

**Expression, Zuordnung, Struktur und Untersuchungen zum Elektronentransportmechanismus des Adrenodoxins; Optimierung der Expression und Aufreinigung des Elektronentransportproteins Ferredoxin NADP+ Reduktase**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt dem Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Dirk Beilke  
aus Heusenstamm

Frankfurt am Main, 2002  
(DF1)

Vom Fachbereich „chemische und pharmazeutische Wissenschaften“ der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Walter E. Müller

1.Gutachter: Prof. Dr. H. Rüterjans

2.Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

Tag der Disputation: 30.10.2002

# Danksagung

Die Doktorarbeit wurde im Zeitraum von März 1999 bis August 2002 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Rüterjans am Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Rüterjans danke ich für die interessante Themenstellung und für die Möglichkeit, diese Aufgabe weitgehend selbständig durchführen zu können.

Herrn Dr. Frank Löhr danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren und die Beantwortung NMR-spezifischer Fragen.

Vicky Katsemi danke ich für ihre Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft. Viele molekularbiologische Fragestellungen hätten ohne ihre Mithilfe nicht beantwortet werden können.

Bedanken möchte ich mich bei Primoz Pristovsek und Christina Fischer für die fachlichen Diskussionen und die Unterstützung bei zahlreichen Experimenten.

Frank Hannemann von der Universität des Saarlandes möchte ich für die Durchführung der Cross-Linking Experimente danken.

Sigrid Fachinger danke ich für ihre freundliche Unterstützung bei organisatorischen Angelegenheiten.

Schließlich möchte ich den Mitgliedern des Arbeitskreises für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima danken.

Ganz besonderer Dank gilt auch Tina Bloos und meiner Familie, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützen.

# Inhalt

1. Einleitung und Problemstellung	1
<b>1.1 Elektronentransportproteine</b>	2
<b>1.2 Adrenodoxin</b>	5
1.2.1 Die Hormonproduktion in der Nebennierenrinde	5
1.2.2 Cholesterin als Ausgangsmolekül bei der Steroidbiosynthese	7
1.2.3 Funktion und Eigenschaften des Adrenodoxins	8
1.2.4 Elektronentransportmechanismen des Steroid Hydroxylase Systems	9
1.2.5. Struktur des Adrenodoxins	12
1.2.6 Das Adx Dimer	19
1.2.7. Der Reduktase-Adx Komplex	20
<b>1.3 Ferredoxin-NADP+-Reduktase</b>	21
1.3.1 Photosynthese	21
1.3.2 Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> -Reduktase	22
1.3.2.1 Die NADP <sup>+</sup> -Bindungsstelle	24
1.3.2.2 Die Ferredoxin-Bindungsstelle	25
2. Material und Methoden	26
<b>2.1 Material</b>	26
2.1.1 <i>E.Coli</i> Stämme	26
2.1.2 Vektoren und Vektorkonstrukte	26
2.1.3 Primer für die Konstruktion der Expressionsvektoren (FNR)	26
2.1.4 Enzyme	27
2.1.5 Chemikalien	27
2.1.6 Standards	29
2.1.7 Kits	29
2.1.8 Geräte	29
2.1.9 Säulen und Chromatographiematerialien	31
2.1.10 Sonstiges Material	32
2.1.11 Antibiotikastammlösungen	32
2.1.12 Medien für die Kultivierung von <i>E.coli</i>	33
2.1.13 Medien für die Anreicherung mit <sup>2</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N	34
2.1.14 Puffer und Elutionsprogramme für Adx	35
2.1.15 Puffer und Elutionsprogramme für die FNR	36
<b>2.2 Methoden</b>	39
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden	39
2.2.1.1 Bakterienstammhaltung	39
2.2.1.2 Ethanolische Fällung von DANN	39
2.2.1.3 Präparation von Plasmid DNA aus <i>E.coli</i>	39
2.2.1.4 Amplifizierung definierter DNA Fragmente über die	

	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	40
2.2.1.5	Verdau von DNA mit TypII Restriktionsendonukleasen	41
2.2.1.6	Erzeugen von DNA Fragmenten mit glatten Enden	41
2.2.1.7	Dephosphorilierung von DNA Fragmenten	41
2.2.1.8	Hybridisierung von Oligonukleotiden komplementärer Sequenz	41
2.2.1.9	Agarosegelelektrophorese DNA	42
2.2.1.11	DNA Isolation aus Agarosegelen	42
2.2.1.12	Ligation von DNA Fragmenten	43
2.2.1.13	Sequenzierung von Plasmid DNA	43
2.2.2	Molekularbiologische Methoden für <i>E.coli</i>	44
2.2.2.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	44
2.2.2.2	Transformation	44
2.2.2.3	Expression von $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ angereicherten Adx in <i>E.coli</i> mittels des pKKHC Vektor	45
2.2.3	Proteinchemische Methoden	46
2.2.3.1	Ernte und Aufschluß	46
2.2.3.2	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	46
2.2.3.3	Hydrophobe Interaktionschromatographie von Adx mit Phenylsepharose	47
2.2.3.4	Ionenaustauschchromatographie von Adx und FNR mit Q-Sepharose	48
2.2.3.5	Affinitätschromatographie mit Bluesepharose bzw. Metallchelataffinitätschromatographie an Ni-NTA Superflow	49
2.2.3.6	Gelfiltration	50
2.2.3.7	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.2.3.8	Analytische HPLC	51
2.2.3.9	Methoden zur Optimierung der Expressionsrate	52
2.2.3.10	Proteinkonzentrationsbestimmung Adx/FNR	53
2.2.3.11	Cross-Linking Experimente	53
<b>2.3</b>	<b>NMR-spektroskopische Methoden</b>	54
2.3.1	NMR-spektroskopische Methoden beim Adx	54
2.3.1.1	Der INEPT-Transfer	55
2.3.1.2	Zuordnung	56
2.3.1.3	Die longitudinale Relaxationszeit $T_1$	66
2.3.1.4	$^3\text{J-H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}$ -Kopplungskonstanten	68
2.3.1.5	Ermittlung von unbestimmten $T_1$ -Relaxationszeiten mit der „inversion recovery Methode“	71
2.3.1.6	Bestimmung von Abständen aus $T_1$ -Zeiten	72
2.3.1.7	Strukturbestimmung	73
2.3.2	NMR-spektroskopische Methoden bei der FNR	74

2.3.2.1	Das TROSY	74
2.3.2.2	Bestimmung der Isotopenanreicherung	75
2.3.2.3	Austausch $^1\text{H}$ gegen $^2\text{H}$	75
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>77</b>
<b>3.1</b>	<b>Adrenodoxin</b>	<b>77</b>
3.1.1	Präparation von $^{15}\text{N}$ -, $^{13}\text{C}$ -angereichertem bAdx	78
3.1.2	Aufreinigung des $^{15}\text{N}$ -, $^{13}\text{C}$ -angereichertem bAdx	78
3.1.3	Analytik des bAdx	80
3.1.3.1	Analyse des bAdx mit analytischer Ionenaustausch HPLC mit MonoQ HR5/5	81
3.1.3.2	NMR-Messungen zur Veranschaulichung der Degradation	83
3.1.4	NMR-Spektroskopische Untersuchungen	84
3.1.4.1	Zuordnung des reduzierten Adrenodoxins	84
3.1.4.2	Sekundärstruktur	88
3.1.4.3	Nichtselektive $T_1$ -Zeiten	89
3.1.4.4	Tertiärstruktur	89
3.1.5	Vergleich zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand	94
3.1.6	Elektronentransportmechanismus	100
<b>3.2</b>	<b>Ferredoxin NADP+ Reduktase</b>	<b>110</b>
3.2.1	Optimierung der Expression unter Verwendung von pET-Expressionsvektoren	110
3.2.2	Aufreinigung der über pET-Expressionssysteme erhaltenen FNR	111
3.2.3	Expression unter Riboflavinzusatz	112
3.2.4	Das pET29HisFNR-Expressionssystem	113
3.2.5	Das pKKHC- und pQE30-Expressionssystem	115
3.2.6	Aufreinigung der eine Oligohistidin-Domäne enthaltenden FNR	116
3.2.7	Präparation von $^{15}\text{N}$ -angereicherter FNR	117
3.2.8	Aufreinigung der $^{15}\text{N}$ -angereicherten FNR	117
3.2.9	Das TROSY-Spektrum der FNR	119
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>120</b>
<b>5.</b>	<b>Literatur</b>	<b>123</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungen und Symbole</b>	<b>132</b>
<b>7.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>135</b>

## 1. Einleitung und Problemstellung

Proteine spielen eine Schlüsselrolle bei nahezu allen biologischen Prozessen. Ihre Funktionsbreite ergibt sich aus der Faltung der Proteine in definierte dreidimensionale Strukturen, die der jeweiligen Funktion des Proteins angepasst sind. Die Kernresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance, NMR) ist neben der Röntgenkristallographie eine der Methoden zur Strukturbestimmung, die es ermöglichen, dreidimensionale Strukturen von Proteinen zu ermitteln. Der Vorteil der Kernresonanzspektroskopie gegenüber der Röntgenkristallographie besteht darin, dass die atomare Struktur von Makromolekülen in Lösung bestimmt werden kann. Die Bestimmung einer Struktur in Lösung spiegelt die natürliche Umgebung des Proteins besser wider, zudem kann die Dynamik der Proteinstruktur erfasst werden.

Die zu untersuchenden Proteine gewinnt man direkt aus dem Wirtsorganismus oder durch biotechnologische Verfahren, bei denen ein gentechnisch veränderter Bakterien- oder Hefestamm zur Überexpression des Proteins verwendet wird. Ein großer Vorteil biotechnologischer Verfahren besteht darin, dass hier das Protein mit Isotopen wie  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^2\text{H}$  angereichert werden kann. Die Spinmarkierung mit diesen Isotopen liefert die Möglichkeit, neben homonuklearen Informationen auch heterokernbezogene Informationen aus den NMR-Experimenten zu erhalten, wodurch das molekulare und dynamische Bild der Proteinstruktur verfeinert werden kann und die Strukturaufklärung von Proteinen mit Molekulargewichten von bis zu 40 kDa ermöglicht wird.

Molekulare Wechselwirkungen zwischen vielen elektronentransportierenden Proteinen sind bislang unverstanden. Strukturelle Untersuchungen unterschiedlicher Redoxzustände eines Proteins können Aufschluss über das Zusammenspiel der jeweiligen Redoxpartner geben.

## 1.1. Elektronentransportproteine

Es existiert eine Vielzahl an Proteinen, die Oxidations-Reduktions-Zentren besitzen. Bei diesen elektronentransportierenden Gruppen handelt es sich in den meisten Fällen um Flavine, Eisen-Schwefel-Cluster, Hämgruppen und Kupferionen.

Bei den Flavinen, die sich vom Riboflavin ableiten, kann man zwischen Flavinmononucleotid (FMN) und Flavinadenindinucleotid (FAD) unterscheiden. Beide Cofaktoren sind Zweielektronenüberträger, die sich in einer beim FAD zusätzlich auftretenden AMP-Einheit unterscheiden. Man kann verallgemeinernd sagen, dass FAD bei Oxidationen, bei denen zwei Wasserstoffatome aus dem Substrat entfernt werden, als Elektronenakzeptor dient. FMN kann auch nur ein einziges Elektron aufnehmen, wobei sich als Zwischenprodukt ein Semichinonradikal bildet (Abb. 1) [Stryer, 1996].

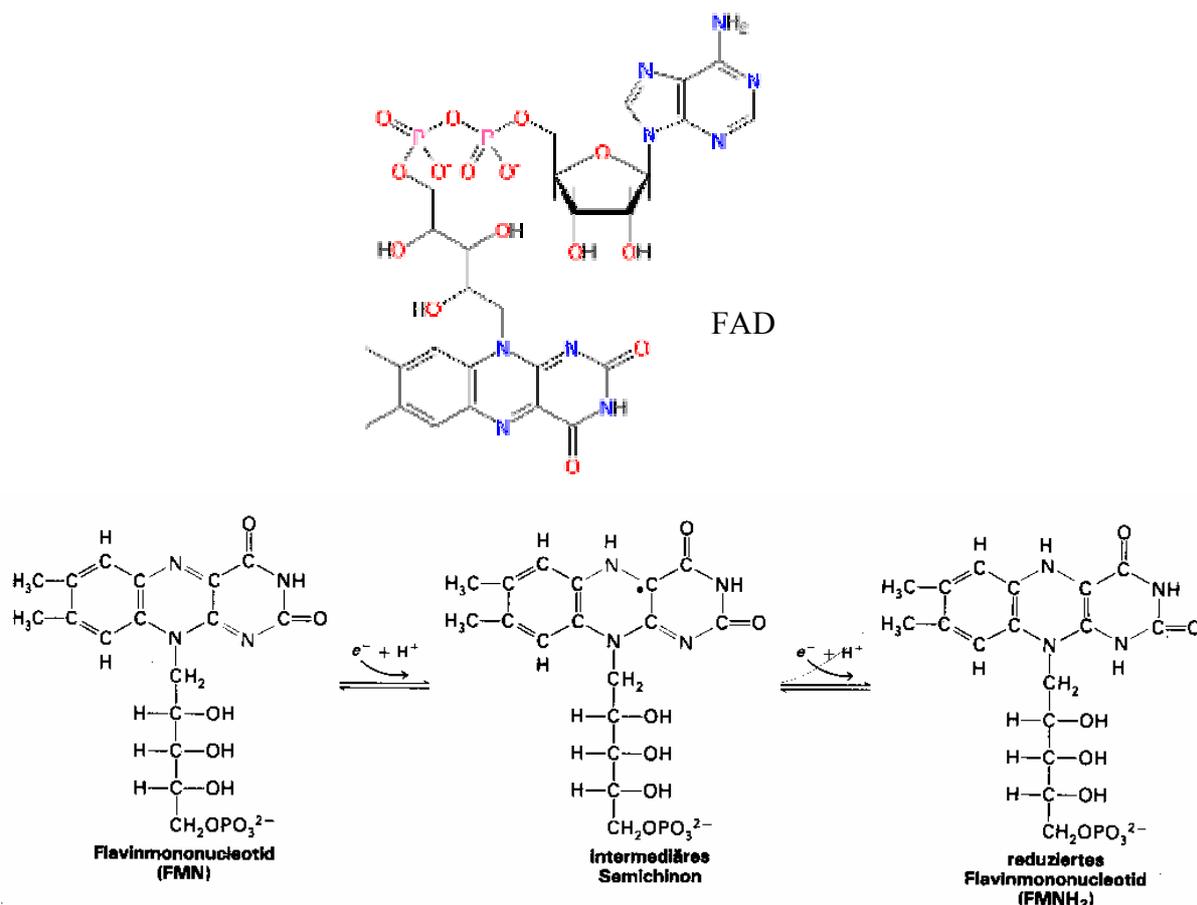


Abb.1: Flavinadenindinucleotid (FAD) als Cofaktor: An das FAD (oben) ist im Gegensatz zum Flavinmononucleotid (FMN) eine zusätzliche Adeninuntereinheit gebunden. Das Isoalloxazinringsystem des FAD und FMN wird durch die Aufnahme eines Elektrons in die Semichinon-Form überführt (unten) [Stryer, 1996].

Bei Proteinen, die Eisen-Schwefel-Cluster als elektronenübertragende Gruppen besitzen, spricht man von sogenannten „non haem iron proteins“ (NHIP). Sie tragen anstelle des Häms

Fe-S-Cluster und erfüllen Funktionen bei der Stickstofffixierung, beim Elektronentransport, bei der Photosynthese, sowie bei der metabolischen Oxidation von Zuckern. Bei den für die Elektronenübertragung verantwortlichen NHIP handelt es sich um Eisen-Schwefel-Proteine mit relativ niedriger molarer Masse (6000-25000Da). Sie enthalten ein, zwei, vier oder acht Fe-Atome, die bei den bekannten Strukturen tetraedrisch durch vier S-Atome koordiniert sind. Bemerkenswert ist, dass sie fast alle ungewöhnlich niedrige Reduktionspotentiale im Bereich von  $-0,05$  bis  $-0,49$  V aufweisen, was darauf schließen lässt, dass sie im Niederpotentialbereich biochemischer Prozesse als Reduktionsmittel fungieren können [Greenwood 1994].

Das einfachste NHIP ist das Rubredoxin [Lazaridis et al. 1994, Sieker et al. 1997], in welchem jedes der Eisenatome durch vier S-Atome von Cystein-Resten koordiniert ist. Es hat sowohl in der oxidierten ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) als auch in der reduzierten Form ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) high-spin-Konfiguration. Das Protein unterscheidet sich von anderen Fe-S-Proteinen darin, dass es kein labiles Schwefelatom enthält. NHIP mit „labilem Schwefel“ oder Ferredoxine lassen sich in folgende Klassen unterteilen:  $[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{S-Cys})_4]$ ,  $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{S-Cys})_4]$  und  $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{S-Cys})_4]_2$ . Neben diesen am weitesten verbreiteten Klassen konnten mittlerweile weitaus kompliziertere Fe-S-Zentren gefunden werden wie Abbildung 2 zeigt [Eady et al. 1996].

Im  $[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{S-Cys})_4]$ -Cluster, der bei Pflanzenferredoxinen sowie bei Adreno-Ferredoxinen (Adrenodoxin/Adx) vorkommt, sind die zwei Fe-Atome über zwei Schwefel-Brücken miteinander verknüpft und zusätzlich mit vier terminalen Cysteingruppen koordiniert. Sie sind bei neutralem pH-Wert negativ geladen und besitzen den Eisen-Schwefel Cluster als redoxaktive Gruppe. Die beiden Fe-Atome liegen in der oxidierten Form als high-spin  $\text{Fe}^{\text{III}}$  vor, in der reduzierten Form als low-spin-Komplexe. Diese Proteine dienen als Einelektron-Überträger [Hanukoglu, 1996], woraus sich für das Fe in der reduzierten Form eine formale Oxidationszahl von 2,5 ergibt. Diese Tatsache und das niedrige magnetische Moment weisen darauf hin, dass es sich bei den Fe-Dimeren um eine eigenständige Einheit und nicht um zwei voneinander unabhängige Atome handelt.

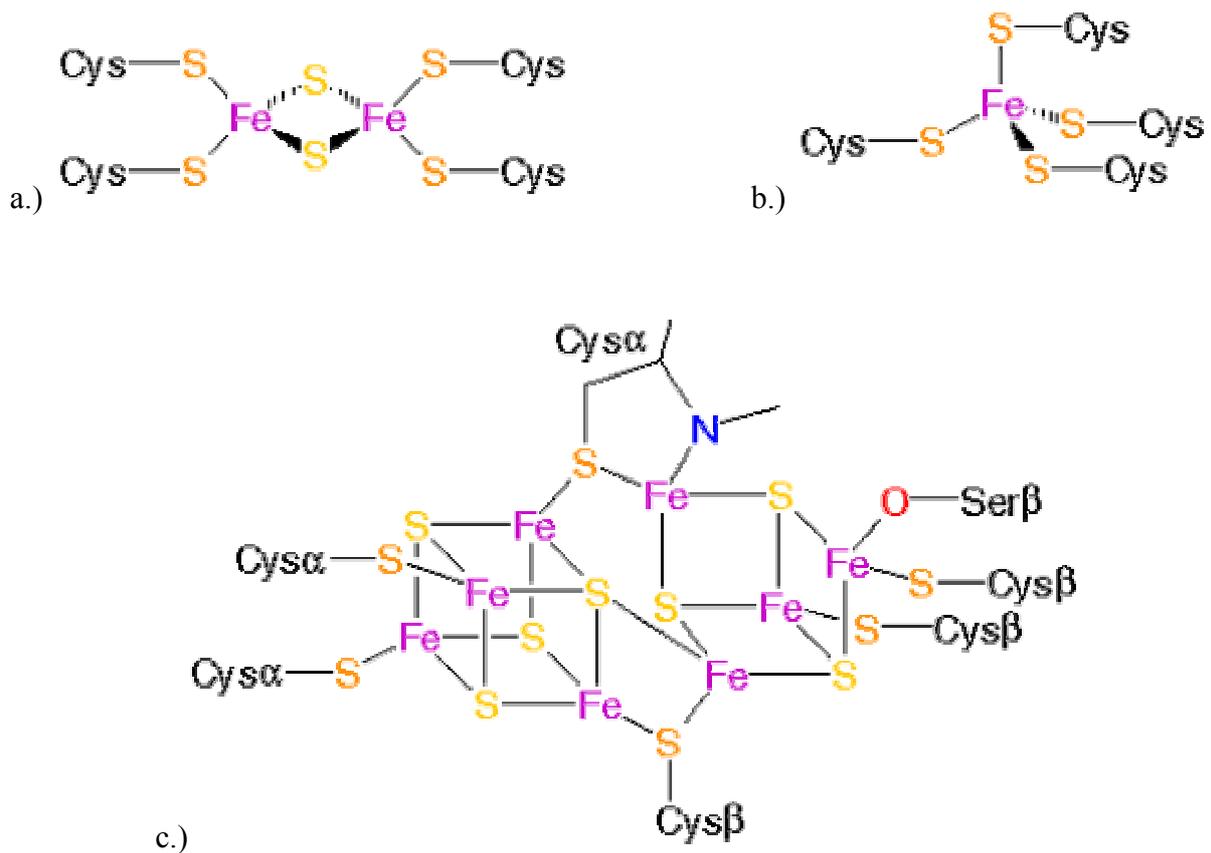


Abb.2: Beispiele für unterschiedliche Eisen-Schwefel-Cluster. a.) Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>-Cluster; b.) Fe(Cys)<sub>4</sub>-Cluster, c.) [Fe<sub>8</sub>S<sub>7</sub>](S<sub>Cys</sub>)<sub>6</sub>N<sub>Cys</sub>O<sub>Ser</sub>-Cluster der Monitrogenase Komponente I [Eady et al. 1996].

Zu den Haem-Proteinen gehören neben dem bekanntesten der Haem Proteine, dem Hämoglobin, die Gruppe der Cytochrome. Die zentrale Funktion der leuchtend gefärbten Cytochrome bei der Respiration wurde 1925 von David Keilin [Keilin, 1925] entdeckt. Während des Elektronentransports wechselt ihr Eisenatom zwischen dem reduzierten Ferro- (+2) und dem oxidierten Ferrizustand (+3). Cytochrome spielen eine wichtige Rolle bei der oxidativen Phosphorylierung, bei der Photosynthese und bei der Biotransformation von vielen körpereigenen und körperfremden Substanzen. So sind sie u.a. an der Biosynthese von Steroiden beteiligt, können Karzinogene / Mutagene aktivieren oder inaktivieren und verwandeln viele körperfremde Stoffe in Verbindungen, die besser ausgeschieden werden können. Unterschieden werden die Cytochrome nach ihrer Häm-Eisen-Koordination, ihren Häm-Liganden und der Sequenzhomologie (Abb.3). Bei der Untergruppe der Cytochrome P450 (absorbieren Licht der Wellenlänge 450 nm, wenn CO als Ligand vorliegt) spricht man beispielsweise auch von Häm-Thiolat-Proteinen, da hier das Häm über den Schwefel eines Cysteins an das Protein gebunden ist.

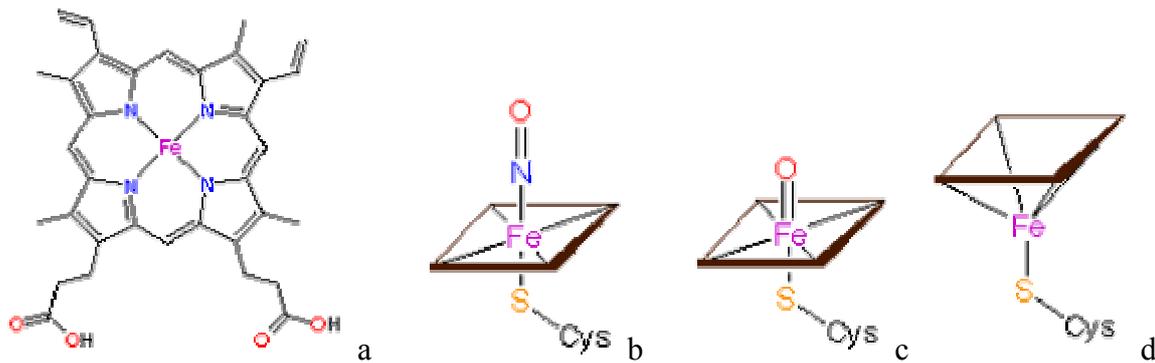


Abb.3: a.) Hämgruppe des Typs b, der vorwiegend bei Cytochromen der Unterklasse P450 vorkommt. b.) und c.) zeigen hexakoordiniertes Häm-Eisen während in Abb. d.) das Eisen pentakoordiniert ist. Typisch für Cytochrome der Klasse P450 ist der Cystein-Ligand, der das Eisen koordiniert.

## 1.2. Adrenodoxin

### 1.2.1 Die Hormonproduktion in der Nebennierenrinde

Die Nebennierenrinde besteht aus drei endokrin wirkenden Schichten, der *Zona Glomerulus*, in der beispielsweise Aldosteron produziert wird, der *Zona Fasciculata* in der das Cortisol synthetisiert wird und der *Zona Reticularis*, in der Sexualhormone produziert werden. Insgesamt werden hier ca. 40 verschiedene Steroidhormone (Corticoide) produziert, die man in drei Gruppen unterteilen kann:

- 1.) Mineralcorticoide – regeln den Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> - Haushalt
- 2.) Glucocorticoide – wirken am Energiestoffwechsel mit
- 3.) Sexualhormone – ergänzen die Androgene und Östrogene der Gonaden

Das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) der Hypophyse reguliert die Hormonproduktion der *Zona fasciculata* und der *Zona reticularis* und damit unter anderem den Cortisonspiegel. ACTH Rezeptoren in der Membran aktivieren die Adenylatcyclase zur Produktion des „second messenger“ cAMP, welcher seinerseits einen wichtigen Faktor bei der Adrenodoxinproduktion darstellt [Stocco 2000, Kramer et al., 1984, Cheng et al., 2000, Selvaraj, 2000].

Stress führt primär zu einem niedrigen Blutglucosespiegel, der im Hypothalamus zur Produktion des Corticotropin-releasing-Hormons (CRH) führt. CRH bewirkt im Hypophysen-Vorderlappen die Ausschüttung des ACTHs, welches zur Aktivierung des Hormonsyntheseapparates in der Nebennierenrinde führt. Der sich dadurch erhöhende Cortisolspiegel führt zur Verminderung der Glucoseaufnahme durch Muskelzellen. Cortisol

passt den Körper durch seine metabolischen Effekte an eine Stresssituation an, indem es die Blutglucosekonzentration, den Herzschlag, die Atemfrequenz sowie den Blutdruck erhöht, um Aufmerksamkeit sowie Wachsamkeit zu steigern. Gleichzeitig werden die vegetativen Funktionen wie z. B. Schlaf, sexuelles Verlangen und Nahrungsaufnahme reduziert. Die Cortisolmenge wird durch einen „feedback loop“ Mechanismus reguliert [Eve van Cauter et al. 2000], der eine Überreaktion auf stressvolle Ereignisse verhindert (Abb.4). Dabei hemmt Cortisol die ACTH-Sekretion der Hypophyse und die CRH-Ausschüttung des Hypthalamus.

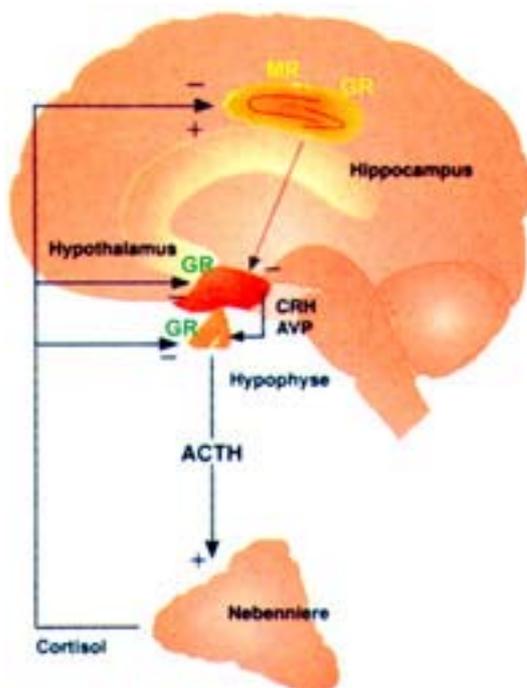


Abb.4: Stressantwort: Corticotropin-releasing-Hormon (CRH) bewirkt im Hypophysen-Vorderlappen die Ausschüttung des ACTHs, welches zur Aktivierung des Hormonsyntheseapparates in der Nebennierenrinde führt. Die Cortisolmenge wird durch einen „feedback loop“ Mechanismus reguliert.

Durch Blockade der CRH-Rezeptoren kann die Stresskaskade unterbunden werden. Diese Erkenntnis wird in den nächsten Jahren zur Entwicklung neuer Medikamente führen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die eine Mutante des CRHR1-Rezeptors besitzen, weit weniger unter Angstzuständen leiden, als diejenigen mit intakten Rezeptoren [Timple et al. 1998].

## 1.2.2. Cholesterin als Ausgangsmolekül bei der Steroidbiosynthese

Das Cholesterin stellt das Ausgangsmolekül bei der Steroidbiosynthese dar. Es wird im Mitochondrium durch das „Side Chain Cleavage“ Enzym (Cytochrom P450<sub>SCC</sub>) hydroxyliert und anschließend in Pregnenolon umgewandelt (Abb.5). Die Konversion von Cholesterin zu Pregnenolon ist der erste, geschwindigkeitsbestimmende und hormonell regulierte Schritt in der Synthese aller Steroidhormone. An dieser entscheidenden Reaktion ist Adrenodoxin als Elektronencarrier beteiligt.

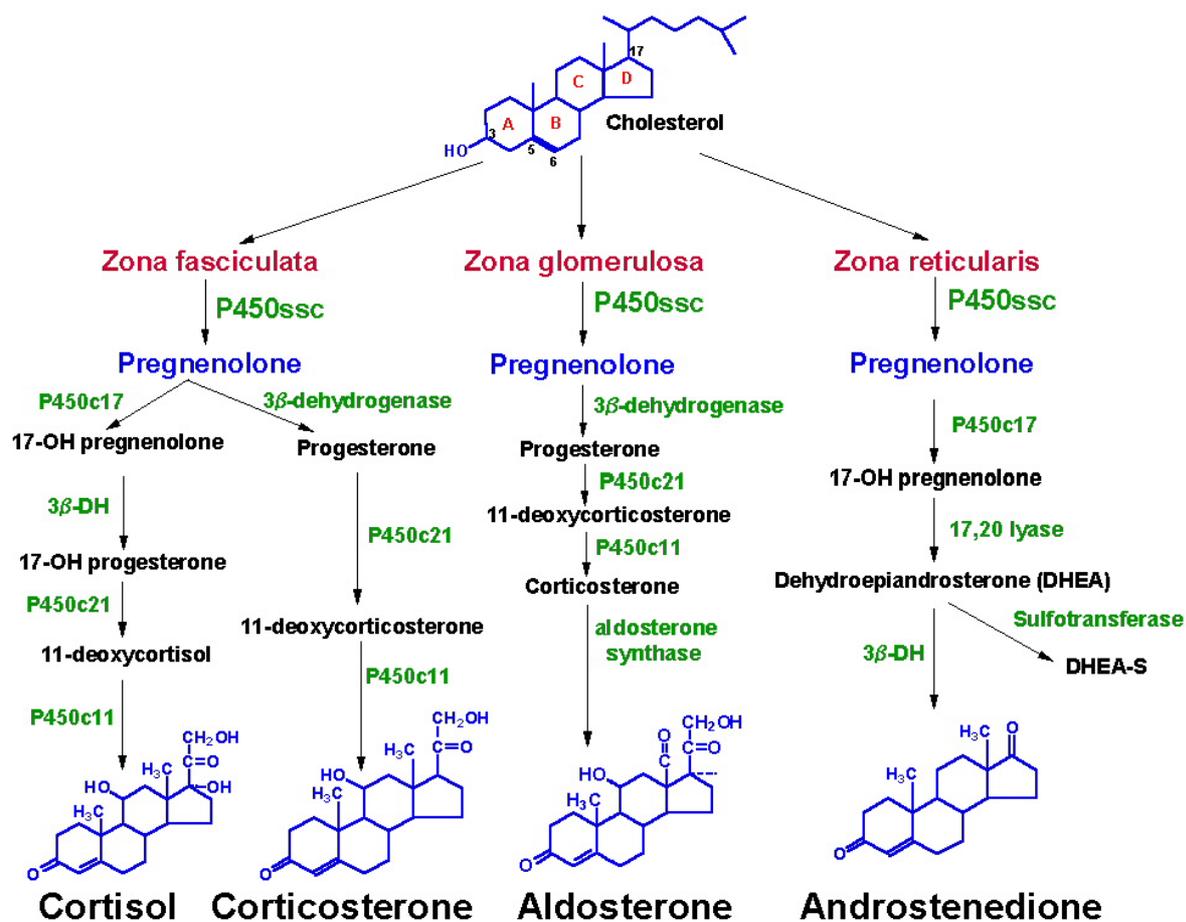


Abb.5: Cholesterin als Ausgangsstoff bei der Synthese der Steroidhormone. Reaktionen, die durch Cytochrome des Typs P450 katalysiert werden, benutzen Elektronen des Einelektronencarriers Adrenodoxin zur Hydroxylierung der Edukte.

### 1.2.3. Funktion und Eigenschaften des Adrenodoxins und seiner Redox-partner

Adrenodoxin ist Bestandteil der mitochondrialen Elektronentransportkette. Dieses mitochondriale System enthält neben Adrenodoxin die Proteine Cytochrom P450<sub>SCC</sub> (CYP11A), das an der Spaltung der Cholesterol-Seitenkette beteiligt ist bzw. Cytochrom P450<sub>11β</sub> (CYP11B) und eine NADPH-Adrenodoxinreduktase (Flavoprotein, 1Mol FAD / 1Mol Protein, M<sub>r</sub> 54 kDa) [Bernhardt, 1996]. Die Adrenodoxin-Reduktase und das Adrenodoxin dienen allen mitochondrialen P450-Systemen als Elektronen-Shuttle [Lambeth et al., 1982, Orne-Johnson, 1990, Lambeth 1991, Hanukoglu, 1992] (Abb.6). Hauptaufgabe dieser Systeme ist es, Elektronen für die Hydroxylierungsreaktion von Steroiden zu ihren Hydroxyderivaten zu liefern; als Elektronen-Donor dient NADPH. Die Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, heißen Monooxygenasen.

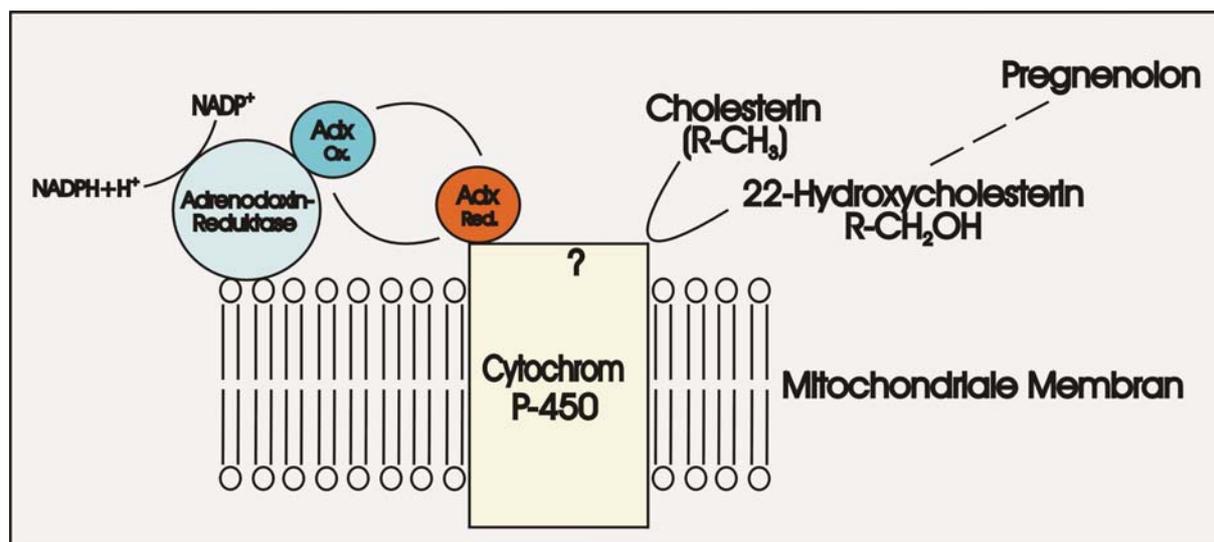
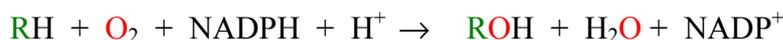


Abb.6: Schematische Darstellung des Elektronentransfers bei der Steroid-Hydroxylierung in Mitochondrien.

Die Hydroxylierung erfordert die Aktivierung des Sauerstoffs [Stryer 1996]. Bei der Synthese der Steroidhormone und Gallensäuren erfolgt diese Aktivierung durch Cytochrom P-450 (Abb.7). Cytochrom P-450 ist das letzte Glied der Elektronentransportkette in Mitochondrien der Nebennierenrinde und in Lebermikrosomen.

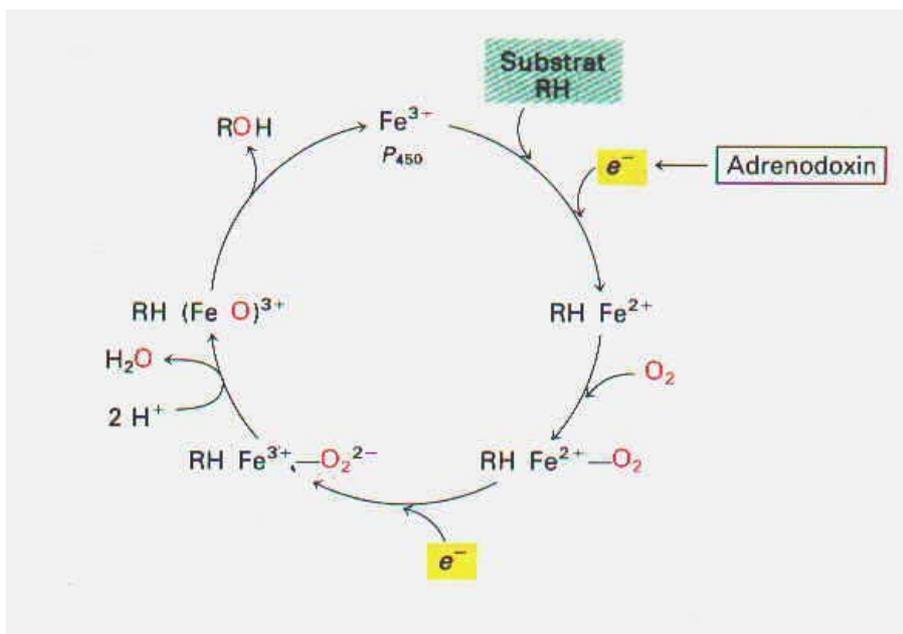


Abb.7 : Vorgeschlagener Katalysezyklus von Cytochrom P-450 [Nach Coon, M.J.;Ding, X.; Pernecky, S. J.; FASEB J. 6 (1992) S.669.]

Die Synthese des Adrenodoxins wird in der Nebennierenrinde in koordinierter Weise durch Adrenocorticotropin, in den Granulazellen der Ovarien durch Gonadotropin stimuliert. Die Stimulation der Proteinbiosynthese wird dabei durch cAMP vermittelt. [Waterman 1982, Kowal 1970, John 1984, Picardo-Leonard 1988, Vontilainen 1988]. Selvaraj et al. konnten zeigen, dass die Adrenalin-Konzentration einen erheblichen Einfluss auf die Bildung von Adrenodoxin hat [Selvaraj et al. 2000]. Bei Stimulation adrenodoxinproduzierender Zellen mit Adrenalin (0,1mM) wurde die Expression des Adrenodoxin um den Faktor 10,8 erhöht.

#### 1.2.4. Elektronentransportmechanismus des Steroid Hydroxylase Systems

Die Wechselwirkung der Redoxpartner beim Elektronentransport konnte bislang noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Adx nur als Ein-Elektronentransporter fungieren kann, wurden folgende vier Mechanismen postuliert (Abb.8), bei denen einerseits Adrenodoxin-Monomere (A) [Lambeth et al. 1979, Lambeth et al. 1982, Hanukoglu 1996] bzw. Adrenodoxin-Dimere (B) [Pikuleva et al. 2000] als mobile Shuttle agieren und andererseits feste Komplexe zwischen den Redoxpartnern vorliegen (Abb.8) [Kido et al. 1979, Hara et al. 1994]. Ein Modell geht dabei vom ternären 1:1:1 Komplex (D) aus, ein anderes postuliert einen 1:2:1 Komplex (C), wobei die Reduktase und das Cytochrom über ein Adx-Dimer verbrückt sind. Es wird sogar vermutet, dass in unterschiedlichen Systemen unterschiedliche Elektronentransportmechanismen existieren [Grinberg et al. 2000].

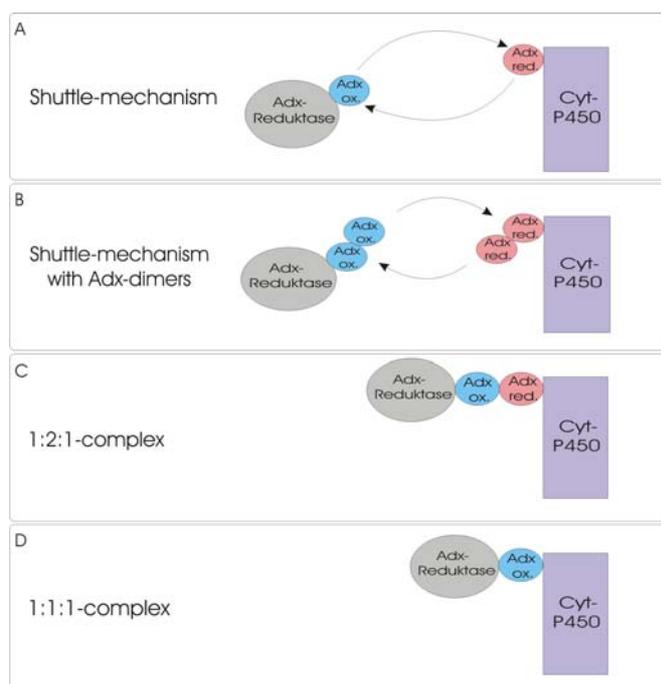


Abb.8: In der Literatur postulierte Elektronentransportmechanismen: A: „Shuttle model“ bei dem Adx Monomere als Elektronencarrier zwischen AdR und dem Cytochrom dienen [Lambeth et al. 1979, Lambeth et al. 1982, Hanukoglu 1996]. B: Modifiziertes „Shuttle model“ bei dem Adx Dimere als Elektronencarrier fungieren [Pikuleva et al. 2000]. In Modell C und D wird ein quarternärer und ein ternärer Komplex zwischen den Redoxpartnern angenommen [Kido et al. 1979, Hara et al. 1994].

Nach dem Shuttle Modell [Lambeth et al. 1979, Hanugoklu et al 1980] überträgt NADPH seine energiereichen Elektronen auf die Reduktase. Das an die Reduktase gebundene Adrenodoxin wird im folgenden Schritt reduziert. Die Reduktion führt zu einer konformationellen Änderung an der Bindungsregion des Adrenodoxins, wodurch sich der 1:1 Komplex auflöst. Das reduzierte Adrenodoxin assoziiert mit dem Cytochrom P-450. Diese Funktion des Ferredoxins als mobiler Elektronentransporter in der Cholesterinseitenkettenreaktion wird durch kinetische [Hanugoklu et al 1980, Lambeth et al. 1979/80], thermodynamische [Light et al. 1981] sowie NMR-spektroskopische Daten untermauert [Miura et al. 1990; Beilke et al. 2002]. Coghlan et al. konnten z.B. zeigen, dass die Bindungsdomänen für Adrenodoxin, Cytochrom P-450 sowie für die Adrenodoxin-Reduktase überlappen [Coghlan et al. 1991]. Dies konnte durch ortsspezifische Mutagenese in der aciden Bindungsregion 68-86 des Adrenodoxins nachgewiesen werden. Das Bindungsverhalten der Mutanten schließt die Bildung eines ternären Komplexes aus. Vor allem Substitutionen an den Positionen 76 und 79 führten zu einer erheblichen Verringerung der Aktivität.

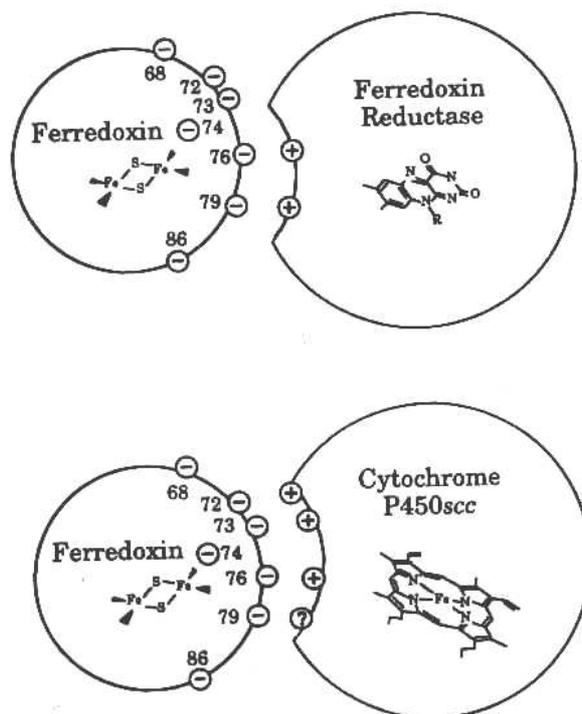


Abbildung 9: Schematisches Modell der Interaktionen von Ferredoxin mit der Ferredoxin-Reduktase und dem Cytochrom P-450scc. Nummeriert sind die für die Bindung essentiellen Aminosäuren des Ferredoxins. Asp-76 und Asp-79 sind essentiell für die Bindung zwischen Ferredoxin und Reduktase wie auch für die Bindung zwischen Ferredoxin und Cytochrom P-450scc, wohingegen die Aminosäuren Asp-72 und Glu-73 nur an der Bindungsbildung des Ferredoxins mit dem Cytochrom P450scc beteiligt sind. [Nach Coghlan V.M.; JBC 1991; 266, 28, 18606-18612].

Aus Abbildung 9 wird ersichtlich, dass die Bindungsregionen zu den Redoxpartnern zwar überlappen, aber nicht identisch sind. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Coghlan et al. und anderen Arbeitsgruppen [Tuls et al. 1987, Hamamoto et al. 1988, Beckert et al. 1994] ist der folgende Reaktionsmechanismus allgemein akzeptiert:

Das Adrenodoxin bindet an die Adrenodoxin-Reduktase. Bei der Bindung kommt es zu einer Verschiebung des Redoxpotentials um mehr als  $-80\text{mV}$  und zu einer Übertragung eines Elektrons auf den  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  Cluster. Dabei überträgt das  $\text{FADH}(-)$  der Reduktase ein Elektron auf das Adrenodoxin. Die Reduktion führt zu starken konformationellen Änderungen des Adrenodoxins [Lambeth et al. 1980], wodurch sich der AdR-Adx-Komplex auflöst. Adrenodoxin bindet an Cytochrom P-450, dabei verschiebt sich das Redoxpotential des Adrenodoxins um  $+20\text{mV}$ , das des Cytochroms um  $-30\text{mV}$ . Diese Potentialänderung bedingt die Dissoziation des Komplexes.

Die Übertragung des Elektrons auf Cytochrom P-450 hat zur Folge, dass das Häm-Eisen des Cytochroms vom low-spin- in den high-spin-Zustand übergeht [Tuls et al. 1987]. Dieser

Zustand ermöglicht die Übertragung des Elektrons auf den Sauerstoff.

### 1.2.5. Struktur des Adrenodoxins (Adx)

Adrenodoxin ist ein niedermolekulares intrazelluläres Protein (14.4 kDa). Es wird vor allem im Cytoplasma von Zellen der Nebennierenrinde synthetisiert und anschließend in das Mitochondrium eingeschleust, wo es in der Matrix lokalisiert ist [Bernhardt 1995].

Das Zusammenspiel zwischen Adx und seinen Redoxpartnern beruht auf den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Aminosäuren an der Oberfläche des Adx [Coghlan et al. 1991] (28 saure Aminosäurereste sind an der Oberfläche des Proteins lokalisiert) und positiv geladenen Aminosäuren der AdR [Geren et al. 1984] oder des Cyt P450 [Wada et al 1992]. Der pI-Wert des Adx beträgt 4,1. Die Fähigkeit, Elektronen aufzunehmen oder abzugeben, hängt vom Redoxpotential der Eisen-Schwefel-Proteine ab. Pflanzliche Ferredoxine besitzen Oxidations/Reduktions-Potentiale zwischen  $-325$  und  $-425$ mV [Cammack et al. 1977], die des Adx und dessen Varianten liegen zwischen  $-235$ mV und  $-273$ mV [Hurley et al. 1997, Uhlmann et al. 1995]

Die Kenntnis der genauen Struktur des Adx ist der Schlüssel zum Verständnis der elektronischen Wechselwirkungen. Bereits 1973 konnte die Primärstruktur des Adrenodoxins durch Aminosäuresequenzierung aufgeklärt werden [Tanaka et al. 1992]. Dabei identifizierten Tanaka et al. 114 der insgesamt 128 Aminosäuren.

Mit Hilfe von cDNA-Sequenzierung [Okamura et al. 1985] konnte schließlich die gesamte Primärstruktur aufgeklärt werden. Der C-Terminus umfaßt demnach 14 Aminosäuren, ist aber sehr instabil, was zum Abbau dieser Aminosäuren im Protein führt. Die Primärstruktur besteht aus 128 Aminosäuren (Abb.10) und ist wie folgt zusammengesetzt:

Ala:7	Arg:5	Thr:10	Leu:12	Gly9
Cys:5	Gln:3	Tyr:1	Pro:1	Lys:6
His:3	Ile:10	Asn:6	Val:7	Ser:10
Met:5	Phe:4	Glu:10	Asp:13	

```

1
GTTCCCGACAGTGCT ATG GCC GCA CGC CTC CTG CGC GTC GCC TCC GCC GCC CTC GGC GAC ACG GCC GGC CGG TGG CGG CTT CTC
Met Ala Ala Arg Leu Leu Arg Val Ala Ser Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Gly Arg Trp Arg Leu Leu
-50 -40
90
GTG CGA CCG CGC GCG GGA GCC GGC GGC CTC CGT GGG AGC CGA GGA CCG GGC CTG GGC GGC GGC GCA GTG GCG ACG CGG ACG
Val Arg Pro Arg Ala Gly Ala Gly Gly Leu Arg Gly Ser Arg Gly Pro Gly Leu Gly Gly Ala Val Ala Thr Arg Thr
-30 -20 -10
180
CTG AGC GTA TCG GGG CGA GCG CAG AGC AGC TCA GAA GAT AAA ATA ACA GTC CAC TTT ATA AAC CGT GAT GGT GAA ACA TTA
Leu Ser Val Ser Gly Arg Ala Gln Ser Ser Ser Glu Asp Lys Ile Thr Val His Phe Ile Asn Arg Asp Gly Glu Thr Leu
-1 1 10
270
ACA ACC AAA GGA AAA ATT GGT GAC TCT CTG CTA GAT GTT GTG GTT CAA AAT AAT CTA GAT ATT GAT GGT TTT GGT GCA TGT
Thr Thr Lys Gly Lys Ile Gly Asp Ser Leu Leu Asp Val Val Val Gln Asn Asn Leu Asp Ile Asp Gly Phe Gly Ala Cys
20 30 40
360
GAG GGA ACC TTG GCT TGT TCT ACC TGT CAC CTC ATC TTT GAA CAG CAC ATA TTT GAG AAA TTG GAA GCA ATC ACT GAT GAG
Glu Gly Thr Leu Ala Cys Ser Thr Cys His Leu Ile Phe Glu Gln His Ile Phe Glu Lys Leu Glu Ala Ile Thr Asp Glu
50 60 70
450
GAG AAT GAC ATG CTT GAT CTG GCA TAT GGA CTA ACA GAT AGA TCG CGG TTG GGC TGC CAG ATC TGT TTG ACA AAG GCT ATG
Glu Asn Asp Met Leu Asp Leu Ala Tyr Gly Leu Thr Asp Arg Ser Arg Leu Gly Cys Gln Ile Cys Leu Thr Lys Ala Met
80 90 100
540
GAC AAT ATG ACT GTT CGA GTA CCT GAT GCC GTG TCT GAT GCC AGA GAG TCC ATT GAT ATG GGC ATG AAC TCC TCA AAG ATA
Asp Asn Met Thr Val Arg Val Pro Asp Ala Val Ser Asp Ala Arg Glu Ser Ile Asp Met Gly Met Asn Ser Ser Lys Ile
110 120
653
GAA TAA ATAGGAATATTTTACACAACATTTTACCCTATTTTATAATTATTATTCTTAATGTAATTAATGAGAACATGGATGAATGGAAAAAAAAA
Glu End

```

Abb.10: Primärstruktur des bAdx

Bis heute konnten Röntgenkristallstrukturen von sechs pflanzlichen Ferredoxinen [Tsukikara et al. 1981a, Tsukikara et al. 1981b, Rypniewski et al. 1991, Jacobson et al. 1993], einem tierischen Ferredoxin [Müller et al. 1998, Pikuleva et al 2000] und dem Ferredoxin aus *E.coli* [Kakuta et al. 2001] bestimmt werden. Außerdem wurde mit Hilfe der NMR-Spektroskopie die Struktur des Putidaredoxins [Pochapsky et al. 1994], des Terpredoxins [Mo et al. 1999] und die des Ferredoxins aus dem Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* [Baumann et al. 1996] in Lösung bestimmt. Die Untersuchung mittels NMR ist wegen der paramagnetischen Eigenschaften solcher Metalloproteine allerdings schwierig. Paramagnetische Atome führen aufgrund der Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ungepaarter Elektronen mit den Kernspins in ihrer Umgebung zu einer Verkürzung der longitudinalen Relaxationszeit und damit zu einer extremen Linienverbreiterung der NMR-Signale von Kernspins in der Umgebung des paramagnetischen Ions [Bertini 1997].

Rinderadrenodoxin ist seit über zwanzig Jahren Gegenstand von kristallographischen [Pikuleva et al. 2000, Müller et al. 1998, Marg et al. 1992, Lammack et al. 1971, Suhara et al. 1972] sowie NMR-spektroskopischen Untersuchungen [Greenfield et al. 1989, Miura et al. 1990, Miura et al 1991, Beckert et al. 1995, Weiss et al. 2000] . Bislang wurden zwei Röntgenstrukturen veröffentlicht [Pikuleva et al. 2000, Müller et al. 1998]. Müller et al. konnten die Röntgenstruktur des um einige Aminosäuren verkürzten Adrenodoxins bestimmen (Abb.11) [Müller et al. 1998]. Aufgrund des zu vermutenden proteolytischen Abbaus des Rinderadrenodoxins wurden die Aminosäurereste Ser1-Ser3 und Asp109-Glu128

entfernt, um damit eine homogene Proteinpräparation zu ermöglichen.

Die Röntgenstrukturanalyse dieser verkürzten Adx-Mutante zeigt, dass bAdx ein fast sphärisches Ellipsoid mit Durchmessern von 18,9Å, 14,1Å und 15,8Å bildet.

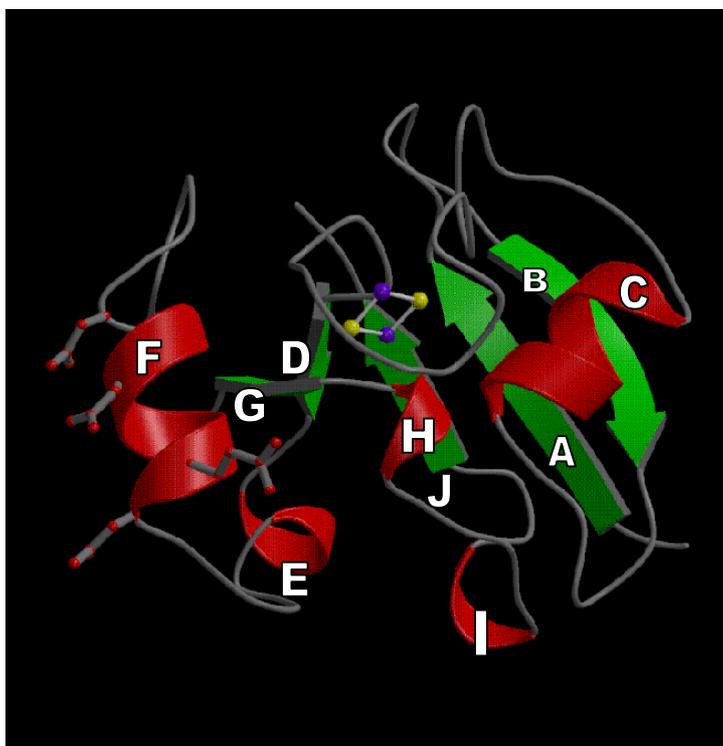


Abb.11: Molekülstruktur des bAdx(4-108). a.) Der Eisen-Cluster ist als „ball and sticks“ - Modell dargestellt (Fe, blau; S, gelb).  $\alpha$ -Helices(rot) und  $\beta$ -Faltblätter(grün) sind mit großen Buchstaben gekennzeichnet [Müller et al. 1998]

Die molekulare Oberfläche von bAdx(4-108) mißt  $4730\text{Å}^2$ . Wie mit GRASP [Nicholls et al. 1991] gezeigt werden konnte, gehören davon  $1440\text{Å}^2$  zum Rückrat,  $1500\text{Å}^2$  sind polar,  $1031\text{Å}^2$  geladen und  $740\text{Å}^2$  hydrophob. Mit einer Ausnahme befinden sich alle geladenen Reste an der Oberfläche; nur Glu74 ist in Wasserstoffbrückenbindungen involviert. Das Protein enthält einen hydrophoben, T-förmigen Kern, der sich bis zur Proteinoberfläche erstreckt. Diese Kerndomäne enthält die Reste Ile40, Leu38, Phe43, Val33, Val107, Pro108, Phe11, Val105, Ile94, Leu29, Leu57, Val32, Met103, Val9, Met100, Ile25 und Leu96. Die „Wechselwirkungsdomäne“ enthält die hydrophoben Aminosäurereste Phe59, Ile63, Phe64, Leu67. Über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Kerndomäne und der Wechselwirkungsdomäne stehen beide in Kontakt. Der [2Fe-2S]-Cluster ist in einer aus der Oberfläche herausragenden Wölbung lokalisiert.

Die zweite Röntgenstruktur, die gelöst wurde, stellt den Wildtyp des Proteins dar [Pikuleva et al. 2000]. Aufgrund der hohen Flexibilität des C-Terminus konnte die Struktur nur bis Val111 bestimmt werden.

bAdx(4-108) ist ein ( $\alpha$ - $\beta$ )-Protein, das aus über 22%  $\beta$ -Strang, 17%  $\alpha$ -Helix und 6%  $3_{10}$ -

Helix besteht [Müller et al. 1998]. In Abbildung 11 sind fünf  $\beta$ -Faltblätter und fünf Helices dargestellt, die, beginnend vom N-Terminus, mit Großbuchstaben gekennzeichnet werden. Die  $\beta$ -Stränge A(Reste Ile7-Ile12), B(Thr18-Gly23), D(His56-Phe59), G(Ser88-Leu90) und J(Met103-Arg106) gehören zu einem  $\beta$ -Strang des gemischten Typs. Die  $\beta$ -Stränge G und D, D und J und A und B sind antiparallel gepaart, wohingegen J und A parallel gepaart sind. Drei Helices, C(Leu29-Gln35), E(Glu61-Phe64) und F(Asp72-Leu78) sind  $\alpha$ -Helices, während H(Gly91-Glu93) sowie I(Lys98-Met100)  $3_{10}$ -Helices sind. Das bAdx(4-108) enthält zwei strukturelle Domänen, die essentiell für seine Funktion sind. Die Reste Asp5-Cys55 sowie Gly91-Pro108 gehören zur Kerndomäne, während die Reste His56-Leu90 eine große Haarnadelschleife formen. Die Haarnadelschleife enthält alle Reste, die für die Wechselwirkung von bAdx mit AR und Cyt P450 notwendig sind und wird deshalb als Wechselwirkungsdomäne bezeichnet. Sie umfaßt die  $\alpha$ -Helices E und F, die Loops Lys66-Ile70 und Leu80-Ser86 sowie die  $\beta$ -Stränge D und G. Beide Domänen sind durch eine „hingeregion“ verbunden. Der Abstand zwischen der zur Wechselwirkungsdomäne gehörenden  $\alpha$ -Helix F (72-79) und der Kerndomäne kann um circa 0,5Å variieren. Zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ile58N und Arg106O sowie Ile58O und Arg106N und dem Cluster (Phe59, Ile63, Phe64 und Leu67) der Wechselwirkungsdomäne könnten die konformationellen Änderungen des [2Fe-2S]-Zentrums während der Redoxprozesse auf die Wechselwirkungsdomäne übertragen.

Der [2Fe-2S]-Cluster befindet sich auf der Moleküloberfläche und ist von vier Seiten lösungsmittelzugänglich. Die Reste Leu30, Phe43-Thr54, Met77, Cys92, Glu93 und Ile94 umgeben den Cluster, ohne die Lösungsmittelzugänglichkeit zu beeinträchtigen.

Die Schwefel-Atome der Eisen koordinierenden Cysteine (Cys92, Cys55, Cys46 und Cys52) sind in einer Ebene angeordnet und bilden ein verzerrungsfreies Rechteck mit den Kantenlängen  $d_{55}^{92} = 3,7\text{Å}$ ,  $d_{92}^{46} = 5,55\text{Å}$ ,  $d_{46}^{52} = 3,7\text{Å}$  und  $d_{52}^{55} = 5,3\text{Å}$  (Abb.12). Die Ebene des [2Fe-2S]-Clusters steht senkrecht zu dieser Ebene. Auf den Schnittpunkten sind die Fe-Atome lokalisiert.

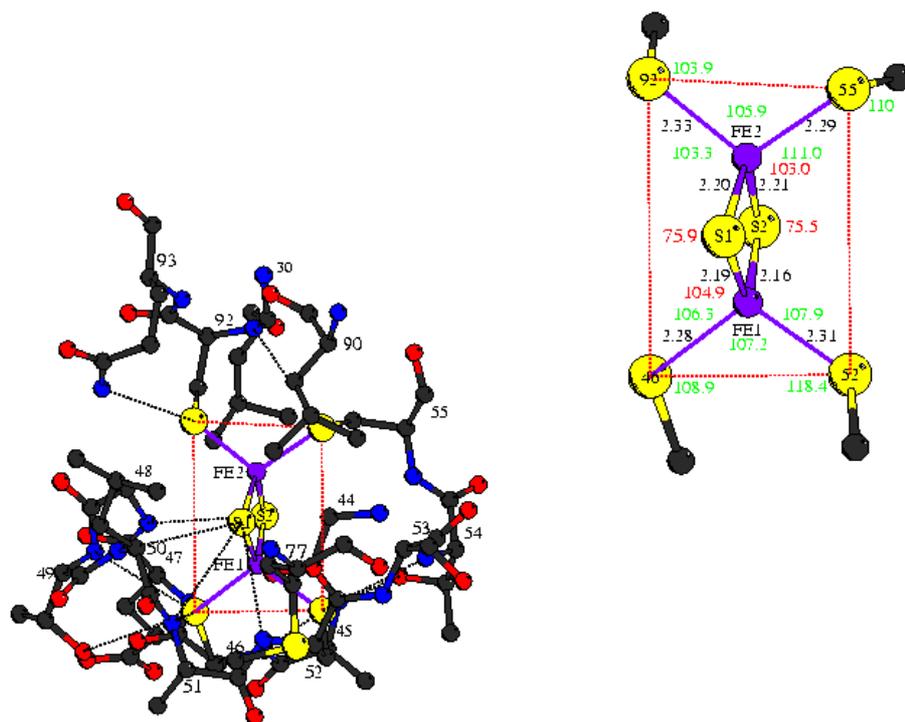


Abb.12: Ansicht auf die [2Fe-2S]-Cluster-Bindungsregion des bAdx(4-108). Die von dem Eisen und dem Schwefel aufgespannte Ebene ist rechts vergrößert dargestellt. Winkel und Bindungsabstände sind angegeben [Müller et al. 1998].

Pro108 ist essentiell für die korrekte Faltung des Proteins sowie für den Einbau des [2Fe-2S]-Clusters (Abb.13). Bei einer Mutation von Pro108 wird der Fe-S-Cluster bei der Proteinbiosynthese nicht in Adx eingebaut [Uhlmann et al. 1994].

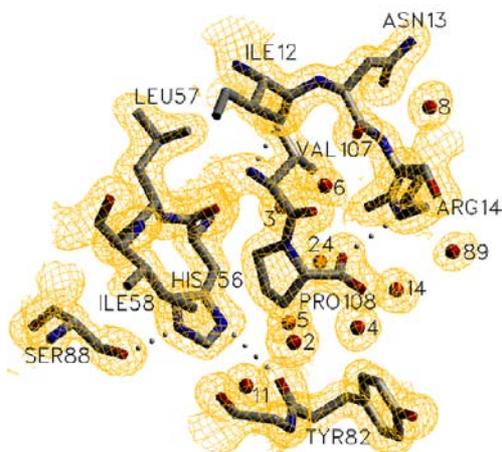


Abb.13: Die Umgebung von Pro108. Gelb dargestellt ist die Elektronendichteverteilung. Die rot markierten Kugeln sind Wasserangriffspunkte.

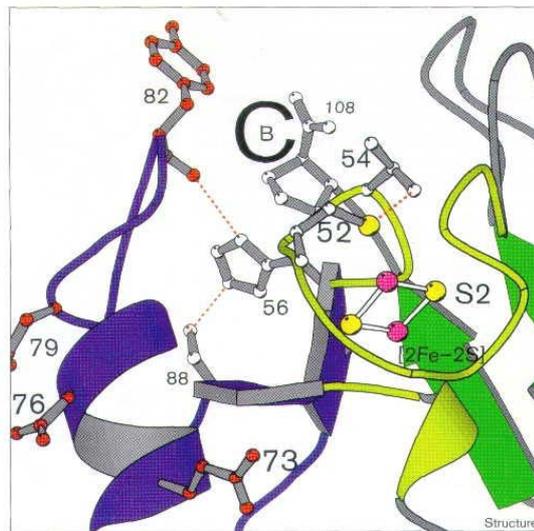


Abb.14: Die Umgebung des [2Fe-2S]-Clusters. Die Wechselwirkungsdomäne ist blau und die Kerndomäne grün gefärbt

Abb.13 und 14 zeigen die für die Wechselwirkungen des Adx mit seinen Redoxpartnern entscheidende Aminosäure His56 und ihre Position an der Oberfläche zwischen Wechselwirkungsdomäne und Fe-S-Cluster. Stabilisiert wird His56 vor allem durch die Wasserstoffbrückenbindungen zu Tyr82 und Ser88. Damit ist His56 für die Wechselwirkung essentiell, was durch Modifikations- und Mutageneseexperimente bestätigt werden konnte. Mutationen von His56 zu Glutamin, Threonin oder Arginin führten zu einem Verlust der thermischen Stabilität des Proteins [Burova et al. 1996].

Außer His56 spielen auch die Reste Thr54, Asp72 und Tyr82 eine wichtige Rolle beim Elektronentransport [Coghlan et al. 1991, Beckert et al. 1994, Beckert et al. 1995]. Beispielsweise können konformationelle Änderungen im [2Fe-2S]-Cluster direkt auf Thr54 oder auf den  $\beta$ -Turn, in dem sich auch His56 befindet, übertragen werden. Über die Wasserstoffbrücken von His56 könnten diese Konformationsänderungen auf die Wechselwirkungsdomäne weitergeleitet werden.

Außerdem könnte die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Arg106 und Ile 58 eine wichtige Rolle bei den Wechselwirkungen zwischen bAdx und seinen Reaktionspartnern spielen.

Die Wechselwirkung mit den Redoxpartnern wird hauptsächlich durch elektrostatische Prozesse hervorgerufen, wie Messungen der Ionenkraftfelder zeigen [Vickery 1997]. Die Abb.15 zeigt das elektrostatische Potential auf der Oberfläche des Adx(4-108).

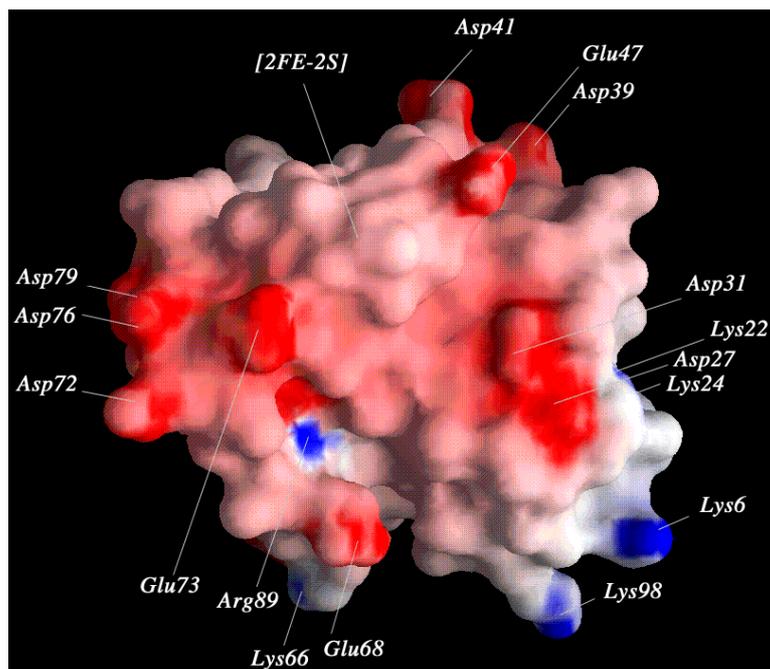


Abb.15: Elektrostatisches Potential an der Oberfläche des bAdx (blau, positiv; rot,negativ) [Müller et al. 1998].

In dieser Abbildung sind die aciden Reste (Asp72, Glu73, Asp76 und Asp79), die den Eisen-Schwefel-Cluster verdecken, zu erkennen. Die dem Lösungsmittel zugängliche Reste der Wechselwirkungsdomäne sind Lys66, Arg87 und Arg89. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass eine zweite Wechselwirkungsdomäne existiert, die die Reste Tyr49 [Hanneman et al. 2001], Asp39 und Asp41 [Müller et al. 2001] enthält. Dabei spielt Tyr49 eine entscheidende Rolle.

Vermutlich wird die Bindung von AR und Cyt P450 an die Wechselwirkungsdomäne durch das stark inhomogene Feld vermittelt und später durch molekulare Wechselwirkungen verstärkt.

Die hydrophile C-terminale Region von Asp109-Gln128 trägt eine Nettoladung von  $-3$ . Diese Region ist flexibel und zum Lösungsmittel hin ausgerichtet, was aus NMR-Daten geschlossen werden kann [Greenfield et al. 1989, Xia et al. 1995]. Bei der verkürzten Mutante des bAdx(4-108) muß berücksichtigt werden, dass die Effizienz des Elektronentransportes zum CytP450 durch das Fehlen des C-terminalen Endes herabgesetzt ist.

### 1.2.6. Das Adx Dimer

Anfang 2000 konnte das erste Mal gezeigt werden [Pikuleva et al. 2000], dass Adx bei niedrigen Konzentrationen, d. h. unter in vivo Bedingungen (0,1-120 $\mu$ M), vorwiegend als Dimer vorliegt (Abb.16). Bei einer Konzentration von 97 $\mu$ M Adx und 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> beträgt das über Light Scattering erhaltene Molekulargewicht 22.7 kDa, was bereits auf einen grossen Überschuss an Adx Dimeren hinweist. Bei einer Konzentration von 779 $\mu$ M Adx und gleichbleibender Salzkonzentration fanden Pikuleva et al. ein Molekulargewicht von 16 kDa [Pikuleva et al. 2000]. Erklärt wird dieses überraschende Ergebnis durch repulsive Kräfte, die zwischen den stark aciden Adx Molekülen wirken und zu dominieren beginnen, wenn die Konzentration des Adx zunimmt. Bei Konzentrationen im millimolaren Bereich, wie sie bei den NMR-Messungen verwendet wurden, kann man davon ausgehen, dass nur Adx Monomere vorliegen.

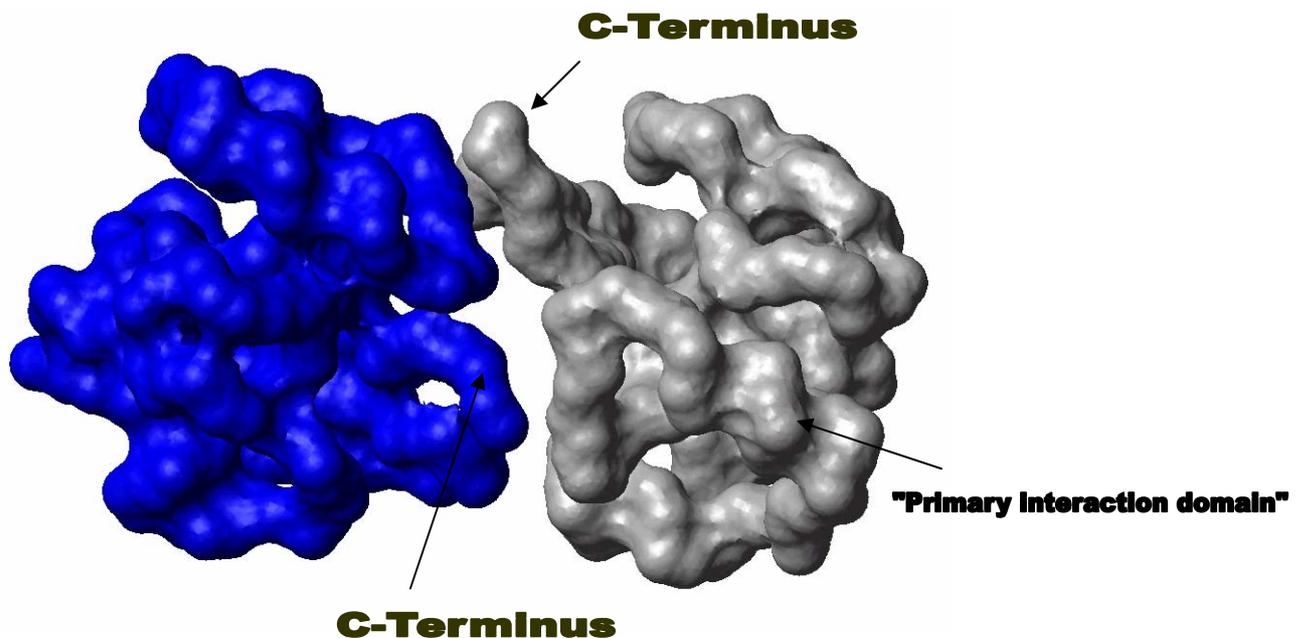


Abb.16: Adx-Adx-Dimer: Die C-Termini beider Adx-Moleküle sind in die Dimerbildung involviert. Val111 O bildet beispielsweise eine intermolekulare Wasserstoffbrücke zu Asp86 O $\delta$ 2 aus [Pikuleva et al. 2000].

Die C-Termini beider Adx Moleküle sind in die Dimerbindung involviert. Intermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen Val111 und Asp86 sowie zwischen Asp109 und Arg106 stabilisieren das Dimer.

### 1.2.7. Der Reduktase-Adx Komplex

Kürzlich wurde die Kristallstruktur des Adrenodoxin-Reduktase-Adx (AdR-Adx) Komplexes von Müller et al. aufgeklärt (Abb.17) [Müller et al. 2001]. Bei der Komplexbildung kommt es zu polaren Wechselwirkungen zwischen der „primary interaction domain“ des Adx und Aminosäureresten der NADP<sup>+</sup> Domäne der Reduktase. Weitere polare Wechselwirkungen sind zwischen der „core domain“ des Adx und der FAD Domäne der Reduktase beobachtet worden. In einer dritten Wechselwirkungsregion interagieren Reste des C-Terminus des Adx mit der Reduktase.

Der [2Fe-2S]-Cluster des Adx hat einen Abstand von 10 Å zu den Isoalloxazinringen des FAD der Reduktase, aufgrund dieses geringen Abstands wäre ein Elektronentransfer mittels Tunneleffekt denkbar [Moser et al. 1992, Page et al. 1999].

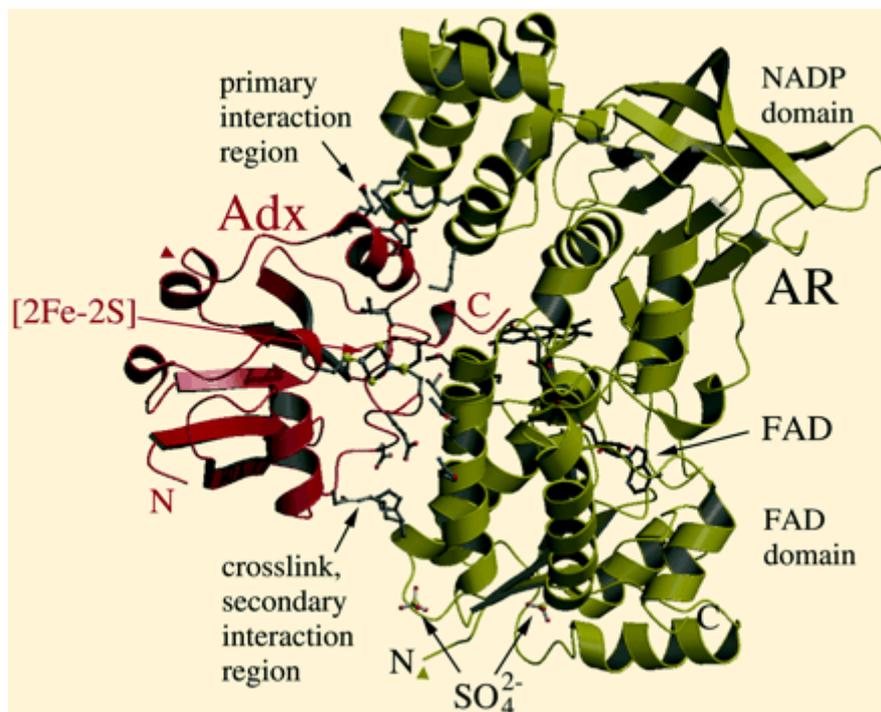


Abb.17: Kristallstruktur des AdR-Adx Komplexes. Das Adrenodoxin ist als „Ribbon-Model“ dargestellt [Müller et al. 2001]

## 1.3. Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase

### 1.3.1. Photosynthese

Durch Photosynthese wird Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt. Forschergruppen der ganzen Welt [Hill, 1934, Bassham et al. 1977, Deisenhofer et al. 1985, Duysens et al. 1961, Kühlbrandt 1984] beschäftigen sich seit Jahrzehnten mit der Frage, wie diese Umwandlung auf molekularer Ebene abläuft. Der Einfall von Licht führt erstens zur Ausbildung eines transmembranalen Protonengradienten für die ATP-Bildung und zweitens zur Erzeugung von Reduktionsäquivalenten für die Herstellung von NADPH. Der Vorgang der Photoreduktion des NADP<sup>+</sup> wurde 1957 von Arnon und Mitarbeitern erstmals beschrieben [Arnon et al. 1957]. Heute weiß man, dass das Licht von Chlorophyllen des Lichtsammelkomplexes des Photosystems II absorbiert wird (Abb.18).

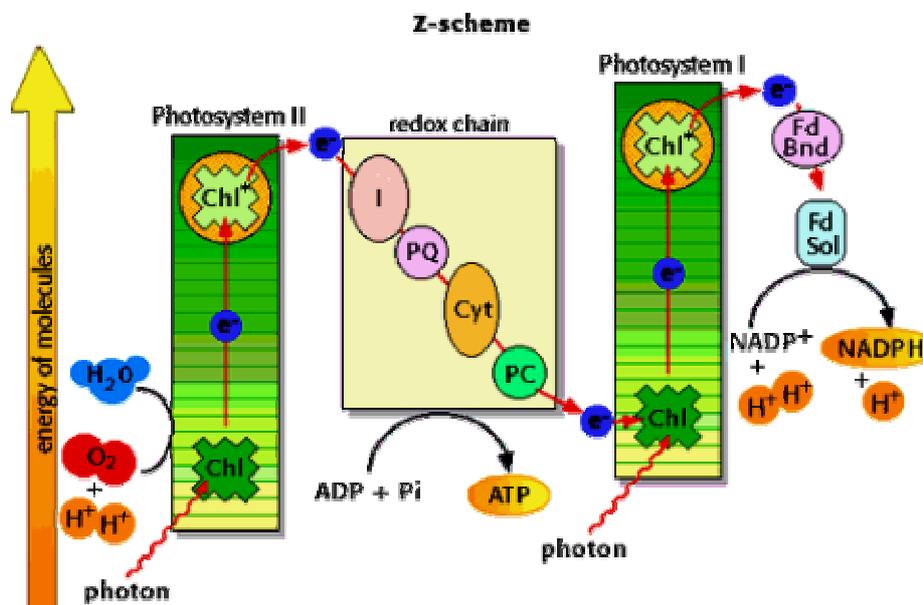


Abb.18: Elektronentransportweg der Photosynthese. Rote Pfeile stellen den Elektronentransportweg dar. Jede dieser Reaktionen ist an eine Redoxreaktion gekoppelt. Wasser wird aufgrund der Lichtreaktion des Photosystems II oxidiert. Die Elektronen werden vom Photosystem II über das Plastochinon (PQ) zum Cytochrom (Cyt) und dann auf das Plastocyanin (PC) weitergeleitet. Eine weitere Lichtreaktion ermöglicht es dem Photosystem I Elektronen für den Transfer zum Ferredoxin und zum NADP<sup>+</sup> zu aktivieren. (Die Abbildung wurde der Internetseite: [http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem\\_sets/photosynthesis\\_1/03t.html](http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/photosynthesis_1/03t.html) entnommen [Prince, 1996].

Die lichtinduzierte Anregung des Reaktionszentrums P680 führt zu einem Elektronenfluss vom angeregten P680 zum Plastochinon. Dabei wird gleichzeitig ein transmembranaler Protonengradient aufgebaut der für die Bildung von ATP essentiell ist. Das Reaktionszentrum

erhält durch die Wirkung eines manganhaltigen Proteins Elektronen aus dem Wasser zurück, wobei gleichzeitig  $O_2$  gebildet wird. Die Elektronen vom Photosystem II fließen durch den Cytochrom-*bf*-Komplex zum Photosystem I [Clayton 1980]. Das Photosystem I vermittelt die vom Licht aktivierte Elektronenübertragung vom Plastocyanin über P700 auf ein Ferredoxin, das die Elektronen an die Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR) transferiert [Ort et al. 1996, Prince 1996]. Die FNR, ein Flavoprotein auf der Stromaseite der Membran, katalysiert im letzten Schritt die Bildung von NADPH. Licht bewirkt also einen Elektronenfluss vom  $H_2O$  zum NADPH unter Bildung von  $O_2$ .



### 1.3.2. Ferredoxin NADP<sup>+</sup> Reduktase

Die Ferredoxin NADP<sup>+</sup> Reduktase ist ein Flavoenzym mit einem Molekulargewicht von 36 kDa, das in höheren Pflanzen, eukaryontischen Algen und photosynthetischen Bakterien vorkommt [Carrillo et al. 1987]. Bei der Photosynthese wird die Bildung von NADPH durch die FNR nach folgender Reaktion katalysiert:



Aufeinanderfolgend werden zwei Moleküle des Einelektronenüberträgers [2Fe-2S]-Ferredoxin I (Fd) benötigt um NADP<sup>+</sup> vollständig zu reduzieren. Diese Reaktion erfolgt in zwei Teilreaktionen. Der erste Schritt beinhaltet die Reduktion des Cofaktors FAD. Das Ferredoxin überträgt ein Elektron auf das FAD, wobei das Semichinonradikal FADH\* entsteht. Die Reduktion des FADH\* durch ein weiteres Ferredoxin führt zur Bildung des FADH<sub>2</sub>, das im zweiten Schritt der Reaktion als Hydriddonor für NADP<sup>+</sup> dient. Durch Hydridtransfer zwischen N5 des FADH<sub>2</sub> und C4 des NADP<sup>+</sup> entsteht NADPH [Karplus et al. 1994]. Die Rückreaktion vom oxidierten zum reduzierten Ferredoxin konnte unter bestimmten Voraussetzungen beobachtet werden [Lazzarini et al. 1962, Nakamura et al. 1972, Mills et al. 1979].

FNR gehört zu der großen Familie der flavinenthaltenden Oxidoreduktasen, die allgemein als „Transducer“ zwischen Nicotinamid Dinukleotiden (Zwei-Elektronentransporter) und verschiedenen ein Elektron Carriern fungieren [Bruns et al. 1995, Correll et al. 1993, Karplus et al. 1991]. Der Elektronentransfer ist seit mehreren Jahren Objekt zahlreicher Studien [Hurley et al. 1993, Hurley et al. 1995, Hurley et al. 1994, Medina et al. 1998, Medina et al. 1992, Sancho et al. 1991]. So konnte auch gezeigt werden, dass das Ferredoxin nicht der einzige mögliche Elektronendonator ist [Fillat et al. 1988]. Organismen, die unter „niedrig

Eisen Bedingungen“ gezüchtet werden, synthetisieren ein Flavodoxin, das anstelle des Ferredoxins die Elektronen zur Reduktion der FNR liefert.

Die Primärstruktur der 303 Aminosäuren enthaltenden FNR aus *Anabaena* konnte erstmals 1990 von Fillat und Mitarbeitern aufgeklärt werden (Abb.19) [Fillat et al. 1990].

```

1  TQAKAKHADV PVNLYRPNAP FIGKVISNEP LVKEGGIGIV QHIKFDLTGG
51  NLKYIEGQSI GIIPPGVDKN GKPEKLRLLYS IASTRHGDDV DDKTISLCVR
101 QLEYKHPESG ETVYGV CSTY LTHIEPGSEV KITGPVGKEM LLPDDPEANV
151 IMLATGTGIA PMR TYLWRMF KDAERAANPE YQFKGFSWL V FGVPTTPNIL
201 YKEELEEEIQQ KYPDNFRLTY AISREQKNPQ GGRMYIQDRV AEHADQLWQL
251 IKNQKTHTYI CGLRGMEEGI DAALSAAA AK EGV TWS DYQK DLKKAGRWHV
301 ETY

```

Abb.19: Primärstruktur der FNR aus *Anabaena*.

Die Ferredoxin NADP<sup>+</sup> Reduktase setzt sich aus zwei unterschiedlichen Domänen zusammen: der N-terminalen FAD-bindenden Domäne und der C-terminalen NADP<sup>+</sup>-bindenden Domäne (two domain Motiv) (Abb.20) [Correl et al. 1993]. Dieses Grundmotiv konnte 1991 von Karplus und Mitarbeitern anhand der Kristallstruktur der FNR aus Spinat aufgezeigt werden [Karplus et al.1991]. Die Strukturen der bis heute erhaltenen Ferredoxin NADP<sup>+</sup> Reduktasen [Bruns et al. 1995, Karplus et al. 1991, Correl et al. 1992, Lu et al. 1994, Nishida et al. 1995, Wang et al. 1997] stimmen weitestgehend überein. So besteht die FAD-bindende Domäne aus einem sechssträngigen antiparallelen  $\beta$ -Barrel, das durch eine  $\alpha$ -Helix verschlossen ist. FAD ist außerhalb des antiparallelen  $\beta$ -Barrels lokalisiert, wobei der Isoalloxazinring des FAD in einer Tasche zwischen dem vierten und fünften Strang des Barrels liegt. Die Phosphatgruppen des FAD sind über Wasserstoffbrücken mit Arg77, Ser88, Val116 und Cys117 an die Ferredoxin NADP<sup>+</sup> Reduktase aus *Anabaena* koordiniert. Gomez-Moreno und Mitarbeiter konnten über zielgerichtete Mutagenese zeigen, dass Arg77 für die Bindung des Cofaktors essentiell ist [Gomez et al.1998]

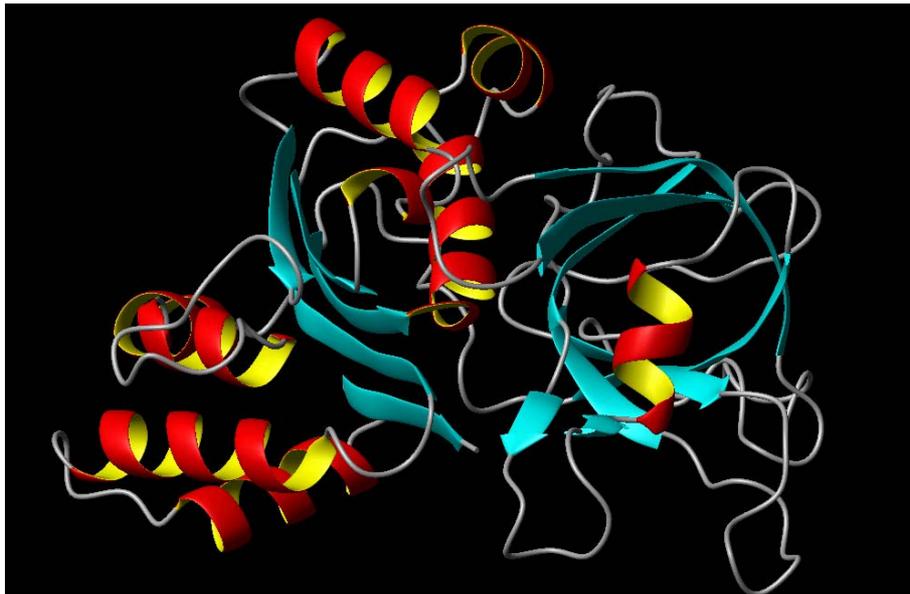


Abb.20: Kristallstruktur der FNR aus Anabaena [Serre et al. 1996].

### 1.3.2.1. Die NADP<sup>+</sup>-Bindungsstelle

Die NADP<sup>+</sup>-bindende Domäne wird aus einem fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt gebildet, welches von 6  $\alpha$ -Helices flankiert wird [Bruns et al. 1995, Karplus et al. 1995]. Die Kristallstruktur des Komplexes zwischen FNR und dem nativen Redoxpartner NADP<sup>+</sup> konnte 1996 von Serre und Mitarbeitern bestimmt werden [Serre et al.1996] (Abb.21).

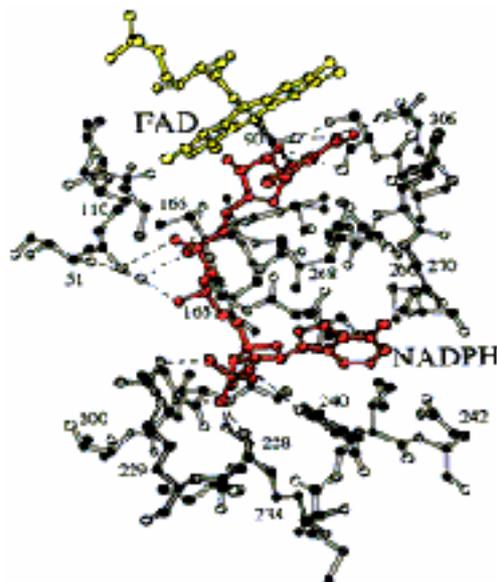


Abb.21: Komplexbildung zwischen NADPH und der FNR. Gelb: FAD; rot: NADPH. Der Nicotinamidteil des NADPH ragt ins Lösungsmittel [Serre et al.1996].

Dabei ist NADP<sup>+</sup> über den 2'-5' Adeninanteil an das Protein gebunden. Eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Adenin-Ring und Glu237 sowie van der Waals Kontakte mit der Seitenkette von Tyr235 stabilisieren den Komplex. Ser223, Arg224, Arg233 und

Tyr235 bilden zudem Wasserstoffbrücken zur 2'-Phosphatgruppe des NADP<sup>+</sup> aus. Der ins Lösungsmittel ragende Nicotinamidanteil des NADP<sup>+</sup> zeigt jedoch keine Wechselwirkungen zur FNR auf. Ein Hydridtransfer zwischen FADH<sub>2</sub> und NADPH ist deshalb schwer vorstellbar. Deng und Mitarbeiter konnten 1999 zeigen, dass der Nicotinamidring des NADP<sup>+</sup> im Komplex mit einer C-terminalen Mutante (Y308S) des FNR parallel zum Isoalloxazinring des FAD angeordnet ist [Deng et al. 1999]. Deshalb sollte der Bindung des Nicotinamidringes an die FNR eine konformationelle Änderung des C-terminalen Tyrosinrestes Y308 vorangehen.

### 1.3.2.2. Die Ferredoxin -Bindungsstelle

Die Fd-Bindungsdomäne stellt eine konkave Oberfläche der FNR dar, die den exponierten Teil des Dimethylbenzyl-Rings des Flavins enthält. Im Komplex zwischen Fd und FNR ist der [2Fe-2S]-Cluster des Ferredoxins in unmittelbarer Nachbarschaft zum FAD der Reduktase lokalisiert (Abb.22). Der kürzeste Abstand zwischen den beiden Redoxzentren beträgt 6 Angström. [Kurusu et al. 2001]. Durch strukturelle Untersuchungen [Kurusu et al. 2001] und zielgerichtete Mutagenese konnte gezeigt werden, dass die Reste Arg16, Lys72, Lys75 und Lys293 der FNR aus *Anabaena* essentiell für die Komplexbildung zwischen FNR und Fd sind.

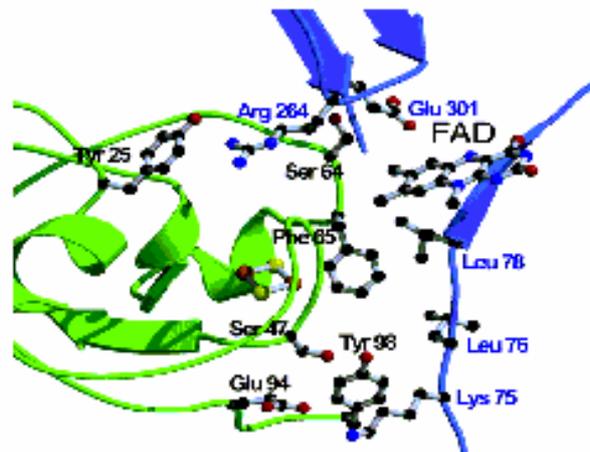


Abb.22: Komplexbildung zwischen FNR und Fd. Der kürzeste Abstand zwischen den Redoxzentren beträgt 6 Angström [Kurusu et al. 2001].

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. *E. coli* Stämme

BL21	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , von Stratagene GmbH, Heidelberg
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> <sup>-</sup> , [F <sup>'</sup> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , <i>lacZΔM15</i> , Tn10( <i>tet</i> <sup>r</sup> )] [Bullock et al., 1987], von Stratagene GmbH, Heidelberg
DH5α	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>U169</i> , <i>deoR</i> , <i>hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ), λ <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , φ80, <i>lacZΔM15</i> , Δ( <i>lacZYA-argF</i> )

#### 2.1.2. Vektoren und Vektorkonstrukte

pKKAdx	[Porter et al. 1991 ; Uhlmann et al. 1992] erhalten von Prof. Dr. R. Bernhardt, Universität des Saarlandes, Saarbrücken
pET-24d(+)	[Studier et al., 1990] von AGS GmbH, Heidelberg
pETHisUG3	[Geschwindner, 1998]
pET32a	[Studier et al., 1990] von AGS GmbH, Heidelberg
pQE30	Qiagen GmbH, Hilden
pTRC99aFNR	[Martinez-Julvez et al., 1996]

#### 2.1.3. Primer für die Konstruktion der Expressionsvektoren (FNR)

Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech GmbH, Ebersberg bzw. von der Firma Sigma GmbH Darmstadt synthetisiert, über HPLC gereinigt und lyophilisiert. Um eine Konzentration von 50 pmol/μl einzustellen wurde das Lyophilisat in der entsprechenden Menge Wasser aufgenommen.

Primer zum Einfügen einer N-terminalen Oligohistidin-Domäne:

5'- GAT ATA CAT ATG CAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GAT CTG GG – 3'

Primer zur Reparatur:

5' – CCT ACA TCT GTG GTT TGC GCG GTA TGG AAG AGG GCA TTG ATG CTG – 3'

5' – CAG CAT CAA TGC CCT CTT CCA TAC CGC GCA AAC CAC AGA TGT AGG –3'

Primer

für die Klonierung einer Oligohistidindomäne in pKKD

5'-CAT GCA TCA TCA TCA TCA TCA CAA GCT TGG CC

GGT GCC GCG CGG CTC -3' (Prm 48)

5'-CAT GGA GCC GCG CGG CAC CAG GCC AAG CTT GTG ATG ATG ATG ATG  
ATG-3' (Prm 49)

BamHI-Primer:

5'-CGG GAT CCA TGG CTC AAG CGA AAG CCA AAC-3'

HindIII-Primer:

5'-ATA ACA ÁGCTTA GTA TGT TTC TAC G-3'

NcoI-Primer:

5'-GCA ACA CCA TGG CTC AAG CGA AAG CCA AAC-3'

## 2.1.4. Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Roche, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Stratagene GmbH, Heidelberg
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Restriktionsendonucleasen	Stratagene GmbH, Heidelberg
Gelase <sup>TM</sup>	BIOzym Diagnostik GmbH, Hameln
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene GmbH, Heidelberg
SAP-Alkaline-Phosphatase	Stratagene GmbH, Heidelberg

## 2.1.5. Chemikalien

Acetylimidazol (AcIm)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarosen:	FMC Bio Products, Rockland, ME, USA
NuSieve GTG	
SeaKem LE	
SeaPlaque GTG	

4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (Pefabloc <sup>®</sup> SC)	Roche, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	E. Merck GmbH, Darmstadt
Ampicillin (Amp)	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Butandion (BD)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	E. Merck GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid	E. Merck GmbH, Darmstadt
HEPES	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Imidazol	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
<sup>15</sup> N-Ammoniumchlorid (99 % <sup>15</sup> N)	Martek Bioscience Corp., Columbia, MD, USA
D <sub>2</sub> O (99% D)	Martek Bioscience Corp., Columbia, MD, USA
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -D-Glucose (98 - 99 % <sup>13</sup> C)	Martek Bioscience Corp., Columbia, MD, USA
<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -Glycerin (99% <sup>13</sup> C)	Martek Bioscience Corp., Columbia, MD, USA
Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid (IPTG)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Kanamycin (Kan)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Luria Broth Base	Gibco BRL Life Technologies GmbH,
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	E. Merck GmbH, Darmstadt
Methylenblau	E. Merck GmbH, Darmstadt
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Serva GmbH & Co., Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva GmbH & Co., Heidelberg
Natriumnitrit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nickelsulfat (NiSO <sub>4</sub> )	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Ni-NTA-Hrp-Konjugat	Qiagen GmbH, Hilden
N-Lauroylsarcosin (Na <sup>+</sup> -Salz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Polyethylenglykol (PEG) 3500	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Rubidiumchlorid (RbCl)	E. Merck GmbH, Darmstadt
Terbium(III)-Chlorid	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trifluoressigsäure (Uvasol <sup>®</sup> , TFA)	E. Merck GmbH, Darmstadt
Tween 20	Roth GmbH, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (30%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Natriumdithionit

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### 2.1.6. Standards

DNA-Molekulargewichts-Marker und -Massenstandards

100 Basenpaar-Leiter	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
1000 Basenpaar-Leiter	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
High DNA Mass Ladder	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenst.
Low DNA Mass Ladder	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenst.
Protein-Molekulargewichts- und IEF-Marker	
Low Range (43 kDa–2.3 kDa)	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenst.

### 2.1.7. Kits

QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden

### 2.1.8. Geräte

Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Badthermostat C1-W5P	Haake Messtechnik GmbH & Co., Karlsruhe
Brutschrank BKE 40	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Chromatographieanlagen:	
FPLC <sup>®</sup> GP-250 Plus	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
HiLoad <sup>®</sup> System Plus	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Dampfautoklav FVS 1/2	Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz
Druckfiltrations-Rührzellen Amicon 8003, 8050, 8200 und 8400	Millipore GmbH, Eschborn
Elektroblotapparatur Sartoblot II	Sartorius AG, Göttingen
Elektrophoreseapparatur GNA-100	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Elektrophoreseapparatur Mini-Protean II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Dual Slab Cell	
Elektrophoresesystem PhastSystem <sup>®</sup>	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Eppendorf Multipette Typ 4780	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Eppendorf Response Typ 4850	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Fraktionssammler SuperFrac <sup>®</sup>	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Geltrockner Model 543	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hochdrucksterilisator Getinge 44EN	Getinge AB, Getinge, Schweden
LiChroGraph <sup>®</sup> Model L-6220 mit UV/VIS-Detektor L-4250	E. Merck GmbH, Darmstadt
Waters 2690 XE Separation Module mit UV/Vis-Detektor Waters 2487	Millipore GmbH, Eschborn
Dual $\lambda$ Absorbance Detector	
Inkubationsschüttler Gyrotory <sup>®</sup> G76	New Brunswick Scientific Inc., Edison, NJ, USA
Inkubationsschüttler Multitron <sup>®</sup>	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Kamera Polaroid MP4+	Bachofer GmbH, Reutlingen
Kühlthermostat F6-C25	Haake Messtechnik GmbH & Co., Karlsruhe
Leitfähigkeitsdetektor	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Membranpumpe MZ 2 C Synchro	Vacuubrand GmbH & Co., Wertheim
Mikrowellengerät R-3V11(W)	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
Minischüttler MS1	Bender & Hobein AG, München
Netzgeräte:	
PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Consort E554	Bachofer GmbH, Reutlingen
PCR-Gerät DNA Engine PTC-200	MJ Research Inc., Watertown, MA, USA
pH-Meter	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
pH/Ion-Meter pHM 240	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
pH-Stat-Apperatur	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Schüttelgerät Promax 2020	Heidolph-Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim
Spektralphotometer U-1100	Hitachi Ltd., Tokyo, Japan
Spektralphotometer Cary 3	Varian Ltd., Mulgrave, Victoria, Australien

Sterilwerkbank Danlaf VFS 1206	Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz
Stopped-Flow System	HiTech Scientific, Salisbury, UK
Sublimator Vaco 10	Zirbus GmbH, Osterode
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Ultraschallhomogenisator Labsonic® U mit Schwingsonden 5 T und 40 T	B. Braun Biotech GmbH, Melsungen
UV-Detektoren UV-M & UV-MII	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
UV-Transilluminator	Renner GmbH, Darmstadt
Vakuummzentrifuge Speed-Vac	Bachofer GmbH, Reutlingen
Zentrifugen:	
Biofuge RS 28 mit Rotor 3746	Haereus Sepatech GmbH, Osterode
RC-5B mit Rotoren SS34 und GS3	Sorvall Instruments, Bad Nauheim
RC 28S mit Rotoren SS34, GSA und GS3	Sorvall Instruments, Bad Nauheim
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

## NMR-GERÄTE

AMX 500/600	Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten
-------------	--

### 2.1.9. Säulen und Chromatographiematerialien

Chromatographie-Leersäulen	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Ni-NTA superflow	Qiagen GmbH, Hilden
Source RPC	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Resource Q (6ml)	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
HiLoad 16/10 Q-Sepharose HP	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Mono Q HR 5/5	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Superdex 75 HR 10/30	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
HiLoad 26/60 Superdex 75 pg	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
HiTrap™ Desalting Säule (5 ml)	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Aquapore RP-300 (C8, 30 x 2.1 mm)	Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
Protein & Peptide C18, Cat.# 218TP52 (52 x 2.1 mm)	Vydac, Hesperia, CA, USA

Blueseparose	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Phenylseparose	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

### 2.1.10. Sonstiges Material

Dialyseschlauch Spectra/Por 3, Ausschlußgröße: 3,5 kDa	Spectrum Medical Industries Inc., L.A., CA, USA
Einmalspritzen, 1 ml, 5 ml, 20 ml & 50 ml	B. Braun Melsungen AG , Melsungen
Einwegkonzentratoren Vivaspin 16 und 4 ml (MWCO: 5 o. 10 kDa)	Millipore GmbH, Eschborn
Eppendorf-Reaktionsgefäße 3810, 0.5 ml, 1.5 ml und 2.0 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Falcon-Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner & Söhne GmbH & Co. KG, Nürtingen
Gefrier Röhrchen	Nalge Company, Rochester, NY, USA
Membranfilter, 0.2 µm und 0.45 µm	Sartorius AG, Göttingen
Membranfilter, Anodisc 13, 0.1 µm	Whatman, Mainstow, UK
NMR-Probenröhrchen, Ø = 5 mm	Wilmad Glass, Buena, NY, USA
Partikel-Separator Micropure™, 0.22 µm	Millipore GmbH, Eschborn
Petrischalen aus Polystyrol, Ø = 94 mm	Greiner & Söhne GmbH & Co. KG, Nürtingen
Pipetten-Spitzen:	
gelb (5-200 µl), blau (200-1000 µl)	Sarstedt GmbH, Nümbrecht
weiß (0.5-10 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Polypropylen-Röhrchen, 13 ml	Sarstedt GmbH, Nümbrecht
Shigemi-NMR-Röhrchen, Ø 4.2 mm	Shigemi Co., Tokyo, Japan
Sterilfilterhalter, 0.2 µm und 0.45 µm	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Zentrifugenbecher aus Polypropylen für Sorvall-Rotoren SS34, GSA und GS3	Nalge Company, Rochester, NY, USA

### 2.1.11. Antibiotikastammlösungen

Ampicillin:	200 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>milli</sub> ;	1:1000 zum Medium
Kanamycin:	25 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>milli</sub> ;	1:500 zum Medium

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert und in Aliquots von 1ml bei -20 °C gelagert.

### 2.1.12. Medien für die Kultivierung von E.coli

#### S.O.C-Medium

20 g/l	Pepton aus Casein (Bacto Trypton)
5 g/l	Hefeextrakt (Bacto Yeast Extrakt)
10 mM	NaCl
2.5 mM	KCl

Medium 20 min autoklavieren und anschließend folgende sterile Lösungen zugeben:

10 ml/l	2 M Glucose
10 ml/l	1 M MgCl <sub>2</sub> / 1 M MgSO <sub>4</sub>

#### LB-Medium (Lurie-Bertani-Medium)

10 g/l	Pepton aus Casein (Bacto Trypton)
5 g/l	Hefeextrakt (Bacto Yeast Extrakt)
10 g/l	NaCl

für LB-Agarplatten außerdem zusetzen:

15 g/l	Agar-Agar
--------	-----------

pH-Wert mit NaOH auf 7.40 einstellen und anschließend 20 min autoklavieren.

#### TB-Medium (Terrific-Broth-Medium)

12 g/l	Pepton aus Casein (Bacto Trypton)
24 g/l	Hefeextrakt (Bacto Yeast Extrakt)
4 ml/l	Glycerin

Medium 20 min autoklavieren und anschließend folgende sterile Lösung zugeben:

100 ml/l	0.17 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / 0.72 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
----------	---

#### Nährbouillon (NB)

17 g/l	Pepton aus Casein (Bacto Trypton)
3 g/l	Hefeextrakt (Bacto Yeast Extrakt)
5 g/l	NaCl

pH-Wert mit NaOH auf 7.40 einstellen und anschließend 20 min autoklavieren.

### 2.1.13. Medien für die Anreicherung mit $^2\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$

#### $^{15}\text{N}$ -Medium:

6 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
3 g/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
0.5 g/l	$\text{NaCl}$
1 g/l	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$

pH-Wert der Lösung mit NaOH auf 7.40 einstellen und im Autoklav sterilisieren.

Anschließend folgende sterile Lösungen zugeben:

1 ml/l	1 M $\text{MgSO}_4$
1 ml/l	1 M $\text{CaCl}_2$ , 0.1 M $\text{FeCl}_3$
0.1 ml/l	20 mg/ml Thiaminhydrochlorid
5 ml/l	50% (v/v) Glycerin
5 ml/l	20% (w/v) Glucose

#### $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Medium

6 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
3 g/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
0.5 g/l	$\text{NaCl}$
1 g/l	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$

pH-Wert der Lösung mit NaOH auf 7.40 einstellen und im Autoklav sterilisieren.

Anschließend folgende sterile Lösungen zugeben:

1 ml/l	1 M $\text{MgSO}_4$
1 ml/l	1 M $\text{CaCl}_2$ , 0.1 M $\text{FeCl}_3$
0.1 ml/l	20 mg/ml Thiaminhydrochlorid
5 ml/l	50% (v/v) $^{13}\text{C}_3$ -Glycerin (99% $^{13}\text{C}$ )
5 ml/l	20% (w/v) $^{13}\text{C}_6$ -D-Glucose (98-99% $^{13}\text{C}$ )

#### D/ $^{15}\text{N}$ -Medium

72 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
17 mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
0,5 g/l	$\text{NaCl}$
1 g/l	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$

1 ml/l	1 M MgSO <sub>4</sub>
1 ml/l	1 M CaCl <sub>2</sub> , 0.1 M FeCl <sub>3</sub>
0.1 ml/l	20 mg/ml Thiaminhydrochlorid
5 ml/l	20% (w/v) Glucose
5 ml/l	50% (v/v) Glycerin

mit D<sub>2</sub>O auf 1l auffüllen und sterilfiltrieren.

### 2.1.14. Puffer und Elutionsprogramme für Adx

Puffer für Zellaufschluß

-Tris/HCl           pH 9       50 mM

Puffer und Elutionsprogramm für Phenylsepharose-Chromatographie

*Puffer A (pH 9):*

-Tris   50 mM

-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>   2.2 M

Puffer sterilfiltrieren und entgasen.

*Puffer B (pH 9):*

-Tris   50 mM

-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>   0.4 M

Puffer sterilfiltrieren und entgasen.

*Elutionsprogramm FPLC für Phenylsepharose-Chromatographie:*

-Flußgeschwindigkeit:       3 ml/min

Fluß [ml]	Puffer A	Puffer B
90	100	0
100	80	20
280	30	70
290	0	100
370	0	100
380	100	0
470	100	0

## Puffer und Elutionsprogramm für Q-Sepharose-FF-Chromatographie

*Puffer A (pH 7.5):*

-Tris/HCl 20 mM

*Puffer B (pH 7.5):*

-Tris/HCl 20 mM

-KCl 0.5 M

Puffer entgasen und sterilfiltrieren.

*Elutionsprogramm FPLC für Q-Sepharose-FF-Chromatographie:*

-Flußgeschwindigkeit: 2.5 ml/min

Fluß [ml]	Puffer A [%]	Puffer B [%]
0	100	0
100	100	0
110	65	35
230	20	80
240	0	100
340	0	100
350	100	0
400	100	0

## 2.1.15. Puffer und Elutionsprogramme für FNR

*Puffer für Zellaufschluß*

**-Tris/HCl pH 8 20 mM**

*Puffer für HiTrapQ/Q-Sepharose*

*Puffer A (pH 8):*

-Tris/HCl 20 mM

Puffer sterilfiltrieren und entgasen.

*Puffer B (pH 8):*

-Tris 50 mM

-KCl 0.5 M

Puffer sterilfiltrieren und entgasen.

Zeit	Fluß	Konz. A[%]	Konz. B[%]	Säulenvolumen
0	3	95	5	
5	3	95	5	1.5
14	3			
20	3	80	20	4.5
22	3	0	100	0.6
27	3	0	100	1.5
29	3	95	5	0.6
33	0	95	5	1.2

Tab.1: Elutionsprogramm für HiTrapQ/Q-Sepharose

### Puffer für Affinitätschromatographie mit NiNTA

#### *NiSO<sub>4</sub>-Lösung*

-NiSO<sub>4</sub> 50mM

#### *Lyse-Puffer:*

-Tris/HCl (pH7.6) 50mM

#### *Wasch-Puffer :*

-Tris/HCl 50mM

-Imidazol 20mM

-EDTA 100µM

-NaCl (pH7.6) 100mM

#### *Elutionspuffer :*

-Tris/HCl 50mM

-Imidazol 300mM

-EDTA 100µM

-NaCl (pH7.6) 100mM

#### *Stripping-Puffer:*

-Tris/HCl 50mM

-EDTA 100mM

-NaCl (pH7.6) 500mM

*Dialysepuffer (Puffer D):*

-Tris/HCl	50mM
-EDTA	100µM
-NaCl (pH7.6)	100mM

**Puffer für Bluesepharose:**

-Tris/HCl	50 mM
-----------	-------

Puffer sterilfiltrieren und entgasen.

*Puffer B (pH 8):*

-Tris	50 mM
-KCl	0.5 M

Puffer sterilfiltrieren und entgasen.

Zeit	Fluß	Konz. A[%]	Konz. B[%]	Säulenvolumen
0	3	90	10	
3	3	90	10	2
6	3	80	20	2
26	3	50	50	12
28	3	0	100	1.1
31	3	0	100	2
33	3	100	0	1.1
36	0	100	0	2

Tab.2: Elutionsprogramm für Bluesepharose

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Bakterienstammhaltung

Für die Stammhaltung über einen geringen Zeitraum (1-4 Wochen) wurden die *E. coli* Stämme DH5 $\alpha$ , XL1-Blue, BL21 auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert und bei 4°C gelagert.

Die dauerhafte Kultivierung erfolgte bei –80°C. Dabei wurde eine 700  $\mu$ l LB-Übernachtskultur mit 300  $\mu$ l 50% (w/v) Glycerin versetzt.

#### 2.2.1.2. Ethanolische Fällung von DNA

Um DNA-Konzentrationen in einer Lösung zu erhöhen wurde die wässrige DNA-Lösung mit 0.1 Vol. 3M Natriumacetat und mit zwei Volumina Ethanol versetzt. Die Präzipitation der DNA erfolgte bei Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Nach 30-minütiger Zentrifugation (13000g, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach 5-minütigem Abzentrifugieren (13000g, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig verworfen und das Sediment in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> resuspendiert.

#### 2.2.1.3. Präparation von Plasmid DNA aus *E.coli*

Bei der Plasmidpräparation wurde auf das Standardprotokoll des Qiaprep Spin Plasmid Kits zurückgegriffen.

Dabei wurden zunächst 5ml LB-Rollerkulturen mit einem Klon frisch transformierter *E.coli* BL21 Zellen angeimpft. Nach ca. 10-stündigem Wachstum wurden je 2ml der Kulturen in Eppendorf-Cups überführt und die Zellen 10 min bei 13000 rpm/4°C (Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R) abzentrifugiert.

Die pelletierten Bakterien wurden dann in 250  $\mu$ l Puffer P1 resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen durch alkalische Lyse erfolgte durch Zusatz von 250  $\mu$ l Puffer P2, zur Durchmischung der Suspension wurde diese nach Zugabe von P2 mehrmals vorsichtig geschüttelt. Nach 5 min wurde die Lyse durch Zusatz von 350  $\mu$ l Neutralisationspuffer N3 gestoppt und anschließend

die Suspension sofort vorsichtig geschüttelt, um lokale Bildung von Präzipitaten zu verhindern.

Das bei Zugabe von Puffer N3 gebildete Präzipitat wurde 10 min bei 13000 rpm (Heraeus Sepatech Biofuge 13) abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mittels einer Pipette vorsichtig abgenommen, in eine Qiagen-Spinsäule überführt, für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Zur Entfernung von Nucleasen wurde die Qiagen-Spinsäule im Folgenden mit 500 µl Puffer PB gewaschen, für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die Spinsäule mit 0.75 ml Puffer PE gewaschen, für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um den Waschpuffer vollständig von der Säule zu entfernen, wurde nochmals für 1 min zentrifugiert.

Nach Überführung der Qiagen-Spinsäule in ein steriles 1.5 ml Eppendorf-Gefäß wurden zur Elution der an die Qiagen-Spinsäule gebundenen Plasmid-DNA 50 µl autoklaviertes  $H_2O_{\text{millipore}}$  auf die Säule gegeben, nach einer Minute wurde die Plasmidlösung dann durch Zentrifugation (1min) bei 13000 rpm von der Säule abgetrennt. Um einen hydrolytischen Abbau der DNA zu verhindern, wurde die Plasmidlösung schließlich bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.1.4. Amplifizierung definierter DNA Fragmente über die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde von Kary Mullis [Mullis et al., 1987] entwickelt und findet heute eine breite Anwendung in der Molekularbiologie. Dabei macht man sich die thermostabilen Eigenschaften der Taq-Polymerase aus dem Archaeobakterium *Thermophilus aquaticus* zunutze. Die zu amplifizierende DNA wird im ersten Schritt denaturiert, so dass sie als Einzelstrang-DNA vorliegt. Im zweiten Schritt erfolgt dann sequenzspezifische Hybridisierung der Oligonukleotidprimer und im letzten Schritt die Polymerisation der DNA-Fragmente. Aufgrund der exponentiellen Vervielfältigung der DNA-Fragmente können bereits nach 30 Zyklen große Mengen der gewünschten DNA gewonnen werden.

Außer dem zu amplifizierenden DNA-Fragment wurden Primer eingesetzt, die an ihren Enden zusätzlich die Erkennungssequenz für das entsprechende Restriktionsenzym tragen.

Bei der optimierten PCR Reaktion wurden für einen 100µl Ansatz 10 µl 10xTaq DNA-Polymerase, 3µl dNTP's (200µM), je 1µl Primer(50pmol/µl), 2 µl  $\text{MgSO}_4$ (25mM), 2µl Formamid, 1 µl Taq-Polymerase, 2µl Template und 79µl  $\text{H}_2\text{O}$  zugefügt. Zur Kontrolle wurde ein 100µl Ansatz der gleichen Zusammensetzung ohne Zusatz des Templats pipettiert. Die

DNA-Synthese erfolgte in 40 Zyklen. Dabei kommt es bei der Behandlung der Probe für 60s bei 94°C zur Strangtrennung. Die Hybridisierung der Primer erfolgte dann für 90 s bei 50°C. Jeder Zyklus wurde mit der DNA-Synthese(Elongation) (72s, 90°C) abgeschlossen. Nach dem letzten Zyklus wurde die Probe 5 min auf 72°C erhitzt um unvollständig synthetisierte DNA-Fragmente aufzufüllen.

#### 2.2.1.5. Verdau von DNA mit TypII Restriktionsendonukleasen

Zum Schneiden der DNA wurden pro Restriktionansatz 10-20 U Restriktionsendonuklease sowie 5µl 10xRestriktionspuffer verwendet. Ein vollständiger Verdau erfolgte meist nach ca. 3h bei 37°C. Die Reaktion wurde durch 10 minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt.

#### 2.2.1.6. Erzeugen von DNA Fragmenten mit glatten Enden

Aufgrund der Desoxynukleotidyltransferaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase kann das amplifizierte DNA-Fragment nach einer PCR 3'oligoA-Überhang besitzen. Um den 3'oligoA-Überhang abzubauen wurde die DNA-Probe mit *Pfu* DNA-Polymerase, die eine 3'-5'-exonuklease-Aktivität besitzt, behandelt. Für einen 20 µl Ansatz wurden 1 µl d'NTP's (10 mM), 2µl 10x *Pfu*-DNA-Polymerase Puffer und 1µl *Pfu*-DNA-Polymerase (2.5U/µl) dem PCR-Produkt zugefügt.

#### 2.2.1.7. Dephosphorylierung von DNA Fragmenten

Die Klonierungseffizienz kann gesteigert werden, wenn die linearisierte Vektor-DNA mit Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP) behandelt wird. Dabei werden die Phosphatgruppen an den Enden der Moleküle entfernt um eine Religation zu vermeiden. Die nach der Ligation verbleibende Lücke in einem DNA-Strang des Plasmids (Nick) wird nach der Transformation in der Bakterienzelle geschlossen.

#### 2.2.1.8. Hybridisierung von Oligonukleotiden komplementärer Sequenz

Um kurze, doppelsträngige DNA-Fragmente zu synthetisieren wurden komplementäre Oligodesoxynukleotidprimer hybridisiert. Nach Zugabe der Primer zu 500µl Hybridisierungspuffer (10mM Kaliumphosphat, 200mM KCl, pH 7.5) wurde der Lösung DNA im Verhältnis 1:1 (Primer:DNA) zugesetzt. Die Lösung wurde vorsichtig mit Mineralöl überschichtet und in einem vorgeheizten Ölbad für 5min auf 95°C erhitzt. Um langsames

Abkühlen zu gewährleisten wurde der Ansatz über Nacht in dem unbeheizten Ölbad inkubiert.

#### 2.2.1.9. Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente aufzutrennen wird die Methode der Agarose-Gel-Elektrophorese [Sambrook et al. 1989] verwendet.

Dabei wurden für ein 1%iges Agarosegel 0.5g Agarose (Roth) in einem 250 ml Erlenmeyer-Kolben in 50 ml 1\* TAE-Puffer suspendiert und die Suspension in der Microwelle (Sharp) so lange erhitzt, bis die gesamte Agarose geschmolzen war. Die Lösung wurde dann auf ca. 60°C abgekühlt und 2µl einer 10% Ethidiumbromidlösung hinzugefügt. Die abgekühlte Agaroselösung wurde anschließend in eine Gelwanne gegossen und sofort der Kamm für die Geltaschen eingefügt. Zum Aushärten wurde das Gel ca. 1h bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend der Kamm entfernt. Anschließend wurde die Gelwanne in eine Flachbettgelapparatur (Gel Elektrophoresis Apparatus GNA-100, Pharmacia) gelegt und das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Vor der Auftragung auf das Gel wurden Restriktionsansätze mit 6xProbenpuffer versetzt und danach je 12 µl der Proben auf das Gel aufgetragen. Als DNA-Längenstandards wurden zusätzlich DNA-Marker aufgetragen (100bp-DNA-Ladder von Gibco BRL). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 80V (Spannungsgeber: Power pack 3000, Biorad). Nach einer Laufzeit von ca. 1h wurde das Gel entnommen und die DNA-Fragmente im UV-Licht bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 254 \text{ nm}$  (Flourescent Table, Renner GmbH) sichtbar gemacht und fotografiert (MP4+ Instant Camera System, Polaroid).

#### 2.2.1.10. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-haltigen Lösungen wurde durch Messung der Absorption bei 260nm bestimmt. Dabei ist die optische Dichte einer Lösung mit der Konzentration von  $50\mu\text{g/ml}=1$ , wenn eine Quarzküvette mit der Schichtdicke von 1 cm verwendet wird.

#### 2.2.1.11. DNA Isolation aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) entsprechend der Anleitung des Herstellers.

### 2.2.1.12. Ligation von DNA-Fragmenten

Um eine kovalente Phosphodiester-Bindung zwischen der freien 5'Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe des Zuckers am Ende von DNA-Strängen zu erreichen, wurde der mit Restriktionsendonukleasen gespaltene Vektor und das Insert mit T4-Ligase behandelt. Zur Verringerung der intramolekularen Selbstzirkulation des Vektors wurde die Gesamtkonzentration an freien Enden erhöht, indem die Insert-DNA in 2-3-fachen molaren Überschuss eingesetzt wurde. Entsprechende Volumina von Vektoren und Fragment-DNA wurden gemischt, 2µl 10xLigasepuffer, 1µl T4-Ligase und die entsprechende Menge H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> zupipetiert. Dabei wurde ein Gesamtvolumen von 20µl nicht überschritten.

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C

### 2.2.1.13. Sequenzierung von Plasmid DNA

Die Sequenzierungen wurden nach der Didesoxynucleotid-Methode mit den Primern „*HindIII*-Primer und *BamHI*-Primer“ durchgeführt [Sanger et al., 1977]. Die fluoreszenzmarkierten dNTPs verursachen nach zufälligem Einbau in einer PCR einen Abbruch der Polymerisationsreaktion, so dass Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Auf dem zur anschließenden Analyse eingesetzten Agarose-Gele wird dadurch ein charakteristisches Bandenmuster erzeugt, aus dem je nach eingesetzten Primer die entsprechende Sequenz abgeleitet werden kann. Die Sequenzierung wurde freundlicherweise von der Firma Scientific Research & Development GmbH, Oberursel durchgeführt.

## 2.2.2. Molekularbiologische Methoden für *E.coli*

### 2.2.2.1. Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen

Kompetente *E.coli* Zellen werden benötigt, um eine Transformation von Plasmid DNA zu ermöglichen. Dabei wurde nach der Methode von Hanahan [Hanahan et al. 1985] folgendermaßen vorgegangen: Mittels einer Impföse wurden einige Zellen einer Glycerinstammlösung von *E.coli* X (X steht für BL21, XL1, DH5 $\alpha$ , XL10, BL21(DE3)) entnommen und auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Memmert) inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie von der Platte angeimpft und im Inkubationsschüttler (Infors CH 4103, New Brunswick G76) bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Nachdem die Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0.5 herangewachsen waren, wurden sie 10 min bei 4°C/5000 rpm (Biofuge 28RS, Rotor 3746, Heraeus Sepatech) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 15 ml TF-B<sub>1</sub>-Puffer resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und danach bei 4°C/5000 rpm abzentrifugiert. Daraufhin wurden die pelletierten Zellen in 2 ml TF-B<sub>2</sub>-Puffer aufgenommen, in Eppendorf-Gefäße zu 100 $\mu$ l Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 2.2.2.2. Transformation

Zur Expression des bAdx wurden 100  $\mu$ l kompetente *E.coli* BL21-Zellen 5 min auf Eis aufgetaut. Nach Zufügen von 1  $\mu$ l der Plasmidlösung wurde die Zellsuspension 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Penetration der Plasmide in die Bakterienzelle wurde durch einen Hitzeschock bei 42°C für 45 sec ermöglicht. Anschließend wurde die Lösung für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde schließlich in 900 $\mu$ l SOC-Medium überführt und 1 Stunde bei 37° geschüttelt.

Zur Selektion transformierter Bakterienzellen macht man sich die auf dem Plasmid pKKA<sub>dx</sub> codierte Ampicillin-Resistenz zunutze. Plasmidtragende Zellen exprimieren die  $\beta$ -Lactamase und können deshalb auf LB-Amp-Platten wachsen. Je 150  $\mu$ l des Transformationsansatzes wurden deshalb auf vorgewärmte LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei der FNR wurde entsprechend vorgegangen.

### 2.2.2.3. Expression von $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ angereicherten Adx in *E.coli* mittels des pKKHC Vektors

Die Expression des bAdx erfolgte in M9-Medium, dem zur Isotopenanreicherung 1g/l  $^{15}\text{N}$  markiertes  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  als Stickstoffquelle sowie 1g/l  $^{13}\text{C}$ -Glucose und 2,5g/l  $^{13}\text{C}$ -Glycerin als Kohlenstoffquelle zugesetzt wurden. Zwei 2 l Kulturkolben mit je 750 ml Medium wurden direkt mit den frisch transformierten *E.coli* BL21 Zellen angeimpft. Dazu wurden die Amp-Platten mit Medium gespült und die erhaltene Suspension dem Nährmedium zugesetzt, so dass dessen  $\text{OD}_{600}$  bei ca. 0,1 lag. Unter ständiger Kontrolle der  $\text{OD}_{600}$  wurden die Kolben bei 37°C im Schüttler inkubiert. Bei einer  $\text{OD}_{600}$  zwischen 0,8 und 0,9 erfolgte die Induktion durch Zusatz von 1mM IPTG. Danach wurde erneut 100 mg/ml Ampicillin zugesetzt, um das Wachstum von Fremdorganismen zu verhindern. Nach Induktion wurden die Zellen weitere 12 Stunden bei 37°C inkubiert und dann geerntet.

### 2.2.2.4. Wachstum in $\text{D}_2\text{O}$

Zum Test des Wachstumsverhaltens in  $\text{D}_2\text{O}$  und der Spektrenqualität der deuterierten Proben wurde eine Expression in  $\text{D}_2\text{O}$  durchgeführt.

## 2.2.3. Proteinchemische Methoden

### 2.2.3.1. Ernte und Aufschluss

Der Inhalt der zwei 750 ml Kulturen wurde in zwei Zentrifugenbecher überführt und für 10 min bei 4°C und 5000rpm zentrifugiert (Rotor GS-3, Sorvall RC28S, Du Pont).

Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die bakteriellen Pellets in insgesamt 40ml 50mM Tris/HCl-Puffer pH 9 resuspendiert. Zur Freisetzung des bAdx wurden die Zellen dann im Eisbad zehnmal für jeweils 15 sec im Abstand von einer Minute bei einer Leistung von 200W mit einem Ultraschallhorn (Ultraschallgerät Lab Sonic U) beschallt.

Um den Abbau der freigesetzten Proteine durch Proteasen zu verhindern, wurden der Suspension vor der Ultraschallbehandlung 0,1 mg/ml eines Protease-Inhibitors (Complete™, Protease-Inhibitoren-Cocktail, Boehringer) zugesetzt.

Die Suspension wurde dann zur Abtrennung der Zelltrümmer in Zentrifugenröhrchen überführt und 30 min bei 4°C und 19000 rpm (Rotor SS34) zentrifugiert. Das rötlich (Adx) bzw. gelblich gefärbte Lysat (FNR) wurde sofort weiterverarbeitet.

### 2.2.3.2. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Die Löslichkeit der meisten Proteine ist bei hohen Salzkonzentrationen erniedrigt. Dieser als „Aussalzen“ bekannte Effekt beruht auf der Neutralisation von Oberflächenladungen des Proteins durch die zugeführten Ionen sowie der Erniedrigung der effektiven Konzentration des Wassers. Die Löslichkeit eines Proteins hängt von der Ionenstärke, dem pH-Wert und der Temperatur ab. Deshalb lassen sich durch „Aussalzen“ Proteine fraktionieren. Bei der Erhöhung der Salzkonzentration kommt es zu Störungen der Protein-Lösungsmittel-Interaktionen, was zu Strukturveränderungen des Proteins führen kann [Stryer 1996]. Die zur Fällung eines Proteins benötigte Salzkonzentration hängt von der Verteilung geladener und nichtionischer hydrophiler Gruppen auf der Proteinoberfläche sowie von der Zahl und der Verteilung der exponierten hydrophoben Gruppen ab.

Die Aufreinigung des Rohlysats begann mit einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung von 0-30 % bzw. 30-45%.

### 1. Ammoniumsulfatfällung

Dem Rohlysat wurde unter Rühren bei 4°C zunächst langsam festes Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 30% (w/v) zugeführt. Zur vollständigen Präzipitation der Proteine wurde die Lösung danach weitere 30 Minuten auf Eis gerührt. Nach anschließender Zentrifugation bei 4°C und 19000 rpm für 30 Minuten (Rotor SS-34, Sorvall RC28S) wurde der Überstand abdekantiert und dessen Volumen bestimmt.

### 2. Ammoniumsulfatfällung

Bei der zweiten Ammoniumsulfatfällung wurde dem Überstand wiederum langsam Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 50% zugefügt. Nach Zugabe des gesamten Ammoniumsulfats wurde die Lösung erneut 30 Minuten auf Eis gerührt und bei 4°C und 19000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, sterilfiltriert (FP 030/2 Einmal-Filterhalter, Porengröße 0,2 µm-steril, Schleicher & Schüll), für 5 Minuten im Exsikkator entgast und anschließend sofort weiterverarbeitet.

#### 2.2.3.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie von Adx mit Phenyl-Sepharose

Hydrophobe Moleküle in wässriger Lösung bilden Aggregate, da die Umstrukturierung des Wassers bei dieser Aggregation entropisch vorteilhaft ist. Diese von der Struktur des Wassers bestimmte Aggregation hydrophober Moleküle wird als hydrophobe Wechselwirkung bezeichnet. Änderungen der Lösungsmittelstruktur z.B. durch Zusatz von Salzen führen zu Änderungen der hydrophoben Wechselwirkungen.

Chaotrope Salze, die die Struktur des Wassers zerstören, führen meist zu einer Verminderung der hydrophoben Wechselwirkungen, während nicht-chaotrope Salze, wie zum Beispiel  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , diese Wechselwirkungen verstärken und somit zur Fällung von Proteinen führen.

Die Trennung von Proteinen bei der HIC basiert auf Hydrophobizitätsdifferenzen unterschiedlicher Proteine. Als Säulenmaterial dienen hydrophile Matrices, an die kurzzeitig unpolare Reste gebunden sind [Kennedy 1990]. Für den Fall, dass die Proteinlösung eine hohe Ammoniumsulfatkonzentration aufweist, werden die hydrophoben Wechselwirkungen groß sein und die meisten Proteine auf die Säule binden. Die Elution der gebundenen Proteine kann dann durch Verringerung der Ammoniumsulfatkonzentration erfolgen, wobei eine Trennung der Proteine nach ihren Hydrophobizitätenunterschieden erfolgt. Außer von der

Hydrophobizität des Proteins und der Salzkonzentration hängt die Stärke der Bindungen auch von der Temperatur ab. Bei Abnahme der Temperatur nehmen die hydrophoben Wechselwirkungen ab.

Die aus der Ammoniumsulfatfällung erhaltene Proteinlösung wird direkt auf die mit 50mM Tris/HCl und 2,2M Ammoniumsulfat äquilibrierte Phenyl-Sepharose-HP-Säule aufgetragen. Ein linearer Salzgradient von 2,2M-0,4M Ammoniumsulfat führte schließlich zur Elution der an die Säule gebundenen Proteine. Die OD<sub>414</sub> sowie die OD<sub>278</sub> der rötlich gefärbten Fraktionen wurden bestimmt. Die Fraktionen mit hohem Gehalt an Adx wurden vereinigt und über einen Amicon YM 10 Konzentrador (Cutoff von 10 kDa) auf 20mM Tris/HCl pH 7 umgepuffert und eingengt.

Nach mehrmaligem Entgasen und Belüften mit Argon konnte die Probe über Nacht gelagert werden.

#### 2.2.3.4. Ionenaustauschchromatographie von Adx und FNR mit Q-Sepharose

Die Trennung von Proteinen bei der IEC basiert auf Ladungsunterschieden zwischen verschiedenen Proteinen. Die bei der IEC verwendeten Säulenmaterialien tragen ionisierbare funktionelle Gruppen, die zur Erzielung elektrischer Neutralität durch mobile Gegenionen ausgeglichen werden. Man unterscheidet Anionenaustauscher (fixierte Ladung ist positiv) und Kationenaustauscher (fixierte Ladung ist negativ). Die Bindung eines Proteins an einen Ionenaustauscher erfolgt über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Ladungen auf der Proteinoberfläche und den entgegengesetzten fixierten Ladungen des Säulenmaterials. Die Elution des Proteins von der Säule kann durch Erhöhung der Konzentration des mobilen Gegenions erfolgen, das mit dem Protein um die Bindung auf der Säule konkurriert. Die Elution eines Proteins von der Säule ist abhängig von seiner Nettoladung und der Konzentration des mobilen Gegenions [Rossomomando et al. 1990].

Für die Separation des Adx/FNR wurde der Anionenaustauscher Q-Sepharose-FF (Q-Sepharose HP, Pharmacia, Säulenvolumen 25 ml) verwendet, da Adrenodoxin aufgrund des hohen Gehalts an den sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat bei pH 7,5 eine negative Nettoladung trägt. Zur Aufreinigung der FNR wurde zusätzlich der Anionenaustauscher HiTrapQ eingesetzt.

Die Säule wurde zunächst mit 3 Volumenteilen Puffer B (20mM Tris/HCl pH 7,5 / 0,5M KCl) gespült, um sie mit den mobilen Gegenionen zu laden. Das anschließende Spülen mit

Puffer A (20mM Tris/HCl pH 7,5) dient zur Äquilibrierung der Säule. Die über Nacht bei 4°C gelagerte Probe wurde sterilfiltriert und auf die Säule aufgetragen. Um, wie bei der HIC, die unspezifisch gebundenen Proteine von der Säule zu eluieren, wurde mit 3 Volumen Puffer A nachgespült. Ein linearer Salzgradient von 0-0,5 M KCl führt zur Elution des Adx. Alle Fraktionen mit einem Q-Wert ( $OD_{414}/OD_{278}$ ) von über 0,8 und einer  $OD_{414}$  von über 0,4 wurden vereinigt, auf 50 mM Natriumphosphat pH 7,5/ 200mM NaCl umgepuffert und mit Hilfe eines Micro-Spin-Zentrifugenfilters (Vivaspin 15 ml Konzentrador, 5000 MWCO, Vivascience Limited) auf ein Volumen von 400 µl eingeengt.

### 2.2.3.5. Affinitätschromatographie mit Bluesepharose bzw. Metallchelataffinitäts- chromatographie an Ni-NTA superflow

Die funktionelle Gruppe des Blue-Sepharose Materials ist „Cibacron Blue“, das kovalent an Sepharose 6 gebunden ist und eine hohe Affinität zu Kinasen und  $NAD^+$  bzw.  $NADP^+$ -bindenden Proteinen besitzt. Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Säulenmaterial und Protein werden durch Erhöhung der Salzkonzentration (linearer Salzgradient 0-0.5M KCl) aufgehoben. Das Säulenmaterial wurde dabei selbst hergestellt, indem 10 ml Sepharose 4B, 3.5 ml 0.47M  $NaCO_3$  und 70 mg Cibacron 3GA (aufgelöst in 3.5 ml  $H_2O$ ) gemischt wurden. Nach Inkubation der Mischung für 2 Tage bei 42°C wurde das Trägermaterial in eine XK 16/1a Leersäule von Pharmacia überführt und solange mit Arbeitspuffer A (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 µM EDTA, 100 µM  $\beta$ -Mercaptoethanol) gewaschen bis die  $E_{600} = 0$  betrug.

FNR wurde mittels Metallchelatsaffinitätschromatographie (Porath et al. 1975) an Ni-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Superflow (Säule: XK 15/20) aufgereinigt. Proteine, die eine Oligohistidindomäne tragen, können über den Imidazolring des Histidins an die zwei freien Koordinationsstellen des  $Ni^{2+}$ -Ions binden. Die Elution erfolgt durch Zugabe von Imidazol, das mit den Histidinresten um die Bindungsstellen konkurriert. Bei einer Konzentration von ca. 200mM Imidazol erfolgt die vollständige Verdrängung des Proteins.

Die Säule wurde bei einer Flussrate von 3 ml/min 15 min mit „Stripping Buffer“ gewaschen, dann mit 3 Säulenvolumen Wasser gespült und anschließend mit  $Ni^{2+}$ -Ionen geladen. Das anschließende Waschen der Säule dient zur Elution ungebundener Ni-Ionen.

Die Proteinlösung wurde bei einer Flußrate von 3 ml/min auf die beladene Ni-NTA Säule aufgebracht. Nach dem Auftragen des Lysats wurde die Säule zunächst 15 min mit Waschpuffer (10mM Imidazol, 50mM Tris/HCl, 20mM  $Na_2HPO_4$ , pH 8,5) gespült, um

unspezifisch gebundene Proteine zu eluieren. Zur Elution der an der Säule gebundenen His-FNR wurde die Konzentration des Imidazols sprunghaft auf 300mM erhöht. Die Elution des Proteins wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert. FNR enthaltende Fraktionen wurden aufgefangen und über einen Amicon YM 10 Konzentrator (Cutoff von 10 kDa) bei 4°C oder über eine Dialyse gegen 5 l Puffer D bei 4°C über Nacht auf Puffer D gebracht.

#### 2.2.3.6. Gelfiltration

Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei der Gelfiltration nach dem Molekulargewicht [Stellwagen 1990]. Dabei bedient man sich einer porösen Gelmatrix, die sich in einem Säulenkörper befindet und mit einem geeigneten Puffersystem im Gleichgewicht steht. Eine solche Gelmatrix enthält zwei unterschiedliche Lösungsmittelräume, zum einen das sogenannte externe Volumen, das aus den Zwischenräumen in der Gelmatrix gebildet wird, zum anderen das interne Volumen, das sich aus der Flüssigkeit im Inneren der Gelporen zusammensetzt. Große Proteine werden aus dem internen Volumen ausgeschlossen, während kleinere einen längeren Weg über die Zwischenräume zurücklegen müssen. Idealerweise müssten deswegen Proteine umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht eluieren. Diese Annahme trifft auf asymmetrische Proteine jedoch nicht zu, da diese aufgrund ihres im Vergleich zu globulären Proteinen größeren hydrodynamischen Durchmessers früher von einer Gelfiltrationssäule eluiert werden, so dass ihr apparentes Molekulargewicht zu hoch erscheint.

Für die analytische Gelfiltration wurde eine Superdex 75-Säule verwendet (Trennbereich:3-70kD). Die Säule wurde zunächst bei einer Flussrate von 1 ml/min mit 50 mM Na-Phosphat/200 mM NaCl-Puffer pH 7.5 äquilibriert. 50 µl der sterilfiltrierten Adx-Probe wurde auf die Säule aufgetragen und bei einem Fluß von 1 ml/min mit 50 mM Na-Phosphat/200 mM NaCl-Puffer pH 7.5 eluiert. Die Elution der FNR wurde durch Messung der Absorption bei  $\lambda = 278$  nm und  $\lambda = 458$  nm verfolgt.

#### 2.2.3.7. SDS-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Beweglichkeit eines Proteins im Acrylamid-Gel hängt sowohl von der Gesamtladung als auch von seiner Größe ab [Lämmli 1970]. SDS maskiert jedoch den Einfluß der Ladungen. Das Detergenz bindet an das Protein, so dass ein Komplex mit negativer Gesamtladung entsteht. Dadurch ist die Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese-Gel nur noch abhängig von den Massen der Proteine bzw. von der Anzahl der Aminosäuren

des Proteins.

Bei den durchgeführten Elektrophoresen wurde eine Mini-Protean II-Gelelektrophorese Apparatur verwendet. Dabei wurden 17%ige bzw. 12.5%ige Trenngele sowie 4%ige Sammelgele verwendet.

Um die Proteine zu denaturieren wurde die Proteinlösung mit 5x Probenpuffer (250 mM Tris/HCl, 50% (v/v) Glycerin, 7.5 g/l SDS, 0.5 mg/ml Bromphenolblau, pH 8.0; bzw. unter reduzierenden Bedingungen: 12.5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt. Die aufgetragenen Proteine wurden dann im Verlauf der Elektrophorese 15 min bei einer Spannung von 100V fokussiert und bei einer Spannung von 200 V über einen Zeitraum von 45 min getrennt. Das Gel wurde in eine Färbelösung (0.1% PhastGel<sup>®</sup> Blue R, 40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Hac) gegeben, in der Mikrowelle kurz erwärmt und anschließend bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung (40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure, 5% (v/v) Glycerin) entfärbt und die Gele danach getrocknet.

Eine andere verwendete Färbemethode basiert auf der Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R-250. Dabei wird das Gel 15 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend 10 min in kochendem Wasser entfärbt.

#### 2.2.3.8. Analytische HPLC

Zur Analyse des aufgereinigten Adrenodoxins wurden analytische HPLC-Läufe mit einer Mono-Q HR 5/5-Säule (17-0546-01, Pharmacia) und mit einer Resource<sup>™</sup>-RPC-Säule (17-1181-01, Pharmacia) durchgeführt. Bei der analytischen HPLC mit der Mono-Q HR 5/5-Säule wurden Proben des aufkonzentrierten Proteins von je 25  $\mu$ l auf die Säule aufgetragen und mit einem linearen Salzgradienten von 0-0.5M KCl eluiert.

Die Reversed Phase Chromatographie (RPC) beruht wie die hydrophobe Chromatographie auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Resten der Probe und fixierten hydrophoben Molekülen in der Säulenmatrix, der Elutionsmechanismus bei der RPC ist jedoch verschieden. Bei den Reversed Phase Systemen ist die mobile Phase polarer als die stationäre Phase. Die mobile Phase besteht normalerweise aus einer aciden Lösung aus Wasser, dem TFA, Phosphorsäure etc. zugesetzt wird und einem weniger polaren organischen Lösungsmittel, während die stationäre Phase in der Regel aus Silica-Medien besteht, die mit n-Alkylketten (C-4 bis C-18) substituiert wurden. Die in der RPC verwendeten stark sauren Phasen führen meistens zu einer Denaturierung der Tertiär- und Sekundärstrukturen der

aufgetragenen Proteine. Deshalb ist die RPC im Gegensatz zu HIC, die von hydrophoben Gruppen auf der Oberfläche eines Proteins abhängt, von der durch die Primärstruktur bestimmten Hydrophobizität der aufzutrennenden Proteine abhängig.

Durch Veränderung der Lösungsmittelzusammensetzung erfolgt die Elution des gebundenen Proteins, wobei der prozentuale Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase zunimmt. Die Selektivität der RPC kann durch Variation der mobilen Phase verändert werden. So bewirken z.B. hydrophobe Säuren wie TFA eine Steigerung der Hydrophobizität der Proteine und damit eine Erhöhung der Retentionszeit auf der RPC-Säule, indem sie Ionenpaare mit geladenen Gruppen des Proteins bilden. Hydrophile Säuren führen dagegen zu einer Abnahme der Retentionszeit der gebundenen Proteine [Gerber et al. 1979]. Die organische Komponente der mobilen Phase (Acetonitril, Methanol, Ethanol, u. a.) scheint für die Selektivität der RPC nur eine geringe Rolle zu spielen [O'Hare et al. 1979]. Die Auswahl der organischen Komponente richtet sich nach der Löslichkeit der aufzutrennenden Proteine und nach der Viskosität der mobilen Phase. Bei niedrigerer Viskosität wird die durch RPC zu erzielende Auflösung verbessert, deshalb wird vor allem Acetonitril als organische Komponente verwendet.

Die RPC ermöglicht es, Proteine, die sich nur um eine Aminosäure unterscheiden, zu trennen. Damit sollte es möglich sein Stabilitätsprüfungen am Adx durchzuführen.

Bei den HPLC-Läufen (HPLC-Anlage Modell D-6000, Merck-Hitachi) wurde die Resource<sup>TM</sup>-Säule zunächst mit Puffer A (25% (v/v) Acetonitril/ 0.1% (v/v) TFA) äquilibriert. Dann wurden je 50 µl der aufgereinigten Probe sterilfiltriert, entgast und auf die Säule aufgetragen. Die an die Säule gebundenen Proteine wurden durch Messung der Absorption bei  $\lambda = 205$  nm verfolgt.

#### 2.2.3.9. Methoden zur Optimierung der Expressionsrate

Neben dem Test unterschiedlicher Expressionsvektoren wurden verschiedene proteinchemische Verfahren verwendet, um die Expressionsrate zu steigern. Um die Zahl der „Inclusion-Bodies“ zu verringern wurde eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde das Pellet in 20 ml Aufschlusspuffer A (5mM Imidazol, 6M Harnstoff, 300mM NaCl, 50 mM Tris, 100µM  $\beta$ -Mercaptoethanol und Pefabloc SC 0,1 mg/ml, pH8) resuspendiert und die Bakterien mit dem Ultraschallhorn (Branson Ultraschall-Desintegrator Sonifier w-250) aufgeschlossen. Die Lösung wurde anschließend 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und bei 10000g für 15 min zentrifugiert. Die mit Ni-

Ionen geladene Ni-NTA-Säule wurde mit dem zuvor sterilfiltrierten Überstand beladen und mit dem Waschpuffer (6M Harnstoff, 10 mM Tris, 100 $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH6) gespült. Die Säule wurde anschließend mit einem linearen pH-Gradienten auf den Elutionspuffer (6M Harnstoff, 10 mM Tris, 100 $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH4.5) umgepuffert. Das Eluat wurde gesammelt und über Nacht in zwei Stufen auf den Arbeitspuffer (50 mM Tris, 100 $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 100 $\mu$ M EDTA pH8) umgepuffert.

Durch den Zusatz von Riboflavin wurde versucht die Menge an FNR gegenüber dem Apo-FNR (FNR ohne den Cofaktor FAD) zu erhöhen. Dabei wurde jeweils einem Liter TB-Medium 20mg, 50 mg sowie 100mg Riboflavin zugesetzt. Die Analyse dieses Versuchs erfolgte über ein SDS-Page.

Aufgrund der hohen Anteile an Inclusion-bodies bei der FNR-Expression wurde zusätzlich versucht die Temperatur sowie die IPTG Konzentration zu optimieren.

Um die Ausbeuten an mit Isotopen markierten Proben zu erhöhen wurde die Expression in M9-Medium unter Zusatz unterschiedlicher Mengen Glucose bzw. Glycerin getestet.

#### 2.2.3.10. Proteinkonzentrationsbestimmung Adx/FNR

Die Bestimmung der Konzentration des Adx erfolgte durch Messung der Absorption bei 414 nm. Dabei wurde ein Extinktionskoeffizient von 11mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> verwendet. Der Q-Wert (A<sub>414</sub>/A<sub>278</sub>) ist ein Maß für die Reinheit der Probe.

Die quantitative FNR-Bestimmung erfolgte durch Messung der Absorption bei 458 nm. Der Extinktionskoeffizient beträgt hier aufgrund des als Cofaktor gebundenen Flavins 9,4 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Außerdem konnten Aktivitätsmessungen über die Entfärbung von DCPIP erfolgen. Die Reinheit des Proteins wird über den Q-Wert (A<sub>274</sub>/A<sub>458</sub>) bestimmt.

#### 2.2.3.11. Cross-Linking Experimente

Für die chemische Quervernetzung von Adx wurde das bifunktionale Reagenz N-ethyl-N'-dimethylaminopropylcarbodiimide (EDC) verwendet. EDC verbindet kovalent räumlich assoziierte primäre Aminogruppen und kann somit zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen herangezogen werden. Im Falle des Adx soll nachgewiesen werden, ob und in welchem Verhältnis sich Dimere in den jeweiligen Redoxzuständen bilden. Die Experimente wurden freundlicherweise von Dr. Frank Hannemann durchgeführt (Universität des Saarlandes).

## 2.3. NMR-spektroskopische Methoden

### 2.3.1 NMR-spektroskopische Methoden beim Adx

Die NMR-Experimente wurden an DMX500 und DMX600 Avance Bruker Spektrometern (Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten), die mit  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  „triple-resonance Probenköpfen“ und PFG-Technik ausgestattet sind, aufgenommen. Die NMR-Spektrometer arbeiten mit Supercon-Magneten der Firma Oxford Instruments (Oxford, England) und besitzen magnetische Induktionen von 11.74 (DMX500) bzw. 14.09 (DMX600) T. Alle NMR Datensätze wurden bei 27°C aufgenommen.

Die NMR Daten wurden an „Workstations“ der Firma Silicon Graphics unter Zuhilfenahme der X-win-NMR Software (Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten) prozessiert. Die chemische Verschiebung der  $^1\text{H}$ -Resonanzen wurde relativ zum internen Standard Natrium-2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonat (DSS) gemessen. Die Messung der chemischen Verschiebungen des  $^{15}\text{N}$  und des  $^{13}\text{C}$  erfolgte unter Verwendung der Methode von Wishart et al. [Wishart et al. 1995].

Die sequentielle Zuordnung des Proteinrückrats des reduzierten Adx erfolgte durch Einsatz folgender Experimente: HNCA [Kay et al. 1990, Farmer et al. 1992], HN(CO)CA [Bax et al. 1991], H(N)CACO, HNCACB [Wittekind et al. 1993], HNCO [Kay et al. 1990, Westler et al. 1988, Mooberry et al. 1989], HBHA(CO)NH [Grzesiek et al. 1993], HCACO [Kay et al. 1990] sowie das (HCA)CO(CA)NH [Löhr et al. 1995]. Für die Seitenkettenzuordnung wurden folgende Experimente verwendet: 3D (H)CC(O)NH-TOCSY, 3D HCCH-TOCSY [Bax et al. 1990], 3D HNHB [Archer et al. 1991] sowie das 3D TOCSY- $(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -HSQC [Wittekind et al. 1992, Marion et al. 1989, Zuiderweg et al. 1990, Consatantine et al. 1992, Fairbrother et al. 1992]. Um NOE-Informationen zu erhalten wurde zusätzlich ein 3D NOESY- $(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -HSQC und ein 3D NOESY- $(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ -HSQC Spektrum aufgenommen [Wittekind et al. 1992, Marion et al. 1989, Zuiderweg et al. 1990, Consatantine et al. 1992, Fairbrother et al. 1992].

Um zusätzliche Informationen über die Sekundärstruktur des Proteins zu erlangen wurden  $^3\text{J}[\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\alpha}]$ -Kopplungskonstanten des oxidierten Zustands bestimmt.

Nichtselektive  $T_1$ -Zeiten aller detektierbaren  $^1\text{H}$ -Resonanzen des reduzierten Zustands konnten anhand der „inversion recovery“-Methode [Bentrop et al. 1997] bestimmt werden. Die  $T_1$ -Zeiten wurden zur Berechnung von Distanzen zum [2Fe-2S]-Cluster eingesetzt [Bertini et al. 1996].

Der „chemical shift index“ (CSI) [Wishart et al. 1994] des reduzierten Zustands wurde für die

chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}^\alpha$ ,  $^{13}\text{C}'$ ,  $^{13}\text{C}^\alpha$  and  $^{13}\text{C}^\beta$ -Resonanzen bestimmt.

Das von Pristovsek et al. entwickelte Programm Nmr2st [Pristovsek et al. 2000] wurde zur automatischen Suche von Abstandsbeschränkungen eingesetzt. Die Strukturberechnung des reduzierten Adx erfolgte dann unter Zuhilfenahme des Programms DYANA (Version 1.5) [Güntert et al. 1997].

### 2.3.1.1 Der INEPT-Transfer

Der sogenannte INEPT-Transferschritt ist das wichtigste Modul für fast alle heteronuklearen Pulssequenzen, die bei Proteinen Anwendung finden.

Die INEPT-Pulsfolge [Morris und Freeman 1979] bietet die Möglichkeit, beim Kohärenztransfer von I (hohes  $\gamma$ ) nach S (niedriges  $\gamma$ ) die Sensitivität um den Faktor  $\gamma_I/\gamma_S$  zu erhöhen. Beispielsweise wird das bei einem INEPT erzeugte Signal für S =  $^{15}\text{N}$  ca. 10 mal größer als bei der direkten Anregung des  $^{15}\text{N}$ -Spins mittels eines  $90^\circ$  Pulses.

In Abbildung 23 ist die INEPT-Pulssequenz dargestellt. Der  $90^\circ$ -Anregungspuls auf I erzeugt transversale Magnetisierung, während nach der Zeit  $\Delta$  je ein  $90^\circ$ -Puls auf beide Kernsorten den Kohärenztransfer bewirkt. Die  $180^\circ$ -Pulse dienen lediglich zur Refokussierung. In der Zeit  $\Delta$  findet somit nur Kohärenztransfer unabhängig von der chemischen Verschiebung beider Kerne statt.

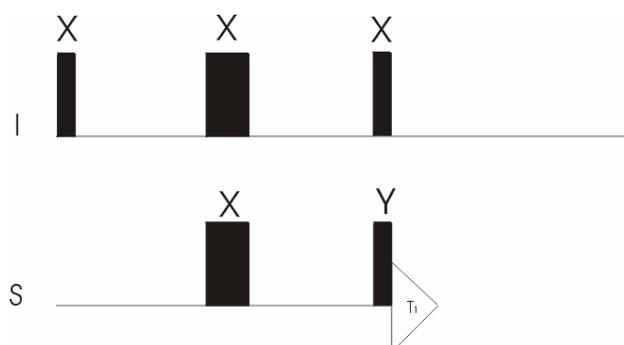


Abb.23: INEPT-Pulssequenz: Schmale und breite Rechtecke repräsentieren  $90^\circ$ - bzw.  $180^\circ$ -Pulse. Die Wartezeit  $\Delta/2$  hat die Länge von  $1/4J_{IS}$ , so dass sich die skalare Kopplung zwischen den beiden Spins optimal entwickeln bzw. refokussieren kann.

### 2.3.1.2 Zuordnung

Die Zuordnung des Adx erfolgte unter Verwendung von Tripleresonanzexperimenten, die Magnetisierungstransfer über skalare Kopplungen zwischen den Heterokernen ausnutzen. Neben  $^1J_{CH}$  und  $^1J_{NH}$  sind dabei die Kopplungen  $^1J_{C\alpha N}$  ( $\sim 11\text{Hz}$ ),  $^1J_{C\alpha N}$  ( $\sim 7\text{Hz}$ ),  $^1J_{NCO}$  ( $\sim 15\text{Hz}$ ),  $^1J_{C\alpha CO}$  ( $\sim 55\text{Hz}$ ),  $^1J_{C\alpha C\beta}$  ( $\sim 35\text{Hz}$ ) von Bedeutung. Oftmals werden die Heterokerne X und Y sowie das an X gebundene Proton korreliert. Eine solche Korrelation entsteht durch Verschachtelung eines H,X-HSQC und eines H;Y-HMQC Experimentes. Dem INEPT-Transfer zu Beginn folgt eine Wartezeit  $\tau$ , in der sich Antiphasenmagnetisierung des X-Kernes bezüglich Y entwickelt, die für die Dauer der Evolutionszeit  $t_y$  in Multiquantenkohärenz umgewandelt wird. Die nachfolgende Umkehrung der Magnetisierungstransferschritte ermöglicht die Detektion des Protons  $H_X$ , während die chemische Verschiebung von X in der Evolutionszeit  $t_x$  aufgezeichnet wird. Diese sogenannte „out and back“ Strategie des Magnetisierungstransfers ist unumgänglich für Korrelationen mit nicht protonierten Heterokernen (z.B.  $Y=^{13}\text{CO}$ ). Da transversale Magnetisierung von Y nur während der Evolutionszeit vorliegt, ist dieses Schema besonders vorteilhaft, wenn Y eine Kernsorte mit kurzen  $T_2$ -Relaxationszeiten ist. Damit ist es möglich die Werte der chemischen Verschiebung eines  $^1\text{H}$ -Kernspins ( $H^N$  oder  $H^\alpha$ ) mit denen der direkt gebundenen  $^{15}\text{N}$  bzw.  $^{13}\text{C}$ -Kernspins und eines weiteren  $^{13}\text{C}$ -Kernspins des Proteinrückrats zu korrelieren. Jede der drei Dimensionen eines 3D-Tripleresonanzexperimentes ist den Werten der chemischen Verschiebung einer der drei Kernsorten zugeordnet. Man unterscheidet bei Zuordnungsexperimenten zwischen Experimenten für die sequentielle Zuordnung, die zur Zuordnung des Proteinrückrats dient und Experimenten, die zur Seitenkettenuordnung dienen.

#### Sequenzielle Zuordnung

Die für diese Arbeit verwendeten Experimente für die sequentielle Zuordnung sollen an dieser Stelle näher erläutert werden. Das 3D HNCA-Experiment [Kay et al. 1990, Farmer et al. 1992] dient zur Detektion der intraresidualen Kerne  $^1\text{H}^N$ ,  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}^\alpha$  sowie der interresidualen  $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerne (Abb.24). Unterschieden werden die inter- und intraresidualen  $^{13}\text{C}^\alpha$ -Resonanzen durch ihre unterschiedlichen Intensitäten. Über einen INEPT-Transfer wird die Magnetisierung von den Amid-Protonen auf die  $^{15}\text{N}$ -Kerne übertragen. Dabei entwickelt sich nur heteronukleare  $^1J^{\text{HN}}$ -Kopplung zwischen  $\text{H}^N$  und  $^{15}\text{N}$ -Kernen. Anschließend wird die Magnetisierung durch ein  $90^\circ$  Pulspar auf  $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerne übertragen. In der darauffolgenden

Periode  $t_1$  entwickelt sich die chemische Verschiebung der  $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerne (Abb.25). Ein weiteres Pulspar transferiert die Magnetisierung wieder auf die  $^{15}\text{N}$ -Kerne. Während  $t_2$  entwickelt sich die chemische Verschiebung der  $^{15}\text{N}$ -Kerne. Ein  $90^\circ$ -Protonenpuls transferiert die Magnetisierung wieder auf die Amidprotonen. In  $t_3$  entwickelt sich die chemische Verschiebung für die  $^1\text{H}$ -Protonen. Die während  $t_1$  und  $t_2$  gelegten Delays wurden unter Gewährleistung einer maximalen Kopplung ausgewählt.

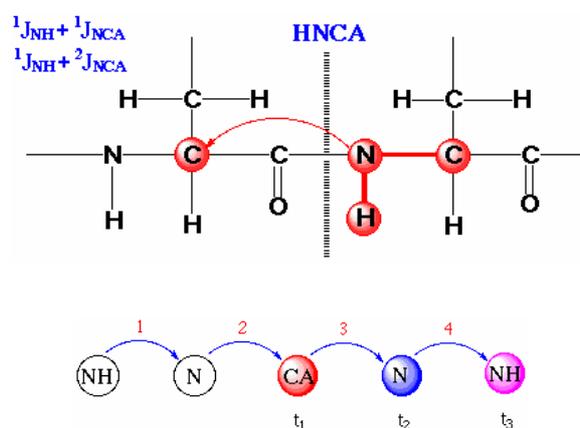


Abb.24: Das HNCA-Experiment [Kay et al. 1990]. Im ersten Schritt des HNCA Experiments wird über eine INEPT Pulssequenz Magnetisierung vom  $\text{H}^{\text{N}}$  auf das  $^{15}\text{N}$  durch  $^1\text{J}^{\text{HN}}$ -Kopplung übertragen. Anschließend wird die Magnetisierung durch ein  $90^\circ$  Pulspar über  $^1\text{J}^{\text{N,CA}}$ -Kopplung auf  $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerne übertragen. In der darauffolgenden Periode  $t_1$  entwickelt sich die chemische Verschiebung der  $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerne. Während  $t_2$  entwickelt sich dann die chemische Verschiebung der  $^{15}\text{N}$ -Kerne. Im vierten Schritt wird die Magnetisierung wieder auf die  $\text{H}^{\text{N}}$  Protonen übertragen und anschließend detektiert.

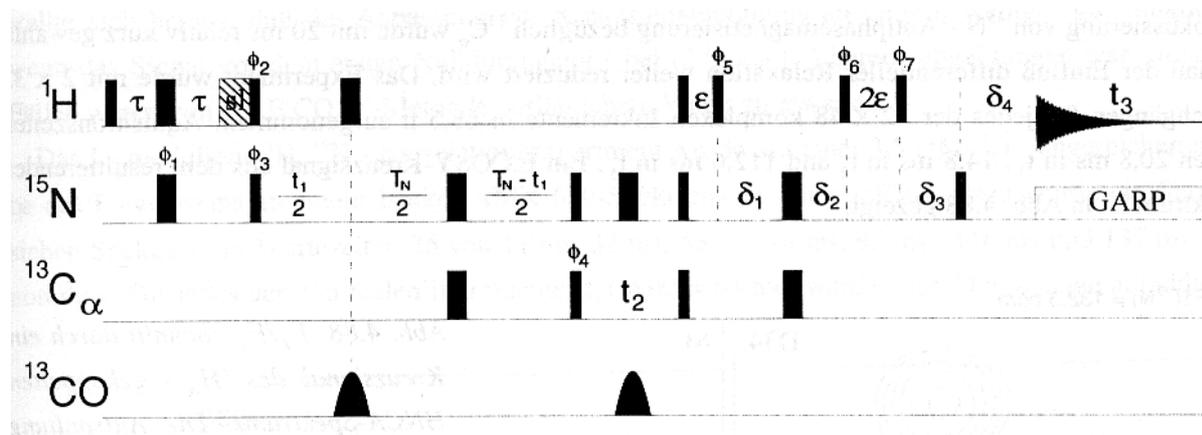


Abb.25: Pulssequenz des HNCA Experimentes. Schmale und breite Rechtecke repräsentieren  $90^\circ$ - bzw.  $180^\circ$ -Pulse. Alle nicht gekennzeichneten Pulse wurden in x-Richtung eingestellt. Pulse auf  $\alpha$ -Kohlenstoffe wurden bei einer RF-Feldstärke von 4,63 kHz angewendet; die Carbonyl  $180^\circ$ -Pulse hatten das Amplitudenprofil einer sinc-Funktion und eine Länge von  $108\mu\text{s}$ . Wartezeiten und Phasenzyklus:  $\tau = 2.3\text{ ms}$ ;  $t_1/2 = 46.1\text{ ms}$ ;  $T_N = 22\text{ ms}$ ;  $\delta_1 = 10.04\text{ ms}$ ;  $\delta_2 = 2.2\text{ ms}$ ;  $\delta_3 = 7.775\text{ ms}$  ( $=\delta_1 - \delta_2 - \epsilon$ );  $\delta_4 = 4.548\text{ ms}$  ( $=\delta_1 + \delta_2 - \delta_3 + \tau_{180^\circ}({}^{13}\text{C}_\alpha) - \tau_{90^\circ}({}^{15}\text{N})$ )

Das HNHB Experiment [Archer et al. 1991] benötigt eine einfach gelabelte  ${}^{15}\text{N}$ -Probe und dient zur Detektion der  $\text{H}^\beta$  und der Amid-Protonen.

Das 3D-HN(CO)CA-Experiment [Bax et al. 1991] ähnelt dem HNCA-Experiment. Im Gegensatz zum 3D-HN(CO)CA-Experiment wird aber nur der interresiduale  ${}^{13}\text{C}^\alpha$ -Kern der vorangegangenen Aminosäure detektiert.

Beim 3D-H(N)CA,CO werden  ${}^1\text{H}^{\text{N}}$ -,  ${}^{13}\text{C}^\alpha$ - und  ${}^{13}\text{CO}$ -Kerne der intraresidualen Aminosäure und  ${}^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerne der vorhergehenden Aminosäure detektiert.

Das 3D-HCACO erfasst die  ${}^{13}\text{C}^\alpha$ ,  ${}^{13}\text{CO}$  und  ${}^1\text{H}^\alpha$  Kerne, während das 3D HNCACB dazu dient,  ${}^{13}\text{C}^\alpha$ ,  ${}^{13}\text{C}^\beta$ ,  ${}^{15}\text{N}$  und  $\text{H}^{\text{N}}$  Protonen zu detektieren.

Weitere Experimente, die der sequentiellen Zuordnung des reduzierten Adx dienen, sind das 3D HNCO ( ${}^1\text{H}^{\text{N}}$ ,  ${}^{15}\text{N}$ ,  ${}^{13}\text{C}^\alpha$  werden detektiert), das 3D (HCA)CO(CA)NH (intraresiduale  ${}^{13}\text{CO}$ ,  ${}^{15}\text{N}$  und  ${}^1\text{H}^{\text{N}}$  werden detektiert) und das 3D HBHA(CO)NH, das die Detektion der Kerne  ${}^1\text{H}^\alpha$  und  ${}^1\text{H}^\beta$  der vorangegangenen Aminosäure und die intraresidualen Kerne  ${}^{15}\text{N}$  und  $\text{H}^{\text{N}}$  ermöglicht.

## Die Seitenkettenuordnung

### 3D TOCSY- $({}^{15}\text{N}, {}^1\text{H})$ -HSQC

Das 3D TOCSY- $({}^{15}\text{N}, {}^1\text{H})$ -HSQC [Wittekind et al. 1992, Marion et al. 1989, Zuiderweg et al. 1990, Consatantine et al. 1992, Fairbrother et al. 1992] korreliert bereits bekannte  ${}^1\text{H}^{\text{N}}$ ,  ${}^{15}\text{N}$  chemische Verschiebungen mit den  ${}^1\text{H}$  chemischen Verschiebungen der Protonen der dazugehörigen Aminosäureseitenkette mit Hilfe der skalaren Kopplung der Kernspins innerhalb eines Spinsystems. Zu Beginn wird die Magnetisierung auf allen  ${}^1\text{H}$ -Kernspins

angeregt, deren chemische Verschiebung sich dann während  $t_1$  entwickelt (Abb.26). Während der TOCSY-Mischzeit werden Korrelationssignale zwischen allen skalar koppelnden  $^1\text{H}$ -Kernspins erzeugt (inklusive der  $\text{H}^{\text{N}}$ -Kernspins, deren chemische Verschiebung bereits bekannt ist). Nachfolgend wird die Magnetisierung auf die direkt gebundenen  $^{15}\text{N}$ -Kernspins übertragen, deren chemische Verschiebung sich in  $t_2$  entwickelt. Dabei werden quasi alle Magnetisierungen herausgefiltert, die zu  $\text{H}^{\text{N}}$ -Kernspins gehören, denn nur diese haben einen  $^{15}\text{N}$ -Kern direkt gebunden. Nach der Zeit  $t_2$  wird via INEPT die Magnetisierung auf die  $\text{H}^{\text{N}}$ -Kernspins transferiert und während  $t_3$  aufgezeichnet.

Neben dem 3D TOCSY- $(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -HSQC wurden zusätzlich folgende Experimente zur Bestimmung der Seitenketten durchgeführt: 3D  $(\text{H})\text{CC}(\text{O})\text{NH}$ -TOCSY, ein 3D HCCH-TOCSY und ein 3D HNHB.

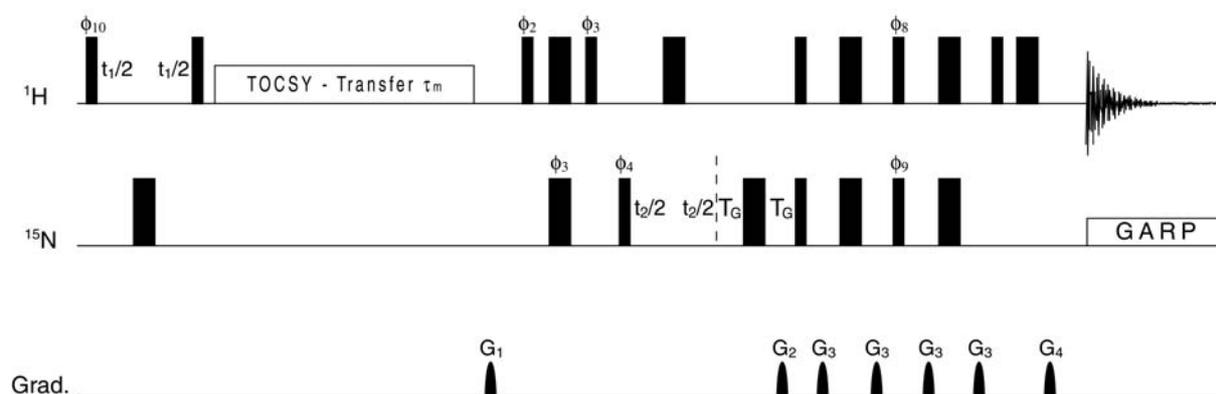


Abb. 26: Pulssequenz des 3D TOCSY- $(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -HSQC Experimentes. Alle nicht gekennzeichneten Pulse sind in x-Richtung eingestellt. Die markierten Pulse haben folgende Phasen:  $\phi_2 = x$ ;  $\phi_3 = y, -y$ ;  $\phi_4 = x, -x$ ;  $\phi_8 = y$ ;  $\phi_9 = y$ ;  $\phi_{10} = x, -x$ ;  $\phi_{12} = x$ ;  $\phi_{13} = y$ ;  $\phi_{15} = -x$ ;  $\phi_{\text{ref}} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$ . Die Längen der Gradienten sind folgende:  $G_1 = 1\text{ms}, 10\text{ Gcm}^{-1}$ ;  $G_2 = 1\text{ms}, -39,85\text{ Gcm}^{-1}$ ;  $G_3 = 0,5\text{ ms}, 8\text{ Gcm}^{-1}$ .

## Das $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC und das $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC Experiment

Der Kern-Overhauser-Effekt [nuclear Overhauser effect (NOE)] hat eine Änderung der Signalintensitäten zur Folge. Die Intensität eines NMR-Signals hängt von den Besetzungsunterschieden der Energieniveaus ab.

In einem Zweispinsystem AX, bei dem es sich bei A und X um Protonen oder auch um verschiedene Kerne handeln kann, sind die Übergänge zwischen den Niveaus 1 und 3 sowie 2 und 4 solche der A-Kerne, zwischen 1 und 2 sowie 3 und 4 solche der X-Kerne [Friebolin 1994]. Diese Übergänge sind erlaubt und messbar. Geht man von einem System aus, bei dem die Kerne nicht skalar gekoppelt sind ( $J_{AX} = 0$ ), beobachtet man im NMR-Spektrum für A- und X-Kerne je ein Singulett, deren Intensitäten von den entsprechenden Besetzungsunterschieden im Gleichgewichtszustand bestimmt werden. Beim NOE-Experiment, bei dem kontinuierlich die Übergänge eines Kernes gesättigt werden, kommt es zu neuen Besetzungsverhältnissen, die nicht mehr dem Gleichgewichtszustand entsprechen. Das Spinsystem relaxiert bevorzugt nach einem dipolaren Mechanismus, wobei der NOE und die DD-Relaxationsprozesse eng zusammenhängen. In Abbildung 27 ist die Balkenstärke ein Maß für die Besetzung der Niveaus. Schema A stellt den Ausgangszustand dar, die Besetzungszahlen  $N_1$  bis  $N_4$  entsprechen den Gleichgewichtswerten. Sättigt man die A-Übergänge, deren Frequenzen gleich sind (da  $J_{AX} = 0$ ), werden die Niveaus 1 und 3 und auch 2 und 4 gleichbesetzt:  $N_1 = N_3$  und  $N_2 = N_4$ . Im Schema B sind formal die Anteile durch schwarze Balken markiert, die von  $N_1$  und  $N_2$  auf  $N_3$  und  $N_4$  übertragen wurden. Die Änderungen der Besetzungszahlen haben keinen Einfluß auf die Gesamtintensität des Signals von X, da die Intensität nur von der Gesamtmagnetisierung  $M_X$  abhängt und  $M_X$  nicht beim Sättigen der A-Übergänge betroffen ist.

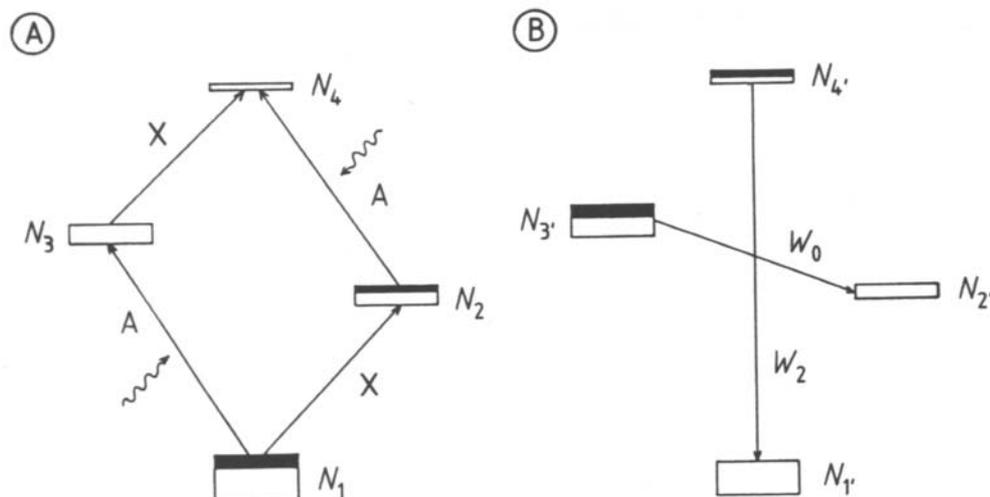


Abb.27: Änderung der Besetzungsverhältnisse im NOE-Experiment. Das Energieniveauschema A gibt den Ausgangszustand an, B den Zustand bei Sättigung der energieglichen A-Übergänge. Die Balkenstärken stellen ein Maß für die Besetzungszahlen  $N_1$  bis  $N_4$  bzw.  $N_1'$  bis  $N_4'$  dar.

Durch die erlaubten Relaxationswege gemäß  $W_2$  und  $W_0$  stellt sich ein neues Gleichgewicht mit einer neuen Besetzungsverteilung ein. Wie in der Abb.27 zu sehen ist, ist  $N_1' < N_1$  und  $N_4' > N_4$  und somit  $N_1'/N_4'$  kleiner als das Gleichgewichtsverhältnis  $N_1/N_4$ , wodurch die Relaxation gemäß  $W_2$  versucht wird,  $N_1'$  auf Kosten von  $N_4'$  zu vergrößern. Dadurch werden die für die Intensität der X-Übergänge verantwortlichen Besetzungsunterschiede  $N_1' - N_2'$  und  $N_3' - N_4'$  vergrößert, was gleichbedeutend mit einer Signalverstärkung ist. Bei einer Relaxation gemäß  $W_0$  kommt es dagegen zu Intensitätsverminderungen. Beide Effekte ergeben die Verstärkung durch den Kern-Overhauser-Effekt. In kleinen Molekülen mit kurzen Korrelationszeiten dominiert  $W_2$ , bei größeren Molekülen dagegen  $W_0$ . Der NOE-Effekt kann auch indirekt auf Kerne, die nicht mit einem angeregten Kern gekoppelt sind, übertragen werden. In einem Dreispinsystem beispielsweise, bei dem die A-Übergänge gesättigt sind, werden für die B-Übergänge (benachbarter Kern) die Besetzungsverhältnisse verändert. Für die DD-Wechselwirkungen von B mit C (C koppelt nicht mit A) gilt der neue, vom Gleichgewichtszustand abweichende Spinzustand. Damit ändert sich auch die Intensität von C. Man kann verallgemeinernd sagen, daß der Kern-Overhauser-Effekt um so größer ist, je kleiner der direkte Abstand zweier Kerne A und X im Molekül ist, unabhängig davon, durch wieviele Bindungen sie voneinander getrennt sind. Die Intensitätsverminderung geht mit der sechsten Potenz des Abstandes einher. Damit lassen sich auch Abstände von Kernen im Raum

bestimmen, was Aussagen über die Konformation des Moleküls zulässt.

### Das NOESY-( $^{15}\text{N}$ , $^1\text{H}$ )-HSQC-Experiment

Die NOESY-( $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ )-HSQC-Technik [Wittekind et al. 1992, Marion et al. 1989, Zuiderweg et al. 1990, Consatantine et al. 1992, Fairbrother et al. 1992] gehört zu den gebräuchlichsten der 3D-NMR-Spektroskopie. Entartete NH-Signale werden mit Hilfe der chemischen Verschiebung direkt gebundener  $^{15}\text{N}$ -Kerne auf verschiedene Ebenen verteilt, analog zu der in Abbildung 28 gezeigten Situation.

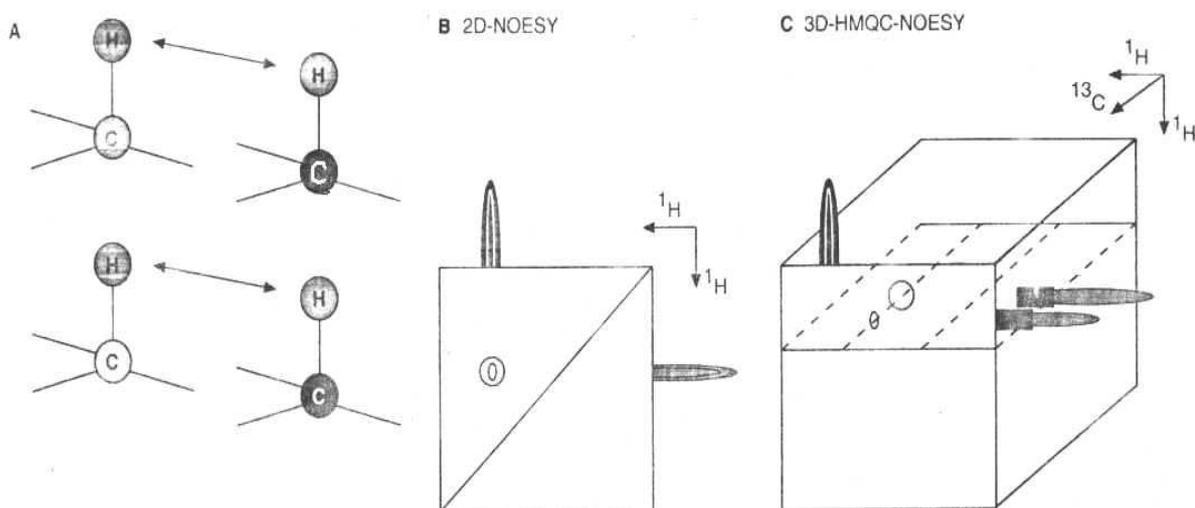


Abb.28: Unter (A) sind zwei Paare von Protonen, die die gleiche Resonanzfrequenz besitzen sollen, gezeigt. Dies führt zu einer Überlagerung der Kreuzsignale im 2D-NOESY-Spektrum (B). Die Hinzunahme der Frequenzen der Kohlenstoffresonanzen in einer dritten Dimension kann das Problem lösen, da ihre Resonanzfrequenzen unterschiedlich sind. Die NOESY-Kreuzsignale werden somit auf verschiedene Ebenen verteilt (C) [Oschkinat et al. 1994].

Man erhält 3D-Spektren, in denen für jede Aminosäure an den Verschiebungen ihres Amidstickstoffkerns als Koordinate ein Vektor erscheint, auf dem alle NOESY-Kreuzsignale des Amidprotons aufgereiht sind. Die sequentielle Zuordnung von  $\alpha$ -helicalen Bereichen in Proteinen kann in sehr eleganter Weise allein unter Verwendung der NOESY-( $^{15}\text{N}$ , $^1\text{H}$ )-HSQC-Technik erfolgen und zwar über das Auffinden von Kreuzsignalen zwischen den NH-Signalen benachbarter Aminosäuren [Oschkinat et al. 1994]. Dies wird bei 2D-NOESY-Spektren problematisch, wenn zum Beispiel zwei aus einer  $\alpha$ -Helix stammende NH-Signale entartet sind; in diesem Fall erwartet man auf der Frequenz dieser Signale vier Kreuzsignale zu anderen NH-Protonen. Eine eindeutige Zuordnung ist dann nicht mehr möglich. Dagegen

befinden sich im NOESY-HSQC-Spektrum die jeweils zusammengehörenden Signale auf verschiedenen  $^{15}\text{N}$ -Ebenen, sofern die  $^{15}\text{N}$ -Kerne eine unterschiedliche chemische Verschiebung aufweisen. Die sequentiell zusammengehörenden Reste findet man, indem man die zur Diagonale symmetrischen Kreuzsignale im NOESY-Spektrum sucht. Eine gelungene sequentielle Zuordnung läßt sich in Form von auseinandergereichten Streifen darstellen. Diese Streifen entsprechen den  $\text{H}^{\text{N}}/^{15}\text{N}$ -Vektoren.

Zur sequentiellen Verknüpfung zweier  $^1\text{H}$ -Spinsysteme in Proteinen können NOE's zwischen einem Amidproton und  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -,  $^1\text{H}^{\alpha}$ -, und  $^1\text{H}^{\beta}$ -Spins herangezogen werden, da die entsprechenden Abstände  $d_{\text{NN}}(i, i + 1)$ ,  $d_{\alpha\text{N}}(i, i + 1)$  und  $d_{\beta\text{N}}(i, i + 1)$  immer unterhalb von etwa 4,5 Angström liegen. Nach Wüthrich et al. [Wüthrich 1986] sind für eine gestreckte Konformation, wie sie in antiparallelen und parallelen  $\beta$ -Faltblättern vorkommt, sehr intensive  $d_{\alpha\text{N}}(i, i + 1)$ - und schwache  $d_{\text{NN}}(i, i + 1)$ -NOE's zu erwarten [Wüthrich et al. 1984]. Helicale Strukturen führen zu relativ intensiven  $d_{\text{NN}}(i, i + 1)$ - und etwas schwächeren  $d_{\alpha\text{N}}(i, i + 1)$ -NOE's (Abb.29). Charakteristisch für Helices sind auch die  $d_{\alpha\text{N}}(i, i + 3)$ -NOE's, die sowohl in  $\alpha$ -Helices, als auch in  $3_{10}$ -Helices vorkommen. Unterscheiden lassen sich die beiden Helixformen durch die  $d_{\alpha\text{N}}(i, i + 2)$ - und die  $d_{\alpha\text{N}}(i, i + 4)$ -NOE's. Im Falle der  $3_{10}$ -Helix kommen vorwiegend  $d_{\alpha\text{N}}(i, i + 2)$ -NOE's, aber keine  $d_{\alpha\text{N}}(i, i + 4)$ -Verknüpfungen vor. Die  $\alpha$ -Helix läßt sich durch vorhandene  $d_{\alpha\text{N}}(i, i + 4)$ -Verknüpfungen sowie nicht vorhandene  $d_{\alpha\text{N}}(i, i + 2)$  identifizieren. Wichtig zur Charakterisierung von  $\alpha$ -Helices sind auch die  $d_{\text{NN}}(i, i + 2)$ -Konnektivitäten, die ebenfalls im NOESY-Spektrum detektierbar sind.

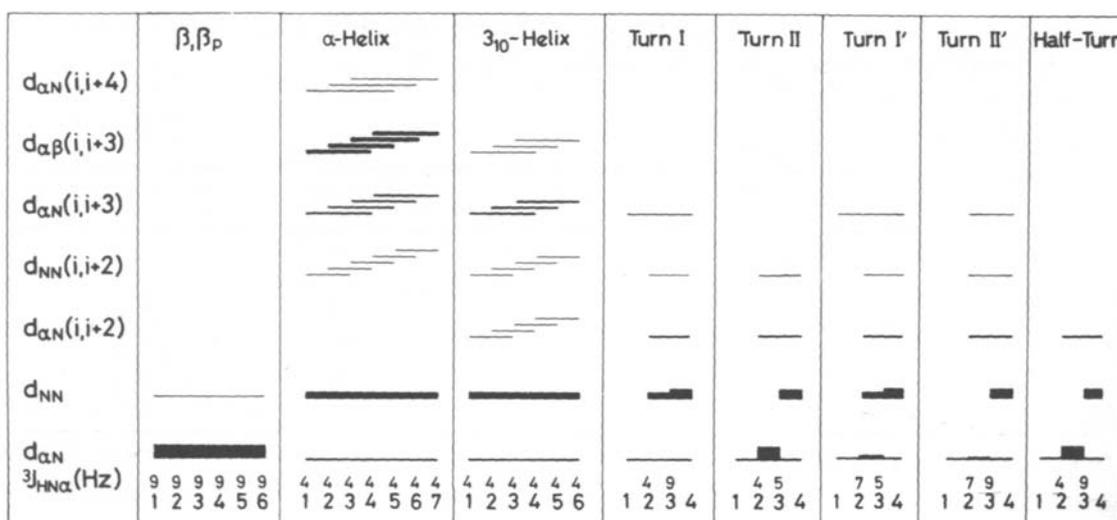


Abb.29: In der Abbildung sind sequentielle und „medium range“ NOE-Informationen, sowie  $^3J_{HN\alpha}$ -Kopplungskonstanten, die bei den jeweiligen Sekundärstrukturelementen auftreten, angegeben. Die Zahlen am Boden der Graphik geben die Anzahl der Aminosäuren wieder. Die Dicke der Linien ist proportional zu  $r^{-6}$  und repräsentiert somit die NOESY-Kreuzpeak-Intensität [Wüthrich 1986].

Für das NOESY- $(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -HSQC ergibt sich folgende Pulssequenz :

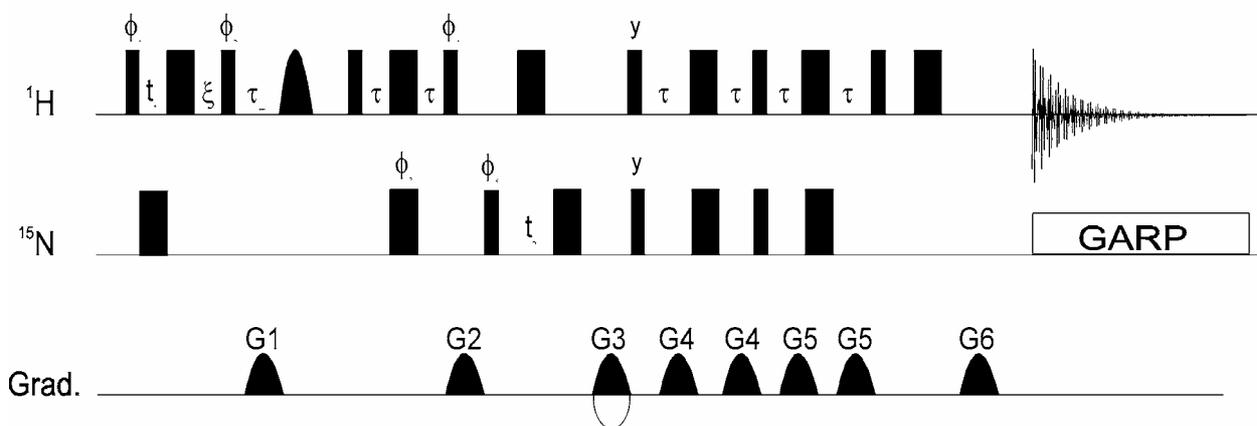


Abb.30: Pulssequenz des NOESY-HSQC-Experiments. Dabei wurde ein selektiver Puls auf die Wasserresonanz angewendet. Der benutzte Phasenzzyklus ist:  $\phi_1 = x, -x$ ;  $\phi_2 = x + 45^\circ$ ;  $\phi_3 = 4(y), 4(-y)$ ;  $\phi_4 = 4(y), 4(-y)$ ;  $\phi_5 = 2(x), 2(-x)$ . Pulse, die nicht gekennzeichnet sind, werden entlang der x-Achse eingestellt. Die Längen und die Stärken der Gradienten sind: G1: 1 ms; 12,5 G/cm (aus x-Richtung); G2: 1 ms; 10 G/cm (x-Richtung); G3: 1 ms; +/- 39,4 G/cm (aus z-Richtung); G4: 0,5 ms; 4 G/cm (x-Richtung); 5,5 G/cm (y-Richtung); G5: 0,5 ms; 5,5 G/cm (aus x-Richtung) und 5 G/cm (in y-Richtung); G6: 0,5 ms; 8 G/cm (z-Richtung)

Quadraturdetektion in  $\omega_1$  wurde durch Änderung von  $\phi_1$  nach dem states-TPPI-Verfahren erreicht.

Beim normalen  $^{15}\text{N}$ -aufgelöstes-NOESY-Experiment kann Wassersättigung nur durch geeignete Wahl der Protonenpulsphasen vermieden werden [Jahnke et al. 1995]. Es gibt jedoch ein Problem, das mit der Quadraturdetektion in  $\omega_1$  zusammenhängt. Zur Vorzeichenunterscheidung der Frequenz in  $\omega_1$  ist es üblich die Phase des Pulses, der  $t_1$  vorangeht, zu ändern. Dies geschieht entweder durch die TPPI-Methode oder durch die hyperkomplexe Methode. Beide Methoden erfordern relative Phasenänderungen von  $90^\circ$  für den ersten Protonenpuls. Dieses Erfordernis beeinflusst die Strategie der Wiederausrichtung des Wassers entlang der z-Achse.

Eine alternative Methode, die Vorzeichenunterscheidung der Frequenz in  $\omega_1$  zu erreichen, wird durch Einsetzen eines Gradienten mit wechselnden Vorzeichen während  $t_1$  erreicht. Dabei werden nur die n-type oder die p-type Signale in  $\omega_1$  selektiert, was mit einem Intensitätsverlust von  $2^{1/2}$  einhergeht. Dies sollte auf jeden Fall vermieden werden.

Die Lösung des Problems wird durch Kombination von zwei neueren Methoden gefunden. Das Wesentliche der modifizierten Pulssequenz (Abb.30) ist eine Strahlungsdämpfung (radiation damping) während der Mischzeit, die die Wassermagnetisierung innerhalb von weniger als 50 ms nahezu quantitativ ins Gleichgewicht zurückbringt. Um bei jeder Einstellung der Phase des ersten Protonenpulses einen gleich großen Anteil an transversaler Wassermagnetisierung zu erreichen, muß sich die Phase des zweiten Protonenpulses um  $45^\circ$  von der des ersten unterscheiden. Ohne diese Phasenverschiebung treten beträchtliche Quadratureffekte auf. Der zweite Teil der Pulssequenz stellt eine in der Empfindlichkeit erhöhte HSQC-Sequenz dar, in der die Wassersättigung durch die vorher beschriebenen Methoden vermieden werden kann.

Eine Kombination der Anwendung der Strahlungsdämpfung und einer geeigneten Wahl der Protonenpulsphasen ermöglicht die Aufnahme von phasensensitiven NOESY-Spektren mit Peakintensitäten, die nicht durch Austauschprozesse beeinflusst werden.

Um räumliche Informationen über die Lage von Kohlenstoff-Atomen in Bezug auf die H-Atome zu erhalten wurde ein  $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC-Experiment [Wittekind et al. 1992, Marion et al. 1989, Zuiderweg et al. 1990, Consatantine et al. 1992, Fairbrother et al. 1992] aufgenommen. Wie auch im  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC nimmt auch hier die Signalintensität um den Faktor  $r^{-6}$  ab. Während  $t_1$  entwickelt sich im Gegensatz zum  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC nur die chemische Verschiebung der aliphatischen Protonen der Seitenketten. Die heteronuklearen Kerne werden während  $t_1$  durch einen  $180^\circ$  Puls entkoppelt. Zur Dephasierung der restlichen transversalen Magnetisierung werden Gradientenpulse G1 eingesetzt. Nach dem zweiten G1 wird die Magnetisierung durch einen  $90^\circ$  Puls auf die  $^{13}\text{C}$ -Kerne übertragen. In  $t_2$  entwickelt

sich die chemische Verschiebung der  $^{13}\text{C}$ -Kerne. Der letzte Teil der Pulssequenz besteht wie beim  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC aus einer „reverse INEPT-Sequenz“, die für die Übertragung der Magnetisierung auf die Protonen verantwortlich ist.

### 2.3.1.3 Die longitudinale Relaxationszeit $T_1$

Durch Einstrahlen der Resonanzfrequenz wird bei NMR-Experimenten das thermische Gleichgewicht des Spinsystems gestört. Ist die Störung beendet, relaxiert das System, bis der Gleichgewichtszustand wieder erreicht ist. Dabei muss man zwischen zwei unterschiedlichen Relaxationsvorgängen unterscheiden: 1. die Relaxation in Feldrichtung, charakterisiert durch die longitudinale Relaxationszeit  $T_1$  und 2. die Relaxation senkrecht zur Feldrichtung, charakterisiert durch die transversale Relaxationszeit  $T_2$ .

Die longitudinale Relaxationszeit  $T_1$  oder Spin-Gitter-Relaxation ist die Zeit, die zur Einstellung der Gleichgewichtsmagnetisierung  $M_0$  nach Einschalten des äußeren Magnetfeldes  $B_0$  verstreicht [Friebolin 1994]. Dabei gehorcht die Änderung der z-Komponente der makroskopischen Magnetisierung einem Zeitgesetz erster Ordnung. Felix Bloch hat dieses Problem durch die folgende Differentialgleichung beschrieben:

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad (1)$$

$M_0$  = Gleichgewichtsmagnetisierung

$M_z$  = Magnetisierung in z-Richtung

Danach ist  $1/T_1$  die Geschwindigkeitskonstante für den Übergang des gestörten Systems in den Gleichgewichtszustand. Die Spin-Gitter-Relaxation ist stets mit einer Energieänderung des Spinsystems verbunden. Die Energie wird dabei an das Gitter übertragen, dessen thermische Energie zunimmt. Die makroskopische Magnetisierung  $M$  wird bei Verwendung von  $B_1$ -Feldern mit kleiner Amplitude durch die Kraftwirkung des rotierenden Feldvektors nicht um  $180^\circ$ , also in die negative z-Richtung gedreht, sondern lediglich um einen kleinen Winkel  $\alpha$  aus der z-Richtung ausgelenkt. Da die Relaxation der Störung der Boltzmann-Verteilung (Gl.2) entgegenwirkt, bleibt somit auch während des Resonanzvorganges die Magnetisierung  $M_z$  erhalten, woraus folgt, dass ein Teil der absorbierten Energie des Radiofrequenzfeldes letztlich an die Umgebung abgegeben wird.

$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = e^{\frac{-\Delta E}{k_B T}} \approx 1 - \frac{\Delta E}{k_B T} = 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{k_B T} \quad (2)$$

$N_{\alpha}, N_{\beta}$  = Besetzungszahlen im Grund- und angeregten Zustand

$B_0$  = äußeres Magnetfeld

$\Delta E$  = Energiedifferenz

$k$  = Boltzmannkonstante

$T$  = absolute Temperatur

Der Betrag der neuen Gleichgewichtsmagnetisierung  $M_z$  ist dabei eine Funktion der longitudinalen Relaxationszeit und der Amplitude des  $B_1$ -Feldes [Günther 1996]. Nach Gleichung 3 gilt beim CW-Experiment [Continuous Wave (bei der Aufnahme des NMR-Spektrums wird die Frequenz  $\nu$  eines schwachen HF-Senders kontinuierlich geändert)] bei großen  $B_1$ -Amplituden für die Signalintensität  $I$  am Maximum ( $\omega = \omega_0$ ) der Zusammenhang:

$$I(\omega_0) = \text{const.} / (B_1 T_1) \quad (3)$$

$$M_y = \frac{-M_0 \gamma B_1 T_2}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega) + \gamma^2 B_1^2 T_1 T_2} \quad (4)$$

Lange  $T_1$ -Zeiten und hohe Amplituden des oszillierenden Feldes führen daher zu einer Reduktion der Signalintensität, d.h. zu einer Sättigung der Resonanzlinie, dagegen beobachtet man bei kurzen  $T_1$ -Zeiten eine Verbreiterung der Resonanzlinien, da die Aufenthaltsdauer der Kerne sowohl im Grundzustand als auch im angeregten Zustand herabgesetzt wird. Das bedingt eine Unsicherheit in der Bestimmung der Energiedifferenz [Günther 1996].

### 2.3.1.4. $^3\text{J-H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}$ -Kopplungskonstanten

Die Wechselwirkung benachbarter Dipole führt zu einer Feinstruktur. Ein Maß für diese Wechselwirkung ist die Spin-Spin Kopplungskonstante  $J$ . Da die Kopplung durch Bindungen erfolgt, bezeichnet man sie als indirekte Spin-Spin-Kopplung. Sie ist unabhängig vom äußeren Feld, weshalb die Kopplungskonstanten  $J$  in Hz angegeben werden. Beträgt die Zahl der Bindungen zwischen koppelnden Kernen 3, spricht man von vicinalen Kopplungen  $^3J$ . Eine entscheidende Rolle für die Größe der  $^3J$ -Kopplungskonstante spielt die Molekülstruktur. Die vicinale H,H-Kopplung in gesättigten Verbindungen ist experimentell wie theoretisch sehr gut untersucht, und daher weiß man recht gut, welche Faktoren die Kopplungskonstante  $^3J(\text{H,H})$  beeinflussen. Dies sind:

- die Torsionswinkel
- die Substituenten
- der C,C-oder wie im vorliegenden Fall der C,N-Abstand
- die H-C-C-bzw. die H-N-C-Valenzwinkel

M. Karplus gab aufgrund von Berechnungen die Abhängigkeit der vicinalen Kopplungskonstanten vom Torsionswinkel  $\phi$  an [Karplus 1963]. Die untere durchgezogene Kurve in Abb.31 entspricht ungefähr der theoretischen Karplus-Kurve. Das grau unterlegte Band gibt an, innerhalb welcher Grenzen sich die  $^3J(\text{H,H})$ -Werte erfahrungsgemäß bewegen. Man sieht, dass die Kopplungskonstanten bei  $\phi = 0^\circ$  oder  $180^\circ$  am größten, bei  $90^\circ$  am kleinsten sind. Die Kurve wird durch die Gleichung:

$$^3J = A + B \cos \phi + C \cos 2 \phi \text{ beschrieben.} \quad (5)$$

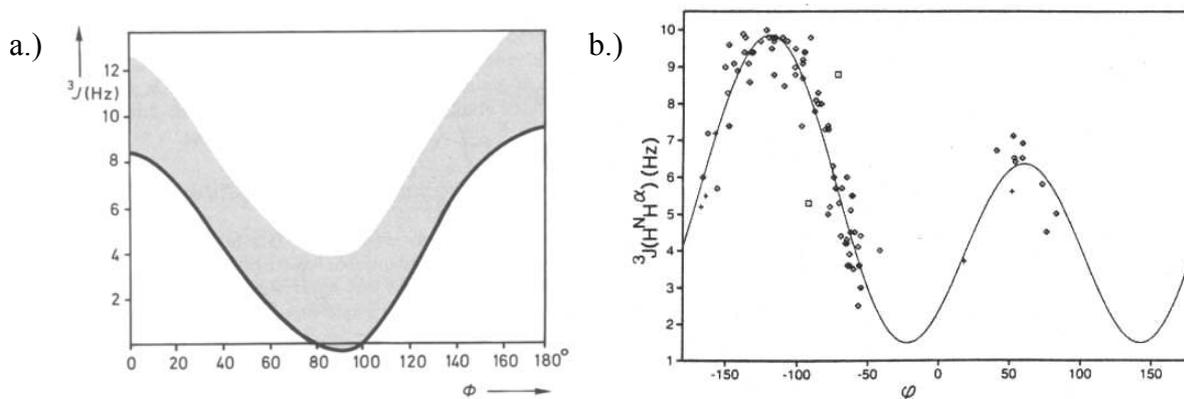


Abbildung 31: a.) Karplus-Conroy-Kurve zur Abhängigkeit der vicinalen H,H-Kopplung vom Diederwinkel  $\phi$ . b.) Abhängigkeit der  $^3\text{J-H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}$ -Kopplungskonstanten vom Diederwinkel  $\phi$ . Die Daten wurden einem HNHA-Spektrum der SNase entnommen [Geerten und Bax 1993].

Die Bestimmung heteronuklearer Kopplungskonstanten von Proteinen war aufgrund der geringen Konzentrationen an NMR-aktiven Isotopen mit  $I = \frac{1}{2}$  kaum möglich. Beispielsweise kommt das NMR-aktive Isotop  $^{15}\text{N}$  nur zu 0,37% in Stickstoff enthaltenden Molekülen vor. Gentechnische Verfahren machen es aber heutzutage möglich, Proteine mit den stabilen Isotopen  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  anzureichern. Diese Verfahren sind sehr kostenintensiv, ermöglichen es aber beispielsweise, die heteronuklearen Kopplungskonstanten zu bestimmen und somit an wichtige strukturelle Informationen zu gelangen. In Proteinen bewegt sich der Torsionswinkel der Aminosäuren, außer der von Glycin, zwischen  $-40^\circ$  und  $-180^\circ$  [Richardson 1981]. Setzt man typische Werte für Sekundärstrukturen in Gleichung 5 ein, ergibt sich folgender Zusammenhang zwischen Struktur und Kopplungskonstante:

$\alpha$ -Helix ( $\phi = -57^\circ$ ),  $^3J_{\text{HN}\alpha} = 3,9$  Hz

$3^{10}$  helix ( $\phi = -60^\circ$ ),  $^3J_{\text{HN}\alpha} = 4,2$  Hz

Antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt ( $\phi = -139^\circ$ ),  $^3J_{\text{HN}\alpha} = 8,9$  Hz

Paralleles  $\beta$ -Faltblatt ( $\phi = -119^\circ$ ),  $^3J_{\text{HN}\alpha} = 9,7$  Hz

In der Praxis können Abweichungen von den theoretischen Werten auftreten, so dass man eine Helix als wahrscheinliche Sekundärstruktur annimmt, wenn die  $^3\text{J-H}^{\text{N}}\text{H}^\alpha$ -Kopplungskonstanten mehrerer aufeinanderfolgenden Aminosäuren kleiner als 5 Hz sind, während  $^3\text{J-H}^{\text{N}}\text{H}^\alpha$ -Kopplungskonstanten, die größer als 8 Hz sind, auf ein  $\beta$ -Faltblatt schließen lassen. Aufgrund der Abhängigkeit der Kopplungskonstante vom Diederwinkel ist es sogar möglich, Aussagen über die Flexibilität und die Moleküldynamik des Proteins zu machen.

Eine Vielzahl von Methoden wurde in den letzten Jahren vorgeschlagen, um die homonuklearen  $^3\text{J-H}^{\text{N}}\text{H}^\alpha$  Kopplungskonstanten in Proteinen zu bestimmen [Ludvigsen et al. 1991, Kay et al. 1989, Griesinger et al. 1991]. Die E.COSY Methode bietet den Vorteil, unabhängig von der Größe der Kopplungskonstante brauchbare Ergebnisse zu erzielen, erfordert aber ein 3-Spinsystem. Die von Kuboniva et al. beschriebene Methode [Kuboniva et al. 1994] nutzt die Abhängigkeit der  $^3\text{J}$ -Kopplungskonstante von der Signalintensität aus (Gl.6). Dabei muss eine Pulssequenz gewählt werden, bei der die Signalintensität eine möglichst hohe Abhängigkeit von der Kopplungskonstanten aufweist.

$$I = CN_1 \cos[\pi J_{\text{HH}} (4T + 2\Delta)] e^{\frac{-4T}{T_2, \text{MQ}}} \quad (6)$$

$C$  = transversale Relaxation während  $2\Delta$

$T_{2,MQ}$  = transversale Relaxationsrate von  $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$  zwei-Spin Kohärenz

$N_1$  = Zahl der  $T_1$ -Inkrementen in der „Constant-Time“ Dimension

$I$  = Peakhöhe

Nach Integration und der Annahme, dass  $J_{\text{HH}} > 1/(2\pi T_{1,\alpha})$  ist, ergibt sich für die Transferfunktion folgender Ausdruck:

$$I_Y(t) = I_Y(0) \exp\left(\frac{t}{T_{2,MQ}} - \frac{t}{2T_{1,\alpha}}\right) * \left[\cos(\pi J^r) + \frac{\sin(\pi J^r t)}{2\pi J^r T_{1,\alpha}}\right] \quad (7)$$

$$J^r = \sqrt{J_{\text{HH}}^2 - \left(\frac{1}{2\pi T_{1,\alpha}}\right)^2} \quad (8)$$

$T_{2,MQ}$  = apparente, transversale Relaxationsrate der  $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ -Zweispin-Kohärenz

$T_{1,\alpha}$  = longitudinale Relaxationsrate des  $\text{H}^\alpha$ -Protons

Mit dieser Methode lassen sich große Kopplungskonstanten mit sehr hoher Genauigkeit, kleine Kopplungskonstanten unter 2 Hz aber nur sehr ungenau bestimmen.

Das hier verwendete J-modulierte CT-HMQC Experiment zur Berechnung von  $^3\text{J}\text{-H}^{\text{N}}\text{H}^\alpha$ -Kopplungskonstanten basiert auf dem von Kuboniva et al. beschriebenen Verfahren [Kuboniva et al. 1994]. Dabei werden die  $90^\circ$ - und  $180^\circ$ -Pulse entlang der x-Achse angewandt (Abb.32). Es wird ein 8-stufiger Phasenzyklus verwendet. Quadraturdetektion in  $t_1$  wird nach der States-TPPI-Methode erhalten, welche  $\phi_1$  inkrementiert. Die Wasserunterdrückung wird durch eine WATERGATE-Sequenz ergänzt. Die J-Modulation von  $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^\alpha$  erstreckt sich über eine Zeit von  $4T+2\Delta$ . Zwischen den Punkten a und b der Pulssequenz ist eine heteronukleare zwei-Spin-  $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ -Kohärenz vorhanden, die die CT-Evolutionsperiode  $4T$  einschließt. Zum Zeitpunkt c wird die in-Phase Komponente der transversalen  $\text{H}^{\text{N}}$ -Magnetisierung entlang der z-Achse ausgerichtet. Außerdem drückt dieser  $90^\circ$ -Puls die  $\text{H}_2\text{O}$ -Magnetisierung auf die +z-Achse zurück [Sklenar et al 1992].

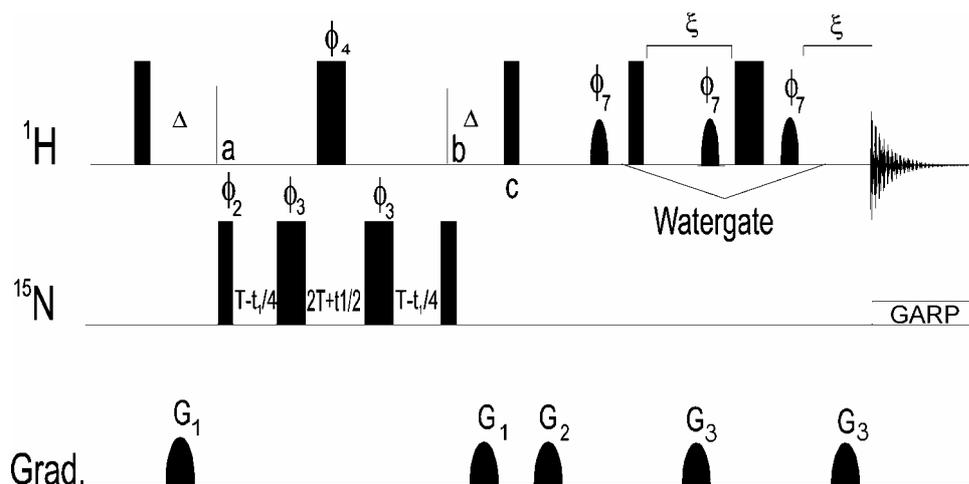


Abb.32: Pulssequenz des J-modulierten ct-HMQC mit eingebauter WATERGATE-Pulssequenz. Die schmalen Pulse haben einen Flipwinkel von  $90^\circ$ , die breiten von  $180^\circ$ . Selektive Pulse sind rechteckig dargestellt, Gradienten sind mit G bezeichnet. Die markierten Pulse haben folgende Phasen:  $\phi_2 = x, -x$ ;  $\phi_3 = 2(x), 2(y), 2(-x), 2(-y)$ ;  $\phi_4 = x, -x$ ;  $\phi_7 = -x$ . Die Delays haben die Längen:  $\xi = 240 \text{ usec}$ ;  $\Delta = 3,69 \text{ msec}$ ;  $T-t_1/4 = 8,9 \text{ msec}$ ;  $2T + t_1/2 = 17,8 \text{ msec}$ . Quatraturdetektion nach TPPI wurde auf die  $\phi_1$ -Phase im Programm angewendet. Die Längen und die Stärken der Gradienten betragen: G1: 1 ms; 10 G/cm (aus x-Richtung); G2: 1 ms; 12,5 G/cm (aus y-Richtung); G3: 0,8 ms; 15 G/cm (aus z-Richtung)

Bei der Watergate-Sequenz [Sklenar et al. 1992] handelt es sich um eine Gradientenechosequenz, bei der zusätzlich zu einem nicht-selektiven Spin-Echo-Pulspar zwei selektive  $90^\circ$  Pulse mit der entgegengesetzten Phase und zwei Feldgradienten symmetrisch zum nicht-selektiven  $180^\circ$  Puls eingesetzt werden.

### 2.3.1.5. Ermittlung von unbestimmten $T_1$ -Relaxationszeiten mit der inversion recovery Methode

Longitudinale Relaxationszeiten können mit Hilfe der “inversion recovery Methode” gemessen werden [Bertini et al. 1996]. Dem Inversionspuls ( $180^\circ$ ) p1 folgt ein „recovery delay“ d2 in dem die Magnetisierung in den Gleichgewichtszustand relaxiert (Abb.33).

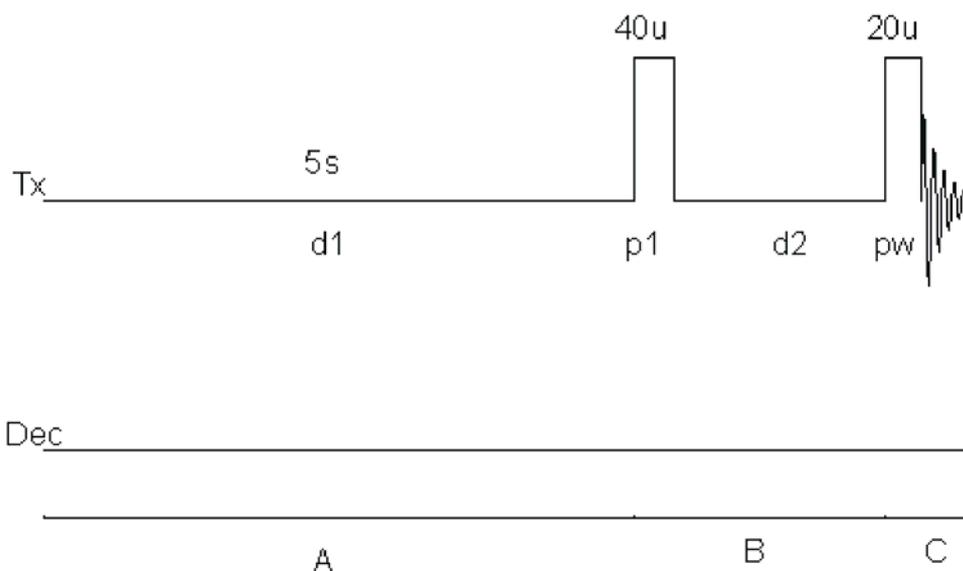


Abb.33:Prinzip der „Inversion recovery“ Methode: Dem 180° Inversionspuls  $p_1$  ist ein langer Delay  $d_1$  vorgeschaltet. In  $d_2$  relaxiert die Magnetisierung.

### 2.3.1.6. Bestimmung von Abständen aus den T1-Zeiten

Der Einfluß der paramagnetischen Effekte auf die Relaxationszeiten der Amid-Protonen wurde anhand folgender Gleichung bestimmt [Ferretti et al. 1989],

$$\frac{1}{T1_p} = \frac{1}{T1_{para}} - \frac{1}{T1_{dia}} \quad (9)$$

in der  $T1_p$  den paramagnetischen Effekt auf die longitudinale Relaxationszeit darstellt.  $T1_{para}$  steht für die aus der „inversion recovery Methode“ erhaltenen longitudinalen Relaxationszeit. Für  $T1_{dia}$  wurde ein geschätzter Wert von  $T1=200\text{ms}$  eingesetzt. Individuelle Korrelationszeiten  $\tau_c$  wurden anhand der Frequenzabhängigkeit der paramagnetischen Effekte für die Amid-Protonen bestimmt. Die Berechnung von  $\tau_c$  erfolgte nach folgender Gleichung [Weber et al. 1991]:

$$\tau_c^2 = \frac{T1_{p800} - T1_{p600}}{T1_{p600} \omega_{600}^2 - T1_{p600} \omega_{800}^2}. \quad (10)$$

Die Abstände zum paramagnetischen Zentrum wurden nach der Solomon-Bloembergen Gleichung [Solomon 1955] bestimmt.

$$r^6 = \frac{2K}{T1_p} \times \frac{3\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} \quad (11)$$

Die Konstante K besitzt einen Wert von  $1.23 \cdot 10^{32} \text{ cm}^6 \text{ s}^{-2}$ .

### 2.3.1.7. Strukturbestimmung

Um die Struktur des reduzierten Zustands des Adx zu bestimmen wurde wie folgt vorgegangen:

- 1: Aufnahme der NOESY-Spektren ( $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC,  $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC)
- 2: Gewinnung von Abstandsbeschränkungen durch NMR2st
- 3: Strukturberechnung durch Einsetzen der Abstandsbeschränkungen in DYANA
- 4: Korrektur der Abstandsbeschränkungen.
- 5: mehrmaliges Wiederholen von Punkt 3 und 4

Das von Pristovšek und Mitarbeitern entwickelte Programm NMR2st dient der Extraktion strukturrelevanter Abstandsbeschränkungen [Pristovšek et al. 2000]. Die Abstandsbeschränkungen werden intern kalibriert, wobei die Intensität eines NOE-Kreuzpeaks zwischen zwei Protonen bekannten Abstands als Orientierung dienen. Eine Zuordnung der NOE-Signale erfolgt unter Zuhilfenahme einer ähnlichen Ausgangsstruktur (hier ox. Zustand des Adx).

Die aus NMR2st erhaltenen Abstandsbeschränkungen werden in das Programm Dyana eingesetzt [Güntert et al. 1997]. Bindungslängen oder Bindungswinkel werden hierbei unter Berücksichtigung sterischer Limitierung kombiniert. Dyana arbeitet im Torsionswinkelraum, so dass Standardgeometrien der Aminosäurereste wie Bindungslänge und –winkel während der Strukturrechnung erhalten bleiben. Durch Variation der Torsionswinkel wird versucht eine minimale Fehlerfunktion T zu erhalten. Neben Verletzungen der van der Waals Abstände werden auch Verletzungen der Diederwinkelintervalle berücksichtigt.

Die Target-Funktion gibt die potentielle Energie des Systems wieder, das durch langsame Minimierung der Temperatur Übergänge zwischen lokalen Minima durchquert (Gl.12). Sie beschreibt die Abweichungen von den vorbestimmten Distanzbeschränkungen.

Es wurden jeweils 50 Strukturen gerechnet. Die 20 Strukturen mit den besten Target-Funktionen wurden auf Abstandsverletzungen hin überprüft. Fehlerhafte

Abstandsbeschränkungen wurden korrigiert und im darauffolgenden DYANA-Lauf berücksichtigt. Mehrmaliges Wiederholen dieses Verfahrens führt zu einer Minimierung der Zielfunktion. Am Ende dieser als REDAC-Strategie bezeichneten Methode verringern sich die zuletzt erhaltenen Zielfunktionen der Konformation eines Ensembles kaum noch.

Der RMSD-Wert des Strukturensembles stellt ein Maß für die Übereinstimmung der erhaltenen Strukturen dar.

Die Qualität der erhaltenen Strukturen wurde mit PROCHECK-NMR [Laskowski et al. 1993] analysiert. Dabei werden anhand der Energiehyperfläche der potentiellen Energie  $\phi$ - $\phi$  Winkelkombinationen auf ihre Güte hin überprüft. Energetisch günstige Winkelkombinationen befinden sich in erlaubten Bereichen, während Winkelkombinationen, die zu ungünstigen van-der-Waals-Kontakten führen, in unerlaubten Bereichen der Hyperfläche liegen.

## 2.3.2. NMR-Spektroskopische Methoden bei der FNR

### 2.3.2.1 Das TROSY Experiment

Bei Pulssequenzen, die lange Delays zur Übertragung der Magnetisierung nutzen, wird das registrierte NMR-Signal durch transversale Relaxation bedeutend abgeschwächt. Die transversale Relaxation ist abhängig von der Grösse der Proteine. So nimmt sie mit steigendem Molekulargewicht zu. Zur Vermessung größerer Proteine muß deshalb ein anderes Verfahren, das als TROSY (Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy) bezeichnet wird, angewendet werden [Perkushin et al. 1997, Pervushin 2000]. Dabei wird das schnelle Abklingen der Magnetisierung in Folge der transversalen Relaxation durch kooperative Nutzung zweier Effekte, die diesen Relaxationsmechanismus bestimmen, verlängert. Bei diesen zwei Mechanismen handelt es sich einerseits um die Dipol-Dipol-Wechselwirkung (DD) und andererseits um die Anisotropie der chemischen Verschiebung. Durch die TROSY-Pulssequenz wird von den vier Multiplett Komponenten einer  $^{15}\text{N}^1\text{H}^{\text{N}}$ -Einheit nur diejenige, die die geringste Linienbreite besitzt, selektiert (Abb.34). Dabei handelt es sich um die Komponente, die parallele Spins der koppelnden Kerne  $^{15}\text{N}$  und  $^1\text{H}$  besitzt. Es kann gezeigt werden, dass in diesem Fall die beiden Relaxationsmechanismen DD und CSA unterschiedliche Vorzeichen besitzen und sich damit gegenseitig abschwächen [Riek et al. 2000]. Auf diesem Wege wird die transversale Relaxation verlangsamt und nur die gewünschte scharfe Komponente des  $^{15}\text{N}$  Multipletts detektiert.

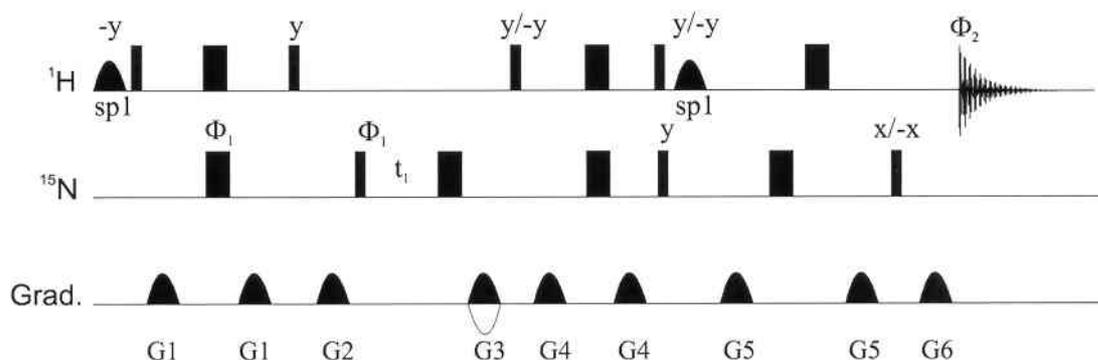


Abb.34: Nicht markierte Pulse besitzen die Phase  $x$ .  $x/-x$  bzw.  $y/-y$  symbolisiert eine Invertierung der Phase der Phase in jedem zweiten Inkrement. Die mit  $\Phi$  gekennzeichneten Pulse durchlaufen folgende Phasenzyklen:  $\Phi_1=x,-x$ ;  $\Phi_2$ (Empfängerphase) =  $x,-x$ . Die Längen und Stärken der gepulsten Feldgradienten betragen:  $G1=500\mu\text{s}$ ,  $5\text{G/cm}$  aus  $x$ -Richtung;  $G2:500\mu\text{s}$ ,  $5\text{G/cm}$  aus  $y$ -Richtung;  $G3$ :  $1.6\text{ms}$ ,  $19.725\text{G/cm}$  aus  $x$ -,  $y$ - und  $z$ -Richtung,  $G3$  wird bei jedem Inkrement invertiert;  $G4$ :  $300\mu\text{s}$ ,  $4\text{G/cm}$  aus  $x$ - und  $5.5\text{G/cm}$  aus  $y$ -Richtung,  $G5$ :  $300\mu\text{s}$ ,  $5.5\text{G/cm}$  aus  $x$ - und  $4\text{G/cm}$  aus  $y$ -Richtung;  $G6$ :  $200\mu\text{s}$ ,  $16\text{G/cm}$  aus  $x$ -,  $y$ - und  $z$ -Richtung.

### 2.3.2.2 Bestimmung der Isotopenanreicherung

Der  $^{15}\text{N}$ -Anreicherungsgrad einer Proteinprobe kann über das Aufspaltungsmuster des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Spektrums abgeschätzt werden. Ein an den Spin1-Kern  $^{14}\text{N}$  gebundenes Proton zeigt aufgrund der  $^1\text{J}$ -Kopplung keine Signalaufspaltung. Im Gegensatz dazu wird für ein an den Spin  $1/2$ -Kern  $^{15}\text{N}$  gebundenes Proton ein Duplett erhalten. Aus dem Intensitätsverhältnis von Duplett- zu Singulettkomponente kann direkt auf den  $^{15}\text{N}$ -Anreicherungsgrad geschlossen werden

### 2.3.2.3. Austausch von $^1\text{H}$ gegen $^2\text{H}$

Amidprotonen von Proteinen zählen zu den labilen Protonen; das sind Protonen in dissoziationsfähigen polaren Bindungen. Nach Dissoziation kann die Säurefunktion ihrererseits wieder ein Proton (im Falle von  $\text{H}_2\text{O}$  als Lösungsmittel) oder ein Deuteron (im Falle von  $\text{D}_2\text{O}$  als Lösungsmittel) aus dem Lösungsmittel aufnehmen. Das entspricht dem chemischen Austausch des labilen Protons mit einem Proton des Lösungsmittels. Die Schnelligkeit des Austausches hängt von vielen Faktoren ab. Beim Lösungsmittel sind das der pH-Wert, die Temperatur und der Salzgehalt. Von Seiten des Proteins spielt die Primärstruktur sowie die dreidimensionale Struktur als auch die lokale Dynamik eine große Rolle. Letzteres ist von Bedeutung für die Lösungsmittelzugänglichkeit von Amidprotonen, die im Inneren des Proteins verborgen sind.

Um die Austauschraten von Amidprotonen mit dem Lösungsmittel zu bestimmen, wurde

folgende Methode verwendet:

$^{15}\text{N}$ -markiertes FNR wird in  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst und so schnell wie möglich in das NMR-Spektrometer gebracht. Hiernach werden in zeitlichen Abständen von Minuten über Stunden bis Tagen kurze  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren aufgenommen. Nach und nach sollten alle Amidprotonen gegen die Deuteronen des Lösungsmittels austauschen. Die  $^2\text{H}$ -Kernspins haben keinen Spin  $\frac{1}{2}$  und zeigen deswegen kernmagnetische Resonanz in einem völlig anderen spektralen Bereich. Das  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum zeigt daher zeitlich exponentiell abnehmende Signalintensitäten für die Korrelationssignale der individuellen NH-Gruppen. Die ausgetauschten Protonen werden gewissermaßen unsichtbar und tragen nicht mehr zur Signalintensität bei.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1. Adrenodoxin

Die paramagnetischen Eigenschaften des Adrenodoxins und die dadurch bedingten Verkürzungen der Relaxationszeiten führen dazu, dass multidimensionale, heteronukleare NMR Experimente für die Zuordnung des Proteins mit einbezogen werden müssen. Um eine möglichst kostengünstige Anreicherung mit den stabilen Isotopen  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$  zu erreichen, wurden M9-Medien mit unterschiedlichen Glucose- und Glycerinkonzentrationen getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von 1g/l Glucose und 2,5 g/l Glycerin optimale Ergebnisse liefert (Tab.3). Höhere Glucose- bzw. Glycerinkonzentrationen führen aufgrund der Katabolitrepression des *trc*-Operons zu keiner Erhöhung der Expressionsraten.

Glucose (g)	Glycerin (g)	Expressionsrate [mg Adx/l M9]
1.5	-	9
3.5	-	32
1	1.5	40
1	2	63
1	2.5	73
1	3	64
1	4	60
1	7	40

Tab.3: Auswirkung verschiedener Glucose bzw. Glycerinkonzentrationen auf die Expressionsrate des Adx in Minimalmedium (M9).

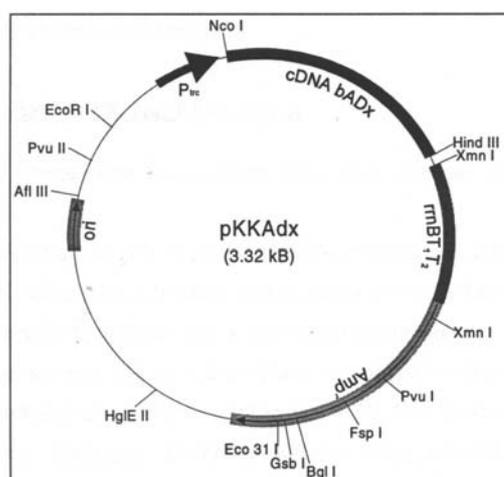


Abb.34: Plasmidkarte des pKKAdx

### 3.1.1. Präparation von $^{15}\text{N}$ -, $^{13}\text{C}$ -angereicherten bAdx

Die Expression des bAdx erfolgte in M9-Medium, dem zur Isotopenanreicherung 1g/l  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  sowie 1g/l  $^{13}\text{C}$ -Glucose und 2,5 g/l  $^{13}\text{C}$ -Glycerin zugesetzt wurden.

Der mit dem Plasmid pKKAdx (Abb.34) transformierte *E. coli* BL21-Stamm wurde in zwei 750 ml Kulturen mit  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Medium überführt. Zur Kontrolle des Wachstums wurden diskontinuierliche Messungen der  $\text{OD}_{600}$  vorgenommen. Bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,83 beziehungsweise 0,81 wurden die beiden Kulturen durch Zusatz von 1mM IPTG induziert und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Die logarithmische Wachstumsphase näherte sich nach ca. 14 Stunden ihrem Ende. Nach 20 Stunden wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert, in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 9 resuspendiert und schließlich mittels Ultraschall aufgeschlossen. Das Lysat wurde dann durch Zentrifugation von den Zelltrümmern getrennt und aufgereinigt.

### 3.1.2. Aufreinigung des $^{15}\text{N}$ -, $^{13}\text{C}$ -angereicherten bAdx

Nach zwei aufeinanderfolgenden Ammoniumsulfatfällungen (1. Schritt 0-30%, 2. Schritt 30-45%) wurde das Lysat durch hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) weiter aufgereinigt (Abb.35). Die Elution des an die Säule gebundenen Adrenodoxins erfolgte mittels eines linearen Salzgradienten von 2,2-0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Verfolgt wurde die Elution der gebundenen Proteine über die Messung der Absorption bei  $\lambda = 278$ .

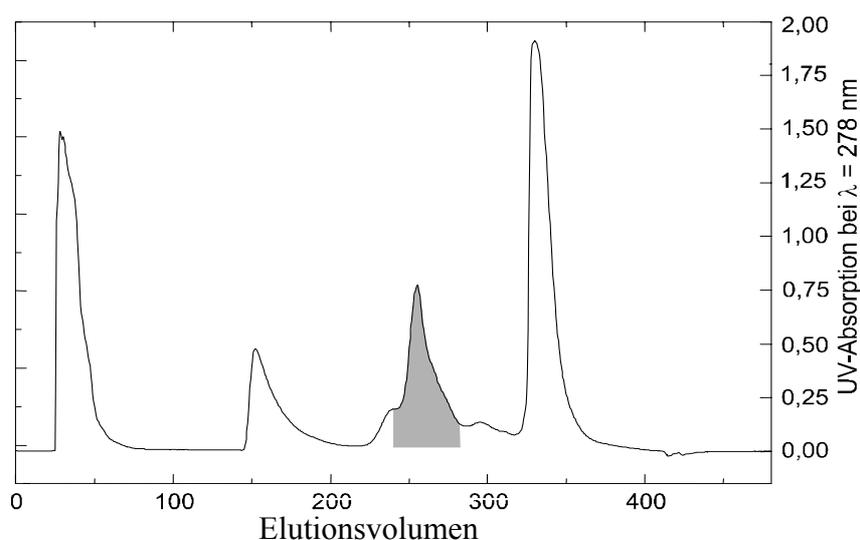


Abb.35: Elutionsprofil der Phenyl-Sepharose-Chromatographie (Flußrate: 3 ml/min, 20 Fraktionen zu je 9 ml gesammelt). Grau unterlegt ist das vom bAdx stammende Elutionssignal.

Wie aus der Absorption ersichtlich ist, wird das Adx bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von ca. 1,3 M eluiert. Die Form des Elutionssignals zeigt jedoch, dass das bAdx noch mit Fremdproteinen verunreinigt ist.

Die Konzentration und die Reinheit der Adx-haltigen Fraktionen wurde über eine Messung der  $OD_{414}$  bzw. über den sogenannten Q-Wert, das Verhältnis  $OD_{414}/OD_{280}$ , bestimmt.

Die Q-Werte zeigen, dass die Fraktionen 11-14 (Q-Wert  $> 0,5$ ) bereits einen hohen Reinheitsgrad aufweisen, aber noch Fremdproteine enthalten. Diese konnten durch die anschließende Ionenaustauschchromatographie abgetrennt werden.

Die Gesamtmenge an bAdx nach der hydrophoben Interaktionschromatographie wurde spektroskopisch bestimmt und betrug 59 mg. Die vereinigten Fraktionen wurden mit Hilfe einer Amicon-Zelle aufkonzentriert und auf 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 umgepuffert. Um den terminalen Abbau zu vermeiden, wurde die Probe entgast und unter Argon bei 4°C über Nacht gelagert, um dann mit der weiteren Aufreinigung fortfahren zu können.

Die Proteinfractionen wurden dann für eine Ionenaustauschchromatographie(IEC) auf eine Q-Sepharose-HP-Säule aufgetragen. Diese wurde mit 3 Volumen Puffer A gespült um unspezifisch gebundene Proteine zu eluieren.

Die Elution des bAdx erfolgte mittels eines linearen Salzgradienten von 0-0,5 M KCl. Wie bei der HIC wurde die Elution des bAdx durch Messung der Absorption bei  $\lambda = 278 \text{ nm}$  verfolgt (Abb.36). Anhand des Elutionsprofils ist zu erkennen, dass das bAdx völlig von Fremdprotein abgetrennt werden konnte.

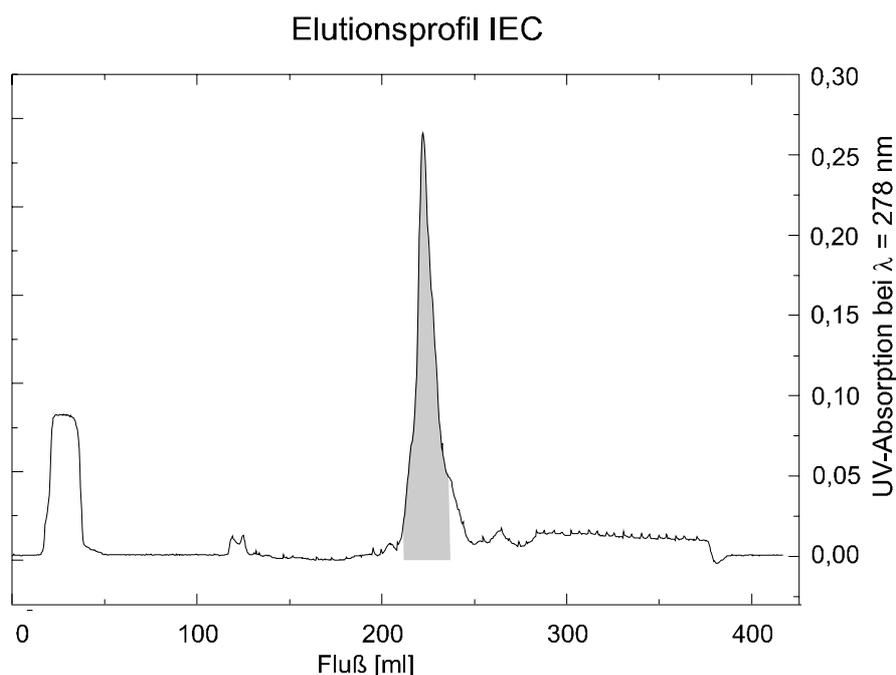


Abb.36: Elutionsprofil des Q-Sepharose-Laufes. Grau unterlegt ist das vom bAdx stammende Elutionssignal.

Die Fraktionen mit Q-Werten, die über einem Wert von 0,9 lagen, wurden aufgrund ihrer hohen Konzentration an bAdx und ihrer hohen Reinheit vereinigt, in einem Amicon-Konzentrator auf 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 + 200 mM NaCl umgepuffert und eingengt. Mit Hilfe eines Micro-Spin-Zentrifugenfilters wurde das Volumen auf 400  $\mu$ l aufkonzentriert. Die Probe wurde anschließend sofort entgast und unter Argon gelagert, um eine partielle Degradation weitgehend zu vermeiden. Die spektroskopisch bestimmte Gesamtmenge des bAdx betrug nach der Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie 46,2 mg. Die Reduktion des Adx erfolgte durch Zugabe von 5mg Natriumdithionit. Zum Nachweis des bAdx dienten anschließend SDS-Gele, HPLC-Läufe und NMR-Spektren. Die Anreicherung von  $^{15}\text{N}$  erfolgte durch Kultivierung von *E.coli* BL21 in N15-Medium, dem 1g/l  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (99%  $^{15}\text{N}$ ) als Stickstoffquelle zugesetzt wurde. Expression und Aufreinigung entsprachen der des  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -angereicherten Proteins.

### 3.1.3. Analytik des bAdx

Wie die in Abbildung 37 dargestellte SDS-PAGE zeigt, ist das Adx nach der IEC homogen. Als Proteinmolekulargleichgewichtsstandard wurde Gibco BRL (Low Protein Mass Ladder) eingesetzt, der Proteine mit Molekulargewichten von etwa 2-43 kDa enthält.

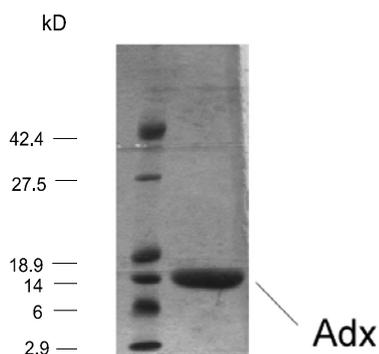


Abb. 37: SDS-Page des aufgereinigten bAdx. Die Proteinbanden sind mit Coomassie-Blue-Färbung behandelt worden. Die zweite Spur ist mit der bAdx-Lösung beladen worden. Die erste Spur wurde mit dem Proteinmolekulargleichgewichtsstandard Gibco BRL beladen.

### 3.1.3.1. Analyse des bAdx mit analytischer Ionenaustausch HPLC mit MonoQ HR 5/5

Zur weiteren Analyse der Reinheit des bAdx wurde neben dem SDS-PAGE eine analytische IEC mit MonoQ HR 5/5 durchgeführt. Durch Verwendung dieser beiden unterschiedlichen Methoden konnte die Reinheit im Hinblick auf Molekülgröße und Ladungsunterschiede bestimmt werden. Außerdem bietet die analytische HPLC die Möglichkeit, die partielle Degradation des Adx zu verfolgen. Die auf die Säule aufgetragene Probe war zum Zeitpunkt der Messung 5 Tage alt. Am Auftreten des Doppelpeaks ist die Degradation deutlich zu erkennen (Abb.38). Der Vergleich der Elutionsprofile unterschiedlich alter Adx-Proben veranschaulicht das Ausmaß der C-terminalen Degradation (Abb.39).

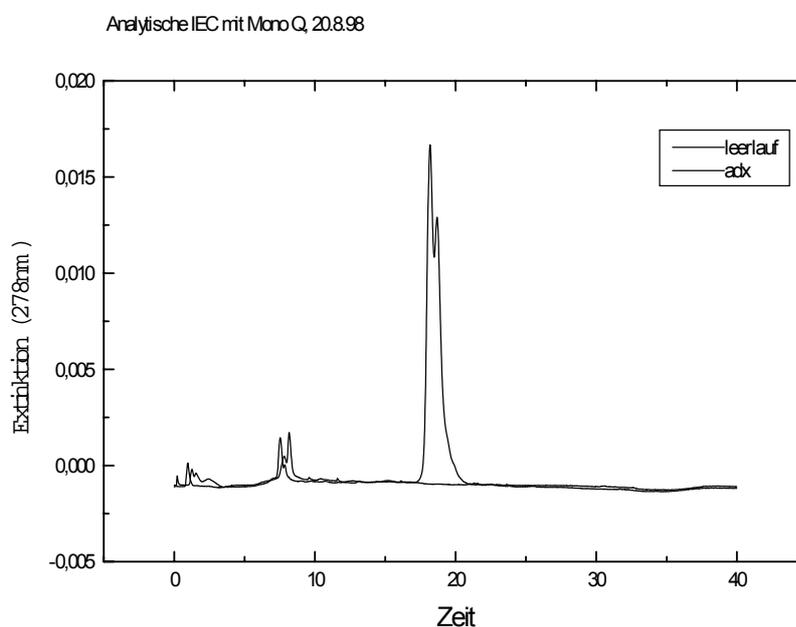


Abb.38: Analytische Ionenaustauschchromatographie des bAdx. Elutionsprofil des HPLC-Laufes mit der Mono-Q HR5/5-Säule, Flußrate: 0,5 ml/min. Detektion bei 278 nm.

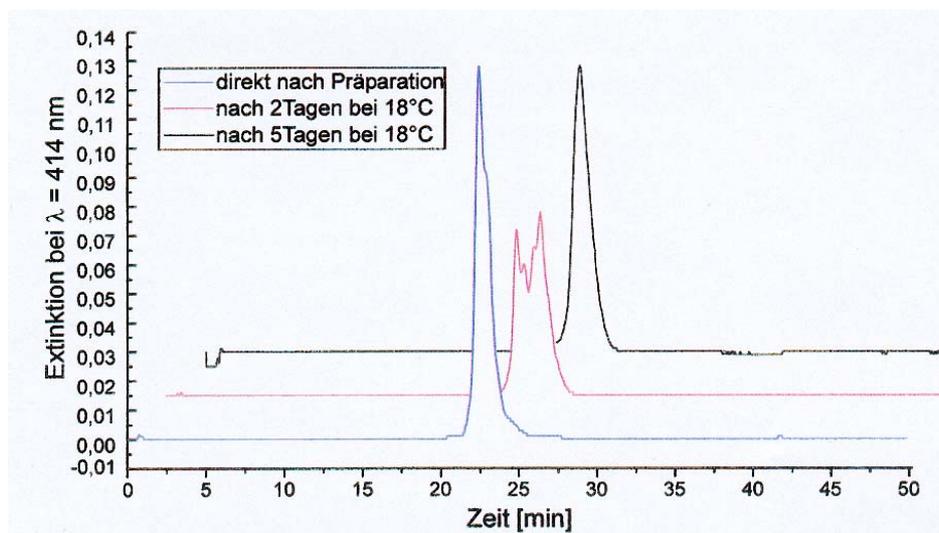


Abb.39: Analytische Anionenaustausch-HPLC mit Mono-Q HR 5/5-Säule. Blau: Direkt nach der Aufreinigung; rot: 2 Tage alte Probe; schwarz: 5 Tage alte Probe. Flußrate: 0,5 ml/min. Detektion bei 278 nm.

### 3.1.3.2. NMR-Messungen zur Veranschaulichung der Degradation

Von der frischen, sowie von einer drei und sechs Tage alten Probe wurden eindimensionale Spektren aufgenommen, um aus den Unterschieden der Spektren auf die Degradation des bAdx schließen zu können (Abb.40).

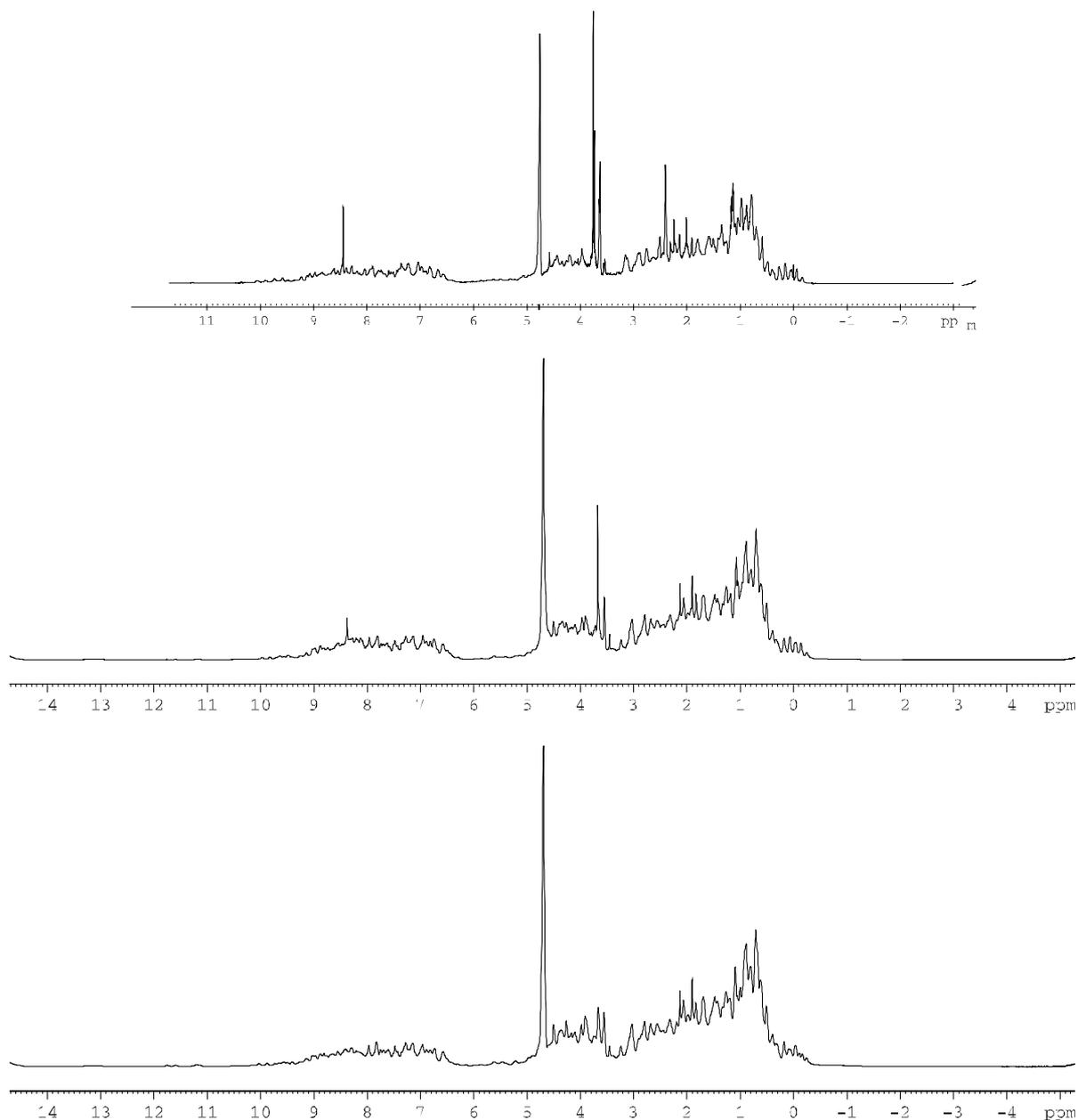


Abb.40: 1D-NMR-Spektren des bAdx. Unten: Spektrum des frischen bAdx; in der Mitte: 3 Tage alte Probe; oben: Die 6 Tage alte Probe enthält bereits stark degradiertes bAdx.

Die mittels Ionenaustausch-, Reverse-Phase-HPLC und NMR-Technik erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass für NMR-Messungen möglichst frische Proben verwendet werden müssen.

### 3.1.4. NMR-Spektroskopische Untersuchungen

#### 3.1.4.1. Zuordnung des reduzierten Adrenodoxins

Die sequentielle Zuordnung des reduzierten Adrenodoxins erfolgte durch Anwendung folgender 3D Tripleresonanzexperimente: HNCA, HN(CO)CA, H(N)CACO, HNCACB, HNCO, HBHA(CO)NH, HCACO und (HCA)CO(CA)NH. Für die Zuordnung der Seitenketten wurden des weiteren folgende Experimente aufgenommen: 3D (H)CC(O)NH-TOCSY, 3D HCCH-TOCSY, 3D HNHB und ein 3D TOCSY-( $^{15}\text{N}$ , $^1\text{H}$ )-HSQC. Zur Kollektion der NOE Informationen wurden zusätzlich 3D NOESY-( $^{15}\text{N}$ , $^1\text{H}$ )-HSQC und 3D NOESY-( $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ )-HSQC Experimente durchgeführt. Aufgrund des wesentlich ausgeprägteren paramagnetischen Moments im reduzierten Zustands [Poe et al. 1979, Brinzinger et al. 1966, Watari et al. 1966, Kimura et al. 1970, Gibson et al. 1966] konnten nur 70 % der 128 Aminosäurereste zugeordnet werden (Tab.4). Eine Zuordnung war nur für solche Reste möglich, die sich mindestens 8 Angström vom [2Fe-2S]-Zentrum entfernt befinden. Trotz des ausgeprägten Paramagnetismus konnten wichtige Regionen, die sich außerhalb des Einflussbereichs des [2Fe-2S]-Clusters befinden, zugeordnet werden und mit dem oxidierten Zustand verglichen werden. Die chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Aminosäurerest	$^{15}\text{N}$	$\text{C}'$	$^1\text{H}^{\text{N}}$	$^{13}\text{C}^{\alpha}$	$^1\text{H}^{\alpha}$	$^{13}\text{C}^{\beta}$	$^1\text{H}^{\beta}$	$^{13}\text{C}^{\gamma}$	$^{13}\text{C}^{\delta}$	$^{13}\text{C}^{\epsilon}$
Ser-1										
Ser-2		177,24		58,31	4,45	63,83	3,88			
Ser-3	117,65	177,68	8,32	58,13	4,45	62,93	3,88			
Glu-4	121,71	175,84	8,42	56,08	4,3	29,57	2,08/1,91	36,26		
Asp-5	120,6	176,54	8,24	53,79	4,58	40,31	2,67			
Lys-6	118,87	175,66	7,87	54,71	4,91	34,83	1,66	25,23	28,99	42,02
Ile-7	117,96	177,07	8,92	58,13	4,47	40,08	1,87	25,23/17,96	13,45	
Thr-8	121	177,86	8,73	62,25	4,75	68,65	3,84	21,72		
Val-9	124,45	177,86	8,46	60,42	4,18	34,6	1,62	21,47/22,72		
His-10	126,18	177,6	8,74	53,56	5,5	30,48	3,34/2,69			
Phe-11	122,02	176,37	9,59	55,16	5,21	41	3,00/2,29			
Ile-12	122,93	175,93	9,1	59,96	4,62	36,88	1,72	26,48/16,71	12,7	
Asn-13	125,06	174,96	8,918	50,59	4,64	38,25	3,34/2,96			
Arg-14	118,36	175,58	8,43	58,36	4,09	29,11	1,91/1,74	28,24	43,78	
Asp-15	115,63	175,05	7,65	52,65	4,6	40,08	2,86/2,71			
Gly-16	108,22	176,45	8,15	44,65	3,86					
Glu-17	122,12	176,13	7,95	55,16	4,3	29,8	1,99	36,01		

Aminosäurerest	<sup>15</sup> N	C'	<sup>1</sup> H <sup>N</sup>	<sup>13</sup> C <sup>α</sup>	<sup>1</sup> H <sup>α</sup>	<sup>13</sup> C <sup>β</sup>	<sup>1</sup> H <sup>β</sup>	<sup>13</sup> C <sup>γ</sup>	<sup>13</sup> C <sup>δ</sup>	<sup>13</sup> C <sup>ε</sup>
Thr-18	118,97	177,42	8,66	62,25	4,98	68,42	3,99	21,47		
Leu-19	130,85	176,02	9,95	52,65	4,81	42,37	1,87/1,47	25,48	22,97	
Thr-20	122,42	178,12	8,89	63,16	4,87	69,56	3,91	22,47		
Thr-21	121,1	179,79	8,69	59,51	4,68	70,47	3,84	20,72		
Lys-22	117,55	175,23	7,93	53,34	5,56	35,28	1,72/1,51	24,48	28,99	42,02
Gly-23	107,3	175,31	8,79	43,28	3,95					
Lys-24	121,81	175,66	8,84	54,25	4,68	33	1,66	24,23	28,99	41,52
Ile-25	122,42	174,35	8,31	62,7	3,32	36,65	1,74	28,49/16,96	12,45	
Gly-26	116,44	174,35	8,73	44,42	4,16					
Asp-27	123,13	175,75	8,21	54,02	4,75	40,54	2,96/2,86			
Ser-28	117,86	175,58	9,55	56,53		65,22				
Leu-29										
Leu-30						28,41	2,1			
Asp-31		174,96		57,81	4,35	38,94	3,30/2,58			
Val-32	117,96	173,21	7,89	65,9	3,65	31,4	2,39	22,72/23,73		
Val-33	121,51	173,82	7,62	66,59	3,09	31,4	2,29	20,72/23,22		
Val-34	118,77	170,75	8,47	65,68	3,74	31,86	2,16	20,72/22,22		
Gln-35	118,77	174,35	9,2	57,68	4,07	27,51	2,1	34,25		
Asn-36	112,48	178,91	7,24	52,88	4,75	38,71	2,77/2,54			
Asn-37	116,34	177,33	7,85	53,34	4,37	36,65	2,98/2,65			
Leu-38	115,32	174,44	7,63	55,16	3,97	41	1,34/0,92	26,48	21,97/24,98	
Asp-39	121,71	177,33	8,55	52,88	4,41	39,17	2,79/2,43			
Ile-40	123,54	176,02	7,66	59,51	4,05	37,8	1,34	25,48/18,71	12,95	
Asp-41	128,21	173,91	8,7	56,31	4,28	40,77	2,60/2,48			
Gly-42	114,2	173,91	8,88	44,88	3,73					
Phe-43	119,48		7,38	58,59		41				
Gly-44-His56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leu-57	123,35	178,39	9,559	53,34	4,81	48,99	1,68/1,01	36,26	28,49/23,98	
Ile-58	118,87	175,31	7,99	61,32	4,51	40,01	1,53	27,74/17,46	14,2	
Phe-59	127,52	176,1	8,72	58,31	4,56	42,52	3,19			
Glu-60	119,18	172,94	9,13	56,56	4,37	31,24	2,33/1,91	37,76		
Gln-61	125,35	175,14	9,56	60,07	3,8	27,74	2,16	32,25		
His-62	112,78	174,96	8,5	58,81	4,47	28,74	3,23/3,11			
Ile-63	119,28	174,26	6,3	59,82	3,91	36,01	2,2	25,73/17,46	8,94	
Phe-64	120,29	174,35	8,74	61,57	3,59	40,02	3,15/2,94			
Glu-65	113,09	175,31	7,963	57,22	4,05	29,34	2,12	36,01		
Lys-66	116,94	175,4	7,44	54,25	4,41	32,54	2,01/1,72	24,73	28,74	42,02

Aminosäurerest	<sup>15</sup> N	C'	<sup>1</sup> H <sup>N</sup>	<sup>13</sup> C <sup>α</sup>	<sup>1</sup> H <sup>α</sup>	<sup>13</sup> C <sup>β</sup>	<sup>1</sup> H <sup>β</sup>	<sup>13</sup> C <sup>γ</sup>	<sup>13</sup> C <sup>δ</sup>	<sup>13</sup> C <sup>ε</sup>
Leu-67	119,48	174,52	6,719	53,79	4,05	41	1,26	25,23	21,97	
Glu-68	122,02	175,93	8,93	56,08	3,93	29,11	1,95	36,26		
Ala-69	124,66	173,38	8,23	51,96	3,95	17,92	1,3			
Ile-70	125,27	176,02	8,43	62,25	3,84	38,94	1,49	29,24/15,71	14,95	
Thr-71	118,67	176,28	8,18	60,19	4,51	71,39	4,72	21,47		
Asp-72	122,53	174,17	8,98	57,22	4,27	39,62	2,77/2,52			
Glu-73	116,94	172,24	8,92	59,73	4,05	28,2	1,95	37,01		
Glu-74	119,48	172,24	7,69	58,24	4,03	28,77	2,1	36,26		
Asn-75	119,37	174,96	8,73	56,76	4,62	39,03	2,75			
Asp-76	117,25	177,68	8,35	56,53		39,85				
Met-77										
Leu-78	123,54	177,24	8,8	57,22	3,76	41,77	1,78/1,66	26,48	24,23/24,73	
Asp-79	114,1	174,44	7,49	56,08	4,41	40,77	2,69/2,52			
Leu-80	117,86	174,26	7,48	53,56	4,35	41	2,04/1,64	25,48	22,22	
Ala-81	124,25	174,44	7,89	51,51	4,45	18,83	1,24			
Tyr-82	122,22	174,96	8,27	58,36	4,14	38,03	2,81/2,69			
Gly-83	114	174,96	7,91	46,25	3,46					
Leu-84	118,87	175,23	7,18	56,31	3,74	42,77	1,51/1,43	25,98	23,73/24,48	
Thr-85	116,84	177,16	8,78	59,28	4,37	73,9	4,93	21,72		
Asp-86	117,45	175,93	8,54	54,02	4,45	39,4	2,71			
Arg-87	119,79	176,72	8,18	54,02	2,9	29,34	2,10/1,22	27,48	43,02	
Ser-88	119,38	177,77	6,868	59,96	5,48	64,76	4,09/3,88			
Arg-89	117,64	177,77	9,144	52,48		33,86				
Leu-90-Ile94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cys-95	123,13	176,89	7,99	56,53	5	28,66	2,69/2,37			
Leu-96	120,39	173,29	8,94	55,16	4,66	41,68	2,01/1,09	26,48	24,48/21,72	
Thr-97	113,29	176,89	7,713	58,36	4,62	71,39	4,55	21,47		
Lys-98	120,39	173,56	9,03	59,06	3,91	31,75	1,87	24,98	28,74	42,02
Ala-99	119,79	173,91	7,85	53,8	4,18	18,21	1,38			
Met-100	115,52	177,68	7,59	56,31	4,07	32,5	2,50/2,04	33,5		18,27
Asp-101	118,06	174,17	7,29	56,81	4,43	40,77	2,77			
Asn-102	122,53	177,6	9,97	55,56	3,88	37,76	3,23/3,04			
Met-103	118,06	178,74	8,41	55,85	4,64	30,94	2,22	32,75		
Thr-104	116,48	176,45	8,65	61,11	5,35	69,79	3,76	21,47		
Val-105	123,13	178,74	9,06	57,91	4,54	33,46	1,36	19,72/22,97		
Arg-106	122,42	177,42	8,79	54,02	4,77	32,31	1,68/1,49	27,99	43,27	
Val-107	126,08	177,95	8,37	59,51		32,31				

Aminosäurerest	<sup>15</sup> N	C'	<sup>1</sup> H <sup>N</sup>	<sup>13</sup> C <sup>α</sup>	<sup>1</sup> H <sup>α</sup>	<sup>13</sup> C <sup>β</sup>	<sup>1</sup> H <sup>β</sup>	<sup>13</sup> C <sup>γ</sup>	<sup>13</sup> C <sup>δ</sup>	<sup>13</sup> C <sup>ε</sup>
Pro-108		175,49		62,25	4,45	32,31	2,41/2,14	26,98	52,05	
Asp-109	118,97	178,03	8,96	56,53	4,18	40,77	2,75/2,67			
Ala-110	116,64	177,51	7,25	49,68	4,22	19,74	0,48			
Val-111	109,33	177,51	7,81	57,91	4,58	34,6	1,68	18,21/21,22		
Ser-112	117,05	179	8,49	56,08	4,45	63,85	3,74/3,55			
Asp-113	126,38	174,08	8,73	52,19	4,26	39,62	1,91			
Ala-114	124,85	172,77	8,237	54,02	4,24	19,06	1,64			
Arg-115	116,74	173,73	8,89	57,22	4,24	29,57	2,08	26,23	44,28	
Glu-116	117,45	175,58	7,95	55,85	4,33	29,57	2,18/2,04	36,26		
Ser-117	115,42	177,24	7,94	57,68	4,37	63,16	4,49/3,91			
Ile-118	122,22	176,01	8	60,65	4,18	38,25	1,89	26,98/17,21	12,95	
Asp-119	123,74	175,4	8,36	53,79	4,62	40,54	2,75/2,62			
Met-120	121,81	174,79	8,38	55,16	4,47	31,86	2,16/2,01	30,74		21,97
Gly-121	109,23	174,79	8,49	45,11	3,95					
Met-122	119,58	176,63	8,15	55,16	4,51	32,08	2,12/1,97	31,75		24,38
Asn-123	124,96	172,24	8,034	54,48		39,85				

Tab.4: Zuordnung des reduzierten Zustands des Adrenodoxins. Die Bereiche 44-55 und 90-94 konnten aufgrund ihrer geringen Distanz zum [2Fe-2S]-Clusters nicht zugeordnet werden.

### 3.1.4.2. Sekundärstruktur

Bei der Sekundärstrukturbestimmung wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet. Anhand des CSI, der die  $^1\text{H}^\alpha$ -,  $^{13}\text{C}'$ -,  $^{13}\text{C}^\alpha$ - und  $^{13}\text{C}^\beta$ -Resonanzen verwendet, um Sekundärstrukturelemente vorherzusagen, konnten drei Helices (31-35, 72-79, 98-102) und vier  $\beta$ -Stränge (6-12, 18-24, 103-107, 110-112) identifiziert werden (Abb.41).

Außerdem konnten durch eine qualitative Abschätzung der sequentiellen und Nahbereichs-NOEs auf die Sekundärstruktur des Adrenodoxins geschlossen werden. So weisen  $\text{H}^\alpha_i\text{-H}^{\text{N}}_{i+3}$  und  $\text{H}^\alpha_i\text{-H}^{\text{N}}_{i+4}$  Konnektivitäten in den Bereichen 33-36, 61-64, 72-75 und 98-100 auf helicale Sekundärstrukturelemente hin. Die für eine  $\beta$ -Faltblattstruktur charakteristischen, starken sequentiellen  $\text{H}^\alpha_i\text{-H}^{\text{N}}_{i+1}$  Konnektivitäten wurden für die Bereiche 6-12, 21-24, 57-58, 88-89, 103-106 gefunden (Abb.41).

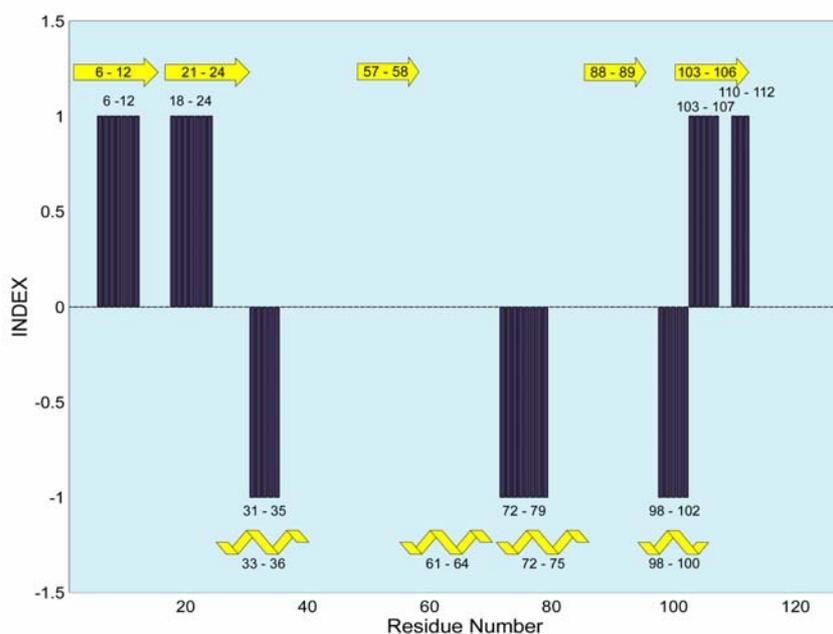


Abb.41: „Chemical Shift Index“ (CSI) des reduzierten Zustands. Die Sekundärstrukturelemente sind in Form von Balken dargestellt. Balken im Positiven:  $\beta$ -Faltblätter (z.B.: 6-12); Balken im Negativen: Helices (z.B.: 72-79). Die gelben Symbole geben die aus NOE-Abstandsbeschränkungen gewonnenen Informationen über die Sekundärstruktur wieder (z.B.: Helix 61-64).

### 3.1.4.3. Nichtselektive T<sub>1</sub>-Zeiten

Abbildung 42 zeigt den Einfluß des paramagnetischen Zentrums auf die T<sub>1</sub>-Relaxationszeiten. Die Aminosäurereste 29-32, 44-57, 76-78 und 90-94 konnten aufgrund der stark verkürzten Relaxationszeiten nicht zugeordnet werden. Aminosäurereste, die im Einflussbereich des [2Fe-2S]-Clusters liegen, aber dennoch zugeordnet werden konnten, lieferten wertvolle Abstandsinformationen. So konnte der Abstand von Protonen zum paramagnetischen Zentrum aus der  $r^{-6}$  Abhängigkeit der Relaxationsraten berechnet werden. Außer für Val32 und Tyr82 stimmen die aus den Relaxationszeiten ermittelten Abstände sehr gut mit den aus der Röntgenstruktur des oxidierten Zustands ermittelten überein (Tab.5).

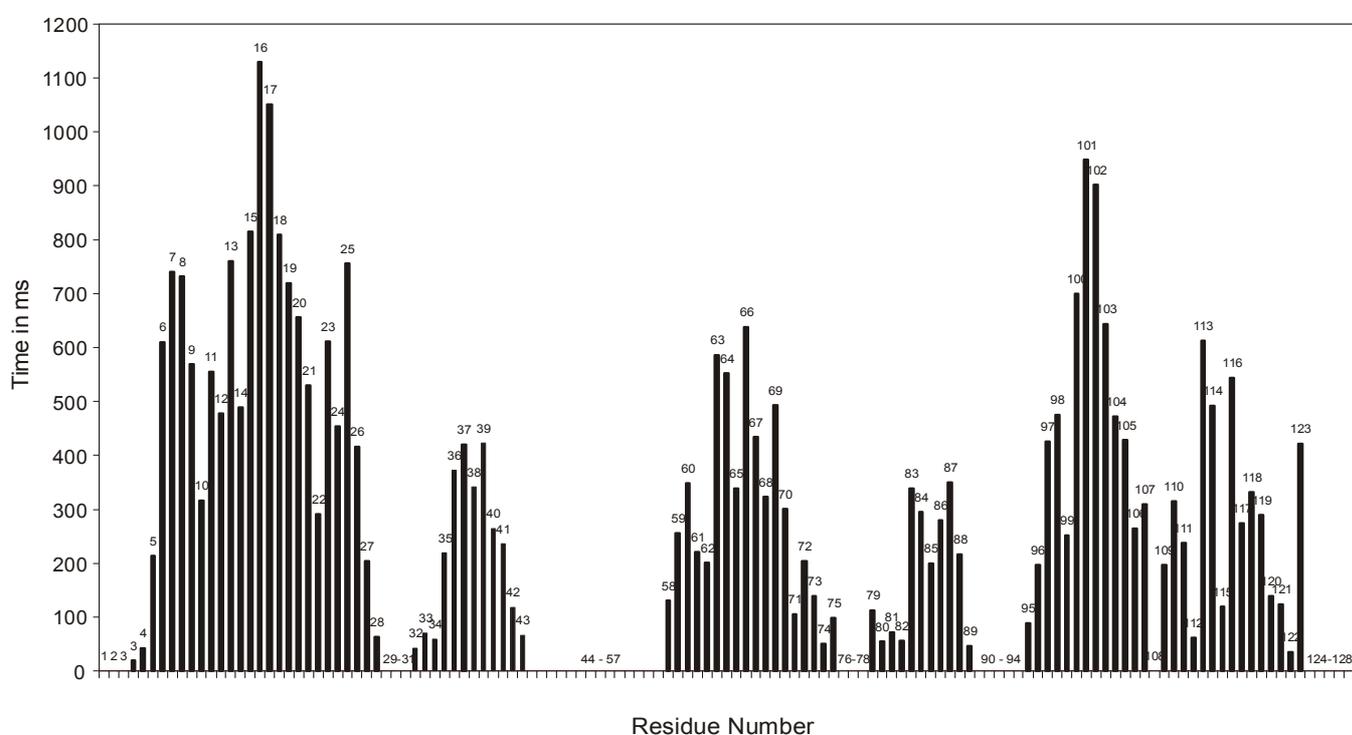


Abb.42: T<sub>1</sub>-Zeiten des reduzierten Zustands. Eine starke Abnahme der Relaxationszeiten ist in der näheren Umgebung des [2Fe-2S] Clusters zu beobachten. Die Bereiche 29-31, 44-57, 76-78 und 90-94 konnten aufgrund der paramagnetischen Eigenschaften des [2Fe-2S] Clusters nicht zugeordnet werden.

### 3.1.4.4. Tertiärstruktur

Aus den <sup>15</sup>N-NOESY-HSQC und <sup>13</sup>C-NOESY-HSQC-Spektren wurden mit dem Programm NMR2st ca. 1300 effektiv abstandsbeschränkende NOE-Signale eindeutig zugeordnet. Nach Minimierung der Zielfunktion wurden im letzten Schritt 50 Strukturen mit DYANA berechnet.

Proton	Aus T1-Zeiten erhaltener	Aus der X-ray- Struktur erhaltene
SER28	10,4 +/- 1,1	11
VAL32	9,7 +/- 0,3	10,7
VAL33	10,7 +/- 0,1	10,3
VAL34	10,3 +/- 0,1	10,4
GLY42	12,2 +/- 0,2	12,4
PHE43	10,5 +/- 0,3	10,2
ILE58 H <sup>N</sup>	12,6 +/- 0,3	12,3
THR71	11,8 +/- 0,2	11,6
GLU73	12,9 +/- 0,5	12,4
GLU74	10 +/- 0,1	9,9
ASN75	11,6 +/- 0,2	11,8
ASP79	12 +/- 0,6	11,4
LEU80	10,1 +/- 0,6	10,7
ALA81	10,7 +/- 0,1	10,8
TYR82	10,2 +/- 1,1	11,3
ARG89	9,8 +/- 0,2	10,0
CYS95	11,3 +/- 0,2	11,5
LEU96	15,4 +/- 0,4	15,8

Tab.5: Aus den T1-Zeiten errechnete Abstände zwischen H<sup>N</sup>-Proton und dem nächstgelegenen Fe-Atom.

In der rechten Spalte sind die aus der Röntgenstruktur bestimmten Abstände gegeben.

Die 20 Strukturen mit den besten Targetfunktionen sind als Strukturensamble in Abb.44a dargestellt. Der RMSD der Strukturen beträgt 2,36 +/- 0,25 Angström für alle Schweratome und 1,53 +/- 0,22 Angström für das Proteinerückrat. Die Struktur zeigt in der Nähe des [2Fe-2S]-Clusters und in Bereichen mit nicht zugeordneten Aminosäureresten eine höhere Dispersion des Proteinerückrates auf. (Bsp.: Bereich 45-80 > RMSD von 2,6). Die Wechselwirkungsdomäne (72-86) ist aufgrund der fehlenden Zuordnung für Met77 und Lys78 strukturell schlecht definiert.

Außerhalb des Einflussbereichs des [2Fe-2S]-Clusters ist die Struktur dagegen teilweise sogar sehr gut aufgelöst (Bsp.: Bereich 4-30 > RMSD von 0,76).

---

### Abstandsbeschränkungen

Anzahl aller Abstandsbeschränkungen	1308
Intraresiduelle Abstände	131
Sequentielle Abstände	325
Nahbereichsabstände	221
Weitbereichsabstände	574

---

Strukturbündel	Aminosäurereste	RMSD (Å)
Rückrat	4-111	1,5
	4-30	0,76
	40-86	1,66
Schweratome	4-111	2,36
	4-30	1,65
	40-86	2,6

Tab.6: RMSD-Werte (Å) für einzelne Bereiche des Strukturbündels

Die Qualität der 20 besten Strukturen wurde mit PROCHECK-NMR analysiert. Das Ramachandran-Diagramm zeigt durch Farbabstufungen verschieden intensiv populierte Bereiche, die einer Hyperfläche der potentiellen Energie entsprechen. Die roten, gelben und hellgelben Regionen kennzeichnen energetisch günstige  $\phi$ - $\psi$  Winkelkombinationen. In weißen Regionen führt die Diederwinkelkombination zu ungünstigen van-der-Waals-Kontakten. Für den reduzierten Zustand des Adx befinden sich 49.4% in besonders günstigen (rot), 38.1% in zusätzlich erlaubten (gelb), 8.4% in großzügig erlaubten (hellgelb) und 4.2% in verbotenen Bereichen (weiß).

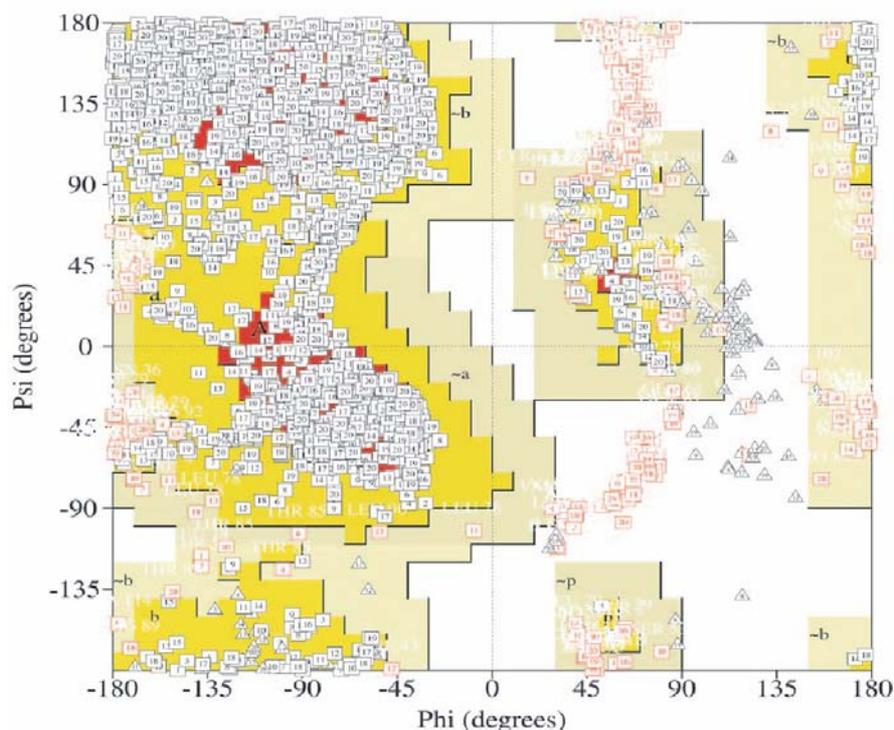


Abb.43: Ramachandran Diagramm: Die roten, gelben und hellgelben Regionen kennzeichnen energetisch günstige  $\phi$ - $\psi$  Winkelkombinationen.

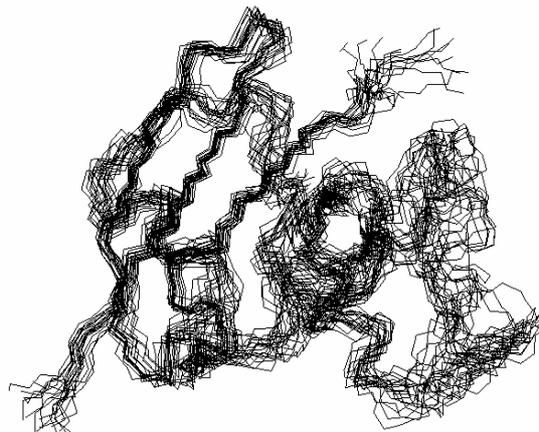


Abb.44a: Strukturbündel der 20 energetisch günstigsten Strukturen des reduzierten bAdx . Bereiche mit höherer Dispersion sind für die Wechselwirkungsdomäne und im gesamten Einflussbereich des [2Fe-2S]-Clusters zu erkennen. Bereiche, die weiter als 8-10 Angström vom [2Fe-2S]-Clusters entfernt liegen, wie beispielsweise die  $\beta$ -Faltblätter A, B und J, sind mit einem partiellen RMSD von 0.76 sehr gut aufgelöst.

Der reduzierte Zustand stellt ein ( $\alpha$ - $\beta$ )-Protein dar. Die fünf  $\beta$ -Faltblätter und fünf Helices sind, vom N-Terminus beginnend, mit Großbuchstaben gekennzeichnet (Abb.44b). Die  $\beta$ -Stränge A(Reste Lys6-Ile12), B(Thr21-Lys24), D(Leu57-Ile58), G(Ser88-Arg89) und J(Met103-Arg106) gehören zu einem  $\beta$ -Strang des gemischten Typs. Die  $\beta$ -Stränge G und D, D und J und A und B sind antiparallel gepaart, wohingegen J und A parallel gepaart sind. Drei Helices, C(Leu29-Asn36), E(Glu61-Phe64) und F(Asp72-Asn75) sind  $\alpha$ -Helices, (Lys98-Met100) gehört zum Typ der  $3_{10}$ -Helices. Das bAdx enthält zwei strukturelle Domänen, die essentiell für seine Funktion sind. Die Reste Asp5-Cys55 sowie Gly91-Val111 gehören zur Kerndomäne, während die Reste His56-Leu90 eine große Haarnadelschleife formen. Die Haarnadelschleife enthält alle Reste, die für die Wechselwirkung von bAdx mit AR und Cyt P450 notwendig sind und wird deshalb als Wechselwirkungsdomäne bezeichnet. Sie umfasst die  $\alpha$ -Helices E und F, die Loops Lys66-Ile70 und Leu80-Ser86 sowie die  $\beta$ -Stränge D und G. Beide Domänen sind durch eine „hinge-region“ verbunden.

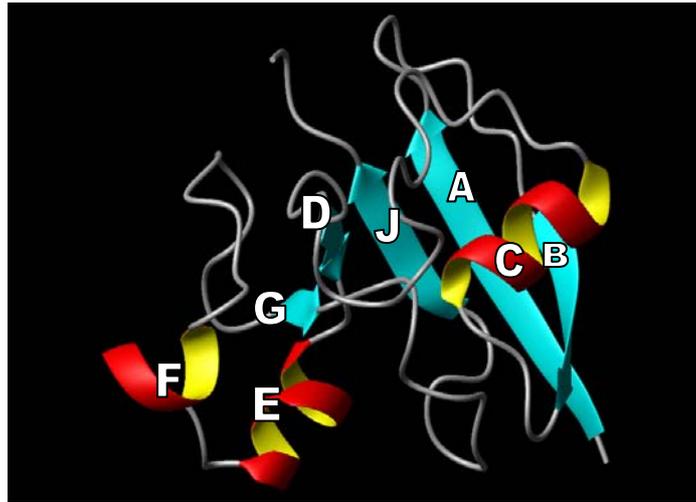


Abb.44b: Ribbon-Diagramm des reduzierten Zustands. Helices (rot/gelb) und  $\beta$ -Faltblätter (blau) sind mit großen Buchstaben gekennzeichnet. Helix H und I sind hier nicht dargestellt.

### 3.1.5. Vergleich zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand

Die folgenden beiden Abbildungen (Abb.45 A und B) zeigen Vergleiche der 1D-Spektren des oxidierten und reduzierten Zustands. Bei Vergrößerung der spektralen Weite (Abb.45B) sind deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zuständen zu erkennen. Die 1D-Spektren dienen zur Kontrolle des Redoxzustandes.

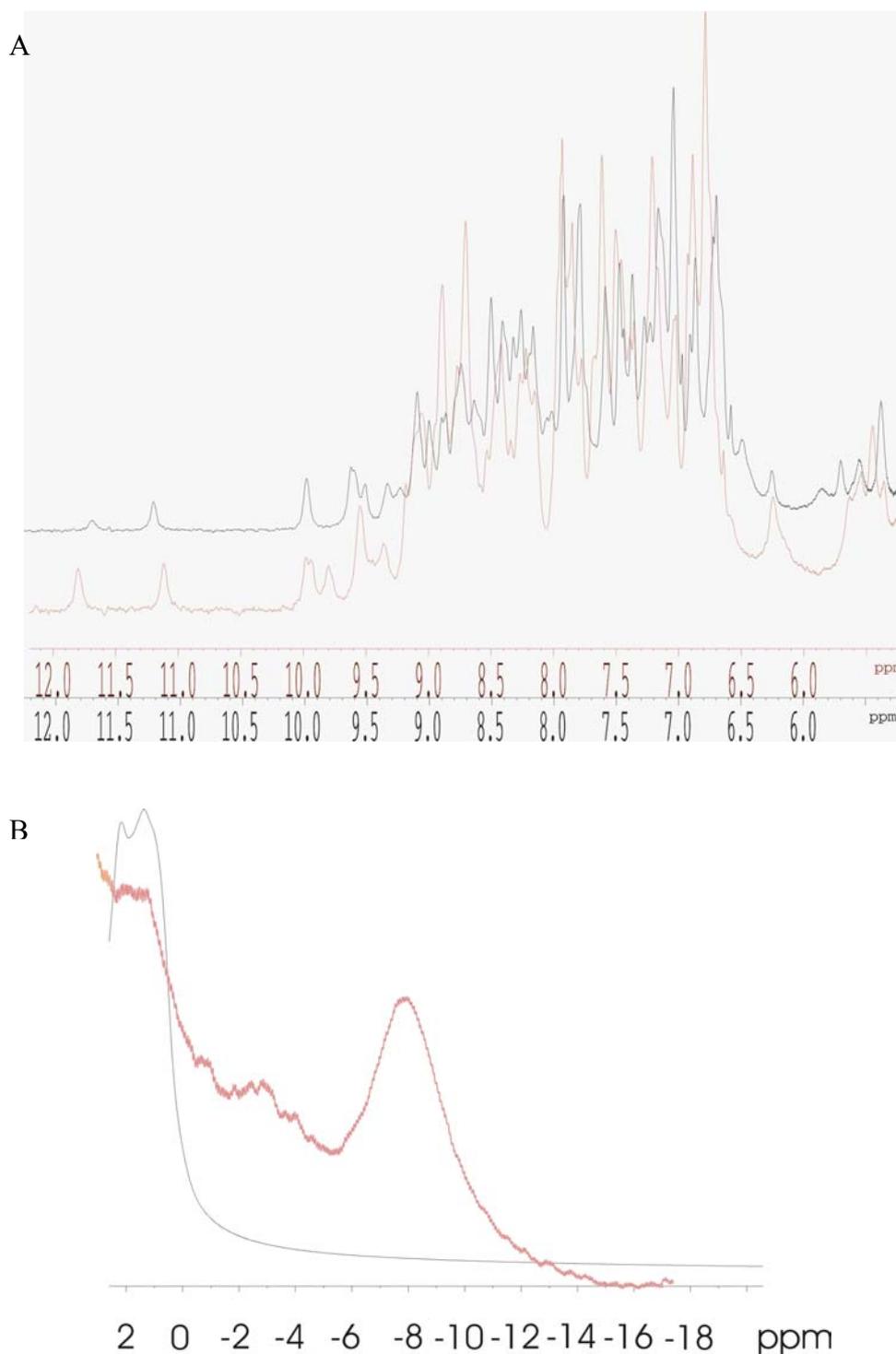


Abb.45: A: Vergleich der 1D-Spektren des oxidierten(schwarz) und reduzierten(rot) Zustands (Spektrale Weite 5-12 ppm). B: Bei Vergrößerung der spektralen Weite sind deutliche Unterschiede im Bereich zwischen -6 und -12 ppm zu erkennen (oben: ox. Zustand; unten: red. Zustand)

Der Vergleich der  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren deutet bereits auf größere Änderungen der chemischen Verschiebungen hin (Abb.46). Diese Änderungen können einerseits durch das geänderte paramagnetische Moment des  $[\text{2Fe-2S}]$ -Clusters und andererseits durch Änderung der chemischen Umgebung verursacht werden. Der Vergleich beider Redoxzustände wird deshalb auf solche Bereiche beschränkt, die sich weiter als 8 Angström vom paramagnetischen Zentrum entfernt befinden.

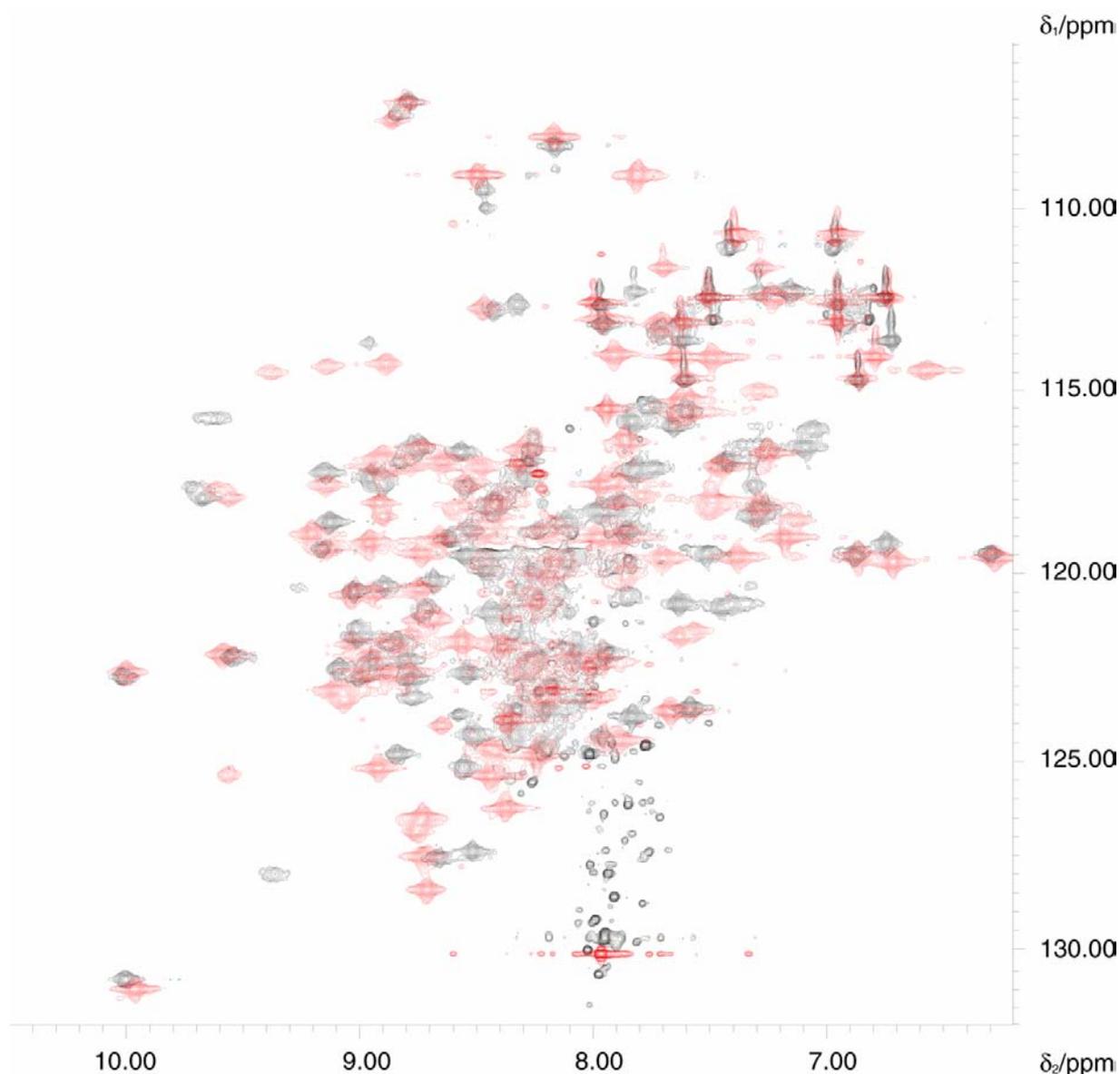


Abb.46: Vergleich der  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des reduzierten (rot) und oxidierten (schwarz) Zustands.

Die Änderung der chemischen Verschiebung wurde für Resonanzen der  $\text{H}^{\text{N}}$ ,  $\text{C}^{\alpha}$ ,  $\text{H}^{\alpha}$  und  $^{15}\text{N}$  Atome bestimmt und in Form der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen  $\Delta\delta_{\text{tot}}$  [Ayed et al. 2001] in Abb.47 dargestellt. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen

sind im Bereich des C-Terminus am ausgeprägtesten. Weiterhin deuten starke chemischen Verschiebungsänderungen im Bereich von Tyr82 auf konformationelle Änderungen hin. Beide Regionen liegen außerhalb des Einflussbereichs des [2Fe-2S]-Clusters und können somit strukturelevante Informationen liefern.

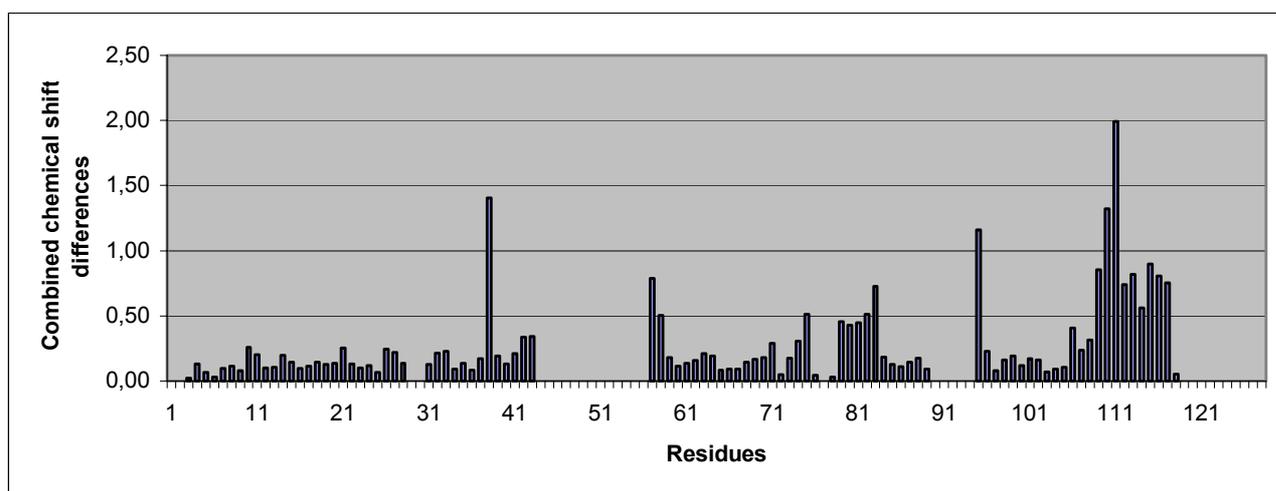


Abb.47: Die kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen zwischen oxidierten und reduzierten Zustand. Signifikante Änderungen der chemischen Verschiebung sind vorwiegend im Bereich des C-Terminus sowie in der Loop-Region 80-86 aufzufinden.

Die größten Änderungen der chemischen Verschiebung wurden für Val111 gefunden. Val111 befindet sich nicht im Einflussbereich des [2Fe-2S]-Clusters und ist zudem nicht von der C-terminalen Degradation betroffen, so dass eine homogene Zuordnung für diese Aminosäure erfolgen konnte. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen sehr gut mit den Daten anderer Arbeitsgruppen überein [Miura et al. 1991, Xia et al. 1998]. Ähnliche Verschiebungsdifferenzen konnten beispielsweise von Xia et al. und Miura et al. für das humane Ferredoxin bzw. das bAdx erhalten werden. Zudem wurden von Pochapsky und Mitarbeitern [Pochapsky et al. 1994] redoxbedingte Änderungen für den C-terminalen Bereich des Putidaredoxins aus *Pseudomonas putida* vorhergesagt. Die C-terminalen Änderungen werden mit der Komplexbildung zwischen Adx und CytP450 in Verbindung gebracht. So haben Experimente mit C-terminal verkürzten Adx- oder Pdx-Mutanten gezeigt, dass die Komplexbildung durch das Fehlen des C-Terminus stark beeinflusst wird [Uhlmann et al. 1994, Schiffler et al. 2001].

Der Vergleich der „Chemical Shift Indices“ zeigt geringe Änderungen der Sekundärstrukturelemente auf. Die  $\alpha$ -Helix E (61-64) und das  $\beta$ -Faltblatt D (56-58) konnten

nur für den oxidierten Zustand identifiziert werden, während das  $\beta$ -Faltblatt 110-112 nur für den reduzierten Zustand nachgewiesen werden konnte. Größere Unterschiede sind beim Vergleich der NOE-Konnektivitäten feststellbar. Die Helices F (ox.:72-79; red.:72-75) und C (ox.:29-35; red.:33-36) sind im reduzierten Zustand verkürzt. Helix E reicht im oxidierten Zustand von 64-66 und im reduzierten von Aminosäurerest 61-64. Die  $\beta$ -Faltblattstruktur ist weitestgehend identisch, so konnten für beide Redoxzustände die  $\beta$ -Faltblätter A, B, D, G und J gefunden werden.

Vergleicht man die aus den  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektren erhaltenen NOE-Konnektivitäten für Asp76 und Asp79 des oxidierten Zustands mit denen des reduzierten Zustands, so sind Unterschiede im Signalaufspaltungsmuster erkennbar (Abb.48). Die beiden  $\text{H}^{\beta}$ -Protonen des Asp76 ergeben für den oxidierten Zustand ein Duplett. Im reduzierten Zustand hingegen sind die Signale für die  $\text{H}^{\beta}$ -Protonen nicht aufgespalten und ergeben ein Singulett mit doppelter Intensität. Diese markanten Unterschiede können die Folge direkter oder indirekter Änderungen der chemischen Umgebung sein. Die Helix F im speziellen Asp76 könnte im oxidierten Zustand durch Wasserstoffbrücken stabilisiert sein und aufgrund dessen ein entsprechendes Aufspaltungsmuster für die  $\text{H}^{\beta}$ -Protonen von Asp76 ergeben. Im Falle eines Verlustes des stabilisierenden Wasserstoffbrückennetzwerkes im reduzierten Zustand könnte die erhöhte Flexibilität und die damit bedingte Erhöhung der Rotationsfrequenz zum Verlust der Signalaufspaltung der  $\text{H}^{\beta}$ -Protonen-Resonanzen führen. Man erhält ein Singulett mit doppelter Intensität. Außerdem könnte eine Änderung der chemischen Umgebung zur Kompensation des Diastereotopieeffektes der  $\text{H}^{\beta}$ -Protonen führen.

Für Asp79 sind größere Veränderungen der chemischen Verschiebung für  $\text{H}^{\text{N}}$  erkennbar. Der Vergleich der Konnektivitäten macht deutlich, dass es auch im Bereich der Wechselwirkungsdomäne zu strukturellen Veränderungen kommt.

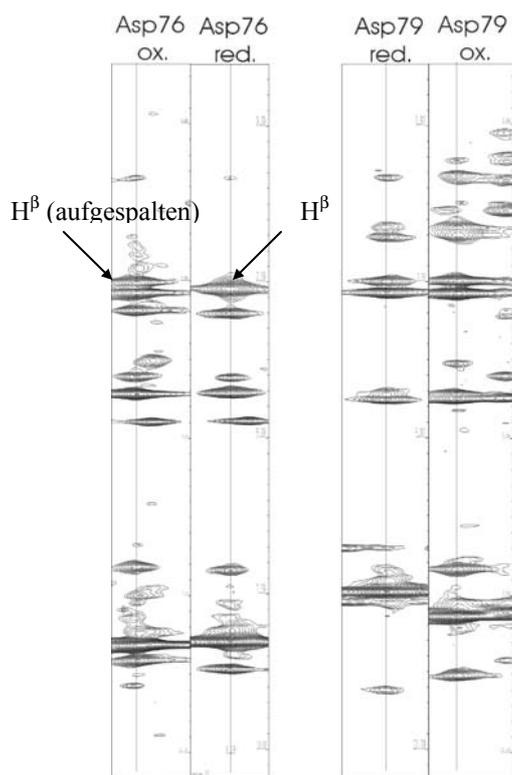


Abb.48: Aus den NOESY-HSQC-Spektren erhaltene NOE-Konnektivitäten für Asp76 und Asp79 des oxidierten und reduzierten Zustands. Deutliche Unterschiede sind für die  $H^\beta$ -Protonen des Asp76 zu erkennen. Im Falle des oxidierten Zustands sind die Resonanzen für die  $H^\beta$ -Protonen aufgespalten und ergeben ein Duplett, im reduzierten Zustand hingegen ein Singulett mit doppelter Intensität. Zusätzliche Signale im oxidierten im Vergleich zum reduzierten Zustand deuten im Falle des Aminosäurerestes Asp79 auf eine kompaktere strukturelle Umgebung hin. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich der Abstand zwischen Helix F (72-79) und Kerndomäne im reduzierten Zustand vergrößert.

In Abbildung 49 sind die Strukturbündel der beiden Redoxzustände abgebildet. Durch die verstärkten paramagnetischen Eigenschaften ergeben sich für den reduzierten Zustand Bereiche höherer Dispersion.

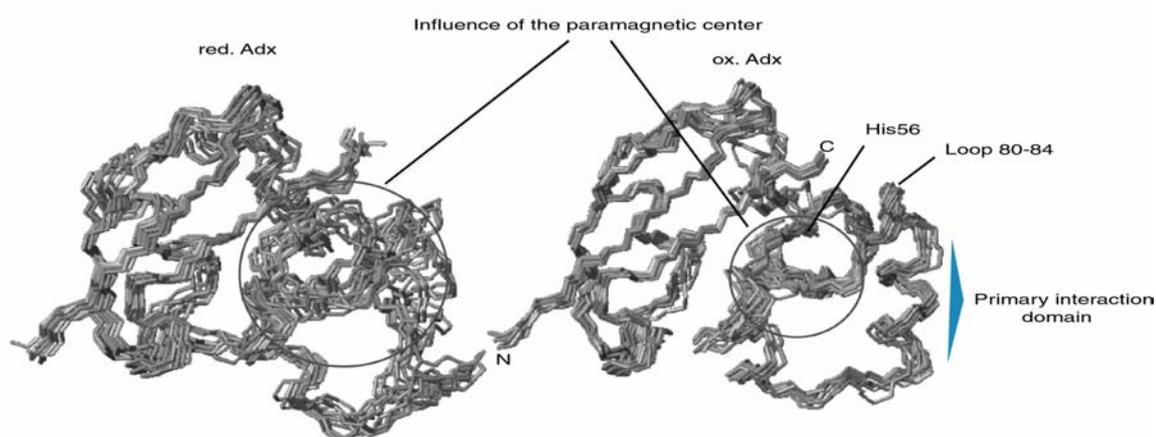


Abb.49: Die 10 energetisch günstigsten Strukturen des reduzierten (links) und oxidierten (rechts) Zustands des Adrenodoxins. Die Struktur des reduzierten Zustands ist aufgrund des wesentlich ausgeprägteren Paramagnetismus schlechter definiert. His 56, der Loop 80-84 und die „primary interaction domain“ sind essentiell für die Wechselwirkung mit den Redoxpartnern.

Vergleicht man die energetisch günstigste Lösungsstruktur des reduzierten Zustands mit der X-Ray-Struktur des oxidierten Zustands, sind vor allem größere Veränderungen im Bereich der Wechselwirkungsdomäne, des Loops 80-86 und im Bereich des C-Terminus feststellbar (Abb.50). In Tab 6 sind einzelne Bereiche der Lösungsstruktur des oxidierten Zustands mit denen der X-Ray Struktur bzw. mit denen der Lösungsstruktur des reduzierten Zustands verglichen. Die beiden Zustände des Adrenodoxins unterscheiden sich vorwiegend im Bereich der Wechselwirkungsdomäne. So beträgt der RMSD für die Aminosäurereste 68-85 3,07. Einerseits trägt der erhebliche Unterschied der paramagnetischen Eigenschaften zu diesem Ergebnis bei, andererseits sind konformationelle Unterschiede für den hohen RMSD-Wert verantwortlich.

Residues	RMSD NMR(ox)/X-ray(ox)	RMSD NMR (ox/red)
6-40; 57-76; 79-89; 96-108	1,23	2,21
6-25	0,61	0,79
6-40	1,05	1,56
68-76; 79-85	1,23	3,07
85-89; 95-108	0,83	1,51

Tab.6: Spalte 1 : Vergleich der NMR und der X-ray Strukturen. Spalte 2: Die größten Veränderungen zwischen oxidierten und reduzierten Zustands sind im Bereich der Wechselwirkungsdomäne (68-76, 79-85) zu finden.

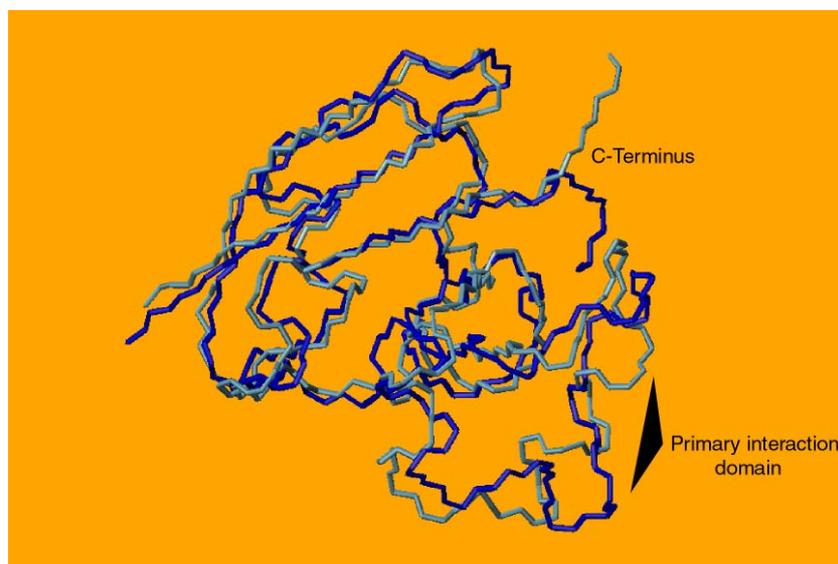


Abb.50: Vergleich der energetisch günstigsten Struktur des oxidierten und reduzierten Zustands. Auffällig sind die großen Veränderungen im Bereich des C-Terminus, im Bereich des Loops 80-86 sowie im Bereich der Wechselwirkungsdomäne (primary interaction domain).

### 3.1.6. Elektronentransportmechanismus

Die aus NMR Daten erhaltenen Ergebnisse zeigen konformationelle Änderungen zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand des Adx auf. Regionen, die nur teilweise oder gar nicht zugeordnet werden konnten, werden beim Vergleich der beiden Zustände nicht berücksichtigt. Größere Veränderungen im Bereich der Wechselwirkungsdomäne könnten einerseits durch die fehlende Zuordnung oder andererseits durch konformationelle Änderungen hervorgerufen werden. Resonanzen der Reste Met77 und Lys78 konnten im reduzierten Zustand nicht zugeordnet werden. Möglicherweise verringert sich nach Reduktion des Adx die Distanz zwischen Met77 und Lys78 und dem [2Fe-2S]-Cluster, was zur drastischen Verkürzung der Relaxationszeiten führen würde. Genauere Hinweise auf konformationelle Änderungen im Bereich der Wechselwirkungsdomäne konnten bei der Analyse der NOE-Konnektivitäten der Aminosäurereste Asp76 und Asp79 gefunden werden. Die Resonanzen der H<sup>β</sup>-Protonen von Asp76 sind im oxidierten Zustand aufgespalten und ergeben ein Duplett, während im reduzierten Zustand ein Singulett mit doppelter Intensität erhalten wird. Verschobene und zusätzlich gefundene Crosspeaks deuten auf Änderungen der chemischen Umgebung von Asp79 hin. Neben diesen markanten Veränderungen sind vor allem strukturelle Änderungen im Bereich des C-Terminus und des Loops 80-86 festzustellen.

Der C-Terminus spielt bei der Dimerbildung des Adx eine wichtige Rolle. Die Reste Asp109 sowie Val111 bilden intermolekulare Wasserstoffbrücken zu Arg106 bzw. Asp86 des zweiten Adx aus. Neben C-terminalen Resten ist der Loop 80-86 mit dem Aminosäurerest Asp 86 an der Dimerbildung beteiligt.

Wie aus der Literatur hervorgeht ist der C-Terminus essentiell für die Komplexbildung zwischen Adrenodoxin und dem Cytochrom P450 [Uhlmann et al. 1994, Schiffler et al. 2001]. Sollte das Dimer an das Cyt P450 binden, käme es aufgrund des nicht frei zugänglichen C-Terminus zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Komplexbildung. Die konformationellen Änderungen im C-terminalen Bereich sollten deswegen zu einer redoxbedingten Auflösung des Dimers führen.

Die Reduktion des Adrenodoxins führt primär zu einem Bruch der Wasserstoffbrücke zwischen His56 und Tyr82 [Miura et al. 1991]. Der Loop 80-86 ändert daraufhin seine Position. Durch starke hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Loop 80-86 und dem C-Terminus werden die Positionsänderungen des Loops an den C-Terminus weitergegeben und

führen somit zum Bruch der intermolekularen Wasserstoffbrücken zwischen den Adx-Monomeren und letztendlich zur Auflösung des Dimers.

Aus Abbildung 52 wird deutlich, dass sich der C-Terminus bei Reduktion von der Oberfläche des zweiten Adx-Moleküls entfernt (oben Adx(ox)-Adx(ox), unten Adx(ox)-Adx(red)), was ein klares Indiz für die Auflösung des Dimers ist.

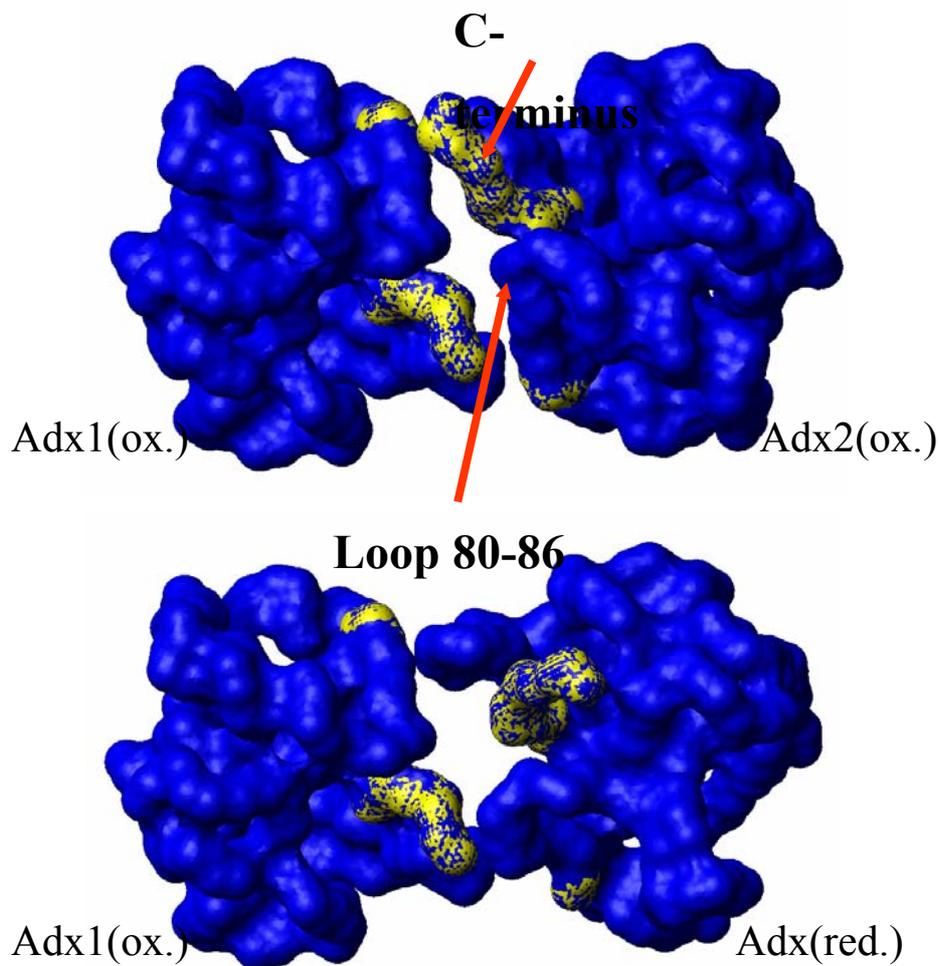


Abb.52: Adx(ox)-Dimer (oben). Der reduzierte Zustand des Adx (Adx(red)) wurde über eines der beiden oxidierten Zustände des Adx (Adx2(ox)) gelegt. Adx2(ox) wurde anschließend ausgeblendet. Gelblich unterlegt ist der C-Terminus und der Aminosäurerest Asp86, der im oxidierten Zustand in eine Wasserstoffbrückenbindung zu Arg106 des zweiten Adx Moleküls involviert ist.

Aus diesen Ergebnissen kann ein neuer Elektronentransportmechanismus postuliert werden der in Abbildung 53 schematisch dargestellt ist [Beilke et al. 2002]:

NADPH bindet an die Adrenodoxin-Reduktase und überträgt unter Bildung von  $\text{NADP}^+$  und  $\text{FADH}(-)$  zwei Elektronen. Das Andocken des NADPH führt zu Positionsänderungen von Tyr331 und Arg124 [Ziegler et al. 2000] der Reduktase, wodurch die Komplexbildung zwischen Adx-Dimer und Reduktase ermöglicht wird.  $\text{FADH}(-)$  überträgt, wie von Müller

und Mitarbeitern beschrieben [Müller et al. 2001], ein Elektron auf das gebundene Adx (Abstand FAD-[2Fe-2S]-Cluster 10,2 Angström). Das Elektron wird im folgenden Schritt zum zweiten Adx übertragen (Fe<sup>2+</sup>-Cys55S $\gamma$ -Cys55N-His56C $\alpha$ -His56N $\delta$ 1-Gly83O $\gggg$ Asp109C $\gamma$ -Asp109N-Pro108C $\beta$ -His56O-Cys55C-Cys55S $\gamma$ -S2-Fe1) [Pikuleva et al. 2000].

Konformationelle Änderungen im Dimerkontaktbereich führen zur Auflösung des Adx-Dimers. FADH\* überträgt das zweite Elektron auf das noch immer an die Reduktase gebundene Adx. Die Auflösung des AdR-Adx Komplexes könnte durch konformationelle Änderungen der Wechselwirkungsdomäne des Adx begünstigt werden. Im folgenden Schritt werden die reduzierten Adx-Moleküle durch das CytP450-System oxidiert und können weitere Elektronentransportzyklen durchlaufen.

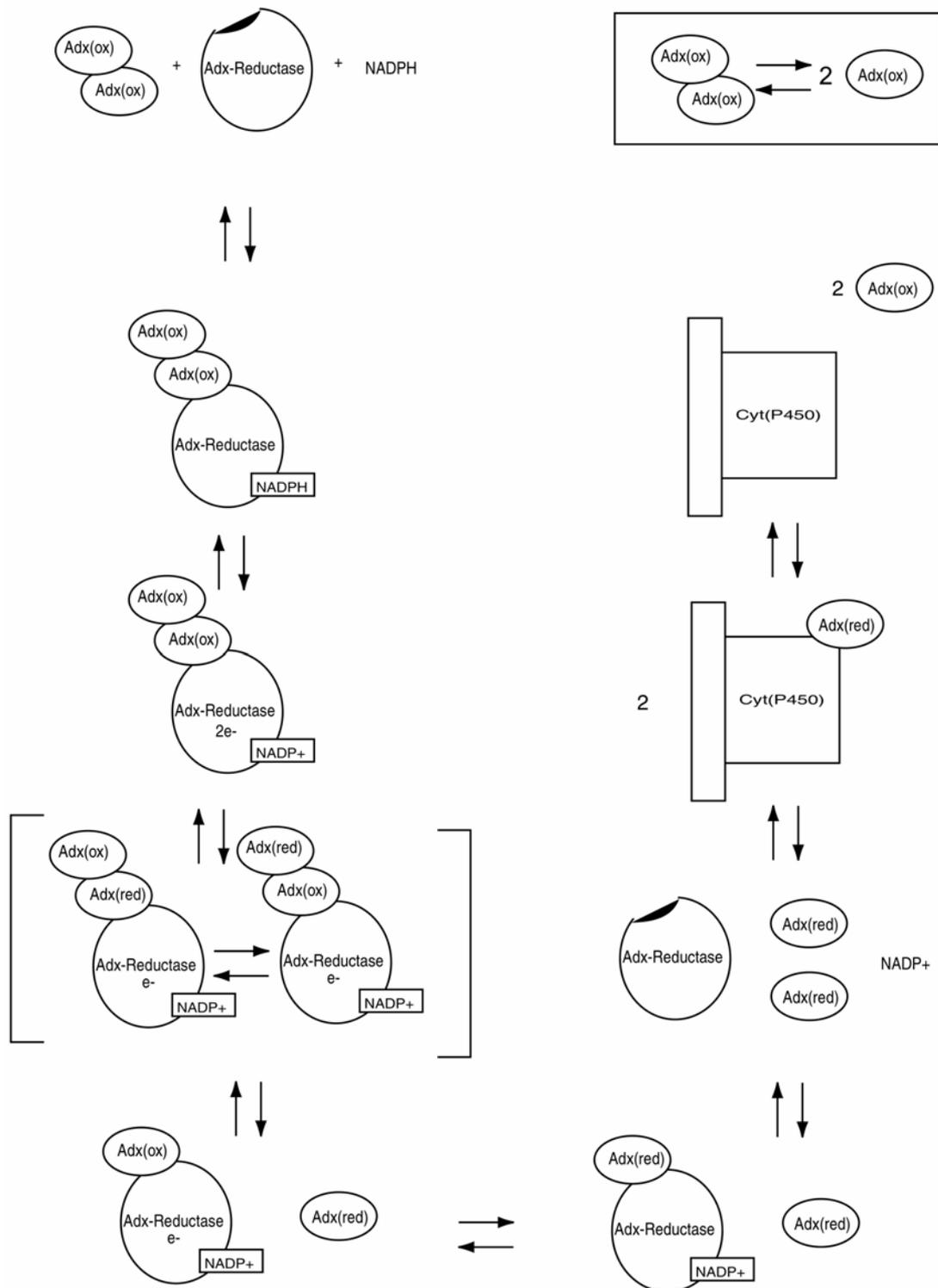


Abb.53: Möglicher Elektronentransportmechanismus: Das Adx(ox) Dimer bindet an die Reduktase. Ein Elektron wird auf das an die Reduktase gebundene Adx übertragen. Der intermolekulare Elektronentransfer zum ungebundenen Adx und dessen Reduktion führt aufgrund von konformationellen Änderungen zur Auflösung des Adx Dimers. Das zweite Elektron wird von der Reduktase auf das noch immer an die Reduktase gebundene Adx übertragen. Die Reduktion des Adx könnte aufgrund von konformationellen Änderungen im Bereich der Wechselwirkungsdomäne zur Auflösung des AdR-Adx Komplexes führen.

Ist der postulierte Mechanismus unter physiologischen Gesichtspunkten sinnvoll? Warum dimerisieren Adx Moleküle in der Natur?

Da es sich beim mitochondrialen Steroid-Hydroxylase-System um ein 2-Elektronen-Transportsystem handelt, Adrenodoxin aber einen Ein-Elektron-Transporter darstellt, erscheint es als sinnvoll Dimere zu verwenden. Die darauffolgende redoxbedingte Auflösung des Dimers führt zur Steigerung der Effektivität des Elektronentransfers.

Das Gleichgewicht zwischen Adx(ox)-Dimer und Monomer spielt sehr wahrscheinlich ebenfalls eine wichtige Rolle. Erstaunlicherweise bilden sich im niederen mikromolaren Bereich vorwiegend Dimere aus, während sich bei Erhöhung der Konzentration das Gleichgewicht auf Seiten der Monomere verschiebt [Pikuleva et al. 2000]. Dieser Befund wurde durch „Light-Scattering“ – Experimente nachgewiesen und wird auf repulsive Kräfte zurückgeführt, die zu dominieren beginnen, wenn die Konzentration des Adrenodoxins ansteigt (Adx enthält 28 saure Reste, die an der Oberfläche des Proteins lokalisiert sind).

Bei Konzentrationen von 2mM, die bei NMR-Experimenten Verwendung finden, sollte das Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer weit auf Seiten des Monomers liegen. Bei den vorliegenden NMR-Spektren sind, wie zu erwarten, keine Anzeichen für ein Dimer-Monomer Gemisch erkennbar, was die Ergebnisse der Gruppe von Pikuleva et al. bestätigt.

Unter physiologischem Gesichtspunkt kann dieser Sachverhalt damit erklärt werden, dass im Falle hoher Adx(ox) Konzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit über das Überangebot an Edukten vorgegeben wird. Hierbei kommen vorwiegend Adx-Monomere zum Einsatz. Nimmt die Konzentration des Adx(ox) jedoch ab, werden Adx-Dimere als Elektronentransporter benutzt, um die Elektronenübertragungsgeschwindigkeit konstant zu halten.

### **Cross-Linking Experimente**

Unter Verwendung von Cross-linking Experimenten konnte erstens die Dimerbildung bestätigt, zweitens die Auflösung des Dimers bei Reduktion nachgewiesen und drittens die Rolle des C-Terminus bei der Dimerbildung unter Beweis gestellt werden (Abb.54). Das Adx(ox/wt) bildet, wie in Abb.54 deutlich zu sehen, Dimere aus (Lane2 Abb.54), während der reduzierte Zustand unter gleichen Bedingungen keine Dimerbildung zeigt (Lane3). Die C-terminal verkürzte, voll funktionsfähige Mutante(3-108) des bAdx hat im oxidierten Zustand (Lane6) eine wesentlich geringere Tendenz Dimere auszubilden. Aus diesen Daten wird klar ersichtlich, dass die Dimerbildung vor allem auf intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den beiden C-Termini beruht. Konformationsänderungen im C-terminalen Bereich führen nach Reduktion zur Auflösung des Dimers.

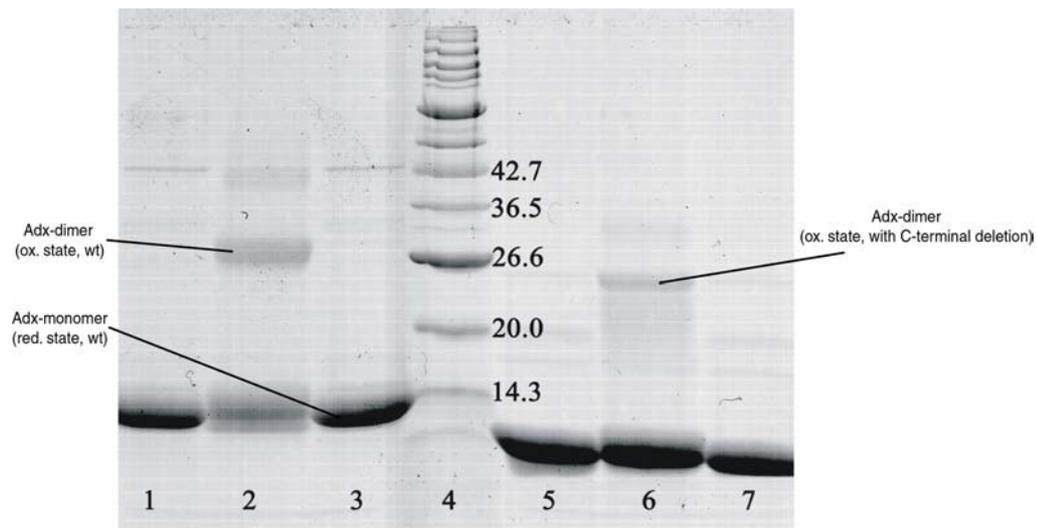


Abb.54: Cross-Linking Experimente mit reduzierten und oxidierten Adx.. Lane 1: wt Adx; Lane 2: cross-linked Adx(wt, oxidiert); Lane 3: cross-linked Adx(wt, reduziert); Lane 4: Standard; Lane 5: C-Terminal verkürzte Mutante des Adx(3-108); Lane 6: Cross-linked Adx(3-108, oxidiert); Lane 7: cross-linked Adx(3-108, reduziert).

Eine Voraussetzung für den vorgeschlagenen Mechanismus ist eine 1:2-Komplexbildung zwischen der Reduktase und dem Adx-Dimer. Um zu zeigen, dass ein 1:2-Komplex gebildet werden kann, wurde die Röntgenstruktur [Pikuleva et al. 2000] des Adx-Dimers (Adx1-Adx2) der Röntgenstruktur des Reduktase-Adx-Komplexes (AdR-Adx1) [Müller et al. 2001] überlagert.

Das Ergebnis gibt die Struktur des Reduktase-Adx-Dimer-Komplexes wieder und ist in Abb.55 dargestellt. Hier ist deutlich zu erkennen, dass der Abstand des ungebundenen Adx zur Reduktase groß genug ist, um Wechselwirkungen auszuschließen zu können. Die Bestimmung der Röntgenstruktur des AdR-Adx Komplexes wurde bei hohen Proteinkonzentrationen entsprechend den Kristallisationsbedingungen durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnte keine 1:2-Komplexbildung beobachtet werden. Das Gleichgewicht zwischen Adx-Monomer und Adx-Dimer liegt bei entsprechend hohen Konzentrationen weit auf Seiten des Monomers.

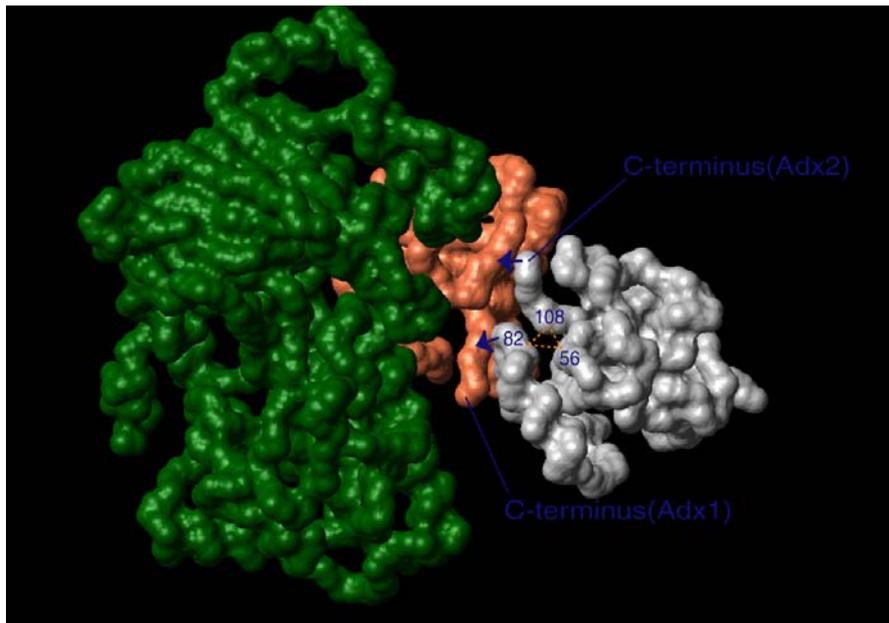


Abb.55: Komplex zwischen AdR und Adx-Dimer. Um zu zeigen, dass die Bildung eines 2:1-Komplexes zwischen AdR und Adx-Dimer möglich ist, wurde die Kristallstruktur des Adx-Dimers [Pikuleva et al. 2000] über die Kristallstruktur des AdR-Adx-Komplexes [Müller et al. 2001] gelegt. Dabei wurden die Koordinaten eines Adx Moleküls des Dimers genau an die Koordinaten des Adrenodoxins, das an die Reduktase gebunden ist, angepasst. Aufgrund des großen Abstands zwischen AdR und dem ungebundenen Adx ist die Bildung eines 2:1 Komplexes möglich.

Der postulierte Mechanismus sei an dieser Stelle nochmals in vereinfachter Form dargestellt (Abb. 56):

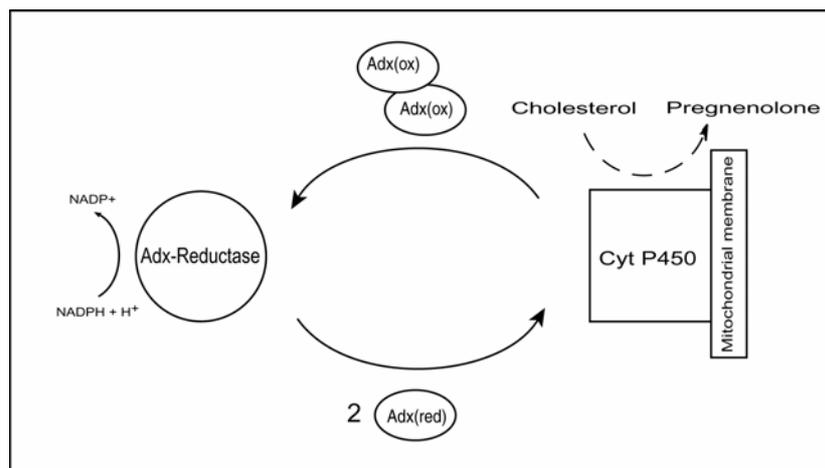


Abb.56: Postulierter Elektronentransportmechanismus: Adx(ox)-Dimere werden durch die Reduktase reduziert. Durch redoxbedingte Veränderungen, vorwiegend im C-Terminalen Bereich des Adx, kommt es zur Auflösung des Dimers. Die reduzierten Adx-Moleküle werden durch das Cyt P450 System wieder oxidiert und können weitere Elektronentransportzyklen durchlaufen.

In den Mitochondrien ist das Konzentrationsverhältnis AdR:Adx:CytP450 = 1:(8-10):(8-10) [Hanogoklu 1996]. Aufgrund dessen sollte die Reduktion des Adx den limitierenden Schritt bei der Steroidhydroxylierung darstellen. Im Falle zu niedriger Adx(ox) Konzentrationen kann das System auf Adx(ox) Dimere zurückgreifen und somit den Pool an reduziertem Adx konstant halten. Obwohl die Konzentration des Cyt P450 um das 8-10-fache höher als die der Reduktase liegt, konnten Hanogoklu und Mitarbeiter nachweisen, dass die Cyt P450 Aktivität genau mit dem „Steady State Level“ der Reduktion des Adx korreliert [Hanogoklu et al. 1980]. Bei optimaler Cyt P450-Aktivität stellte die Reduktion des Adx nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Die Reduktion verlief im Vergleich zur Oxidation sogar mehr als doppelt so schnell. Zum einen geht man davon aus, dass oxidiertes Adx das Cyt P450 kompetitiv inhibiert, zum anderen können die aus dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Interpretation dieses Sachverhalts herangezogen werden. Der Konzentrationsunterschied wird demnach durch Adx(ox)-Dimere teilweise ausgeglichen. Hanogoklu und Mitarbeiter konnten des weiteren zeigen, dass in vitro ein Konzentrationsverhältnis zwischen AdR und Cyt P450 von 1:2 optimale Hydroxylierungsraten liefert [Hanogoklu 1996]. Diese überraschenden Ergebnisse konnten zum damaligen Zeitpunkt nicht erklärt werden. Nach den Dissoziationskonstanten der vorliegenden Komplexe ( $K_d$ : AdR-Adx(red)-Komplex/substratfreier CytP450-Adx(ox)-Komplex: beide  $\sim 500\text{nM}$ ; AdR-Adx(ox)-Komplex/ substratgebundener CytP450-Adx(red)-Komplex: beide  $\sim 20\text{nM}$ ) sollte man für einen optimalen Reaktionsablauf ein Verhältnis von AdR zu CytP450 von 1:1 erwarten. Tatsächlich liefert ein Verhältnis von AdR zu CytP450 von 1:2 bessere Ergebnisse, was durch die redoxbedingte Auflösung des Adx(ox) Dimers erklärt werden kann. Das Dimer bindet an die Reduktase wird dort reduziert und löst sich aufgrund von konformationellen Änderungen auf. Zwei reduzierte Adrenodoxin-Moleküle werden im folgenden Schritt von zwei CytP450 Systemen oxidiert.

Die Elektronentransportmechanismen:

1:1:1-Komplex:

Ein ternärer Komplex zwischen AdR, Adx und CytP450 konnte von Kimura et al. [Kimura et al 1970] sowie Akhrem et al. [Akhrem et al. 1988] nachgewiesen werden. Von Kimura et al. wurden starke unspezifische Cross-Linker verwendet, um den ternären Komplex nachweisen zu können. Vickery und Mitarbeiter [Vickery 1996] konnten durch zielgerichtete Mutagenese zeigen, dass die Wechselwirkungsdomänen des Adx zu seinen Redoxpartnern teilweise identisch sind. So ist Asp76 und Asp79 an der Komplexbildung zwischen AdR und Adx als auch an der Komplexbildung zwischen Cyt P450 und Adx beteiligt. Diese experimentell erhaltenen Daten schließen die Bildung eines 1:1:1-Komplexes aus.

1:2:1-Komplex:

Hara und Mitarbeiter postulierten die Bildung eines 1:2:1 Komplexes, wobei ein AdR-Adx Komplex die Elektronen auf den CytP450-Adx Komplex überträgt [Hara et al. 1994]. Aufgrund des von Pikuleva und Mitarbeitern [Pikuleva et al. 2000] entdeckten Adx-Dimers sollte zudem die Bildung ternärer AdR-Adx-Adx- oder CytP450-Adx-Adx Komplexe möglich sein. So könnte unter Bildung eines quaternären Komplexes der AdR-Adx-Adx Komplex die für die Hydroxylierungsreaktion benötigten Elektronen direkt auf das Cyt P450 übertragen. Die Dissoziationskonstante des AdR-Adx(ox) Komplexes liegt bei ~20 nM, die des AdR-Adx(red) Komplexes aber bei ~500nM. Dieser große Unterschied sollte zu einer Auflösung des Komplexes zwischen AdR und Adx(red) führen. Somit sind AdR-Adx- sowie AdR-Adx-Adx-Komplexe, die Elektronen auf das CytP450 übertragen, schwer vorstellbar.

Shuttle-Mechanismus:

Das Grundprinzip des von Lambeth et al. [Lambeth et al. 1981] vorgeschlagenen Shuttle-Mechanismus kann durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. Unter *in vivo* Bedingungen (Konzentration des Adx: 1-120  $\mu$ M) muß aber berücksichtigt werden, dass vorwiegend Adx(ox) Dimere vorliegen. Redoxbedingte konformationelle Änderungen im C-terminalen Bereich des Adx führen zur Auflösung der Dimere.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten einige bislang unverstandene Sachverhalte erklärt werden. Die redoxbedingte Auflösung eines Dimers ist in der Biochemie

einzigartig und kann zum Verständnis molekularer Wechselwirkungen beitragen. Für die gesamte Gruppe der vertebraten Ferredoxine sind ähnliche Ergebnisse zu erwarten. Markley und Mitarbeiter konnten bereits C-terminale Änderungen am humanen Ferredoxin feststellen [Xia et al. 1998]. Weitere Untersuchungen werden in Zukunft nötig sein um hierüber Aufschluß zu geben.

Die streng kontrollierte Steroidbiosynthese wird durch den Einsatz von Adx Dimeren beschleunigt und durch die redoxbedingte Auflösung der Dimere optimiert.

## 3.2. Ferredoxin NADP<sup>+</sup> Reduktase

Die Größe der FNR bedingt eine hohe Rotationskorrelationszeit, die bei NMR Messungen zur Verkürzung der Relaxationszeiten führt. Kurze Relaxationszeiten führen zu Linienverbreiterung sowie zur Abnahme der Signalintensitäten und der spektralen Auflösung. Die Anreicherung mit den stabilen Isotopen <sup>15</sup>N und <sup>13</sup>C ermöglicht die Aufnahme von Tripleresonanzexperimenten, die zur Verbesserung der spektralen Auflösung führen. Bei Proteinen, die ein MG von 25 kDa überschreiten, ist es zudem erforderlich die stabilen Protonen durch Deuterium zu ersetzen. Dadurch können die Relaxationszeiten der Heterokerne verlängert werden. Um eine Anreicherung mit den stabilen Isotopen <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N und <sup>2</sup>H zu ermöglichen müssen optimale Expressions- und Aufreinigungsbedingungen gefunden werden.

### 3.2.1. Optimierung der Expression unter Verwendung von pET-Expressionsvektoren

Das uns zur Verfügung gestellte Expressionssystem pTRC99aFNR führte zu unbefriedigenden Proteinausbeuten (ca. 7 mg aus 1l LB Medium). 10 Liter M9 Medium wären notwendig um eine <sup>15</sup>N-NMR Probe einer Konzentration von 1 mM zu präparieren. Unter optimalen Voraussetzungen würde eine triplemarkierte NMR Probe unter Verwendung dieses Systems Materialkosten von ca. 50 000 DM verursachen. Aufgrund der Vielzahl der erforderlichen NMR-Experimente sind zudem mehrere Proben erforderlich. Deshalb kam dieses Expressionssystem nicht in Betracht.

Die Expression der FNR wurde unter Verwendung verschiedener Expressionsvektoren getestet. Die pET-Systeme mit T7 RNA-Polymerase Aktivität sollten dabei höhere Ausbeuten liefern als die Systeme mit *E.coli* RNA-Polymerase Aktivität, die unter der Kontrolle *E.coli* eigener Promotoren wie dem *trc*- und dem *lac*-Promotor stehen. Unter Verwendung der pET Systeme (pET22b, pET24d (Abb.57), pET32a) konnten nur befriedigende Ausbeuten an löslichem Protein erzielt werden. Grund hierfür ist der hohe Anteil an unlöslichen Proteinaggregaten („inclusion bodies“), die bei unkorrekter Faltung entstehen. Aufreinigung der „inclusion bodies“ unter denaturierenden Bedingungen und anschließender Renaturierung unter Zusatz von Riboflavin führte zu keiner Verbesserung der Proteinausbeute. Unter diesen Bedingungen ist eine optimale, fast verlustfreie Aufreinigung des Proteins die Voraussetzung für eine möglichst kostengünstige Proteinpräparation.

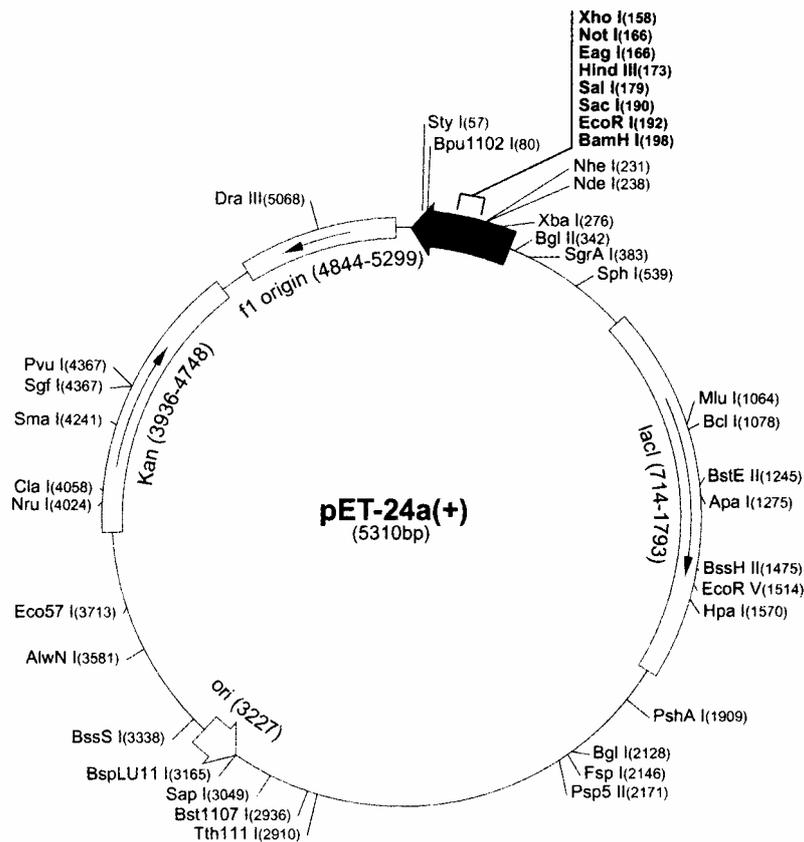


Abb57: Plasmidkarte des pET24d-Systems

### 3.2.2. Aufreinigung der über pET-Expressionssysteme erhaltenen FNR

Als erster Schritt der Aufreinigung der FNR (erhalten mit pET24dFNR in BL21(DE3)) wurde das Protein über eine HiTrapQ gereinigt (Abb.58). Eine SDS-Gelanalyse hat gezeigt, dass noch eine große Anzahl an Fremdproteinen in den FNR enthaltenden Fraktionen vorlag. Um diese zu entfernen wurde ein Gelfiltrationslauf mit Superdex 75 durchgeführt (Abb.59). Wie aus dem Diagramm zu entnehmen ist eluiert die Probe in zwei Hauptpeaks, von denen die Fraktionen des zweiten Peaks Aktivität zeigten. Die Elutionszeit des zweiten Peaks deutet aber auf ein wesentlich höheres Molekulargewicht als 36 kDa hin; möglicherweise liegt die FNR teilweise als Dimer vor. Die Ausbeute an FNR lag nach der Gelfiltration bei 64%.

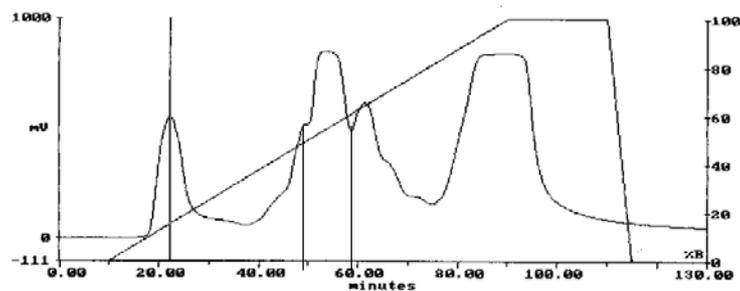


Abb.58: Anionenaustausch-Chromatographie von FNR an HiTrapQ.

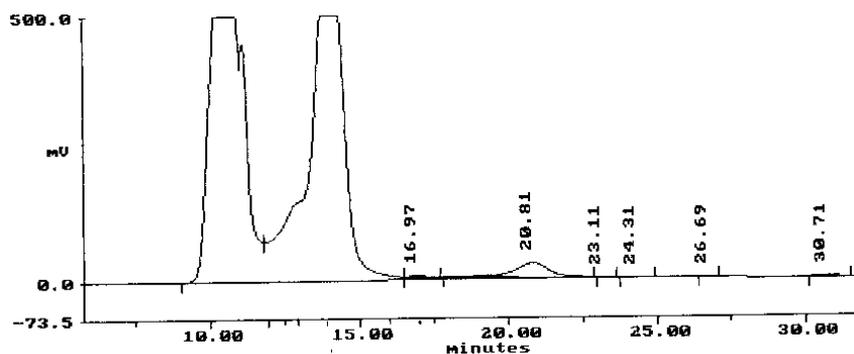


Abb.59: Gelfiltrationslauf: Fraktionen des zweiten Peaks zeigen Aktivität. Das zugehörige Molekulargewicht dieser Proben ist aber deutlich grösser als 36kDa, was auf eine partielle Dimerbildung hindeutet.

Die von Medina et al. vorgeschlagene Aufreinigungsstrategie [Medina et al. 1999] über eine Affinitätschromatographie an Bluesepharose (Abb.60) führte zu erheblichen Verlusten an FNR. ApoFNR, das kein FAD gebunden hat, wird hier möglicherweise vom FNR getrennt. Nach den zwei Aufreinigungsschritten Ionenaustauschchromatographie an HiTrapQ und Affinitätschromatographie an Bluesepharose lag die Ausbeute an aktivem Protein nur noch bei 30%, was aufgrund der geringen Expressionsrate der pET-Systeme zu einer zu geringen Gesamtproteinausbeuten führte.

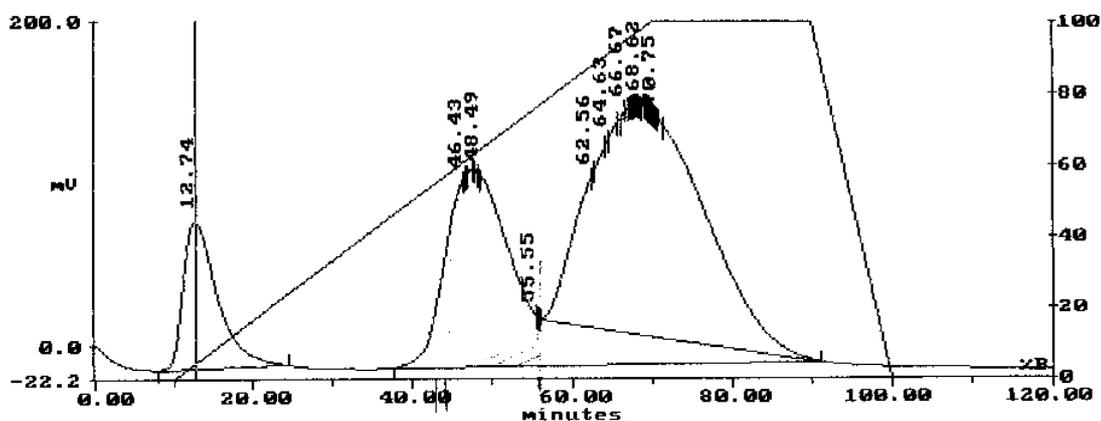


Abb.60: Elutionsprofil des Bluesepharoselaufs: Die FNR wird bei einer Laufzeit von 45-51 min eluiert.

### 3.2.3. Expression unter Riboflavinzusatz

Unter der Annahme, dass eine zu geringe Konzentration des Cofaktors FAD bei der Expression zu den hohen Anteilen an „inclusion bodies“ führt, wurde die Expression unter Zusatz verschiedener Riboflavinkonzentrationen (20 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l) durchgeführt. Die Expressionsanalyse auf einem SDS-Gel zeigt in allen Ansätzen das Auftreten einer Doppelbande (Laufunterschied ~1000 Da). Die drei Proben wurden über die HiTrapQ Säule

aufgereinigt und auf ihre Aktivität getestet. Danach liegt die Gesamtaktivität der Probe mit 20 mg Riboflavinzusatz bei 269 U, bei derjenigen mit 50 mg Riboflavinzusatz bei 258 U und bei einem Riboflavinzusatz von 100 mg Riboflavin bei 341 U. Ohne den Zusatz von Riboflavin wurde aus einem Liter TB-Medium Protein der Gesamtaktivität von 284 U erhalten. Die Verwendung von 100 mg Riboflavin scheint die Ausbeute an aktiven Protein leicht zu verbessern (Abb.61). Der Effekt ist allerdings minimal und führt nur zu geringfügigen Steigerungen der Proteinmenge (von ca. 24 mg auf 29 mg pro Liter TB-Medium). In Anbetracht der Tatsache, dass die Expression in M9-Medium wesentlich geringere Expressionsraten liefert, müssen andere Wege in Betracht gezogen werden um die Gesamtproteinmenge zu steigern.

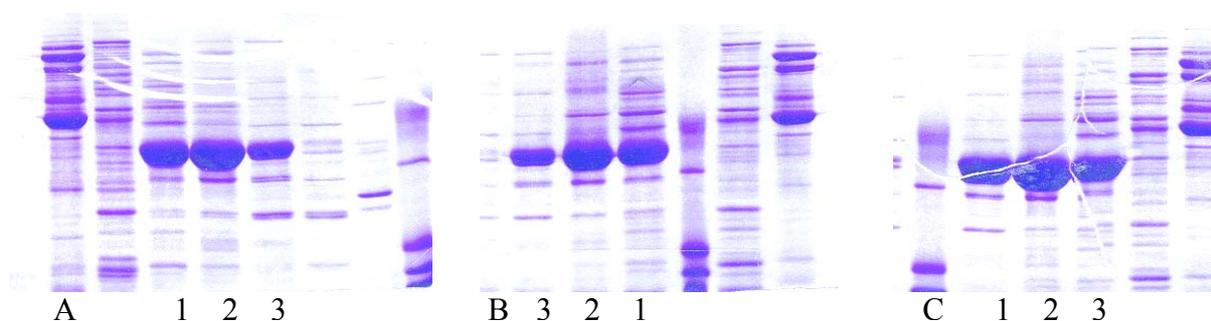


Abb.61: Einfluß der dem M9-Medium zugesetzten Riboflavinmenge auf die Proteinausbeute. A: 20mg Riboflavinzusatz (1, 2, 3 verschiedene Auftragskonzentrationen); B: 50mg Riboflavin; C: 100mg Riboflavin.

### 3.2.4. Das pET29HisFNR Expressionssystem

Zur Verbesserung der Aufreinigung wurde das Wt-FNR in das pET29HisUG3 umklontiert. Mit einem His-Taq versehene Proteine können über Metallchelataffinitätschromatographie an Ni-NTA aufgereinigt werden. Das Insert wurde über Restriktionsverdau mit *NcoI* und *HindIII* aus pET24dFNR geschnitten. Durch Ligation des mit *NcoI* und *HindIII* behandelten Vektors pET29HisUG3 mit dem ebenso behandelten Insert wurde das Plasmid pET29HisFNR erhalten (Abb.62). Zur Analyse der Plasmid DNA wurde ein REV mit *NcoI/HindIII*, *NdeI/HindIII* und Eco130I (StyI) durchgeführt (Abb.63/64). Wie man aus dem Agarosegel entnehmen kann, enthalten alle Minipräps das Insert.

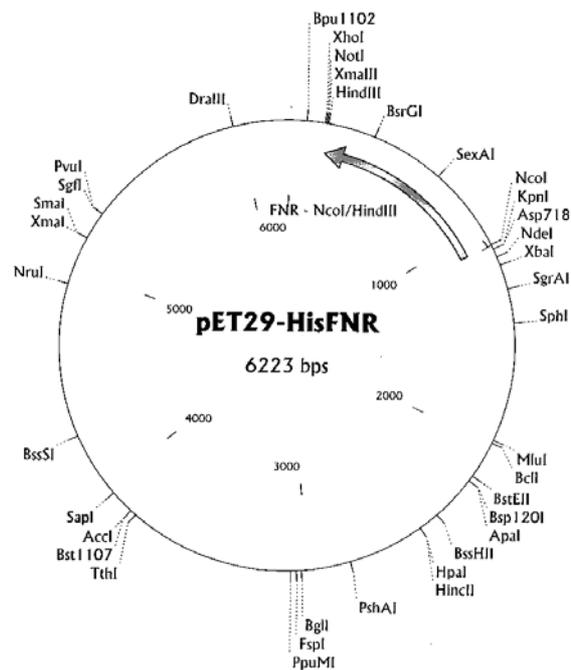
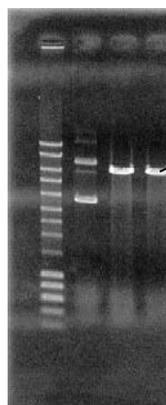
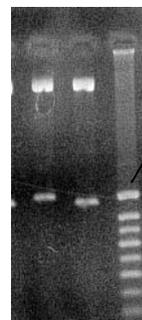


Abb.62: Plasmidkarte des pET29-HisFNR Systems



~6200 bp

Abb.63: REV des pET29HisFNR.  
Lane1: Marker; Lane 2: Plasmid ungeschnitten; Lane 2,3: mit HindIII geschnittenen Plasmid



~1000 bp

Abb.64: REV des pET29HisFNR.  
Lane1:Plasmid NdeI/HindIII geschnitten; Lane 2: NcoI/HindIII geschnitten; Lane 3: Marker

Die Klone III3, III4, IV4 und IV5 wurden für die Expression in BL21(DE3) ausgewählt um die Expressionseffizienz zu testen. Der Klon III4 erreichte dabei die höchste Aktivität und wurde aufgrund dessen weiterverwendet und durchsequenziert. Trotz der positiven Sequenzierung gestaltete sich die Aufreinigung über die Ni-NTA schwierig. Das Bindungsverhalten variiert zu stark, um eine homogene Aufreinigung zu ermöglichen. Diese Tatsache deutet auf eine N-terminale Verkürzung der FNR hin (His-Taq ist N-terminal eingefügt). Bei optimalem Bindungsverhalten erhält man nach drei Aufreinigungsschritten 10 mg sauberes aktives Protein aus 1 Liter M9-Medium. Die erhaltene Proteinausbeute wäre ausreichend um NMR Proben herzustellen. Die hohe Inhomogenität bei der Aufreinigung bedingt aber ein zu hohes Risiko.

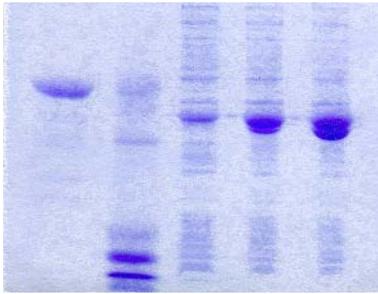


Abb.65: SDS-Gelelektrophorese zur Analyse der Homogenität des gereinigten Proteins. Doppelbänder tritt vorwiegend bei Proben auf, die einer längeren Expressionszeit ausgesetzt sind. Beispielsweise nach Wachstum in M9 Medium.

Durch Veränderung der Expressionsbedingungen konnte nur eine geringfügige Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins erzielt werden. Deswegen wurden andere Expressionssysteme getestet.

Expressions- system	Zellen	Ausbeute LP(1 Liter)	Ausbeute M0(1 Liter)
pET22bFNR	DH5 $\alpha$	14mg	3mg
pET24dFNR	DH5 $\alpha$	16mg	4mg
pET32aFNR	DH5 $\alpha$	-	4mg
pTRC99aFNR	DH5 $\alpha$	7mg	2mg
pET29HisFNR	BL21(DE3)	20mg	10mg

Tab.7: Test verschiedener Expressionssysteme mit T7 RNA-Polymerase Aktivität.

### 3.2.5. Das pKKHC- und pQE30-Expressionssystem

Der hohe Anteil an „inclusion bodies“ kann verschiedene Ursachen haben [Rudolph et al. 1996, Hannig et al.1998], ist aber im Falle der FNR höchstwahrscheinlich auf die Expression großer Proteinmengen innerhalb zu kurzer Zeit zurückzuführen. Unter Verwendung von bakteriellen Expressionssystemen, wie dem pKKHC- bzw. dem pQE30 System, sollten die geänderten Expressionsbedingungen zu höheren Ausbeuten an nativem Protein führen. Das pKKHC-System enthält den *trp-lac*-Hybridpromotor  $P_{trc}$  [DeBoer et al. 1983], dessen Aktivität infolge der Hybridisierung der  $-35$ -Region des *trp*-Promotors mit der Pribnow-Box des *lac* UV5-Promotors im Vergleich zur Aktivität des *lac* UV5-Promotors um bis zu eine Größenordnung erhöht ist. Der pQE30 Vektor (Abb.66) enthält ein Promotor-Operator-Element, das aus einem Phagen-T5-Promotor (wird durch die *E.coli* eigene RNA-Polymerase erkannt) und zwei *lac* Operator-Sequenzen besteht, die die Bindung des *lac*-Repressors

verstärken. Die ausgewählten Vektoren führen aufgrund der 5-fach niedrigen Aktivität der E.coli RNA-Polymerase im Vergleich zur T7-RNA-Polymerase zu einer verlangsamten Proteinexpression.

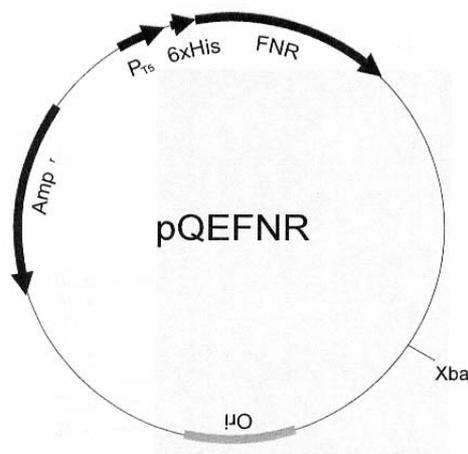


Abb.66: Plasmidkarte des pQEFNR Vektors

Durch Insertion einer Oligohistidindomäne in den Vektor pKKD sollte eine Möglichkeit geschaffen werden, die FNR mittels Affinitätschromatographie zu reinigen. Für die Einführung der Oligohistidindomäne in den Vektor pKKD wurden zunächst die beiden Oligodesoxyribonukleotide Prm 48 und Prm 49 hybridisiert und der Vektor pKKD durch Restriktionverdau mit *NcoI* linearisiert. Durch die Hybridisierung entsteht ein DNA-Fragment, dessen 5'- und 3'-Enden zu den von *NcoI* erzeugten Enden kompatibel ist, so dass das DNA-Fragment anschließend in den Vektor pKKD ligiert werden konnte, wobei das Plasmid pKKHisND erhalten wurde.

Die Expression der rekombinanten FNR mit pKKFNR lieferte befriedigende Ergebnisse. So konnte aus 1 Liter LB-Medium 55 mg FNR gewonnen werden. Aufgrund der hohen Verluste bei der Aufreinigung über Affinitätschromatographie mit Blueseparose ist dieses System für die Herstellung isopenangereicherter Proben ungeeignet.

### 3.2.6. Aufreinigung der FNR mit Oligohistidindomäne

Die Aufreinigung der eine Oligohistidindomäne enthaltenden FNR erfolgte über zwei Metallchelataffinitätschromatographien an Ni-NTA und einen Anionenaustauscher mit Q-Sepharose. Der Q-Wert liegt nach den drei Aufreinigungsschritten bei 13 und deutet auf eine hohe Reinheit der FNR hin. Unter Verwendung des pKKHisFNR Expressionssystems konnte aus 1 Liter M9-Medium unter Standardbedingungen eine Ausbeute von 9 mg reiner FNR

erzielt werden. Das pQEFNR-System lieferte sogar Expressionsraten von 15 mg reiner FNR pro Liter M9-Medium. Die Expressionsrate konnte durch geeignete Wahl der IPTG-Konzentration und Verringerung der Expressionstemperatur um 130 % auf 35 mg gesteigert werden. Damit liegt die Ausbeute an rekombinanter FNR bezüglich des Ursprungssystems um den Faktor 12 höher.

Expressions-system	Zellen	Optimale Ausbeute	Optimale Ausbeute
pKKFNR	BL21	19mg	6mg
pKKHisFNR	BL21	27mg	9mg
pQEFNR	XL10	65mg	10-35mg

Tab.8: Test verschiedener Expressionsvektoren mit bakteriellen Erkennungssequenzen.

### 3.2.7. Präparation von $^{15}\text{N}$ -angereicherter FNR

Die Expression der FNR erfolgte in M9-Medium, dem zur Isotopenanreicherung 1g/l  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  zugesetzt wurden

Die transformierten XL10-Zellen wurden in zwei 750 ml Kulturen mit  $^{15}\text{N}$ -Medium überführt. Um das Wachstum zu kontrollieren, wurden diskontinuierliche Messungen der  $\text{OD}_{600}$  vorgenommen. Die Inkubationstemperatur wurde beim Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 auf 30°C gesenkt. Bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,9 beziehungsweise 0,8 wurden die beiden Kulturen durch Zusatz von 0,2 mM IPTG induziert und anschließend über Nacht bei 30°C inkubiert. Die logarithmische Wachstumsphase näherte sich nach ca. 15 Stunden ihrem Ende. Tests ergaben, dass der Anteil an löslichem Protein bereits nach 6 Stunden einen maximalen Wert erreicht. Deswegen wurden die Zellen nach 6 h geerntet, abzentrifugiert, in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 8 resuspendiert und schließlich mittels Ultraschall aufgeschlossen. Das Lysat wurde dann durch Zentrifugation von den Zelltrümmern getrennt und aufgereinigt.

### 3.2.8. Aufreinigung der $^{15}\text{N}$ -angereicherten FNR

Nach Metallchelataffinitätschromatographie an Ni-NTA wurde das Lysat durch Anionenaustausch an Q-Sepharose weiter aufgereinigt. Die Elution der an die Säule gebundenen FNR erfolgte mittels eines linearen Salzgradienten von 0-0,5M KCl. Nach der zweiten Metallchelataffinitätschromatographie an Ni-NTA liegt der Q-Wert bei 9.2. Die Proteinausbeute beläuft sich auf 19 mg FNR pro Liter M9 Medium. Das TROSY-Spektrum

ist in Abbildung 67 wiedergegeben.

Reinigungsschritt	Proteinmenge [mg]	Proteinausbeute [%]
Lysat	45	100
Durchbruch 1, 1. MCAC	2	4.5
Durchbruch 2, 1. MCAC	1.5	3
1. NTA	35	87.5
IEC	25	55.5
2. NTA	19	42

Tab.9: Aufreinigungsschema der  $^{15}\text{N}$  angereicherten FNR Probe

Das pQEFNR Expressionssystem führte zu hervorragenden Ausbeuten an rekombinanten FNR. So konnten bis zu 45 mg reines lösliches Protein aus einem Liter LB-Medium gewonnen werden. Aufgrund des zu vermutenden N-terminalen Abbaus des Proteins (Doppelbande, sowie geringe Affinität an NiNTA, besonders bei längerer Expressionsdauer) während der Expression ist die Präparation in M9 Medium problematisch. Eine Trennung der beiden Fragmente (FNR, N-terminal verkürztes FNR) ist aufgrund des geringen Größenunterschieds nicht ohne höhere Verluste an FNR möglich.

### 3.2.9 Das TROSY-Spektrum der FNR

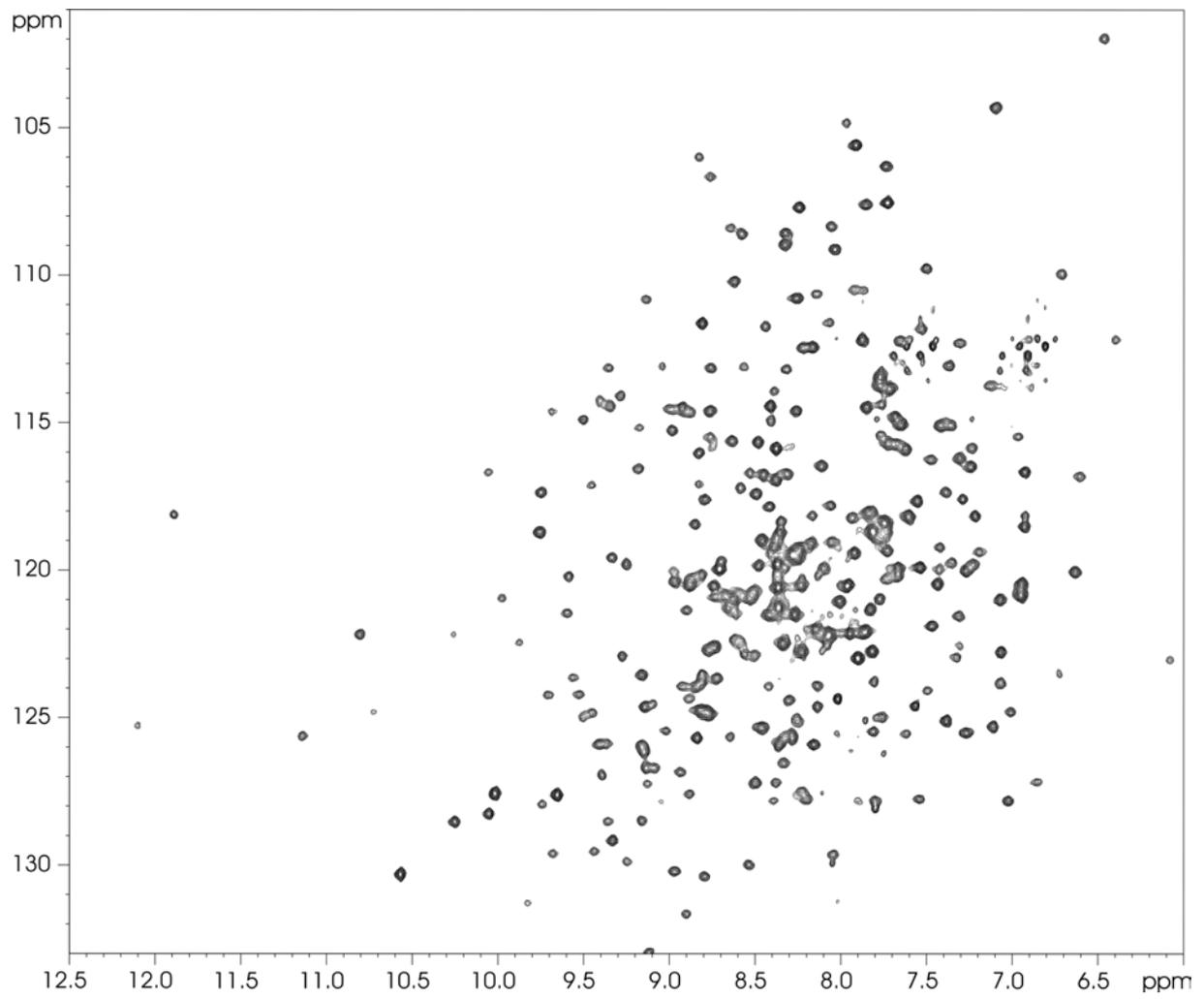


Abb.67: Trosy Spektrum der FNR

## 4. Zusammenfassung

Der Ein-Elektron Transporter Adrenodoxin spielt in der Steroidhormonbiosynthese eine entscheidende Rolle. Bislang konnte der Elektronentransportmechanismus zwischen der Adrenodoxin-Reduktase und dem Cytochrom P450 mittels Adrenodoxin nicht eindeutig nachgewiesen werden. Um die molekularen Wechselwirkungen besser verstehen zu können wurden in der vorliegenden Arbeit strukturelle Untersuchungen am Rinderadrenodoxin durchgeführt. Nachdem es bereits 1998 gelang die Struktur des oxidierten Zustands des Adrenodoxins aufzuklären [Müller et al. 1998], sollte die Struktur des reduzierten Zustands Aufschluss über mögliche redoxbedingte konformationelle Änderungen geben.

Die Strukturaufklärung mittels NMR erfordert hohe Expressionsausbeuten und effektive Aufreinigungsstrategien des rekombinant hergestellten Proteins. Deshalb wurde zunächst eine Steigerung der Expression von löslichem Adrenodoxin in *E.coli* angestrebt. In Minimalmedium lieferte die Expression unter Zusatz von 2,5g Glycerin und 1g Glucose optimale Ergebnisse. So konnte nach Optimierung der Aufreinigungsabfolge aus einem Liter M9-Medium bis zu 50 mg homogenes Protein isoliert werden. Nach Optimierung der Expressionsbedingungen und der Aufreinigungsstrategie konnte das Adrenodoxin mit den NMR aktiven Isotopen  $^{15}\text{N}$  sowie  $^{13}\text{C}$  angereichert werden. Die Reduktion des Adrenodoxins erfolgte durch Zusatz von Natriumdithionit unter strikt anaeroben Bedingungen.

Die strukturelle Untersuchung mittels NMR setzt eine Zuordnung der Proteinresonanzen voraus. Diese erfolgte unter Verwendung verschiedener Tripleresonanzexperimente. Eine Zuordnung war aufgrund des stark ausgeprägten Paramagnetismus nur für solche Reste möglich, die sich mindestens 8 Å vom [2Fe-2S]-Cluster des Adrenodoxins entfernt befinden. Trotzdem konnten wichtige Regionen, die sich außerhalb des Einflussbereichs des [2Fe-2S]-Clusters befinden, zugeordnet und mit dem oxidierten Zustand verglichen werden. Aus den  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC und  $^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC-Spektren wurden für den reduzierten Zustand unter Zuhilfenahme des Programms NMR2st 1300 effektiv abstandsbeschränkende NOE-Signale eindeutig zugeordnet. Nach Minimierung der Zielfunktion wurden im letzten Schritt 50 Strukturen mit dem Strukturkalkulationsprogramm DYANA berechnet. Die 20 Strukturen mit den besten Targetfunktionen wurden als Strukturensemble dargestellt. Für das Proteinrückrat beträgt der RMSD 2,34 Å.

Anhand der chemischen Verschiebungsänderungen konnten erste Unterschiede zwischen oxidierten und reduzierten Zustand des Adrenodoxins festgestellt werden. Besonders markant sind diese Veränderungen im Bereich des C-Terminus und des Loops 80-86. Änderungen

konnten auch im „Chemical Shift Index“ und beim Vergleich der NOE-Konnektivitäten beider Redoxzustände beobachtet werden. Gerade für die Aminosäurereste Asp76 und Asp79, die für die Wechselwirkung zu den Redoxpartnern essentiell sind, konnten Veränderungen im Aufspaltungsmuster der „NOE-Pattern“ nachgewiesen werden, was auf konformationelle Änderungen im Bereich der Wechselwirkungsdomäne hindeutet. Der Vergleich der beiden Tertiärstrukturen lieferte weitere Indizien dafür, dass der C-Terminus redoxbedingte konformationelle Änderungen erfährt.

Während des Erstellens dieser Arbeit konnte eine US-amerikanische Gruppe durch Zufall die Existenz eines Adrenodoxin (oxidiert) Dimers bei physiologisch relevanten Konzentrationen nachweisen [Pikuleva et al. 2000]. Bei der Dimerisierung spielt der C-Terminus eine entscheidende Rolle. Zwei intermolekulare Wasserstoffbrücken bilden sich zwischen C-Terminus und Protein des jeweils anderen Partners aus. Redoxbedingte konformationelle Änderungen im Bereich des C-Terminus sollten die Auflösung des Dimers begünstigen. Um diese Vermutung zu bestätigen wurden Cross-Linking Experimente mit dem reduzierten und oxidierten Zustand des Adrenodoxins durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigten die Annahme, dass sich das Adrenodoxin Dimer nach Reduktion auflöst. Außerdem konnte anhand der voll funktionsfähigen C-terminal verkürzten Mutante Adx(4-108) die tragende Rolle des C-Terminus bei der Dimerbildung bewiesen werden. Aus den experimentell erhaltenen Daten wurde ein neuer Elektronentransportmechanismus postuliert, der sowohl Adrenodoxin Dimere als auch Adrenodoxin Monomere als Elektronentransporter annimmt [Beilke et al. 2002].

Die streng kontrollierte Steroidhormonbiosynthese wird durch den Einsatz von Adrenodoxin Dimeren beschleunigt und durch die redoxbedingte Auflösung der Dimere optimiert.

Die redoxbedingte Auflösung eines Dimers ist in der Biochemie einzigartig und kann zum Verständnis molekularer Wechselwirkungen beitragen. Für die gesamte Gruppe der vertebraten Ferredoxine sind aufgrund der Struktur- und Sequenzhomologie ähnliche Ergebnisse zu erwarten.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR) für strukturelle Untersuchungen mittels NMR zugänglich gemacht werden. Durch Verwendung von bakteriellen Expressionssystemen, insbesondere dem pQE30-Expressionssystem, konnte der Anteil an löslichem Protein im Vergleich zum Ursprungssystem um den Faktor 12 erhöht werden. Dabei führten möglichst niedrige Expressionstemperaturen und IPTG Konzentrationen zu den höchsten Proteinausbeuten. Ein verbessertes Isolationsverfahren wurde etabliert und ermöglicht die Darstellung von bis zu 90 mg FNR aus einem Liter LB-

Medium. Eine Verlängerung der Expressionsdauer, hervorgerufen durch das Wachstum in M9-Medium und in D<sub>2</sub>O, verringerte den Anteil an vollständig intaktem Protein, weshalb auf eine kostspielige Proteinpräparation in dreifach angereicherten Minimalmedium verzichtet wurde.

## 5. Literatur

- Archer, S., Ikura, M., Torchia, D. and Bax, A.** (1991) *J. of Magn. Reson.*, 95, 636-641
- Arnon D. I.** (1965) *Science* 149, 1460
- Ayed, A., Mulder, F. A. A., Yi, G.-S., Lu Y., Kay L. E., Arrowsmith, C. H.** (2001)  
*Nature structural biology* 8, 756
- Bassham J. A.** (1977) *Science* 197, 630-638
- Baumann, B.; Sticht, H.; Scharpf, M.; Sutter, M.; Haehnel, W.** (1996) *Biochemistry* 35, 12831-12841
- Bax, A. and Ikura, M.** (1991) *J. of Biomol. NMR* 1, 99
- Bax, A., Clore, G. and Gronenborn, A.** (1990) *J. of Magn. Reson.*, 88, 425
- Beckert, V., Schrauber, H., Bernhardt, R., Van Dijk, A., Kakoschke, C., Wray, V.**  
 (1995) *Eur. J. Biochem.* 231, 226-235
- Beckert, V.; Dettmer, R.; Bernhardt, R.** (1994) *Journal of Biological Chemistry*, 269, 2568-2573
- Beckert, V.; Kakoschke, C.; Schrauber, H.; Bernhardt, R.; Wray, V.; Van Dijk, A.A.**  
 (1995) *Eur. J. Biochem.*, 231, 226-235
- Beilke D., Weiss R., Löhr F., Pristovsek P., Hannemann F., Bernhardt R., Rüterjans H.**  
 (2002) *Biochemistry* 41, 7969-7978
- Bentrop, D., Bertini, I., Cremonini, M.,A., , Forsén, S., Luchinat, C. and Malmendal A.**  
 (1997) *Biochemistry* 36, 11605-11618
- Bernhardt, R.** (1995) *Rev. Physiol. Pharmacol.*, 127, 137-221
- Bertini I.,** (1997) *Proteins*, 29, 348-358
- Bertini I., Couture, M. M. J., Donaire, A., Eltis, L. D., Felli, I. C., Luchinat, C.,  
 Piccioli, M., Rosato, A.** (1996) *Eur. J. Biochem.* 241, 440
- Bodenhausen, G.; Ruben, D.J.** (1980) *Chem. Phys. Lett.*, 69, 185-189
- Brinzinger, H., Palmer, G. and Sands, R. H.** (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 55, 397
- Brosius, J.; Dull, T.J.; Sleeter D.D.; Noller H.F.** (1981) *J. Mol. Biol.*, 148, 107-127
- Bruns D. M. und Karplus P. A.** (1995) *J. Mol. Biol.* 247, 125-145
- Bruns, C. M., und Karplus, P. A.** (1995) *JMB* 247, 125-145
- Bullock, W. O.; Fernandez, J. M. & Short, J. M.** (1987). *Bio/Techniques* 5, 376
- Burova, T. V.; Beckert, V.; Uhlmann, H.; Ristau, O.; Bernhardt, R.; Pfeil, W.** (1996)  
*Protein Science*, 5, 1890-1897

- Cammack, R.; Rao, K.K.; Barger, C.P.; Hutson, K.G.; Andrew, P.W.; Rogers, L.J.** (1977) *Biochem. J.*, 168, 205-209
- Carrillo, N., und Vallejos, R. H.** (1987) *Topics in Photosynthesis* 8, 527-560
- Cauter E. V., Leproult R., Plat L.**, (2000) *JAMA* 284, 861-868
- Clayton R.** (1980) Cambridge University Press, Cambridge
- Clayton, R. K.** (1980) *Photosynthesis*, Cambridge University Press, UK
- Coghlan, V. M.; Vickery, L.E.**, (1991) *Journal of Biological Chemistry*, 266, 18606-18612
- Consatantine, K., Goldfarb, V., Wittekind, M., Anthony, J., Ng, S. and Müller, L.** (1992) *Biochemistry* 31, 5033
- Coon, M.J.; Ding, X.; Pernecky, S. J.**; (1992) *FASEB J.* 6, 669
- Correl, C. C., Batie, C. J., Ballou, D. P., und Ludwig, M. L.** (1992) *Science* 258, 1604-1610
- Correl, C. C., Ludwig, M. L., Bruns, C. M., und Karplus, P. A.** (1993) *Protein Science* 2, 2112-2133
- Correll C. C., Ludwig M. L., Bruns C. M. und Karplus P. A.** (1993) *Protein Sci.* 2, 2112-2133
- Cupp, J. R., Vickery, L. E. and Coghlan, V. M.** (1988), *Arch. Biochem. Biophys.* 264, 376 – 382
- DeBoer, H. A.; Comstock, L.J.; Vasser, M.**, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 21-25
- Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel H.** (1985) *Nature* 318, 618-624
- Deng, Z., Aliverti, A., Zanetti, G., Arakaki, A. K., Ottado, J., Orellano, E. G., Calcaterra, N. B., Ceccarelli, E. A., Carrillo, N. und Karplus, P. A.** (1999) *Nature Struct. Biol.*
- Duysens L. N. M, Amesz J., Kamp B. M.** (1961) *Nature* 190, 510-511
- Eady R. R., Richardson T. H., Miller R. W., Hawkins M., Lowe D. J.** (1988) *Biochem. J.* 256, (189–196)
- Fairbrother, W., Palmer III, A., Rance, M., Seizer, J., Saier, H. and Wright, P.** (1992) *Biochemistry* 31, 5033
- Farmer II, B., Venters, R., Spicer, L., Wittekind, M. and Müller, L., J.** (1992) *J. of Biomol. NMR* 2, 195
- Ferretti
- Fillat M. F., Sandmann G., Gomez-Moreno C.** (1988) *Arch. Microbiol.* 150, 160-164
- Fillat, M. F., Bakker, H. A. C., Weisbeek, P. J.** (1990) *Nucl. Acids Res.* 18, 7161
- Friebolin, H.**, Ein- und zweidimensionale NMR- Spektroskopie (2.Auflage), Verlag: VCH

- Geerten, W.V., Bax, A.** (1993) *J., Am. Chem. Soc.*, 115,7772-7777
- Gerber, G. F., Hall, D. O., Thornley, J. H. M., Whatley, F. R.** (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56, 987
- Geren, L. M.; O'Brian, P.; Stonehuerner, J.; Mittet, F.** (1984) *Journal of Biological Chemistry*, 259, 2155-2160
- Geschwindner S.** (1998) Dissertation. Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main
- Gibson, J. F., Hall, D. O., Thornley, J. H. M., Whatley, F. R.** (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56, 987
- Gomez –Moreno, C., Martinez-Julvez, M., Medina, M., Hurley, J. K., Tollin, G.,** (1998) *Biochimie* 80, 837-846
- Greenfield, N. J., Wu, X. and Jordan, F.** (1989), *Biochim. Biophys. Acta* 995, 246 – 254
- Greenwood, N. N.** *Chemie der Elemente*, 1.Auflage, VCH Verlag, S. 1406-1413\*
- Griesinger, C.; Sorensen, O.W.; Ernst, R. R.,** (1991) *J. Magn. Reson.* 93, 436-440
- Grinberg A. V., Hannemann F., Schiffler B., Müller J., Heinemann V. and Berhardt R.** (2000), *Proteins* 40, 590-612
- Grzesiek, S. and Bax, A.** (1993) *J. of Biomol. NMR*, 3, 185-204
- Güntert, P., Mumenthaler, C., Wüthrich, K.** (1997) *J. Mol. Biol.* 273, 283-298
- Günther, H.** *NMR Spektroskopie*, 3.Auflage, Georg Thieme Verlag, S. 108-115; S. 357-365
- Hamamoto, J.; Kurokochi, V.; Tanaka, S.; Ichikawa, Y.** (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 953, 207-213
- Hanahan, D.** (1985). *DNA cloning*. Vol. I, 109-136, IRL Press
- Hannig G., Makrides S. C.** (1998) *Tibtech* 16, 54
- Hanugoklu, I.; Jefcoate, C.R.** (1980) *Journal of Biological Chemistry*, 255, 3057-3061
- Hara, T.; Takeshima, M.** (1994) *Cytochrome P450 8<sup>th</sup> Int. Conf.*, 417-420
- Hill R** (1937) *Nature* 139, 881-882
- Hiwatashi, A., Ichikawa, Y. and Waki, N.** (1986), *FEBS Lett.* 195, 87 – 91
- Huang, J. J and Kimura, T. (1973), *Biochemistry* 12, 406 - 409
- Hurley J. K., Salamon Z., Meyer T. E., Fitch J. C., Cusanovich M. A., Markley J. L. Cheng H., Xia B., Chae Y. K., Medina M., Gomez-Moreno C., Tollin G.** (1993) *Biochemistry* 32, 9346-9354
- Hurley J. K., Schmeits J. L., Genzor C., Gomez-Moreno C., Tollin G.** (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 245-250

- Jacobson, B. L.; Markley, J. L.; Chae, Y.K.; Rayment, J.; Holden, H.M.** (1993) *Biochemistry*, 32, 6788-6793
- Jahnke, W.; Baur, M.; Gemmecker, G.; Kessler, H.** (1995) *J. Magn. Resonance*, 106, 86-88
- John, M. E., John, M. C., Ashley, P., MacDonald, R. J., Simpson, E. R., Waterman, M. R.** (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4715-4719
- Kakuta Y., Horio T., Takahashi Y., Fukuyama K.** (2001) *Biochemistry* 40, 11007-11012
- Karplus P. A., Daniels M. J., Herriott J. R.** (1991) *Science* 251, 60-66
- Karplus, J.** (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2870
- Karplus, P. A., Daniels, M. J. und Herriott, J. R.** (1991) *Science* 251, 60-66
- Karplus, P. A., und Bruns, C. M.** (1994) *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 89-99
- Kay, L. E.; Dennis, A.T.; Bax, A.** (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 5488-5490
- Kay, L., Ikura, M., Tschudin, R. and Bax, A. J.** *Magn. Reson.* (1990), 89, 496-514
- Keilin, D.**, (1925) *Proceedings of the Royal Society B*, 98 312-339.
- Kennedy, R. M.** (1990) *Methods Enzymol.*, 182
- Kessler, H.; Gehrke, M.; Griesinger, C.** (1988) *Angew. Chem.*, 100, 507-559
- Kido, T.; Kimura, T.** 1979 *Journal of Biological Chemistry*, 254, 11806-11815
- Kimura, T.** (1968), *Struct. Bonding* 5, 1 - 40
- Kimura, T. and Suzuki, K.** (1965), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 19, 340 - 345
- Kimura, T., Tasaki, A. and Watari, H.** (1970) *JBC* 254, 4450-4452
- Kowal J., Simpson E. R., Estabrook, R. W.** (1970) *JBC* 245, 2438
- Kuboniva, H.; Grzesiek, S.; Delaglio, F.; Bax, A.** (1994) *J. of Biomolekular NMR*, 4, 871-878
- Kühlbrand W.** (1984) *Nature* 307, 478-480
- Kurusu G., Kusunoki M., Katoh E., Yamazaki T., Teshima K., Onda Y., Kimata-Ariga Y., Hase T.** (2001) *Nature Struct. Biol.* 8, 117-121
- Laemmli, U. K.** (1970) *Nature* 227, 680-685
- Lambeth, J. D., Seybert, D. W., Lancaster, J. R., Salerno, J. C., Kamin, H.** (1982) *Mol. Cell. Biochem.* 45, 13-31
- Lambeth, J. D.; Kamin, K.** (1979) *Journal of Biological Chemistry*, 254, 2766-2774
- Lambeth, J. D.; Seybert, D.W.; Kamin, H.** (1980) *Journal of Biological Chemistry*, 255, 138-143
- Lammack, R., Rao, K. K., Hall, D. O., Johnson, C. E.** (1971) *Biochem. J.* 125, 849-856
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thoratn, J. M.** (1993) *J. Appl.*

Crystallogr. 26, 283-291

**Lazaridis T., Lee I., and Karplus M.** (1997) *Protein Science*, 6: 2589-2605

**Lazzarini R. und San Pietro, A.**, (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 62, 417-420

**Lazzarini R., San Pietro A.** (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 62, 417-420

**Löhr F.**, Dissertation, Frankfurt am Main (1996), Entwicklung und Anwendung NMR-spektroskopischer Methoden zur Strukturbestimmung von Proteinen

**Löhr, F. and Rüterjans, H.** (1995) *J. of Biomol. NMR*, 6, 189-197

**Lu, G., Campbell, W. H., Schneider, G. und Lindqvist, Y.** (1994) *Structure* 2, 809-821

**Ludvigsen, S.; Andersen, K.V.; Poulsen, F.M.** (1991) *J. Mol. Biol.*, 217, 731-736

**Marg, A., Kuban, R.-J, Behlke, J., Dettmer, R. and Ruckpaul, K.** (1992), *J. Mol. Biol.* 227, 945 – 947

**Marion, D., Driscoll, P., Kay, L., Wingfield, P., Bax, A., Gronenborn, A. and Clore, G.** (1989) *Biochemistry* 28, 6150

**Martinez-Julvez, M., Hurley, J. K., Tollin, G., Gomez-Moreno, C., Fillat, M. F.**, (1996) *Biochimica et Biophysica Acta* 1297, 200-206

**Medina M., Martinez-Julvez M., Hurley J. K., Tollin G., Gomez-Moreno C.** (1998) *Biochemistry* 37, 2715-2728

**Medina M., Mendez E., Gomez-Moreno C.** (1992) *FEBS Lett.* 298, 25-28

**Mills J. D., Crowther D., Slovacek R. E., Hind G., McCarty R. E.** (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 547, 127-138

**Mills, J. D., Crowther, D., Slovacek, R. E., Hind, G., McCarty, R. E.** (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 547, 127-138

**Miura, S., Ichikawa** (1990) *JBC* 266, 6252-6258

**Miura, S., Tomita, S. and Ichikawa, Y.** (1991), *JBC* 266, 19212 – 19216

**Mooberry, E., Oh, B. and Markley, J.** (1989) *J. of Magn. Reson.*, 85, 147

**Morales, R., Chron, M.-H., Hundry-Clergeon, G., Petillot, Y., Norager, S., Medina, M., Frey, M.** (1999) *Biochemistry* 38, 15764-15773

**Morris G. A., Freeman R.**, (1979) *J. Amer. Chem. Soc.*, 101, 760-2

**Morris, G. A. und Freeman, R.** (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 760-762

**Müller, A.; Müller, J.J.; Muller, Y.A.; Uhlmann, H.; Bernhardt, R.; Heinemann, U.** (1998) *Structure*, 6, 269-280

**Müller, J. J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K., Heinemann, U.** (2001) *JBC* 276, 2786-2789

**Nakamura, S. und Kimura, T.** (1972) *JBC* 247, 2462-2468

- Nakanura S., Kimura T.** (1972) *JBC* 247, 6462-6468
- Nicholls, A.; Sharp, K.A.; Honig, B.** (1991) *Protein*, 11, 281-296
- Niemczura, W., Helm, G., Chesnick, A., Moore, R. and Bornemann, J.** (1989) *J. of Magn. Reson.*, 81, 635
- Nishida, H., Inaka, K., Yamanaka, M., Kaida, S., Kobayashi, K. und Miki, K.** (1995) *Biochemistry* 34, 2763-2767
- O'Hare, M. J., Nice, E. C.** (1979) *J. Chromatogr.* 171, 203
- Okamura, T.; Zuber, M.E.; Simpson, M.X.; Waterman, M.R.** (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5705- 5709
- Okuda, K. and Atsuta, Y.** (1978), *JBC* 253, 4653 - 4658
- Ort , D. R. und Yocum, C. F.** (1996) *Advances in Photosynthesis* 4, 1-9
- Oschkinat, H.; Müller, T.; Dieckmann, T.** (1994) *Angew. Chem.*, 106, 284-300
- P. Timpl, R. Spanagel, I. Siilaber, A. Kresse, J.M.H.M. Reul, G.K. Stalla, V. Blanquet, T. Steckler, F. Holsboer, W. Wurst** (1998) *Nature Genetics*, 19, 162-166.
- Page C., Moser C., Chen X., Dutton L.** (1999) *Nature* 402, 47-52
- Pervushin K., Riek, R., Wider, G., Wüthrich, K.** (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120, 6394-6400
- Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. and Wüthrich, K.** (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12366-12371
- Picado-Leonard, J., Voutilainen, R., Kao, L.-C., Chung, B.-C., Strauss, F. J., Miller, W. L.** (1988) *JBC* 263, 3240-3244
- Pikuleva, I., Tesh, K., Waterman, M. R., Kim, Y.** (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 44-55
- Pochapsky, T. C., Ratnaswarny, G., Patera A.** (1994) *Biochemistry* 33, 6433-6441
- Pochapsky, T. C.; Ratnaswamy, G.; Pater, A.** (1994) *Biochemistry*, 33, 6424-6432
- Pochapsky, T. C.; Ye, X.M.** (1991) *Biochemistry*, 30, 3850-3856
- Poe, M., Phillips, W. D., McDonald, C. C. and Lovenberg, W.** (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65, 797-804
- Porter, T. D., Larson, J. R.** (1991) *Meth. Enzymol.* 206, 108
- Porter, T. D.; Larson, J. R.** (1991). *Meth. Enzymol.* 206, 108
- Prince, R. C.** (1996) *TIBS* 21, 121-122
- Pristovsek, P., Lücke, C., Reincke, B., Ludwig, B., Rüterjans, H.** (2000) *Eur. J. Biochem.* 267, 4205-4212

- Richardson, J.** (1981) *Adv. Protein Chem.*, 34, 167-339
- Riek, R., Pervushin, K. and Wüthrich, K.** (2000) *TiBS* 25, 462-468.
- Rossomando, E. F.** (1990) *Methods Enzymol.*, 182, 309-317
- Rudolph R., Lilie H.** (1996) *FASEB J.* 10, 49
- Rypniewski, W. R.; Breiter, D.R.; Benning, M.M.; Weissenberg, G.; Oh, B.H.; Markley, J.L.; Rayment, J.; Holden, H.M.** (1991) *Biochemistry*, 30, 4126-4131
- Saarem, K., Bjorkhem, I., Pedersen, J. I. and Oftebro, H.** (1981), *J. Lipid. Res.* 22, 1254 - 1264
- Sakihama, N.; Hawatashi, H.; Miyatake, A.; Shin, M.; Ichikawa, Y.** (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, 264, 23-29
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory
- Sancho J., Gomez-Moreno C.** (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 231-233
- Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463
- Schiffler, B., Kiefer, M., Wilken, A., Hannemann, F., Adolph, H. W. and Bernhardt R.,** (2001) *JBC* 276, 36225-36232
- Schwarz, D., Chernogogolov, A. Kisselev, P.** (1999) *Biochemistry* 38, 9456-9464
- Selvaraj N., Dantes A., Amsterdam A.** (2000) *Molecular and Cellular Endocrinology* 168, 53-63
- Serre, L., Vellieux, F. M. D., Medina, M., Gomez-Moreno, C., Fontecilla-Camps, J. C., Frey, M.** (1996) *JMB* 263, 20-39
- Shkumatov, V.M., Smettan, G., Ristau, O., Rein, H., Ruckpaul, K., Chaschin, V.L. and Akhrem, A.A.** (1988) *Chem. Biol. Interact.* 68, 71-83.
- Sieker L. C., Stenkamp, R. E. and LeGall J.** (1994) *Methods in Enzymology*, Vol. 243
- Sklenar, V.; Saudeck, V.; Piotto, M.** (1992) *J. of Biomolekular NMR*, 2, 661-665
- Solomon I.,** (1955) *Phys. Rev.* 99: 559
- Stellwagen, E.** (1990) *Methods Enzymol.* 182, 317-328
- Stocco, D. M.** (2000) *Biochimica et Biophysica Acta* 1486, 184-197
- Stormer, F. C., Pedersen, J. I. and Oftebro, H.** (1979), *JBC* 254, 4331 - 4334
- Stryer, L.** *Biochemie*, 4.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg . Berlin . Oxford, S. 721-746
- Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Dubendorff J. W.** (1990) *Meth. Enzymol.* 185, 60
- Studier, F. W.; Rosenberg, A. H.; Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W.** (1990). *Meth.*

Enzymol. 185, 60

**Suhara, K., Takemori, S. and Katagiri, M.** (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 263, 272 – 278

**Taitelbaum H., Ferretti J. A., Spencer R. G. S., Weiss G. H.** (1994) *J Magnetic Resonance*; A109:166-171.

**Takeuchi, K., Tsubaki, M., Futagawa, J., Masuya, F. and Hori, H.** (2001) *J. Biochem.* 130, 789-797

**Tanaka, M.; Hanui, M.; Yasunobu, K.T.** (1992) *Journal of Biological Chemistry*, 248, 1141-1157

**Tsukikara, T. J.; Matsubara, H. J.** (1981) *Biochem.*, 90, 1763-1773

**Tsukikara, T.; Fukuyama, K.; Mizushima, M.; Harioka, T.; Hase, Y.; Matsubara, H.** (1981) *J. Mol. Biol.*, 216, 399-410

**Tuls, J.; Geren, L.; Lambeth, J.D.; Millet, F.** (1987) *Journal of Biological Chemistry*, 262, 10020-10025

**Uhlmann, H., Beckert, V., Schwarz, D., Bernhardt, R.,** (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1188, 1131-1138

**Uhlmann, H.; Kraft, R.; Bernhardt, R.** (1994) *Journal of Biological Chemistry*, 269, 22557-22564

**Vickery, L. E.** (1997) *Steroids*, 62,124-127

**Vierira, J.; Messing, J.** (1982) *Gene*, 19, 259-268

**Vontilainen, R., Picado-Leonard, J., Diblasio, A. M., Miller, W. L.** (1988) *J. Clin. Endocrinol. Mtab.* 66, 383-388

**Vorlesungsscript OC4 von Prof. Dr. Griesinger (SS 1997)**

**Wada, A.; Waterman, M.R.** (1992) *Journal of Biological Chemistry*, 267, 22877-22882

**Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S. S., und Kim, J. J. P.** (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8411-8416

**Watari, H. and Kimura, T.** (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 106

**Waterman, M. R.** (1982) *Xenobiotica* 12, 773-786

Weber

**Weiß, R., Brachais, L., Löhr, F., Hartleib, J., Bernhardt, R. and Rüterjans, H.** (2000), *J.of Biomol. NMR* 17, 355 - 356

**Westler, W., Stockman, B. and Markley, J.** (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110, 6256

**Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., Markley, J. L. and Sykes, B. D.** (1995), *J. Biomol. NMR* 6, 135 - 140

**Wishart, D. S., Sykes, B. D.** (1994) *J. Biomol. NMR* 4, 171-180

- Wittekind, M. and Müller, L.** (1993) *J. of Magn. Reson. Ser. B* 101, 201
- Wittekind, M., Gorlach, M., Friedrichs, M., Dreyfuss, G. and Müller, L.** (1992) *Biochemistry*, 31, 6254
- Wüthrich, K.; Billeter, M.; Braun, W.** (1984) *J. Mol. Biol.*, 180, 715-740
- Wüthrich, K.;** (1986) *NMR of proteins and nucleic acids*; Verlag: Wiley, New York
- Xia, B., Cheng, H., Skjeldahl, L., Coghlan, V. M., Vickery, L. E. and Markley, J. L.** (1998), *Biochemistry* 34, 180 – 187
- Ziegler, G. A., Schulz G. E.** (2000) *Biochemistry* 39, 10986-10995
- Zuiderweg, E., McIntosh, L., Dahlquist, F. and Fesik, S.** (1990) *J. of Magn. Reson.*, 86, 210

## 6. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp <sup>R</sup>	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
Bis-Tris-propane	1,3-[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
ct	constant-time
cw	continuous wave
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E.COSY	exclusive correlation spectroscopy
et al.	und andere
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FID	free induction decay
FMN	Flavinmononucleotid
FPLC	Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie (Fast performance liquid chromatography)
g	Erdbeschleunigung
GARP	globally optimized, alternating-phase rectangular pulses
Gl.	Gleichung
HAc	Essigsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
H <sub>2</sub> O <sub>milli</sub>	über Millipore Filtrationsanlage gereinigtes Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IEC	Ionenaustausch-Chromatographie
INEPT	insensitive nuclei enhanced by polarisation transfer
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MCAC	Metallchelat-Affinitätschromatographie
MCS	Multiple Cloning Site
MLEV	Entkopplungs-Sequenz benannt nach Malcolm Levitt
MW	Molekulargewicht
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte

ori	Origin of replication
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ppm	parts per million
RPC	<i>Reversed Phase</i> -Chromatographie
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TB	Terrific-Broth
TOCSY	total correlation spectroscopy
TPPI	time proportional phase incrementation
Tris	Tris(hydroxymethyl)-methylamin
TROSY	Transverse relaxation optimized spectroscopy
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
WATERGATE	water suppression by gradient tailored excitation
w/v	Gewicht pro Volumen

Weitere Abkürzungen für Chemikalien sind in Abschnitt 2.1.5. angegeben.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Dirk Beilke, an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der erwähnten Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt am Main, September 2002

.....

(Dirk Beilke)

# Curriculum vitae

## Zur Person

Dirk Beilke

Diplom-Chemiker

geboren am 07.04.1973 in Offenbach

## Schulbildung

1979-1983

Grundschule in Heusenstamm/Rembrücken

1983-1985

Förderstufe an der Adolf Reichwein Schule in Heusenstamm

1985-1992

Adolf Reichwein Gymnasium in Heusenstamm

## Zivildienst

7/1992-10/1993

## Studium

10/1993-6/1998

Studium *Chemie* an der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

07/1998-02/1999

Diplomprüfung und Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biophysikalische Chemie der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main unter Anleitung von Prof. Dr. H. Rüterjans

## Promotion

03/1999-dato am Institut für Biophysikalische Chemie der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main unter Anleitung von Prof. Dr. H. Rüterjans

*Thema:* Expression, Zuordnung, Struktur und Untersuchungen zum Elektronentransportmechanismus des Adrenodoxins; Optimierung der Expression und Aufreinigung des Elektronentransportproteins Ferredoxin NADP+ Reduktase.

## Berufserfahrung

07/1998-07/2002

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biophysikalische Chemie der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main (Betreuung der Praktika „Biophysikalische Chemie I und II“)

## Meine akademischen Lehrer waren:

N.Auner, B. Brutschy, F.J. Comes, E. Egert, J. Engels, H. Fasold, C. Griesinger, K. Hensen, B. Ludwig, W. Martiensen, R. Prinzinger, G. Kohlmaier, B.O. Kolbesen, D. Rehm, H. Rüterjans, R. Schlögl, H. Schwalbe, W. Sterzel.