terminalen Unterdomäne.



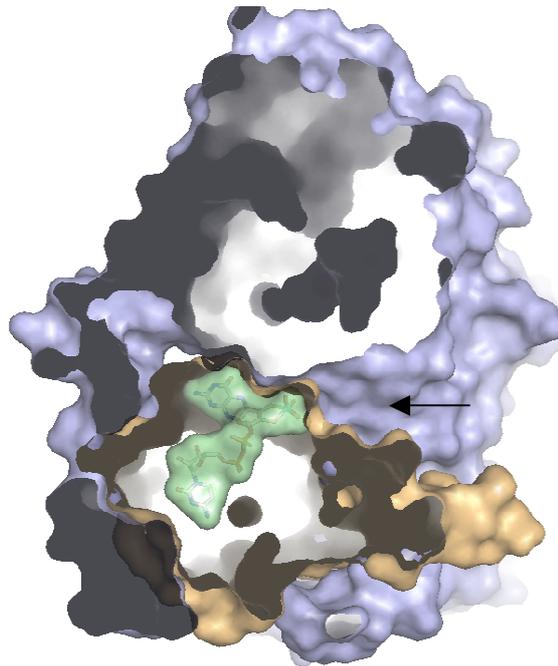
**Abbildung 3.8: Molybdopterin Domäne.** A) Die L-Untereinheit ist blau-violett, die M-Untereinheit gelb-rot dargestellt. B) wie A) um  $90^\circ$  gedreht. C) M-Untereinheit in gleicher Position wie in A). D) L-Untereinheit in gleicher Position wie in B). Beide Untereinheiten liegen um  $90^\circ$  zueinander gedreht. Die M-Untereinheit weist eine gestreckte Konformation auf, die L-Untereinheit dagegen ist kompakt und umschließt die M-Untereinheit.

Beide Untereinheiten sind eng ineinander verschlungen (Abb. 3.8) und liegen um  $90^\circ$  gedreht übereinander. Während die M-Untereinheit eine gestreckte Konformation einnimmt, wird sie von der L-Untereinheit nahezu ringförmig eingeschlossen (Abb. 3.8 D). Der N-Terminus (R1-28) der L-Untereinheit ist tief zwischen den beiden Domänen der M-Untereinheit eingebettet und steht in engem Kontakt zur Eisen-Schwefel-Untereinheit. Zusätzlich ist er an der Interaktion zur L-Untereinheit des anderen Protomers beteiligt. Die Oberfläche der L-Untereinheit umfasst  $19.590 \text{ \AA}^2$ , die der M-Untereinheit  $16.644 \text{ \AA}^2$ . Gemeinsam teilen sie sich ein Interaktionsfläche von  $4.545 \text{ \AA}^2$ .

Der N-terminalen Extension folgen zwei Unterdomänen. Die erste besteht aus einem gemischten siebensträngigen  $\beta$ -Faltblatt, das an beiden Seiten von kleinen  $\alpha$ -Helices flankiert

wird. Teile dieses Faltblattes interagieren mit der bereits genannten N-terminalen Extension des anderen Protomers. Ein weiteres zweisträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt geht in die C-terminale Domäne über. Diese wird von einem fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt gebildet. Zwei  $\alpha$ -Helices verlaufen quer dazu, drei weitere kleine  $\alpha$ -Helices umgeben das Faltblatt. Die N-terminale Domäne (Reste 1-150) wurde durch SCOP (Murzin, Chandonia et al., 1995) der „hammerhead“-Superfamilie zugeordnet. Die übrigen Domänen weisen keine auffälligen Faltungsmotive auf.

Im Gegensatz zur M-Untereinheit ist die L-Untereinheit kaum an der strukturellen Bindung des Molybdän-Kofaktors beteiligt. Sie bildet keine Interaktionen zum Ribonukleotid aus, dagegen liegen mehrere „Coiled Coil“-Bereiche der L-Untereinheit nahe am funktionellen Bereich des Kofaktors (Abb. 3.8 C). Viele Reste der zweiten und dritten Ligandensphäre des Molybdäns werden von der L-Untereinheit bereitgestellt (Abb.3.16). Auch ein Großteil der Reste der Substratbindetasche und des Substratkanals gehören zur L-Untereinheit.



**Abbildung 3.9:** Oberflächendarstellung der L- und M-Untereinheit. Der Molybdopterin-Teil des Kofaktors (grün) befindet sich direkt zwischen der L- und der M-Untereinheit (blau bzw. orange). Der Nukleotid-Teil wird ausschließlich durch die M-Untereinheit gebunden. Der Molybdän-Komplex ist direkt auf das Ende des Substratkanals gerichtet (Pfeil), der ebenfalls von beiden Untereinheiten gebildet wird.

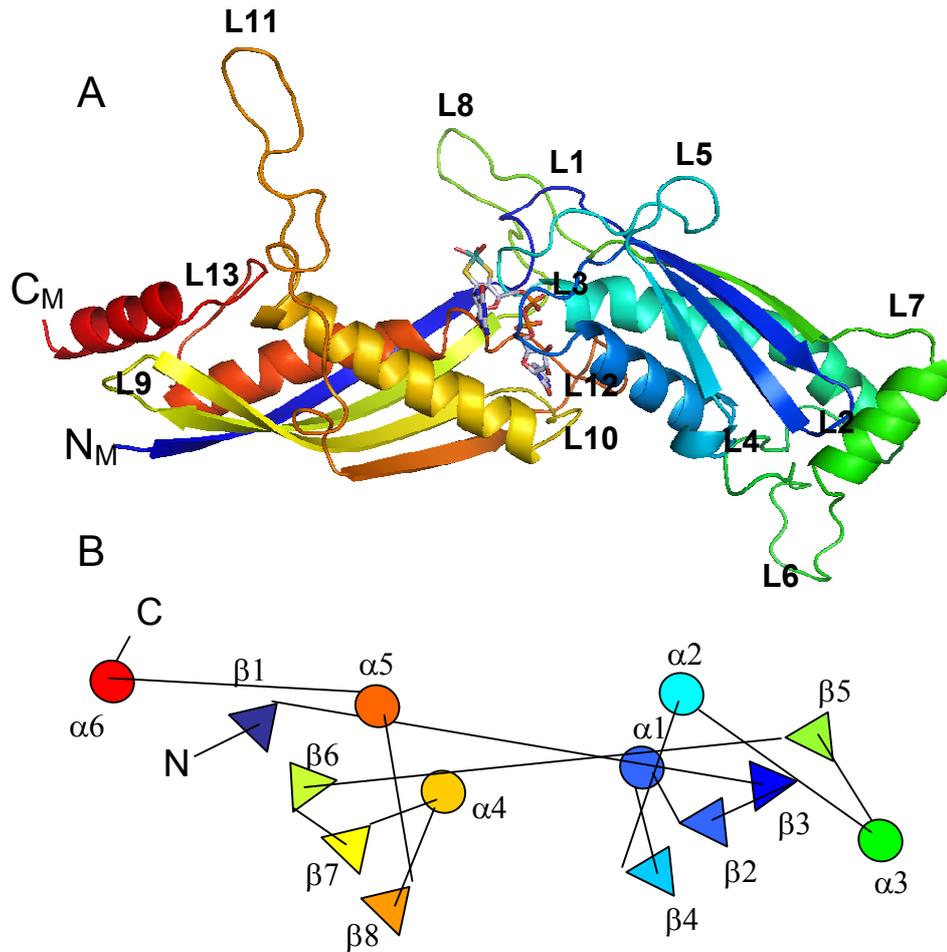
Die M-Untereinheit wird aus zwei Unterdomänen gebildet, die eine nahezu zweifache Pseudosymmetrie zueinander aufweisen (Abb. 3.10). Die Symmetrieebene verläuft direkt durch den Kofaktor-bindenden Bereich, die interagierenden Reste weisen selber jedoch keine Symmetrie auf. Beide Domänen bestehen aus einem gemischten, viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt und drei  $\alpha$ -Helices. Sowohl N- als auch C-Terminus befinden sich in derselben Domäne. Die als L6 bezeichnete Schleife wird in einigen Strukturen (*ocCODH*, *btXDH*) als kleines dreiblättriges  $\beta$ -Faltblatt dargestellt und fehlt bei *dgAOR*.

Die M-Untereinheit vermittelt den Eindruck aus einer Genverdopplung entstanden zu sein. Ein Vergleich der Topologie zeigt, dass die Schleifen L1 zu L8, sowie L4 zu L11 und L5 zu L10 und L6 zu L13 homolog sind. L1 und L8 bilden die Verbindung der beiden Domänen untereinander. Für L7 findet sich keine strukturelle Entsprechung. Er befindet sich in der gleichen Position wie N- und der C-Terminus der gegenüberliegenden Domäne. L7 könnte daher den Bereich der Fusion darstellen.

Alternativ könnten die jeweiligen N-terminalen Stränge der  $\beta$ -Faltblätter ursprünglich Teil der gegenüberliegenden Domäne gewesen sein. In diesem Fall hätte es jedoch zu mindestens vier Überkreuzungen auf genomischer Ebene (Bereiche der Schleifen L1 und L8), sowie bei einer der Domänen zu einer Verschmelzung der C- und N-Termini im Bereich L7 kommen müssen.

Die überwiegend aus N-terminalen Sequenzen bestehende Domäne (kalte Farben in Abb. 3.10) bildet die meisten Interaktionen zum zweiten Protomer aus. Vergleicht man die beiden Domänen miteinander, dann sind die Sekundärstruktur-Elemente dieser Domäne etwas verkürzt, die Schleifen dagegen verlängert.

Ein Strukturvergleich (secondary structure matching (Krissinel und Henrick, 2004)) der M-Untereinheit mit dem Programm Dali (Holm, 1993) erbrachte keine eindeutigen Treffer. Es wurden einige mögliche homologe Strukturen gefunden, (Ornithin-Acetyl-Transferase 1vz8  $z = 6.0$  rmsd 4,4 Å; long hypothetical Aminopeptidase 2drh  $z = 5,3$  rmsd 4,3 Å; Aminopeptidase 1b65  $z = 5,1$  rmsd 4,5 Å; S-Adenosylmethionin-Synthase  $z = 5.0$  rmsd 3,7 Å), ein visueller Vergleich dieser Strukturen ließ jedoch keine auffälligen Gemeinsamkeiten erkennen. Alle Strukturen wiesen kleinere  $\beta$ -Faltblätter mit schräg dazu liegenden  $\alpha$ -Helices auf. Diese Gemeinsamkeiten könnten jedoch auch auf der Einfachheit des Strukturmotivs und die gemeinsame Zugehörigkeit zur  $\alpha/\beta$ -Superfamilie zurückzuführen sein.



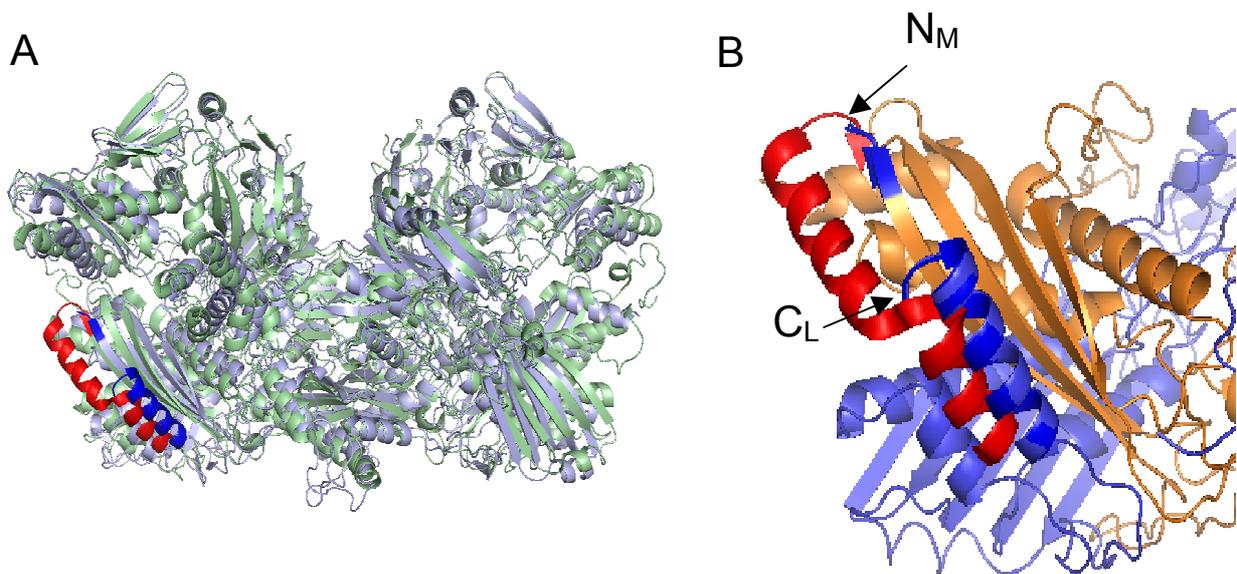
**Abbildung 3.10: Bänder- und Topologie-Diagramm der M-Untereinheit.** A) Zur besseren Verdeutlichung des Sequenzverlaufs wurde die M-Untereinheit in chromatischen Farben dargestellt. Kalte Farben entsprechen dem N-Terminus, warme Farben dem C-Terminus. Die Strukturmodule wurden mit  $\alpha 1-6$  ( $\alpha$ -Helix),  $\beta 1-8$  ( $\beta$ -Faltblatt) und L1-13 (Schleife) bezeichnet. B) Topologie-Diagramm des Sequenzverlaufs. Helices sind als Kreise, Faltblätter als Dreiecke dargestellt. Die Färbung entspricht der in A)

Der Molybdän-Kofaktor wird zwischen den beiden Domänen gebunden. Die Domäne, die die Dimer-Interaktionsfläche bildet, geht die meisten Wechselwirkungen zum Pyrophosphat ein und bildet einen Teil des aktiven Zentrums. Die andere Domäne interagiert hauptsächlich mit dem Cytosin und dem distalen Bereich des Pterins.

Die M-Untereinheit liefert somit alle Kontakte zur Bindung des Ribonukleotids, darunter auch alle Interaktionen zur Cytosin-Komponente. An der Verankerung des Kofaktors ist die L-Untereinheit nicht beteiligt. Der katalytisch aktive Pterin-Bereich befindet sich zwischen der

L- und M-Untereinheit (Abb. 3.9). Entsprechend bilden Reste der L-Untereinheit den apikalen und Reste der M-Untereinheit den dorsalen Bereich des aktiven Zentrums und der Substrat-Tasche. Die M-Untereinheit weist darüber hinaus viele Wechselwirkungen zur Eisen-Schwefel-Domäne und zur FAD-Domäne auf.

Die Teilung der Molybdopterin-Bindedomäne in zwei getrennte Untereinheiten beruht auf einer kurzen Deletion einer auf der Oberfläche des Enzyms gelegenen Helix. Ein Vergleich mit XDH und anderen Strukturen zeigt zwei aufeinander folgende Helices (Abb. 3.11 *bt*XDH Bereich V964-S975 und Q976-N991), die die beiden Domänen miteinander verbinden. Das Ende der großen Untereinheit der NDH fällt mit dem Ende der N-terminalen Helix zusammen, der N-Terminus der M-Untereinheit liegt am Beginn des nachfolgenden  $\beta$ -Faltblatts. Die C-terminale, verbindende Helix fehlt vollständig. Große und mittlere Untereinheit werden im Nicotinat-Operon durch zwei aufeinander folgende Gene *ndhLM* kodiert, wobei beide Sequenzen sich um 17 bp überlappen. Auf Grund der oberflächennahen Lage der Helix kann man davon ausgehen, dass die Deletion keinen Einfluss auf die Funktionalität des Enzyms hatte.



**Abbildung 3.11: Molybdopterin-Domäne in *bt*XDH und *eb*NDH.** A) Überlagerung der Strukturen der *bt*XDH (grün) und *eb*NDH (hellblau). Zu erkennen ist die Position im Molekül, an der die *eb*NDH durch eine Deletion in zwei Untereinheiten geteilt wird. Die entsprechenden Bereiche sind für *bt*XDH rot und für *eb*NDH blau dargestellt. B) Vergrößerte Darstellung der entsprechenden Region der L- und M-Untereinheit von *eb*NDH. Deutlich zu erkennen ist die zweite Helix in der *bt*XDH Struktur, die in *eb*NDH fehlt. Der N-Terminus der M-Untereinheit liegt am N-terminalen Beginn des folgenden  $\beta$ -Faltblattes. Hellblau: L-Untereinheit, orange: M-Untereinheit.

Neben der *ebNDH* wurde bisher nur die Purin-Hydroxylase (*cpPH*) aus *Clostridium purinolyticum* (Self und Stadtman, 2000) als ein Dimer aus Tetrameren beschrieben. Auch bei *cpPH* scheint die Molybdopterin-Bindedomäne in eine 54 kDa und eine 44 kDa Untereinheit unterteilt zu sein. Auf Grund der Größe der gereinigten Untereinheiten kann die Position der Trennung jedoch nicht mit der der *ebNDH* übereinstimmen.

Obwohl die ursprüngliche BLAST-Suche (nBLAST, NCBI Homepage) der gesamten NDH-Sequenz gegen die PDB-Datenbank die höchste Ähnlichkeit zur 4HBCR ergab, wiesen Strukturvergleiche über den Dali-Server (Holm und Sander, 1993) oder MSDfold (MSD, EMBL-EBI) eine weitaus geringere strukturelle Ähnlichkeit zu diesem Enzym auf. Im Allgemeinen besteht jedoch eine hohe Ähnlichkeit der NDH zu anderen Molybdän-Hydroxylasen. Die rmsd betrug für die Struktur des gesamten Enzyms zur *dgAOR* 2,0 Å und zur *ocCODH* 2,5 Å. Abhängig von der jeweiligen Untereinheit variierten die strukturellen Gemeinsamkeiten ein wenig. Die geringsten Unterschiede wies die S-Untereinheit auf (rmsd 1,0 Å zur *taHBCR*, 1,3 Å zur *ocCODH*). Die übrigen Untereinheiten wichen stärker voneinander ab: L-Untereinheit (2,1 Å zur *ocCODH*, 2,3 Å zur *ppQOR*), M-Untereinheit (1,7 Å zur *ppQOR*, 1,9 Å zur *dgAOR*). Die geringste Ähnlichkeit fand sich für die F-Untereinheit (2,2 Å zur *ocCODH*, 2,3 Å zur *ppQOR*), bei der es sich um die am wenigsten konservierte Untereinheit der XOR-Familie handelt.

Zur Erstellung eines Sequenz-Vergleichs wurden einige, wenn vorhanden strukturell charakterisierte, Vertreter der verschiedenen XOR-Unterfamilien verwendet. Es umfasst nur die Sequenzen der Molybdän-Untereinheiten. Daneben wurden noch einige annotierte, jedoch nicht weiter charakterisierte Sequenzen verwendet, die eine hohe Sequenzähnlichkeit zur *ebNDH* aufwiesen bzw. als Selen-haltig beschrieben wurden. Sequenzen von Enzymen, die nachweislich Selen enthalten, konnten nicht berücksichtigt werden, da entsprechende Organismen bzw. Gene nicht sequenziert sind.

Der Sequenzvergleich weist mehrere konservierte Reste auf, von denen funktionell wichtige in Abb. 3.11 rot markiert wurden. Während an der Katalyse beteiligte Reste hoch konserviert sind, ist dies für Reste, die bei der Substratbindung eine Rolle spielen, nicht der Fall.

An Hand dieses *Alignments* wurde ein Stammbaum berechnet, der die Verwandtschaften der einzelnen Proteine zueinander verdeutlicht. Die engste Verwandtschaft der *ebNDH* besteht zu zwei Proteinen der Organismen *Anaerotruncus colihominis* und *Bacteroides capillosus*. Beide Proteine sind Teile von Operons, die auf Grund ihrer Organisation auf eine funktionelle Ähnlichkeit zum Nicotinat-Operon hindeuten könnten. Wie in der Einleitung erwähnt, konnte

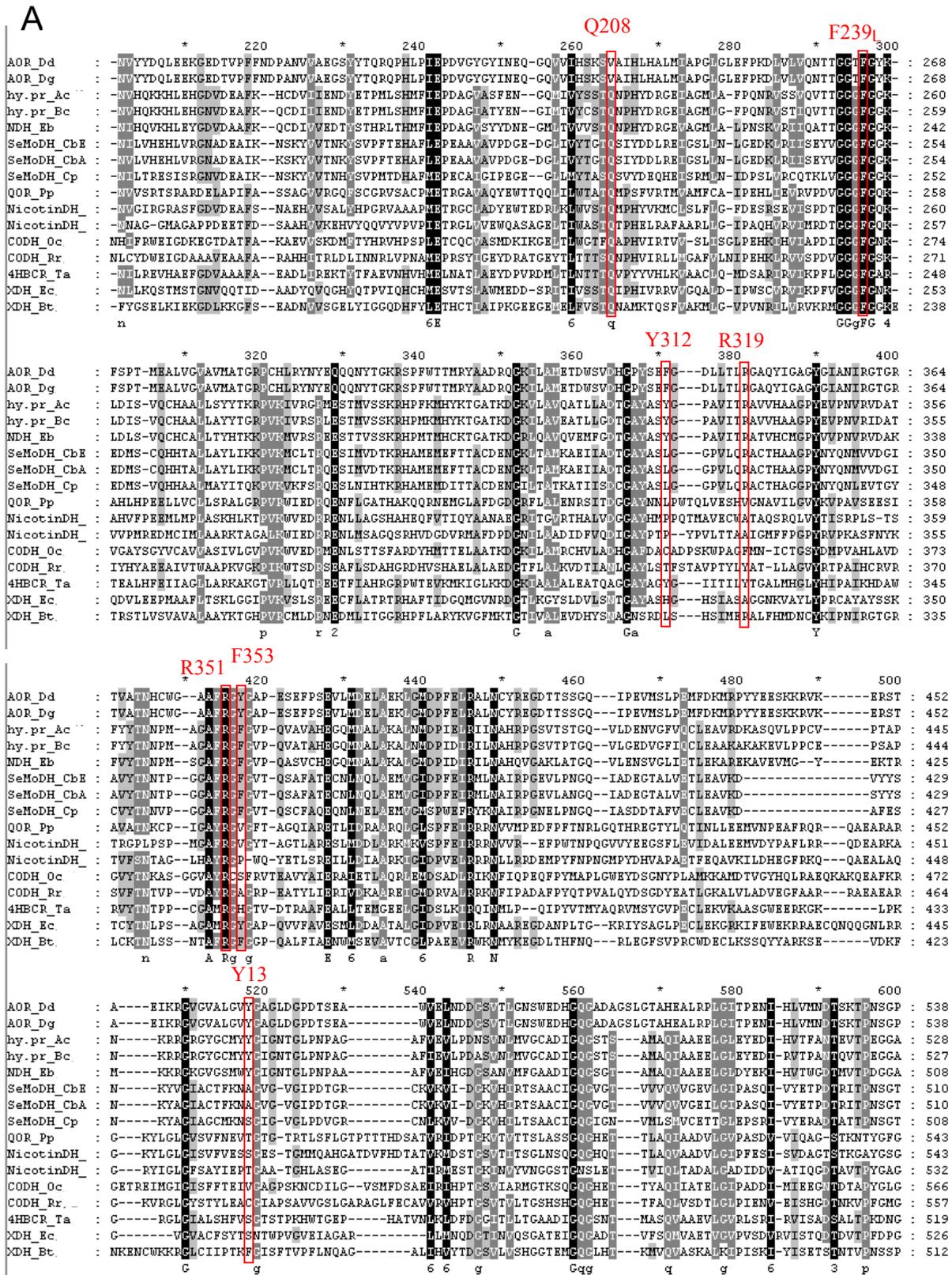
bisher nur für *E.barkeri* der Abbau von Nicotinat unter fermentativen Bedingungen nachgewiesen werden. *A.colihominis* ist eine Gram-positives, obligat anaerobes und nicht sporulierendes Stäbchen, das auf Grund seiner 16s-rRNA, der Untergruppe von *Clostridium leptum* zugeordnet wurde. Als bisher einziger Vertreter der Gattung *Anaerotruncus* ist es ein Bewohner des menschlichen Darmtraktes. *B. capillosus* gehört ebenfalls zum Phylum Firmicutes. Es ist ein obligat anaerobes, gram-negatives Stäbchen und findet sich ebenfalls in der Normalflora des Intestinaltraktes. Es konnte in endogenen Infektionen, beispielsweise an Cysten, nachgewiesen werden. Dagegen ist *E. barkeri* kein endogener Organismus und soweit bekannt nicht an Infektionen beteiligt.

Die nicht weiter beschriebenen Se-Mo-Hydroxylasen aus *C. botulinum* Stämme Eklund 17B und Alaska E43, sowie *C. phytofermentans* sich ebenfalls eng mit der *ebNDH* verwandt. Allein über den Sequenzvergleich lassen sich jedoch keine gemeinsamen Merkmale ableiten, die auf eine Nutzung eines Selen-haltigen Pterin-Kofaktors hindeuten würden.

Die nächst verwandten Sequenzen sind die der AORs und der XDHS, sowie mit etwas weiterem Abstand die 4HBCR. Auch hier treten Unterschiede zwischen den einzelnen Domänen auf. Während die 4HBCR über die Gesamtsequenz die höchste Ähnlichkeit zur *ebNDH* aufweist, ist dies für die Molybdän-Untereinheit nicht der Fall.

Eine deutlich größere Distanz besteht zu den CODHs, Qor und den NicotinDHs. Dieses Ergebnis steht im Bezug auf die SSM-Vergleiche für die CODH nicht im Einklang, lässt sich jedoch einfach dadurch erklären, dass gleiche Sekundärstrukturen nicht zwangsläufig eine gleiche Aminosäuresequenz voraussetzen müssen.

Der Stammbaum stimmt nicht mit dem phylogenetischen Stammbaum der Organismen überein. So weist beispielsweise die *btXDH* eine höhere Sequenzhomologie zur *ebNDH* auf als die *rrXDH*.





### 3.7.3 Der Molybdän Kofaktor

Der Molybdopterin-Kofaktor (Molybdopterin-Cytosin-Dinucleotid; MCD) nimmt in der Struktur der *eb*NDH eine typische Konformation ein. Das Pterin ist ein 2-Amino-4-Hydroxy-Pteridin mit einer C4-Alkyl-Seitenkette in Position 6. Der Pyran-Ring wird durch die Kondensation der 3'-OH-Gruppe der C4 Seitenkette und dem C7 des Pterin-Kerns gebildet. Er befindet sich in einer Halbsesselkonformation und bildet relativ zum Pterin-System einen Winkel von 34 °. Dieser Winkel beträgt für andere Molybdän Hydroxylasen zwischen 30-60°. Man nimmt an, dass diese konformelle Flexibilität das Redoxpotential des Molybdäns regulieren könnte. Der Redoxzustand des Pterins selber konnte bisher, auf Grund der Instabilität des Kofaktors, nicht exakt bestimmt werden. Man nimmt jedoch an, dass er in der reduzierten Tetrahydropterin-Form vorliegt, da an N5 und N8 H-Brücken ausgebildet werden.

C1' und C2' des Pyran-Ringes sind *sp*<sup>2</sup>-hybridisiert und tragen jeweils einen Sulfidoliganden. Beide Liganden sind in *cis*-Stellung zueinander und koordinieren gemeinsam das Molybdän. CMP (Cytosin-Monophosphat) bildet wie bei vielen anderen Bakterien die zweite Komponente des Dinukleotids. Es ist über eine Pyrophosphat-Brücke mit der C4'-Phosphatgruppe verbunden und liegt in einer offenen Konformation relativ zum Molybdopterin vor. Der Winkel, den die Ebene des Pterins relativ zum Cytosin einnimmt, beträgt ungefähr 60°. Das Molybdopterin durchspannt die große Domäne an ihrer schmalsten Stelle und liegt mit seiner Ebene direkt zwischen dem aktiven Zentrum und dem nächsten [2Fe2S]-Zentrum, wobei es weit in die angrenzende Eisen-Schwefel Untereinheit hineinreicht.

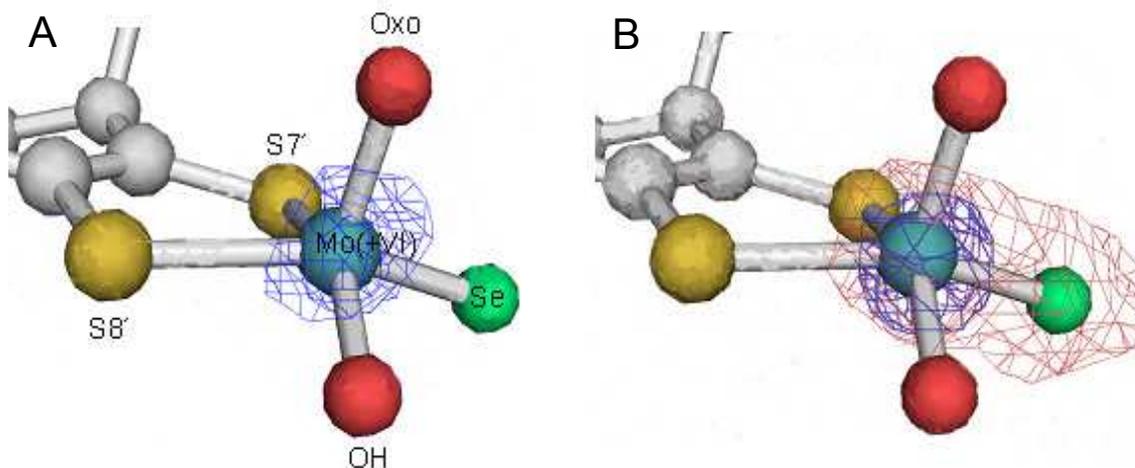
Der Kofaktor selbst ist an der Katalyse nicht beteiligt. Bisher konnte nicht geklärt werden, ob das Molybdopterin möglicherweise am Elektronentransport beteiligt ist. Die Lage direkt zwischen dem Molybdän und dem ersten [2Fe2S]-Zentrum, führte zu der Annahme, dass die Elektronen über das konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem des Pterins transportiert werden. Ein Hinweis auf einen „unterstützten“ Elektronentransport könnte die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen N2 des Pterin und S $\gamma$ -Cys des benachbarten [2Fe2S]-Zentrums liefern. Bisherige Untersuchungen erbrachten jedoch keine Hinweise auf eine Beschleunigung des Elektronentransports gegenüber einem nicht „unterstützenden“ System.

Abb. 3.13 zeigt alle Interaktionen des Proteins zum Kofaktor. Wie bereits erwähnt bildet die M-Untereinheit die meisten Kontakte aus, dagegen sind nur jeweils drei Reste der L- und der S-Untereinheit beteiligt.



berechnen. Ein Vergleich der B-Faktoren des Selen ( $=29,9 \text{ \AA}^2$ ) und der übrigen Liganden des Kofaktors ergaben eine Besetzung von ungefähr 80%. Dieser Wert stimmt gut mit den Werten aus Absatz 3.3 überein. Sowohl Spektren als auch Kristallisationsansätze wurden unmittelbar nach Beendigung der Reinigung gemessen bzw. angesetzt. Stadtman und Mitarbeiter wiesen eine positive Korrelation zwischen Aktivität und dem Vorhandensein des EPR-„resting“-Signals nach. In inaktivem Enzym konnte eine Interaktion von Selen zum Molybdän nicht mehr nachgewiesen werden. In diesem Hinblick ist es interessant, dass NDH in Lösung innerhalb von 24 h nahezu 50 % seiner Aktivität verliert, es während der Kristallisation jedoch zu keinem vergleichbaren Verlust des Selengehalts gekommen ist. In der Literatur wurden für den Selengehalt Besetzungszahlen zwischen 0,1 und 0,5 (Dilworth, 1982) sowie 0,4 und 0,8 (Gladyshev, Khangulov et al., 1996) angegeben. Zusätzliche Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Selen-Gehalts ergaben sich daher, dass das Enzym anscheinend unterschiedliche Mengen an Selen und anderen Kofaktoren verlor (Gladyshev, Khangulov et al., 1994). Möglicherweise hatten die Kristallisation oder die Kristallisationsbedingungen einen stabilisierenden Effekt auf die NDH. Weitere Diskussion dazu in Abs. 4.5.2

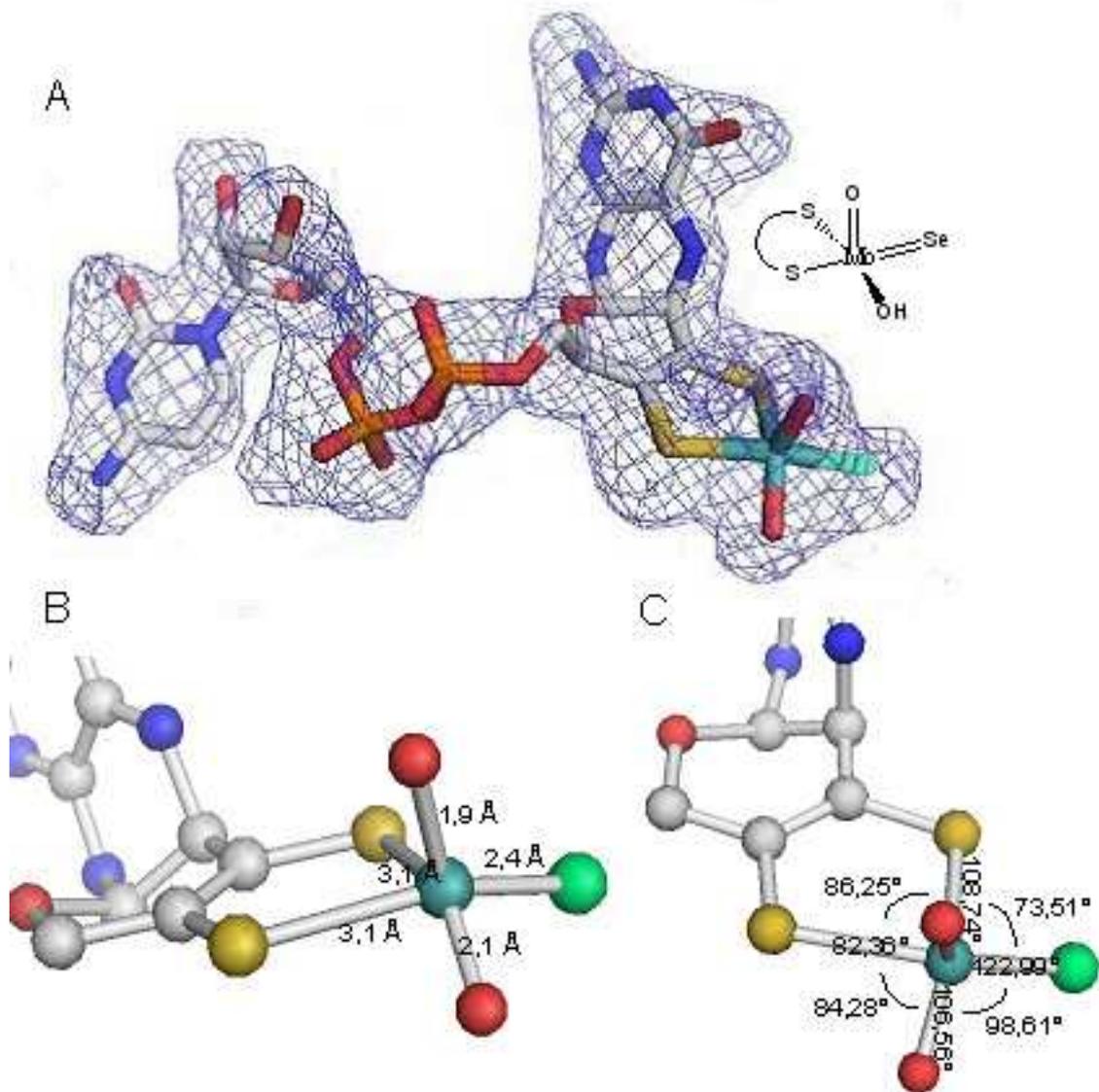
Zur weiteren Charakterisierung der MCD-Geometrie wurden die über die anomalen Datensätze erhaltenen Parameter für die Struktur der nativen Datensätze verwendet. Da nativ eine höhere Auflösung erreicht werden konnte, sollte hierdurch eine genauere Bestimmung der Bindungslängen und Winkel möglich sein. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Röntgenstrukturanalyse, noch dazu bei einer Auflösung von  $2,2 \text{ \AA}$  und in der Nähe eines schweren Atoms wie Molybdän (Fourierreihenabbruch-Effekte), keine exakten Werte liefern kann.



**Abbildung 3.14: Anomale Dispersion des äquatorialen Liganden.** a)  $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  Differenz Elektronendichte Karte (blau), bei  $\sigma$ -Level 3.0. Der Datensatz wurde bei  $\lambda=0,9800 \text{ \AA}$  (unterhalb der Selen-K-Kante) gemessen. Nur das Molybdän zeigt eine anomale Streuung bei dieser Wellenlänge. B)  $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  Differenz Elektronendichte Karten bei  $\sigma$ -Level 3.0. Blaue Karte wie bei A), der Datensatz zur Berechnung der roten Karte wurde oberhalb der Selen-K-Kante ( $\lambda=0,9780 \text{ \AA}$ ) gemessen. Auf Grund dieser anomalen Streuung konnte der vierte äquatoriale Ligand als Selen bestätigt werden. Farben der Elemente: Grau=Kohlenstoff, gelb=Schwefel, rot=Sauerstoff, blau=Molybdän, grün=Selen.

Die erste Koordinationssphäre des Molybdän hat die Geometrie einer verzerrt-quadratischen Pyramide (Abb. 3.14). Das zentrale Molybdän wird durch vier äquatoriale Liganden koordiniert, den beiden Thiolenketten des Pyranringes (ihr Abstand zum Molybdän beträgt  $2,1 \text{ \AA}$ ), einer Hydroxylgruppe (Abstand  $1,8 \text{ \AA}$ ), der sogenannte „labile site“, die während der Katalyse in das Substrat eingefügt wird, sowie einer Selenogruppe (Abstand  $2,4 \text{ \AA}$ ). Bei letzteren handelt es sich in anderen XORs üblicherweise um einen Sulfoliganden. Die beiden Thiolenketten bilden eine *cis*-Thiolen-Bindung zueinander aus und erhalten dadurch einen partiellen  $\sigma$ -Bindungscharakter. Ihr Abstand zueinander beträgt  $3,1 \text{ \AA}$ . Strukturen anderer XORs haben gezeigt, dass diese Bindungslänge auf ein oxidiertes Molybdän hindeutet. Reduktion des Molybdäns führt zu einer Vergrößerung des Abstandes bis auf  $3,5 \text{ \AA}$ . Den fünften Liganden bildet eine Oxogruppe in apikaler Position (Abstand  $1,7 \text{ \AA}$ ). Die Funktion dieses Liganden konnte bisher nicht geklärt werden. Er scheint nicht direkt in der Katalyse teilzunehmen, könnte jedoch an der Stabilisierung von Übergangszuständen eine Rolle spielen. Es wurde angenommen, dass er als sogenannter „*spectator-oxo ligand*“ (Rappe und Goddard, 1980) Übergangszustände, durch die Erhöhung der Bindungsordnung zum Molybdän, stabilisieren kann. Das Molybdän befindet sich  $0,47 \text{ \AA}$  oberhalb der äquatorialen Ebene zum apikalen Liganden hin verschoben.

Die meisten Liganden (apikaler-, Thiolen- und Hydroxyligand) befinden sich damit in einem für oxidierte XORs typischen Abstand zum Molybdän.



**Abbildung 3.15:** Model des Selen-haltigen Molybdopterin-Kofaktors. A)  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Dichte Karte des Se-MCD. Die Karte ist auf  $1\sigma$  konturiert. B) Bindungslängen der ersten Koordinationssphäre des zentralen Molybdäns sowie C) Bindungswinkel.

Abweichungen treten dagegen beim vierten äquatorialen Liganden auf. Wie bereits erwähnt konnte das Vorhandensein eines terminalen Selenoliganden gezeigt werden. Übereinstimmend mit EPR-spektroskopischen Untersuchungen (Gladyshev, Khangulov et al., 1994; Gladyshev, Khangulov et al., 1996) ist Selen analog zum Schwefel anderer Molybdän-Hydroxylasen direkt an das Molybdän koordiniert. Der Abstand des Selen zum Molybdän beträgt 2,4 Å und ist damit um 15 % länger (Gromer, Johansson et al., 2003) als eine analoge

Schwefel-Molybdän Doppelbindung, die typischerweise im Bereich von 2,18-2,19 Å liegt (Thapper, Donahue et al., 1999). Man kann auch hier davon ausgehen, dass der Kofaktor in der oxidierten Selenido-Form vorliegt.

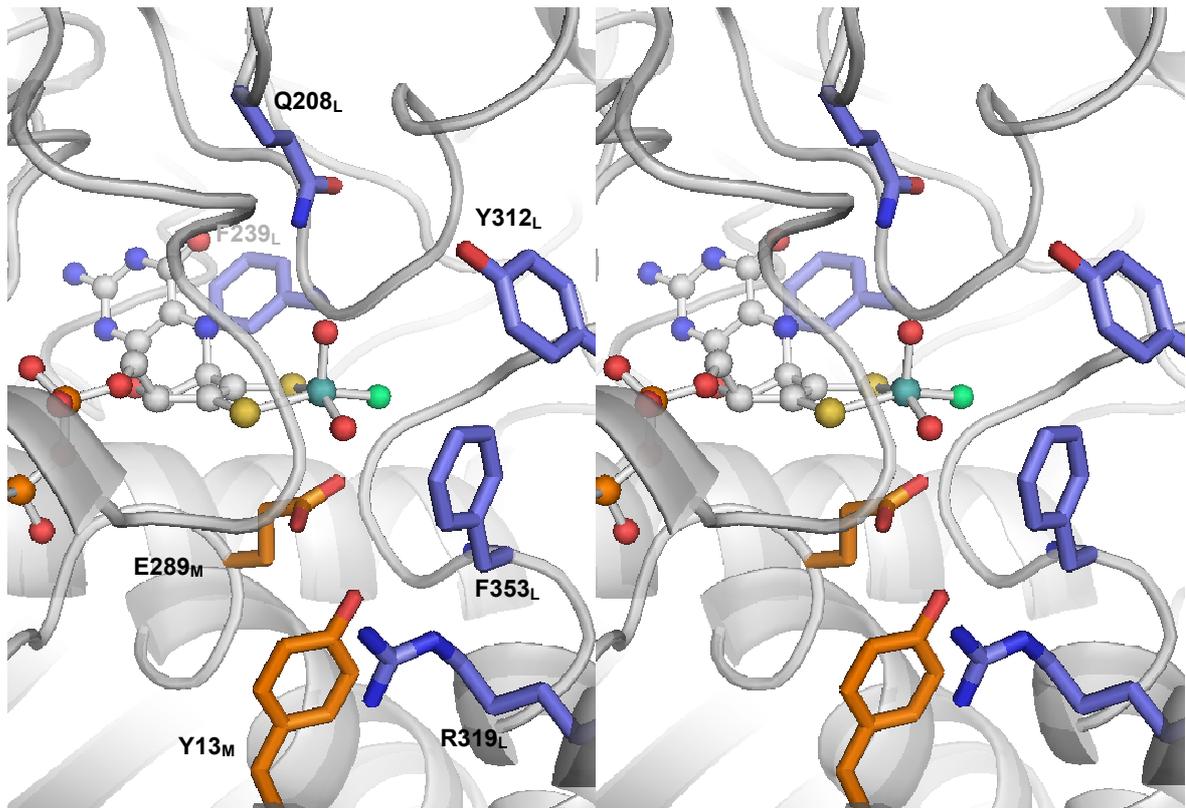
Das Selen liegt im Interaktionsbereich zweier weiterer Gruppen, zur Oxogruppe des F239<sub>L</sub> und zur Carboxylgruppe des E289<sub>M</sub>. Im oxidierten Zustand ist zu diesen Resten die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke nicht möglich, in der reduzierten Selenolform könnte es möglicherweise zu einer Interaktion bzw. Stabilisierung kommen.

### 3.7.4 Das Aktive Zentrum

Zur zweiten Koordinationssphäre gehören Reste, die sich innerhalb von 5 Å Abstand zum Molybdän befinden. Die strukturelle Umgebung des Molybdopterin-Kofaktors ist bei allen Molybdän-Hydroxylasen konserviert, was auf seine funktionelle Wichtigkeit hindeutet.

Das *Alignment* in Abb. 3.13 zeigt mehrere konservierte Aminosäuren, die Teil des aktiven Zentrums sind. Zwei Reste bilden eine Wasserstoffbrücke zum apikalen Liganden aus. Zum einen handelt es sich dabei um Glutamin Q208<sub>L</sub> (Q767 in *btXOR*), das im Abstand von 3,2 Å über seine Nε2-Gruppe mit dem apikalen Oxoliganden interagiert, sowie dem Peptidstickstoff eines Threonins (T84<sub>L</sub>) im Abstand von 3,5 Å. Beide Interaktionen sind hoch konserviert, in den meisten Enzymen findet sich jedoch ein Glycin an Stelle eines Threonins. Glutamin kann in anderen Enzymen gegen Glutamat ausgetauscht sein, bei den AORs fehlt dieser Ligand vollständig.

Wie für den apikalen Liganden selber, ist auch die Funktion des Glutamins bzw. Glutamats nicht geklärt. Mutationen dieser Reste hatten ausschließlich Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit  $k_{\text{cat}}$ . Da dem apikalen Glu/Gln Einfluss auf die Katalyse zugeschrieben wird, ist es erstaunlich, dass dieser Ligand in *dgALO* and *ddALO* fehlt. Im Allgemeinen wird für die AORs und die XORs ein grundlegend ähnlicher Reaktionsmechanismus angenommen. Die Aufgabe des Glu/Gln besteht möglicherweise darin, durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke den apikalen Liganden zu stabilisieren. Da die AORs eine geringe Aktivität sowie eine geringe Substratspezifität aufweisen, könnte dies möglicherweise auf die fehlende Stabilisierung des apikalen Liganden zurückzuführen sein.



**Abbildung 3.16:** Aktive Zentrum der NDH. Das aktive Zentrum wird aus der L- und der M-Untereinheit gebildet. Der allgemeine Aufbau ist innerhalb der XORs sehr ähnlich. An der Katalyse beteiligte Reste sind meist hoch konserviert. Unterschiede treten bei den Resten auf, die bei der Substratbindung beteiligt sind. Die funktionellen Reste sind entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den beiden beteiligten Untereinheiten farblich hervorgehoben (blau= L-Untereinheit, orange= M-Untereinheit).

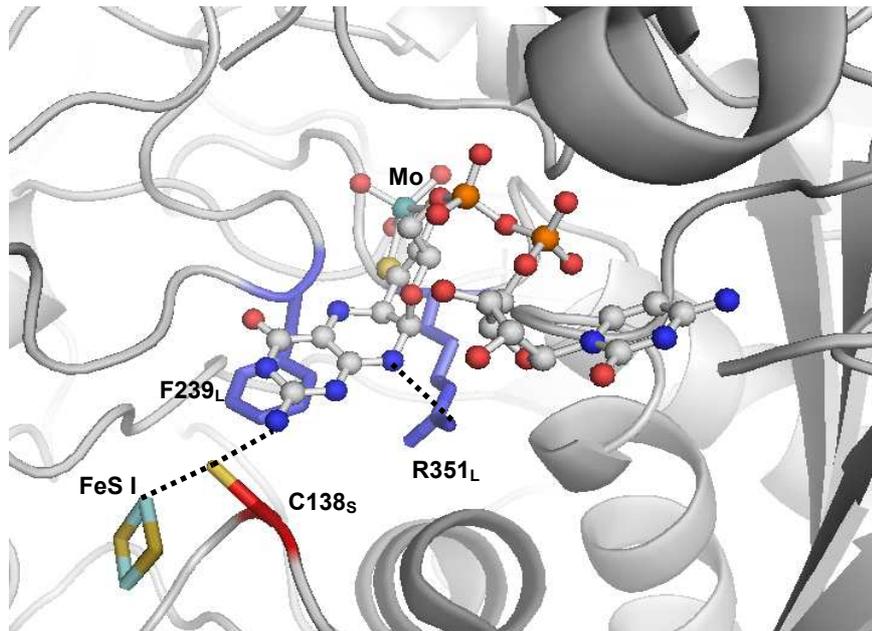
Unterhalb des Molybdän-Kofaktors befindet sich E289<sub>M</sub> (E1261 in *btXOR*). Seine Carboxylgruppe ist koplanar zum Kofaktor und liegt im Interaktionsbereich sowohl zum Hydroxyl-, als auch zum Selenoliganden (2,39 Å bzw. 3,32 Å). Eine Bindung zum Molybdän wurde bisher nicht beschrieben, eine leichte Rotation des Glutamatrestes würde jedoch ausreichen, um eine direkte Bindung zum Molybdän zu erlauben (Hille, 2005). Der Abstand zum Molybdän beträgt für die *ebNDH* 3,06 Å, Beispiele für andere Enzyme sind 4.1 Å für *ppQor*, 3.1 Å für *ocCODH* und 2.7 Å für *rcXDH*. Auch E289<sub>M</sub> ist hoch konserviert, es ist in allen bisher untersuchten Enzymen vorhanden und spielt eine wichtige Rolle im Reaktionsmechanismus. Mutationen zeigten Auswirkungen sowohl auf den  $K_m$ - als auch den  $k_{cat}$ -Wert (Leimkühler, Stockert et al., 2004). Der Beitrag zum  $k_{cat}$ -Wert beruht in seiner

Funktion als generelle Base. E289<sub>M</sub> initiiert den Katalysezyklus, indem es das Proton vom Hydroxyliganden abstrahiert. Auswirkungen auf den  $K_m$ -Wert lassen sich über direkte oder indirekte Interaktionen mit dem Substrat erklären. So besteht die Möglichkeit, dass E289<sub>M</sub> auch mit der Hydroxylgruppe des Y13<sub>M</sub> interagiert und dadurch dessen Interaktion zum Substrat stabilisiert (siehe Abs. 4.5.4). Weiter wurde vermutet, dass das deprotonierte Glutamat an der Stabilisierung des Mo(+VI) Zustandes beteiligt sein könnte (Dobbek, Gremer et al., 2002). Auch der Abstand zum Selen könnte eine Interaktion mit dem Glutamat erlauben. Möglicherweise spielt E289<sub>M</sub> auch bei der Abstraktion des Protons des Selenoliganden eine Rolle.

Unterhalb des Pyrimidinringes befindet sich ein Phenylalanin (F239<sub>L</sub>). Seine aromatische Seitenkette liegt planar in 3,5 Å Abstand zum Carbonylatom (C4) des Kofaktors. Es ist deshalb möglich, dass  $\pi$ - $\pi$  Interaktionen zwischen dem Phenylalanin und dem Kofaktor auftreten. Möglicherweise hat F239<sub>L</sub> die Aufgabe das Pterin zu stabilisieren oder nimmt Einfluss auf dessen Redoxpotential. Wie bereits erwähnt ist nicht bekannt, ob der Molybdopterin-Kofaktor direkt am Elektronentransport beteiligt ist. Die Lage von F239<sub>L</sub> in unmittelbarer Nähe zur vermuteten Austrittsstelle der Elektronen könnte jedoch einen Einfluss auf den Elektronentransport haben. Auch F239<sub>L</sub> scheint bei allen Vertretern der Familie konserviert zu sein, seine Funktion wurde bisher jedoch nicht erklärt.

Zusätzlich bildet (F239<sub>L</sub>) über seinen Amid-Stickstoff eine konservierte Wasserstoffbrücke zum Carbonylatom (C4) des Kofaktors aus. Weiterhin liegt die Peptid-Carbonylgruppe von F239<sub>L</sub>, wie oben erwähnt, im H-Brücken Abstand zum Selenoliganden.

Ein weiterer auffallender Ligand ist ein hoch konserviertes Arginin (R351<sub>L</sub>) unterhalb des Pterinringes. R351<sub>L</sub> ist ein Teil des „*active site loops*“ (siehe Abs. 3.7.2.3). Dieser Rest lag in der Ramachandran-Auftragung in beiden Untereinheiten außerhalb des erlaubten Bereichs, und ließ sich auch durch wiederholte manuelle Positionierung nicht in eine andere Konformation überführen. Da R351<sub>L</sub> keine erkennbaren Interaktionen zu anderen Resten aufweist, scheint seine Konformation durch den „*active site loop*“ vorgegeben zu werden. Die Funktion dieses Restes ist ebenfalls nicht bekannt. Der Abstand der Guanido-Gruppe zum N8 Atom des Pyrazin-Rings beträgt 3,6 Å, der Abstand der  $\epsilon$ -Aminogruppe 4,4 Å. Die Abstände in der *ebNDH* sind damit etwas größer als bei anderen Enzymen.



**Abbildung 3.17:** Interaktionen zum Pterin-Bereich des Molybdopterin-Kofaktors. Auch der Pterin-Teil des Kofaktors interagiert mit konservierten Resten. Ihre Funktionen sind jedoch, genauso wie die des Pterin-Teils selber, weitestgehend ungeklärt.

### 3.7.5 Die Substratbindetasche

Auch die Substratbindetasche enthält mehrere konservierte Reste. Auf Grund der unterschiedlichen Substrate der einzelnen Enzyme treten unter den Resten der Substrattasche allerdings höhere Variationen auf (Abb. 3.13 A). Gleichermaßen kann davon ausgegangen werden, dass ähnliche Reste in diesen Positionen auf eine prinzipiell ähnliche Interaktion der Enzyme mit ihren Substraten hindeuten (Pauff, Zhang et al., 2008).

Arginin (R319<sub>L</sub>) ist wahrscheinlich an der Bindung des Substrats beteiligt und nimmt eine ähnliche Konformation wie in anderen Strukturen ein. Die Struktur der *rcXOR* (Truglio, Theis et al., 2002) komplexiert mit Alloxanthin zeigt die Interaktion des Inhibitors mit Arginin (R310). Sowohl die Guanido als auch die  $\epsilon$ -Aminogruppe bilden Wasserstoffbrücken zur Ketogruppe in Position 6 des Alloxanthin aus. Die Rolle des Arginin scheint neben der Substratbindung auch die Stabilisierung des Übergangszustands zu sein. Es wird angenommen, dass die negative Ladung, die sich auf Grund des nukleophilen Angriffs auf dem Heterozyklus ansammelt, und durch Tautomerisierung auf dem Sauerstoff akkumuliert, durch die positive Ladung des Arginins stabilisiert wird (Pauff, Hemann et al., 2007).

Die Substrattasche besitzt einen hydrophoben Charakter und wird von drei großen aromatischen Resten gesäumt, den beiden Tyrosinen Y13<sub>M</sub> und Y312<sub>L</sub>, sowie einem

Phenylalanin F353<sub>L</sub>. Y13<sub>M</sub> wurde bereits im Zusammenhang mit der Interaktion zu E289<sub>M</sub> erwähnt. Die Hydroxylgruppe des Tyrosins ist zur Substrattasche hin ausgerichtet. Man nimmt an, dass Tyrosin an der Bindung des Substrates bzw. der Stabilisierung des Übergangszustandes beteiligt ist, indem die Hydroxylgruppe mit Heteroatomen des Substrates interagiert. Bei Enzymen, die Aromaten, jedoch keine Heteroaromaten umsetzen, befindet sich in dieser Position häufig ein Phenylalanin. Wahrscheinlich ist dieser Rest an der Ausrichtung des Substrates beteiligt.

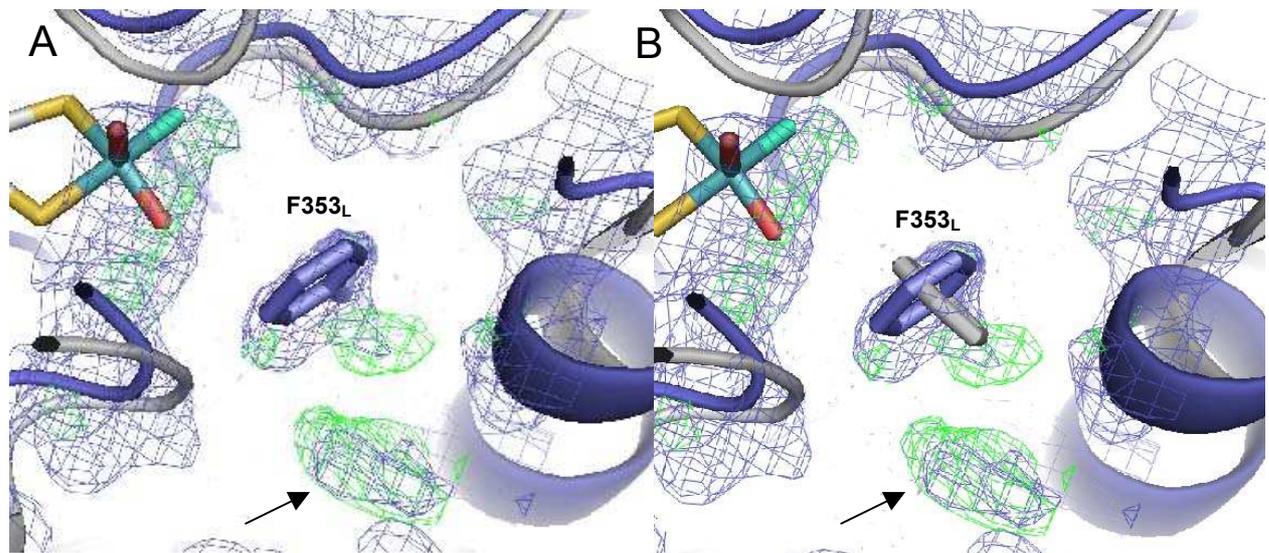
F353<sub>L</sub> hat eine wichtige Aufgabe bei der Bindung und Orientierung des Substrats. Strukturen von Molybdän-Hydroxylasen im Komplex mit (hetero)aromatischen Substraten oder Inhibitoren zeigen eine aromatische Stapelung der hydrophoben Kerne mit denen des Phenylalanins. Es hat damit einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung und die korrekte Orientierung des Substrates. Gelegentlich, wie in einigen AORs, kann Phenylalanin gegen ein Tyrosin ausgetauscht sein.

Das F353<sub>L</sub> in *ebNDH* liegt im Vergleich zu anderen Strukturen in einer ungewöhnlichen Konformation vor. Üblicherweise befindet sich der Ring des Phe/Tyr in einer Art „*edge-on*“ Orientierung relativ zum Molybdän-Kofaktor, wobei der Ring selbst annähernd senkrecht zur äquatorialen Achse des Kofaktors liegt (Abb. 3.18 B). Die Seitengruppe von F353<sub>L</sub> nimmt jedoch eine Orientierung ein, die um 90° gegenüber anderen Strukturen gedreht ist (Abb. 3.18). Dadurch liegt der Ring in einer Art „*side-on*“ Position zum Kofaktor und versperrt den Zugang zum Molybdän nahezu vollständig. F353<sub>L</sub> befand sich in allen ausgewerteten Datensätzen in der gleichen Position und war deutlich schlechter definiert als die umgebenden Reste. Die B-Faktoren der Hauptkette betragen durchschnittlich 27 Å<sup>2</sup>, die des Rings dagegen 72 Å<sup>2</sup>. Dies deutet auf eine hohe Flexibilität dieser Gruppe hin. Verbleibende positive Elektronendichte am Ring des Phenylalanins (grün in Abb. 3.18) lässt auf mindestens eine weitere Konformation schließen. Diese entspräche der Konformation wie sie Phenylalanine in den aktiven Zentren anderer Molybdän Hydroxylasen einnehmen.

Weiterhin befindet sich im aktiven Zentrum eine konservierte Schleife, deren Konsensussequenz *x*AaR*x*sas (a: aromatisch (Phe, Tyr, Trp), s: small (Gly, Ala, Ser), *x* (alle Aminosäuren)) entspricht. An Hand von Sequenzähnlichkeiten zwischen einzelnen Enzymen wurde angenommen, die Molybdän-Hydroxylasen in verschiedene Substrat-Gruppen einteilen zu können (Hänzelmann, Dobbek et al., 2000). Die Schleife sollte demnach an der Spezifität des Enzyms beteiligt oder sogar bestimmend sein (Hänzelmann et al., 2000).

Es sind verschiedene Sequenzen dieser Schleife bekannt. So weisen die Aldehyd-Oxidoreduktasen und Xanthin-Oxidoreduktasen ein AFR-G(F/Y)G Motiv, die 4-

Hydroxybenzoyl-CoA-Reduktase (*ta4*-HBCR) ein AMR-GHG Motiv, die Chinolin-Oxidoreduktase und Nicotin-Dehydrogenasen ein A(Y/F)R-GHG und die CODHs ein ungewöhnliches VAYRCSFR Motiv auf, was bei letzterem auf die Beschaffenheit des aktiven Zentrums, sowie des Substrates zurückzuführen ist. Die Schleife der *eb*NDH hat die Sequenz AFRGFG, die damit mit der Sequenz der Aldehyd-Oxidoreduktasen übereinstimmt. In Hinblick auf den aromatischen Charakter des Nicotinats, sowie der hohen Substratspezifität der NDHs im Allgemeinen und der *eb*NDH im Besonderen, scheint zumindest für die *eb*NDH die Beschaffenheit dieser Schleife nicht entscheidend zu sein für die Substratspezifität.

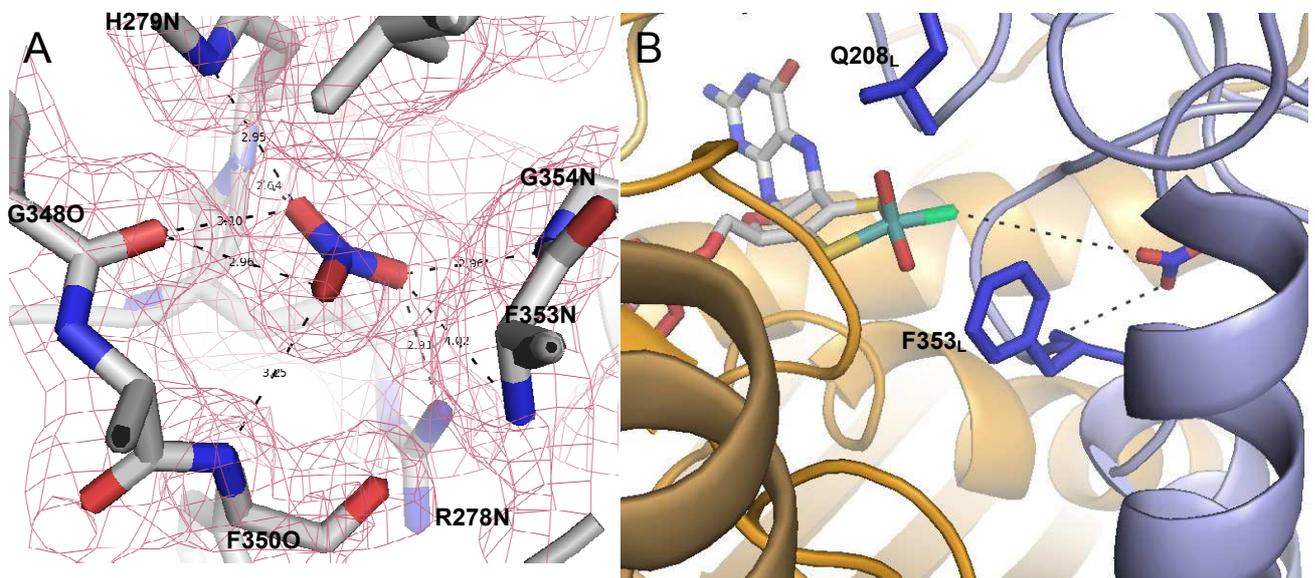


**Abbildung 3.18: Konformation des F353<sub>L</sub> im aktiven Zentrum.** Überlagerung der Strukturen der *eb*NDH (blau) mit *bt*XOR (grau). Aus Gründen der Übersicht wurde das aktive Zentrum als Bändermodell dargestellt. A) Die Elektronendichtekarten  $2 F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  (blau,  $\sigma$ -Level 1) und  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  (grün,  $\sigma$ -Level 3) weisen beide eine positive Elektronendichte seitlich des F353<sub>L</sub> auf. B) Position des F914 in *bt*XOR (grau). Die positive Elektronendichte deckt sich genau mit der Konformation dieses Restes. Weiter unten im Bild ist eine weitere unmodellierete Dichte zu erkennen (Pfeil).

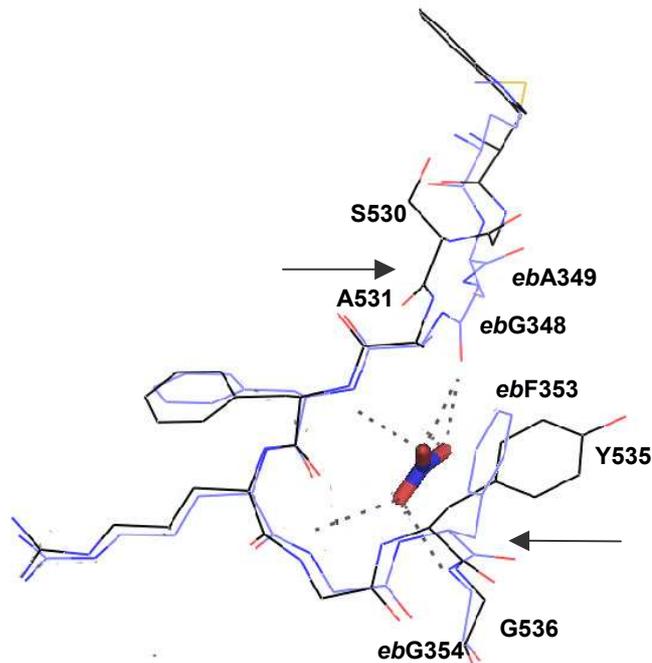
In unmittelbarer Nähe der Substrattasche befindet sich die Bindungsstelle eines Nitrat-Moleküls. Sein Abstand zum Molybdän beträgt 7,8 Å, zum Selen nur 5,4 Å. Das Nitrat ist gut definiert, in der  $2 F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Differenzkarte war es mit 6  $\sigma$  konturiert. Das Nitrat entstammt mit hoher Wahrscheinlichkeit der Kristallisationslösung, die 75 mM Natriumnitrat als Additiv enthielt.

Sechs verschiedene Reste der L-Untereinheit liegen im H-Brücken Abstand zum Nitrat, R278, H279, F350, G354, Q357 und G348, wobei letztere mit seiner Peptid-Oxogruppe nicht in der Lage sein wird, eine solche auszubilden (Abb. 3.19). Die Bindungslängen liegen zwischen

2,64 und 3,25 Å. Das Nitrat bildet eine H-Brücke zum Peptidamid des F353<sub>L</sub> aus. Vergleicht man den Hauptkettenverlauf der *ebNDH* mit dem der *dgAOR* (dem engsten strukturellen Verwandten im Bezug auf das aktive Zentrum) so ist über weite Bereiche ein nahezu identischer Verlauf der beiden Ketten zu erkennen. Dies gilt sowohl für die Orientierung der Seitenketten als auch die Ausrichtung der Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$ . Betrachtet man jedoch die Peptidwinkel der an der Bindung zum Nitrat beteiligten Reste G348<sub>L</sub>, F350<sub>L</sub> und F353<sub>L</sub>, so treten hier deutliche Abweichungen der Winkel des Proteinrückgrads auf (in *dgAOR* bilden die Reste S530 und A531 einen Winkel von 123°; *ebNDH* G348 und A349 - 141°; *dgAOR* Y535 und G536 -129°; *ebNDH* F353 und G354 - 120°), die im Bereich der Reste G348<sub>L</sub> bis F350<sub>L</sub> zu einer deutlichen Verdrehung des Peptidrückgrads führen (Abb. 3.20). Nitrat nimmt in der *ebNDH* die gleiche Position ein, wie Formiat in der *btXO* (Okamoto, Eger et al. 2003), Glycerol in *btXDH* (Enroth, Eger et al., 2000) oder Kalzium in *dgAOR* (Rebelo, Dias et al. 2001). Ungewöhnliche Torsionswinkel treten in diesen Strukturen jedoch nicht auf. Frühere Untersuchungen ließen auf eine Ionenbindestelle nahe des aktiven Zentrums schließen (Gladyshev, Khangulov et al., 1996). Ob es sich dabei um die Nitrat-Bindestelle handelt, ist jedoch unklar. Interessanterweise waren Nitrat, Formiat und Glycerol Bestandteile der in dieser Arbeit gefundenen Kristallisationslösungen (Abs. 3.5).



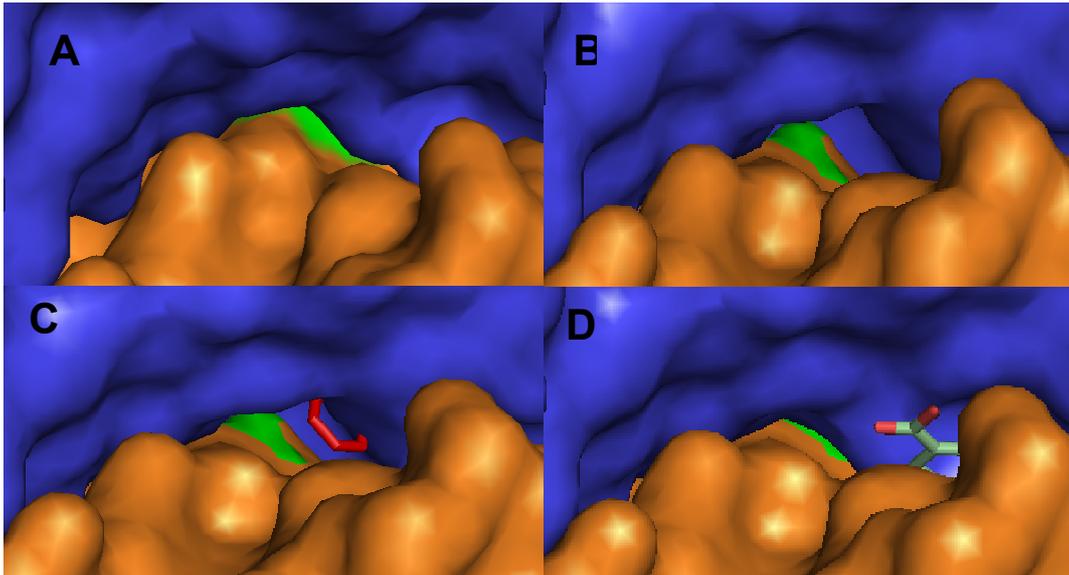
**Abbildung 3.19: Position des Nitrat-Anions.** A) Model und  $2 F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Karte der Nitrat-Umgebung. Die Elektronendichte (rot) ist bei einem  $\sigma$ -Level von 1,5 dargestellt. B) Darstellung des aktiven Zentrums aus der Position des Substratkanals. Die Entfernung zum Selen beträgt 5,4 Å.



**Abbildung 3.20:** Vergleich der Peptidkettenkonformation im Bereich der Nitrat-Bindestelle. Die Peptidkette der *ebNDH* ist in blau, die der *dgAOR* in schwarz dargestellt. Die Pfeile zeigen die voneinander abweichenden Bereiche.

### 3.7.6 Der Substratkanal

Das aktive Zentrum befindet sich unterhalb der Oberfläche eingebettet zwischen der L- und M-Untereinheit. Der Substratkanal hat eine Tiefe von ungefähr 15 Å und eine Weite von 9 Å (Abstände des Peptidrückgrads). Enzyme mit Substraten der gleichen Größenordnung weisen ähnliche Werte auf (Romão, Archer et al. 1995; Bonin, Martins et al., 2004), wohingegen Enzyme mit kleineren Substraten (Dobbek, Gremer et al., 1999) engere Substratkanäle besitzen. Der Eingang des Kanals der *ebNDH* erscheint weit geöffnet, wird jedoch unmittelbar vor dem aktiven Zentrum nahezu vollständig blockiert. Ein Blick in den Substratkanal hinein macht dies deutlich (Abb. 3.21 A). Die Reste, die zu dieser Verengung beitragen sind hauptsächlich F353<sub>L</sub>, in geringerem Ausmaß auch S85<sub>L</sub> und Y312<sub>L</sub>. In Abbildung 3.21 B wurde F353<sub>L</sub>, in Anlehnung an Strukturen anderer Molybdän-Hydroxylasen, um 90° gedreht, was zu einer Öffnung des Kanals führte.



**Abbildung 3.21: Oberflächendarstellung des Substratkanals mit Blick auf das aktive Zentrum.** Die L-Untereinheit ist in blau, M-Untereinheit in orange und die Oberfläche des Moco in grün dargestellt. A) Substratkanal des gereinigten Enzyms, der Kofaktor ist kaum zugänglich, da die Seitenkette des F353<sub>L</sub> weit in das aktive Zentrum hineinreicht. B) F353<sub>L</sub> wurde manuell in eine den anderen XORs ähnliche Konformation gedreht. Der Zugang zum Moco ist deutlich geöffnet. C) Wie in A), nur wurde F353<sub>L</sub> (rot) nicht in die Berechnung der Oberfläche mit einbezogen. D) Position des Nicotinats im Substratkanal (Abs. 3.7.2.6). F353<sub>L</sub> versperrt dem Substratmolekül den Zugang zum aktiven Zentrum.

Der Substratkanal wird von Resten der L- und M-Untereinheit gebildet und hat einen hydrophoben Charakter. Größere aromatische Reste, wie für *dgALO* beschrieben, treten jedoch nicht auf. Es handelt sich hauptsächlich um kleine Reste, wie Leuzine und Isoleuzine, aber auch einige Glycine, Alanin, threonin und Serin. Diese könnten beim Zugang oder Freisetzen des Substrates bzw. Produkts eine Rolle spielen. Für die *dgALO* wurde eine Konformationsänderung verschiedener Reste (Phe425, Phe494, Leu497 and Leu626) angenommen, um den Zugang der verschiedenen Aldehyd-Substrate zu erklären (Romão, Archer et al., 1995). Da im Substratkanal der *ebNDH* ausschließlich kleinere Reste zu finden sind, die auch größeren Molekülen den Zugang gewähren könnten, ist die Substratspezifität dieses Enzym wahrscheinlich nicht ausschließlich auf die Beschaffenheit des Kanals zurückzuführen.

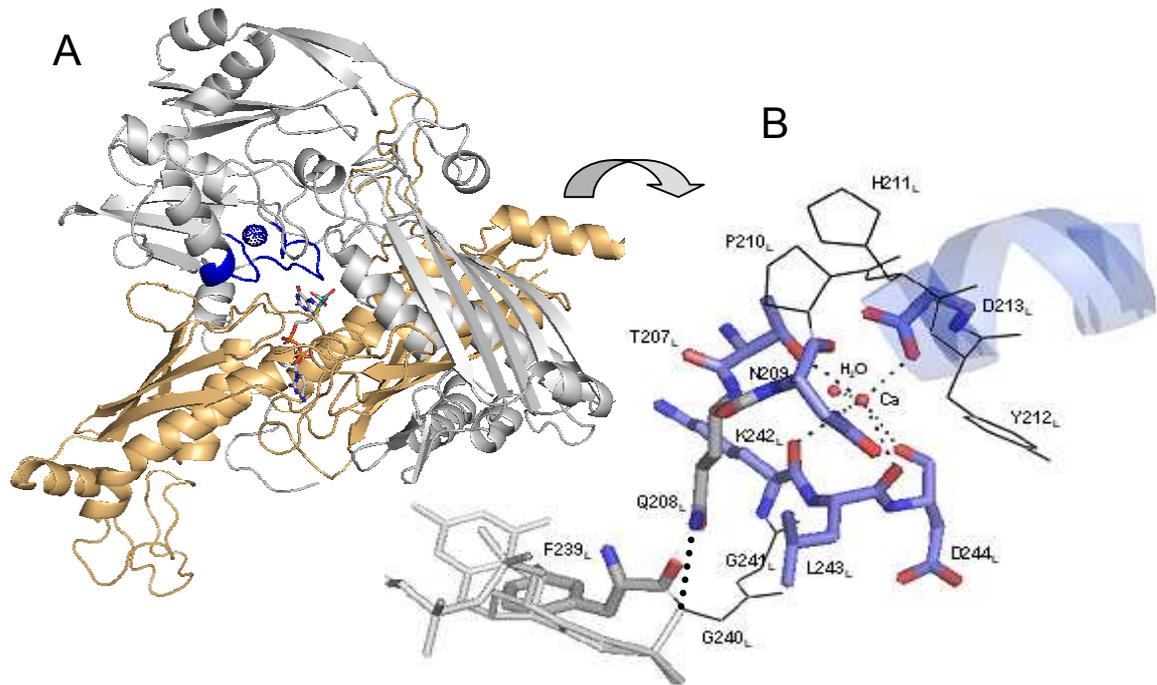
### 3.7.7 Die Kalzium-Bindestelle

Ebenfalls in der Nähe des Aktiven Zentrums, 12 Å vom Molybdän entfernt, befindet sich eine auffallende Ionenbindestelle mit einem  $\sigma$ -Level von 6 (Abb. 3.22). Es handelt sich wahrscheinlich um ein Kalzium-Ion, da eine B-Faktor Verfeinerung mit einem vollständig besetztem Kalzium-Ion den niedrigsten B-Faktor (27,5 Å<sup>2</sup>) ergab.

Das zentrale Kalzium ist von sieben Liganden umgeben, der häufigsten Koordinationszahl von Kalzium-Ionen in Proteinen. Meist handelt es sich um sechs proteinogene Liganden, die siebte Position nimmt, wie auch in diesem Fall, ein Wassermolekül ein. In der *ebNDH* wird Kalzium durch ein apikal gelegenes D<sub>213L</sub>O(2,87), sowie T<sub>207L</sub>O(2,52), N<sub>209L</sub>O(2,68), K<sub>242L</sub>O(2,74), L<sub>243L</sub>O(2,79), D<sub>244L</sub>O(3,07), und H<sub>2</sub>O(2,89) koordiniert. Neben Kalzium ist nur noch Magnesium in der Lage ähnlich hohe Ligandensphären auszubilden. Magnesium kann bis zu sechs proteinogene Liganden koordinieren. Auch die Konformation von Magnesium-bindenden „Loops“ ist denen des Kalziums häufig sehr ähnlich. Daher kann als Alternative Magnesium nicht vollständig ausgeschlossen werden. Gegen Magnesium sprechen jedoch die langen Bindungslängen, die für Magnesium in Proteinen im Durchschnitt zwischen 2,0 und 2,1 Å liegen (Cates, Teodoro et al., 2002), sowie die hohe  $\sigma$ -Dichte. Der Durchschnitt für Bindungslängen von Kalzium-Liganden liegt bei 2,3 bis 2,6 Å.

Ein Vergleich mit anderen Strukturen der XOR-Familie zeigte in äquivalenter Position einen ähnlichen Verlauf der Peptidkette, oft mit einem koordinierten Wasser im Zentrum. Die beteiligten Reste sind denen der *btXDH* sehr ähnlich, andere Strukturen wie *ocCODH* oder *ppQOR* weisen jedoch keine größeren Ähnlichkeiten auf. Eine Ausnahme bildet K<sub>242L</sub> das (außer bei der 4HBCR) hoch konserviert ist. Auch seine Position und Konformation ist in den oben genannten Strukturen nahezu identisch. Die AORs weisen dagegen im Bereich der *ebNDH* Kalzium-Bindestelle eine andere Konformation der Peptidkette auf. Diese Enzyme besitzen allerdings, als einzige Mitglieder der XOR-Familie, kein Glu/Gln in Wechselwirkung mit dem apikalen Oxoliganden.

Ob es sich bei der Kalzium-Bindestelle der *ebNDH* um eine physiologisch relevante Struktur oder um ein Artefakt handelt, lässt sich an Hand der Struktur nur schwer beurteilen. Gegen eine funktionelle Position und für ein Artefakt sprechen die relativ langen Koordinationsbindungen, diese sind in funktionellen Strukturen meist kürzer.



**Abbildung 3.22: Kalzium-Bindestelle.** A) Molybdopterin-bindende Domäne mit Blick auf das aktive Zentrum und die Ionenbindestelle. Das Kalzium-Ion wurde mit seinem van-der-Waals Radius dargestellt. B) Die Abbildung wurde gegenüber A) um 90° gedreht, um die Kalzium-Koordination besser sichtbar zu machen. An der Koordination des Kalziums sind zwei voneinander entfernte Sequenzbereiche beteiligt. An der Koordination beteiligte Reste sind blau, konservierte Reste grau und nicht beteiligte Reste schwarz dargestellt. Sie umgeben das zentrale Ion in der für Kalzium typischen, sieben-zähligen Geometrie. Fünf Liganden, darunter ein Wasser, befinden sich in äquatorialer Position. Das apikale D213<sub>L</sub> ist der einzige Rest, der Teil einer Sekundärstruktur ist.

Die Konformation und die beteiligten Reste ähneln denen einer EF-Hand. Typische Merkmale wie sechs proteinogene Liganden (L6 38%, L7 30%, L9 22%) und die „Turn-Loop“-Struktur sind vorhanden. Auch die sich nahezu gegenüber liegenden Carboxylgruppen von N209<sub>L</sub> und D213<sub>L</sub> sind ein typisches Merkmal. Nach der *acid pair*-Theorie soll diese Konformation kennzeichnend für eine hohe Kalzium-Affinität sein (Wu und Reid, 1997). Das Ion befindet sich leicht oberhalb der Ebene, die durch fünf äquatorialen Liganden (T207<sub>L</sub>, N209<sub>L</sub>, L243<sub>L</sub>, D244<sub>L</sub>, H<sub>2</sub>O) gebildet wird. Zwei weitere Liganden befinden sich in dorsaler (K242<sub>L</sub>) und apikaler Position (D213<sub>L</sub>), wobei es sich beim apikalen Liganden für gewöhnlich um ein Glutamat oder Aspartat handelt. Letztere finden sich oft in sogenannten Magnesium-EF-Händen (Cates, Teodoro et al., 2002). Auch dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass es sich um eine Magnesium und nicht um ein Kalzium-bindende Struktur handeln könnte.

Strukturell ließe sich die Koordinationsstelle der *eb*NDH in den EF-Hand TypII einordnen. Hierbei sind Reste aus zwei entfernten Bereichen der Peptidkette an der Bindungsstelle beteiligt. TypI (der Prototyp aus Parvalbumin oder Calmodulin) zeichnet sich dagegen durch die Beteiligung von 12 aufeinander folgenden Resten und mehreren, teils konservierten Glycin-Resten aus. Diese sind nötig, um die durch die enge Schleifenbildung auftretenden sterischen Hinderungen zu umgehen. Da im Fall der *eb*NDH die Bindestelle von Resten aus weiter entfernten Bereichen gebildet wird sind Torsionen der Peptidkette nicht nötig.

Kalzium hat in Proteinen häufig die Aufgabe, strukturell entfernte Bereiche aneinander anzunähern. In der *eb*NDH wären die Regionen 209<sub>L</sub> bis 213<sub>L</sub> und 242<sub>L</sub> bis 244<sub>L</sub> betroffen. Beide Bereiche enthalten jeweils eine konservierte Aminosäure, Q208<sub>L</sub> und F239<sub>L</sub> (Abb. 3.13, 3.16 und 3.18). Q208<sub>L</sub> liegt direkt zwischen den beiden Kalzium-koordinierenden Resten T207<sub>L</sub> und N209<sub>L</sub>, F239<sub>L</sub> ist nur zwei Reste vom Beginn der Schleife entfernt. Eine dritte Aminosäure L243<sub>L</sub> liegt direkt oberhalb der Substrattasche.

Die Reste des Kalzium-Schleife weisen keine Kontakte zu anderen Aminosäuren auf, die einzige Interaktion untereinander erfolgt durch das Kalzium. Funktionelle Kalzium-„Loops“ halten ihre Konformation meist auch ohne Liganden aufrecht. Trotzdem hat die Bindung des Ions strukturelle Einflüsse. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich bei diesem Kalzium um das von Stadtman vermutete, nahe des aktiven Zentrums gebundenen Ion handeln könnte (Gladyshev, Khangulov et al., 1996).

Neben Kalzium wurden noch weitere Ionen in der Struktur gefunden. Sie wurden als Zink-Ionen modelliert, da Zink wiederholt in NDHs nachgewiesen wurde (Andreesen und Fetzner, 2002) und eine vierzählige Koordinationssphäre aufwies. Sie befanden sich jedoch nicht an Positionen, an denen eine physiologisch wichtige Funktion erkennbar wäre.

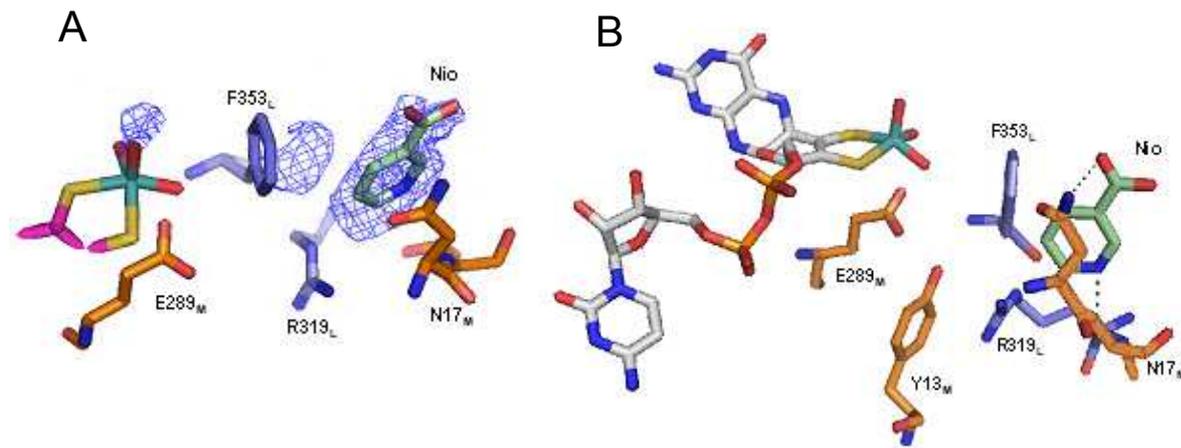
### 3.7.8 Tränken der Kristalle mit Nicotinat

Zum Tränken in substrathaltiger Lösung wurden Kristalle, wie unter 2.4.2 beschrieben, zunächst in Lösungen mit geringerer Nitrat-Konzentration überführt. Auf diese Weise sollte versucht werden, das Nitrat aus dem aktiven Zentrum zu entfernen um einen inhibitorischen Effekt zu vermeiden. Diese Vorgehensweise führte teilweise zur Bildung von kleineren Rissen im Kristall, die auf das Streuverhalten jedoch keinen Einfluss hatten. Das darauffolgende Tränken in Nicotinat-haltiger Mutterlauge hatte keine erkennbaren Effekte.

Das Nitrat-Ion konnte auf diese Weise jedoch nicht aus der Struktur entfernt werden. Tatsächlich hatte das Tränken in Lösung mit geringerer Nitrat-Konzentration keinerlei

Einfluss auf die Besetzungsdichte der Nitrat-Bindestelle. Nitrat scheint demnach relativ fest gebunden zu sein.

In der verfeinerten Struktur konnte ein Nicotinat-Molekül in  $\pi$ - $\pi$ -Interaktion mit einem Tryptophan-Rest nahe der Interaktionsfläche der beiden Protomeren lokalisiert werden. Eine physiologische Bedeutung besteht in dieser Position jedoch nicht.



**Abbildung 3.23: Bindung von Nicotinat im Substratkanal.** A) F353<sub>L</sub>, E289<sub>M</sub> und Y13<sub>M</sub> bilden die Substrattasche, N17<sub>M</sub> das Ende des Substratkanals. Reste der L-Untereinheit sind blau, Reste der M-Untereinheit orange und Nicotinat (Nio) grün dargestellt. Nicotinat ist außerhalb der Substrattasche im Substratkanal gebunden. Die Konformation von F353<sub>L</sub> scheint den Eingang zu blockieren. Die Differenzdichte des Substrats ist blau dargestellt. Die Carboxylatgruppe ist nicht vollständig von Elektronendichte eingeschlossen. Die beiden anderen Dichten können dem Selen (Kofaktor ist in der Oxoform dargestellt) und der alternativen Konformation des F353<sub>L</sub> zugeordnet werden. B) Um die Interaktionen des Nicotinats mit der Peptidkette darzustellen wurde die Ansicht des aktiven Zentrums leicht gedreht.

Eine schwächere, positive Elektronendichte mit einem  $\sigma$ -Level von 4 konnte im Substratkanal von Protomer A gefunden werden (Abb. 3.23). Auch in Protomer B war diese vorhanden, wenn auch weniger gut definiert. Für eine eindeutige Zuordnung war jedoch auch die Dichte aus Protomer nicht ausreichend. Deshalb wurden Verfeinerungen mit Wasser, Nitrat und Nicotinat durchgeführt. Die Verfeinerung des Wassermoleküls ergab eine positive Restdichte, bei der Verfeinerung des Nitrat hingegen war das Stickstoffatom von einer negativen Dichte umgeben.

Nicotinat verfeinerte auf einen R-Faktor von 28 Å<sup>2</sup>. Es entstand jedoch auch um die Carboxylat-Gruppe herum eine negative Dichte. Nach Verringerung des Besetzungsgrad des

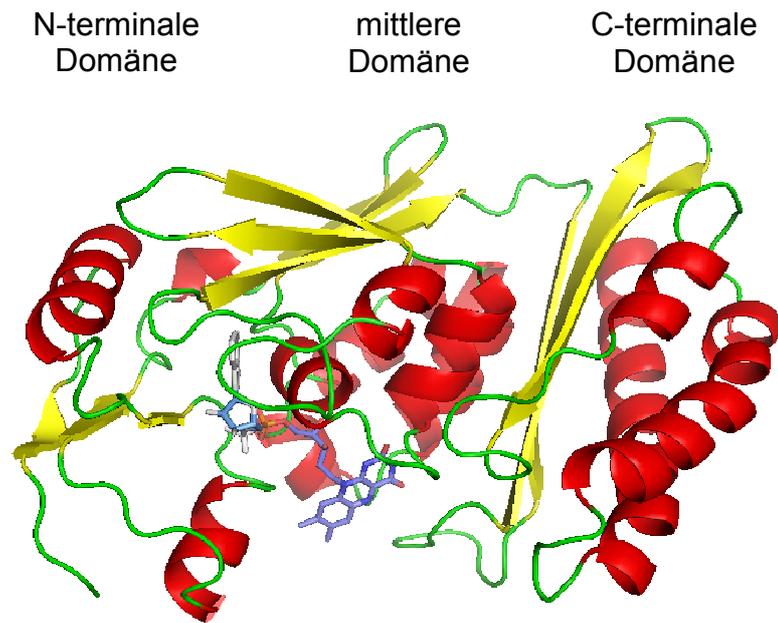
Nicotinats auf 0,8 war keine negative Dichte mehr vorhanden. Zusätzlich wurde Nicotinat in verschiedene Positionen des Kanals positioniert und erneut mit der „*simulated annealing*“-Methode verfeinert. Das Nicotinat-Molekül befand sich daraufhin immer an der gleichen Position.

Letztlich reichen diese Werte jedoch nicht aus, um eindeutig Nicotinat dieser Dichte zuzuordnen. Die Anwesenheit von Nitrat erscheint jedoch unwahrscheinlich, da die Kristalle zuvor in Lösungen mit sinkender Nitrat-Konzentration getränkt wurden. Es könnte sich bei diesem Molekül auch um ein Artefakt der Reinigung handeln, mit einer Komponente der Kristallisationslösung oder der Proteinlösung ist die Morphologie der Elektronendichte allerdings nicht erklärbar.

Betrachtet man die Interaktionen des modellierten Nicotinats, wird dieses über nur zwei Reste, R319<sub>L</sub> und N17<sub>M</sub>, gebunden. Diese offensichtlich recht schwachen Wechselwirkungen könnten die ungenaue Definition erklären. Das Molekül befindet sich nicht in der Substratbindetasche, sondern am Ende des Substratkanals, unmittelbar vor F353<sub>L</sub>. Die Konformation dieses Restes behindert offenbar den Zugang zum aktiven Zentrum. In Abb. 3.21 D wurde die Bindestelle des Nicotinats noch einmal als Oberflächendarstellung gezeigt. Die Position des Nicotinats ist der des Salicylats in *btXOR* sehr ähnlich (Pauff, Zhang et al., 2008) und steht in Wechselwirkung mit Resten des gleichen Sequenzbereichs. Salicylat interagiert jedoch mit seiner Carboxylgruppe mit dem Arginin (R880), wohingegen die Carboxylgruppe des Nicotinats in die entgegengesetzte Richtung gedreht ist.

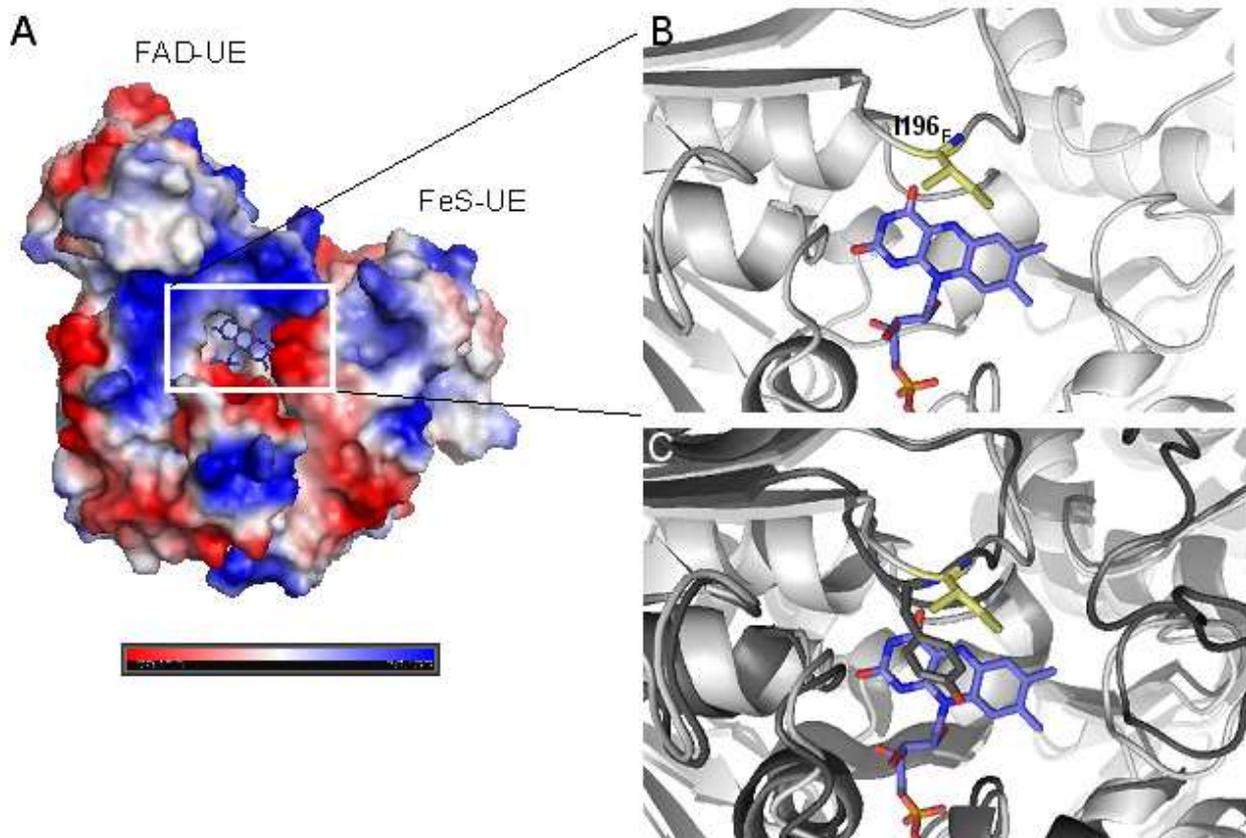
### 3.7.9 Die Flavin-Untereinheit

Die F-Untereinheit umfasst 296 Aminosäuren, ihre Oberfläche beträgt  $13.540 \text{ \AA}^2$  von denen  $1.160 \text{ \AA}^2$  als Interaktionsfläche zur S-Untereinheiten beteiligt sind. Sie unterteilt sich in drei Domänen, die alle aus gemischten  $\alpha/\beta$ -Faltblättern bestehen. Die N-terminale Domäne (1-57) wird aus einem kleinen dreisträngigen parallelen  $\beta$ -Faltblatt gebildet, das von zwei  $\alpha$ -Helices flankiert wird. Die mittlere Domäne (Reste 59-173) besteht aus einem fünfsträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt und sechs kleinen  $\alpha$ -Helices. Die C-terminale Domäne (179-291) schließlich umfasst ein dreisträngiges antiparallele  $\beta$ -Faltblatt und ein Bündel aus drei  $\alpha$ -Helices.



**Abbildung 3.24: Die mittlere oder F-Untereinheit.** Die Untereinheit besteht aus drei Domänen, von denen die N-terminale und mittlere Domäne an der Bindung des FAD (blau) beteiligt sind.

Die F-Untereinheit weist strukturelle Ähnlichkeiten zu einer Gruppe von Oxidoreduktasen auf, die als Vanillyl-Alkohol-Oxidasen (VAO) bezeichnet werden (Fraaije et al., 1998). Der FAD-Kofaktor ist nicht kovalent gebunden, beteiligt an seiner Bindung sind Wasserstoff- und Salzbrücken der N-terminalen und mittleren Domäne. Er liegt in einer Falte, die durch diese beiden Domänen gebildet wird. Die Sequenz der F-Untereinheit enthält zwei konservierte, glycinreiche Bindemotive, AGGTN und TIGGN, die charakteristisch sind für die Familie der Vanillyl-Alkohol-Oxidasen (Fraaije, Van Berkel et al., 1998). Allerdings weicht das erste Motiv der *ebNDH* etwas von der Konsensus AGGHS-Sequenz ab. Die beiden Motive liegen in konservierten „Loop“-Bereichen, die mit der Adenosin-5'-biphosphat Komponente des FAD interagieren. AGGTN bildet eine „P-Loop“-ähnliche Struktur und liegt zwischen einer  $\alpha$ -Helix und einem  $\beta$ -Faltblatt der N-terminalen Domäne. TIGG befindet sich auf einer Helix der mittleren Domäne und interagiert neben dem Pyrophosphat auch mit dem Ribosyl-Bereich. Ein typisches Flavin-Bindemotiv kommt in der *ebNDH*, ebenso wie in den VAOs, nicht vor. Die mit dem FAD interagierenden Reste sind innerhalb der XOR-Familie konserviert und können als sogenannte „fingerprints“ in anderen Flavin-Proteinen vorkommen (Dobbek, Gremer et al., 1999).



**Abbildung 3.25: FAD-Bindetasche.** A) Elektrostatische Oberfläche der F- und S-Untereinheiten. Negativ geladene Reste sind rot, positiv geladene Reste blau und unpolare Reste weiß dargestellt. Der Substratkanal und das aktive Zentrum werden von der Flavin-Untereinheit und der Ferredoxin-ähnlichen Domäne der S-Untereinheit gebildet. Die unmittelbare Umgebung des Isoalloxazin-Ringes ist hydrophob oder unpolar, während die Nukleotid-Binderegion überwiegend positiv oder negativ geladen ist. I196<sub>F</sub> befindet sich als kleiner hydrophober Fortsatz oberhalb der N5-Position des Isoalloxazin-Ringes. B) Vergrößerter Ausschnitt der FAD-Bindestelle. I196<sub>F</sub> ist gelb dargestellt. C) Vergleich der FAD-Bindestelle mit der Struktur der *ocCODH* (dunkelgrau). Das Y193 bedeckt einen großen Teil des Isoalloxazin-Ringes.

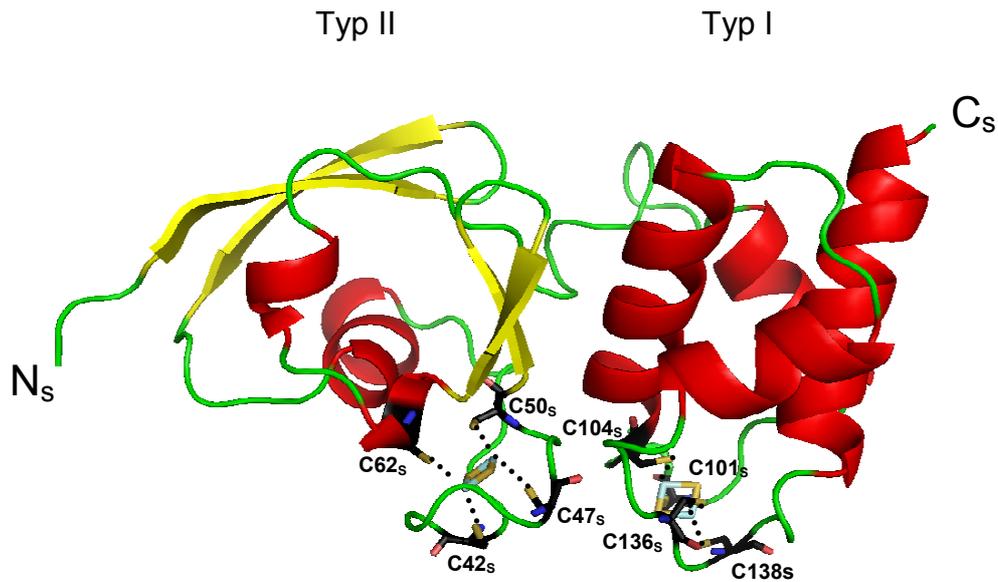
Die C-terminale Domäne ist kaum an der Interaktion zum Flavin beteiligt, sie bildet mit K187<sub>F</sub> und A195<sub>F</sub> zum O4 des Isoalloxazin-Ringes lediglich zwei H-Brücken aus. Ansonsten ist sie mit I196<sub>F</sub> eher an der Abschirmung der N5-Position des Isoalloxazin-Ringes beteiligt (Abb. 3.25). N5 ist die Position an der die Elektronen vom Kofaktor auf das Substrat übertragen werden. Sie muss deshalb gut vom Solvenz abgegrenzt sein.

I196<sub>F</sub> befindet sich auf der „*si-site*“ des FAD (Abb. 3.25 B), es ist in bakteriellen und eukaryotischen XORs konserviert. In anderen Strukturen, wie der *ppQOR* oder der

*oc/hpCODH*, befindet sich in äquivalenter Position ein Tyrosin- oder ein Tryptophan-Rest. In Abbildung 3.25 C ist zu erkennen, dass ein Isoleuzin in dieser Position den Flavin-Ring deutlich weniger abschirmt als ein größerer, hydrophober Rest. Letztere Enzyme sind, im Gegensatz zur *ebNDH* oder den XORs, nicht in der Lage  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$  als Elektronenakzeptoren zu nutzen. Wahrscheinlich verhindern die größeren Reste den Zugang dieser Nukleotide zum aktiven Zentrum. Dies erklärt auch warum der Isoalloxazin-Ring der *ebNDH* deutlich stärker Solvenz exponiert ist als er für andere Strukturen beschrieben wurde. Der Isoalloxazin-Ring liegt eingebettet in einer hydrophoben Grube, die von der F-Untereinheit und der S-Untereinheit gebildet wird (Abb. 3.25). Das aktive Zentrum ist von hydrophoben und unpolaren Resten (weiß) umgeben. Ein erkennbarer Substratkanal für das  $\text{NADP}^+$  ist nicht vorhanden. Zu erkennen ist lediglich eine Vertiefung, an der das Substrat-Nukleotid wahrscheinlich kurzzeitig binden wird. Dieser Bereich wird aus einer halbmondförmigen Fläche positiv (blau) geladener Reste (F-Untereinheit) und am gegenüberliegenden Ende von negativ geladene Resten (F- und S-Untereinheit) gebildet. Ein Nukleotid-Enzym-Komplex konnte bisher für keine der XOR beschrieben werden. Die Bindung des Nukleotids scheint schwach und kurz zu sein. Trotzdem wird es wahrscheinlich vor der Reaktion zu einer optimalen Orientierung des Nukleotids kommen müssen.

### 3.7.10 Die kleine Untereinheit

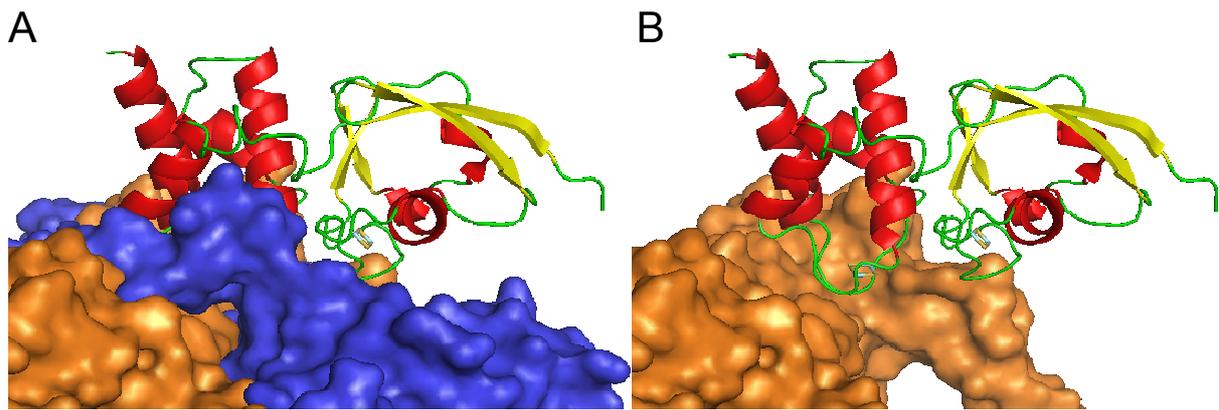
Die kleinste Untereinheit (157 Aminosäuren) bildet zu allen anderen Domänen intensive Kontakte aus (Abb. 3.6, rot). Sie hat eine Oberfläche von  $8.166 \text{ \AA}^2$  und bindet zwei nicht identische Eisen-Schwefel-Zentren durch zwei unterschiedliche Domänen. Die N-terminale Domäne (Reste 1-79) ähnelt dem Pflanzentyp-Ferredoxin (Sticht und Rosch, 1998). Sie bindet das als Typ-II beschriebene  $[2\text{Fe-2S}]$ -Zentrum nahe des FAD. Gemeinsam ist dieser Superfaltung ein Strukturmotiv, das als „*ubiquitin super-fold*“ oder auch als „ *$\beta$ -grasp motif*“ bekannt ist. Es besteht aus einem gemischten viersträngigem  $\beta$ -Faltblatt und einer langen  $\alpha$ -Helix. Der Abstand des  $[2\text{Fe2S}]$ -Zentrums zum Isoalloxazin Ring beträgt  $7,8 \text{ \AA}$ . Cluster II enthält ein  $\text{CX}_4\text{CX}_2\text{CX}_{11}\text{C}$  Bindemotiv und ist deutlich stärker Solvenz exponiert als Cluster I.



**Abbildung 3.26: Die kleine oder S-Untereinheit.** Die kleine Untereinheit bindet die beiden [2Fe2S]-Zentren in jeweils einer Domäne. Die N-terminale Domäne weist strukturelle Ähnlichkeiten zu den pflanzlichen Ferredoxinen auf, während die C-terminale eine ungewöhnliche und für die XORs einzigartige Faltung aufweist.

Die C-terminale Domäne (80-157) weist eine ungewöhnliche Faltung auf, die bisher nur für die Familie der Molybdän-Oxidoreduktasen (Romão, Archer et al., 1995) beschrieben wurde. Sie besteht aus einem Bündel aus vier Helices, die zueinander eine nahezu zweifache Symmetrie aufweisen. Das [2Fe2S]-Zentrum wird über zwei Schleifen koordiniert. Die C-terminale Domäne ist wie ein Stift tief (mehr als 10 Å unterhalb der Oberfläche) zwischen der L- und der M-Untereinheit eingebettet (Abb. 3.27), wobei sie das Cluster I nahe des Molybdän-Kofaktors positioniert. Der Abstand zum Pterin beträgt 7,8 Å. Cluster-I liegt deutlich tiefer unter der Oberfläche als Cluster-II und ist daher weniger zum Solvenz exponiert. Cluster-I weist ein CX<sub>2</sub>CX<sub>3</sub>CXC Bindemotiv auf. In EPR-spektroskopischen Untersuchungen fällt es durch ein ungewöhnliches, breites Signal auf (Nishino and Okamoto 2000). Die Gründe hierfür sind noch nicht geklärt.

Die N-terminale, Ferredoxin-ähnliche Domäne bildet Kontakte zur F-Untereinheit aus und bindet zusammen mit dieser den Isoalloxazin-Ring des FAD. Sie ist mit den Resten E44<sub>s</sub> und E46<sub>s</sub> an der Ausbildung des negativ geladenen Bereichs der NADP<sup>+</sup>-Substrattasche beteiligt (Abb. 3.25).



**Abbildung 3.27: Interaktionen der C-terminalen Domäne der S-Untereinheit.** A) Die Hälfte der C-terminalen Domäne liegt tief eingebettet zwischen der M-Untereinheit (orange) und der N-terminalen Extension der L-Untereinheit (blau). Dadurch positioniert sie das [2Fe2S]-Zentrum (Cluster-I) mehr als 12 Å unterhalb der Proteinoberfläche. L- und M-Untereinheit sind als Oberflächenmodell dargestellt, die S-Untereinheit als Bändermodell. B) Wie in A) ohne die L-Untereinheit.

## 4 Diskussion

### 4.1 Wachstum

Die NDH wurde aus *E. barkeri*-Wildtyp gereinigt, entsprechend war die Ausbeute an Protein sehr gering. Gegen eine heterologe Expression sprachen jedoch zwei Gründe. Einmal enthält die NDH aus *E. barkeri* ein Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid (MCD). Im Gegensatz dazu gehören Enterobakterien wie *E. coli* zu den wenigen Bakterienfamilien, die den Cytosin abhängigen Kofaktor nicht synthetisieren können. Alternativ wäre eine Expression in *Bacillus* oder *Pseudomonas* denkbar gewesen. Andere Molybdän-Hydroxylasen wie die Isoquinolin-1-Oxidoreduktase aus *Brevundimonas diminuta* oder QOR aus *Pseudomonas putida* 86 wurden bereits erfolgreich in *Pseudomonas* exprimiert (Israel, Sohni et al., 2002).

Das weitaus größere Problem stellt wahrscheinlich der Selenoligand da, der bisher nur in den drei anearoben Arten *E. barkeri* (Dilworth, 1982; Schröder, Rienhöfer et al., 1999), *C. purinolyticum* (Self, Wolfe et al., 2003) und *C. acidurici* (Wagner und Andreesen, 1979) beschrieben wurde und über dessen Biosynthese, im Gegensatz zum schwefelhaltigen Kofaktor in *E. coli*, nichts bekannt ist. Sowohl Selenocystein als auch Selenouridin und Derivate werden in allen Organismen ausschließlich über Selenophosphat als Vorstufe synthetisiert. Deshalb kann die Selenophosphat-Synthase als Markerprotein für das Vorhandensein eines Selen-Stoffwechsels herangezogen werden. Der Selen-Stoffwechsel verläuft über Selenophosphat, da das toxische Selen vom Schwefel-Stoffwechsel getrennt werden muss. Sein hohe Toxizität besteht in der kaum vorhandenen Fähigkeit biologischer Systeme zwischen Selen und Schwefel unterscheiden können.

In der Biosynthese des Molybdopterin dient in allen untersuchten Organismen Sulfat als Schwefel-Donor. Entweder sind Organismen wie *E. barkeri* in der Lage, zwischen Selen und Schwefel zu unterscheiden, oder sie verwenden ein Selenophosphat abhängiges System. In beiden Fällen würde sich das Synthese-System von den bisher bekannten unterscheiden. Die Bildung eines selenhaltigen Kofaktors in einem Expressionssystem wie *Pseudomonas* ist daher unwahrscheinlich.

Die Sauerstoffempfindlichkeit des Seleno-Kofaktors könnte ebenfalls zu Problemen bei der Expression in einem aeroben Organismus führen. Eine homologe Expression der *ebNDH* wäre möglicherweise erfolgreich, zumal für einer Reihe anderer Clostridien stabile Shuttle-Vektor Systeme getestet wurden (Bradshawa, Goodnougha et al., 1998). Ob die Expression der NDH in größeren Mengen zu einer Beeinträchtigung des Nukleotid-Stoffwechsels führen würde ist unklar. Da *E. barkeri* auf Grund seiner anaeroben Lebensweise keinen Kynurenin-Weg zur Synthese von Chinolinat besitzt, muss dieses entweder über einen alternativen Weg

synthetisiert werden oder Nicotinamid oder Nicotinat werden als Vorstufen zur Synthese von Nukleotiden herangezogen. Die ungewöhnlich hohe Substratspezifität der NDH könnte bei der Unterscheidung von katabolem Nicotinat-Stoffwechsel und anaboler Nukleotid-Biosynthese eine Rolle spielen.

Wie bereits erwähnt ist es *E. barkeri* möglich, auf Nicotinat-Minimal-Medium auch ohne Zusatz von Nicotinat zu wachsen, letzteres kann daher nicht die alleinige C-, N- und Energie-Quelle sein. Auf den Zusatz von LB-Medium kann hingegen nicht verzichtet werden. Ob die zusätzliche C-Quelle oder eine weitere N-Quelle, ein Vitamin oder ein anderer Bestandteil des LB-Mediums die essentielle Komponente darstellt ist nicht bekannt. Auch andere Vertreter dieser Gattung weisen teils ungewöhnliche Auxotrophien auf. So braucht das verwandte *Eubacterium purinolyticum* Adenin als essentiellen Zusatz obwohl dieser Organismus einen funktionsfähigen Xanthin-Stoffwechsel besitzt (Self, 2002).

Die Lag-Phase der Hauptkultur ist mit fünf Stunden ungewöhnlich lang, oft ein Hinweis darauf, dass das zugegebene Substrat möglicherweise nicht der eigentliche Induktor ist. Nicotinat dient als Vitamin B3 als Baustein für die NAD(P)-Biosynthese. Würden bereits kleine Mengen an Nicotinat die eigene Fermentation induzieren, könnte dies mit dem Grundstoffwechsel interferieren. Deshalb sollte die Grundversorgung mit Nicotinat bevorzugt sein gegenüber seinem Abbau. Dies wird häufig durch eine Art Schwellenregelung erreicht, bei der es erst ab einer bestimmten Konzentration zur Induktion des entsprechenden Stoffwechselweges kommt. Dies wiederum wird dadurch erreicht, dass ein Intermediat, häufig das Produkt der ersten Enzymreaktion, den eigentlichen Induktor darstellt (Induktionstheorie von Hirschberg und Ensign (Hirschberg und Ensign, 1972)). Für die Nicotinat-Fermentation ist bekannt, dass 6-Hydroxynicotinat akkumuliert (Hirschberg und Ensign, 1972). Die meisten Gene werden auch im reprimierten Zustand in geringem Maße abgelesen, um einen Grundlevel aufrecht zu halten. Da die NDH einen relativ hohen  $K_m$ -Wert besitzt, wird sie geringe Mengen Nicotinat kaum oder in sehr geringen Ausmaß verstoffwechseln. Steigt die Nicotinat-Konzentration an, werden größere Mengen 6-Hydroxynicotinat produziert, die dann zur eigentlichen Induktion des Stoffwechselweges führen. Derart regulierte Stoffwechselwege sind durch eine lange Induktionszeit charakterisiert (Tryptophan-Abbau durch mehrere *Bacillus*-Stämme (Crawford, 1975)).

Das Nicotinat-Operon wird über NicR reguliert, der zur LysR-Familie gehört. Vertreter dieser Regulator-Familie regulieren häufig die oben beschriebene Form von Stoffwechselwegen.

Betrachtet man die spezifische Aktivität der *E. barkeri*-Wachstumskurve, so ist innerhalb der ersten vier Stunden keine Expression zu beobachten. Danach steigt die spezifische Aktivität

stark an und erreicht beim Eintritt in die exponentielle Phase beinahe ihr Maximum. Der Expressionslevel der NDH bleibt daraufhin bis zur stationären Phase konstant. Inwieweit die übrigen Enzyme des Operons durch zusätzliche transkriptionale/translationale oder posttranskriptionale/posttranslationale Regulation und damit ihr Expressionslevel beeinflusst werden, ist nicht bekannt. Da sich in der Nicotinat-Fermentation Intermediate anreichern, ist ein Schwanken der Konzentration einiger anderer Enzyme nicht auszuschließen. In der stationären Phase führt der Verbrauch des Nicotinats zu einer schnellen Unterbindung des Weges (Imhoff und Andreesen, 1979).

## 4.2 Reinigung und Aktivität

Genauso wie in früheren Reinigungsversuchen (Holcenberg und Stadtman, 1969; Gladyshev, Khangulov et al., 1994; Gladyshev, Khangulov et al., 1996), zeigte die NDH eine hohe katalytische Instabilität, mit einer Halbwertszeit von 14 h. Durch eine Verkürzung der Reinigungsdauer konnte eine deutliche Verlängerung der Stabilität erreicht werden.

Auch wies das Enzym die in der Literatur beschriebene Empfindlichkeit gegenüber Verdünnung auf. Wurde das Enzym in konzentrierter Form gelagert, blieb für mehrere Tage eine Restaktivität bestehen. Verdünnung führte dagegen schnell zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Möglicherweise hatte auch das Vermeiden der Gelfiltrationssäule in Strategie 3 diesbezüglich eine positive Wirkung.

Der Einsatz einer Hydroxyapatit-Säule scheint ebenfalls zu einer Stabilisierung der NDH geführt zu haben. Hydroxyapatit-Material verliert in geringen Mengen Kalzium, ein Effekt der durch den schwach chelatorischen Tris-Puffer wahrscheinlich noch erhöht wurde. Möglicherweise resultierte die relativ hohe Konzentration an freien Ionen zu einer Einlagerung ins Protein. Auch Phosphat könnte eine stabilisierende Wirkung gehabt haben. Weitere Diskussion zu den möglichen Auswirkungen von Kalzium und Phosphat sind in Absatz 4.5 zu finden.

Ein weiterer Effekt dieser Säule war die Abtrennung von inaktiven und aktiven Enzym. Ein ähnliches Verhalten wurde für die *btXDH* unter Verwendung einer 4B/Folat-Gel Säule beschrieben. Die Kriterien, die zu einer Bindung an Hydroxyapatit-Material führen sind nicht eindeutig geklärt. Vermutet wird das Vorhandensein negativ geladener Sequenzbereiche, gefolgt von basischen Abschnitten, die Bindung an Hydroxyapatit deutlich verbesserte (Goobes, Goobes et al., 2007). Auch Enzyme, die eine Affinität zu biologischen Kalziumkarbonat-Verbindungen aufweisen, scheinen diese Sequenz zu enthalten (Goobes, Goobes et al., 2007). Für das Interaktionsverhalten der NDH bedeutet dies, dass eine

Veränderung des Binde-Motivs beispielsweise durch eine Veränderung der Konformation, die Affinität verringern könnte. Das Fehlen des Selens sollte kaum Einfluss auf die Konformation der NDH haben, das Fehlen des gesamten Kofaktors möglicherweise schon. Allerdings wurde für *ebNDH* nur in geringfügigen Maße eine Substöchiometrie von Molybdän festgestellt (Holcenberg und Stadtman, 1969). Auch eine Veränderung der Konformation der Untereinheiten bzw. der Orientierung der Domänen zueinander könnte ein verändertes Bindeverhalten bewirken.

Zugabe von geringen Mengen an Kalzium zum Lagerpuffer führte zu keiner weiteren Stabilisierung des Enzyms. Wurde Kalzium den Kristallisationsansätzen zugegeben, resultierte dies in einer starken Veränderung der Kristallmorphologie. Dieser Effekt ist für divalente Ionen allerdings nicht ungewöhnlich.

Eine teilweise Inaktivierung der NDH durch die Verwendung der Hydroxyapatit-Säule kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Die Familie der VAO wird durch Phosphat-Konzentrationen höher als 200 mM inaktiviert, da dies zur Destabilisierung und Dissoziation des Flavins führt. Da jedoch keine der Fraktionen ihre Flavin abhängige Oxidase-Aktivität verloren hatte, kann es nicht zu einer Dissoziation des FAD gekommen sein. Hinzu kommt, dass Hydroxyapatit schon früher zur Reinigung der *ebNDH* verwendet wurde (Gladyshev, Khangulov et al., 1996).

### 4.3 Vergleich mit anderen NDHs

Soweit bekannt, ist *ebNDH* die einzige selenhaltige Nicotinat-Hydroxylase. Viele Nicotinat-abbauenden Bakterien sind aerob oder mikroaerophil, entsprechend verlaufen die einzelnen Abbauwege sehr unterschiedlich. Die Hydroxylierung des Nicotinats durch eine Molybdän-Hydroxylase ist jedoch bei allen der erste Schritt.

Die Anzahl der bisher biochemisch charakterisierten NDHs ist gering (Tab. 4.1). Ein direkter Vergleich der Aktivitäten mit der *ebNDH* erweist sich als schwierig. Da nahezu alle Autoren eine hohe Instabilität und Inaktivierung während der Reinigung beschreiben, entsprechen die angegebenen Werte wahrscheinlich nicht den physiologischen Aktivitäten. Die NDH aus *Ralstonia/Burkholderia* DSM6920 weist eine ähnliche Aktivität auf. Allerdings katalysiert die NDH aus *Ralstonia* eine sehr ungewöhnliche C2-Hydroxylierung und nicht die konventionelle C6-Hydroxylierung.

Die einzige NDH, die als stabil und ohne größeren Aktivitätsverlust beschrieben wurde, ist das Enzym aus *Pseudomonas fluorescens* (Hunt, 1959). Ein direkter Vergleich der *ppNDH* Aktivität (600 U/mg) mit der *ebNDH* ist jedoch auch hier nicht möglich, da die *ppNDH*

keine Flavin-Untereinheit, sondern ein membrangebundenes Cytochrom-c enthält. Man nimmt an, dass die Elektronen direkt in die oxische Atmungskette geleitet werden. Auf Grund der elektronischen Verhältnisse innerhalb der Membran unterliegt die *pp*NDH wahrscheinlich vollständig anderen Kriterien als die *eb*NDH. Die *pp*NDH hat eine hohe wirtschaftliche Bedeutung, da sie auf Grund ihrer hohen Stabilität und Aktivität Verwendung bei der industriellen Herstellung von 6-Hydroxynicotinat findet.

**Tabelle 4.1: Eigenschaften anderer Nicotinat-Dehydrogenasen.** Die Werte entsprechen den Literaturangaben nach Beendigung der Reinigung. ZE: Aktivitätsbestimmung des Zellextraktes

Organismus	spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Substrat	Autor
<i>E. barkeri</i>	18 (35)	51	Nicotinat	Stadtman
<i>E. barkeri</i>	*	*	Nicotinat	Andreesen
<i>E. barkeri</i>	21	41	Nicotinat	diese Arbeit
<i>Pseudomonas fluorescense</i>	600	22,5	Nicotinat	Hunt
<i>Pseudomonas ovalis</i>	*	*	Nicotinat	Jones
<i>Rhizobium</i> sp	*	*	Nicotinat	Ludwig
<i>Bacillus niacini</i>	0,54	2,2	Nicotinat	Nagel
<i>Bacillus niacini</i>	0,93	89	Nicotinat	Hirschberg
<i>Burkholderia</i> DSM6920	18,4	27	Nicotinat	Schräder
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	0,4 (ZE)	*	Nicotinat	Ludwig
<i>Mycobacterium</i> sp INA1	5,66	4	2-Hydroxyisonicotinat	Schräder
Nicht charakterisiertes Isolat	*	*	n-Methylisonicotinat	Orpin
<i>Arthrobacter</i> sp	2,16	15	Nicotin	Holmes

#### 4.4 Zyanid-Inhibition

Die *eb*NDH galt bisher als nicht durch Zyanid inhibierbar. Daher wurde vermutet, dass das aktive Zentrum keinen dem Schwefel analogen terminalen Selenoliganden enthält (Gladyshev, Khangulov et al., 1996). Auch in dieser Arbeit konnte „*as isolated*“ Enzym nicht inhibiert werden. Wurde es jedoch vor der Inhibition oxidiert, erfolgte die Aktivitätsabnahme in einem vergleichbaren Zeitraum wie für andere Molybdän-Hydroxylasen beschrieben (Cleere und Coughlan, 1974).

Man nimmt an, dass die Inhibition der XOR durch Zyanid analog zur Cyanolyse von Disulfidbrücken erfolgt. Bei diesem Vorgang handelt es sich um einen Nukleophilen-Angriff

des Zyanids auf den terminalen Sulfoliganden. Für den Übergangszustand eines nukleophilen Angriffs müssen zwei Elektronen auf den Akzeptor übertragen werden, ein Vorgang der der Reaktion mit dem eigentlichen Substrat recht ähnlich ist. Einen weiteren Hinweis darauf liefern Spektren von Zyanid inhibierten XDHs unter anaeroben Bedingungen, die eine deutliche Reduktion des Enzyms zeigten (Massey und Edmondson, 1970). Auf Grund der Absorptionsänderung wurde die Menge an Elektronen auf 1,5-2 geschätzt, was gut mit dem nukleophilen Angriff übereinstimmt.



Da beim gereinigten Enzym das Molybdän jedoch im 5+ Redoxzustand (d.h. halbreduziert) vorliegt, könnte der Transfer von zwei Elektronen erschwert oder ganz verhindert werden. Auch die XDH aus Geflügel-Leber konnte nach Reduktion mit DT nicht inhibiert oder mit CN14 markiert werden (Fridovich und Handler, 1958; Rajagopalan und Handler, 1967). Dagegen wurde die Inhibition der selenhaltigen XDH aus *E. barkeri* erfolgreich durchgeführt. Spätere Untersuchungen ergaben, dass Zyanid auch an Thiologanden des reduzierten Enzyms binden kann. Allerdings kommt es unter reduzierenden Bedingungen nicht zu einer Freisetzung von Thiocyanat und damit nicht zu einer irreversiblen Inhibition. Zugabe oxidativer Reagenzien führte zu einer vollständigen Reaktivierung des Kofaktors (Coughlan, Johnson et al., 1980). Geringe Mengen an oxidativen Spezies in der Proteinlösung, die durch Kontakt zu Sauerstoff während der Reinigung entstanden sind, könnten möglicherweise die Inhibition der *ebNDH* verhindert haben. Abhängig von der Affinität des Zyanids zum Liganden und dem Konzentrations-Verhältnis zum Nicotinat, würde das Ausmaß der Inhibition möglicherweise gering sein und daher unbemerkt bleiben. Die Zugabe geeigneter Oxidantien können die Aufhebung der Inhibition begünstigen (Coughlan, Johnson et al., 1980).

Die Inhibition durch Zyanid während der Katalyse konnte ebenfalls gezeigt werden. Da die NDH während der Katalyse abwechselnd den oxidierten und reduzierten Zustand durchläuft, kam es auch hier zu einer Inhibition. Zusätzlich zeigte dieser Versuch, dass die Aktivitätsabnahme des luftoxidierten Enzyms nicht auf einen Nebeneffekt durch restlichen Sauerstoff zurückgeführt werden kann, da das Enzym bei letzterem Versuch nicht mit diesem in Kontakt gekommen war. Auch für die NDH aus *Pseudomonas* (Hunt, 1959) wurde eine Inhibition während der Katalyse gezeigt.

Da während der vorliegenden Arbeit kein Nachweis von freigesetztem Selenozyanid erfolgte, ist nicht vollständig auszuschließen, dass die Zyanid-Inhibition nicht an einer anderen Stelle des Enzyms auftritt, beispielsweise den [2Fe2S]-Zentren. Verlauf und Geschwindigkeit der Inhibition sind jedoch mit anderen Molybdän-Hydroxylasen vergleichbar.

## 4.5 Struktur

### 4.5.1 Kalzium-Bindestelle

In 12 Å Entfernung zum Molybdän befindet sich eine Kalzium-Bindestelle. Das Ion wird von sieben Liganden koordiniert, bei denen es sich um Proteinreste, Rückgradgruppen und einem Wassermolekül handelt. Ob es sich um eine physiologische Bindestelle oder um ein Artefakt handelt ist nicht klar. Die hohe Konzentration an freien Kalzium-Ionen auf der Hydroxyapatid-Säule könnte zu einer unspezifischen Einlagerung geführt haben. Die erste Koordinationssphäre erfüllt die Eigenschaften einer EF-Hand vom Typ II. Unspezifische Kalzium-Bindung ist in Proteinen jedoch keine Seltenheit, weshalb der Einsatz von Lanthoiden sich einer immer größeren Beliebtheit erfreut. Lanthoide weisen eine dem Kalzium ähnliche Spezifität zu Kalziumbindestellen auf, und werden auf Grund ihrer lumineszierenden, paramagnetischen und hydrolytischen Eigenschaften eingesetzt.

Der Lagerpuffer der NDH enthielt unter anderem 1 mM EDTA. Eine solche Konzentration sollte nicht ausreichend sein, ein Ion aus einem spezifischen Bindemotiv zu entfernen, die Affinität nicht physiologischer Motive ist dagegen meist wesentlich geringer. Der Besetzungsgrad der Kalziumposition scheint in diesem Fall bei nahezu 100% zu liegen. Möglicherweise ein Hinweis darauf, dass dem Ion in dieser Position eine physiologische Rolle zukommt.

Diese könnte darin bestehen, die konservierten Reste F239<sub>L</sub> und Q208<sub>L</sub> optimal auszurichten. Beide befinden sich in unmittelbarer Nähe oder sind Teil der ligierenden Peptidsequenz. Strukturelle Veränderungen dieses Bereichs würden sich wahrscheinlich direkt auf die Position und damit auf die Interaktion mit dem Kofaktor auswirken.

Vergleicht man die Umgebung des Kalzium mit dem entsprechenden Bereich anderer Molybdän-Hydroxylasen fällt auf, dass alle bis auf die AORs einen sehr ähnlichen Verlauf der Haupt- und Seitenketten haben. Oft befindet sich in analoger Position des Kalziums ein Wassermolekül in einer zentralen, hochzähligen Proteinumgebung. Da viele metalbindende Motive ihre Konformation auch ohne das entsprechende Ion aufrecht erhalten können, führt ein Verlust des oder der Zentralatome nicht zwangsläufig zu einer strukturellen Veränderung (Cates, Berry et al., 1999).

Die Nähe eines Ions innerhalb von bis zu 20 Å zu einem redoxaktiven Zentrum kann elektrostatischen Auswirkungen auf dieses haben (Pidcock and Moore 2001). Als „charge balance“ bezeichnet man ein Prinzip, bei dem ein gut neutralisiertes Kation einen senkenden, ein weniger gut neutralisiertes einen erhöhenden Einfluss auf das Redoxpotential hat (Pidcock and Moore 2001). Auch auf Grund von EPR-spektroskopischen Untersuchungen wurde ein Ion in der Nähe des aktiven Zentrums vermutet (Gladyshev, Khangulov et al. 1996), das jedoch nicht weiter charakterisiert werden konnte.

Da nicht bekannt ist, ob es sich um eine physiologische Struktur oder nur um ein Artefakt handelt, kann auch nicht mit Sicherheit gesagt werden ob und welche Auswirkungen das Kalzium auf den Kofaktor haben könnte. Mögliche elektrostatische Auswirkungen könnten auch einen negativen, inhibitorischen Einfluss haben.

Die NDH aus *E. barkeri* reagiert sehr empfindlich auf Verdünnung (Gladyshev, Khangulov et al., 1996). Auch bei anderen NDHs und XORs wurde ein Aktivitätsverlust in Folge geringer Proteinkonzentrationen beschrieben. Ein derartiger Aktivitätsverlust tritt oft bei Ionenbindenden Enzymen auf, da eine hohe Verdünnung zum Verlust dieser Ionen führen kann. [2Fe2S]-Zentren sind im Allgemeinen sehr stabil und auch der Molybdän-Kofaktor sollte fest genug ins Protein eingebunden sein, um bei der vorliegenden inhibitorischen Konzentration (0,1mg NDH/mL), nicht zu dissoziieren. Als weitere Alternativen bleiben daher das Kalzium-Ion und die Zink-Ionen. Letztere scheinen nicht an funktionellen oder strukturellen Positionen zu liegen, d.h. sie sind weder in der Nähe von Kofaktoren, der Substrattasche oder des Substratkanals noch an Interaktionsflächen zwischen den Untereinheiten. Eine Relevanz dieser Ionen lässt sich jedoch nicht mit Sicherheit ausschließen.

Alternativ könnte es auch auf Grund der Verdünnung zu einer Dissoziation von Untereinheiten gekommen sein. Die Morphologie der Interaktionsflächen lassen jedoch auf intensive Wechselwirkungen schließen, die vorliegende Proteinkonzentration sollte daher nicht ausreichend sein, um eine derartige Dissoziation hervorzurufen. Auch wurde ein solches Verhalten ohne die Zugabe chaotroper Reagenzien bisher nicht beschrieben. Denkbar wäre eine teilweise Dissoziation bzw. konformelle Veränderung, die den optimalen Elektronentransport einschränkt oder unterbindet.

Nicht auszuschließen ist die Möglichkeit, dass die Kalziumbindestelle im nativen Protein zur Bindung von Magnesium dient, das auf Grund der hohen Kalzium-Ionen Konzentration auf der Hydroxyapatit-Säule gegen dieses ausgetauscht wurde. Kalzium-bindende Motive wie EF-Hände weisen meist ein Glutamat in apikaler Position auf. Ein Aspartat findet sich dagegen in sogenannten Magnesium-EF-Händen (Cates, Teodoro et al., 2002). Der Austausch

E101D in apikaler Position des *Cyprinus carpio* Parvalbumins (Cates, Berry et al., 1999) führte zu einer 100fachen Affinitätsabnahme für Kalzium, die Dissoziationsrate (off-rate) stieg von 3/sec auf 630/sec. Gleichzeitig stieg die Affinität für Magnesium um das 10fache. Charakteristisch für die Koordination durch Glutamat ist die bidentale Koordination durch die Carboxylatgruppe. Diese geht beim Austausch gegen Aspartat verloren. Dies resultiert in einer durch Magnesium bevorzugten sechszähligen Koordination. Ein fälschlicherweise eingelagertes Kalzium würde gegebenenfalls die fehlende siebte Koordinationsstelle durch ein Wassermolekül sättigen.

#### 4.5.2 Nitrat

F353<sub>L</sub> befindet sich in einer für XORs ungewöhnlichen Position und reicht weit in die Substratbindetasche hinein. Der Zugang zum aktiven Zentrum scheint in Folge dessen nahezu vollständig versperrt zu sein. Strukturelle Erklärungen basierend auf der Peptidsequenz gibt es für diese Konformation nicht. Die allgemeine Geometrie des aktiven Zentrums stimmt weitestgehend mit der anderer Strukturen übereinstimmt (*dgAOR*, *btXDH*). Die einzige erkennbare Interaktion die F353<sub>L</sub> eingeht ist die seiner Peptidgruppe zum Nitrat. Wie in Absatz 3.7.5 beschrieben, scheinen die Rückgrad-Torsionswinkel der unmittelbar an der Bindung beteiligten Reste vom denen anderer Strukturen abzuweichen. Wurde F353<sub>L</sub> manuell in eine Konformation überführt, die denen anderer Strukturen ähnlich ist, führte dies zu einer deutlichen Distanzierung der Peptidbindung F353<sub>L</sub>/G354<sub>L</sub> zum Nitrat.

In anderen Strukturen konnten in gleicher Position Moleküle wie Kalzium, Acetat oder Glycerol gefunden werden. Diese scheinen jedoch alle ein deutlich schwächeres H-Brückennetzwerk auszubilden als Nitrat, eine Veränderung der Geometrie ist in diesen Strukturen nicht zu erkennen.

Untersuchungen der NDH aus *P.fluorescence* ergaben eine inhibitorische Wirkung von Nitrat auf die Nicotinat-Hydroxylase Aktivität (Hurh, Yamane et al., 1994), der zu Grunde liegende Mechanismus wurde jedoch nicht weiter charakterisiert. Möglicherweise wird die inhibitorische Wirkung des Nitrats durch die Konformationsänderung von F353<sub>L</sub> ausgelöst, die Substratmolekülen den Zugang zum aktiven Zentrum erschwert. Die Inhibition durch Nitrat ist nicht vollständig (Hurh, Yamane et al., 1994). Auch die zusätzliche Elektronendichte in Abbildung 3.18 könnte auf eine alternative, offene Konformation und damit eine unvollständige Inhibition hindeuten.

Möglicherweise hat die Abschirmung des aktiven Zentrums durch das F353<sub>L</sub> neben einer Inhibition noch einen weiteren Effekt. Der Selengehalt der Kristalle mit bis zu 80% war

deutlich höher als er nach dem Aktivitätsprofil der (gelösten) Kontrollprobe erwartet wurde. Vielleicht trägt Nitrat, ebenso wie KCl oder Glycerol (Gladyshev, Khangulov et al., 1996), maßgeblich zur Stabilisierung des Enzyms, bzw. des Selenoliganden bei. Auch Glycerol-Moleküle wurden in anderen XORs in der gleichen Position wie Nitrat in der *ebNDH* gefunden. Das F353<sub>L</sub> könnte nicht nur den Zugang von Substrat, sondern auch von Wasser, Sauerstoff oder anderer inhibitorischer Substanzen wie Schwermetalle, beeinträchtigen. In keiner der *ebNDH*-Strukturen konnten im aktiven Zentrum Wassermoleküle gefunden werden. In anderen Strukturen treten dagegen gelegentlich Wassermoleküle auf. Obwohl der allgemeine Charakter des aktiven Zentrums eher hydrophob ist, muss der Zugang von Wasser zur Regeneration des labilen Hydroxyliganden gewährleistet sein. In dieser Hinsicht könnte auch der bei der Hydroxyapatit-Säule verwendete Phosphat-Puffer stabilisierend gewirkt haben. Auf Grund seiner ähnlichen Struktur, ist auch die Bindung eines Phosphat-Moleküls in derselben Position wie des Nitrats denkbar.

Alternativ könnte die Flexibilität von F353<sub>L</sub> wichtig für die Substratbindung sein. Möglicherweise bewirkt nur die Bindung des Substrates eine Konformationsänderung zur offenen Form hin, was als „*Ligand-Gating*“ bezeichnet wird. Auch für die *dgAOR* wurde ein ähnlicher Substratbindemechanismus angenommen (Romão, Archer et al., 1995). An Hand von Isopropanol konnte gezeigt werden, dass Isopropanol zuerst mehrere Prä-Michaelis Komplexe eingeht, bevor es den eigentlichen Enzym-Substrat-Komplex ausbildet. Konformationsänderungen bestimmter Reste (F425, F494, L497 and L626) im Substratkanal sollten ebenfalls als eine Art „*Gating*“-Mechanismus dienen. Auf diesem Mechanismus beruht möglicherweise die hohe Substratspezifität, die für alle NDHs sehr charakteristisch zu sein scheint. Falls es sich um das Molekül in Abbildung 3.23 wirklich um ein Nicotinat-Molekül handeln sollte, hätte dieses allerdings keine Öffnung der Substrattasche bewirkt.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Nitrat einen ähnlichen Einfluss auf die Aktivität der NDHs hat wie Arsenit. Die Struktur der *dgAOR* im Komplex mit Arsenit (Boer, Thapper et al., 2004) zeigte eine direkte Interaktion zum labilen Hydroxyliganden. Denkbar wäre, dass Nitrat auf Grund seiner Ähnlichkeit zum Arsenit auf vergleichbare Weise mit dem Kofaktor interagiert. In den Strukturen der *ebNDH* konnte soweit jedoch keine Elektronendichte nahe des labilen Liganden festgestellt werden.

Um einen Einfluss des Nitrats auf das F353<sub>L</sub> ausschließen zu können, müsste Nitrat vollständig aus dem aktiven Zentrum entfernt werden. Da das Tränken der Kristalle in Lösungen mit geringerer Nitrat-Konzentration keinerlei Auswirkungen auf den Besetzungsgrad des Nitrats hatte, wäre wahrscheinlich die Verwendung einer anderen

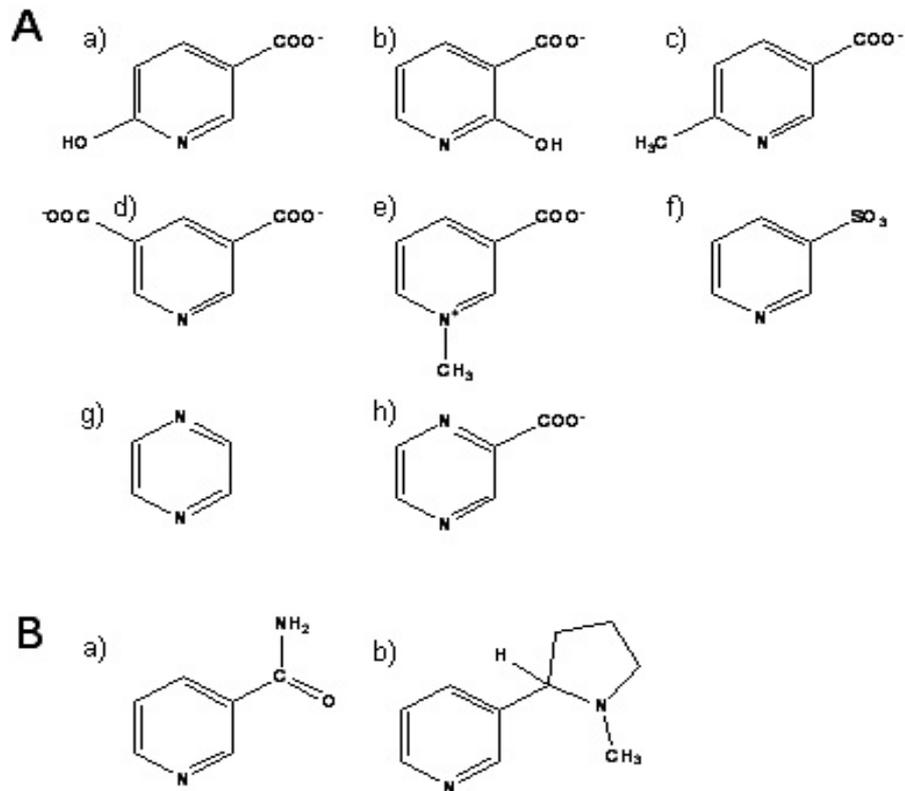
Kristallisationsbedingung nötig. Die beiden Kristallisationslösungen in Tabelle 3.2 enthalten kein Nitrat. Eine Optimierung dieser Bedingungen könnte möglicherweise Hinweise liefern.

### 4.5.3 Substratspezifität

Die hohe strukturelle Ähnlichkeit der Molybdän-Bindedomäne und insbesondere des aktiven Zentrums mit denen der AOR ist unerwartet. Letztere sind für ein breites Substratspektrum bekannt, die NDHs hingegen für ihre ungewöhnlich hohe Spezifität innerhalb der XOR-Gruppe. In *ebNDH* und *dgAOR* ist der „*active-site-Loop*“ identisch, dem ein Einfluss auf die Substratselektion zugeschrieben wurde (Hänzelmann, Dobbek et al., 2000). Es stellt sich die Frage, auf welchen molekularen Mechanismen die Substratspezifität der *ebNDH* beruht. Es wurde bereits angesprochen, dass die fehlende Stabilisierung des apikalen Oxoliganden durch ein Glu/Gln in den AORs zu einer geringen Aktivität und geringen Substratspezifität in dieser Enzym-Familie führt. Diese fehlende Interaktion ist der einzige Unterschied der im Vergleich zur *ebNDH* zu erkennen ist.

Der Substratkanal ist breit und durch kleine und/oder hydrophobe Reste gesäumt, hauptsächlich Leuzine und Isoleuzin aber auch Glycin, Alanin und Serin, die auch in anderen XORs häufig im Substratkanal zu finden sind. Eine Diskriminierung größerer Moleküle oder bestimmter funktioneller Gruppen scheint nicht gegeben.

Basierend auf den Resten des aktiven Zentrums kann die Bindung von Nicotinat gut erklärt werden (Abs. 4.5.4), die schwache Bindung vieler anderer, ähnlicher Verbindungen dagegen nicht. Die Eigenschaften des aktiven Zentrums werden wahrscheinlich zu einer Bevorzugung von heteroaromatischen gegenüber aromatischen oder aliphatischen Verbindungen führen (Abs. 4.5.4), sie erklären jedoch nicht die hohe Selektivität gegenüber Verbindungen ähnlicher Struktur. Die hohe Substratspezifität gilt für Substrate und substratähnliche Inhibitoren gleichermaßen. In Abbildung 4.1 A sind die bekannten Inhibitoren für verschiedene NDHs dargestellt. Für die *ebNDH* zeigt nur 6-Hydroxynicotinat, das physiologische Produkt der NDH, eine effektive inhibitorische Wirkung. Die Inhibition der NDH durch 6-Hydroxynicotinat erfüllt wahrscheinlich eine wichtige Funktion in der Regulation des Stoffwechsels. Da sich 6-Hydroxynicotinat im Medium anreichert, wird ab einer bestimmten Konzentration der weitere Umsatz von Nicotinat verlangsamt.



**Abbildung 4.1: Inhibitoren der NDH und Strukturanaloga des Nicotinat.** A) a) 6-Hydroxynicotinat b) 2-Hydroxynicotinat c) 6-Methylnicotinat d) 3,5-Pyridindicarboxylat e) Trigonellin f) 3-Pyridinsulfonat g) Pyrazin h) 2-Pyrazincarboxylsäure B) a) Nicotinamid b) Nicotin

3-Pyridinsulfonat, 6-Methylnicotinat bzw. 6-Chloronicotinat sind schwache Inhibitoren. Letztere ähneln dem 6-Hydroxynicotinat, scheinen jedoch auf Grund der fehlenden Hydroxylgruppe eine geringere Affinität zum aktiven Zentrum zu haben. Der Austausch der Carboxylgruppe gegen eine Sulfonatgruppe scheint die Interaktion zum R319<sub>L</sub> deutlich zu beeinflussen.

2-Pyrazincarboxylsäure ist dem Nicotinat ebenfalls sehr ähnlich und wird in gleichem Maße umgesetzt. Der zusätzliche Heterostickstoff scheint keine Auswirkungen auf die Funktionalität zu haben. 3,5-Pyridindicarboxylat und Trigonellin werden nur geringfügig hydroxyliert, wahrscheinlich führen die zusätzlichen Liganden zu einer sterischen Behinderung. Die Blockierung des Heterostickstoffs durch eine Methylgruppe scheint dagegen geringere Auswirkungen zu haben als der Austausch der Carboxylgruppe gegen eine Sulfat-Gruppe. Man nimmt an, dass die Interaktion des Heterostickstoffs mit dem Tyrosin zur Stabilisierung des Übergangszustandes und der Orientierung des Substrates dient.

Möglicherweise kann die positive Ladung einen Teil der fehlenden Stabilisierung kompensieren, die fehlende optimale Orientierung des Substrates trägt mit zur Verringerung der Umsatzrate bei. 2-Hydroxynicotinat und Pyrazin wurden nicht getestet.

Leider sind die Wirkungsweisen und Affinitäten aller dieser Inhibitoren kaum untersucht. Inhibitionskonstanten oder Art der Inhibition wurden nicht untersucht. Gründe sind wahrscheinlich die hohen Instabilitäten der Enzyme und die großen Mengen an benötigtem Protein.

Nicotinamid und Nicotin haben keine inhibitorische Wirkung (Abb. 4.1 B), noch werden sie als Substrate umgesetzt. Nicotin ist wahrscheinlich auf Grund der Methyl-Pyrrolidin-Gruppe zu groß für das aktive Zentrum der *ebNDH*. Die Sequenzen der NicotinDHs weichen deutlich von der der *ebNDH* ab (Abb. 3.13). Diese Unterschiede werden besonders deutlich im Bereich des „*active site loops*“. R319<sub>L</sub> ist in den NicotinDHs ausgetauscht gegen Valin oder Alanin, F353<sub>L</sub> gegen Valin oder Prolin und Y13<sub>M</sub> gegen Serin oder Threonin. Insgesamt ergibt sich dadurch eine weitere Substrattasche als es bei *ebNDH* der Fall ist.

Nicotinat und Nicotinamid sind sich dagegen sehr ähnlich. Da auch 3-Pyridinsulfonat eine gewisse Affinität zum aktiven Zentrum aufweist, ist es umso erstaunlicher dass Nicotinamid seinerseits keinerlei Affinität besitzt. Die Unterscheidung der beiden Verbindungen kann nur auf einer veränderten Interaktion mit R319<sub>L</sub> beruhen.

Die Unterscheidung von Nicotinat und Nicotinamid hat wahrscheinlich eine wichtige stoffwechselphysiologische Bedeutung. Nicotinamid dient als Vorstufe in der Biosynthese von Nukleotiden. Es ist somit Bestandteil des anabolen Baustoffwechsels, der grundsätzlich vom katabolen Energiestoffwechsel getrennt werden muss. Überkreuzungen hätten schwerwiegende Auswirkungen auf den Organismus.

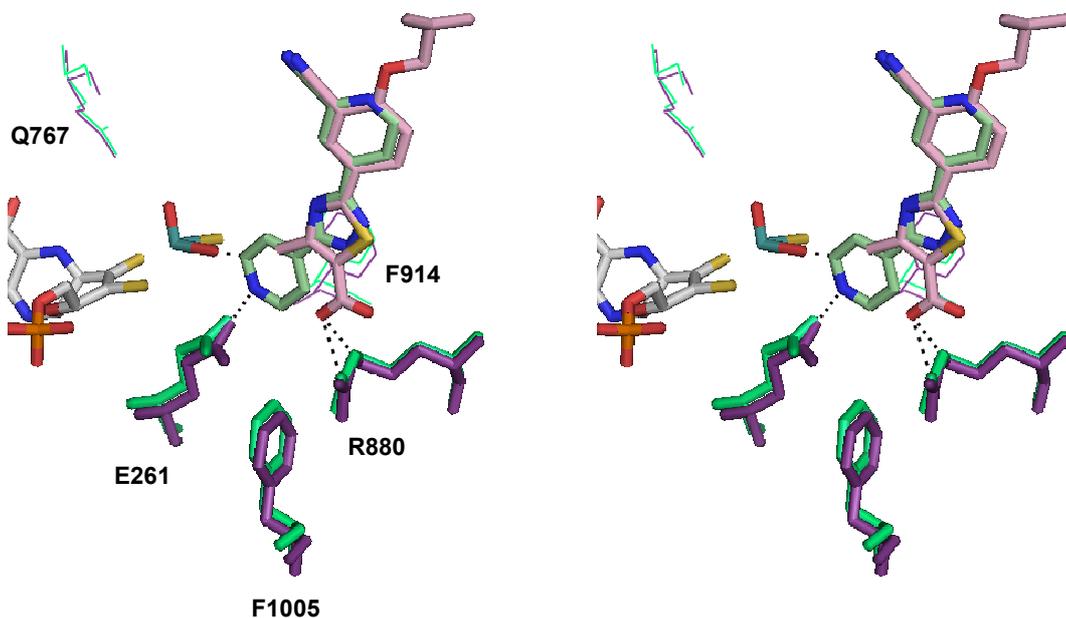
Zusammenfassend liefert die Struktur keine eindeutigen Hinweise, wodurch die hohe Spezifität erreicht wird. Wahrscheinlich ist die Feinabstimmung der Reste mit dem jeweiligen Substrat ausschlaggebend.

#### 4.5.4 Substratbindung

Wie die gesamte Struktur ist auch die Architektur des aktiven Zentrums und der Bindetasche denen anderer XORs, insbesondere den AORs, sehr ähnlich. Der Versuch durch Tränken der Kristalle in Nicotinat-haltiger Lösung einen Michaelis-Komplex mit Nicotinat herzustellen, führte zu einer nicht einwandfrei zuordbaren Differenzelektronendichte im Zugang zur Substrattasche. Sollte es sich hierbei um Nicotinat handeln, so befindet sich dieses in einer für

die Katalyse nicht relevanten Position. Es erscheint möglich, dass die Konformation des F353<sub>L</sub> eine Bindung in der Substrattasche verhindert hat. Möglicherweise handelt es sich um einen Art Prä-Michaelis-Komplex, wie er auch für *dgAOR* beschrieben wurde. Belege hierfür gibt es allerdings nicht.

Auf Grund der hohen Ähnlichkeiten im Substratbindemodus aller bisher untersuchten Strukturen, sollte es möglich sein, den Michaelis-Komplex der *ebNDH* mit Nicotinat zu modellieren.



**Abbildung 4.2:** Überlagerung der *btXDH*-Strukturen im Komplex mit FYX-051 bzw. TEI-6720. An der Substratbindung beteiligte Reste wurden als stick-Modell dargestellt, andere Reste als Drahtmodell. Grün: Struktur im Komplex mit FYX-051; violett: Struktur im Komplex mit TEI-6720.

Als Anhaltspunkt hierfür wurden die Strukturen der *btXO* im Komplex mit den Inhibitoren FYX-051 (grün) und TEI-6720 (violett) verwendet. TEI-6720 (2-(3-Cyano-4-Isobutoxyphenyl)-4-Methyl-5-Thiazolcarboxylsäure) und FYX-051 (4-[5-Pyridin-4-yl-1H-[1,2,4]Triazol-3-yl]Pyridin-2-Carbonitril) sind zwei starke Inhibitoren der XOR (Okamoto, Eger et al., 2003; Okamoto, Matsumoto et al., 2004). Ihre Wirkung ist auf eine Reihe von Interaktionen mit den Resten der Substrattasche und dem Substratkanal zurückzuführen. TEI-6720 hat beispielsweise einen 106-fach höheren *K<sub>i</sub>* Wert als Salicylat (Okamoto, Eger et al., 2003). Beide Verbindungen werden unter anderem über den aromatischen Ring des F914

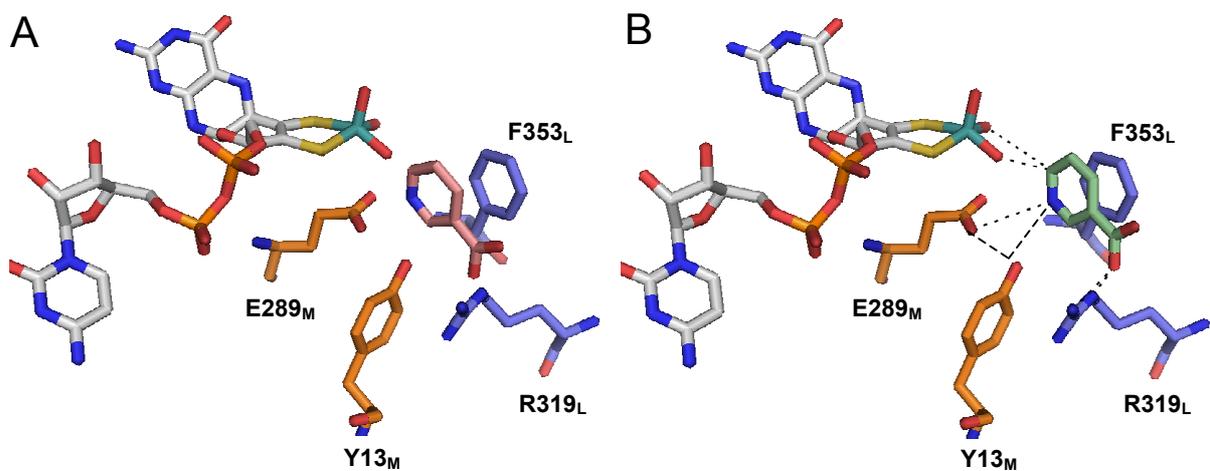
(F353<sub>L</sub> in *ebNDH*) gebunden. FYX-051 interagiert über den Heterostickstoff des Pyrin-Rings mit E261 (E289<sub>M</sub> in *ebNDH*), bei TEI-6720 interagiert die Carboxylgruppe mit R880 (R319<sub>L</sub> in *ebNDH*). Die Carboxylgruppe befindet sich in beinahe der gleichen Position und zeigt das gleiche Bindungsmuster wie die Carboxylatgruppe des Salicylat in der *btXDH*-Struktur (Enroth, Eger et al., 2000). Sie bildet mit der Guanidino-Gruppe des Arg880, sowie mit dem Hydroxylrest und dem Rückgradamid des T1010 (S85<sub>M</sub> in *ebNDH*) eine Wasserstoffbrücke aus. Die Struktur der *rcXDH* in Komplex mit Alloxanthin (Truglio, Theis et al., 2002) zeigt Interaktionen mit den Resten Glu232,730 und Arg310. In der *btXDH* Struktur interagiert der Stickstoff des gebundenen Harnstoffs mit R880. Arginin übernimmt bei beiden die Koordination der Ketogruppe, sowohl über die Guanidino-Gruppe sowie zusätzlich mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe. Wie in Absatz 3.7.5 erwähnt, soll die sich auf der Ketogruppe ansammelnde negative Ladung über die positive Ladung des Arginins resonanz-stabilisiert werden.

Gestützt wird diese Hypothese durch Mutationsstudien des Arginins, die sowohl auf den  $K_m$ -Wert sowie den  $k_{cat}$ -Wert Einfluss hatten. Eine Mutation des Arginin zu Lysin verringerte die Reaktionsrate deutlich, vollständig zum Erliegen kam sie jedoch nicht (Pauff, Hemann et al., 2007). Die Reaktionsgeschwindigkeit ging mit einigen Substraten kaum merklich zurück. Man nimmt an, dass sich an dieser Stelle „gute Substrate“ von den sogenannten „schlechten Substraten“ unterscheiden. Letztere besitzen keine Ketogruppe und werden in ihrer Reaktionsrate kaum von einer Lysin-Mutante beeinflusst, da sie die Resonanzstabilisierung des Arginin ohnehin nicht nutzen können. Purine, die an N3 methyliert sind, können im aktiven Zentrum gebunden werden, werden jedoch nicht umgesetzt und wirken daher ausschließlich als Inhibitoren.

Auch das Nicotinat wird diese Resonanz nicht nutzen können, da sich auf Grund der hohen negativen Dichte in der Carboxylat-Gruppe sowie der  $sp^3$ -Hybridisierung des Carboxylat-Kohlenstoffs keine weitere negative Ladung aus dem Ring auf der Carboxylat-Funktion ansammeln wird. Möglicherweise hat die Interaktion in der NDH für die Carboxylat-Gruppe rein bindenden Charakter.

Überlagert man die beiden Inhibitor-Strukturen wie in Abbildung 4.2, ergibt sich eine dem Nicotinat sehr ähnliche Anordnung. Abbildung 4.3 A zeigt die Bindung von Nicotinat analog zur FYX-051/TEI-6720-Interaktion. Leichte Änderungen wurden an der Konformation der Carboxylatgruppe vorgenommen. Außerdem musste F353<sub>L</sub> in der gleichen Konformation modelliert werden wie F914, um eine geeignete Interaktion mit dem Substrat zu ermöglichen. In Anlehnung zur Struktur der *rcXDH* im Komplex mit Alloxanthin (Truglio, Theis et al., 2002) sollte der aromatische Ring des Nicotinats koplanar zur Seitenkette des Phenylalanins

positioniert sein. Die Position des zu hydroxylierenden Kohlenstoffs befindet sich zwischen der äquatorialen Hydroxylgruppe, und der Sulfogruppe, um einen nukleophilen Angriff der Hydroxylgruppe sowie den Hydridtransfer zu ermöglichen. Die Abstände des modellierten Substrates wurden entsprechend ausgerichtet und stimmen mit denen anderer Strukturen weitestgehend überein. Sie betragen für Se-C<sub>6</sub> 4,04 Å, OH- C<sub>6</sub> 2,35 Å, E289<sub>M</sub>-N<sub>1</sub> 3,07 Å, Y13<sub>M</sub>- N<sub>1</sub> 3,18 Å und R319<sub>L</sub>-Coo 1,9 Å.



**Abbildung 4.3:** Modellierung von Nicotinat ins aktive Zentrum der NDH. A) Position des Nicotinats, die sich aus der Überlagerung der beiden Inhibitoren FYX-051/TEI-6720 ergeben würde B) Möglicher Bindemodus des Nicotinats im aktiven Zentrum. Berücksichtigt wurden die Abstände anderer Strukturen mit ihren jeweiligen Substraten.

(Y13<sub>M</sub>) nimmt in der *eb*NDH die gleiche Position ein wie F1005 in der *bt*XOR. Die Seitenketten dieser Reste stehen senkrecht zum aromatischen Ring des Substrates und nähern sich diesem bis zu 4 Å an. Diese Anordnung führt zu einer energetisch günstigen aromatisch-aromatischen Wechselwirkung, der eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Bindeposition von aromatischen Substraten zugeschrieben wird (Okamoto, Eger et al., 2003). Im Komplex der *bt*XDH mit Salicylat ist diese Interaktion gut zu sehen. Analog dazu wird angenommen, dass die Hydroxylgruppe des Tyrosins ihrerseits zur Stabilisierung von heteroaromatischen Substraten durch eine Interaktion mit dem Heterostickstoff beiträgt. Neben der reinen Bindung des Substrates, könnte auch hier eine Resonanzstabilisierung

hinzukommen oder sogar ausschlaggebend sein. Möglicherweise dient diese Wechselwirkung teilweise als Ausgleich zur fehlenden Stabilisierung einer Ketogruppe durch Arginin.

Auch E261 (E289<sub>L</sub> in *ebNDH*) interagiert mit dem Heteroatom des Pyridinyl-Ringes in FYX-051. Dementsprechend könnte E289<sub>L</sub> auch mit dem Nicotinat interagieren. Wie unter Absatz 3.7.4 erwähnt, zeigten Mutationen dieses Restes Auswirkungen sowohl auf den  $k_{cat}$ - als auch den  $K_m$ -Wert. Die Auswirkungen auf den  $K_m$ -Wert müssen daher auf einer direkten oder indirekten Interaktion mit dem Substrat beruhen. Da sich E289<sub>L</sub> auch in Interaktionsreichweite-H-Brückendistanz (3,45 Å) zu Y13<sub>M</sub> befindet, könnte eine Interaktion zwischen diesen beiden wiederum die Interaktion des Y13<sub>M</sub> zum Nicotinat stabilisieren.

#### 4.5.5 Stabilität des Kofaktors

Die Gründe für die Instabilität des Kofaktors und den damit einhergehenden Aktivitätsverlust sind weiterhin ungeklärt, insbesondere da die Kristalle einen relativ hohen Selengehalt aufwiesen. In Bezug darauf sind Untersuchungen von Gladyshev und Stadtman (Gladyshev, Khangulov et al., 1994) interessant, die eine positive Korrelation des „*very rapid*“ EPR-Signals mit der Nicotinat-Hydroxylase Aktivität nachweisen konnten, jedoch keine zwischen Selenverlust und Aktivitätsabnahme. Aktivitätsabnahme erfolgte auch dann, wenn der proteingebundene Selengehalt konstant blieb. Denkbar wäre, dass der Verlust von Selen nur einer von mehreren Gründen ist, der zur Inaktivierung der *ebNDH* führt.

Möglich wäre, dass der Selenligand auf Grund seiner gesteigerten Aktivität, eine kovalente Bindung eingeht und damit seine Reaktivität verliert. Selen bildet mit Sulfiden bevorzugt Selenenylsulfide, die nur schwer wieder reduziert werden können. Ähnliche Interaktionen wären auch für Sauerstoff oder Schwermetalle denkbar. Die Beobachtung, dass die Zugabe von EDTA die Aktivität der *ebNDH* stabilisiert, könnte ein Hinweis darauf sein, dass inhibitorische Ionen aus der Lösung entfernt werden. Dieser Effekt muss allerdings nicht auf den Molybdän-Kofaktor beschränkt sein, sondern könnte auch die Eisen-Schwefel Zentren oder das Flavin betreffen.

#### 4.5.6 Redoxzustand des Molybdäns

Die Ursache für den ungewöhnliche Mo(+V) Zustand, in dem die *ebNDH* wiederholt gereinigt wurde, ist ebenfalls weiterhin unklar. Der Mo(+V) Zustand ist dahingehend ungewöhnlich, als dass die Redoxpotentiale der übrigen Redoxzentren für gewöhnlich eine sofortige Oxidation des Molybdän-Kofaktors auch ohne terminalen Elektronenakzeptor begünstigen. Die elektronischen Verhältnisse der einzelnen Redoxzentren ( Mo(VI)/Mo(V),-

350±20 mV; Mo(V)/Mo(IV), -362±20 mV; FeS-I<sub>ox.</sub> /FeS-I<sub>red.</sub>, -295±15 mV; FeS-I<sub>ox.</sub>/FeS-I<sub>red.</sub>, -292±15 mV; FAD/FADHt, -359 ± 20 mV; FADH/FADH<sub>2</sub>, -366 ± 20 mV) (Barber, Bray et al., 1976) verhindern im allgemeinen ein Rückfließen von Elektronen auf das Molybdän (Harris, Sanders et al., 1998; Nishino und Okamoto, 2000). Das erste Elektron befindet sich meist auf dem Flavin, kommt ein weiteres hinzu ist dieses über die beiden [2Fe2S]-Zentren verteilt. Da die übrigen Kofaktoren der gereinigten *eb*NDH oxidiert vorliegen, die negative Ladung also am Molybdän lokalisiert ist, scheint ein derartiges Regulierungssystem in der *eb*NDH nicht vorhanden zu sein. Wechselwirkungen mit Aminosäureresten, die eine Stabilisierung dieses Zustandes begünstigen würden, sind nicht zu erkennen.

Ob das Kalzium unter Umständen einen Einfluss auf den Redoxzustand des Kofaktors hat, kann weder bestätigt noch widerlegt werden. Das Kation befindet sich in ungefähr 12 Å Entfernung zum Molybdän, liegt also gut innerhalb der 20 Å, in denen elektrostatische Einflüsse wirksam werden können. Um eine Verteilung von Elektronen zwischen den [2Fe2S]-Zentren und dem Molybdän zu erreichen, müssten sich die Redoxpotentiale der beiden Zentren angleichen. Dies würde wiederum bedeuten, dass entweder das Potential des Molybdäns tiefer als gewöhnlich liegt oder das Potential des FeS-I angehoben ist. Ein gut neutralisiertes Kation hätte tendenziell eine senkende Wirkung auf das Redoxpotential.

Das Standardpotential des Selen liegt mit -0,92V wesentlich tiefer als das des Schwefels mit -0,48V, wodurch es wahrscheinlich ebenfalls eine Erniedrigung des Molybdän-Potentials bewirken wird. Das Vorhandensein von Selen zur Aufrechterhaltung des teilweise reduzierten Zustandes kann jedoch nicht die einzige Erklärung sein, da andere Se-Mo-Hydroxylasen, wie beispielsweise die Se-XDH aus *E. barkeri*, im vollständig oxidierten Zustand gereinigt wurden.

#### 4.6 Reaktionsmechanismus

Der Reaktionsmechanismus der Molybdän-Hydroxylasen wurde ursprünglich an der Struktur der AOR aus *D. gigas* entwickelt (Romão, Archer et al., 1995). Auf Grund des hohen Konservierungsgrades einiger an der Katalyse beteiligter Aminosäuren (E289<sub>M</sub> in allen Molybdän-Hydroxylasen, Q208<sub>L</sub> in allen flavinhaltigen Molybdän-Hydroxylasen), wurde ein grundlegend ähnlicher Mechanismus für alle bisher bekannten Vertreter dieser Familie angenommen. Deshalb wird im Folgenden der Reaktionsverlauf der *eb*NDH analog zum Mechanismus der XOR beschrieben. Es handelt sich um einen Basen assistierten nukleophilen Angriff einer an das Mo(+VI) koordinierten Hydroxylgruppe. Selen übernimmt die Position der terminalen Sulfogruppe. Eine Besonderheit des oxidierten Mo(+VI)

Zustandes ist die Koordination eines reduzierten  $\delta$ -2 Schwefelliganden. Die Mo-4d- und S-3p-Orbitale sind sich energetisch nahe, wodurch die Redoxchemie zwischen den beiden Liganden ermöglicht wird (Laughlin und Young, 1996; Xiao, Bruck et al., 1996).

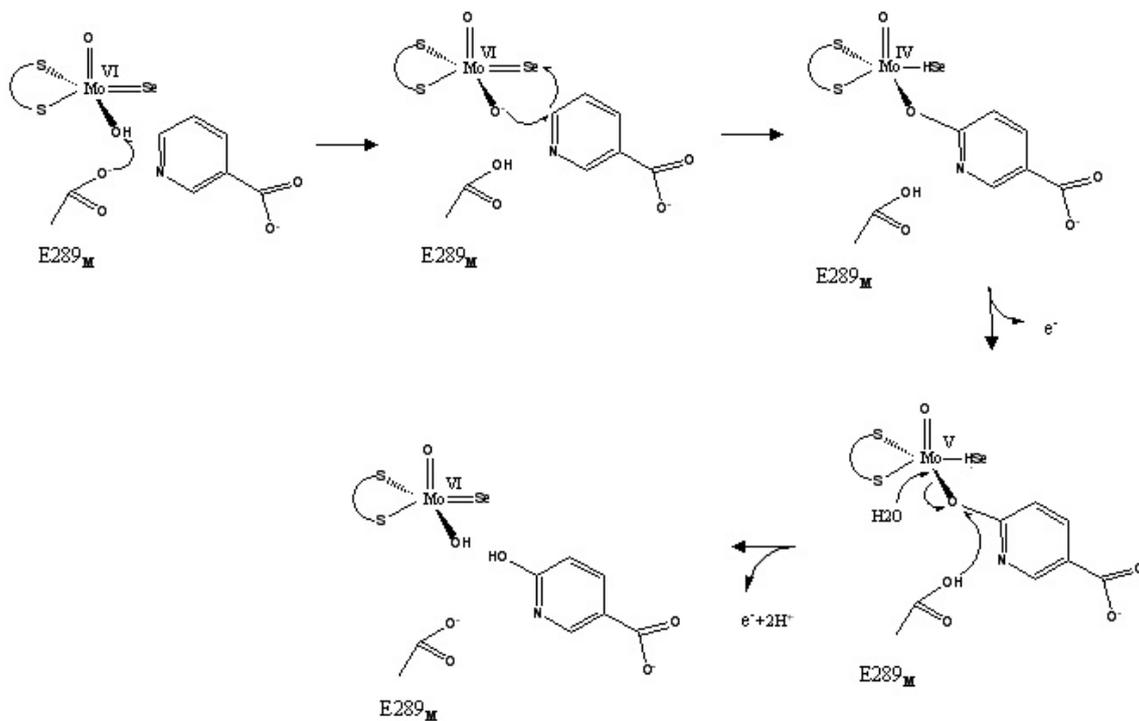
Die Reaktionssequenz beginnt mit der Abstraktion eines Protons vom äquatorialen Hydroxyl-Liganden durch E289<sub>M</sub> (Hille, 2005). Das resultierende, nukleophile Sauerstoff-Anion greift das C6-Atom des Nicotinats an. Gleichzeitig erfolgt ein Hydrid-Transfer vom Substrat auf die Mo=Se Gruppe, der in einer Reduktion des Molybdäns von +6 auf +4 resultiert. Im Übergangszustand befindet sich das zu hydroxylierende C-Atom in einer tetraedrischen Konfiguration (Se-Mo-O<sup>-</sup>...CH). Des weiteren ist dieser Übergangszustand, kurz vor Übertragung des Hydridions, charakterisiert durch eine negative Ladungsansammlung auf dem betreffenden Wasserstoffatom. Diese bewirkt letztlich die Übertragung des Hydrids auf den Akzeptor. Als Zwischenprodukt der Reaktion, am Ende der oxidativen Halbreaktion, ist das Produkt 6-Hydroxynicotinat über das Sauerstoffatom an das Molybdän-Zentrum gebunden. Aus der Selenogruppe ist ein Selenol geworden, das Molybdän ist im Vergleich zum Beginn der Reaktion um zwei Elektronen reduziert (Mo(+IV)-Zustand).

Die reduktive Halbreaktion beginnt mit dem Transfer eines Elektrons auf die Eisen-Schwefel Zentren. Der resultierende Mo(+V) Zustand erzeugt das bereits in der Einleitung erwähnte EPR „*very rapid*“ Signal. Es folgen der Transfer des Protons sowie die Dissoziation des Produktes. Ob das Produkt den Komplex bei Mo(+V) oder Mo(+VI) verlässt, ist abhängig vom Redoxpotential und den Abgangsgruppeneigenschaften der verschiedenen Produkte. Die Deprotonierung geht dem Transfer des zweiten Elektrons direkt voraus, Untersuchungen weisen darauf hin, dass sie den Transfer sogar kontrolliert. Die Elektronen verteilen sich relativ zu den Redoxpotentialen der nachfolgenden Redoxzentren, ein als „*ligand gating*“ bezeichneter Vorgang.

Das Produkt wird von einem Wassermolekül aus dem Solvenz verdrängt, wodurch die labile Hydroxylgruppe regeneriert wird und der Reaktionszyklus beendet ist. Der Vorteil des Wassers als Quelle der Hydroxylgruppe liegt darin, dass das Wasser bereits in reduzierter Form vorliegt.

Der apikale Oxoligand ist nicht an der Reaktion beteiligt, trotzdem wird ihm eine möglicherweise entscheidende Rolle an der Katalyse zugeschrieben. Auf Grund des Verlustes der Hydroxylgruppe im Verlauf der Reaktion steigt die Bindungsordnung des verbleibenden Oxoliganden formel auf drei an. Die freiwerdende Energie stabilisiert den Übergangszustand, für einige Molybdän-Oxo-Komplexe kann sie mehrere dutzend kcal/mol betragen (Rappe and Goddard 1980). Dieser Effekt wird als „*Spectator-Oxo-Effect*“ bezeichnet. Seine Bedeutung

wurde für Katalysatoren in Epoxidationen sowie Chrom- und Molybdän-Komplexen als Katalysatoren in verschiedensten Metathese-Reaktionen gezeigt (Rappe und Goddard, 1980). Er ist am stärksten in Systemen in denen das Molybdän von harten Liganden wie Sauerstoff umgeben ist, in denen die Metal-Liganden Bindung einen hohen ionischen Charakter hat. Im Kofaktor der Molybdän-Hydroxylasen besteht die Liganden-Sphäre des Molybdäns aus deutlich weichen Schwefel- bzw. Selen-Liganden, die den „*Spectator-Oxo-Effect*“ abschwächen würde (Hille, 1996).



**Abbildung 4.4: Reaktionsmechanismus der *eb*NDH.** Der obere Teil repräsentiert die oxidative Halbreaktion, der untere Teil die reduktive Halbreaktion. Der deprotonierte Hydroxyligand greift das Substrat an C6 nukleophil an, gleichzeitig wird ein Hydrid auf die Mo=Se-Gruppe übertragen, wodurch das Mo(+VI) zu Mo(+IV) reduziert wird. Das Produkt ist an das Molybdän über die neu eingefügte OH-Gruppe gebunden. In der reduktiven Hälfte verlassen zwei Elektronen in Einzelschritten den Molybdän-Komplex und ein Proton wird auf das freigesetzte Produkt übertragen, welches wiederum durch ein Wasser-Molekül vom Komplex verdrängt wird.

Zusammenfassend ergeben sich für das Molybdän zwei Aufgaben: die Aktivierung des Liganden, sowie die Aufnahme von zwei Elektronen. Die Molybdän-Hydroxylasen bedienen sich des Prinzips der nukleophilen Addition einer Hydroxylgruppe über ein Metal-aktiviertes Wasser. Auch andere Enzyme setzen die gleiche Strategie für die Katalyse verschiedenster Reaktionen ein. In Kollagenase (und anderen Carboxypeptidasen) erfolgt die Aktivierung des Wassers beispielsweise über ein Zink-Ion. Die Abstraktion des Protons erfolgt auch hier durch ein Glutamat.

Hinzu kommt die Fähigkeit der Molybdän-Hydroxylasen, ein Hydrid zu translokalisieren, wodurch die Stabilität des Übergangszustandes deutlich erhöht wird. Diese Kombination ermöglicht es den Molybdän-Hydroxylasen, in einzigartiger Form eine hetero-aromatische Verbindung zu hydroxylieren. Sie umgehen dabei die Ausbildung einer hochenergetischen oxidierenden Spezies im Übergangszustand, wie es beispielsweise bei Flavoproteinen (Oxianion) oder Hämproteinen (Ferryloxide) der Fall ist. Gleichzeitig werden bei den Molybdän-Hydroxylasen, im Gegensatz zu anderen Reaktionsmechanismen, noch zwei Reduktionsäquivalente gewonnen und nicht verbraucht.

#### 4.7 Einfluss des Selen

Unter Annahme des oben gezeigten Reaktionsmechanismus ist Selen direkt an der Katalyse beteiligt. Es bleibt daher die Frage, welche Auswirkungen der Austausch von Selen gegenüber Schwefel als Hydridakzeptor auf den Verlauf der Reaktion hat.

Der eigentliche Elektronentransfer des übertragenden Hydrids erfolgt in das unbesetzte, antibindende  $\pi$ -Orbital  $\pi^*$  der Mo=Se Gruppe, das am Metal zentriert ist. Die Länge der einzelnen Bindungen spiegelt ihre Stärke wieder. Je stärker stabilisierend die  $\pi$ -Interaktionen sind (Mo=O > Mo=S > Mo=Se), desto höher ist auch die Energie der dazugehörigen antibindenden Orbitale. Folglich ist die Energie-Barriere zur Übertragung eines Elektronenpaares auf die Mo=X Gruppe entsprechend der Reihe Mo=Se < Mo=S < Mo=O erhöht. Dies wiederum bedeutet, dass der Übergangszustand der Oxoform energetisch sehr hoch liegen würde. Auf Grund der daraus resultierenden hohen Aktivierungsenergie ist diese Form inaktiv. Umgekehrt sollte, durch die Schwäche der Selen-Molybdän- $\pi$ -Bindung, der Übergangszustand herabgesetzt und die Reaktionsrate damit erhöht werden. Hierzu durchgeführte HDFT-Berechnungen (HDFT: hybrid density functional theory) (Ibdah und Hille, nicht veröffentlichte Werte) belegen diese Annahme. Sie ergaben eine Stabilisierung der Selenoform gegenüber der Sulfoform um 3.1-3.4 kcal/mol. (Ethylaldehyd ( $\Delta H^\ddagger$  ist 3.47

kcal/mol für Mo=S und 0.13 kcal/mol für Mo=Se); Formamid ( $\Delta H^\ddagger$  ist 14.81 kcal/mol für Mo=S und 11.67 kcal/mol für Mo=Se)). Dies könnte gleichbedeutend sein mit einer Beschleunigung der Reaktion um das 180-290fache. Selen ermöglicht damit eine verbesserte Oxidation des Substrates und bestätigt damit die Eigenschaften katalytisch aktivem Selenocysteins gegenüber Cystein.

Ähnliche Berechnungen wurden für die *bt*XDH mit Tellur als terminalen Liganden durchgeführt (Ilich und Hille, 2002). Hierbei ließ sich der erhöhte Übergangszustand auch durch die Geometrien der einzelnen Komplexe erklären. Die eigentlich planare Geometrie des Übergangszustands ist in der Oxoform deutlich verzerrt. Im Übergangszustand verlängert sich die Mo-X Abstand (X=O,S,Te) umgekehrt reziprok zur Bindungslänge des Grundzustandes. D.h. die Bindung Mo=O ist im Übergangszustand länger als die Mo=S oder die Mo=Te Bindung. Durch die erhöhte Deformation muss die Oxoform eine höhere Energiebarriere überschreiten, um den Übergangspunkt zu erreichen. Entsprechend war für die Telluroform eine geringere Aktivierungsenergie nötig als für die Sulfoform. Den mit Abstand höchsten Übergangszustand wies die Oxoform auf. Diese Berechnungen haben gezeigt, dass Tellur die Reaktionsrate ebenfalls beschleunigen würde. Zusätzlich würde sich für die Telluroform ein breiteres Substratspektrum ergeben. Neben Formamid war in diesen Berechnungen theoretisch auch Thioformamid als Substrat möglich.

Die Oxoform weist noch weitere Unterschiede anderer Bindungslängen auf. So verringert sich die O-H Bindung des Hydroxyliganden der Oxoform gegenüber der O-H Bindung der Sulfoform, wodurch das Proton schlechter abstrahiert werden kann. Dagegen verlängert sich die O-C Bindung im Übergangszustand und die Übertragung des Sauerstoffatoms wird schwieriger.

Die katalytischen Fähigkeiten von selenhaltigen Enzymen sind nachweislich höher als die ihrer cysteinhaltigen Orthologen. Zum Beispiel haben Sec-haltige Formiat-DHs eine höhere katalytische Aktivität als Cystein-haltige Formiat-DHs (Axley, Bock et al., 1991).

Ein eindrucksvolles Beispiel für eine erhöhte katalytische Aktivität liefern die in allen Organismenreichen vertretenen Methionin-R-Sulfoxid-Reduktasen (Kim und Gladyshev, 2005). Diese kommen nur in Säugetieren in verschiedenen Isoformen, MsrB1, MsrB2, und MsrB3, vor. Alle katalysieren sie die Reduktion von freien oder proteingebundenen Methionin-Sulfoxiden unter Rückbildung der natürlichen Methionin-Seitenkette in Anwesenheit von Thioredoxin (Trx) (Weissbach, Etienne et al., 2002). Sie werden deshalb als ein wichtiger Bestandteil im Reparaturweg von Proteinen unter oxidischem Stress, für Proteinregulation und Verzögerung von Alterungsprozessen angesehen (Moskovitz, 2005;

Petropoulos und Friguet, 2005; Stadtman, Van Remmen et al., 2005; Weissbach, Resnick et al., 2005). Während es sich bei MrsB2 und MrsB3 um cysteinhaltige Formen handelt, enthält MrsB1 Selen in Form von Selenocystein. Beide Isoformen weisen eine annähernd gleiche Aktivität auf, allerdings erreichen MrsB2 und 3 dies nur, indem sie zusätzlich zum redoxaktiven Cystein noch drei weitere konservierte Reste (His, Val oder Ile, Asn) besitzen, die zusammen wahrscheinlich ähnlich einer katalytischen Triade agieren (Lowther, Weissbach et al., 2002). Die Mutation einer oder mehrere dieser Reste führt zu einem Aktivitätsverlust bis zu einem Faktor von 1000. Die Sec-haltige Isoform hingegen benötigt diese Reste nicht. Mutiert man hier das Sec zu Cystein, zeigt auch sie eine 1000-fach niedrigere Aktivität. Resultierend daraus ist der katalytische Mechanismus dieser beiden Isoformen unterschiedlich.

Die Autoren interpretieren ihre Ergebnisse dementsprechend, dass Selen in biologischen Prozessen zur Beschleunigung von katalytischen Prozessen verwendet wird, aber nicht zwangsläufig notwendig ist. Hinzu kommt, dass ein Selenoprotein auf Grund des niedrigeren Redoxpotentials, wesentlich schlechter wieder rückreduziert werden kann. Die Selensulfid-Bindung hat ein sehr negatives Redoxpotential im Vergleich zum Disulfid. Selenenylsulfid ist bekannt für sein niedriges Redoxpotential (Besse, Siedler et al., 1997), das des Diselenids ist sogar noch niedriger. Dies ist wahrscheinlich der Grund warum eine Diselenid-Gruppe noch nie in Proteinen gefunden wurde. Die Verwendung von Sec ist ein Kompromiß zwischen effektiverer Katalyse und erschwerter Regeneration. Die Selenoform braucht zur Regeneration einen zusätzlichen Cysteinrest, um eine Rückreduktion zu ermöglichen. Derartige Proteine haben gegenüber ihren cysteinhaltigen Homologen eine Präferenz zu Trx oder anderen Reduktionsmitteln mit geeignetem Redoxpotential. Gleichzeitig ermöglicht die Verwendung eines anderen Kosubstrates eine unabhängige Regulation.

Neben der erhöhten Katalysegeschwindigkeit kann noch eine Erweiterung oder Veränderung der Funktionalität hinzukommen. So führte der Austausch eines Cysteins gegen ein Selenocystein in Subtilisin dazu, dass das Enzym seine Protease-Funktion verlor und zu einer effizienten Peroxidase wurde (Bell, Fisher et al., 1993).

Beispiele einiger Oxidoreduktasen wie Gutathion-Peroxidase oder Thioredoxin-Reduktase zeigen, dass deren natürlichen Sec-Homologe eine 100-1000fache höhere Aktivität aufweisen, als ihre schwefelhaltigen Verwandten. Diese hohe Aktivität wurde auch hier als Schlüsseleigenschaft genannt, warum Sec in biologischen Systemen genutzt wird (Stadtman, 1996; Jacob, Giles et al., 2003). Die Aktivität einer pflanzlichen Phospholipid-Hydroperoxid

Glutathion-Peroxidase konnte durch den Austausch eines Sec gegen ein Cysteins erhöht werden (Hazebrouck, Camoin et al., 2000).

Auch für die Se-XDH aus *E. barkeri* wurde eine erhöhte Reaktivität im Vergleich zu anderen XDHs beschrieben (Schräder, Rienhöfer et al., 1999). Es wurde angenommen, dass die Aktivität der Se-*eb*XDH um mindestens das 10-fache höher ist als die anderer XDHs.

Eine weitere Selenocystein abhängigen Molybdän-Hydroxylase aus *Desulfococcus multivorans* wurde beschrieben, die in der Lage ist Benzoat unter anaeroben Bedingungen zu hydroxylieren und damit den Abbau dieser Substanz unter anaeroben Bedingungen möglich macht. Üblicherweise werden Aromaten wie Benzoat unter anaeroben Bedingungen über Benzoyl-CoA abgebaut. Für die Übertragung auf CoA ist mindestens ein ATP nötig, ein weiteres wird bei der Spaltung des aromatischen Ringes verbraucht. Eine oxidative Hydroxylierung würde diese energieverbrauchenden Schritte umgehen. Die Autoren vermuten, dass durch den selenhaltigen Kofaktor eine erhöhte Reaktivität erreicht wird. Es wäre damit das erste Molybdän-haltige Enzym, das zur Oxidation einer aromatischen Verbindung in der Lage wäre. Die genaue Charakterisierung dieses Enzyms steht jedoch noch aus.

#### 4.8 Bedeutung für den Organismus

Man geht davon aus, dass sich die Selenoproteine ursprünglich aus schwefelhaltigen Homologen entwickelt haben (Kim und Gladyshev, 2005), während heute ein dynamischer Wechsel zwischen Cystein- und Selenocysteinformen stattfindet. Die geringe Verfügbarkeit von Selenverbindungen unter reduzierenden Bedingungen sprechen gegen eine frühe Entwicklung selenhaltiger Proteine. Viele dieser Verbindungen wurden infolge der raschen Oxidation der Erdatmosphäre zugänglich, in deren Verlauf es wahrscheinlich recht schnell zur Entwicklung erster selenhaltiger Enzyme kam. Da alle drei Organismenreiche dieselben Mechanismen zur Aktivierung von Selen besitzen, datiert seine Entstehung sehr wahrscheinlich noch vor der Trennung der einzelnen Reiche.

Eine auffallend hohe Anzahl von Selenoenzymen ist an der Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies und Reparatur sauerstoffbedingter Schäden beteiligt. Da die meisten dieser Reaktionen auch von schwefelhaltigen Enzymen katalysiert werden können, scheint die erhöhte Reaktionsrate von Sec-Enzymen ein wichtiger Faktor zu sein. Gerade viele oxidative Schäden benötigen eine schnelle Reparatur, um weitere Folgeschäden zu verhindern.

Dagegen sind alle Molybdoenzyme mit Selen als endständigem Liganden, soweit bisher beschrieben, Enzyme aus strikt anaeroben Organismen. Die hohe Sauerstoffinstabilität des Se-Mo-Kofaktors macht die Verwendung unter oxidischen Bedingungen möglicherweise

schwierig. Auch Selenocystein ist deutlich sauerstoffempfindlicher als Cystein. Sec-haltige FDHs zeigten eine deutlich erhöhte Inaktivierung als ihre cysteinhaltigen Homologen (Axley, Bock et al., 1991). Aerobe Organismen müssen die Vorteile einer verbesserten Katalyse gegen die Nachteile einer erhöhten Instabilität abwägen (Kim und Gladyshev, 2005). Eine derartige Notwendigkeit besteht bei anaeroben Organismen dagegen nicht.

Auffallend ist, dass sowohl *C. purinolyticum* als auch *E. barkeri* gleich mehrere Se-Mo-Enzyme besitzen, ungeachtet der Seltenheit dieses Kofaktors. Große Selenoproteome treten im Allgemeinen in selenreichen Ökosystemen auf. Es gibt jedoch keine Hinweise dass *C. purinolyticum* und *E. barkeri* bevorzugt in selenreichen Lebensräumen auftreten. Da auch *C. acidurici* und *C. cylindrosporum* in enger Verwandtschaft zu den anderen beiden Organismen stehen, scheint es zur Entwicklung einer bisher einzigartigen Eigenschaft innerhalb dieser Gruppe gekommen zu sein, die die Nutzung eines Se-Mo-Kofaktors ermöglicht.

Schwefelhaltige Isoformen sind für die beschriebenen Se-Molybdoproteine in den jeweiligen vier Organismen nicht bekannt. *E. barkeri* ist daher von der Verfügbarkeit größerer Mengen Selens abhängig (Imhoff und Andreesen, 1979). Da für die meisten Organismen Selen ein Spurenelement ist, ist die Zugabe von Selen nicht notwendig und resultiert meist nicht in einer erhöhten Wachstumsrate. Die geringe Verfügbarkeit von Selenverbindungen unter anaeroben Bedingungen stellt die betreffenden Organismen möglicherweise vor Probleme.

Eine Notwendigkeit von Selen bei der Umsetzung von Nicotinat besteht nicht. Viele andere Organismen hydroxylieren Nicotinat zu 6-Hydroxynicotinat durch schwefelhaltige NDHs. Alle diese Organismen besitzen jedoch Atmungsketten auf aerober oder anaerober Basis. *E. barkeri* ist der einzige fermentative Nicotinat-Verwerter. Möglicherweise ergibt sich hieraus die Notwendigkeit, eine erhöhte katalytische Umsatzrate zu erzielen. *E. barkeri* kann aus einem Molekül Nicotinat nur ein Molekül ATP erzeugen, eine Atmungskette dagegen ermöglicht es Organismen, einen deutlich höheren Energiegewinn zu erzielen. Eine geringe ATP-Versorgung der Zelle resultiert zwangsläufig in einem sehr langsamen Zellwachstum. Die Erhöhung des Stoffumsatzes würde der Zelle mehr ATP zur Verfügung stellen.

Dagegen spricht jedoch, dass sich selen- und schwefelhaltige NDHs, abgesehen von der *pf*NDH, in ihren katalytischen Eigenschaften kaum zu unterscheiden scheinen (Tab. 4.1). Ein Vergleich der Aktivitäten ist jedoch auf Grund der hohen Instabilität vieler NDHs schwierig, da bei den meisten dieser Enzyme die Maximalaktivitäten wahrscheinlich nicht bekannt sind. Denkbar wäre auch, dass schwefelhaltigen NDHs durch Variationen des aktiven Zentrums, ähnlich der der MrsB-Isoformen, eine *eb*NDH ähnliche Aktivität erreichen. Aerob und

microaerophil lebende Organismen könnten auf diese Weise den sauerstofflabilen Selen-Molybdän-Kofaktor umgehen.

## 5 Ausblick

Obwohl die NDH aus *E. barkeri* vor mehr als 30 Jahren zum ersten Mal beschrieben wurde, ist sie bis heute kaum charakterisiert. Weder wurden Inhibitoren weitergehend untersucht noch ist Wie die Regulation ihrer Expression. Auch über die eigentliche Maximalaktivität besteht immer noch Unklarheit.

Zur weiteren Untersuchung der Substratbindung und des Reaktionsmechanismus können Mutationen einen großen Beitrag liefern. Ein Problem bei allen diesen Untersuchungen wird wahrscheinlich die geringe Menge an zur Verfügung stehendem Protein darstellen. Die Entwicklung eines geeigneten Expressionssystems, das die Bereitstellung größerer Mengen Proteins ermöglicht, wird auf Dauer wahrscheinlich unumgänglich sein.

Weiter wäre es hilfreich den Faktor, der zu der schnellen Deaktivierung der NDH führt, näher zu untersuchen, bzw. eine Möglichkeit zu finden das Enzym zu rekonstituieren.

Strukturell wäre die Interaktion des aktiven Zentrums mit Substrat, bzw. Inhibitoren von Interesse. Auch die Interaktion mit dem terminalen Elektronenakzeptor konnte noch bei keiner XOR strukturell charakterisiert werden.

Schließlich sind xxx des Reaktionsmechanismus noch viele Fragen offen. Insbesondere der Einfluss des Selens auf die Reaktionsrate und dem Reaktionsverlauf müssen noch weiter untersucht werden. Gleichzeitig bietet die NDH nicht nur die Möglichkeit für einen tieferen Einblick in den Reaktionsmechanismus der XORs, sondern auch in den der Selenoproteine im Allgemeinen.

## 6 Literaturverzeichnis

Abdel-Rassol, T., (2003). Construction of the Genomic Library of *Proteus vulgaris* and its Screening for the Gene Encoding (2R)-Hydroxycarboxylate-Viologen-Oxidoreductase. Karlsruhe, Universität Karlsruhe.

Aiyar, A., (2000). "The use of CLUSTAL W and CLUSTAL X for multiple sequence alignment." Methods Mol Biol. **132**: 221-41.

Alhapel, A., D. J. Darley, et al., (2006). "Molecular and functional analysis of nicotinate catabolism in *Eubacterium barkeri*." Biochemistry **103**(33): 12341-6.

Altschul, S. F., T. L. Madden, et al., (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. **25**: 3389-3402.

Anderson, L. A., T. Palmer, et al., (1997). "Characterisation of the Molybdenum-Responsive ModE Regulatory Protein and its Binding to the Promoter Region of the modABCD (Molybdenum Transport) Operon of *Escherichia Coli*." FEBS Journal **246**(1): 119-126.

Andersson, K. M. und S. Hovmöller, (2000). "The protein content in crystals and packing coefficients in different space groups." Acta Cryst. D **56**: 789-790.

Andreesen, J. R. und S. Fetzner, (2002). The Molybdenum-Containing Hydroxylases of Nicotinate, Isonicotinate, and Nicotine. Met. Ions Biol. Syst. Siegel. **39**: 405-430.

Axley, M. J., A. Bock, et al., (1991). "Catalytic properties of an *Escherichia coli* formate dehydrogenase mutant in which sulfur replaces selenium." Proc Natl Acad Sci **88**: 8450–8454.

Banerjee, R. und V. N. Gladyshev, (2008). Redox biochemistry, Wiley-Interscience.

Barber, M. J., R. J. Bray, et al., (1976). "Oxidation-Reduction Potentials of Turkey Liver Xanthine Dehydrogenase and the Origins of Oxidase and Dehydrogenase Behaviour in Molybdenum-Containing Hydroxylases." Biochem. J. **163**: 279-289.

Bell, I. M., M. L. Fisher, et al., (1993). "Kinetic studies on the peroxidase activity of selenosubtilisin." Biochemistry **32**(14): 3754–3762.

Berry, M. J., L. Banu, et al., (1991). "Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region." Nature **353**: 273-276.

Besse, D., F. Siedler, et al., (1997). "The redox potential of selenocystine in unconstrained cyclic peptides." Angew Chem Int Ed **36**: 883–885.

Bock, A., K. Forchhammer, et al., (1991). "Selenocysteine: the 21st amino acid." Molecular Microbiology **5**(3): 515-520.

Boer, D. R., A. Thapper, et al., (2004). "X-ray Crystal Structure and EPR Spectra of "Arsenite-Inhibited" *Desulfovibrio gigas* Aldehyde Dehydrogenase: A Member of the Xanthine Oxidase Family." J.Am.Chem.Soc **126**: 8614-8615.

- Bonin, I., B. M. Martins, et al., (2004). "Active site geometry and substrate recognition of the molybdenum hydroxylase quinoline 2-oxidoreductase." Structure **8**: 1425-35.
- Bradford, M. M., (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. **72**: 248-254.
- Bradshawa, M., M. Goodnougha, et al., (1998). "Conjugative Transfer of the Escherichia coli-Clostridium perfringens Shuttle Vector pJIR1457 to Clostridium botulinum Type A Strains." Plasmid **40**(3): 233-237.
- Bray, R., G. George, et al., (1983). "Studies by e.p.r. spectroscopy of carbon monoxide oxidases from Pseudomonas carboxydovorans and Pseudomonas carboxydohydrogena." Biochem J. **211**(3): 687-694.
- Brünger, A. T., (1992). "Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures." Nature **355**: 472-475.
- Cates, M., M. Berry, et al., (1999). "Metal-ion affinity and specificity in EF-hand proteins: coordination geometry and domain plasticity in parvalbumin." Structure **10**: 1269-78.
- Cates, M., M. Teodoro, et al., (2002). "Molecular Mechanism of Calcium and Magnesium Binding to Parvalbumin." Biophysical Journal **82**: 1133-1146.
- Chambers, I., J. Frampton, et al., (1986). "The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA." EMBO J. **5**(6): 1221-1227.
- Chan, M. K., S. Mukund, et al., (1995). "Structure of a hyperthermophilic tungstopterin enzyme, aldehyde ferredoxin oxidoreductase." Science **267**(5203): 1463-9.
- Chan, M. K., S. Mukund, et al., (1995). "Structure of a hyperthermophilic tungstopterin enzyme, aldehyde ferredoxin oxidoreductase." Science **267**(10): 1463-9.
- Ching, W., B. Alzner-Deweerd, et al., (1985). "A selenium-containing nucleoside at the first position of the anticodon in seleno-tRNA<sup>Glu</sup> from Clostridium sticklandii." Biochemistry **82**: 347-350.
- Cleere, W. F. und M. P. Coughlan, (1974). "Turkey Liver Xanthine Dehydrogenase." Biochem J. **143**: 331-340.
- Collins, M. D., P. A. Lawson, et al., (1994). "The phylogeny of the genus Clostridium: proposal of five new genera and eleven new species combinations." Int. J. Syst. Bacteriol. **44**: 812-826.
- Coughlan, M., J. Johnson, et al., (1980). "Mechanisms of inactivation of molybdoenzymes by cyanide." J. Biol. Chem. **255**(7): 2694-2699.
- Crawford, R. L., (1975). "Degradation of 3-Hydroxybenzoate by Bacteria of the Genus Bacillus." Appl Microbiol. **30**(3): 439-444.

- Dalton, H., D. Lowe, et al., (1976). "Studies by electron-paramagnetic-resonance spectroscopy on the mechanism of action of xanthine dehydrogenase from *Veillonella alcalescens*." Biochem J. **153**: 287-295.
- De Jong, E., W. J. H. Van Berkel, et al., (2005). "Purification and characterization of vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*." European Journal of Biochemistry **208**(3): 651-657.
- DeLano, W. L., (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. Palo Alto, DeLano Scientific.
- Dilworth, G. L., (1982). "Properties of the selenium-containing moiety of nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barkeri*." Arch Biochem Biophys **219**(1): 30-8.
- Dobbek, H., L. Gremer, et al., (2002). "Catalysis at a dinuclear [CuSMo(=O)OH] cluster in a CO dehydrogenase resolved at 1.1-Å resolution." Proc Natl Acad Sci . **99**(25): 15971-6.
- Dobbek, H., L. Gremer, et al., (1999). "Crystal structure and mechanism of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selanylcyteine." Biochemistry **96**(16): 8884-8889.
- Drenth, J., (1994). Principles of Protein X-Ray Crystallography. New York, Springer Verlag.
- Einsle, O., F. A. Tezcan, et al., (2002). "Nitrogenase MoFe-Protein at 1.16 Å Resolution: A Central Ligand in the FeMo-Cofactor." Science **297**: 1696-99.
- Emsley, P. und K. Cowtan, (2004). "Coot: model-building tools for molecular graph." Acta Crystallogr D **60**: 2126-32.
- Engh, R. A. und R. Huber, (1991). "Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement." Acta Crystallog. Sect. A **47**: 392-400.
- Enroth, C., B. T. Eger, et al., (2000). "Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(20): 10723-10728.
- Ensign, J. C. und S. C. Rittenberg, (1964). "The Pathway of Nicotinic Acid Oxidation by a *Bacillus* Species." J. Biol. Chem. **239**(7): 2285-2291.
- Flohe, L., W. A. Günzler, et al., (1973). "Glutathione peroxidase: a selenoenzyme." FEMS Letters **32**(1): 132-4.
- Fraaije, M. W., W. J. Van Berkel, et al., (1998). "A novel oxidoreductase family sharing a conserved FAD-binding domain." Trends Biochem Sci **6**: 206-7.
- Fridovich, I. und P. Handler, (1958). "Xanthine oxidase. II. Studies of the active site." J Biol Chem. **231**(2): 899-911.
- Garcin, E., X. Vernede, et al., (1999). "The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center." Structure **7**: 557-566.

- Gill, S. C. und P. H. von Hippel, (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." Anal. Biochem. **182**(2): 319-26.
- Gladyshev, V., S. Khangulov, et al., (1994). "Nicotinic Acid Hydroxylase from *Clostridium barkeri*: Electron Paramagnetic Resonance Studies show that Selenium is Coordinated with Molybdenum in the Catalytically Active Selenium-Dependent Enzyme." Proceedings of the National Academy of Sciences **91**(1): 232-236.
- Gladyshev, V. N., S. V. Khangulov, et al., (1996). "Properties of the Selenium- and Molybdenum-Containing Nicotinic Acid Hydroxylase from *Clostridium barkeri*." Biochemistry **35**(1): 212-223.
- Goobes, R., G. Goobes, et al., (2007). "Thermodynamic Roles of Basic Amino Acids in Statherin Recognition of Hydroxyapatite." Biochemistry **46**: 4725-4733.
- Gromer, S., L. Johansson, et al., (2003). "Active sites of thioredoxin reductases: Why selenoproteins?" PNAS **100**(22): 12618-12623.
- Haft, D. H. und W. T. Self, (2008). "Orphan SelD proteins and selenium-dependent molybdenum hydroxylases." Biology Direct **3**(4): doi:10.1186/1745-6150-3-4.
- Hänzelmann, P., H. Dobbek, et al., (2000). "The effect of intracellular molybdenum in *Hydrogenophaga pseudoflava* on the crystallographic structure of the seleno-molybdo-iron-sulfur flavoenzyme carbon monoxide dehydrogenase." Journal of Molecular Biology **301**: 1221-1235.
- Harary, I., (1957). "BACTERIAL FERMENTATION OF NICOTINIC ACID. I. END PRODUCTS." J. Biol. Chem. **227**(2): 815-822.
- Harris, C. M., S. A. Sanders, et al., (1998). "Role of the Flavin Midpoint Potential and NAD Binding in Determining NAD versus Oxygen Reactivity of Xanthine Oxidoreductase." Journal of Biological Chemistry **274**: 4561-4569.
- Hazebrouck, S., L. Camoin, et al., (2000). "Substituting selenocysteine for catalytic cysteine 41 enhances enzymatic activity of plant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expressed in *Escherichia coli*." J Biol Chem **275**: 28715-28721.
- Hendrickson, W. A., (1985). "Analysis of protein structure from diffraction measurements at multiple wavelength." Transactions ACA **21**: 11-21.
- Hille, R., (1996). "The Mononuclear Molybdenum Enzymes." Chem Rev. **96**(7): 2757-2816.
- Hille, R., (1999). "Molybdenum enzymes." Essays Biochem **34**: 125-37.
- Hille, R., (2005). "Molybdenum-containing hydroxylases." Archives of Biochemistry and Biophysics **433**(1): 107-116.
- Hille, R., (2006). "Structure and Function on Xanthine Oxidoreductase." Eur. J. Inorg. Chem.: 1913-26.

- Hirschberg, R. und J. C. Ensign, (1972). "Oxidation of Nicotinic Acid by a Bacillus Species: Regulation of Nicotinic Acid and 6-Hydroxynicotinic Acid Hydroxylases." J. Bacteriol. **112**(1): 392-397.
- Holcenberg, J. S. und E. R. Stadtman, (1969). "Nicotinic Acid Metabolism. III. PURIFICATION AND PROPERTIES OF A NICOTINIC ACID HYDROXYLASE." J. Biol. Chem. **244**(5): 1194-1203.
- Holm, L. S., C., (1993). "Protein structure comparison by alignment of distance matrices." J. Mol. Biol. **233**: 123-138.
- Huber, R., P. Hof, et al., (1996). "A structure-based catalytic mechanism for the xanthine oxidase family of molybdenum enzymes." Biochemistry **93**: 8846-8851.
- Hunt, A. L., (1959). "Purification of the nicotinic acid hydroxylase system of Pseudomonas fluorescens KB1." Biochem J. **72**(1): 1-7.
- Hurh, B., T. Yamane, et al., (1994). "Purification and characterization of nicotinic acid dehydrogenase from Pseudomonas fluorescens TN5." J. Ferment. Bioeng. **78**(19-26).
- Ibdah, A. und R. Hille, "Unveröffentlichte Werte."
- Ilich, P. und R. Hille, (2002). "Oxo, sulfido, and tellurido Mo-enedithiolate models for xanthine oxidase: understanding the basis of enzyme reactivity." J Am Chem Soc. **124**(24): 6796-7.
- Imhoff, D. und J. R. Andreesen, (1979). "Nicotinic Acid Hydroxylase from Clostridium barkeri: Selenium-Dependent Formation of Active Enzyme." FEMS Microbiology Letters **5**: 155-8.
- Israel, I., M. Sohni, et al., (2002). "Expression of the *iorAB* genes from Brevundimonas diminuta encoding the molybdenum hydroxylase isoquinoline 1-oxidoreductase in Pseudomonas putida." FEMS Microbiology Letters **210**(1): 123-127.
- Jacob, C., G. I. Giles, et al., (2003). "Sulfur and selenium: The role of oxidation state in protein structure and function." Angew Chem Int Ed **42**: 4742-4758.
- Johnson, M. K., D. C. Rees, et al., (1996). "Tungstoenzymes." Chem. Rev. **96**(7): 2817-2840.  
no abstract
- Jones, M. V. und D. E. Hughes, (1972). "The Oxidation of Nicotinic Acid by Pseudomonas ovalis Chester." Journal of Biochemistry **129**: 755-761.
- Kabsch, W., (1993). "Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants." J. Appl. Crystallog. **26**: 795-800.
- Kaim, W. und B. Schwederski, (1994). Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life. New York.
- Kim, H. Y. und V. N. Gladyshev, (2005). "Different catalytic mechanisms in mammalian selenocysteine- and cysteine-containing methionine-Rsulfoxide." PLoS Biol. **12**.

- Kisker, C., a. Schindelin, Hermann, et al., (1997). "MOLYBDENUM-COFACTOR CONTAINING ENZYMES: Structure and Mechanism." Annual Review of Biochemistry **66**(1): 233-267.
- Kletzin, A. und M. W. W. Adams, (1996). "Tungsten in biological systems." FEMS Microbiology Reviews **18**(1): 5-63.
- Kleywegt, G. J. und A. T. Brünger, (1996). "Checking your imagination: applications of the free R value." Structure **4**: 897-904.
- Kleywegt, G. J. und T. A. Jones, (1995). "Where freedom is given, liberties are taken." Structure **3**: 535-540.
- Ko, T.-P., J.-J. Lin, et al., (2003). "Crystal Structure of Yeast Cytosine Deaminase: INSIGHTS INTO ENZYME MECHANISM AND EVOLUTION." J. Biol. Chem. **278**(21): 19111-19117.
- Krissinel, E. und K. Henrick, (2004). "Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions." Acta Crystallogr D **60**: 2256-68.
- L'vov, N. P. L., A. N. Nosikov, et al., (2002). "Tungston-Containing Enzymes." Biochemistry (Moscow) **67**(2): 196-200.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, M. T., (1993). "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures." J. Appl. Crystallogr. **26**: 283-291.
- Lattman, E., (1985). "Diffraction methods for biological macromolecules. Use of the rotation and translation functions." functions. Methods Enzymol. **115**: 55-77.
- Laughlin, L. J. und C. G. Young, (1996). "Oxygen Atom Transfer, Coupled Electron Proton Transfer, and Correlated Electron & Nucleophile Transfer Reactions of Oxomolybdenum(IV) and Dioxomolybdenum(VI) Complexes." Inorganic Chemistry **35**(4): 1050-1058.
- Leimkühler, S., A. L. Stockert, et al., (2004). "The role of active site glutamate residues in catalysis of *Rhodobacter capsulatus* xanthine dehydrogenase." J Biol Chem **279**(39): 40437-44.
- Lowther, W. T., H. Weissbach, et al., (2002). "The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB." Nat Struct Biol **9**: 348-352.
- Majeed, S., G. Ofek, et al., (2003). "Enhancing Protein Crystallization through Precipitant Synergy." Structure **11**: 1061-1070.
- Massey, V. und D. Edmondson (1970). "On the Mechanism of Inactivation of Xanthine Oxidase by Cyanide." J. Biol. Chem. **245**(24): 6595-6598.
- McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, et al., (2007). "Phaser crystallographic software." J. Appl. Cryst. **40**: 658-674.

- Morozova, N., E. P. Forry, et al., (2003). "Antioxidant function of a novel selenoprotein in *Drosophila melanogaster*." Genes to Cells **8**: 963–971.
- Moskovitz, J., (2005). "Methionine sulfoxide reductases: Ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases." Biochim Biophys Acta **1703**: 213–219.
- Murzin, A. G., J. M. Chandonia, et al., (1995). "SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures." J. Mol. Biol. **247**: 536-540.
- Nishino, T. und K. Okamoto, (2000). "The role of the [2Fe2S] cluster centers in xanthine oxidoreductase." J Inorg Biochem **82**: 43-49.
- Nishino, T. und K. Okamoto, (2000). "The role of the [2Fe-2S] cluster centers in xanthine oxidoreductase." J. Inorg. Biochem. **82**: 43-9.
- Okamoto, K., B. T. Eger, et al., (2003). "An Extremely Potent Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase. CRYSTAL STRUCTURE OF THE ENZYME-INHIBITOR COMPLEX AND MECHANISM OF INHIBITION." J. Biol. Chem. **278**(3): 1848-1855.
- Okamoto, K., K. Matsumoto, et al. (2004). "The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: implications for reaction mechanism and enzyme inhibition." Proc Natl Acad Sci **101**(21): 7931-6.
- Patterson, A. L., (1934). "A Fourier series method for the determination of the components of interatomic distances in crystals." Phys. Rev. **46**: 372-376.
- Pauff, J. M., C. F. Hemann, et al., (2007). "The Role of Arginine 310 in Catalysis and Substrate Specificity in Xanthine Dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*." J. Biol. Chem. **282**(17): 12785-12790.
- Pauff, J. M., J. Zhang, et al., (2008). "Substrate Orientation in Xanthine Oxidase: CRYSTAL STRUCTURE OF ENZYME IN REACTION WITH 2-HYDROXY-6-METHYLPURINE." J. Biol. Chem. **283**(8): 4818-4824.
- Petropoulos, I. und B. Friguet, (2005). "Protein maintenance in aging and replicative senescence: A role for the peptide methionine sulfoxide reductases." Biochim Biophys Acta **1703**: 261–266.
- Pidcock, E. und G. R. Moore, (2001). "Structural characteristics of protein binding sites for calcium and lanthanoide ions." J Biol Inorg Chem **6**: 479-89.
- Porter, T. N., Y. Li, et al., (2004). "Mechanism of the Dihydroorotase Reaction." Biochemistry **43**(51): 16285-16292.
- Rajagopalan, K. V. und P. Handler, (1967). "Purification and properties of chicken liver xanthine dehydrogenase." J Biol Chem. **242**(18): 4097-107.
- Ramachandran, G. N. und V. Sassiakaran, (1968). "Conformation of polypeptides and proteins." Adv. Protein Chem. **28**: 283-437.

- Rappe, A. K. und W. A. Goddard, (1980). "Bivalent spectator oxo bonds in metathesis and epoxidation alkenes." **285**(5763): 311-312.
- Rappe, A. K. und W. A. Goddard, (1980). "Bivalent Spectator Oxo Bonds in Metathesis and Epoxidation Alkenes." Nature **285**: 311-312.
- Ravelli, R. B. G., R. M. Sweet, et al., (1997). "STRATEGY: a program to optimize the starting spindle angle and scan range for X-ray data collection." J. Appl. Cryst. **30**: 551-4.
- Rebelo, J., J. Dias, et al., (2001). "Structure refinement of the aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas* (MOP) at 1.28 Å." J.Biol.Inorg.Chem. **6**: 791-800.
- Reddy, K. J. und S. P. Gloss, (1993). "Geochemical speciation as related to the mobility of F, Mo and Se in soil leachates." Applied Geochemistry Journal **14**: 159-163.
- Romão, M., M. Archer, et al., (1995). "Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido-reductase from *D. gigas*." Science **270**(17): 1170-6.
- Romão, M. J., M. Archer, et al., (1995). "Crystal Structure of the Xanthine Oxidase-Related Aldehyde Oxido-Reductase from *D. gigas*." Science **270**(5239): 1170-1176.
- Romero, H., Y. Zhang, et al., (2005). "Evolution of selenium utilization traits." Genome Biology **6**(8): R66.
- Rossmann, M. G., (1990). "The molecular replacement method." Acta Crystallogr. A **46**: 73-82.
- Ryan, M. G., K. Ratnam, et al., (1995). "The Molybdenum Centers of Xanthine Oxidase and Xanthine Dehydrogenase." J. Biol. Chem. **270**(33): 19209-19212.
- Schröder, T., A. Rienhöfer, et al., (1999). "Selenium-containing xanthine dehydrogenase from *Eubacterium barkeri*." Eur J Biochem **264**: 862-871.
- Self, W. T., (2002). "Regulation of Purine Hydroxylase and Xanthine Dehydrogenase from *Clostridium purinolyticum* in Response to Purines, Selenium and Molybdenum." J.Bacteriology: 2039-2044.
- Self, W. T. und T. C. Stadtman, (2000). "Selenium-dependent metabolism of purines: A selenium-dependent purine hydroxylase and xanthine dehydrogenase were purified from *Clostridium purinolyticum* and characterized." PNAS **97**: 7208-7213.
- Self, W. T., M. D. Wolfe, et al., (2003). "Cofactor Determination and Spectroscopic Characterization of the Selenium-Dependent Purine Hydroxylase from *Clostridium purinolyticum*." Biochemistry **42**: 11382-11390.
- Solomon, P. S., A. L. Shaw, et al., (1999). "Characterization of a molybdenum cofactor biosynthetic gene cluster in *Rhodobacter capsulatus* which is specific for the biogenesis of dimethylsulfoxide reductase." Microbiology **145**: 1421-9.
- Stadtman, E. R., T. C. Stadtman, et al., (1972). "*Clostridium barkeri* sp. n." J. Bacteriol. **110**(2): 758-760.

*Clostridium barkeri* sp. n. has been described, and its relationship to other clostridia is discussed.

Stadtman, E. R., H. Van Remmen, et al., (2005). "Methionine oxidation and aging." Biochim Biophys Acta **1703**: 135–140.

Stadtman, T. C., (1996). "Selenocysteine." Annu Rev Biochem **65**: 83–100.

Teplova, M., C. J. Wilds, et al., (2002). "Covalent incorporation of selenium into oligonucleotides for X-ray crystal structure determination via MAD: proof of principle. Multiwavelength anomalous dispersion." Biochimie **84**(9): 849-58.

Thapper, A., J. P. Donahue, et al., (1999). "The unperturbed oxo-sulfido functional group cis-Mo(VI)OS related to that in the xanthine oxidase family of molybdoenzyme: Synthesis, structural characterization, and reactivity aspects." Inorganic Chemistry **38**: 4104-4114.

Truglio, J. J., K. Theis, et al., (2002). "Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*." Structure **10**(1): 115-25.

Unciuleac, M., E. Warkentin, et al., (2004). "Structure of a Xanthine Oxidase-Related 4-Hydroxybenzoyl-CoA Reductase with an Additional [4Fe-4S] Cluster and an Inverted Electron Flow." Structure **12**: 2249-2256.

Wagner, R. und J. R. Andreesen, (1979). "Selenium requirement for active xanthine dehydrogenase from *Clostridium acidurici* and *Clostridium cylindrosporum*." Arch. Microbiol. **121**: 255-260.

Wagner, R., R. Cammack, et al., (1984). Biophys. Acta **791**: 63-74.

Walkenhorst, H. M., S. K. Hemschemeier, et al., (1995). "Molecular analysis of the molybdate uptake operon, modABCD, of *Escherichia coli* and modR, a regulatory gene." Microbiol Res. **150**(4): 347-61.

Weissbach, H., F. Etienne, et al., (2002). "Peptide methionine sulfoxide reductase: Structure, mechanism of action, and biological function." Arch Biochem Biophys **397**: 172–178.

Weissbach, H., L. Resnick, et al., (2005). "Methionine sulfoxide reductases: History and cellular role in protecting against oxidative damage." Biochim Biophys Acta **1703**: 203–212.

Willems, A. and M. D. Collins (1996). "Phylogenetic relationships of the genera *Acetobacterium* and *Eubacterium* sensu stricto and reclassification of *Eubacterium alactolyticum* as *Pseudoramibacter alactolyticus* gen. nov., comb. nov." Int. J. Syst. Bacteriol. **46**: 1083-1087.

Wu, X. und R. E. Reid, (1997). "Structure/Calcium Affinity Relationships of Site III of Calmodulin: Testing the Acid Pair Hypothesis Using Calmodulin Mutants." Biochemistry **36**(28): 8649-8656.

Xiao, Z., M. A. Bruck, et al., (1996). "Dioxomolybdenum(VI) Complexes of Tripodal Nitrogen-Donor Ligands: Syntheses and Spectroscopic, Structural, and Electrochemical

Studies, Including the Generation of EPR-Active Molybdenum(V) Species in Solution." Inorg Chem. **35**(19): 5752.

Yoshida, M., K. Takeishi, et al., (1971). "Structural studies on a yeast glutamic acid tRNA specific to GAA codon." Biochim Biophys Acta **228**(1): 153-66.

Zavacki, A. M., J. B. Mansell, et al., (2003). "Coupled tRNA<sup>Sec</sup> dependent assembly of the selenocysteine decoding apparatus." Mol Cell **11**: 773-781.

Zhang, Y., D. E. Fomenko, et al., (2005). "The microbial selenoproteome of the Sargasso Sea." Genome Biol **6**(8): R66.

Zhang, Y. und V. N. Gladyshev, (2005). "An algorithm for identification of bacterial selenocysteine insertion sequence elements and selenoprotein genes." Bioinformatics **21**(11): 2580-2589.

Zhang, Y. und V. N. Gladyshev, (2005). "An algorithm for identification of bacterial selenocysteine insertion sequence elements and selenoprotein genes." BIOINFORMATICS **21**: 2580–2589.

Zhang, Y. und V. N. Gladyshev, (2007). "High content of proteins containing 21st and 22nd amino acids, selenocysteine and pyrrolysine, in a symbiotic deltaproteobacterium of gutless worm *Olavius algarvensis*." Nucleic Acids Research **35**(15): 4952–4963.

Zhang, Y., H. Romero, et al., (2006). "Dynamic evolution of selenocysteine utilization in bacteria: a balance between selenoprotein loss and evolution of selenocysteine from redox active cysteine residues." Genome Biol **7**(10): R94.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Holger Dobbek danken für die Bereitstellung des Themas, seiner Hilfsbereitschaft und seines Interesses für diese Arbeit.

Herrn Dr. Antonio Pierik danke ich für die Versorgung mit Zellen sowie für die Hilfe und Ratschläge während der Reinigung.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für das einzigartige Klima sowie vieler neuer Erkenntnisse, an die ich mich noch lange erinnern werde. Es hat Spaß gemacht mit Euch zu arbeiten!

Besonders möchte ich Eva, Ruth und Gabi danken für ihre Entschlossenheit mich immer wieder aufzumuntern und mich zum Durchhalten aufzufordern.

Benno möchte ich danken für seine nie enden wollende Zuversicht und sein Vertrauen in den Augenblick.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Eltern, die mich in allen Lebenslagen unterstützt haben.

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Arbeiten entnommen wurden, mit Quellenangaben kenntlich gemacht sind. Außerdem habe ich keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, Dezember 2008

Nadine Wagener

