

Bestimmung des Interaktionsbereiches sowie der Struktur des
Adrenodoxins im Komplex mit der Adrenodoxin-Reduktase
mit Hilfe der paramagnetischen NMR-Spektroskopie

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Frau Dipl. Chem. Berna Mersinli

Saarbrücken

2010

Tag des Kolloquiums: 12. Oktober 2010
Dekan: Prof. Dr. Stefan Diebels
Berichterstatter: Prof. Dr. Rita Bernhardt
Prof. Dr. Marcellus Ubbink
Vorsitz: Prof. Dr. Uli Müller
Akademischer Mitarbeiter: Dr. Gert-Wieland Kohring

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Zusammenfassung	7
Summary	8
1 Einleitung	10
1.1 Cytochrome P450	10
1.2 Ferredoxin-NADPH Reduktasen	16
1.3 Ferredoxine	19
1.4 Interaktion des Adx mit AdR und CYP11A1	24
1.5 NMR-Spektroskopie	26
1.6 Ziel der Arbeit	34
2 Material und Methoden	36
2.1 Materialien	36
2.2 Molekularbiologische Methoden	39
2.3 Heterologe Proteinexpression und Reinigung	42
2.4 Biochemische und biophysikalische Methoden	46
2.5 NMR-Untersuchungen	52
3 Ergebnisse	60
3.1 Herstellung der AdR-Mutanten	61
3.2 Charakterisierung der AdR-Mutanten	72
3.3 Paramagnetische NMR-Experimente	84
4 Diskussion und Ausblick	110
4.1 Heterologe Expression und Reinigung der AdR-Formen	111
4.2 Charakterisierung der AdR-Mutanten	118
4.3 Paramagnetische NMR-Messungen	123

Inhaltsverzeichnis

5 Veröffentlichungen	143
Literaturverzeichnis	143
Anhang	164

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

A ₄₅₀	Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm
Adx	Adrenodoxin
AdxWT	Adrenodoxin Wildtyp (1-128)
Adx(4-108)	verkürzte Form des Adx, fehlende Aminosäuren 1-3 und 109-128
¹⁵ N ² H-AdxWT	deutერიertes, ¹⁵ N-markiertes Adrenodoxin(1-128)
¹⁵ N ² H-Adx(4-108)	deutერიertes, ¹⁵ N-markiertes Adrenodoxin(4-108)
AdR	Adrenodoxin-Reduktase
AdRWT	Adrenodoxin-Reduktase Wildtyp
bp	Basenpaar
CLaNP-5	Lanthanoid-ligierende NMR-Sonde-5 (<i>Caged Lanthanide NMR Probe-5</i>)
CO	Carbonmonoxid
CSA	Chemische-Verschiebungsanisotropie (<i>Chemical Shift Anisotropy</i>)
CSP	Chemische-Verschiebungsänderung (<i>Chemical Shift Perturbation</i>)
CYP	Cytochrom P450
CYP11A1	Cytochrom P45011A1, auch P450scc genannt
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DRMS	Distanz-Effektivwert (<i>Distance Root Mean Square</i>)
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
DTNB	Dithiobisnitrobenzoesäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidierte Form)
Gd	Gadolinium
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-propansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)

Inhaltsverzeichnis

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
K_A	Assoziationskonstante
k_a	Assoziationsrate
K_D	Dissoziationskonstante
k_d	Dissoziationsrate
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
K	Kelvin
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LCMS	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie (<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
Ln	Lanthanoid
Lu	Lutetium
NADPH	Nikotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NaPP	Natriumphosphatpuffer
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
OD	optische Dichte
ox	oxidiert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCS	Pseudokontaktverschiebung (<i>Pseudocontact Shift</i>)
PDB	Proteindatenbank (<i>Protein Data Bank</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	<i>parts per million</i>
PRE	Paramagnetische-Relaxationsverstärkung (<i>Paramagnetic Relaxation Enhancement</i>)
Q-Wert	Reinheitsgrad der Proteinlösung der AdR ($A_{270\text{ nm}}/A_{450\text{ nm}}$)
red	reduziert
RMS	Effektivwert (<i>Root Mean Square</i>)
RMSD	Standardabweichung (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
RU	Resonanzeinheit (<i>Responce Unit</i>)
SPR	Oberflächenplasmonresonanz (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
T	Temperatur

Inhaltsverzeichnis

Tm	Thulium
TROSY	Transversale Relaxationsoptimierte Spektroskopie (<i>Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy</i>)
u.a.	unter anderem
UV/Vis	Ultravioletter und visueller Wellenlängenbereich
WT	Wildtyp

Abkürzungen für Aminosäuren

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

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden der Interaktionsbereich und die Struktur des Adrenodoxins (Adx) im Komplex mit der Adrenodoxin-Reduktase (AdR) beschrieben. Beide Proteine sind wichtige Komponenten der Steroidhormon-Biosynthese. Für die Untersuchungen wurden AdR-Mutanten (AdR_A: AdR_C364S/S425C/K429C, AdR_B: AdR_C145S/C364S/Q232C/K236C) hergestellt, die jeweils ein exponiertes Cysteinpaar besitzen. Beide Mutanten zeigten gleiche strukturelle und funktionale Eigenschaften wie der AdR-Wildtyp (AdRWT). Der Interaktionsbereich des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx im Komplex mit AdRWT wurde durch die Bestimmung der Chemischen-Verschiebungsänderung unter Anwendung der Transversalen Relaxationsoptimierten NMR-Spektroskopie (TROSY) bestimmt. CLaNP-5, eine Lanthanoid-ligierende Sonde, wurde über Disulfidbrücken an die AdR gekoppelt und für paramagnetische TROSY-NMR-Untersuchungen der Pseudokontaktverschiebungen und Paramagnetischen-Relaxationsverstärkungen eingesetzt. Die dadurch erhaltenen, weitreichenden Distanzinformationen wurden für Docking-Berechnungen des AdR-Adx-Komplexes verwendet. Diese Berechnungen wurden von Herrn Dr. Peter H.J. Keizers (Universität Leiden, Niederlande) durchgeführt. Der Interaktionsbereich des Adx in Wechselwirkung mit der AdR konnte damit in dieser Arbeit zum ersten Mal detailliert beschrieben werden, der seinerseits die eingehendere Bestimmung des AdR-Adx-Komplexes in Lösung ermöglichte.

Summary

In this work the structure of adrenodoxin (Adx) and its region, which is important for the interaction with adrenodoxin reductase (AdR), will be described. Both proteins are important components of the steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex. Therefore, two AdR mutants (AdR_A: AdR_C364S/S425C/K429C, AdR_B: AdR_C145S/C364S/Q232C/K236C) containing two exposed cysteins on the protein surface, respectively, have been prepared and characterized. AdR_A and AdR_B showed the same structural and functional properties as the wild type form of AdR. The exact interaction region of $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx in interaction with AdR wild type has been determined by measuring Chemical Shift Perturbations (CSP) using the method of Transverse Relaxation Optimized NMR-Spectroscopy (TROSY). Furthermore, to obtain long-range distance information by paramagnetic TROSY-NMR measurements, a Caged Lanthanide NMR Probe-5 (CLaNP-5) has been ligated to the AdR mutant surface via disulfide bridges, causing Pseudocontact Shifts (PCS) and Paramagnetic Relaxation Enhancement (PRE). These restraints (CSP, PCS, and PRE) have been used by Dr. Peter H.J. Keizers (University Leiden, The Netherlands) to perform docking experiments of Adx and AdR. This work describes in detail for the first time the interaction region of Adx and the structure of the AdR-Adx-complex in solution.

1 Einleitung

1.1 Cytochrome P450

1.1.1 Allgemeine Aspekte

1958 wiesen Garfinkel und Klingenberg (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958) in Lebermikrosomen ein CO bindendes Pigment nach, welches im reduzierten und CO-gebundenen Komplex ein untypisches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 450 nm zeigte (Omura & Sato, 1964a,b). Dieses Pigment konnte als ein b-Typ Hämoprotein identifiziert werden und erhielt durch diese Eigenschaft seinen Namen Cytochrom P450, wobei das P für Pigment und 450 die entsprechende Wellenlänge steht (Omura & Sato, 1964a,b). Dieses für Cytochrome untypische Absorptionsspektrum wird durch das Thiolat-Anion eines Cysteins induziert, welches die fünfte Ligandenstelle am Eisen des Protoporphyrins IX besetzt (Ichikawa & Yamano, 1967; Murakami & Mason, 1967). Durch diese Eigenschaft erfolgt die Klassifizierung der Cytochrom P450 Enzyme als Häm-Thiolat-Proteine.

Cytochrome P450 zählen zu den Oxidoreduktasen. Sie katalysieren die reduktive Spaltung des molekularen Sauerstoffs und zählen somit zur Untergruppe der Oxygenasen, die weiterhin in die Gruppen der Mono-, und Dioxygenasen unterteilt wird. Cytochrome P450 katalysieren den Einbau eines Sauerstoffatoms in das Substrat, während das zweite zu Wasser umgesetzt wird und zählen somit zu den Monooxygenasen (Mason *et al.*, 1955; Mason, 1957; Hayaishi & Nozaki, 1969). Hayaishi und Nozaki unterteilten die Gruppe der Monooxygenasen in die Gruppen der internen und externen Monooxygenasen (Hayaishi & Nozaki, 1969). Während interne Monooxygenasen die benötigten Elektronen zur Reduktion des Sauerstoffatoms dem Substrat entnehmen, erhalten die externen Monooxygenasen diese von einem externen Elektronendonator wie z.B NADPH. Die Einordnung der Cytochrome P450 ist in Abbildung 1.1 aufgeführt.

1 Einleitung

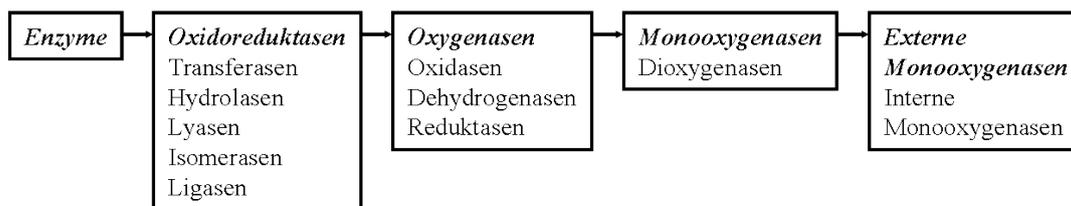


Abbildung 1.1: Einordnung der Cytochrome P450 in Enzymgruppen.

Die Cytochrome P450 werden zu einer Proteinsuperfamilie zusammengefasst, die aus 11294 bekannten Enzymen besteht und die in 977 Familien unterteilt werden kann (Stand November 2009: <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). Cytochrome P450 sind ubiquitäre Hämproteine, die in allen Lebensformen vorkommen und ein weitreichendes Spektrum an Reaktionen katalysieren.

Um die Vielfalt der vorhandenen Cytochrome klassifizieren zu können, führte Nebert 1987 eine systematische Nomenklatur ein (Nebert *et al.*, 1987). In Abbildung 1.2 wird anhand des Beispiels CYP11A1 diese Systematik veranschaulicht. CYP steht für das **C**ytochrom **P**450, die nachfolgende arabische Ziffer beschreibt die Familie, der darauffolgende Buchstabe definiert die Unterfamilie und die letzte arabische Ziffer steht für das jeweilige Isoenzym. Die Mitglieder einer Familie stimmen zu mindestens 40 % in der Sequenz überein. Bei einer Sequenzidentität von über 55 % gehören die Enzyme derselben Unterfamilie an.

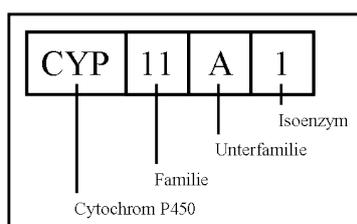


Abbildung 1.2: Nomenklatur der Cytochrome P450 am Beispiel des CYP11A1.

Cytochrome P450 katalysieren die folgende Reaktion:



Das Substrat RH wird bei Anwesenheit des Elektronendonors NAD(P)H zum hydroxylierten Produkt ROH umgesetzt.

Cytochrome P450 sind in eine Vielzahl von Reaktionen eingebunden, wie z.B. Hydroxylierungen, N-, O- und S-Desalkylierungen, Sulfoxidierungen, Epoxidierungen, Des-

1 Einleitung

aminierungen, Desulfurierungen, Peroxidierungen, Dehalogenierungen und die Reduktion von N-Oxiden (Ruckpaul, 1993; Sono *et al.*, 1996; Bernhardt, 1996; Guengerich, 2001; Bernhardt, 2006). Zu den Substraten zählen unter anderem Steroide, Fettsäuren, Terpene, Arzneimittel (Hannemann *et al.*, 2007).

Cytochrom P450 Systeme nehmen aber auch eine wichtige Rolle im Metabolismus diverser Arzneimittel, Karzinogene, Alkaloide, Pestizide und weiterer wichtiger Xenobiotika ein (Porter & Coon, 1991; Bernhardt, 1996, 2006). Daher ist es nicht überraschend, dass diese Enzyme in vielen Forschungsgebieten, wie der Biochemie, Biotechnologie, Pharmakologie, Physiologie, Toxikologie, Mikrobiologie und Umweltforschung von großem Interesse sind (Bernhardt, 1996).

Als externe Monooxygenasen benötigen Cytochrome P450 Elektronen für ihre Katalyse. Entsprechend der Art des Elektronendonorsystems werden sie mittlerweile in insgesamt zehn Klassen unterteilt (Hannemann *et al.*, 2007). In Abbildung 1.3 ist die erste Klasse, welche die bakteriellen Cytochrome P450 (A) und die mitochondrialen Cytochrome P450 einschließt (B), dargestellt.

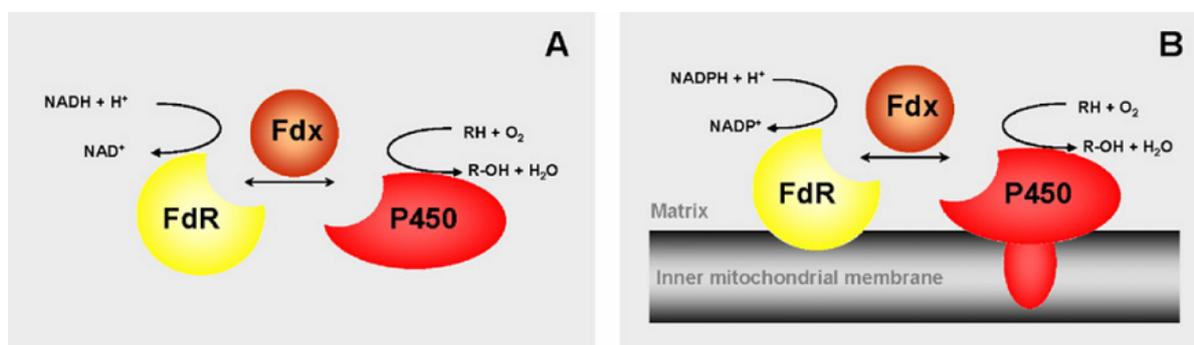


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau von zwei Cytochrom P450 Systemen (Hannemann *et al.*, 2007).

(A) Bakteriell System: Komponenten Ferredoxin-Reduktase (FdR), Ferredoxin (Fdx) und Cytochrom P450 liegen löslich im Cytosol vor. (B) Mitochondriales System: Ferredoxin-Reduktase liegt membran-assoziiert vor, Ferredoxin ist löslich in der Matrix, Cytochrom P450 liegt membran-integriert vor.

In den meisten bakteriellen und in den mitochondrialen P450 Systemen ist neben dem Cytochrom eine FAD-haltige Reduktase und ein Ferredoxin, welches einen Eisen-Schwefel-Cluster enthält, am Elektronentransfer beteiligt. Die Elektronen werden von NAD(P)H über die Reduktase und das Ferredoxin auf das Cytochrom übertragen, welches den Substratumsatz ausführt. Alle drei Komponenten des bakteriellen Systems

1 Einleitung

sind löslich. Im Vergleich dazu liegt im eukaryontischen System nur das Ferredoxin in der Matrix löslich vor. Während die Reduktase über ionische Wechselwirkungen an die Membran assoziiert ist, liegt das Cytochrom P450 membran-integriert vor. Beide Proteine sind an der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert (Gunsalus & Sligar, 1978; Lambeth, 1991; Bernhardt, 1996, 2006). Dieses System ist für die Biosynthese von Steroiden, Vitamin D und Gallensäuren verantwortlich, welche sich alle vom Cholesterol ableiten (Ruckpaul, 1990).

Die zweite große Klasse umfasst die mikrosomalen P450 Systeme, deren Komponenten, die FAD- und FMN-haltige Reduktase und das Cytochrom P450, membran-integriert vorliegen. Beide Proteine sind auf der cytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Der Elektronentransfer erfolgt in diesem System von NAD(P)H über die Reduktase zu diversen Cytochrom P450 Isozymen.

Die Steroidhormon-Biosynthese erfolgt hauptsächlich in den Gonaden und in der Nebenniere (adrenaler Cortex), die aus der Zona glomerulosa, Zona fasciculata und der Zona reticularis besteht (Young *et al.*, 2003). Die Synthese der Glucocorticoide erfolgt in der Zona fasciculata (Malee & Mellon, 1991; Erdmann *et al.*, 1995a,b; White, 2001; Young *et al.*, 2003), während die Mineralocorticoide in der Zona glomerulosa (Malee & Mellon, 1991) und die Sexualhormone in der Zona reticularis synthetisiert werden (Young *et al.*, 2003).

Die Steroidhormone Cortisol, Aldosteron und Androstendion werden in mehreren Schritten gebildet, an denen fünf Cytochrome beteiligt sind: CYP11A1 (Cytochrom P450_{sc}), CYP11B1 (Cytochrom P450_{11β}), CYP11B2 (Cytochrom P450_{aldo}), CYP17 (Cytochrom P450_{17a}) und CYP21A1 (Cytochrom P450_{c21}).

Die Abspaltung der Seitenkette am Cholesterol durch CYP11A1 und die damit einhergehende Bildung des Pregnenolons ist der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Synthese der Steroidhormone (Lambeth, 1991).

Die Abbildung 1.4 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Synthesewege der Steroidhormone.

1 Einleitung

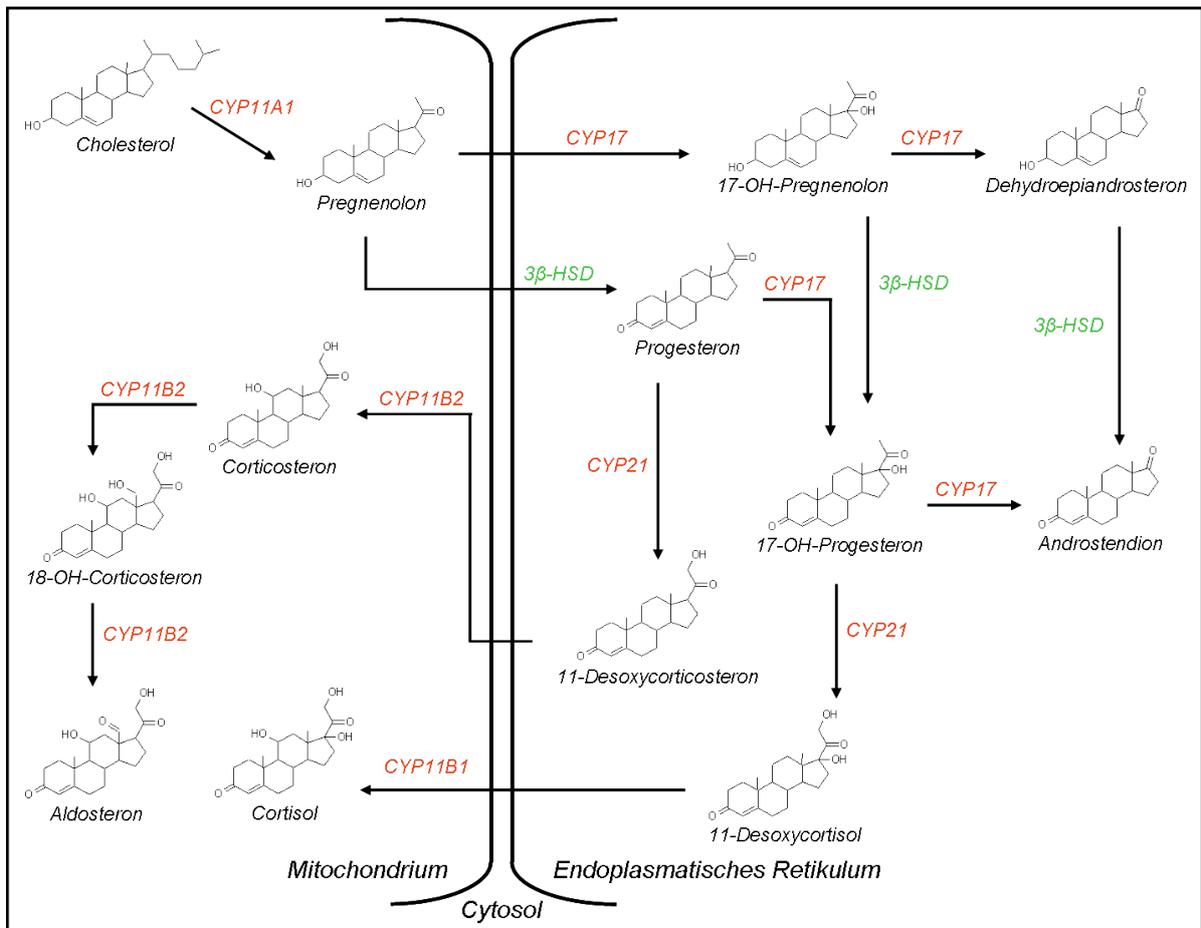


Abbildung 1.4: Die Steroidhormon-Biosynthese im adrenalen Cortex. Abgebildet sind die Reaktionen, die vom Cholesterin beginnend zu den Produkten Cortisol, Aldosteron und Androstendion führen. Außerdem sind die an der Synthese beteiligten Cytochrome P450 und die 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β-HSD) abgebildet. Die Cytochrome sind rot, die 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase grün beschriftet.

Bereits 1968 wurde ein Katalysemechanismus für die Reaktion der Cytochrome P450 vorgeschlagen, welcher im Laufe der Zeit immer wieder aktualisiert wurde und nun allgemein anerkannt ist. In Abbildung 1.5 sind die einzelnen Schritte dargestellt. Cytochrom P450 Enzyme sind Ein-Elektron-Überträger (Peterson *et al.*, 1977), so dass in einigen Zwischenstufen des Mechanismus Radikale involviert sind (Ortiz de Montellano, 1989; White, 1991). Der erste Schritt im Zyklus umfasst die Bindung des Substrats (RH) an das aktive Zentrum, welches zunächst im *low-spin*-Zustand vorliegt (1). Diese Bindung führt zur konformationellen Änderung des Proteins, die nicht nur Auswirkung auf den Spin-shift, sondern auch auf das Redox-Potential hat (Ruckpaul, 1993; Bernhardt, 1996). Die Bindung des Substrates führt zur Verdrängung des Wassermoleküls und somit auch

1 Einleitung

zu einer Spin-Umkehr des Häm-Eisens, welches nun im *high-spin*-Zustand vorliegt (2). Der Komplex besitzt ein positiveres Reduktionspotential, so dass die Reduktion zur Ferri-Form des Eisens erleichtert wird (3) (Sligar, 1976). Im folgenden Schritt wird molekularer Sauerstoff gebunden (4), welches zur Bildung des Sauerstoff-P450-Komplexes führt. Diese Form stellt ein relativ instabiles Zwischenprodukt dar. Die Reduktion durch das zweite Elektron führt im nächsten Schritt zu einer Peroxo-Ferric-Zwischenstufe (5). Da das Cytochrom P450 ein Ein-Elektron-Überträger ist, findet die Aktivierung des Sauerstoffs in zwei Schritten statt (Peterson *et al.*, 1977). Die erste Protonierung führt zur Hydroperoxo-Ferric-Zwischenstufe (6), während die zweite die Spaltung des molekularen Sauerstoffs initiiert und damit die Bildung des nächsten Intermediates (7) und Wasser. Der letzte Schritt im Zyklus beinhaltet die Übertragung eines Sauerstoffatoms auf das Substrat und die Freisetzung des hydroxylierten Produkts (8) (Denisov *et al.*, 2005).

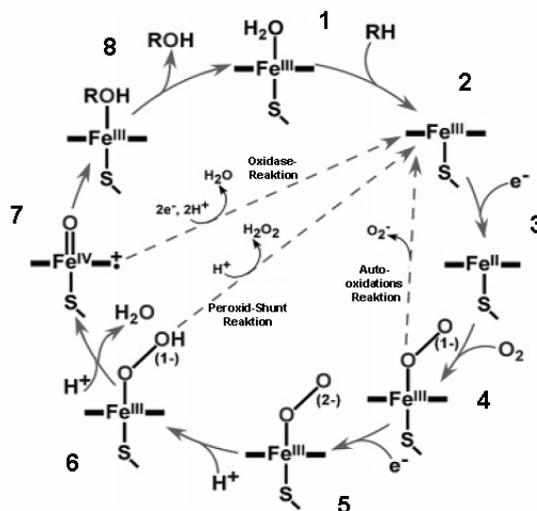


Abbildung 1.5: Katalytischer Zyklus des Cytochrom P450 nach Denisov (Denisov *et al.*, 2005).

Neben dem eigentlichen Zyklus sind drei Nebenreaktionen möglich, die verstärkt unter physiologischen Bedingungen auftreten können und zum Abbruch der Hydroxylierung führen (Bernhardt, 1996; Denisov *et al.*, 2005; Bernhardt, 2006). Die Autooxidation (i) des Oxy-Ferro-Enzyms und gleichzeitige Bildung des Superoxid-Anions führen dazu, dass das Enzym in Zustand (2) zurückfällt. Bei der Peroxid-Nebenreaktion (ii) dissoziieren das koordinierte Peroxid (5) bzw. das Hydroperoxid-Anion (6) vom Eisen und bilden Wasserstoffperoxid. Die letzte mögliche Abbruchreaktion ist die Oxidase-Reaktion (iii).

1 Einleitung

Hier wird das Ferri-Oxo-Intermediat zu Wasser oxidiert. Dabei wird molekularer Sauerstoff durch insgesamt vier Elektronen zu zwei Molekülen Wasser reduziert, wodurch die Oxygenierung des Substrates entfällt (Denisov *et al.*, 2005; Bernhardt, 2006). Diese Art von Prozessen werden oft zusammenfassend als Entkopplung (*Uncoupling*) bezeichnet (Denisov *et al.*, 2005). Bei Abwesenheit eines geeigneten Substrates können einige reduzierte Formen der Cytochrome P450 reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden. Diese Reaktionen finden sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* statt und führen in Säugern zur Induktion der Apoptose (Nordblom *et al.*, 1976; Nordblom & Coon, 1977; Hanukoglu *et al.*, 1993; Derouet-Hümbert *et al.*, 2005).

Die erste Komponente in der Elektronentransferkette stellen die Reduktasen dar, die im Folgenden näher beschrieben werden.

1.2 Ferredoxin-NADPH Reduktasen

1.2.1 Allgemeines

Ferredoxin-NADPH Oxidoreduktasen (FNR) sind Flavoenzyme, die als prosthetische Gruppe ein FAD tragen. Sie katalysieren die Elektronenübertragung vom NADPH zu diversen Ferredoxinen, die in einer Vielzahl von metabolischen Prozessen involviert sind. Zu diesen zählen unter anderem die Photosynthese, Steroidhormon-Biosynthese, Stickstoff-Fixierung, Isoprenoid-Biosynthese und Eisen-Schwefel-Biogenese (Carrillo & Ceccarelli, 2003; Ceccarelli *et al.*, 2004; Medina & Gómez-Moreno, 2004; Seeber *et al.*, 2005; Röhrich *et al.*, 2005).

Die FNRs können in die 2 phylogenetischen Familien der Pflanzen-Typ-FNR und der Glutathion-Reduktase-Typ-FNR (GR-Typ) eingeordnet werden. Die zweite Gruppe lässt sich weiterhin in die AdR-ähnliche- und in die Oxygenase-gekoppelte-NADH-Ferredoxin-Reduktase-Typ-FNR (ONFR) Gruppe unterteilen.

Beide FNR-Familien weisen eine 2-Domänen Struktur auf. Das aktive Zentrum ist immer zwischen der NADPH-Bindedomäne und der FAD-Domäne lokalisiert. Dym und Eisenberg identifizierten insgesamt vier generelle Faltungstrukturen, die in Abbildung 1.6 dargestellt sind (Dym & Eisenberg, 2001).

1 Einleitung

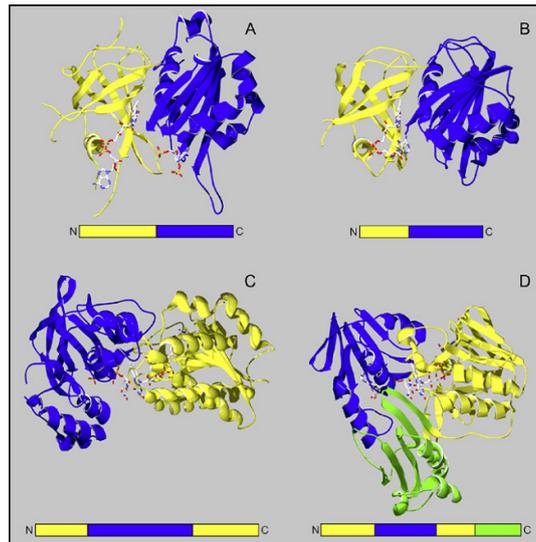


Abbildung 1.6: Dreidimensionale Struktur und Domänenaufbau des (A) Pflanzen-Typs, (B) bakteriellen-Typs, (C) des AdR-ähnlichen und (D) des Oxygenase-gekoppelte-NADH-Ferredoxin-Reduktase-Typs (ONFR). Unter jeder β -Faltblatt-Struktur ist die Polypeptidketten-Verteilung der FAD- (gelb) und NADPH-Domänen (blau) wiedergegeben. Die C-terminale Domäne der Biphenyl-Dioxygenase ist in grün dargestellt. Abbildung aus (Aliverti *et al.*, 2008).

Die Struktur der Adrenodoxin-Reduktase, die in der vorherigen Abbildung unter (C) vorgestellt wurde, wird im Folgenden genauer erläutert.

1.2.2 Adrenodoxin-Reduktase

Die bovine Adrenodoxin-Reduktase (AdR), welche 1966 entdeckt wurde (Omura *et al.*, 1966; Nakamura *et al.*, 1966), ist die erste Komponente im mitochondrialen Cytochrom P450 System. Sie ist in der inneren mitochondriellen Membran lokalisiert und über elektrostatische Wechselwirkungen an die Membran assoziiert (Hanukoglu, 1992; Ishimura & Fujita, 1997). Die NADPH-abhängige Reduktase ist ein 51 kDa Protein, besteht aus insgesamt 460 Aminosäuren und trägt ein FAD als prosthetische Gruppe (Sagara *et al.*, 1987; Ziegler *et al.*, 1999). Sie erhält die Elektronen von NADPH und überträgt diese einzeln auf das Adrenodoxin, welches diese wiederum auf eines der sechs mitochondrialen Cytochrome P450 übertägt, mit denen es wechselwirken kann (Hanukoglu, 1992).

Ziegler und Mitarbeiter bestimmten 1998 die Kristallstruktur der AdR (Ziegler *et al.*, 1999). Das Protein kann in zwei Domänen eingeteilt werden. Abbildung 1.7 zeigt in blau dargestellt die NADPH-Domäne, während die FAD-Domäne in rot dargestellt ist. Beide

1 Einleitung

Domänen sind in ihrem Aufbau ähnlich. Jeweils in ihrem Zentrum liegen parallele β -Faltblätter, die von α -Helices umgeben sind (Ziegler *et al.*, 1999). Die NADPH-Domäne enthält zusätzlich ein dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt (Ziegler *et al.*, 1999).

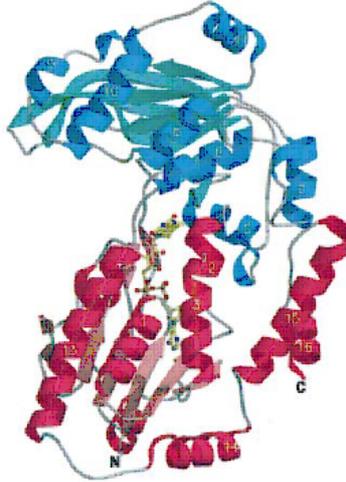


Abbildung 1.7: Struktur der Adrenodoxin Reduktase (Ziegler *et al.*, 1999). Die FAD-Domäne ist in rot, die NADPH-Domäne in blau dargestellt. FAD ist gelb als Kugel-Stab-Modell dargestellt.

Die größere FAD-Domäne bindet das FAD durch die parallelen β -Faltblätter im Bereich des C-Terminus, in der sogenannten Rossmann-Faltung ein (Schulz, 1992). Der Isoalloxazin-Ring weist in Richtung der NADPH-Domäne, während der Adenin-Anteil in der Domäne eingegraben vorliegt. Die Ribose ist am Carboxy-Ende des β -Stranges an Glu38 gebunden, wie es üblicherweise bei Dinukleotiden beobachtet wird (Schulz, 1992).

Die Ladungsverteilung auf der Oberfläche der AdR ist strikt getrennt. Die Spalte zwischen der FAD- und NADPH-Domäne ist nahezu vollständig mit basischen Aminosäuren besetzt, während die Rückseite des Proteins hauptsächlich aus sauren Aminosäuren besteht (Ziegler *et al.*, 1999). Die Wechselwirkung zum Ferredoxin Adx findet über die basischen Aminosäuren zur negativ geladenen Seite des Adx, nahe am Eisen-Schwefel-Cluster statt (Müller *et al.*, 1998).

Dabei spielen, wie durch Mutageneseexperimente bestimmt werden konnte, die in der Spalte zwischen beiden Domänen des AdR lokalisierten basischen Reste Arg240 und Arg244, eine entscheidende Rolle in der Wechselwirkung zum Adx (Coghlan & Vickery, 1991, 1992; Vickery, 1997).

Die Bedeutung des Ferredoxins Adx als Interaktionspartner der AdR wird im Folgenden beschrieben.

1.3 Ferredoxine

Ferredoxine sind ubiquitäre Eisen-Schwefel-Proteine. In Vertebraten wurden sie in den Nebennieren (Suzuki & Kimura, 1965), im Gehirn (Oftebro *et al.*, 1979), der Plazenta (Coghlan *et al.*, 1988), den Gonaden (Kimura, 1968) und in geringen Mengen in der Leber nachgewiesen (Atsuta & Okuda, 1978; Oftebro *et al.*, 1981; Waki *et al.*, 1986).

Proteine, die ein Eisen-Schwefel-Cluster im aktiven Zentrum beinhalten, wurden 1960 durch Elektronenspinresonanz (EPR) Messungen zum ersten Mal in mitochondrialen Membranen nachgewiesen (Beinert & Sands, 1960). Kurze Zeit später wurden die ersten Ferredoxine isoliert (Mortenson *et al.*, 1962; Tagawa & Arnon, 1962; Malkin & Rabinowitz, 1966).

Im Laufe der Jahre wurden diverse Methoden entwickelt und verfeinert, um mit deren Hilfe sowohl ihre strukturellen, als auch chemischen und magnetischen Eigenschaften zu bestimmen (Beinert *et al.*, 1997, 2004). Während die meisten Eisen-Schwefel-Proteine ein bis vier Eisen-Atome enthalten, konnten auch Proteine mit bis zu acht Eisen-Atomen identifiziert werden (Rees, 2002). Eisen-Schwefel-Cluster sind bevorzugt über Thiolat-Gruppen im Protein ligiert, so dass sie überwiegend an Cysteine gebunden sind, aber auch Bindungen an Histidin, Serin oder Arginin konnten nachgewiesen werden (Moulis *et al.*, 1996). Alle zum jetzigen Zeitpunkt bekannten Eisen-Schwefel-Proteine besitzen ein Molekulargewicht zwischen 6 und 500 kDa und können bis zu neun Eisen-Schwefel-Cluster enthalten (Sazanov & Hinchliffe, 2006).

Eisen-Schwefel-Proteine werden üblicherweise an Hand der im Protein enthaltenden Eisenatome und der stark variierenden Redoxpotentiale unterteilt. Die Unterteilung erfolgt in insgesamt fünf Gruppen: Rubredoxine [1Fe], Ferredoxine ([2Fe-2S],[3Fe-4S] oder [4Fe-4S]-Typ), Rieske-Typ-[2Fe-2S], HiPIP's (High Potential Iron Proteins) und Ferredoxine, die einen komplexen Eisen-Schwefel-Aufbau aufweisen.

Die Besonderheit des Rubredoxins ist das Vorkommen eines einzelnen Eisenatoms ohne anorganisches Sulfid, das durch vier Cysteine ligiert im Protein vorliegt. Sein Redoxpotential liegt im Bereich zwischen -100 und +200 mV.

Rieske-Typ-[2Fe-2S]-Proteine haben gemeinsam, dass sie alle aus ca. 120 Aminosäuren

1 Einleitung

gebildet werden und in ihrer Grundstruktur generell drei übereinander angeordnete β -Faltblätter aufweisen. Das oberste Faltblatt bildet zwei Schleifen aus, in die der [2Fe-2S]-Cluster eingebunden wird. Beide Schleifen enthalten je ein Cystein und ein Histidin, die erheblich zur Stabilität des Proteins beitragen (Iwata *et al.*, 1996; Link, 2001; Meyer, 2008). Rieske-Typ-Proteine besitzen im Vergleich zu den Pflanzen-Typ- und Vertebraten-Typ-Ferredoxinen höhere Redoxpotentiale, die zwischen +100 bis +400 mV liegen und aus der Ligation der Cluster an Histidine resultieren (Meyer, 2008).

HiPIP's (High Potential [4Fe-4S] Iron Proteins) sind kleine, aus etwa 55 bis 85 Aminosäuren bestehende Ferredoxine, die überwiegend aus Bakterien isoliert wurden (Bartsch, 1978). Auch bei diesen wird der Eisen-Schwefel-Cluster, wie in fast allen Fällen, von vier Cysteinen gebunden. Aufgrund der hohen Redoxpotentiale, die im Bereich zwischen +100 mV und +400 mV liegen, erhielt dieser Typ seinen Namen.

Komplexe Eisen-Schwefel-Proteine können mehrere gleiche oder unterschiedliche Eisen-Schwefel-Cluster enthalten, sowie diverse weitere prosthetische Gruppen (Sazanov & Hinchliffe, 2006; Meyer, 2008).

Die Gruppe der Ferredoxine umfasst Proteine, die die unterschiedlichen Clusterzusammensetzungen [2Fe-2S]-, [3Fe-4S]- und [4Fe-4S]-Cluster enthalten. Die Redoxpotentiale liegen für die [2Fe-2S]-Cluster im Bereich von -233 mV bis -455 mV (Bezkorovainy, 1980), für die [3Fe-4S]-Cluster bei etwa -130 mV (Bruschi & Guerlesquin, 1988) und für die [4Fe-4S]-Cluster bei -250 bis -652 mV (Bruschi & Guerlesquin, 1988).

Da das [2Fe-2S]-Ferredoxin Adx von großer Bedeutung für die Steroidhormon-Biosynthese ist, werden diese Ferredoxine im Folgenden näher beschrieben.

1.3.1 [2Fe-2S]-Pflanzen- und Vertebrate-Typ-Ferredoxine

Die Gruppe der [2Fe-2S]-Ferredoxine kommt in Bakterien, Tieren und Pflanzen vor. Pflanzen-Typ-Ferredoxine sind für den Elektronentransport zwischen dem Photosystem I und diversen anderen Enzymen verantwortlich (Tagawa & Arnon, 1962; Tsukihara *et al.*, 1981). Vertebraten-Typ (z.B. Adrenodoxin) und bakterielle Ferredoxine (z.B. Putidaredoxin - Pdx) liefern Elektronen für diverse Cytochrome P450 (Grinberg *et al.*, 2000). Putidaredoxin überträgt hierbei Elektronen auf das CYP101, während Adrenodoxin Cy-

1 Einleitung

tochrome, die u.a. für die Steroidhormon-Biosynthese verantwortlich sind, bedient. Die Redoxpotentiale der Pflanzen-Typ-Ferredoxine sind mit -325 bis -425 mV niedriger als die der Vertebrate-Typ-Ferredoxine, deren Redoxpotentiale im Bereich zwischen -235 bis -273 mV liegen (Hurley *et al.*, 1997; Grinberg *et al.*, 2000). Beide Ferredoxin-Typen sind globuläre Proteine, in denen der Cluster in der Nähe der Oberfläche lokalisiert ist und von einem Teil der Polypeptidkette eingebunden wird, der drei bis vier Cysteine enthält (Frolow *et al.*, 1996; Morales *et al.*, 1999; Grinberg *et al.*, 2000; Zanetti G, 2001; Kakuta *et al.*, 2001). Diese Ferredoxine sind Ein-Elektron-Überträger, die von den jeweiligen Reduktasen zu den Cytochromen Elektronen übertragen, um die Hydroxylierung der Substrate durch die Cytochrome P450 zu ermöglichen (Orme-Johnson & Beinert, 1969).

1.3.2 Adrenodoxin

Adrenodoxin (Adx) gehört der Familie der [2Fe-2S]-Ferredoxine an. Die Vorstufe des Adx wird im Cytoplasma der Zellen des adrenalen Cortex synthetisiert und anschließend post-translational in die Mitochondrien transportiert. Als lösliches Protein liegt es dort in der Matrix vor (Usanov *et al.*, 1990; Lambeth, 1991; Bernhardt, 1996). Matures Adx besteht aus insgesamt 128 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 14,4 kDa (Grinberg *et al.*, 2000). Adrenodoxin nimmt eine essentielle Rolle in der Steroidhormon-Biosynthese ein, da es die Elektronen von der Adrenodoxin-Reduktase (AdR) zu diversen Cytochrom P450-Enzymen überträgt (Usanov *et al.*, 1990; Lambeth, 1991; Bernhardt, 1996).

Bisher sind zwei Kristallstrukturen des Adx bekannt. 1998 gelang die Kristallisation der verkürzten Form Adx(4-108) (Müller *et al.*, 1998). Durch die Entfernung der Aminosäuren 1-3 und 109-128 wurde eine Mutante des Adx erhalten, die nicht nur stabiler war (Uhlmann *et al.*, 1994), sondern durch die Abtrennung des flexiblen C-terminalen Endes auch eine homogene Kristallisation ermöglichte. Kristallisationsversuche mit dem Adx Wildtyp (AdxWT) waren 2000 erfolgreich (Pikuleva *et al.*, 2000).

Die Sekundärstrukturanalyse des Adx(4-108) ergab, dass das Ferredoxin aus 22 % β -Faltblatt, zu 17% aus α -Helices und zu 6 % aus 3_{10} -Helices besteht (Müller *et al.*, 1998). In Abbildung 1.8 ist die molekulare Struktur des Adx(4-108) dargestellt.

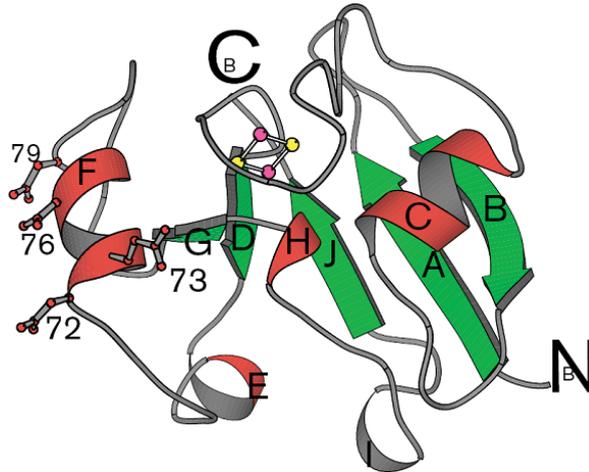


Abbildung 1.8: Molekulare Struktur des Adx(4-108) (Müller *et al.*, 1998). Der [2Fe-2S]-Cluster und die für die Wechselwirkung zum AdR und CYP11A1 relevanten Aminosäuren 72, 73, 76 und 79 sind als Kugel-Stab-Modell dargestellt. Die α -Helices sind rot, die β -Faltblätter sind grün dargestellt und mit Großbuchstaben gekennzeichnet.

Adx(4-108) besteht aus zwei strukturellen Domänen, welche essentiell für dessen Funktion sind. Die sogenannte Interaktionsdomäne, die aus den Resten His56 bis Leu90 besteht, bildet eine Haarnadelschleife aus, die eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung mit der AdR und CYP11A1 einnimmt (Müller *et al.*, 1998). Die sogenannte Kerndomäne enthält die Reste Asp5 bis Cys55 und Gly91 bis Pro108, in der sich auch der Eisen-Schwefel-Cluster befindet. Dieser wird von den Resten Leu30, Phe43 bis Thr54, Met77, Cys92, Gln93 und Ile94 umgeben, die dessen Zugänglichkeit nicht beeinträchtigen (Müller *et al.*, 1998). Die Aminosäuren Cys46, Cys52, Cys55 und Cys92 sind an der Bindung des Clusters beteiligt. Sie sind in einer Ebene angeordnet und stehen senkrecht zur Ebene des Eisen-Schwefel-Clusters. Die beiden Eisenatome Fe1 und Fe2 sind im Schnittpunkt beider Ebenen lokalisiert. Das Fe1 scheint im Vergleich zum Fe2 bezüglich der Reaktivität begünstigt, da es näher an der Proteinoberfläche liegt (Dugad *et al.*, 1990; Stephens *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 1998) und dessen Umgebung viel polarer ist, als die des Fe2 (Bertrand & Gayda, 1979). Darüber hinaus zeigten Versuche, dass die Wahrscheinlichkeit reduziert zu werden für das Fe1 höher liegt (Dugad *et al.*, 1990). Die Bindung zwischen den Cysteinen und dem Eisen-Schwefel-Cluster werden durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert, dargestellt in Abbildung 1.9 (Müller *et al.*, 1998).

1 Einleitung

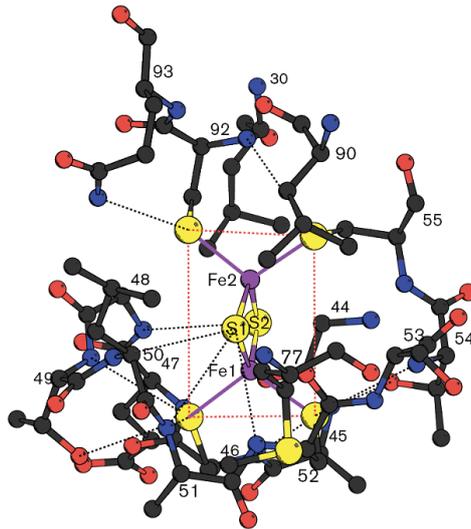


Abbildung 1.9: Ansicht der [2Fe-2S]-Region des Adx(4-108) (Müller *et al.*, 1998). Die $S\gamma$ -Atome der Cysteine 46, 52, 55 und 95 bilden eine Ebene, die durch rot gepunktete Linien symbolisiert wird. Die Ebene, die durch die zwei 2Fe- und 2S-Atome gebildet wird, steht senkrecht zu dieser. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind durch rote, gepunktete Linien dargestellt. Die Atome sind als Kugel-Stab-Modell abgebildet.

Wie wichtig Wasserstoffbrückenbindungen und die Ausbildung von Salzbrücken für die Stabilität eines Proteins sind, konnte durch Mutationen oder Deletionen gezeigt werden (Grinberg *et al.*, 2000). Diese Untersuchungen ergaben, dass die C-terminale Aminosäure Pro108 in Adx(4-108) eine wichtige Rolle bei der korrekten Faltung des Proteins und bei dem damit verbundenen richtigen Einbau der prosthetischen Gruppe spielt (Uhlmann *et al.*, 1994; Grinberg & Bernhardt, 1998). Die Wasserstoffbrückenbindung zum Arg14, sowie die hydrophobe Wechselwirkung zu Ile58, His56 und Tyr82 tragen zur Stabilität des Adx bei (Pikuleva *et al.*, 2000).

Die Aminosäure Thr54 trägt zur Stabilisierung des Clusters bei, indem sie eine Wasserstoffbrückenbindung zum Clusterliganden Cys52 ausbildet (Uhlmann & Bernhardt, 1995; Burova *et al.*, 1996). Auch Thr49 spielt eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der Wasserstoffbrückenbildung des [2Fe-2S]-Clusters. Die Deletion dieser Aminosäure führte zu einer dramatischen Reduzierung der Affinität des Adx zu seinen Redoxpartnern (Hannemann *et al.*, 2001). Weiterhin ist His56 wichtig für die Stabilität des Proteins und wird seinerseits durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Tyr82 und Ser88 stabilisiert. (Beckert *et al.*, 1994; Burova *et al.*, 1996).

Adx fungiert im adrenalen Cortex als Shuttle zwischen AdR und den Cytochrom P450

Enzymen. Im Folgenden wird auf die Interaktion dieses Proteins mit seinen Redoxpartnern näher eingegangen, insbesondere zwischen den Komponenten des ersten und wichtigsten Schrittes der mitochondrialen Steroidhormon-Biosynthese.

1.4 Interaktion des Adx mit AdR und CYP11A1

Adrenodoxin überträgt Elektronen vom durch NADPH reduzierten AdR auf das Cytochrom CYP11A1, welches dann über drei Hydroxylierungsschritte die Seitenkettenabspaltung des Cholesterols zu Pregnenolon katalysiert. Auf welche Art und Weise diese Elektronenübertragung im Einzelnen funktioniert, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Allerdings wurden bisher fünf Theorien postuliert.

Im ersten, von Lambeth vorgeschlagenen, Modell wird der Zyklus durch die Reduktion des AdR durch NADPH gestartet, welches einen Komplex mit oxidiertem Adx eingeht. Der Elektronentransfer überführt Adx in den reduzierten Zustand und der Komplex dissoziiert. Das zweite Elektron wird auf ein weiteres Adx übertragen. Das reduzierte Adx lagert sich an ein Cytochrom an, reduziert dieses und dissoziiert anschließend. Nach einem weiteren Elektronentransfer durch das zweite Adx endet der Zyklus.

Neben dem ersten Modell, in dem nur ein oxidiertes Adx beteiligt ist, wurde ein weiteres Modell postuliert, das von einem Adx-Dimer statt einem Monomer ausgeht. Nach der Reduktion des zweiten Adx dissoziieren beide Proteine von der AdR ab (Lambeth *et al.*, 1979). Das dritte Modell von Kido und Kimura beinhaltet zusätzlich ein Cytochrom. Postuliert wurde ein ternärer Komplex bestehend aus AdR, Adx und Cytochrom im Verhältnis 1:1:1 (Kido & Kimura, 1979). Das 1989 postulierte Modell von Hara und Kimura beinhaltet zusätzlich zum vorhergehenden Modell ein weiteres Adx, so dass oxidiertes und reduziertes Adx an einem quarternären Komplex 1:2:1 beteiligt sein könnten (Hara & Kimura, 1989a,b). Untersuchungen ergaben allerdings, dass Adx nach seiner Reduktion eine Konformationsänderung durchläuft. Auch konnte nachgewiesen werden, dass das Adx mit dem Cytochrom P450 ein Komplex im Verhältnis 1:1 eingeht (Takeuchi *et al.*, 2001). Das fünfte Modell stammt von Beilke *et al.* (Beilke *et al.*, 2002). Der Mechanismus beginnt durch die Übertragung von zwei Elektronen vom NADPH auf AdR. Das Adx-Dimer, welches im oxidierten Zustand vorliegt, lagert sich an die AdR

1 Einleitung

an. Allerdings interagiert nur Adx(1) direkt mit der AdR. Das erste Elektron wird auf Adx(1) übertragen, welches dieses auf das zweite gebundene Adx(2) überträgt, das in keinem direkten Kontakt zu AdR steht (Pikuleva *et al.*, 2000). Adx(2) dissoziiert durch die, durch die Reduktion ausgelöste, Konformationsänderung in der C-terminalen Region ab. Anschließend wird auch Adx(1) reduziert und dissoziiert ab. Im nächsten Schritt werden beide Elektronen nacheinander auf das Cytochrom P450 übertragen und die oxidierten Adx-Formen bilden erneut ein Dimer aus (Beilke *et al.*, 2002).

In den letzten zwei Jahrzehnten konnten durch *cross-link*-Versuche, chemische Modifizierung und ortsgerichtete Mutagenese Informationen über einzelne Aminosäuren erhalten werden, die eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen den Reaktionspartnern spielen (Vickery, 1997). Bereits 1991 wurde durch ortsgerichtete Mutagenese nachgewiesen, dass die Aminosäuren Asp76 und Asp79 an der elektrostatischen Interaktion sowohl zur Reduktase als auch zum Cytochrom P450 beteiligt sein müssen (Coghlan & Vickery, 1991; Vickery, 1997). Verantwortlich für die Interaktion zwischen Adx und Cytochrom P450 sind zusätzlich Asp72 und Glu73 (Coghlan & Vickery, 1991). Aufgrund der Tatsache, dass die Aminosäuren Asp76 und Asp79 des Adx an der Wechselwirkung zu beiden Reaktionspartnern beteiligt sind, kann man den vorgeschlagenen ternären und quarternären Komplex des AdR, Adx und Cytochroms ausschliessen (Kido & Kimura, 1979; Usanov *et al.*, 1985; Hara & Kimura, 1989a). Aber noch wichtiger ist, dass das Adx als Shuttle zwischen AdR und Cytochrom P450 fungiert und somit den Modellen von Lambeth bzw. Beilke sehr nahe kommt (Lambeth *et al.*, 1982; Beilke *et al.*, 2002).

Einen Einblick in die atomaren Wechselwirkungen zwischen der AdR und Adx wurde nach der Kristallisation des *cross-link*-Komplexes möglich (Müller *et al.*, 2001). Diese Untersuchungen ergaben zwei Interaktionsbereiche. Der primäre Interaktionsbereich umfasst die Argininreste 211, 240 und 244 der NADPH-Domäne der AdR, welche mit den Resten Asp72, Asp76 und Asp79 der Interaktions-Domäne (His56-Leu90) des Adx wechselwirken (Müller *et al.*, 1998).

Der sekundäre Interaktionsbereich beinhaltet die Reste Asp39 und Asp41 der Kern-domäne, in der sich der Eisen-Schwefel-Cluster des Adx befindet (Müller *et al.*, 1998), die mit den Aminosäureresten Lys27 und His28 der FAD-Domäne der AdR in Kontakt stehen.

1 Einleitung

Müller *et al.* beschrieben 2001 die Kristallstruktur des AdR-Adx Komplexes (Müller *et al.*, 2001), der die Aminosäuren 5-117 des Adx und 4-460 der AdR umfasste. Somit konnten auch Informationen über einen Teil der Struktur des C-terminalen Endes des Adx erhalten werden. Es scheint, dass das C-terminale Ende des Adx in die tiefe Spalte zwischen den beiden AdR-Domänen gelangt, wobei die Reste Asp113 bis Asp115 des Adx eine 3_{10} -helikale Konformation einnehmen (Müller *et al.*, 2001).

Während der Reaktion mit seinen Reaktionspartnern ändert sich das Redoxpotential des Adx (Uhlmann & Bernhardt, 1995), wobei es bei der Ausbildung des AdR-Adx-Komplexes von -273 mV auf ca. -360 mV abnimmt (Lambeth *et al.*, 1976, 1979, 1980, 1982; Grinberg *et al.*, 2000). Es kommt zu einer Elektronenübertragung von der AdR auf das Adx. Die resultierende Konformationsänderung des Adx nach dem Elektronentransfer führt zu seiner Dissoziation. Während dieser Reaktion ändert sich das Potential der AdR kaum (-295 mV). Die Komplexbildung mit einem Cytochrom P450 führt zur Potentialverschiebung der Hämgruppe von -284 mV zu -314 mV und auch das Potential des Adx ändert sich auf -291 mV. Nach der Reduktion des Cytochroms erfolgt die Dissoziation des Adx (Grinberg *et al.*, 2000).

Die Interaktionsuntersuchung der AdR und des Adx sind der Hauptgegenstand dieser Arbeit. Bisher konnten die Strukturen einzelner Proteine, sowie der *cross-link*-Komplex zwischen AdR und Adx mittels Röntgenstrukturanalyse erhalten werden. Im Folgenden wird auf die NMR-Spektroskopie eingegangen, insbesondere die paramagnetische NMR, die es ermöglicht, den ca. 65 kDa großen Komplex bestehend aus AdR und Adx in Lösung in seiner nativen Form zu untersuchen.

1.5 NMR-Spektroskopie

Die ersten erfolgreichen NMR-Experimente wurden 1946 unabhängig voneinander von Felix Bloch und Edward Mills Purcell beschrieben. Sie wurden für diese Entwicklung 1952 mit dem Nobelpreis für Physik ausgezeichnet. Mittlerweile stellt diese Methode neben der Röntgenstrukturanalyse die wichtigste Methode zur Bestimmung von Strukturen dar. Für die Untersuchung von Biomakromolekülen bietet die NMR-Spektroskopie den

großen Vorteil, dass die Strukturbestimmung der Proteine in Lösung erfolgen kann. Die erhaltene Struktur kommt daher der nativen Struktur der untersuchten Proteine am nächsten.

Allerdings wird man bei der klassischen NMR-Spektroskopie von Biomakromolekülen mit zwei Problemen konfrontiert. Zum einen führt die große Zahl der Resonanzen zu ihrer Überlagerung, wodurch die Interpretation der NMR-Spektren kaum möglich ist. Ein weiteres Problem stellt die schnelle Relaxation großer Proteine dar, die zu verbreiterten Resonanzsignalen mit geringer Intensität führt und somit die Strukturbestimmung von Proteinen mit einer Größe von mehr als 25 kDa erschwert (Fernández & Wider, 2003).

1.5.1 2D-NMR-Spektroskopie

In den 1980ern wurde die zweidimensionale NMR-Spektroskopie entwickelt (Kumar *et al.*, 1980) und 1992 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (Ernst, 1992). Sie findet verstärkt Anwendung in der Chemie und Biochemie und ermöglicht es durch Einsatz von stabilen Isotopen, mehr Informationen über die Struktur und Interaktion von Proteinen zu erhalten, als es mit der eindimensionalen NMR-Spektroskopie möglich wäre. Für die Untersuchungen von Proteinen werden vor allem stabile Isotope, die einen Kernspin ungleich Null besitzen, wie z.B. ^{13}C und ^{15}N eingesetzt, die während der Proteinexpression in das Rückgrat des Proteins eingebaut werden.

Bereits der Einsatz von Deuterium verbesserte die Auflösung, wie auch Sensitivität der Protein-NMR (Markley *et al.*, 1968; Crespi *et al.*, 1968; Gardner & Kay, 1998). Folglich fanden auch die Isotope ^{13}C und ^{15}N Anwendung und ermöglichten es, Proteine mit einem Molekulargewicht über 25 kDa unter Einsatz von zweidimensionaler [$^{13}\text{C}, ^1\text{H}$], [$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$] sowie dreidimensionaler NMR [$^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}, ^1\text{H}$] (Kay & Gardner, 1997; Gardner & Kay, 1998) zu analysieren. Die Auflösung konnte so verbessert und die Resonanzüberlagerung vermindert werden (Wagner, 1993). Dennoch blieb trotz partieller Deuterierung und Anreicherung der Proteine mit weiteren Isotopen die Grenze zur Strukturbestimmung bei einer Proteinmasse von 50 kDa bestehen (Kay & Gardner, 1997; Gardner & Kay, 1998).

1.5.2 Transversale Relaxationsoptimierte Spektroskopie

Die Entwicklung der TROSY-Methode (Transversale Relaxationsoptimierte Spektroskopie, *Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy*) (Pervushin *et al.*, 1997) eröffnete in Kombination mit partieller Deuterierung sowie isopen-markierten Proteinen neue Möglichkeiten für die Untersuchung von Proteinen und Proteininteraktionen.

Die transversale Relaxation ist abhängig von der Größe des jeweiligen Proteins. Je größer das Protein, umso schneller relaxiert das NMR-Signal. Man erhält abgeschwächte Resonanzen, die stark verbreitert sind, geringe Intensität aufweisen und teilweise nicht mehr detektierbar sind. Auch wird das Signal-Rausch-Verhältnis verringert, wodurch die Datenauswertung erschwert wird. Die transversale Relaxation konnte jedoch durch Austausch der Amidprotonen durch Deuterium reduziert werden.

Bei der Anwendung der NMR-Spektroskopie bei hohen Magnetfeldern, wie es für Protein-NMR üblich ist, sind für diese schnelle transversale Relaxation hauptsächlich die Dipol-Dipol-Kopplung sowie die Chemische-Verschiebungsanisotropie (*Chemical Shift Anisotropy*, CSA) verantwortlich (Pervushin *et al.*, 1997).

TROSY nutzt bei multidimensionalen NMR-Experimenten die Interferenz dieser zwei Relaxationseffekte und selektiert durch ihre angepasste Pulssequenz das Signal mit der geringsten Linienbreite (Pervushin *et al.*, 1997), bei der sich diese beiden Relaxationsmechanismen gegenseitig auslöschen. Daher erscheinen die drei ansonsten verbreiterten Resonanzsignale nicht mehr im Spektrum (siehe Abbildung 1.10).

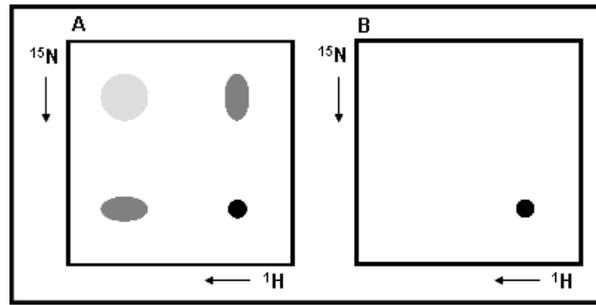


Abbildung 1.10: Transversale Relaxationsoptimierte Spektroskopie (TROSY) in einem zweidimensionalen $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -Spektrum. (A) Theoretisches Multiplett-Muster für das $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -TROSY-Experiment. Die vier Resonanzen entstehen durch ^1H - ^{15}N -Scalar-Kopplung. Sie besitzen unterschiedliche Linienverbreiterung, verursacht durch unterschiedliche transversale Relaxation. (B) Das TROSY-Experiment selektiert durch die angepasste Pulssequenz nur das Resonanzsignal mit der geringsten Linienverbreiterung. Nach (Fiaux *et al.*, 2002).

Das erhaltene scharfe Resonanzsignal mit hoher Intensität entspricht dem der koppelnden Kerne ^1H und ^{15}N mit parallelem Spin. Somit ermöglicht TROSY die Untersuchung auch von weitaus größeren Proteinen (Pervushin *et al.*, 1997).

1.5.3 Paramagnetische NMR-Spektroskopie

Ungepaarte Elektronen induzieren ein zusätzliches Magnetfeld und nehmen somit einen großen Einfluss auf NMR-Spektren. Je nach Charakter des Paramagneten kann der Einfluss in unterschiedlichen Effekten resultieren, so dass entweder Resonanzsignalverschiebungen oder Linienverbreiterungen der Resonanzsignale auftreten können. Diese Effekte können gezielt zur Strukturbestimmung eingesetzt werden.

Mittels der paramagnetischen NMR konnten bisher viele Strukturen ermittelt werden, in denen die Proteine entweder ein paramagnetisches Metall enthielten, oder der Austausch eines diamagnetischen gegen ein paramagnetisches Metall erfolgte (Hus *et al.*, 2000; Allegrozzi *et al.*, 2000; Bertini *et al.*, 2001a; Pintacuda *et al.*, 2003; Hansen & Led, 2004; Gay *et al.*, 2004; Pintacuda *et al.*, 2004a; Bertini *et al.*, 2005). Mit dieser Methode gelang es im Laufe der Zeit, Interaktionsbereiche zwischen Interaktionspartnern wie Cytochrom *f* und Plastocyanin zu untersuchen (Ubbink *et al.*, 1998; Crowley *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2005; Díaz-Moreno *et al.*, 2005). Die Möglichkeit, ein diamagnetisches Metall aus dem aktiven Zentrum gegen ein paramagnetisches auszutauschen,

besteht allerdings nicht für alle Proteine.

Die Entwicklung einer paramagnetischen Sonde eröffnet ganz neue Möglichkeiten zur Untersuchung von Komplexen. Diese Sonden können zum einen gezielt an definierten Positionen auf der Oberfläche des zu untersuchenden Proteins angebracht werden (Prudêncio *et al.*, 2004; Pintacuda *et al.*, 2004b) und zum anderen mit Lanthanoiden versetzt werden, die unterschiedliche Effekte ausüben (Lauffer & Brady, 1985; Arano *et al.*, 1996; Lewis & Shively, 1998 Jan-Feb; Leonov *et al.*, 2005; Tei *et al.*, 2008).

Zu diesen Effekten gehören die Pseudokontaktverschiebung (*Pseudocontact Shift*, PCS) und die Paramagnetische-Relaxationsverstärkung (*Paramagnetic Relaxation Enhancement*, PRE), die im Folgenden näher erläutert werden.

1.5.4 Pseudokontaktverschiebung

Pseudokontaktverschiebungen werden durch paramagnetische Metalle ausgelöst. Das ungepaarte Elektron des Metalls weist eine Anisotropie seiner magnetischen Suszeptibilität auf und beeinflusst Kerne in seiner Umgebung mit einem Kernspin ungleich Null. Die Anwesenheit des Paramagneten führt zu einer veränderten magnetischen Umgebung des Kerns, die eine Verschiebung der Resonanzsignale, sogenannte Pseudokontaktverschiebungen (PCS) zur Folge hat.

Diese PCSs werden verwendet, um weitreichende Distanzinformationen ausgehend vom paramagnetischen Metall zu erhalten (Allegrozzi *et al.*, 2000). Die paramagnetischen Zentren weisen allerdings eine Winkelabhängigkeit auf, die sich durch den magnetischen Suszeptibilitäts-Tensor (X -Tensor) beschreiben lässt. Der X -Tensor beschreibt die Orientierung des paramagnetischen Zentrums zum Kernspin und lässt sich durch seine axiale ($\Delta_{X_{ax}}$) und rhombische ($\Delta_{X_{rh}}$) Komponenten beschreiben. Diese ergeben sich aus den Basiskomponenten X_{xx} , X_{yy} und X_{zz} (Bertini *et al.*, 2005).

$$\Delta_{X_{ax}} = X_{zz} - \frac{X_{xx} + X_{yy}}{2} \quad (1.2)$$

$$\Delta_{X_{rh}} = X_{xx} - X_{yy} \quad (1.3)$$

Seine Orientierung zum Kern wird durch Messungen der PCSs bestimmt, in dem die

1 Einleitung

Differenz zwischen den diamagnetischen und paramagnetischen Resonanzsignalen gebildet wird.

Die Größe der PCSs ist von der Distanz zwischen Kernspin und dem Paramagneten abhängig. Dabei weisen Kernspins geringere PCSs auf, je weiter weg sie sich von dem paramagnetischen Metall befinden und überlappen fast vollständig mit dem Resonanzsignal des diamagnetischen Metalls. Die auftretenden PCSs sind somit größer, je näher sich das paramagnetische Zentrum befindet.

PCSs können mit der folgenden Gleichung beschrieben werden.

$$PCS = \frac{1}{12\pi r^3} [\Delta_{X_{ax}} (3 \cos^2 \Theta - 1) + \frac{3}{2} \Delta_{X_{rh}} (\sin^2 \Theta \cos 2\Omega)] \quad (1.4)$$

In dieser Gleichung beschreiben r , Θ , Ω die Polarkoordinaten des Kerns hinsichtlich der Achsen des X -Tensors. $\Delta_{X_{ax}}$ und $\Delta_{X_{rh}}$ beschreiben die axiale und rhombische Komponente des X -Tensors.

1.5.5 Paramagnetische-Relaxationsverstärkung

Die Wechselwirkung eines Paramagneten mit dem Kern führt aufgrund der dipolaren Interaktion zwischen dem Paramagneten und dem Kern zur Relaxationsverstärkung und hat zur Folge, dass die Intensität des Resonanzsignals abnimmt bzw. vollständig verschwindet. Dabei ist der Effekt des Paramagneten stärker, je näher sich die Kerne befinden. Die gemessene Intensitätsabnahme des Resonanzsignals (I_{para}/I_{dia}) bei Wechselwirkung mit dem Paramagneten kann genutzt werden, um direkte Distanzen zwischen dem Paramagneten und dem einflussnehmenden Kern zu ermitteln. Dabei ist die Paramagnetische-Relaxationsverstärkung proportional zu r^{-6} (r : Distanz zwischen Paramagnet und Kern) (Gleichung 2.6).

Lanthanoide, die paramagnetische Eigenschaften besitzen, werden im Folgenden Abschnitt näher erläutert.

1.5.6 Lanthanoide

Die Gruppe der Lanthanoide umfasst insgesamt 15 Elemente, die zu den inneren Übergangselementen zählen. Die f-Orbitale, dieser auch sogenannten f-Block-Elemente, liegen tief im Innern der Atome, so dass sie nicht an kovalenten Bindungen beteiligt sind.

1 Einleitung

Lanthanoide spielen auch biologisch keine Rolle, z.B. weisen Proteine keine Lanthanoid-Bindestellen auf (Keizers *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2008). Obwohl ihre Eigenschaften, wie z.B. die Koordinationschemie, insgesamt sehr ähnlich sind, befinden sich sowohl Elemente mit paramagnetischem Charakter (Dysprosium (Dy), Terbium (Tb), Holium (Ho), Erbium (Er), Thulium (Tm) und Ytterbium (Yb)), als auch mit diamagnetischem Charakter (Lutetium (Lu) und Lanthan (La)) unter ihnen (Allegrozzi *et al.*, 2000; Bertini *et al.*, 2001b). Dy, Tb, Tm weisen im Gegensatz zu den drei übrigen starke paramagnetische Eigenschaften auf und sind daher von größerem Interesse (Tabelle 1.1). Diese Paramagneten verursachen durch Wechselwirkung mit dem Kernspin Verschiebungen der Resonanzen im Spektrum.

Tabelle 1.1: Lanthanoide mit paramagnetischen Eigenschaften

Paramagnet	J	PSC	PRE	Reichweite (Å)	Referenz
Gd ³⁺	7/2	-	+	20-30	(Vlasie <i>et al.</i> , 2007)
Tb ³⁺	12/2	+	-	15-60	(Feeny <i>et al.</i> , 2001)
Dy ³⁺	15/2	+	-	15-60	(Su <i>et al.</i> , 2006)
Ho ³⁺	16/2	+	-	10-40	(Horrocks & Sipe, 1972)
Er ³⁺	15/2	+	-	10-40	(Pintacuda <i>et al.</i> , 2006)
Tm ³⁺	12/2	+	-	15-60	(Wöhnert <i>et al.</i> , 2003)
Yb ³⁺	12/2	+	-	10-40	(Prudêncio <i>et al.</i> , 2004)

Eine besondere Stellung nimmt Gadolinium (Gd) ein. Es besitzt sieben f-Elektronen mit einer isotropen Ladungsverteilung. Die Besonderheit des Gadoliniums ist es, dass es in Wechselwirkung mit Atomspins von 1/2 keine Verschiebung der Resonanzsignale, sondern eine Linienverbreiterung auslöst.

1.5.7 Lanthanoid-ligierende NMR Sonde-5

Um die Effekte der Lanthanoide gezielt einsetzen zu können, musste ein Chelatkomplex entwickelt werden, in welchen die Lanthanoide eingebunden werden konnten. Diese Komplexe müssen wichtige Voraussetzungen erfüllen. Zum einen sollte ihre Struktur so beschaffen sein, dass keine Isomerisierungen auftreten. Lanthanoide favorisieren eine Koordination von acht bis neun Liganden, die durch die Struktur der Sonde vorgegeben sein sollte. Eine weitere Voraussetzung ist es, dass der Chelatkomplex auf einer definierten

1 Einleitung

Position der Proteinoberfläche angebracht werden muss (Keizers *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2008). Dies kann beispielsweise durch zwei Cysteingruppen realisiert werden. Jedoch ist hier darauf hinzuweisen, dass keine unspezifische Bindung an exponierte Cysteine auf der Proteinoberfläche stattfinden darf. Da die Anwesenheit von Paramagneten zu Linienverbreiterung führt, macht es die ausreichende Entfernung dieser NMR-Sonde zum Interaktionsbereich möglich, weitreichende Distanzinformationen zu erhalten (Keizers *et al.*, 2008).

Das Anbringen der paramagnetischen Sonde durch zwei Disulfidbrücken verringerte zusätzlich dessen Mobilität und lieferte einzelne und größere Resonanzsignale für jede Amidgruppe als sie bis zu diesem Zeitpunkt für artifizielle Sonden erhalten werden konnte (Vlasie *et al.*, 2007; Keizers *et al.*, 2007). Hierzu wurde das Molekül Ln-CLaNP-5 (*Caged Lanthanide NMR Probe-5*, Lanthanoid-ligierende NMR-Sonde-5) entwickelt, welche all diese Bedingungen erfüllt. Die Zweiarm-Bindung an das Protein macht es aufgrund seiner Struktur besonders rigide. Auch unterstützen die zwei gegenüberliegenden Pyridin-*N*-oxide die Rigidität des Ln-CLaNP-5 (Keizers *et al.*, 2007, 2008). In Abbildung 1.11 ist dessen Struktur dargestellt.

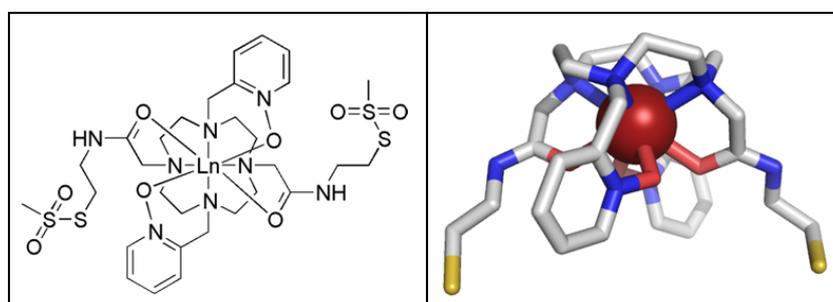


Abbildung 1.11: Strukturformel des Ln-CLaNP-5, sowie dessen dreidimensionale Struktur (Keizers *et al.*, 2007).

Für die Untersuchungen der Interaktion zwischen zwei Proteinen wird das Ln-CLaNP-5 über ein Paar Disulfidbrücken an einen Interaktionspartner gekoppelt (Clöre *et al.*, 2007; Vlasie *et al.*, 2008). Diese Lanthanoid-ligierende Sonde wird mit unterschiedlichen Lanthanoiden versetzt, um wie bereits beschrieben, entweder die Pseudokontaktverschiebungen oder die Paramagnetische-Relaxationsverstärkung messen zu können. Um diese Effekte eindeutig ermitteln zu können, wird ein zweites Experiment mit einer diamagnetischen Referenz durchgeführt. Hierzu stehen die Lanthanoide Luthetium und Lanthan

zur Verfügung. Die erhaltenen PCSs und PREs werden als Einschränkungen für die Docking-Berechnungen eingesetzt.

1.5.8 Änderung der chemischen Verschiebung

Die Interaktion eines Proteins mit einem weiteren Protein, wie z.B. seinem Reaktionspartner, wirkt sich aufgrund der geänderten chemischen Umgebung auf das erhaltene NMR-Spektrum aus. Es kommt zur chemischen Verschiebung der Resonanzen, wobei einige wenige bis hin zu allen Signalen betroffen sein können. Die Verschiebung der Signale erfolgt dabei in unterschiedliche Richtungen mit unterschiedlicher Stärke. Bezeichnet wird dieser Effekt als Änderung der Chemischen Verschiebung (*Chemical Shift Perturbation*, CSP). Die erhaltenen CSPs können auf die Oberfläche des Proteins aufgetragen werden und visualisieren damit den Interaktionsbereich des Proteins (Xu *et al.*, 2006). Hierzu wird zunächst ein [^{15}N , ^1H]-TROSY Spektrum des freien ^{15}N -markierten Proteins aufgenommen. Jede einzelne Resonanz im zweidimensionalen Spektrum entspricht einer Amidgruppe des Proteinrückgrats. Somit sind die erhaltenen Spektren eine Art Fingerabdruck eines Proteins. Um die Information, welche Aminosäuren nun an der Wechselwirkung zum Reaktionspartner beteiligt sind, zu erhalten, wird dem Protein schrittweise der markierte Reaktionspartner hinzutitriert und die chemische Verschiebung der einzelnen Resonanzsignale beobachtet. Der Vergleich der Spektren des in Lösung frei vorliegenden ^{15}N -markierten Proteins mit den Spektren des mit dem Reaktionspartner interagierenden Proteins liefert die Information über den Interaktionsbereich. Im Idealfall kann auf diese Weise der Interaktionsbereich zwischen zwei Reaktionspartnern eindeutig ermittelt werden. Allerdings kann es aufgrund zu starker Konformationsänderungen im gesamten Protein während der Interaktion dazu kommen, dass keine klare Aussage über den Interaktionsbereich gemacht werden kann.

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die erstmalige Untersuchung der Interaktion des AdR-Adx-Komplexes mittels der NMR-Spektroskopie, insbesondere der Transversalen Relaxations-optimierten NMR-Spektroskopie.

1 Einleitung

Um erste Hinweise auf den Interaktionsbereich des Adx in Wechselwirkung mit der AdR zu erhalten, sollten Experimente des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx in Ab- und Anwesenheit der AdR durchgeführt werden. Die dadurch erhaltene Chemische-Verschiebungsänderung (CSP) des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx sollte als Einschränkung für die Docking-Berechnungen verwendet werden.

Zusätzlich sollten weitreichende Distanzinformationen unter Verwendung von paramagnetischen Lanthanoiden erhalten werden. Zu diesem Zweck sollten AdR-Mutanten hergestellt werden, die jeweils ein exponiertes Cysteinpaar an definierten Positionen auf der Proteinoberfläche besitzen. Diese beiden Cysteine sollten genutzt werden, um die NMR-Sonde Ln-CLaNP-5 (*Caged Lanthanide NMR Probe-5*) spezifisch an das Protein zu binden. In diese Sonde sollten sowohl Lutetium, ein diamagnetisches Lanthanoid, welches als Referenz dienen sollte, als auch die paramagnetischen Lanthanoide Thulium und Gadolinium ligiert werden. Die unterschiedlichen Effekte der Pseudokontaktverschiebung (PCS) ausgelöst durch Thulium und die Paramagnetische-Relaxationsverstärkung (PRE), verursacht durch Gadolinium, sollten genutzt werden, um den Interaktionsbereich zwischen beiden Reaktionspartnern zu untersuchen. Dabei sollte die Interaktion zwischen der AdR sowohl mit dem AdxWT als auch mit Adx(4-108), der verkürzten Form des Wildtypen, durchgeführt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit experimentell erhaltenen Daten für CSP, PCS und PRE sollten anschließend im Rahmen einer Kooperation verwendet werden, um die Docking-Berechnungen zwischen der AdR und Adx durchzuführen. Diese Berechnungen wurden von Herrn Dr. Peter H.J. Keizers aus der Gruppe von Herrn Prof. Dr. Marcellus Ubbink durchgeführt.

Dabei musste sichergestellt werden, dass die hergestellten AdR-Mutanten keine strukturellen und funktionalen Unterschiede zum AdRWT aufweisen, die die Untersuchungen der Interaktion stören könnten. Daher sollten diese Mutanten nach ihrer Expression und Reinigung zunächst charakterisiert werden. Die AdR-Mutanten wurden sowohl auf ihre spektroskopischen, als auch kinetischen Eigenschaften hin, in Wechselwirkung mit dem physiologischen Interaktionspartner AdxWT, sowie Adx(4-108), charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammten aus Standardbezugsquellen, sofern sie nicht explizit aufgeführt sind.

2.1.1 Organismen, Vektoren und Oligonukleotide

Das Expressionsplasmid pBAR1607 wurde freundlicherweise von Dr. Sagara (Sagara *et al.*, 1987) zur Verfügung gestellt. Dieses Plasmid enthält die Sequenz für den Wildtyp der bovinen Adrenodoxin-Reduktase (AdRWT). Zur Verfügung standen außerdem die Expressionsplasmide für die AdR-Einfachmutanten pBAR_AdR_C10S, pBAR_AdR_C74S, pBAR_AdR_C145S, pBAR_AdR_C322S und pBAR_AdR_C364S, wie auch der Klonierungsvektor für die AdR-Dreifachmutante pMOS_AdR_C10S/C145S/C364S (Donauer, 2006).

Das Expressionsplasmid pKKHC erhielten wir von Dr. T. Porter, University of Kentucky, Lexington, KY (Porter & Larson, 1991) und die Adrenodoxin Wildtyp (AdxWT) cDNA von Dr. Waterman, Vanderbilt University, Nashville, TN. Die Klonierungsarbeiten des AdxWT in pKKHC wurden in unserem Institut durchgeführt. Die Expressionen und Reinigungen des AdxWT und des Adx(4-108), wie auch der deuterierten und ^{15}N -markierten Formen $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT und $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) wurden freundlicherweise von Herrn Wolfgang Reinle in unserem Institut durchgeführt.

Für die heterologe Expression des CYP11A1 wurde das Plasmid pTrc99A-bSCCMc (Wada *et al.*, 1991) verwendet, welches unserem Institut von Dr. Waterman zur Verfügung gestellt wurde. Die Expression und Reinigung erfolgte nach Janocha *et al.* (in Vorbereitung).

2 Material und Methoden

E. coli Stämme

Tabelle 2.1: Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
TOP10F'	$F' lacI^q$ Tn10(Tet_R) <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\theta 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139$ $\Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG$	Invitrogen
JM109	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> $(r_k^- m_k^+)$ <i>relA1 supE44</i> $\Delta(lac-proAB)$ [F', <i>traD36 proAB, lacI^qZ\Delta M15</i>]	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985) Promega
JM109(DE3)	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> $(r_k^- m_k^+)$ <i>relA1 supE44</i> $\lambda-$ $\Delta(lac-proAB)$ [F' <i>traD36 proAB lacI^qZ\Delta M15</i>] IDE3	(Studier & Moffatt, 1986)
C43(DE3)	$F^- ompT gal hsdS_B (r_B^- m_B^-)$ <i>dcm Ion</i> $\lambda(DE3)$	(Miroux & Walker, 1996)

Plasmide

Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide

Plasmid	kb	Verwendungszweck	Resistenz	Referenz
pMOSBlue	2,9	Klonierungsvektor	Ampicillin	GE Healthcare
pCWori ⁺	4,9	Expressionsvektor	Ampicillin	(Sagara <i>et al.</i> , 1993)
pBAR_AdR	6,3	Expressionsvektor AdR	Ampicillin	(Sagara <i>et al.</i> , 1993)
pET17b	3,3	Expressionsvektor	Ampicillin	Novagen
pTrc99a	4,2	Expressionsvektor	Ampicillin	(Wada <i>et al.</i> , 1991)
pGro12		Expressionsvektor	Kanamycin	(Nishihara <i>et al.</i> , 1998)
pRDKJG	7,9	Expressionsvektor	Kanamycin	(Caspers <i>et al.</i> , 1994)
pREP4groESL	5,9	Expressionsvektor	Kanamycin	(Caspers <i>et al.</i> , 1994)

Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden mit dem online verfügbaren Programm SilentSiteSelector (<http://rana.lbl.gov/SSS/bin/SSS2.cgi>) entworfen und von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.3: Sequenzen der *QuikChange* Mutagenese Primer

Primer	Primersequenz 5'→3'	Verwendungszweck
AdR_C74S_for	GAC GGC CCG CTC TGA CAG ATC TGC CTT CTA TGG CAA A	C74S in AdRWT
AdR_C74S_rev	GTT GCC ATA GAA GGC AGA TCT GTC AGA GCG GGC CGT C	C74S in AdRWT
AdR_C145S_for	CCG GAC CTG AGC TCT GAC ACA GCC GTG	C145S in AdRWT
AdR_C145S_rev	CAC GGC TGT GTC AGA GCT CAG GTC CGG	C145S in AdRWT
AdR_C322S_for	GGA GGA CCT CCC CAG TGG GCT GGT G	C322S in AdRWT
AdR_C322S_rev	CAC CAG CCC ACT GGG GAG GTC CTC C	C322S in AdRWT
AdR_A_for	CG TGT CTT TCT GTG ATT GGG AGT GTC TGG ATG CTG AGG AGG TG	S425C/K429C in AdR_C364S
AdR_A_rev	CAG CAT CCA GAC ACT CCC AAT CAC AGA AAG ACA CGG GCC AG	S425C/K429C in AdR_C364S
AdR_B_for	TCT TGG GTC TCT GTG ACC TAT GTG AGG CCG CTC GCA GCC CG	Q232C/K236C in AdR_C145S/C364S
AdR_B_rev	GAG CGG CCT CAC ATA TGC GGT CAC AGA GAC CCA AGA AAT CCG C	Q232C/K236C in AdR_C145S/C364S

2 Material und Methoden

Tabelle 2.4: Sequenzen der Amplifizierungs- und Sequenzierprimer

Primer	Primersequenz 5'→3'	Verwendungszweck
AdR_NdeI_for	GGA ATT CCA TAT GAG CAC TCA AGA ACA AAC C	Einführung einer <i>NdeI</i> Schnittstelle in AdR in pMOS
AdR_HindIII_rev	GGG AAG CTT CAG TGC CCC AGC CGC AGC ATC	Einführung einer <i>HindIII</i> Schnittstelle in AdR in pMOS
pCWori_for	GAT CGA TCC ATC GAT GAG C	Sequenzierprimer für den pCWori ⁺ -Vektor
pCWori_rev	GAT CTG CTT GAA GAC GAA AG	Sequenzierprimer für den pCWori ⁺ -Vektor
T7 Promotor	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sequenzierprimer für den pMOSBlue & pET17b-Vektor
M13RevCS(-49)24mer	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	Sequenzierprimer für den pMOSBlue & pET17b-Vektor

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Methode der zielgerichteten Mutagenese wurde entsprechend der Anleitung des *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene) durchgeführt, um die gewünschten Mutationen in die AdR einzuführen. Die Mutagenese wurde im Klonierungsvektor pMOS_AdR nach folgendem PCR-Programm (Tabelle 2.5) durchgeführt.

Tabelle 2.5: Programm: *QuikChange* Mutagenese

Stufe	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95°C	5 min
2	Denaturierung	95°C	45 s
3	Annealing	70°C	1 min
4	Elongation	73°C	9 min
	Schritte 2-4		18x
5	Elongation	73°C	10 min
6		4°C	∞

Im Anschluss an die PCR wurden die Proben für eine Stunde durch Zugabe von *DpnI*

verdaut und nach Transformation von TOP10F' konnten angewachsene Klone gepickt und angezogen werden, die dann einer Plasmidpräparation unterzogen wurden. Durch Sequenzierung verifizierte Mutanten der AdR wurden aus dem Klonierungsvektor pMOS-Blue in die Expressionsvektoren pCWori⁺ bzw. pET17b ligiert und die gewünschte Mutation durch Sequenzierung erneut verifiziert.

2.2.2 Klonierung der AdR-Mutanten in den Expressionsvektor

Zur Umklonierung aller AdR-Mutanten aus dem Klonierungsvektor pMOSBlue in die Expressionsvektoren pCWori⁺ bzw. pET17b wurden die AdR-Mutanten zunächst amplifiziert. Dazu wurde das folgende Programm (Tabelle 2.6) verwendet.

Tabelle 2.6: PCR-Programm zur Amplifizierung der Inserts

Stufe	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95°C	5 min
2	Denaturierung	95°C	45 s
3	Annealing	55°C	1 min
4	Elongation	70°C	3 min
	Schritte 2-4		30x
5	Elongation	70°C	10 min
6		4°C	∞

Nach erfolgter Amplifizierung wurde die DNA der AdR mittels Agarose-Gelelektrophorese von weiteren DNA-Fragmenten getrennt, aus dem Gel extrahiert und gereinigt.

2.2.3 Restriktionsverdau

Zur Ligation des Inserts in den entsprechenden Vektor wurden beide Komponenten für zwei Stunden mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII* verdaut und durch Agarose-Gelelektrophorese von weiteren Fragmenten getrennt, extrahiert und gereinigt. Die Konzentrationsbestimmung beider Komponenten erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.4 Ligation

Die Ligation des jeweiligen Inserts in die Expressionsvektoren pCWori⁺ und pET17b wurde mit einem Vektor zu Insert Verhältnis von 1:3 durchgeführt. Bei allen Ansätzen betrug die maximale DNA-Masse 100 μg . Für die Ligation wurde die T4-Ligase eingesetzt.

Um den Erfolg der Ligation zu prüfen, wurden die Proben dialysiert und anschließend in TOP10F' Zellen transformiert, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Vorhandene Kolonien wurden durch Kolonie-PCR auf Anwesenheit des vollständigen Expressionsplasmids überprüft.

2.2.5 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ermöglicht es, bereits durch Einsatz einer Kolonie den Erfolg der Ligation zu prüfen. Hierzu wurden Klone gepickt und in 15 μl dH₂O aufgenommen. Für die PCR wurden je 10 μl aus dem Mastermix, in Tabelle 2.7 beschrieben, hinzu gegeben. Das verwendete PCR-Programm entspricht Tabelle 2.6.

Tabelle 2.7: Probenzusammensetzung

Komponenten	Menge
Primer_vorwärts	10 pmol
Primer_zurück	10 pmol
dNTPs	5 mM
ddH ₂ O	ad 10 μl
<i>Taq</i> DNA Polymerase	1 U

Anhand der Agarose-Gelelektrophorese konnten die Inserts nachgewiesen werden. Positive Klone wurden in Flüssigkulturen vermehrt und die Plasmide isoliert.

2.2.6 DNA Extraktion und Konzentrationsbestimmung

Die Isolierung der Plasmide aus den Bakterienzellen erfolgte mittels des *Nucleobond^R midi plasmid preparation Kits* (Macherey-Nagel), während für die Extraktion der DNA aus Agarosegelen das *NucleoSpin Extract Kit* (Macherey-Nagel) verwendet wurde.

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgte anschließend am Doppelstrahl-Spektralphotometer (UV2101PC) der Firma Shimadzu bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei entspricht die Absorption von 1 einer DNA-Konzentration von 50 μg .

2.2.7 Sequenzierung

Zur Verifizierung der gewünschten Mutationen wurden die DNA-Proben von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) sequenziert.

2.2.8 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation der Plasmid-DNA

Die Herstellung sowohl der elektro- als auch der chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen, sowie die Transformation von Plasmiden erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook (Sambrook & Russel, 2001).

2.2.9 DNA-Analyse mittels Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse der Restriktionsverdauungen, zur Extraktion von DNA-Fragmenten und zur Prüfung von PCR-Versuchen, nach Sambrook durchgeführt (Sambrook & Russel, 2001).

2.3 Heterologe Proteinexpression und Reinigung

2.3.1 Expression und Reinigung der Adrenodoxin-Reduktasen

Für die Expression der AdR wurde eine LB-Vorkultur mit frisch transformierten *E. coli* JM109 bzw. C43(DE3) Zellen angeimpft. Die Vorkultur wurde über Nacht angezogen (37°C, 16 h und 180 UpM) und am Folgetag verwendet, um die Hauptkultur anzupflanzen. Alle Hauptkulturen wurden bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,5$ angezogen und die heterologe Expression anschließend mit IPTG-Zugabe (1 mM) gestartet. Bei Einsatz des Chaperonplasmids pGro12 wurde Arabinose mit einer Endkonzentration von 2 mg/ml zur Induzierung hinzugegeben. Die Vor- und die Hauptkulturen wurden mit Ampicillin

2 Material und Methoden

(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und gegebenenfalls mit Kanamycin (35 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versehen. Die Expression der AdR erfolgte für 70 Stunden bei einer Temperatur von 25°C und 110 UpM. Die Zellen wurden geerntet (4°C, 15 min, 4500 UpM) und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Zur Reinigung der AdR wurden 2 Pellets (ca. 10 g Frischgewicht) nach dem Auftauen in 100 ml Lysepuffer (10 mM KPP, pH 7,4, 1 mM EDTA) aufgenommen und mit PMSF (1 mM) versetzt. Die Lyse erfolgte entweder durch Ultraschallbehandlung oder enzymatisch. Für die Ultraschallbehandlung wurde der Ultraschall-Desintegrator (USD 30, 2/8 Zoll Sonotrode, Fa. Emich) mit folgendem Programm (Tabelle 2.8) verwendet:

Tabelle 2.8: Ultraschall (USD 30)

Sondentyp	1
Amplitude	50 Hz
Gesamtdauer	20 min
Puls	30 s
Ratio	1 (30 s Beschallung, 30 s Pause)
Temperatur	10°C
Rührgeschwindigkeit	200 UpM
Vorrührzeit	0 min

Der enzymatische Aufschluss wurde durch die Zugabe des Lysozyms (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gestartet. Nach 10-minütigem Rühren bei Raumtemperatur wurde solange tropfenweise Natriumdesoxycholat (2-3 Spatelspitzen in 2 ml Puffer) hinzugegeben, bis eine viskose Lösung entstand. Nach weiterem 10-minütigen Rühren wurde DNase (2 mg/ml H₂O) hinzugegeben und solange gerührt, bis die Lösung wieder im dünnflüssigen, homogenen Zustand vorlag. Die Suspension wurde anschließend bei 35000 UpM für 30 min in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Die Proteine im Überstand wurden anschließend zwei Ammoniumsulfatfällungen unterzogen. Während beider Fällungen wurde der pH-Wert kontrolliert und durch Zugabe von KOH auf pH 7,4 eingestellt.

Die erste 30 %ige-Fällung erfolgte durch Zugabe des Salzes mit einer Endkonzentration von 176 g Ammoniumsulfat/l, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt (4°C, 18000 UpM, 20 min). Der Überstand wurde einer zweiten 60 %igen-Fällung durch Zugabe von 198 g Ammoniumsulfat/l unterzogen. Der zweite Zentrifugationsschritt wurde

für 30 min bei 4°C und 35000 UpM durchgeführt.

Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet in 30 ml Dialysepuffer (50 mM KPP, pH 7,4, 0,1 mM DTE, 0,1 mM EDTA, 1 μ M FAD) aufgenommen, 15 min gerührt und gegen den Dialysepuffer für 36 Stunden dialysiert, um das Ammoniumsulfat vollständig zu entfernen. Der Pufferwechsel fand jeweils nach 4 h, 18 h und 24 h statt. Die Lösung wurde in der Ultrazentrifuge bei 4°C und 35000 UpM für 30 min abzentrifugiert, anschließend auf die mit Laufpuffer (50 mM KPP, pH 7,4, 0,1 mM DTE, 0,1 mM EDTA) äquilibrierte Adx-Sepharose-Säule aufgetragen (Flussrate 0,5 ml/min) und mit 30 ml Laufpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit dem Elutionspuffer (50 mM KPP, pH 7,4, 0,1 mM DTE, 0,1 mM EDTA, 0,7 M KCl; 2 ml/Fraktion). Die gelben Fraktionen wurden vereinigt, eingengt und die Konzentration bestimmt. Zusätzlich wurde der Reinheitsgrad (Q-Wert) durch den Koeffizienten A_{270nm}/A_{450nm} ermittelt. Der Q-Wert lag im Bereich zwischen 7,6 und 8,0.

2.3.2 Expression und Reinigung des $^{15}\text{N}^2\text{H-AdxWT}$, sowie des $^{15}\text{N}^2\text{H-Adx(4-108)}$ ¹

Die Expression der deuterierten und ^{15}N -markierten Adx-Formen wurden im Expressionsvektor pKKHC im *E. coli* Stamm BL21 durchgeführt. Die Zellen wurden im M9 Medium, welches $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ und D3-Glycerol für AdxWT bzw. D3-Acetate für Adx(4-108) enthielt, angezogen.

Während der Expression wurde der D_2O -Gehalt in mehreren Schritten von 0% sukzessive auf 50%, 80%, 93% und auf 99% gesteigert. Die Reinigung erfolgte nach (Schiffler *et al.*, 2004).

Protein mit einem Reinheitsgrad ($A_{415\text{ nm}}/A_{276\text{ nm}}$) von über 0,9 wurde isoliert und die Konzentration unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten $9,8\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ermittelt. Die Ausbeute für den $^{15}\text{N}^2\text{H-AdxWT}$ lag bei 1,4 mg/l, während die Ausbeute für den $^{15}\text{N}^2\text{H-Adx(4-108)}$ bei 2 - 3 mg/l *E. coli* Kultur lag.

¹Ein großer Dank geht an Herrn Wolfgang Reinle für die Expression und Reinigung der deuterierten und markierten Adx-Formen.

2.3.3 Einschlusskörper

Bakterielle Einschlusskörper entstehen durch Akkumulation von fehlerhaften und/oder unvollständig gefalteten Proteinen während der heterologen Expression. Ob Proteine tatsächlich in Einschlusskörper aggregieren, kann mit einem Test überprüft werden. Hierbei werden zunächst lösliche, dann membranassoziierte und -integrierte Proteine abgetrennt. Die unlöslichen Proteine werden anschließend in einer 8 M harnstoffhaltigen Pufferlösung denaturiert und können nachgewiesen werden.

Für den Nachweis von Einschlusskörpern wurde nach der Expression das Pellet zunächst in Lysepuffer I (50 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl) aufgenommen und anschließend nach PMSF-Zugabe (1 mM) aufgeschlossen. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C und 30000 UpM für 30 min. In diesem Schritt werden die löslichen Proteine von den membranassoziierten und -integrierten, wie auch evtl. vorhandenen Einschlusskörpern abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde im zweiten Schritt in Lysepuffer II (50 mM Tris, pH 8,0, 20 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 0,5 % (v/v) Triton-X-100) aufgenommen und nach fünf-minütigem Rühren bei Raumtemperatur erneut zentrifugiert (15 min, 7000 UpM). Auf diese Weise können membranassoziierte bzw. -integrierte Proteine solubilisiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit dH₂O gewaschen. Das Pellet wurde nachfolgend in 40 ml Solubilisierungspuffer I (50 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 8 M Harnstoff) resuspendiert und eine Stunde auf Eis gerührt. 20 ml dieser Lösung wurden mit 20 ml Solubilisierungspuffer II (50 mM KPP, pH 8,0, 1 mM EDTA 8,0, 50 mM NaCl) versetzt und erneut gerührt (Raumtemperatur, 30 min). In Harnstoff solubiliertes Protein wurde im letzten Schritt abzentrifugiert (15 min, 5000 UpM) und mittels SDS-PAGE nachgewiesen.

2.3.4 Expressionsoptimierung durch IPTG-Screening der AdR-Mutanten

Zur Steigerung der Expressionsraten wurde ein IPTG-Screening durchgeführt. Hierzu erfolgte eine Kotransformation der Expressionsplasmide für die verschiedenen AdR-Mutanten mit dem Expressionsplasmid pGro12 für das Chaperonsystem GroES/EL,

2 Material und Methoden

die Plasmide wurden mittels chemischer Transformation in die Zellen eingebracht. Nach 16-stündiger Inkubation (37°C, 180 UpM) wurden 10 μl der Kultur entnommen und 1:1 Million in LB-Medium verdünnt. Der erste Schritt des Screenings umfasste das Ausplattieren von 50 μl der verdünnten Lösung auf LB-Platten. Diese enthielten IPTG-Konzentrationen von 0,25, 0,5 oder 1,0 mM. Es folgte eine Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37°C. Auf den Platten wurden unterschiedlich große Kolonien beobachtet, deren Größe zwischen 0,5 mm und 4 mm variierte. Der zweite Schritt des Screenings umfasste das Überführen der kleinen Kolonien auf Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Kanamycin (35 $\mu\text{g}/\text{ml}$) haltige LB-Platten, welche dann für etwa 8-10 Stunden bei 37°C inkubiert wurden. Es konnte an dieser Stelle immer beobachtet werden, dass nur etwa die Hälfte der überführten Kolonien beide Plasmide enthielten. Um eine höhere Expressionsrate zu erzielen, wurde das vollständige Screening mit einer Kolonie der LB-Amp/Kan-Platte wiederholt. Die erhaltenen Kolonien wurden für weitere Expressionen eingesetzt. Das IPTG-Screening wurde für den AdRWT, die fünf AdR-Einfachmutanten und für die zwei AdR-Mehrfachmutanten durchgeführt.

2.4 Biochemische und biophysikalische Methoden

2.4.1 UV/Vis-Spektroskopie

Die Konzentration der Proteine wurde mittels der UV/Vis-Spektroskopie ermittelt. Hierzu wurden für die jeweiligen Proteine entsprechende Wellenlängenbereiche gewählt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur am Shimadzu Doppelstrahl-Spektralphotometer (UV2101PC) durchgeführt.

Zur Konzentrationsbestimmung des AdRWT und der Mutanten wurden UV/Vis-Spektren in einem Wellenlängenbereich zwischen 250 - 550 nm aufgenommen. Unter Anwendung des Lambert-Beer-Gesetzes konnte die AdR-Konzentration bestimmt werden. Der molare Extinktionkoeffizient beträgt $\epsilon = 11,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Bestimmung des Reinheitsgrades (Q-Wert) ergab sich aus dem Koeffizienten $\text{Ext}_{270 \text{ nm}}/\text{Ext}_{450 \text{ nm}}$. Werte im Bereich von 7,6 - 8,0 weisen auf eine sehr reine AdR-Lösung hin.

2.4.2 Circular dichroismus-Spektroskopie

Die Methode der Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) wird in der Biochemie insbesondere zur Aufklärung von Sekundärstrukturen angewendet (Pingoud & Urbanke, 1997). Dabei können durch Messungen im fernen UV (190 - 260 nm), nahen UV (250 - 320 nm) und sichtbaren Bereich (320 - 650 nm) neben Informationen über die Sekundärstruktur auch welche über die Zusammensetzung eines Proteins erhalten werden. Somit ist jedes erhaltene CD-Spektrum eine Art Fingerabdruck für ein Protein.

FAD ist ein optisch aktiver Chromophor. Wenn linear polarisiertes Licht eine optisch aktive Probe durchläuft, kann es sein, dass die Extinktionskoeffizienten für das links- bzw. rechts-zirkular polarisierte Licht unterschiedlich ausfallen. Aus der entstehenden Differenz $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ ergibt sich die Elliptizität Θ (Lottspeich, 1998). Mittels dieser ermittelten Elliptizität in Abhängigkeit zur Wellenlänge wird ein CD-Spektrum aufgezeichnet, welches für jedes Protein unterschiedlich ist. Da die optische Rotation entweder links- bzw. rechts-drehend ist, kommt es zu negativen bzw. positiven Cotton-Effekten.

Die CD-Spektroskopie wurde angewendet, um Informationen über die Umgebung des FADs in der AdR zu erfahren. Sollte sich die eingeführte Mutation auf die FAD-Umgebung auswirken, würde man dies direkt im CD-Spektrum beobachten.

Für die CD-Messungen wurden der AdRWT und alle Mutanten in 50 mM HEPES (pH 7,4), versetzt mit 0,05 % Tween 20, aufgenommen. Die eingesetzte Proteinendkonzentration betrug in allen Fällen 20 μM . Die Messungen umfassten den Wellenlängenbereich von 250 und 650 nm und beinhalteten somit sowohl den nahen UV und den sichtbaren Bereich. Es wurden für jede AdR-Form vier Proben in einer 1 cm dicken Quarzküvette vermessen.

Die CD-Messungen wurden mit einem Jasco 715 Spektropolarimeter durchgeführt. Die Probenkammer wurde während der gesamten Messung mit Stickstoff (3 l/min) gespült. Die Auswertung erfolgte mittels SigmaPlot9.0.

2.4.3 Thermische Denaturierung

Zur Bestimmung der thermischen Stabilität erfolgten temperaturabhängige CD-Messungen. Die Proteinkonzentration betrug für alle AdR-Formen 10 μM . Bei einer

Wellenlänge von 264 nm (größtes CD-Signal) wurde in einem Bereich zwischen 20°C und 70°C und einer Temperaturzunahme von 1°C/min die thermische Stabilität betrachtet. Die Ermittlung der Entfaltungstemperatur erfolgte aus den erhaltenen Spektren mit einem nichtlinearen Regressionsprogramm mittels SigmaPlot9.0 (Privalov, 1979).

2.4.4 Bestimmung des FAD-Gehaltes in den AdR-Formen

Die quantitative Bestimmung des FAD-Gehaltes des AdRWT und der AdR-Mutanten erfolgte UV/Vis-spektroskopisch. Proteinlösungen wurden in 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) vorbereitet und deren UV/Vis-Spektren aufgezeichnet. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 100°C wurden die Lösungen auf Eis abgekühlt und für weitere 10 min bei 4°C und 10000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wurde überführt und die UV/Vis-Spektren erneut aufgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration und des freien FADs in Lösung erfolgte anhand des Lambert-Beer-Gesetzes. Die daraus erhaltenen Stoffmengen für die Proteine und des freien FADs wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Der molare Extinktionskoeffizient für die Bestimmung der Proteinkonzentration und der freien FAD-Lösung beträgt $\epsilon_{450} = 11,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Alle Messungen wurden am Shimadzu Doppelstrahl-Spektralphotometer (UV2101PC) im Bereich von 250 - 550 nm aufgenommen.

2.4.5 Reduktionsfähigkeit der AdR-Formen

Die Fähigkeit der erzeugten AdR-Mutanten, Elektronen auf den AdxWT zu übertragen, wurde in einem System aus Adx (50 μM) und AdR (5 μM) in 50 mM KPP (pH 7,4) bei Raumtemperatur untersucht. Es wurden zunächst Spektren der Proben im oxidierten Zustand im Bereich 200 und 700 nm an einem Shimadzu Doppelstrahl-Spektralphotometer (UV2101PC) aufgenommen. Die Reduktion wurde durch Zugabe von 50 μM NADPH gestartet und das reduzierte Adx-Spektrum aufgenommen.

2.4.6 Cytochrom *c*-Test

Die Aktivitätsbestimmung des AdRWT und der acht AdR-Mutanten erfolgte mit dem artifiziellen Elektronenakzeptor Cytochrom *c*. Dieses nicht-physiologische System diente

zur Prüfung, ob die Mutationen die Aktivität in den AdR-Formen beeinträchtigen.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte hierzu in 50 mM KPP (pH 7,4). Die zeitliche Extinktionsänderung bei 550 nm wurde nach Zugabe von NADPH (200 μM) verfolgt und die Aktivität der AdR mittels des molaren Extinktionskoeffizienten, der für Cytochrom *c* 20 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ beträgt, ermittelt. Die Proben setzten sich aus 200 μM Cytochrom *c*, 1 μM Adx (AdxWT bzw. Adx(4-108)) und AdR mit Endkonzentrationen zwischen 0,05 und 1 μM zusammen. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur am Shimadzu Doppelstrahl-Spektralphotometer (UV2101PC) durchgeführt.

2.4.7 Optische Biosensor Messungen der Wechselwirkung zwischen AdR und Adx

Mit der Methode der Oberflächenplasmonresonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) wurde die Komplexbildung des AdRWT und der AdR-Mutanten an AdxWT und Adx(4-108) an einem Biacore 3000 System unter Verwendung eines CM5-Chips untersucht. Die Oberfläche des Chips besteht aus einer carboxylierten Dextranoberfläche, deren Carboxylgruppen durch eine Kombination aus 0,2 M N-ethyl-N'-dimethylaminopropylcarbodiimid (EDC) und 0,05 M N-hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert wurden. Für die Untersuchungen wurden entweder AdxWT oder Adx(4-108) solange kovalent auf den Chip gekoppelt, bis etwa 300 Resonanzeinheiten (RU) erreicht wurden (Zöllner *et al.*, 2002, 2004). Das Blockieren der freien Estergruppen erfolgte mit einer 1 M Ethanolaminhydrochlorid-Lösung.

Die Analyten (AdRWT und die AdR-Mutanten) wurden mit einer Konzentration von 500 nM in Biacore HBS-EP Puffer (0,01 M HEPES Puffer, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% Surfactant P20) angesetzt und ihre Bindung an den AdxWT bzw. Adx(4-108) gemessen. Die Assoziation der jeweiligen AdR-Form wurde 8 mal wiederholt. Zwischen den Messungen erfolgte die Dissoziation der AdR durch Injektion von 10 μl NaOH Lösung (2 mM).

Alle resultierenden Sensorgramme wurden zur Ermittlung der K_D -Werte mit der Biacore Software 4.1, mit der Annahme, dass die AdR:Adx Wechselwirkung einem 1:1-Bindungsmodell entspricht, ausgewertet.

2.4.8 *In vitro*-Rekonstitutions-Test

Der Aktivitätstest diente zur Untersuchung, ob es aufgrund der eingeführten Mutationen in die AdR zu einer Beeinträchtigung des Substratumsatzes kommt. Die Überprüfung erfolgte mit einem *in vitro*-Enzym-Test nach Sugano (Sugano *et al.*, 1996) der geringfügig modifiziert wurde. Dieser Test beinhaltet die Komponenten AdR (1 μM), Adx (1 μM) und CYP11A1 (1 μM). Es wurden der AdRWT und alle AdR-Mutanten kombiniert mit dem AdxWT und Adx(4-108) vermessen. Alle Komponenten wurden in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) aufgenommen, welcher zusätzlich mit 0,05 % Tween 20 versetzt war. Während der Reaktion wird der Elektronendonator NADPH verbraucht. Um diesen limitierenden Faktor ausschließen zu können, wurde dem Reaktionsansatz ein NADPH-regenerierendes System zugefügt, welches aus MgCl_2 (1 μM), Glucose-6-Phosphat (5 μM) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1 U) bestand. Als Substrat wurde 7-Dehydrocholesterol (200 μM) eingesetzt (Slominski *et al.*, 2004).

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μM NADPH gestartet und nach 10 min durch Zugabe von 400 μl Chloroform gestoppt. Cholecalciferol (100 μM) diente als interner Standard und wurde zum Versuchsansatz hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 20 s gevortext und anschließend zentrifugiert (8 min, 8000 UpM). Die Chloroformphase wurde in ein zweites Reaktionsgefäß überführt. Zur vollständigen Extraktion der Steroide wurde in einem weiteren Durchgang Chloroform zum Versuchsansatz pipettiert und die Extraktion wiederholt. Die vereinigten Chloroformphasen wurden für eine Stunde im Vakuumverdampfer (Univapo 100H, RS Laborgeräte) abgedampft und die Steroide wurden in 200 μl Acetonitril resuspendiert. 50 μl wurden auf einem Jasco Reverse Phase HPLC System der LC900 Serie mit einer 4/125 mm Nucleodur 100-3 C18 RP Säule (Macherey-Nagel) bei einer Säulentemperatur von 40°C getrennt. Als Vorsäule wurde eine CC84 Nucleodur 100-3 C18 ec Säule (Macherey-Nagel) verwendet. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm analysiert. Die Elution der Steroide erfolgte mit einem Gemisch aus Acetonitril:Isopropanol (30:1). Die Produktquantifizierung erfolgte über den Vergleich der Peakflächen des Produkts und des Standards unter Verwendung der JASCO Borwin Software und wurde mittels SigmaPlot9.0 ermittelt.

2.4.9 Quantitative Bestimmung von Thiol-Gruppen

Thiol-Gruppen Bestimmung mittels *Thiol and Sulfide Quantitation Kit*

Die Thiol-Quantifizierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Bestimmung stand das *Thiol and Sulfide Quantitation Kit (T-6060)* (Molecular Probes) zur Verfügung.

Thiol-Gruppen Bestimmung mittels 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)

Zur photometrischen Bestimmung der exponierten Cysteine in AdR wurden die AdR-Formen in nativer und in denaturierter Form vermessen. Aus dem Verhältnis dieser beiden Formen sollte die Zahl der exponierten Cysteine erhalten werden. Hierzu wurden je zwei Testansätze vorbereitet.

Testansatz 1: Probenpuffer A (100 mM Tris-HCl, pH 8,0) + 30 μ l DTNB (10 mM)

Testansatz 2: Probenpuffer B (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 8 M Harnstoff) + 30 μ l DTNB (10 mM)

Die Referenzprobe enthielt 100 μ g Protein in Probenpuffer A. Außerdem wurden je zwei Leerwerte aufgenommen. Leerwert 1 enthielt Probenpuffer A bzw. B und 30 μ l DTNB, während Leerwert 2 nur Probenpuffer A bzw. B enthielt.

Es wurde zunächst für alle Testansätze und Leerwerte die Absorption bei 412 nm ermittelt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 100 μ g Proteinlösung gestartet. Die harnstoffhaltigen Lösungen wurden zusätzlich weitere 15 min inkubiert. Aus den ermittelten Absorptionswerten konnte die Extinktionsdifferenz δE_{410} nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\delta E_{410} = (E_{T1} - E_{LW1}) - (E_{T2} - E_{LW2}) \quad (2.1)$$

In dieser Gleichung beschreiben δE_{410} die Extinktionsdifferenz, E_{T1} bzw. E_{T2} die Extinktionswerte des Testansatzes T1 bzw. T2 und E_{LW1} bzw. E_{LW2} die Extinktionswerte der Leerwerte LW1 und LW2.

Die Konzentration freier Cysteine ergibt sich nach Gleichung:

$$[SH] = \frac{\delta E_{410}}{\epsilon \cdot d} \quad (2.2)$$

Mit ϵ = Extinktionskoeffizient von Thionitrobenzoat-Anionen ($13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und $d = 0,2 \text{ cm}$ (Schichtdicke der Quarzküvette).

Die Bestimmung der exponierten Cysteine erfolgte aus dem Verhältnis der ermittelten Extinktionen der Testansätze 1 und 2, in denen das Protein entweder im nativen bzw. denaturierten Zustand vorlag.

2.4.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach Sambrook (Sambrook & Russel, 2001). Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 15 %tigen SDS-Gel bei 120 V. Die Gele wurden im Gelrockner (Geldryer model583, Bio-Rad) getrocknet.

2.5 NMR-Untersuchungen

2.5.1 Ln-CLaNP-5 Vorbereitung

Die Ligation der Lanthanoide Lutetium (Lu), Thulium (Tm) und Gadolinium (Gd) in 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,7-[di-(N-oxido-pyridin-2-yl)methyl]-4,10-Bis(2-(acetylamino)ethylmethansulfonothioat) (CLaNP-5) erfolgte bei Raumtemperatur. Hierzu wurden zunächst $\text{Lu}(\text{OAc})_3$ (5,2 mg, 12 μmol), $\text{Tm}(\text{OAc})_3$ (9,2 mg, 21 μmol), $\text{Gd}(\text{OAc})_3$ (13,5 mg, 32 μmol) in N,N-dimethylformamid gelöst und danach 0,9 Äquivalente CLaNP-5 (0,6 M) zugegeben. Die Proben wurden eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die Aufnahme der Lanthanoide per LC-MS (0,1% Trifluoressigsäure) mit einem 10-90% Acetonitril Gradient auf einer analytischen Säule-C18; $[\text{M}+\text{H}]^+$ 949 m/z geprüft. Die Endkonzentrationen betragen 55 μM für Lu-CLaNP-5, 89 μM für Tm-CLaNP-5 und 55 μM für Gd-CLaNP-5.

2.5.2 Kopplung der Ln-CLaNP-5 an AdR

0,2 mM (6 mg) Protein wurde mit DTT (5 mM) zur Reduktion der SH-Gruppen versetzt. Die Proben wurden eine Stunde auf Eis inkubiert und zur Entfernung des DTT sowie der Aggregate über eine Superdex-200-Säule (20 mM NaPP, pH 7,4, 0,1 M NaCl)

2 Material und Methoden

mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min gereinigt. Die AdR-Monomere enthaltenden Fraktionen (3-4 ml) wurden gesammelt und mit Puffer (20 mM NaPP, pH 7,4, 0,1 M NaCl) auf maximal 6 ml verdünnt, um Aggregation bei Ln-CLaNP-5-Zugabe zu vermeiden. Die Zugabe der Ln-CLaNP-5 zur AdR erfolgte im Stoffmengenverhältnis 3:1. Nach einstündiger Inkubation wurde die Lösung eingeeengt und erneut über die Superdex-200-Säule aufgereinigt, um sowohl überschüssiges Ln-CLaNP-5, als auch Dimere, zu entfernen. Fraktionen mit markiertem AdR wurden gesammelt und eingeeengt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie.

2.5.3 NMR-Messungen

Die NMR-Proben enthielten jeweils 20 - 50 μM $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) bzw. $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT mit 1,2 Äquivalenten der AdR-Spezies, markiert mit Ln-CLaNP-5. Die Proteine lagen in 20 mM NaPP (pH 7,4) mit 0,1 M NaCl und 6% D_2O (v/v) vor. Die NMR-Proben wurden für die Messungen in ein Shigemi-Röhrchen überführt. [^{15}N , ^1H]-TROSY Messungen (Pervushin *et al.*, 1997) wurden am Bruker Avance DMX 600 Spektrometer ausgestattet mit einer TCI-Z-GRAD Cryoprobe bei 285 K für 24 Stunden durchgeführt.

2.5.4 Prozessierung und Auswertung der NMR Daten

Die erhaltenen Daten wurden unter Anwendung des Programms *Azara* (www.bio.cam.ac.uk/azara) prozessiert und mit dem Programm *Ansig for Windows* analysiert (Helgstrand *et al.*, 2000). Die Zuordnung der Resonanzen erfolgte basierend auf bereits bekannten Daten (Xu *et al.*, 2006).

2.5.5 Chemische Verschiebung

Die auftretende chemische Verschiebungsänderung ($\Delta\delta_{avg}$) der Resonanzsignale wird anhand der folgenden Formel berechnet (Grzesiek *et al.*, 1996):

$$\Delta\delta_{avg} = \sqrt{\frac{(\Delta\delta\text{N}/5)^2 + \Delta\delta\text{H}^2}{2}} \quad (2.3)$$

Dabei wird die chemische Verschiebung, ausgelöst durch Wechselwirkung mit dem Reaktionspartner, oder durch paramagnetischen Einfluss, ermittelt. $\Delta\delta\text{N}$ und $\Delta\delta\text{H}$ stellen

die chemische Verschiebungsänderung für die ^{15}N - und ^1H -Kerne der Amidgruppen des Proteinrückgrats dar.

2.5.6 Bestimmung der Chemischen-Verschiebungsänderung

Für die Bestimmung der Chemischen-Verschiebungsänderung (CSP) zwischen Adx(4-108) und AdRWT wurde zunächst das [^{15}N , ^1H]-TROSY-Spektrum des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) (50 nmol) aufgenommen. Die Zugabe von 0,3, 0,6, 0,9 und 1,2 Äquivalenten des AdRWT führte sukzessive zu Verschiebungen der Resonanzsignale des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108), die mit Gleichung 2.3 ermittelt wurde.

Die NMR-Spektren für die CSP-Untersuchungen und die Bestimmung der CSP des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) wurden zuvor von Herrn Dr. Peter H.J. Keizers, aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Marcellus Ubbink durchgeführt.

Für die Bestimmungen der CSPs des ^{15}N -markierten AdxWT wurde dessen [^{15}N , ^1H]-TROSY Spektrum aufgenommen. Anschließend wurde die AdR_B-Mutante gekoppelt mit Lu-CLaNP-5 im Verhältnis 1:1,1 hinzugeben und das Spektrum erneut aufgenommen. Die mit dem Diamagneten gekoppelte AdR_B-Mutante entspricht dem AdRWT, da das Lutetium keinen Effekt auf das $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT ausübt. Die CSPs wurden mit der Gleichung 2.3 berechnet.

2.5.7 Bestimmung der Pseudokontaktverschiebung

Um Pseudokontaktverschiebungen (PCS) bestimmen zu können, wurde zunächst Lu-CLaNP-5 an die AdR gekoppelt und in Wechselwirkung mit ^{15}N -markiertem Adx gemessen. Das diamagnetische Luthetium diente als Referenz, um die durch den Paramagneten auftretende Verschiebungen zu ermitteln. Die beobachteten Verschiebungen entstehen erst durch die Wechselwirkung des paramagnetischen Lanthanoids gekoppelt an die AdR mit den Amidgruppen des Rückgrats des ^{15}N -markierten Adx. Hierzu wurde Tm-CLaNP-5 an AdR gekoppelt und ebenfalls vermessen. Gemessene PCS stehen im direkten Zusammenhang mit der Wechselwirkung zwischen Paramagneten und der Amidgruppen und können im Folgenden für die Bestimmung der X -Tensoren (paramagnetischer Suszeptibilitäts-Tensor) verwendet werden.

2 Material und Methoden

Die Größe der PCSs ist von der Distanz zwischen Kernspin und dem Paramagneten abhängig und kann mit der folgenden Gleichung beschrieben werden.

$$PCS = \frac{1}{12\pi r^3} [\Delta_{X_{ax}} (3 \cos^2 \Theta - 1) + \frac{3}{2} \Delta_{X_{rh}} (\sin^2 \Theta \cos 2\Omega)] \quad (2.4)$$

In dieser Gleichung beschreiben r , Θ , Ω die Polarkoordinaten des Kerns hinsichtlich der Achsen des X -Tensors. $\Delta_{X_{ax}}$ und $\Delta_{X_{rh}}$ beschreiben die axiale und rhombische Komponente des X -Tensors.

Um die Komponenten des X -Tensors ermitteln zu können wurde die Kristallstruktur des AdR-Adx-Komplexes der PDB (1E6E) entnommen. Die Positionen der Lanthanoide wurden mittels des Programms X-PLOR-NIH Version 2.9.9 (Schwieters *et al.*, 2003) und des XPCS Energieterms für PCS, optimiert (Banci *et al.*, 2004).

Die Position des Lanthanoids und die Ausgangsgröße des X -Tensors des Tm-CLaNP-5 mit $55,3 \cdot 10^{-32} \text{m}^3$ für die axiale Komponente und $6,9 \cdot 10^{-32} \text{m}^3$ für die rhombische Komponente wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit durch Keizers *et al.* ermittelt (Keizers *et al.*, 2008). Während der Docking-Berechnungen wurde die Ausrichtung des X -Tensors iterativ optimiert, wobei die Position des Lanthanoids unverändert blieb.

Die erhaltenen PCS wurden als Einschränkungen für die Docking-Berechnungen der AdR und Adx in X-PLOR-NIH, sowie für den XPCS Energieterm für PCSs eingesetzt.

2.5.8 Paramagnetische-Relaxationsverstärkung

Zur Bestimmung der Paramagnetischen-Relaxationsverstärkung (PRE) wurde das Intensitätsverhältnis (I_{para}/I_{dia}) der Amidresonanzen aus den [^{15}N , ^1H]-TROSY Spektren der Lu-CLaNP-5 und Gd-CLaNP-5 gekoppelt an die AdR_B entnommen. Diese Spektren dienten zur Ermittlung der paramagnetischen Mitwirkung zur ^1H T2 Relaxationszeit, welche mit der nachfolgenden Formel beschrieben werden kann (Vlasie *et al.*, 2008):

$$\frac{I_{para}}{I_{dia}} = \frac{R_2^{dia} \exp(-R_2^{para} t)}{R_2^{dia} + R_2^{para}} \quad (2.5)$$

R_2^{dia} und R_2^{para} beschreiben die diamagnetische bzw. paramagnetische Mitwirkung zur transversalen Relaxationsrate und somit die resultierende Resonanzsignalintensität. t ist mit 9 ms die Evolutionszeit der transversalen Relaxation.

2 Material und Methoden

Aus der Linienbreite des Resonanzsignals $\Delta\nu_{1/2}$ der diamagnetischen Sonde kann R_2^{dia} ($R_2^{dia} = \pi\Delta\nu_{1/2}$) bestimmt und anschließend für die Berechnung des R_2^{para} genutzt werden. Die Linienbreiten für die diamagnetische Sonde wurde unter Verwendung des Programms MestReC (www.mestrec.com) ermittelt.

Für die Normierung der Intensitätswerte wurde die Aminosäure Thr21 ausgewählt. Sie besitzt mit 47 Å die größte Entfernung zum Gadolinium und unterliegt somit nicht seinem Effekt. Diese Entfernung wurde anhand der vorliegenden Kristallstruktur des AdR-Adx Komplexes bestimmt (PDB Eintrag: 1E6E).

Die Entfernung (r) vom Gd zu den entsprechenden Amidn kann nun unter Verwendung der bereits ermittelten R_2^{para} -Werte mit der vereinfachten Solomon und Bloembergen Gleichung berechnet werden (Solomon & Bloembergen, 1956):

$$r = \sqrt[6]{\frac{1}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma_H^2 g^2 \mu_B^2 J(J+1)}{R_2^{para}} \left(4\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_H^2 \tau_c^2}\right)} \quad (2.6)$$

Mit μ_0 als Vakuumpermeabilität, γ_H als Gyromagnetisches Verhältnis des Protons, μ_B als Bohrsches Magneton, g als elektronischer g-Faktor, J als Quantenzahl (Gd 7/2), τ_c als Totale Korrelationszeit (mittels des Programms HYDRONMR auf 49,0 ns geschätzt (de la Torre *et al.*, 2000)) und ω_H als Larmorfrequenz des Protonspins.

2.5.9 Docking-Berechnungen zwischen AdR und Adx²

Die Berechnungen des Dockings zwischen AdR und Adx(4-108) wurden unter Verwendung des Programms XPLOR-NIH (Schwieters *et al.*, 2003) durchgeführt. Die benötigten Strukturen für den AdR-Adx-Komplex (1E6E) und für das Adx(4-108) (1AYF) wurden der Proteindatenbank entnommen.

Desweiteren wurden die experimentell ermittelten Daten der Chemischen Verschiebungsänderung (CSP), der Paramagnetischen-Relaxationsverstärkung (PRE) und der Pseudokontaktverschiebung (PCS) berücksichtigt. Für die Einrechnungen der PCS wurde zusätzlich das Modul PARArestraints (Banci *et al.*, 2004) in das Programm XPLOR-NIH eingebunden. Der Produg Server

²Ein großer Dank geht an Herrn Dr. Peter H.J. Keizers für die Durchführung der Docking-Berechnungen.

2 Material und Methoden

(<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg/>) wurde verwendet, um die FAD-Parameter und dessen Topologie-Daten für die Berechnungen zu erzeugen (van Aalten *et al.*, 1996). Diese wurden ebenfalls für die Docking-Berechnungen eingebunden.

CSPs wurden als Kern-Overhauser-Effekt-Typ Einschränkungen behandelt. Für die Berechnungen des Dockings wurden im Fall der Chemischen-Verschiebungsänderungen nur die Aminosäurereste miteinbezogen, die eine zugängliche Oberfläche von über 40 % aufwiesen. Diese Bestimmung erfolgte mit der Software NACCESS 2.1.1. (Gerstein, 1992). Für insgesamt 16 Amidgruppen mit einem CSP über 0,03 ppm wurde eine Distanz von 11 Å (-8/+15 Å) zu jedem beliebigen Stickstoffatom der AdR erhalten.

Die Ln-CLaNP-5-Moleküle und ihre zugehörigen X -Tensoren wurden durch ein Metallion und einem Achsensystem dargestellt, dessen Richtungen durch Pseudoatome angezeigt werden.

Die Metallionen wurden mit einem Abstand von 8 Å von den eingefügten Cystein $C\alpha$ -Atomen in Richtung der Seitenketten platziert. Die z -Achse des X -Tensors zeigte dabei, wie zuvor beschrieben, ursprünglich weg vom Rückgrat (Keizers *et al.*, 2008).

Die Größe des X -Tensors von Tm-CLaNP-5 wurde bereits durch vorhergehende Experimente erhalten und beträgt $55,3 \cdot 10^{-32} \text{ m}^3$ für die axiale und $6,9 \cdot 10^{-32} \text{ m}^3$ für die rhombische Komponente (Keizers *et al.*, 2008).

Die energieminierte Struktur des Komplexes von AdR und Adx wurde, unter Berücksichtigung der Energieterme der CSPs, PREs und PCSs, wie folgt berechnet.

Als Ausgangspunkt für die Berechnungen wurde das Adx (1AYF) auf eine zufällige Position im Abstand von $60 \pm 10 \text{ Å}$ zur AdR gesetzt, mit einer zufälligen Rotation um 15° .

Die Energieminimierung begann mit einer Drehung des X -Tensors, wobei nur der Energieterm der PCSs eingesetzt wurde. Die Positionen der Proteine und der Lanthanoid-Ionen blieb unverändert.

Anschließend wurden unter Berücksichtigung aller Einschränkungen (CSPs, PCSs, PREs) die Translationen und Rotationen für die Proteine zugelassen, wobei die Lanthanoid-Ionen und ihre X -Tensoren relativ zum AdR unverändert blieben.

Die Proteine wurden als starr angesehen und nur das Rückgrat sowie $C\beta$ und $C\gamma$ -Atome wurden in den Abstoßungsfunktionen zur Vermeidung sterischer Überlagerungen

berücksichtigt.

Eine Gesamtzahl von 400 Schritten eingeschränkter Molekulardynamik wurde bei 300 K simuliert, von denen jeder 0.04 ps entsprach. Im Anschluß wurden die X -Tensor-Ausrichtungen erneut mittels der PCS-Einschränkungen optimiert, wobei wiederum die Proteine und die Lanthanoid-Ionen unverändert blieben.

Üblicherweise wurde für einen Lauf der beschriebene Minimierungszyklus 50.000 mal wiederholt.

Im Falle, dass bei 6 aufeinanderfolgenden Zyklen keine Energieminimierung erreicht wurde, wurde das Adx mit einer zufälligen Rotation von 15°C auf eine zufällige Position $60 \pm 10 \text{ \AA}$ entfernt von der AdR gesetzt und die Energieminimierungsberechnungen wurden fortgesetzt.

Die Strukturen der Komplexe wurden gespeichert und die PCSs und PREs aus ihnen zurückgerechnet, wenn die Gesamtenergie einen bestimmten Wert unterschritt. Für jede Annäherung aus einer Startposition wurde nur die Komplexstruktur mit der niedrigsten Gesamtenergie gespeichert. Die Kraftkonstanten für die Abschätzung der CSPs wurden auf 50 gesetzt, die Kraftkonstanten für die PCSs wurde auf 250 eingestellt und die für die PREs auf 100. Diese wurden variiert um ähnliche Beiträge zur Energie zu erhalten und es wurde überprüft, dass sowohl die PRE- als auch die PCS-Energierterme eine Rolle spielten beim Erhalt der Strukturen mit den niedrigsten Gesamtenergien.

Die Docking-Berechnungen wurden von Herrn Dr. Peter H.J. Keizers aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Marcellus Ubbink (Leiden, Niederlande) durchgeführt.

2.5.10 Q-Faktor

Der Vergleich zwischen den experimentell ermittelten und berechneten NMR-Parametern kann durch einen Qualitäts-Faktor (Q-Faktor) beschrieben werden. Dieser ist als das Verhältnis der Standardabweichung zwischen den experimentell und den berechneten Daten auf der einen Seite und dem Effektivwert der experimentell erhaltenen Werte auf der anderen Seite, definiert (Bashir *et al.*, 2010).

Um die Übereinstimmung der experimentell erhaltenen PCSs mit den durch die Docking-Berechnungen erhaltenen PCSs zu bestimmen, wurde die folgenden Formel ver-

wendet.

$$Q = \sqrt{\frac{\sum_i \{\Delta\delta_{PC}^{exp}(i) - \Delta\delta_{PC}^{sim}(i)\}^2}{\sum_i \{\Delta\delta_{PC}^{exp}(i) + \Delta\delta_{PC}^{sim}(i)\}^2}} \quad (2.7)$$

Dabei beschreiben exp: die experimentell ermittelten PCSs in ppm und sim: den Mittelwert der berechneten PCSs in ppm für die Aminosäure i.

2.5.11 DRMS-Berechnung

Um die Strukturen aus den Docking-Berechnungen mit der Kristallstruktur vergleichen zu können wurde die Distanz-Effektivwert-Metrik (DRMS, Distance Root Mean Square) verwendet. Für die Berechnung wurde die folgende Formel verwendet (Kim *et al.*, 2008):

$$DRMS = \frac{1}{N} \sum_{i,j} |d_{ij}^{sim} - d_{ij}^{exp}| \quad (2.8)$$

wobei d_{ij} die Distanz zwischen den $C\alpha$ -Atomen der zwei Reste i und j zwei verschiedener Proteine beschreibt. N gibt die Zahl der vorhandenen Aminosäurepaare (i, j) an. d_{ij}^{sim} und d_{ij}^{exp} beschreiben die Distanz-Matrizen der Strukturen aus einer Docking-Berechnung und der Kristallstruktur.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktion zwischen den beiden Proteinen AdR und Adx zu untersuchen. Diese nehmen eine essentielle Rolle in der Steroidhormon-Biosynthese ein, indem sie Elektronen auf die beteiligten Cytochrom P450 Enzyme übertragen.

Deshalb soll ihr Interaktionsbereich mittels der paramagnetischen NMR-Spektroskopie, insbesondere der Methode Transversale Relaxationsoptimierte Spektroskopie (TROSY) untersucht werden. Die Entwicklung dieser Methode in den letzten Jahren ermöglichte es, Protein-Komplexe mit einem Molekulargewicht über 25 kDa zu untersuchen.

Um erste Informationen über den Interaktionsbereich zwischen der AdR und des Adx zu erhalten, wurden NMR-Messungen des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx in Ab- und Anwesenheit seines Interaktionspartners AdR durchgeführt. Die dabei auftretende Chemische-Verschiebungsänderung gab erste Informationen über den Interaktionsbereich.

Für die Bestimmung von weitreichenden Distanzinformationen zwischen der AdR und dem Adx wurden zunächst AdR-Mutanten hergestellt, die jeweils ein exponiertes Cysteinpaar an definierten Positionen auf der AdR-Oberfläche enthalten. Die Cysteinpaare wurden genutzt, um die CLaNP-5 (*Caged Lanthanide NMR Probe-5*) anzubringen, in die entweder das diamagnetische Lanthanoid Lutetium, oder die paramagnetischen Lanthanoide Thulium und Gadolinium ligiert wurden. Die unterschiedlichen Effekte der paramagnetischen Lanthanoide wurden genutzt, um den Interaktionsbereich zwischen beiden Reaktionspartnern zu untersuchen.

Die AdR enthält insgesamt fünf Cysteine, die der Kristallstruktur (PDB Eintrag: 1E6E) nach teilweise exponiert und teilweise im Proteininnern vorliegen. Keines der exponierten Cysteine konnte verwendet werden, um die Ln-CLaNP-5 anzubringen, da sie, wie im Folgenden näher behandelt wird, entweder nicht die nötige Distanz zueinander besitzen oder ihre Position zueinander ungünstig ist. Daher sah die Strategie zu Beginn der Arbeit vor, eine AdR-Fünffachmutante herzustellen, in der alle Cysteine zu Serin mutiert werden sollten. Dadurch sollte eine unspezifische Bindung der Ln-CLaNP-5 vermieden werden. Die Mutation zu Serin erfolgte, um möglichst keine Strukturveränderung durch Aufhebung oder Neubildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu verursachen. Der nächste

Schritt beinhaltete die Einführung von Cysteinpaaren auf der AdR-Oberfläche.

3.1 Herstellung der AdR-Mutanten

3.1.1 Herstellung der AdR-Fünffachmutante

Die Strategie zu Beginn dieser Arbeit war zunächst, eine stabile AdR-Fünffachmutante (AdR_C10S/C74S/C145S/C322S/C364S) herzustellen, in der die fünf Cysteine gegen Serin ausgetauscht wurden. Die Betrachtung der AdR (PDB Eintrag: 1E6E) ergab, dass keines der vorhandenen Cysteinpaare verwendet werden konnte, um die NMR-Sonde Ln-CLaNP-5 anzubringen. Hierzu ist ein Cysteinpaar nötig, in dem die Cysteine eine Entfernung von 8 ± 2 Å zum Lanthanoid und zueinander aufweisen müssen (Keizers *et al.*, 2008). Die folgende Abbildung zeigt die Cysteine und ausgewählte Entfernungen zueinander.

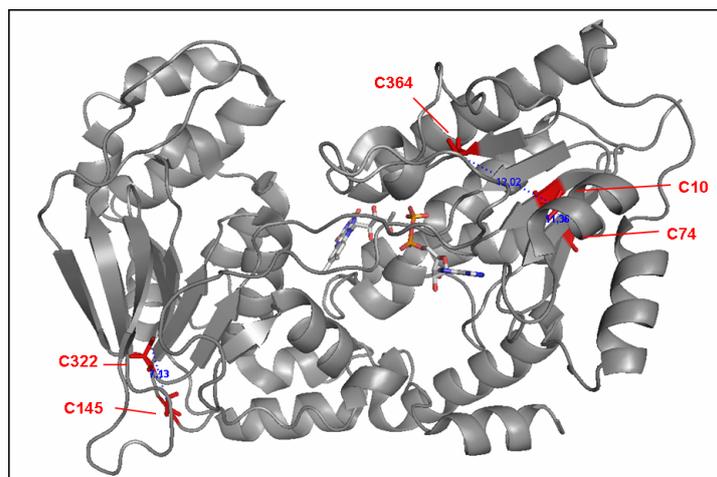


Abbildung 3.1: Dreidimensionale Struktur der AdR in grau. Die fünf Cysteine C10, C74, C145, C322 und C364 sind als Stabmodell rot gekennzeichnet. Die Distanz zwischen den ausgewählten Cysteinen beträgt: C322 - C145: 7,13 Å, C364 - C10: 12,02 Å und C10 - C74: 11,36 Å.

Die Cysteine C10, C74 und C364 sind in der FAD-Domäne lokalisiert. Die Distanz zwischen den Cysteinen C364 und C10 beträgt 12,02 Å, während die Cysteine C10 und C74 eine Entfernung von 11,36 Å aufweisen. Damit liegen sie zu weit voneinander entfernt, um die NMR-Sonde anzubringen. Die Cysteine C145 und C322 weisen hingegen eine Distanz von 7,13 Å auf und liegen innerhalb der benötigten Distanz von 8 ± 2 Å. Diese beiden Cysteine liegen allerdings, wie in der Sekundärstruktur zu erkennen ist (Abbil-

3 Ergebnisse

dung 3.2), nicht unmittelbar hintereinander, sondern auf unterschiedlichen Schleifen und bieten damit nicht die nötige Rigidität.

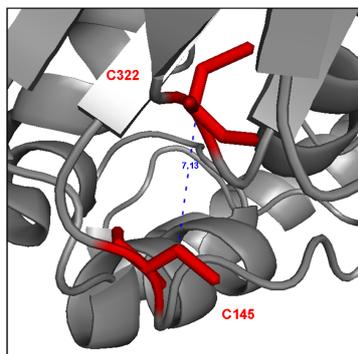


Abbildung 3.2: Gezeigt wird ein Ausschnitt der FAD-Domäne der AdR in grau. Die Cysteine C145 und C322 (rot) liegen auf zwei unterschiedlichen Schleifen. Die Distanz zwischen ihnen beträgt C322 - C145: 7,13 Å.

Als Ausgangspunkt zur Erzeugung der AdR-Fünffachmutante lag die AdR-Dreifachmutante (AdR_C10S/C145S/C364S) im Klonierungsvektor pMOSBlue vor. Bei dieser wurden die verbliebenen Cysteine C74 und C322 zu Serin mutiert, die Mutationen wurden mittels Sequenzierung verifiziert und anschließend wurde die mutierte DNA in den Expressionsvektor pCWori⁺ kloniert.

Expressions- und Reinigungsversuche der AdR-Fünffachmutante

Der nächste Schritt war die Expression und Reinigung der AdR-Fünffachmutante. Während der Expression und Reinigung wurden Proben für die SDS-PAGE entnommen und auf Anwesenheit der AdR geprüft. Wie in Abbildung 3.3 zu sehen ist, befindet sich in der löslichen Fraktion (4) keine nachweisbare AdR-Mutante. Daher wurde während einer weiteren Reinigung das Pellet untersucht.

3 Ergebnisse

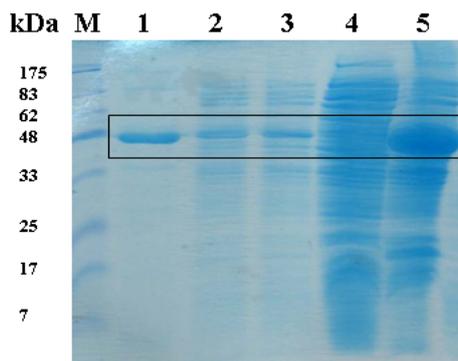


Abbildung 3.3: SDS-PAGE der Reinigung der AdR-Fünffachmutante. (M) Protein Marker, (1) AdRWT, (2/3) vor/nach Zellaufschluss, (4) Überstand nach Ultrazentrifugation, (5) Pellet nach Ultrazentrifugation.

In Abbildung 3.3 ist deutlich zu erkennen, dass die Reduktase exprimiert, aber in der Pelletfraktion (5) nachgewiesen werden konnte.

Solubilisierungsversuche

Mit der Annahme, dass die Mutationen in der AdR deren Löslichkeit verändert haben könnten, wurden Solubilisierungsversuche durchgeführt. Diese erfolgten unter Verwendung der Detergenzien Natriumcholat und Tween 20. Natriumcholat wird vorzugsweise für die Solubilisierung membranintegrierter Proteine verwendet, während Tween 20 für membranassoziierte Proteine eingesetzt wird. Die Solubilisierungsstärke wird durch Zugabe von 0,5 M NaCl erhöht. Nach dem Zellaufschluss (2) wurde das Zellysate geteilt und jeweils mit entweder Natriumcholat und 0,5 M NaCl (Solub.I) oder mit Tween 20 und 0,5 M NaCl (Solub.II) versetzt und gerührt.

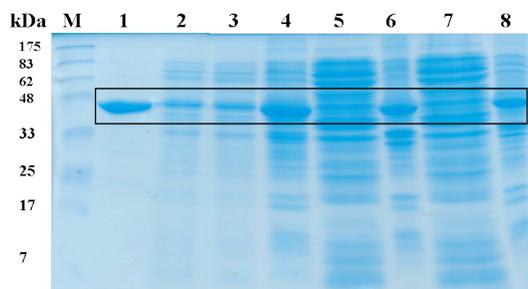


Abbildung 3.4: SDS-PAGE der Solubilisierungsversuche der AdR-Fünffachmutante. (M) Protein Marker, (1) AdRWT, (2/3) vor/nach Zellaufschluss, (4) nach NaCl-Zugabe, (5/6) Solub.I: Überstand/Pellet, (7/8) Solub.II: Überstand/Pellet.

Wie in Abbildung 3.4 zu erkennen ist, konnte trotz der eingesetzten Detergenzien

3 Ergebnisse

Natriumcholat (5) und Tween 20 (7) kein lösliches AdR im Überstand erhalten werden. Die AdR-Mutante wurde exprimiert, lag aber weiterhin in der Pelletfraktion vor.

Einschlusskörper

Somit wurde ein Nachweis auf Einschlusskörper durchgeführt. Hierzu wurden nacheinander die löslichen Proteine, die membranassoziierten und membranintegrierten Proteine abgetrennt. Der entscheidende Schritt erfolgte bei Zugabe des harnstoffhaltigen Puffers, der die im Pellet noch vorhandenen Proteine denaturierte. Die während der Durchführung entnommenen Proben wurden mittels SDS-PAGE überprüft.

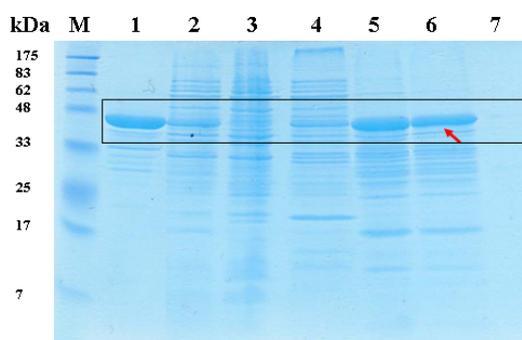


Abbildung 3.5: SDS-PAGE des Nachweises auf Einschlusskörper. (M) Protein Marker, (1) AdRWT, (2) nach Zellaufschluss, (3) Überstand nach Ultrazentrifugation (enthält lösliches Protein), (4) Überstand nach Zugabe des Lysepuffers (enthält membranassoziierte und -integrierte Proteine), (5) Überstand versetzt mit 8 M harnstoffhaltigem Solubilisierungspuffer, (6) Überstand nach Ultrazentrifugation. AdR gelöst in Harnstoff angezeigt durch roten Pfeil, (7) Pellet nach Ultrazentrifugation (frei von Proteinen).

In Spur 6 ist deutlich eine Bande zu erkennen, welche die AdR-Fünffachmutante anzeigt. Durch Harnstoffzugabe liegt es denaturiert in der löslichen Fraktion (6) vor. Das Protein akkumulierte somit in Einschlusskörpern.

Chaperonsysteme

Chaperone sind Proteine, die andere Proteine während ihrer Faltung unterstützen. Um eine native AdR-Fünffachmutante zu erhalten, kamen die beiden Chaperonplasmide pRDKJG und pREP4groESL zum Einsatz. Während der Reinigung wurden Proben für die SDS-PAGE entnommen und untersucht.

3 Ergebnisse

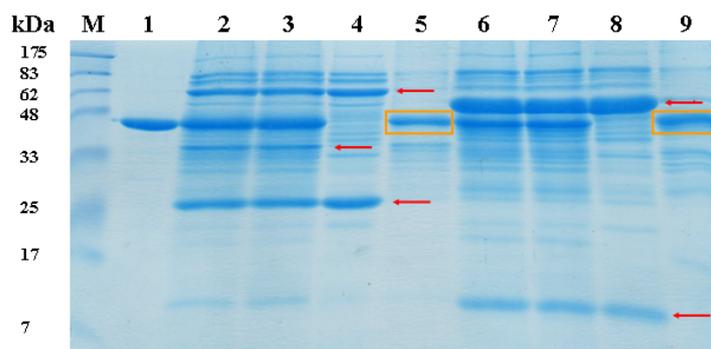


Abbildung 3.6: SDS-PAGE nach Einsatz der Chaperonplasmide. Proben 2-5 stammen aus der Koexpression mit pRDKJG und 6-9 mit pREP4groESL. (M) Protein Marker, (1) AdRWT, (2/3) vor/nach Zellaufschluss, (4) Überstand nach Ultrazentrifugation, (5) Pellet nach Ultrazentrifugation, (6/7) vor/nach Zellaufschluss, (8) Überstand nach Ultrazentrifugation, (9) Pellet nach Ultrazentrifugation. Im Pellet detektiertes AdR wird durch Umrahmung gekennzeichnet, während die Chaperone mit einem roten Pfeil angezeigt werden.

Wie in Abbildung 3.6 zu erkennen ist, wurden die Chaperone DnaK (69 kDa), DnaJ (41 kDa) und GrpE (24 kDa) exprimiert (Spuren 2-4), während in Spur 5 die AdR-Fünffachmutante im Pellet nachgewiesen wurde. Auch die Expression der Chaperone des zweiten Systems (GroEL: 60 kDa, GroES: 10 kDa) war erfolgreich (Spuren 6-8). In Spur 9 wurde die AdR-Mutante erneut im Pellet nachgewiesen. Der Einsatz der Chaperonplasmide führte somit zu keiner löslichen AdR-Fünffachmutante.

Expressionsversuche durch Einsatz des pET17b-Expressionsplasmids

Für die Expression der AdR-Fünffachmutante wurde weiterhin das Expressionsplasmid pET17b herangezogen. Hierzu wurde die AdR-Mutante in pET17b kloniert und Expressionsversuche gestartet. Die Induktion erfolgte in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 0,25, 0,5 und 1 mM IPTG. Während der Reinigung wurden nach Zellaufschluss und Zentrifugation Proben aus dem Überstand und Pellet entnommen. Auch hier konnte keine lösliche AdR-Fünffachmutante mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden. Das Protein wurde erneut in der Pelletfraktion detektiert.

Neben einer Expressionstemperatur von 25°C wurden zusätzlich niedrigere Temperaturen (22°C und 20°C) getestet. Auch eine verringerte Expressionstemperatur führte zu keiner nativen AdR-Mutante.

An dieser Stelle kann zusammengefasst werden, dass Expressionsversuche bei unterschiedlichen Temperaturen, mit Hilfe von Detergenzien und Chaperonplasmiden, sowie einem weiteren Expressionssystem zu keiner funktionsfähigen AdR-Fünffachmutante führten. Es musste eine neue Strategie gewählt werden, um eine AdR-Mutante zu erzeugen, in die für die Interaktionsmessungen mit Adx Cysteinpaare eingefügt werden konnten. Ausserdem musste gewährleistet werden, dass kein unspezifisches Binden der NMR-Sonde erfolgt.

Ziel war es nun, eine AdR-Mutante herzustellen, die keine exponierten Cysteine besitzt. Hierzu wurden zunächst die exponierten Cysteine bestimmt.

3.1.2 Herstellung der AdR-Dreifachmutante

Die Expression und Reinigung lieferte bis zu diesem Zeitpunkt keine funktionsfähige AdR-Fünffachmutante. Ziel war es nun, möglichst wenige Cysteine in der AdR zu Serin zu mutieren, um dessen Funktionsfähigkeit nicht zu beeinträchtigen. Die Bindung der CLaNP-5 erfolgt an definierte Positionen auf der AdR-Oberfläche, so dass nur die exponierten Cysteine mutiert werden müssen, um eine spezifische Bindung der NMR-Sonde zu gewährleisten.

Für die Bestimmung der exponierten Cysteine wurden die fünf AdR-Einfachmutanten exprimiert und gereinigt. Die Bestimmung der frei zugänglichen Cysteine erfolgte zunächst unter Einsatz eines Kits.

Thiolbestimmung mittels des *Thiol Quantitation Kits*

Für die Bestimmung der exponierten Cysteine wurden der AdRWT und alle fünf AdR-Einfachmutanten getestet. Der AdRWT enthält fünf Cysteine, während in den Einfachmutanten jeweils nur vier Cysteine vorliegen. Die Thiol-Quantifizierung wurde anhand der Herstellerangaben durchgeführt. In der folgenden Tabelle sind die quantifizierten Cysteine im AdRWT, sowie der Einfachmutanten aufgeführt. Es wurden insgesamt 7 unabhängige Versuchsreihen durchgeführt.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.1: Thiolbestimmung anhand des *Thiol Quantitation Kits*

Exp.	AdRWT	AdR_C10S	AdR_C74S	AdR_C145S	AdR_C322S	AdR_C364S
1	3,35	2,26	2,72	3,11	3,09	2,43
2	2,99	1,81	1,96	2,52	2,08	2,77
3	2,83	1,62	2,03	2,57	2,80	3,30
4	2,92	2,32	2,83	2,56	2,45	2,65
5	2,66	2,47	2,08	2,98	2,38	3,04
6	2,73	2,53	2,36	2,42	2,84	2,71
7	2,64	2,58	2,98	2,95	3,21	2,88
	$2,90 \pm 0,25$	$2,23 \pm 0,37$	$2,33 \pm 0,42$	$2,79 \pm 0,27$	$2,54 \pm 0,41$	$2,87 \pm 0,28$

Bestimmt wurden anhand dieses Test drei exponierte Cysteine im AdRWT, während für die Mutante AdR_C10S zwei und für die Mutanten AdR_C145S und AdR_C364S drei Cysteine bestimmt wurden. Für die Mutanten AdR_C74S und AdR_C322S wurden 2,3 bzw. 2,5 Cysteine auf der Proteinoberfläche lokalisiert. In diesen beiden Fällen könnten also zwei oder drei Cysteine exponiert vorliegen, bzw. es könnte eine partielle Zugänglichkeit vorhanden sein.

Bei Betrachtung der Messwerte innerhalb der Messreihen der einzelnen AdR-Formen wurden für alle Mutanten Differenzen von bis zu einem Cystein beobachtet, was zu nicht unerheblichen Schwankungen um den Mittelwert führte. Als Konsequenz war es anhand dieses Experiments nicht möglich auszusagen, welche der fünf Cysteine definitiv exponiert vorliegen. Daher wurde ein weiteres Experiment gewählt und durchgeführt, dessen Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden.

Thiolbestimmung mittels 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)

Eine weitere Methode zur Bestimmung exponierter Cysteine erfolgte mit Hilfe von 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB). Hierbei reagiert das DTNB mit zugänglichen Cysteinen zu einem gemischten Disulfid und setzt dabei dem Thiol äquivalente Mengen 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB) frei, welches aufgrund seiner intensiv gelben Färbung bei 412 nm detektiert werden kann.

Zur Bestimmung der Cysteine, die an der Oberfläche liegen und derer, die ins Innere der AdR reichen, wurden Messungen des Proteins sowohl im nativen, als auch im denatu-

3 Ergebnisse

rierten Zustand durchgeführt. Das Verhältnis zwischen beiden Formen gibt die Zahl der exponierten Cysteine an. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Thiol-Gruppen Quantifizierung mittels 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure).

AdR-Formen	im Protein vorhandene Cysteine	native AdR SH-Gruppen (nmol)	denaturierte AdR SH-Gruppen (nmol)	Verhältnis der SH-Gruppen nativ:denaturiert
Wildtyp	5	2,11 ± 0,07	3,57 ± 0,09	0,59 ± 0,03
AdR_C10S	4	2,28 ± 0,24	3,18 ± 0,24	0,72 ± 0,05
AdR_C74S	4	1,45 ± 0,16	3,03 ± 0,20	0,49 ± 0,02
AdR_C145S	4	1,80 ± 0,14	3,40 ± 0,31	0,53 ± 0,02
AdR_C322S	4	1,69 ± 0,16	3,31 ± 0,34	0,51 ± 0,03
AdR_C364S	4	2,37 ± 0,24	3,48 ± 0,36	0,70 ± 0,03

Der AdRWT enthält fünf Cysteine, während alle fünf Einfachmutanten insgesamt nur vier Cysteine besitzen. Unter Verwendung des DTNB wurden für den AdRWT drei von fünf Cysteinen an der Oberfläche bestimmt. Der Anteil an Thiol-Gruppen für die beiden Einfachmutanten AdR_C10S und AdR_C364S liegt bei drei Cysteinen. Somit liegen sowohl C10 als auch C364 im Proteininnern und können erst durch Zugabe des Denaturierungsmittels nachgewiesen werden. Für die Mutanten AdR_C74S, AdR_C145S und AdR_C322S wurden zwei der vier vorhandenen Cysteine auf der Oberfläche nachgewiesen. Somit wurden im Gegensatz zum ersten Test hier für die Mutanten AdR_C10S und AdR_C145S klar drei bzw. zwei exponierte Cysteine ermittelt. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Cysteine C74, C145 und C322 exponiert vorliegen, während C10 und C364 im Proteininnern zu finden sind.

Expression und Reinigung der AdR-Mutante AdR_C74S/C145S/C322S

Anhand der durchgeführten Thiolgruppenbestimmung wurde folglich eine AdR-Dreifachmutante hergestellt (AdR_C74S/C145S/C322S), exprimiert und gereinigt. Während der Reinigung wurden Proben entnommen und auf die Anwesenheit der AdR-Dreifachmutante mittels SDS-PAGE geprüft. Wie bereits bei der AdR-Fünffachmutante beobachtet werden konnte, war auch diese Mutante nicht im Überstand nachweisbar und

wurde erneut in der Pelletfraktion detektiert.

Parallel zu den Expressions- und Reinigungsversuchen wurden die fünf AdR-Einfachmutanten exprimiert, gereinigt und auf ihre Stabilität bei Zugabe der NMR-Sonde geprüft (Universität Leiden, Niederlande). Die Einfachmutanten AdR_C145S und AdR_C364S zeigten die höchste Stabilität bei Ln-CLaNP-5 Zugabe. Sie wurden daher als Ausgangsmutanten für die Einführung weiterer Mutationen (Cysteine zur Anbringung des Ln-CLaNP-5) verwendet.

3.1.3 Herstellung der Mutanten AdR_A und AdR_B

Auswahl der einzuführenden Cysteinpaare

Die Auswahl der Cysteinpaare sind von großer Bedeutung für das Anbringen der Ln-CLaNP-5. Hierzu müssen folgende Bedingungen erfüllt werden. Die Cysteinpaare sollten eine Entfernung von 8 ± 2 Å zueinander aufweisen, damit die Kopplung der NMR-Sonde möglich wird. Auch die Position der NMR-Sonde auf der AdR-Oberfläche ist für den Effekt des Lanthanoids auf das Adx-Rückgrat von Bedeutung. Der Effekt der Lanthanoide sollte sich auf das gesamte Adx auswirken. Die ausgewählte Position für die Ln-CLaNP-5 sollte außerdem möglichst rigide sein.

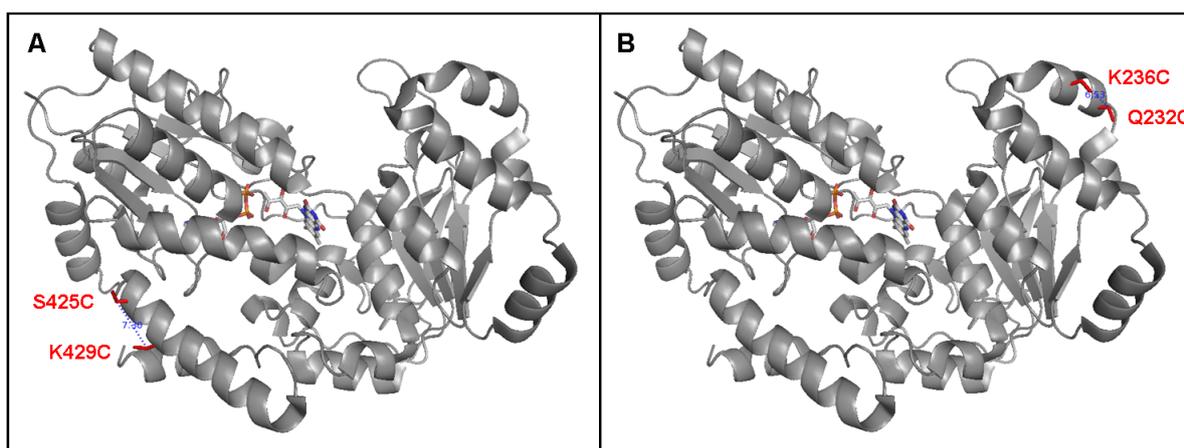


Abbildung 3.7: Dreidimensionale Struktur der AdR in grau. (A) AdR_A enthält das Cysteinpaar S425C/K429C, dargestellt als Stabmodell (rot). (B) AdR_B enthält das Cysteinpaar Q232C/K236C als Stabmodell in rot dargestellt. Die Distanz beträgt 7,30 Å für S425C/K429C und 6,53 Å für Q232C/K236C.

Wie Abbildung 3.7 zeigt, ist das Cysteinpaar Q232C/K236C auf der NADPH-Domäne

und S425C/K429C auf der FAD-Domäne lokalisiert. Die Entfernungen der Cysteine zueinander liegen bei 6,53 Å bzw. 7,30 Å. Beide Cysteinpaare liegen jeweils in einer α -Helix vor. Damit ist die rigide Positionierung der CLaNP-5 gewährleistet.

Expression und Reinigung der Mutanten AdR_A und AdR_B

In AdR_C364S wurde mittels der zielgerichteten Mutagenese das Cysteinpaar S425C/K429C (AdR_A) eingefügt, während in die Doppelmutante AdR_C145S/C364S das Cysteinpaar Q232C/K236C (AdR_B) eingefügt wurde, gefolgt von ihrer Expression und Reinigung.

Für die NMR-Experimente und das Anbringen der NMR-Sonde konnte unter den bisherigen Bedingungen keine ausreichende Menge an Protein unter Verwendung des *E. coli* Stammes JM109 erhalten werden (Tabelle 3.3). Daher wurde ein weiterer *E. coli* Stamm für die Expression getestet. C43(DE3) besitzt die Besonderheit, membranassoziierte und membranintegrierte Proteine in einem höheren Maß zu exprimieren. Durch eine unbekannte Doppelmutation in diesem Stamm enthält sie zusätzliche Membraneinstülpungen, an welche die Proteine während der Expression assoziieren oder in die sie integriert werden können (Miroux & Walker, 1996). Darüber hinaus wurde ein IPTG-Screening durchgeführt, um die Expressionsrate zu steigern.

3.1.4 Optimierte heterologe Expression und Reinigung der AdR-Mutanten

Um eine erfolgreiche heterologe Expression mit hoher Ausbeute erhalten zu können, wurde vor Expressionsbeginn ein IPTG-Screening durchgeführt. Getestet wurden der *E. coli* Stamm JM109 in An- und Abwesenheit des Chaperonplasmids pGro12 und C43(DE3) in Anwesenheit des Plasmids pGro12. Das IPTG-Screening wurde für alle AdR-Formen angewendet.

Mit den aus dem Screening erhaltenen Kolonien wurde die Expression durchgeführt. In der nachfolgenden Tabelle 3.3 sind die Expressionsraten für die Mutanten im Vergleich zum AdRWT aufgeführt.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.3: Expressionsraten aller AdR-Formen.

AdR-Formen	JM109 [nmol/l]	JM109/pGro12 [nmol/l]	C43(DE3)/pGro12 [nmol/l]
Wildtyp	12	27	76
AdR_C10S	2	4	52
AdR_C74S	6	16	61
AdR_C145S	6	13	58
AdR_C322S	10	9	54
AdR_C364S	8	14	55
AdR_A	-	9,6	31,4 ± 9,5
AdR_B	-	9,5	35,9 ± 7,9

Die heterologe Koexpression im *E. coli* Stamm JM109 mit dem Chaperonplasmid pGro12 führte zu einer Steigerung der Expressionsrate um das 1,8- bis 2,7-fache für den AdRWT und die Mutanten AdR_C10S, AdR_C74S, AdR_C145S und AdR_C364S. Die Mutante AdR_C322S zeigte eine gleichbleibende Expressionsrate.

Die Mehrfachmutanten wurden direkt im *E. coli* Stamm JM109 mit dem Plasmid pGro12 koexprimiert. Die Ausbeute beider Mutanten lag im Vergleich zum AdRWT bei etwa 35 %.

Der anschließende Wechsel des *E. coli* Stammes JM109 zum C43(DE3) Stamm führte, wie erwartet, unter Einsatz des Chaperonplasmids zu einer Erhöhung der Expressionsrate. Die Ausbeute des AdRWT verdreifachte sich, während im Fall der Einfachmutanten das 3,8- bis 6-fache im Vergleich zum JM109 Stamm erhalten wurde. Für die Einfachmutante AdR_C10S konnte sogar eine Erhöhung um das 13-fache erreicht werden. Die Expressionsrate für die Mehrfachmutanten erhöhte sich um das 3- bis 3,5-fache.

Aufgrund der erfolgreichen Steigerung der Expressionsrate wurde der *E. coli* Stamm C43(DE3) in Kombination mit dem Chaperonplasmid pGro12 gewählt, um die benötigte Menge Protein zu exprimieren. Insgesamt wurden für die NMR-Messungen 67 mg (1289 nmol) der AdR_A und 75 mg (1442 nmol) der AdR_B hergestellt.

Die Reinheit des AdRWT und der Mutanten wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

3 Ergebnisse

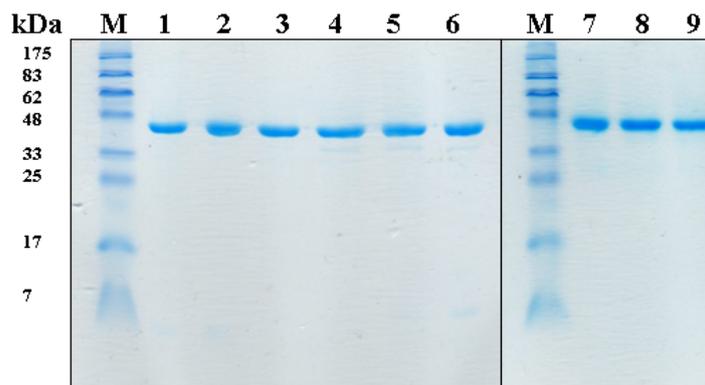


Abbildung 3.8: SDS-PAGE der AdR-Formen. (M) Protein Marker, (1) AdRWT, (2) AdR_C10S, (3) AdR_C74S, (4) AdR_C145S, (5) AdR_C322S, (6) AdR_C364S, (7) AdRWT, (8) AdR_A, (9) AdR_B.

Wie in Abbildung 3.8 zu sehen ist, wurden reine Proteinlösungen des AdRWT, sowie aller Einfach- und Mehrfachmutanten erhalten.

3.2 Charakterisierung der AdR-Mutanten

3.2.1 UV/Vis-spektroskopische Eigenschaften

Der korrekte Einbau des FAD in die AdR wurde mittels der UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Der Wildtyp der oxidierten AdR weist charakteristische Maxima bei 376 und 450 nm auf und besitzt außerdem Schultern bei 425 und 450 nm. Der Vergleich der Mutanten mit dem Wildtypen gibt klare Aussagen über den korrekten Einbau des FAD und damit evtl. auftretender struktureller Unterschiede.

Die folgende Abbildung zeigt jeweils die Spektren des AdRWT und der Einfachmutanten (Abbildung 3.9 A) und der Mehrfachmutanten (Abbildung 3.9 B).

Die Spektren der Einfach- und Mehrfachmutanten zeigen dieselben charakteristischen Maxima bei 376 und 450 nm und Schultern bei 425 und 475 nm wie der Wildtyp (Sagara *et al.*, 1993). Daraus kann geschlossen werden, dass der Einbau des FAD durch keine der in die AdR eingeführten Mutationen gestört wird.

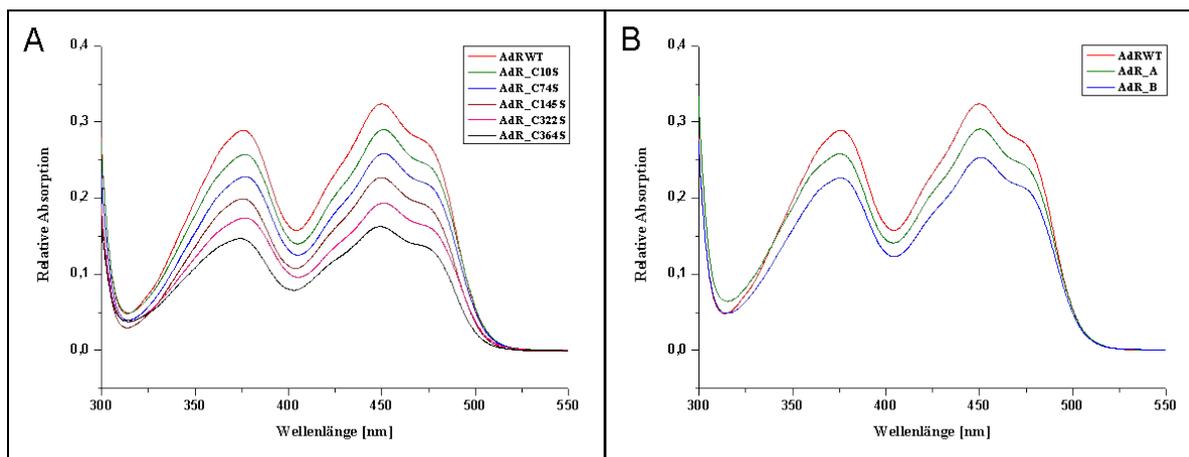


Abbildung 3.9: UV/Vis-Spektren der (A) Einfach- und (B) Mehrfachmutanten im Vergleich zum AdRWT. Die Spektren wurden im Bereich von 300 - 550 nm in 0,2 cm Quarzküvetten aufgenommen. Die Proteine lagen im Elutionspuffer (50 mM KPP, pH 7,4, 0,1 mM DTE, 0,1 mM EDTA, 0,7 M KCl) vor. Um einen besseren Vergleich zwischen dem Wildtypen und den Mutanten zu ermöglichen, wurden die Einfachmutanten mit einem Faktor von 0,2 bis 0,6 und die Mehrfachmutanten mit einem Faktor von 1,35 bzw. 1,3 multipliziert.

3.2.2 Circular-Dichroismus-Spektroskopie

Die Methode der Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD) wurde eingesetzt, um zu überprüfen, ob sich die FAD-Region nach Einführung der Mutationen geändert hat. Die CD-Messungen erstreckten sich über den nahen UV (250 - 320 nm) und den sichtbaren Bereich (320 - 650 nm). Wie in den Abbildungen 3.10 A und B ersichtlich ist, weisen alle Mutanten das für den AdRWT charakteristische Spektrum auf.

Im nahen UV zwischen 250 - 278 nm weisen alle AdR-Formen eine negative Elliptizität auf, während im Bereich zwischen 278 - 403 nm das Signal positiver Natur ist. Im Bereich zwischen 403 - 497 nm kommt es zu einer negativen Elliptizität. Ab einer Wellenlänge von 497 nm steigt der Wert wieder ins Positive.

Im sichtbaren Bereich liegt das Minimum zwischen 450 - 452 nm. Dieser Cotton-Effekt beruht auf dem FAD, welches das links-drehende Licht absorbiert. Der negative Cotton-Effekt bei 450 nm mit der Schulter bei etwa 474 - 476 nm entspricht dabei dem umgekehrten Spektrum des Absorptionsspektrums der AdR (475 nm). Im Bereich zwischen 400 - 430 nm ist eine leichte Schulterbildung zu beobachten, die dem umgekehrten Absorptionsspektrum entspricht (425 nm). Der positive Cotton-Effekt bei 376 ist eben-

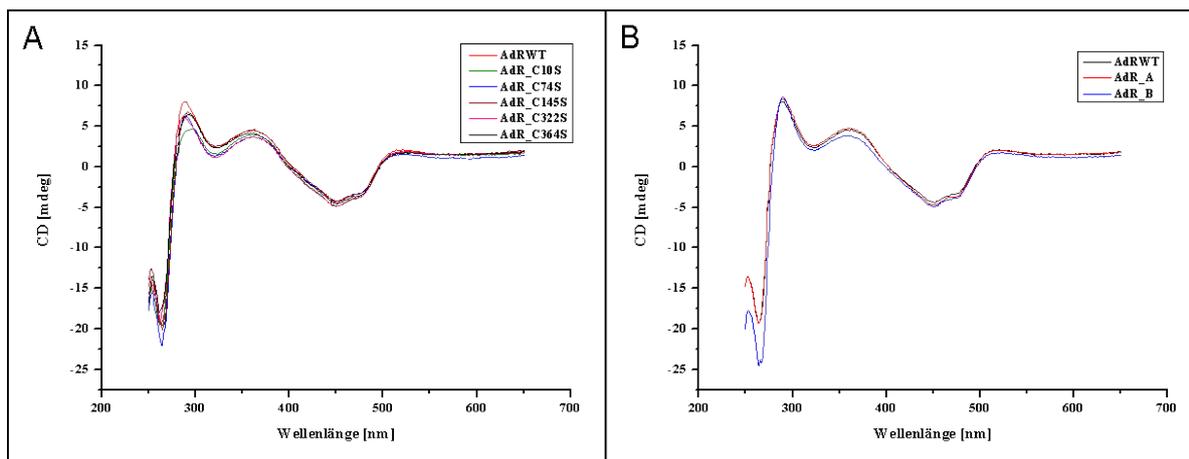


Abbildung 3.10: Circular-Dichroismus-Spektren des AdRWT und (A) der Einfachmutanten und (B) der Mehrfachmutanten im oxidierten Zustand im Bereich von 250 - 650 nm. Die Proteine wurden in 50 mM HEPES Puffer (pH 7,4) mit 0,05% Tween 20 aufgenommen. Die Messungen wurden in einer 1 cm Küvette bei 20°C in einem Jasco 715 Spektropolarimeter durchgeführt.

falls charakteristisch für AdR, da auch hier im UV/Vis-Absorptionsspektrum ein Peak erhalten wird (376 nm).

3.2.3 Thermische Denaturierung

Die thermische Denaturierung der oxidierten AdR-Formen wurde durchgeführt, um den Einfluss der Mutationen in der AdR zu untersuchen. Da bei einer Wellenlänge von 264 nm das stärkste CD-Signal beobachtet wurde, wurde die Denaturierung mittels der CD-Spektroskopie bei dieser Wellenlänge verfolgt. Aus den erhaltenen Kurven konnte die Schmelztemperatur (T_d) ermittelt werden, bei der das Protein zu 50 % denaturiert vorliegt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.4: Thermische Denaturierung des AdRWT und der Mutanten. Die Schmelztemperaturen wurden aus den Kurven der Signaländerung (264 nm) ermittelt. Die AdR-Formen mit einer Konzentration von 10 μ M lagen in 50 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) versetzt mit 0,05 % Tween 20 vor. Die thermische Denaturierung wurde zwischen 20 und 70°C verfolgt.

AdR-Formen	T_d ($^{\circ}$ C)
Wildtyp	$46,15 \pm 0,54$
AdR_C10S	$43,27 \pm 0,06$
AdR_C74S	$40,79 \pm 1,87$
AdR_C145S	$43,98 \pm 0,68$
AdR_C322S	$42,70 \pm 4,27$
AdR_C364S	$41,58 \pm 1,26$
AdR_A	$39,85 \pm 0,72$
AdR_B	$39,71 \pm 1,49$

Die Schmelztemperatur für den AdRWT beträgt 46,15°C, während die Einfachmutanten bis zu 5,4°C niedrigere Schmelztemperaturen aufwiesen. Die Schmelztemperaturen liegen bei beiden Mehrfachmutanten noch mal um 0,94°C bzw. 1,08°C niedriger und weisen, verglichen zum AdRWT, die geringste thermische Stabilität auf.

3.2.4 Bestimmung des FAD-Gehalts in den AdR-Mutanten

Um den FAD-Gehalt der Proteinlösungen zu bestimmen, wurde ein UV/Vis-Spektrum der nativen Proteinlösung aufgenommen und deren Konzentrationen ermittelt. Anschließend wurden die Proteine in Lösung thermisch denaturiert und die FAD-Konzentration des Überstandes ermittelt. Die daraus resultierenden Stoffmengen für die Proteine und des FADs sind in Tabelle 3.5 zueinander ins Verhältnis gesetzt.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.5: Bestimmung des FAD-Gehaltes der AdR-Formen in Lösung. Die Proteine lagen in 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) vor. Die UV/Vis-Spektren wurden in einem Bereich von 250 - 550 nm aufgenommen.

AdR-Formen	Protein [nmol]	FAD [nmol]	FAD/Protein [nmol]
Wildtyp	5,75 ± 0,22	5,19 ± 0,29	0,90 ± 0,02
AdR_C10S	6,07 ± 0,05	5,41 ± 0,13	0,89 ± 0,02
AdR_C74S	5,97 ± 0,31	5,51 ± 0,09	0,92 ± 0,04
AdR_C145S	6,30 ± 0,40	5,63 ± 0,26	0,90 ± 0,02
AdR_C322S	5,85 ± 0,22	5,36 ± 0,19	0,92 ± 0,01
AdR_C364S	6,25 ± 0,21	5,79 ± 0,50	0,93 ± 0,06
AdR_A	6,27 ± 0,51	5,63 ± 0,31	0,90 ± 0,05
AdR_B	6,73 ± 0,12	5,88 ± 0,02	0,88 ± 0,22

Anhand der ermittelten FAD/Protein-Verhältnisse wurden für alle Proteinlösungen 1 FAD/AdR ermittelt. Damit kann man davon ausgehen, dass alle vorhandenen FAD-Moleküle nicht frei in Lösung, sondern in AdR vorliegen.

3.2.5 Reduktionsfähigkeit der AdR-Mutanten

Die Reduktionsfähigkeit der AdR-Mutanten wurde mit seinem physiologischen Reaktionspartner Adx überprüft. Die oxidierte Form des Adx zeigt Absorptionsmaxima bei 320, 414 und 455 nm (Grinberg *et al.*, 2000). Nach Reduktion des Adx ist die Abnahme der Maxima bei 320 und 414 nm zu beobachten, die mit einer zusätzlichen Maximumausbildung bei 540 nm einhergeht (Estabrook *et al.*, 1973). Die Reduktion wurde durch NADPH initiiert und im Wellenlängenbereich zwischen 200 und 700 nm aufgenommen. Die erhaltenen Spektren sind in den Abbildungen 3.11 A und B dargestellt.

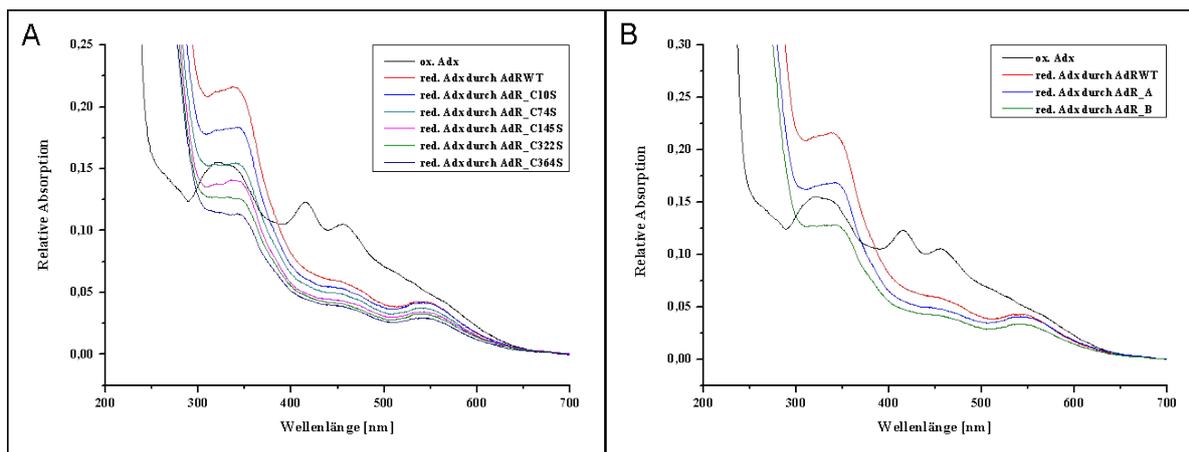


Abbildung 3.11: UV/Vis-Spektren des oxidierten und des durch den AdRWT, (A) der Einfachmutanten und (B) der Mehrfachmutanten reduzierten Adx. Die Spektren wurden in einer 0,2 cm Quartzküvette im Bereich von 200 - 700 nm aufgenommen. Alle Proben enthielten 50 μM Adx sowie 5 μM AdR und lagen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) vor. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μM NADPH initiiert. Die Spektren wurden zur besseren Übersicht mit einem Faktor zwischen 0,95 und 1,4 multipliziert.

Die Abnahme der Maxima bei 414 und 455 nm und Absorptionszunahme bei 540 nm zeigten, dass das Adx durch alle AdR-Formen reduziert werden konnte.

3.2.6 Reduktion des Cytochrom *c*

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktion zwischen AdR und Adx zu untersuchen. Somit ist es von besonderer Bedeutung, dass die in AdR eingeführten Mutationen weder zu einer strukturellen Änderung noch zu einer Interaktionsstörung und damit verbundenen Aktivitätsänderung führen. Um diesen letzten Punkt genauer zu untersuchen, wurden die Reduktionsgeschwindigkeit von Adx durch NADPH reduziertes AdR und die anschließende Reduktion des artifiziellen Elektronenakzeptors Cytochrom *c* bestimmt. Dieses nicht-physiologische System eignet sich besonders gut, um kinetische Daten über die hergestellten AdR-Mutanten zu erhalten. Hierbei liegen sowohl NADPH als auch Cytochrom *c* im Überschuss vor. Die erhaltenen K_m - und V_{max} -Werte für Cytochrom *c* entsprechen den Daten für die Reduktionsgeschwindigkeit des Adx durch die AdR (Geren *et al.*, 1984; Cupp & Vickery, 1989; Coghlan & Vickery, 1991; Uhlmann *et al.*, 1994).

Es wurden der AdRWT sowie die Einfach- und Mehrfachmutanten vermessen. Die

3 Ergebnisse

Reduktionsgeschwindigkeit auf Cytochrom *c* wurde sowohl mit AdxWT, als auch Adx(4-108) durchgeführt (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Kinetische Daten der AdR-Mutanten im Cytochrom *c*-Test. Es wurde die Reduktion des artifiziellen Elektronenakzeptors Cytochrom *c* durch AdR-Adx betrachtet.

AdR-Formen	AdxWT		Adx(4-108)	
	K_m [μM]	V_{max} [nmol Cyt c_{red} /min]	K_m [μM]	V_{max} [nmol Cyt c_{red} /min]
Wildtyp	$0,40 \pm 0,20$	455 ± 58	$0,64 \pm 0,15$	478 ± 66
AdR_C10S	$0,55 \pm 0,05$	411 ± 33	$0,55 \pm 0,06$	461 ± 29
AdR_C74S	$0,55 \pm 0,17$	415 ± 72	$0,63 \pm 0,04$	491 ± 20
AdR_C145S	$0,58 \pm 0,15$	466 ± 84	$0,58 \pm 0,19$	481 ± 45
AdR_C322S	$0,51 \pm 0,08$	429 ± 64	$0,59 \pm 0,18$	439 ± 91
AdR_C364S	$0,54 \pm 0,06$	480 ± 19	$0,62 \pm 0,18$	455 ± 84
AdR_A	$1,28 \pm 0,52$	311 ± 86	$1,65 \pm 0,45$	384 ± 56
AdR_B	$0,79 \pm 0,12$	375 ± 31	$0,80 \pm 0,08$	430 ± 25

Die folgenden Abbildungen 3.12 und 3.13 ermöglichen den besseren Vergleich der erhaltenen K_m - und V_{max} -Werte für den AdxWT und dessen verkürzte Form Adx(4-108).

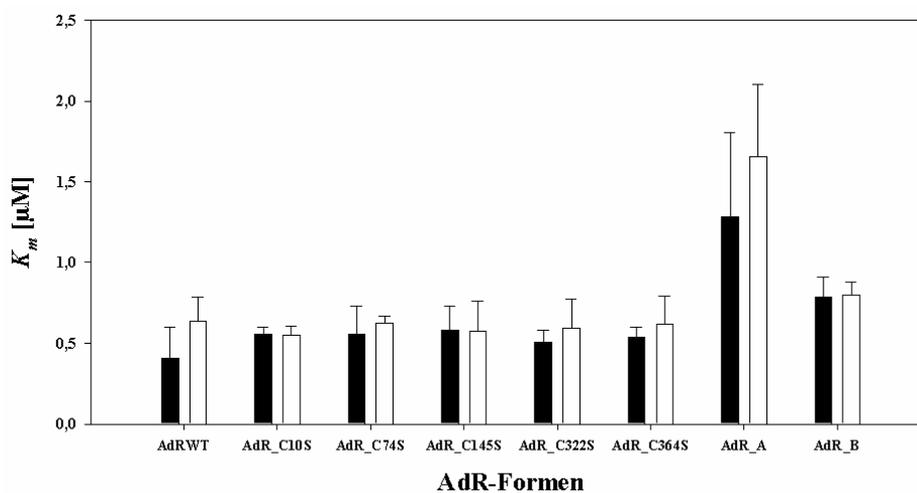


Abbildung 3.12: Absolute Änderung der K_m -Werte bei der Interaktion der AdR-Formen mit AdxWT (schwarz) und Adx(4-108) (weiss).

3 Ergebnisse

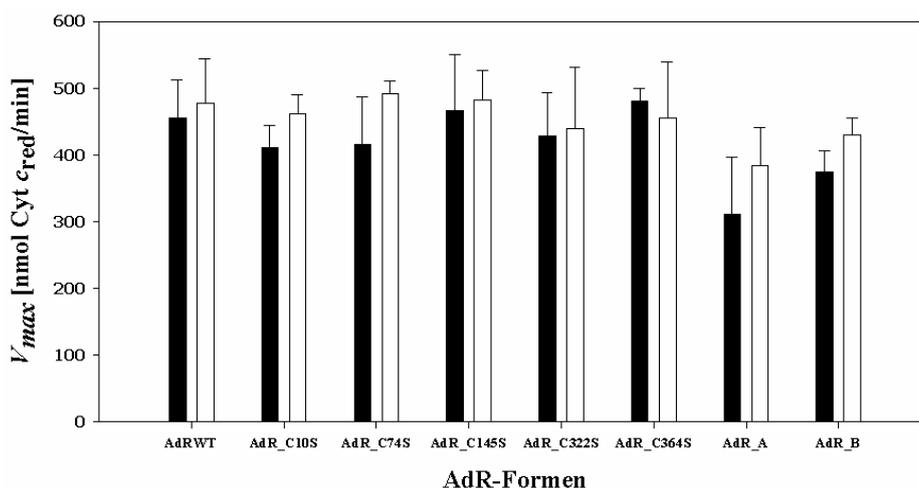


Abbildung 3.13: Absolute Änderung der V_{max} -Werte bei der Interaktion der AdR-Formen mit AdxWT (schwarz) und Adx(4-108) (weiss).

Im Vergleich zum AdRWT liegen die K_m -Werte der Einfachmutanten in der gleichen Größenordnung wie die des AdRWT in der Reaktion mit dem AdxWT. AdR_A zeigte im Vergleich zum AdRWT einen um 3,2-fach erhöhten K_m -Wert in der Reaktion mit AdxWT, während sich der K_m -Wert für die AdR_B-Mutante in der Wechselwirkung mit dem AdxWT um das 2,0-fache erhöhte.

Vergleicht man die V_{max} -Werte der Einfachmutanten mit dem des Wildtyps, so zeigen diese in der Reaktion mit dem AdxWT eine bis zu 9,7%ige Abweichung zum AdRWT. Auch ist der V_{max} -Wert in der Reaktion mit dem AdxWT für AdR_A um 31,6% und um 17,6% für AdR_B erhöht.

Auch in der Reaktion mit Adx(4-108) zeigten alle fünf AdR-Mutanten einen K_m -Wert in der gleichen Größenordnung wie der AdRWT. Allerdings zeigte AdR_A auch hier im Vergleich zum AdRWT einen um 2,6-fach erhöhten K_m -Wert bei Reaktion mit Adx(4-108), während sich der K_m -Wert für die Mutante AdR_B in der Wechselwirkung mit der verkürzten Form des Adx um das 0,3-fache erhöhte.

Die Reduktionsgeschwindigkeit durch die Reaktion mit den Einfachmutanten liegt auch in der gleichen Größenordnung wie die des AdRWT. Die Mutanten AdR_A (19,7%) und AdR_B (10,0%) zeigten eine etwas langsamere Reduktionsgeschwindigkeit in der Reaktion mit der verkürzten Adx-Form verglichen mit dem AdRWT.

Insgesamt zeigten alle für die AdR-Mutanten erhaltenen Werte keine signifikanten Unterschiede zur Wildtyp-Form der AdR, was durch einen durchgeführten t-Test gezeigt

werden konnte.

3.2.7 Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen AdR und Adx

Die Untersuchung der Reduktionsfähigkeit des Adx durch die verschiedenen AdR-Formen konnte in den vorhergehenden Abschnitten gezeigt werden, so dass nun die Interaktion zwischen diesen Reaktionspartnern näher betrachtet werden sollte. Hierzu wurde die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie als Methode gewählt. Diese Methode ermöglicht es, in Echtzeit die Assoziations- (k_a) und Dissoziationsrate (k_d) der AdR zum Adx zu ermitteln. Die daraus resultierende Dissoziationskonstante ($K_D=k_d/k_a$) gibt Aufschluß über die Stärke der Bindung der AdR zum AdxWT bzw. Adx(4-108). Untersucht wurden alle AdR-Mutanten.

Die erhaltenen Assoziations- und Dissoziationsraten und die daraus resultierenden Dissoziationskonstanten sind in den Tabellen 3.7 und 3.8 aufgeführt.

Tabelle 3.7: Analyse der Interaktion zwischen den AdR-Formen und AdxWT. Untersucht wurde das Bindungsverhalten der AdR-Formen an AdxWT, welches auf dem CM5-Chip immobilisiert wurde. AdR (500 nM) lag in Biacore HBS-EP Puffer (0,01 M HEPES Puffer, pH 7,4, 0,15 M NaCl mit 0,005 % Surfactant P20) vor. Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt.

AdR-Formen	AdxWT		
	k_a [$M^{-1}s^{-1}$] $\cdot 10^3$	k_d [s^{-1}] $\cdot 10^{-3}$	$K_D(k_d/k_a)$ [M] $\cdot 10^{-6}$
Wildtyp	5,87 ± 0,53	1,39 ± 0,16	0,24 ± 0,04
AdR_C10S	8,79 ± 0,69	6,72 ± 0,56	0,77 ± 0,08
AdR_C74S	5,62 ± 0,77	2,43 ± 0,29	0,44 ± 0,09
AdR_C145S	9,90 ± 1,18	5,97 ± 0,38	0,61 ± 0,10
AdR_C322S	10,30 ± 0,89	5,55 ± 0,31	0,56 ± 0,03
AdR_C364S	6,18 ± 1,00	3,51 ± 0,15	0,58 ± 0,10
AdR_A	17,59 ± 1,73	3,60 ± 0,75	0,20 ± 0,04
AdR_B	12,25 ± 2,24	4,01 ± 0,59	0,34 ± 0,09

Die Interaktion zwischen AdxWT und den AdR-Einfachmutanten zeigte uneinheitliche Bindungskonstanten. Die Assoziationsrate der Einfachmutanten steigt maximal um

3 Ergebnisse

das 2-fache, die Dissoziationsraten maximal um das 5-fache. Daraus ergeben sich erhöhte Dissoziationskonstanten, die auf eine schwächere Affinität zwischen den Interaktionspartnern hinweisen. Interessanterweise sind im Vergleich dazu die Assoziationsraten der AdR_A Mutante um das 3,0-fache, der AdR_B Mutante um das 2,1-fache erhöht. Die Dissoziationsrate allerdings zeigt ebenfalls erhöhte Werte (AdR_A: 2,6-fach und AdR_B: 2,9-fach).

Tabelle 3.8: Analyse der Interaktion zwischen den AdR-Formen und Adx(4-108). Untersucht wurde das Bindungsverhalten der AdR-Formen an Adx, welches auf dem CM5-Chip immobilisiert wurde. AdR (500 nM) lag in Biacore HBS-EP Puffer (0,01 M HEPES Puffer, pH 7,4, 0,15 M NaCl mit 0,005 % Surfactant P20) vor. Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt. Aufgrund eines Defekts des Gerätes war die Messung der Mutante AdR_B bis jetzt nicht möglich.

AdR-Formen	Adx(4-108)		
	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹] $\cdot 10^3$	k_d [s ⁻¹] $\cdot 10^{-3}$	$K_D(k_d/k_a)$ [M] $\cdot 10^{-6}$
Wildtyp	13,03 ± 5,57	2,58 ± 0,71	0,22 ± 0,08
AdR_C10S	8,15 ± 1,02	5,00 ± 0,92	0,62 ± 0,14
AdR_C74S	5,88 ± 1,09	3,06 ± 0,22	0,54 ± 0,12
AdR_C145S	13,17 ± 3,09	7,84 ± 1,77	0,63 ± 0,24
AdR_C322S	7,20 ± 0,98	5,24 ± 0,37	0,74 ± 0,11
AdR_C364S	8,26 ± 0,94	3,63 ± 0,12	0,44 ± 0,07
AdR_A	20,20 ± 3,61	3,39 ± 1,00	0,17 ± 0,04
AdR_B	-	-	-

Die Bindungskonstanten für die Interaktion zwischen den AdR-Einfachmutanten und Adx(4-108) zeigten, mit Ausnahme der AdR_C145S Mutante, eine geringere Assoziationsrate als der AdRWT. Die Dissoziationsraten der Einfachmutanten zeigte, wie schon in der Reaktion zum AdxWT beobachtet wurde, höhere Werte auf. Die daraus erhaltenen Dissoziationskonstanten sind damit bis zu 3-fach erhöht und resultieren in einer schwächeren Affinität zum Adx(4-108). Auch hier zeigt die AdR_A Mutante eine erhöhte Assoziationsrate zum Adx, die in einer stärkeren Affinität zum Reaktionspartner resultiert.

Um einen direkten Vergleich der Affinität der AdR-Formen zum Adx(4-108) und zum

3 Ergebnisse

AdxWT zu ermöglichen, wurden die Dissoziationskonstanten (Abbildung 3.14) gegenübergestellt.

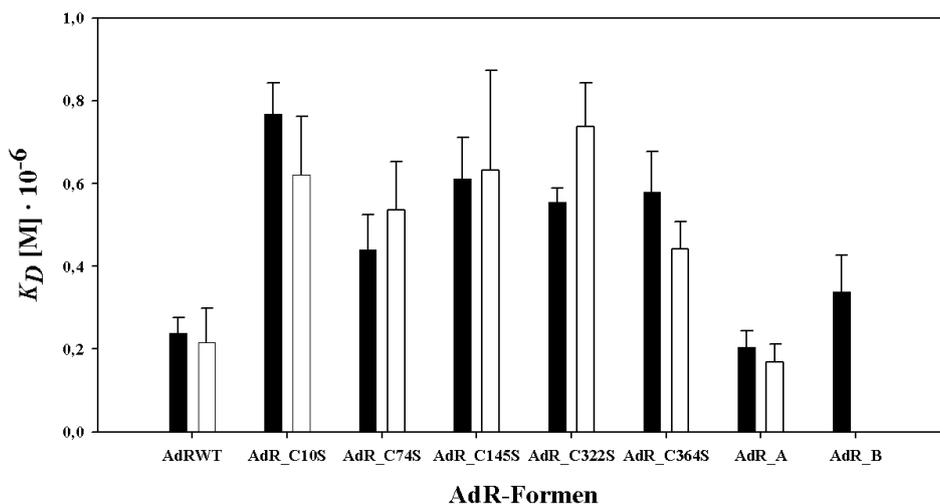


Abbildung 3.14: Absolute Änderung der Dissoziationskonstanten bei Interaktion des AdRWT und der AdR-Mutanten mit AdxWT (schwarz) und Adx(4-108) (weiss).

Die erhaltenen Dissoziationskonstanten zeigen für alle AdR-Einfachmutanten in Interaktion zum AdxWT, wie auch zum Adx(4-108) gleiche Tendenzen. Die Affinität des AdRWT zu beiden Adx-Formen ist im Vergleich zu den Einfachmutanten um 2- bis 3-mal stärker. Die Dissoziationskonstanten der Mehrfachmutanten liegen im Vergleich zum AdRWT in einer ähnlichen Größenordnung und weisen eine voneinander wenig abweichende Affinität zu beiden Adx-Formen auf. Mit dem durchgeführten t-Test konnte für die AdR-Mutanten gezeigt werden, dass in der Reaktion mit den Adx-Formen kein signifikanter Unterschied zum AdRWT besteht.

3.2.8 AdR-abhängiger *in vitro*-Substratumsatz

Anhand der vorhergehenden Experimente wurde gezeigt, dass alle AdR-Mutanten den Elektronentransfer auf Adx vollziehen. Auch das Bindungsverhalten zum Adx wurde untersucht. Im Mittelpunkt steht nun die Frage, ob die Mutationen in den unterschiedlichen AdR-Formen Einfluss auf den Substratumsatz nehmen. Die Überprüfung erfolgte hierzu mit einem rekonstituierten System, welches aus AdR, Adx und CYP11A1 bestand. Das eingesetzte molare Verhältnis lag bei 1:1:1. Als Substrat wurde 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) eingesetzt und der Umsatz zu 7-Dehydropregnenolon (7-DHP) ermittelt.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 3.9 dargestellt.

Tabelle 3.9: CYP11A1-abhängiger Umsatz des 7-Dehydrocholesterols zum 7-Dehydropregnenolon. Angegeben sind die erhaltenen k_{cat} -Werte der AdR-Formen mit AdxWT und Adx(4-108).

AdR-Formen	AdxWT $k_{cat} [s^{-1}] \cdot 10^{-4}$	Adx(4-108) $k_{cat} [s^{-1}] \cdot 10^{-4}$
Wildtyp	13,4 ± 0,34	22,8 ± 0,08
AdR_C10S	13,1 ± 0,19	21,1 ± 0,56
AdR_C74S	12,9 ± 0,13	22,3 ± 0,33
AdR_C145S	12,5 ± 0,35	23,0 ± 0,32
AdR_C322S	12,5 ± 0,30	23,6 ± 0,38
AdR_C364S	13,0 ± 0,15	23,5 ± 0,49
AdR_A	12,4 ± 0,04	20,5 ± 0,71
AdR_B	13,3 ± 0,09	22,0 ± 0,31

Die für die AdR-Mutanten erhaltenen k_{cat} -Werte zeigen keinen signifikanten Unterschied zu den k_{cat} -Werten des AdRWT auf, was durch einen t-Test bestätigt werden konnte.

Wie in der folgenden Abbildung zu erkennen ist, wiesen alle AdR-Mutanten in Reaktion mit dem AdxWT und Adx(4-108) einen gleichen Substratumsatz wie der Wildtyp auf. Dabei zeigten die Mutanten maximal 7,5 % geringeren Umsatz als der AdRWT. Auch weichen die Umsätze der AdR-Mutanten in Interaktion mit der verkürzten Adx-Form nur wenig vom AdRWT ab und liegen wie zuvor beim AdxWT bei maximal 10,1 % (Abbildung 3.15).

3 Ergebnisse

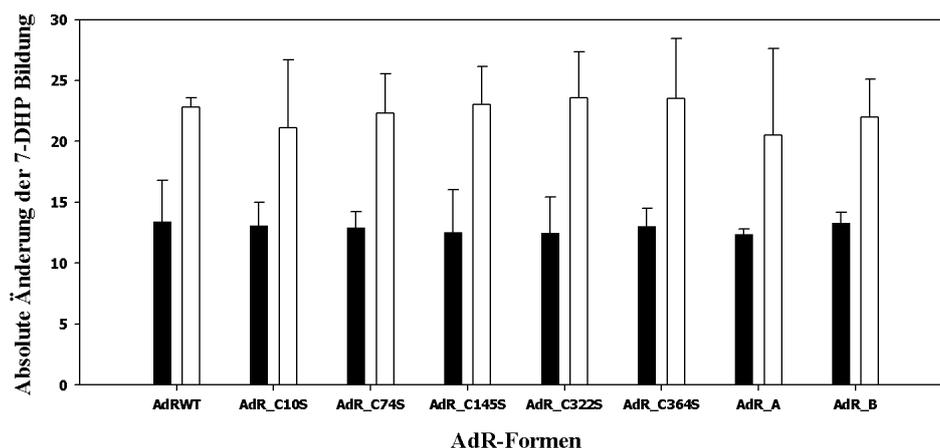


Abbildung 3.15: CYP11A1-abhängige 7-DHC Umwandlung zu 7-DHP in Anwesenheit der AdR-Formen und entweder AdxWT (schwarz) oder Adx(4-108) (weiss). Die Reaktion wurde in einem rekonstituierten System ($1 \mu\text{M}$ AdR, $1 \mu\text{M}$ Adx, $1 \mu\text{M}$ CYP11A1, $100 \mu\text{M}$ NADPH) bei 30°C für 10 min in 50 mM HEPES (pH 7,4), versetzt mit $0,05\%$ Tween 20 durchgeführt. Als interner Standard wurde $100 \mu\text{M}$ Cholecalciferol eingesetzt.

3.3 Paramagnetische NMR-Experimente

3.3.1 Interaktion des Adx(4-108) mit AdR-Formen

Zur Bestimmung der AdR-Bindestelle des Adx(4-108) wurde das $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -TROSY-Spektrum des freien ^{15}N -markierten Adx(4-108) aufgenommen. Mit zunehmender AdRWT-Zugabe wurden $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -TROSY-Spektren aufgenommen und es konnte beobachtet werden, wie die Verschiebung einzelner Resonanzsignale auftraten. Diese Verschiebungen werden als Chemische-Verschiebungsänderung (*Chemical Shift Perturbation*, CSP) bezeichnet, da sie auf der Wechselwirkung mit einem Reaktionspartner basiert, ohne weiteren Effekten von Paramagneten zu unterliegen.

Insgesamt 63 CSPs wurden für das Adx(4-108) in Wechselwirkung mit dem AdRWT ermittelt und sind in der folgenden Abbildung 3.16 gegen die Aminosäurereste aufgetragen.

3 Ergebnisse

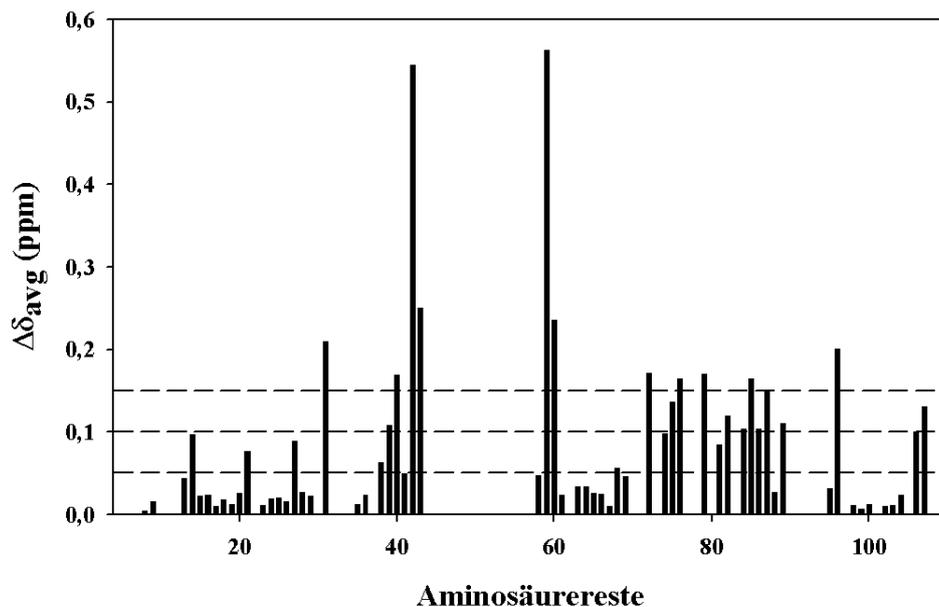


Abbildung 3.16: Chemische-Verschiebungsänderungs-Analyse ($\Delta\delta_{avg}$) des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) nach Komplexbildung mit AdRWT. Die $\Delta\delta_{avg}$ sind gegen die Aminosäurereste aufgetragen. Zur besseren Übersicht wurden die Abstufungen 0,05, 0,10 und 0,15 ppm als gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Für einige Aminosäuren war die chemische Verschiebung nicht detektierbar. Der Grund liegt an dem paramagnetischen Charakter des [2Fe-2S]-Clusters, der zu verkürzten Relaxationszeiten und damit zu einer starken Linienverbreiterung der Resonanzsignale führte. Von den insgesamt 63 CSPs lagen 11 CPSs $> 0,15$ ppm, 8 CPSs $> 0,10$ ppm, 8 CPSs $> 0,05$ ppm und 36 CPSs $< 0,05$ ppm.

Diese CSPs wurden auf die Adx-Oberfläche projiziert, um besser zu verdeutlichen, welche Regionen welche Größe an CSPs aufweisen (Abbildung 3.17).

3 Ergebnisse

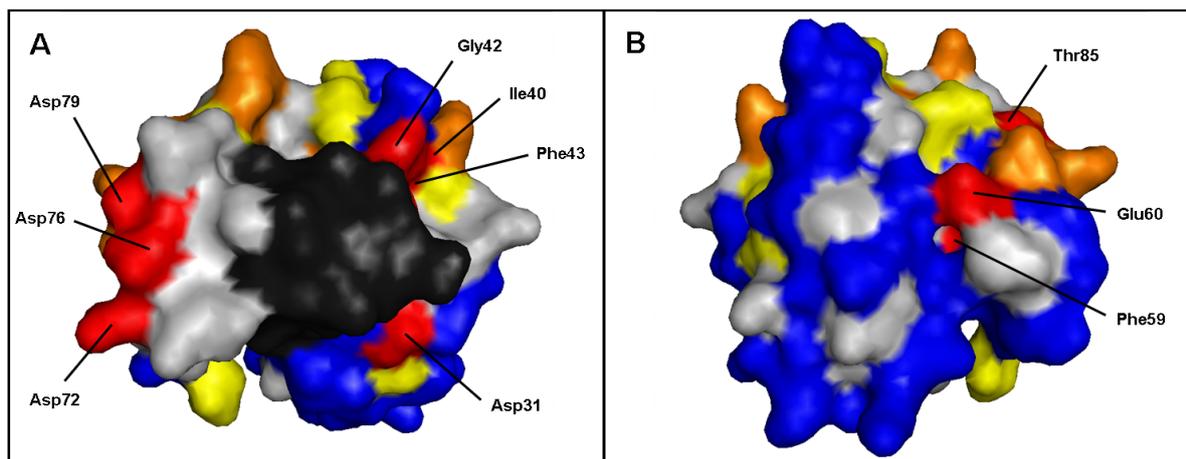


Abbildung 3.17: Chemische-Verschiebungsänderungs-Analyse des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) nach Komplexbildung mit AdRWT. Die erhaltenen $\Delta\delta_{avg}$ des Adx sind auf die Oberfläche des Adx projiziert (PDB Eintrag: 1E6E). Zur besseren Übersicht wurden die Reste mit $\Delta\delta_{avg} > 0,15$ rot, $\Delta\delta_{avg} > 0,10$ orange, $\Delta\delta_{avg} > 0,05$ gelb und $\Delta\delta_{avg} < 0,05$ blau markiert. Reste über die keine Aussage zu treffen sind, sind grau und die [2Fe-2S]-Region ist dunkelgrau gekennzeichnet. A: erste Ansicht, B: um 180° rotierte Ansicht. Zur besseren Übersicht wurden die Abstufungen 0,05, 0,10 und 0,15 ppm in Abbildung 3.16 als gestrichelte Linien gekennzeichnet. Aminosäurereste mit einer Chemischen-Verschiebungsänderung von über 0,15 ppm wurden markiert.

Die Aminosäurereste mit einer $\Delta\delta_{avg} > 0,15$ wurden in der vorhergehenden Abbildung rot markiert und werden in der Tabelle 3.10 zusammengefasst:

Tabelle 3.10: Aufgeführt sind die Aminosäurereste des Adx(4-108) mit einer Chemischen-Verschiebungsänderung ($\Delta\delta_{avg}$) von über 0,15 ppm.

Aminosäurerest	$\Delta\delta_{avg}$ (ppm)
Phe59	0,56
Gly42	0,54
Phe43	0,25
Glu60	0,24
Asp31	0,21
Leu96	0,20
Asp72	0,17
Asp79	0,17
Ile40	0,17
Asp76	0,16
Thr85	0,16

Die Aminosäuren um die Region des Eisen-Schwefel-Clusters sind in Abbildung 3.17 dunkelgrau gekennzeichnet. Die Clusterregion in rot ist mit Aminosäuren umgeben, welche die größten CSPs mit $> 0,15$ ppm aufweisen. Aminosäuren mit abnehmenden CSPs sind orange ($> 0,10$ ppm) und gelb ($> 0,05$ ppm) markiert, während sich auf der Rückseite des Adx Reste mit sehr geringen CSPs befinden. Diese sind blau markiert und weisen eine Verschiebung geringer als $0,05$ ppm auf.

Anhand der Verteilung der CSPs auf der Adx-Oberfläche ist zu erkennen, dass der Eisen-Schwefel-Cluster vermehrt von Aminosäureresten umgeben wird, welche die größten CSPs aufwiesen. Damit kann man davon ausgehen, dass dieser Bereich, der den Kofaktor beinhaltet in Richtung der AdR ausgerichtet ist. Dieselbe Orientierung des Adx zur AdR wurde auch in der Kristallstruktur nachgewiesen (Müller *et al.*, 1998).

Das erhaltene [$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-Spektrum des AdR-Adx-Komplexes wurde in folgenden Versuchen als Referenzspektrum für die Auswertung der Pseudokontaktverschiebungen und Paramagnetischen-Relaxationsverstärkungen herangezogen.

3.3.2 Ln-CLaNP-5 Herstellung und Kopplung an AdR

Für die Messungen der Pseudokontaktverschiebung (PCS) und der Paramagnetischen-Relaxationsverstärkung (PRE) wurden Lanthanoide ausgewählt, die entweder Resonanzsignalverschiebungen oder Relaxationsverstärkungen auslösten (Otting, 2008). Als Referenz diente bei beiden Methoden das Anbringen des CLaNP-5, welches Lutetium als diamagnetische Referenz enthielt. Um PCSs messen zu können, wurde der Paramagnet Thulium gewählt, während für die Relaxationsverstärkung Gadolinium in CLaNP-5 liiert wurde. Die Endkonzentrationen betragen $55 \mu\text{M}$ für Lu-CLaNP-5, $89 \mu\text{M}$ für Tm-CLaNP-5 und $55 \mu\text{M}$ für Gd-CLaNP-5.

3.3.3 Ln-CLaNP-5 Kopplung an AdR

Für die NMR-Messungen der PCSs und PREs wurden zunächst Ln-CLaNP-5 an die AdR-Mutanten AdR_A und AdR_B gekoppelt. Die Ankopplung der Sonde erfolgte immer in zwei Schritten. Der erste Schritt beinhaltete die Reduktion der Thiolgruppen. Hierzu wurden jeweils 6 mg Protein mit DTT reduziert und für eine Stunde bei 4°C

3 Ergebnisse

inkubiert. Anschließend wurde die Lösung über eine Superdex-200-Säule von überschüssigem DTT und Aggregaten getrennt (Abbildung 3.18).

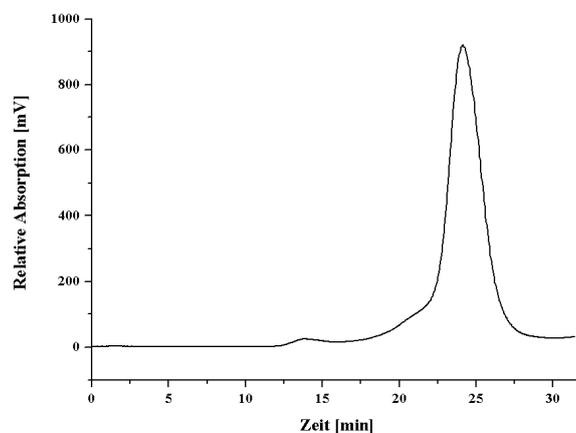


Abbildung 3.18: Gelfiltrationschromatographie. Elutionsprofil des Superdex-200-Laufes. Gereinigt wurde die reduzierte AdR von überschüssigem DTT und Aggregaten.

Das Elutionsprofil (Abbildung 3.18) zeigt einen Peak bei 24 min, bei dem es sich um die reduzierte AdR-Mutante handelt, während die Schulter bei 20 - 22 min auf aggregiertes Protein hinweist. Der Peak bei 24 min besitzt eine relative Absorption von 920 mV.

Die Markierung der AdR-Mutanten erfolgte, nach Verdünnung der Proteinlösung auf etwa 6 ml, im nächsten Schritt durch Zugabe der Ln-CLaNP-5 im Stoffmengenverhältnis 3:1. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 4°C. Nach Konzentrieren der Probe wurde diese erneut mittels der Superdex-200-Säule gereinigt (Abbildung 3.19). Ziel war die Entfernung der überschüssigen NMR-Sonde und der AdR-Dimere.

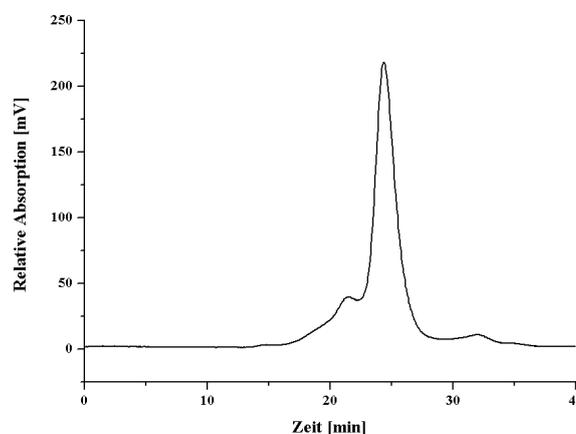


Abbildung 3.19: Gelfiltrationschromatographie. Elutionsprofil des Superdex-200-Laufes. Reinigung der mit CLaNP-5 markierten AdR von überschüssiger NMR-Sonde, sowie AdR-Dimeren.

Das Elutionsprofil zeigt bei 24 min einen Peak mit einer relativen Absorption von 220 mV, bei der es sich um das markierte AdR-Monomer handelt. Bei der Schulter bei 21 - 22 min könnte es sich um AdR-Dimere handeln, die eine etwas verkürzte Elutionszeit im Vergleich zu den Monomeren besitzen. Ln-CLaNP-5 gekoppeltes AdR enthaltende Fraktionen wurden gesammelt, eingengt und ihre Konzentration mittels der UV/Vis-Spektroskopie ermittelt. Die Ausbeute der markierten AdR-Mutanten lag bei 20 - 25 %.

3.3.4 Bestimmung der Pseudokontaktverschiebungen

Für die Ermittlung der Pseudokontaktverschiebungen (PCS) wurden AdR_A bzw. AdR_B entweder mit Lu-CLaNP-5, die als diamagnetische Referenz diente, oder mit der paramagnetischen Tm-CLaNP-5 versehen und mit $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) versetzt. Es wurden $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -TROSY-Spektren des Komplexes aufgenommen.

Bei ausreichender Entfernung zwischen dem Paramagneten und dem ^{15}N -markierten Rückgrat des Proteins resultieren PCSs. Diese sind distanzabhängig. Somit ist der Effekt des paramagnetischen Thuliums umso größer, je kürzer der Abstand zum Proteinrückgrat des ^{15}N -markierten Adx(4-108) ist. Die Bestimmung der PCSs erfolgte aus der Differenz der chemischen Verschiebung der diamagnetischen und paramagnetischen Probe.

Für die Bestimmung der PCSs wurden zwei Positionen auf der AdR Oberfläche gewählt. Diese besitzen eine Entfernung von 25-35 Å zum Adx(4-108) und befinden sich in rigiden Bereichen der AdR. Das Cysteinpaar S425C/K429C der AdR_A ist auf der FAD-Domäne lokalisiert, während das Cysteinpaar Q232C/K236C des AdR_B auf der NADPH-Domäne lokalisiert ist. Der paramagnetische Effekt, der von diesen Positionen auf das ^{15}N -markierten Adx ausgeht, wurde im Folgenden untersucht.

AdR_A in Komplex mit $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108)

AdR_A, an die das Lu-CLaNP-5 gekoppelt wurde, wurde zunächst im Komplex mit $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) gemessen. Das diamagnetische Lutetium diente als Referenz, um die durch den Paramagneten Thulium auftretenden PCSs ermitteln zu können. Diese Verschiebungen entstehen erst durch die dipolare Wechselwirkung des Paramagneten

3 Ergebnisse

mit den Amidn des Rückgrats des $^{15}\text{N}^2\text{H-Adx}(4-108)$. Hierzu wurde Tm-CLaNP-5 an AdR_A gekoppelt und in Komplex mit Adx(4-108) gemessen. Die resultierenden Spektren sind überlagert in Abbildung 3.20 abgebildet.

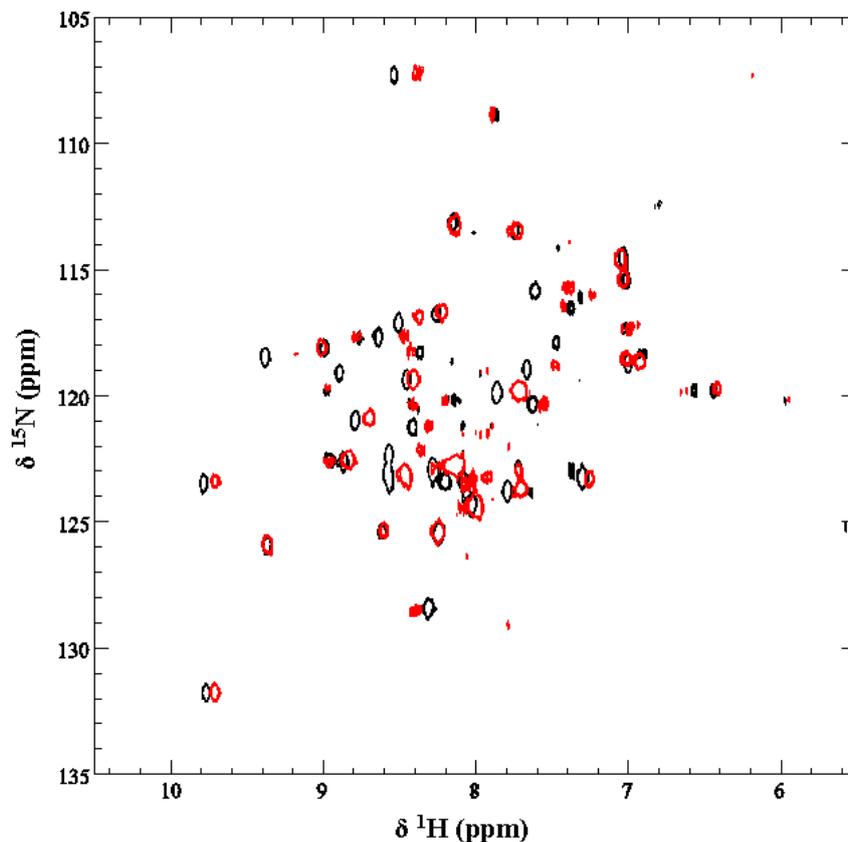


Abbildung 3.20: $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-Spektren des $^{15}\text{N}^2\text{H-Adx}(4-108)$ in Wechselwirkung mit entweder Lu-CLaNP-5 (schwarz) oder Tm-CLaNP-5 (rot) gekoppelt an AdR_A zur Bestimmung der Pseudokontaktverschiebungen.

Die erfolgreiche Kopplung der NMR-Sonde lässt sich aus den resultierenden Verschiebungen erkennen. Die PCSs wurden ausgewertet und gegen die Aminosauereste des Adx(4-108) aufgetragen.

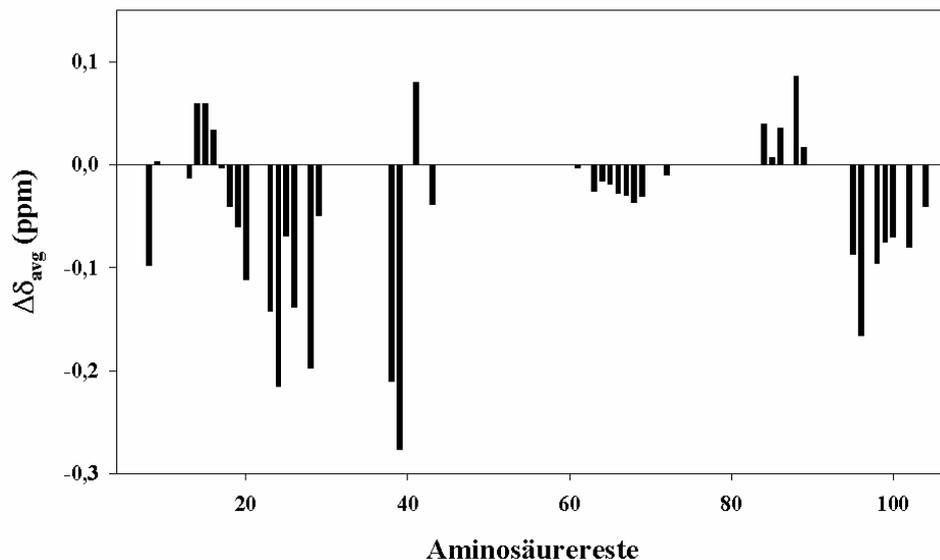


Abbildung 3.21: Pseudokontaktverschiebungen der ^{15}N -markierten Adx(4-108) durch Einfluss des Tm-CLaNP-5 gekoppelt an AdR_A aufgetragen gegen die Aminosäurereste.

Insgesamt konnten 41 Resonanzen zugeordnet werden (siehe Tabelle 5.2 im Anhang), wobei die Aminosäure Asp39 den größten PCS mit 0,276 ppm zeigte. Aufgrund des paramagnetischen Charakters des $[\text{2Fe-2S}]$ -Clusters war die Zuordnung von PCSs der Aminosäuren im Bereich von 44-56 und 90-94 nicht möglich.

AdR_B in Komplex mit $^{15}\text{N}^2\text{H-Adx(4-108)}$

Auch für die AdR_B Mutante wurden zwei Messungen durchgeführt. Lu-CLaNP-5 gekoppelt an AdR_B in Wechselwirkung mit $^{15}\text{N}^2\text{H-Adx(4-108)}$ diente als Referenz, während Tm-CLaNP-5 gekoppelt an AdR_B seinerseits PCSs bewirkte. Die überlagerten Spektren sind in Abbildung 3.22 dargestellt.

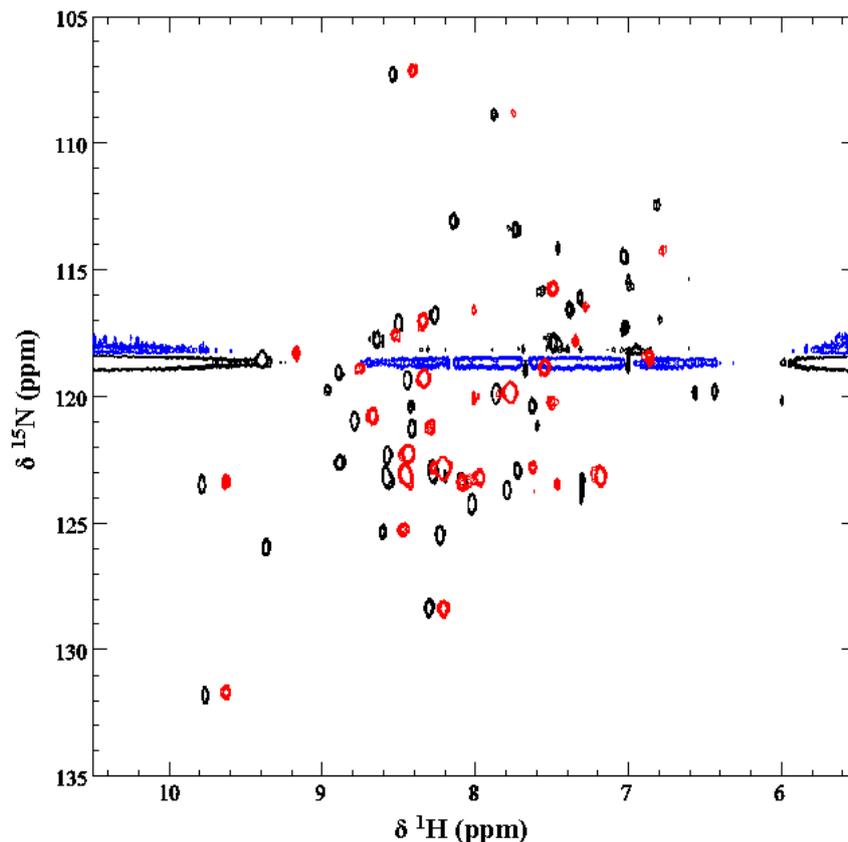


Abbildung 3.22: $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -TROSY-Spektren des ^{15}N -markierten Adx(4-108) in Wechselwirkung mit entweder Lu-CLaNP-5 (schwarz) oder Tm-CLaNP-5 (rot) gekoppelt an AdR_B zur Bestimmung der Pseudokontaktverschiebungen.

Auch die Kopplung des Tm-CLaNP-5 an die AdR_B Mutante war erfolgreich, wie die auftretenden PCSs zeigen. Im Vergleich zur AdR_A Mutante ist hier bereits zu erkennen, dass das Thulium eine aufgrund seiner näheren Position zum ^{15}N -markierten Adx einen weitaus größeren Effekt auf die Amidgruppen des Adx(4-108) besitzt und damit größere PCSs bewirkt.

Die PCSs wurden gegen die Aminosäurereste des Adx(4-108) aufgetragen (Abbildung 3.23).

3 Ergebnisse

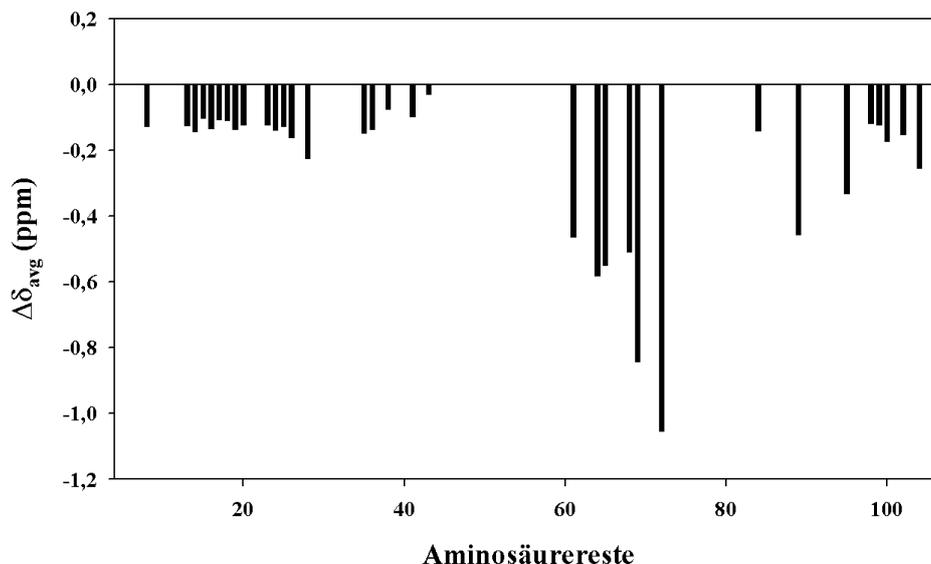


Abbildung 3.23: Pseudokontaktverschiebungen der $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) durch Einfluss des Tm-CLaNP-5 gekoppelt an AdR_B aufgetragen gegen die Aminosäurereste.

Für die Mutante AdR_B konnten insgesamt 33 PCSs ermittelt werden (siehe Tabelle 5.3 im Anhang). Diese zeigten bis zu viermal größere PCSs als die für AdR_A erhaltenen PCSs. Die größte Verschiebung weist die Aminosäure Asp72 mit -1,054 ppm auf.

3.3.5 Paramagnetische-Relaxationsverstärkung: AdR_B mit Gd-CLaNP-5 in Komplex mit $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108)

Direkte Distanzinformationen zwischen dem Paramagneten, gekoppelt an die AdR-Oberfläche und die Amidgruppen können durch Einsatz des Lanthanoids Gadolinium bestimmt werden. Gadolinium besitzt die Besonderheit, aufgrund der isotropen Elektronenverteilung, Linienverbreiterung auszulösen. Dabei ist der Effekt des Gadoliniums umso stärker, je näher es sich in der Nähe der markierten Amidgruppen des Adx(4-108) befindet.

Jeweils Lu-CLaNP-5 bzw. Gd-CLaNP-5 wurden an AdR_B gekoppelt. In der nachfolgenden Abbildung sind die $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -TROSY-Spektren überlagert gezeigt, wobei das Spektrum der Probe mit Lu-CLaNP-5 in schwarz und dasjenige mit Gd-CLaNP-5 in rot abgebildet ist (Abbildung 3.24).

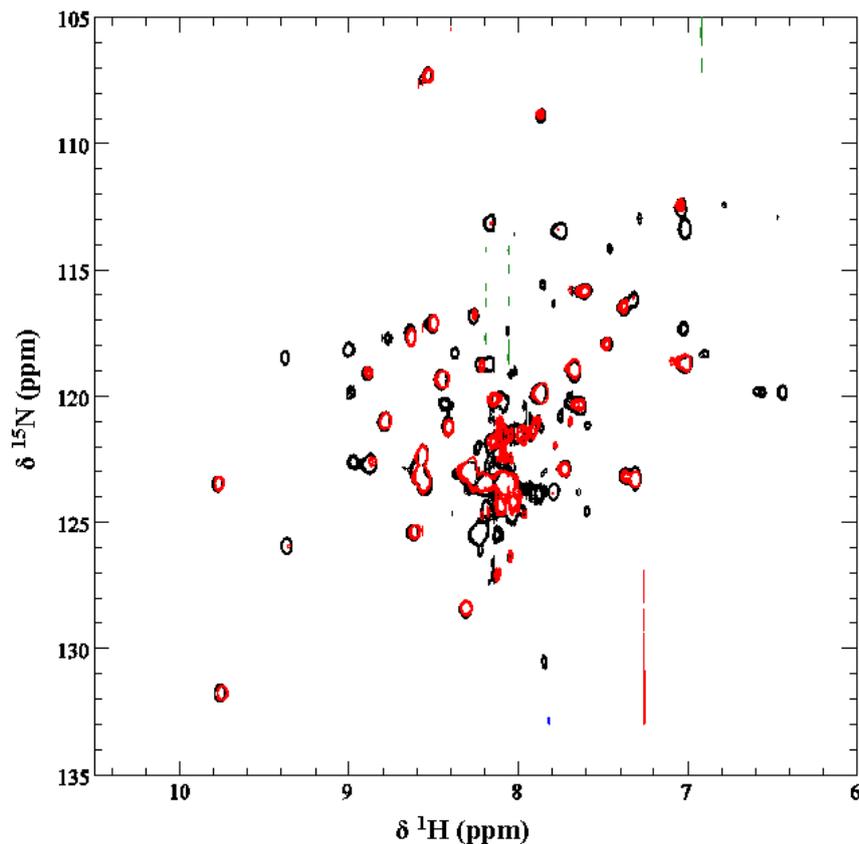


Abbildung 3.24: $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-Spektren des ^{15}N -markierten Adx(4-108) in Wechselwirkung mit Lu-CLaNP-5 (schwarz) und Gd-CLaNP-5 (rot) gekoppelt an AdR_B zur Bestimmung der Paramagnetischen-Relaxationsverstärkung.

Um die Paramagnetische-Relaxationsverstärkung (PRE) bestimmen zu können, wurde das Intensitätsverhältnis (I_{para}/I_{dia}) der Amidresonanzen aus den aufgenommenen $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-Spektren von Lu-CLaNP-5 und Gd-CLaNP-5 gekoppelt an die AdR_B unter Verwendung des Programms MestreC bestimmt. Aus dem Intensitätsverhältnis lässt sich R_2^{para} unter Anwendung der Formel 2.5 ermitteln, wobei R_2^{dia} und R_2^{para} die diamagnetische bzw. paramagnetische Mitwirkung zur transversalen Relaxationsrate beschreiben.

Im der folgenden Abbildung 3.25 sind die R_2^{para} -Werte für die betroffenen Aminosäuren aufgeführt.

3 Ergebnisse

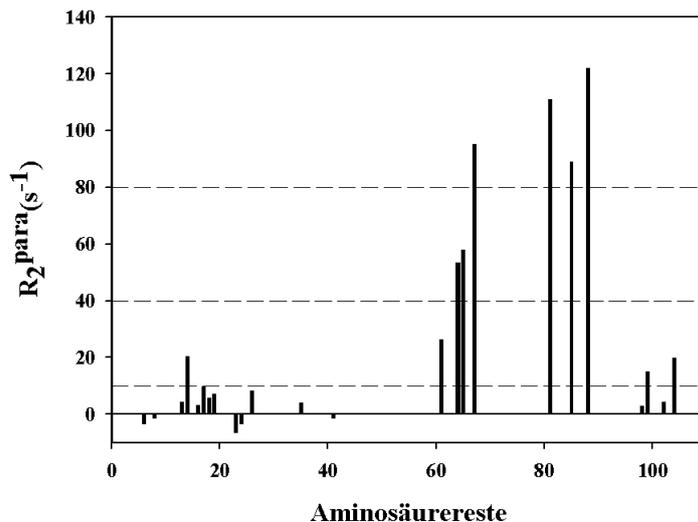


Abbildung 3.25: Analyse der Paramagnetischen-Relaxationsverstärkung (PRE), ausgeübt durch Gd-CLaNP-5 gekoppelt an AdR_B auf die Amidgruppen des ^{15}N -markierten Adx(4-108). Aufgetragen sind die erhaltenen R_2^{para} -Werte für die jeweilige Amidgruppe. Die Größe der Intensitätsänderung wird bei R_2^{para} von 10, 40 und 80 als gestrichelte Linie, markiert.

Für insgesamt 24 Amidgruppen konnten Intensitätsabnahmen (R_2^{para}) beobachtet werden, die in der folgenden Tabelle 3.11 zusammengefasst werden.

Tabelle 3.11: Aufgeführt sind die Intensitätsabnahmen (R_2^{para}) der Aminosäurereste des ^{15}N -markierten Adx(4-108) in Komplex mit AdR_B, versehen mit Gd-CLaNP-5.

Adx(4-108) Reste	R_2^{para} (s^{-1})	Adx(4-108) Reste	R_2^{para} (s^{-1})
Lys6	-3,263	Asp41	-1,225
Thr8	-1,269	Gln61	26,157
Asn13	4,291	Phe64	53,310
Arg14	20,483	Glu65	57,877
Gly16	3,329	Leu67	95,256
Glu17	9,518	Ala81	111,065
Thr18	5,743	Thr85	88,999
Leu19	7,060	Ser88	122,070
Gly23	-6,357	Lys98	2,953
Lys24	-3,191	Ala99	15,034
Gly26	8,268	Asn102	4,435
Gln35	4,135	Thr104	19,812

Die ermittelten R_2^{para} -Werte wurden auf die Oberfläche des Adx(4-108) projiziert. Die

3 Ergebnisse

unterschiedliche Farbkennzeichnung beschreibt die Stärke der Intensitätsänderung der gemessenen Resonanzen.

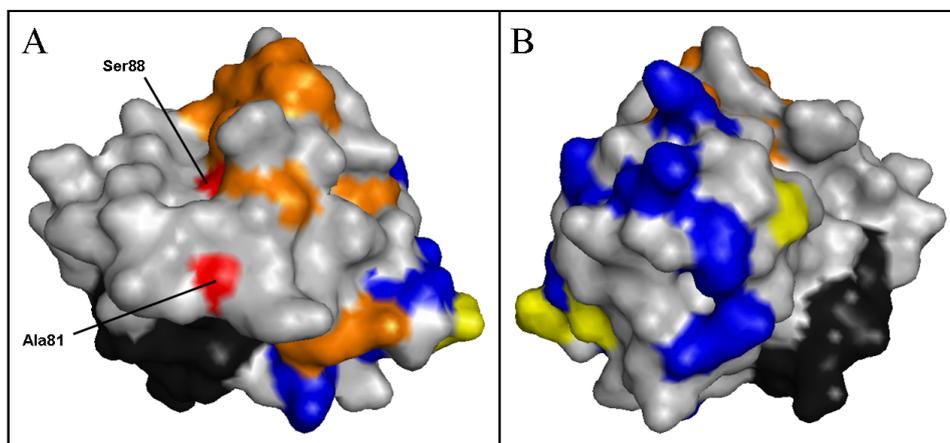


Abbildung 3.26: Auswirkung der Paramagnetischen-Relaxationsverstärkung auf die $^{15}\text{N}^2\text{H-Adx}(4-108)$ Resonanzen, ausgeübt durch Gd-CLaNP-5 gekoppelt an AdR_B. Die ermittelten R_2^{para} wurden zur besseren Verdeutlichung durch eine Farbkennzeichnung beschrieben. R_2^{para} größer als 80 sind rot, R_2^{para} größer als 40 orange, R_2^{para} größer als 10 gelb und R_2^{para} kleiner als 10 blau. Diese Einstufungen sind in Abbildung 3.25 als gestrichelte Linien gekennzeichnet. Reste die nicht bestimmt wurden, oder nicht dem Einfluss des Gadoliniums unterliegen, sind grau markiert. Die [2Fe-2S] Region ist dunkelgrau gekennzeichnet. A: erste Ansicht, B: um 180° rotierte Ansicht. Gekennzeichnet sind die Aminosäurereste Ala81 und Ser88, welche die höchste Paramagnetische-Relaxationsverstärkung zeigten.

Auf der Oberflächenstruktur zeigten zwei Reste (Ala81 und Ser88, rot gekennzeichnet) eine starke Intensitätsabnahme. Diese besitzen somit die geringste Entfernung zum Gadolinium und sind in Richtung des Gd-CLaNP-5, welches sich auf der NADPH-Domäne befindet, ausgerichtet (Abbildung 3.26 A), während sich in Abbildung 3.26 B viele Aminosäurereste befinden, die wenig durch Gd-CLaNP-5 beeinflusst wurden.

Die Aminosäurereste wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe beinhaltet 13 Aminosäurereste, die nach der Normierung ein Intensitätsverhältnis bis zu 0,83 aufweisen, während die zweite Gruppe 11 Aminosäurereste mit einem Intensitätsverhältnis über 0,83 beinhaltet. Für diese Reste der ersten Gruppe durften die mittels der PREs berechneten Distanzen nur eine Abweichung von $\pm 3 \text{ \AA}$ während der Docking-Berechnungen aufweisen. Den Resten der zweiten Gruppe wurde mit bis zu maximal 44 \AA eine viel höhere Änderung der Position während der Docking-Berechnungen er-

laubt.

Für die Normierung der Intensitätswerte wurde die Aminosäure Thr21 gewählt, die mit 47 Å die größte Entfernung zum Gadolinium besitzt und damit nicht seinem Effekt unterliegt (PDB Eintrag: 1E6E).

3.3.6 Interaktion des AdxWT mit AdR

Überlagerte Spektren des AdxWT und Adx(4-108)

Die Untersuchung struktureller Unterschiede während der Interaktion des AdxWT und der AdR erfolgte im nächsten Schritt. Dabei sollten weitere Informationen über den C-terminalen Bereich des AdxWT erhalten werden, welcher die Aminosäurereste 109-128 umfasst. Die Identifizierung dieser Aminosäurereste erfolgte durch die Überlagerung des AdxWT (rot) mit dem Spektrum des Adx(4-108) (schwarz).

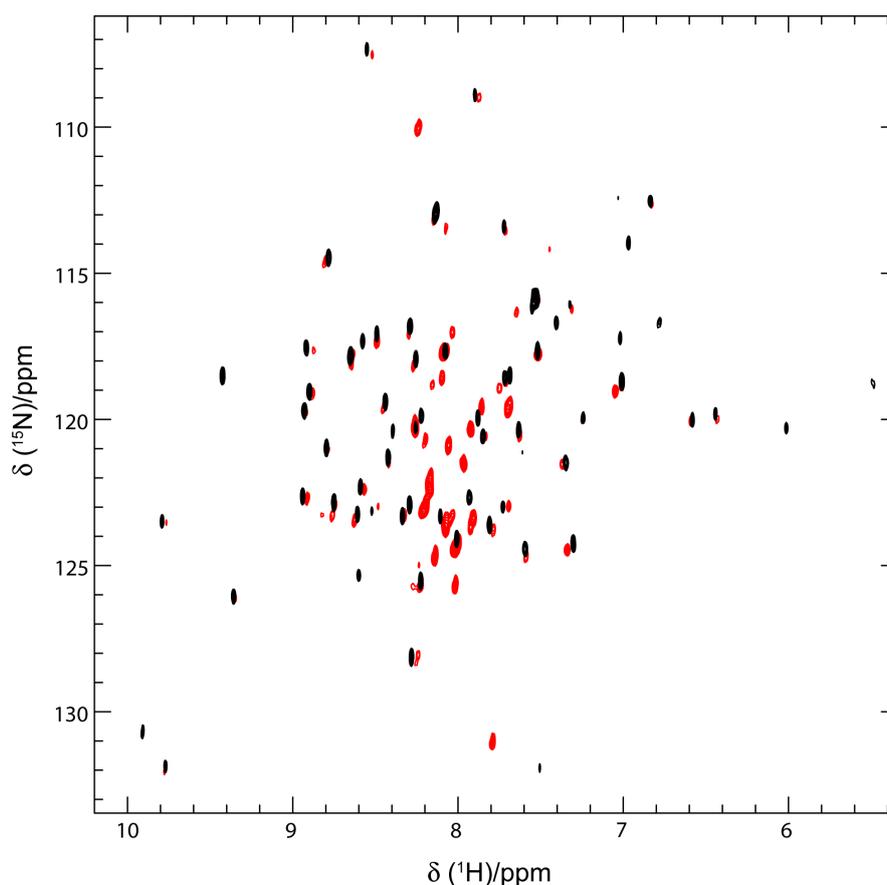


Abbildung 3.27: [^{15}N , ^1H]-TROSY-Spektren des ^{15}N -markierten Adx(4-108) (schwarz) und des ^{15}N -markierten AdxWT (rot).

Es ist gut zu erkennen, dass es sich in dem Bereich zwischen 7,5 und 8,5 ppm entlang der

^1H -Domäne um neue Resonanzsignale handelt, die auf die Anwesenheit des C-terminalen Endes des AdxWT zurückzuführen sind. Die Resonanzen in diesem Bereich konnten bisher nicht zugeordnet werden. Dennoch könnten diese möglicherweise genutzt werden, um Informationen über die Aminosäuren des C-terminalen Endes durch Bestimmung von CSPs und PCSs zu erhalten.

Interaktion des AdxWT mit der AdR

Um Informationen bezüglich des C-terminalen Endes des AdxWT in Wechselwirkung mit AdR zu erhalten, wurde ein Experiment durchgeführt, in dem die Aufnahme des $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -TROSY-Spektrums des freien $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT erfolgte. Um CSPs zu bestimmen, wurde der Komplex aus $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT mit AdR_B (gekoppelt mit Lu-ClNP-5) im Verhältnis 1:1,1 gemessen. Die überlagerten Spektren sind in Abbildung 3.28 abgebildet, wobei der AdxWT in schwarz und AdR_B gekoppelt mit Lu-ClNP-5 in grün dargestellt sind.

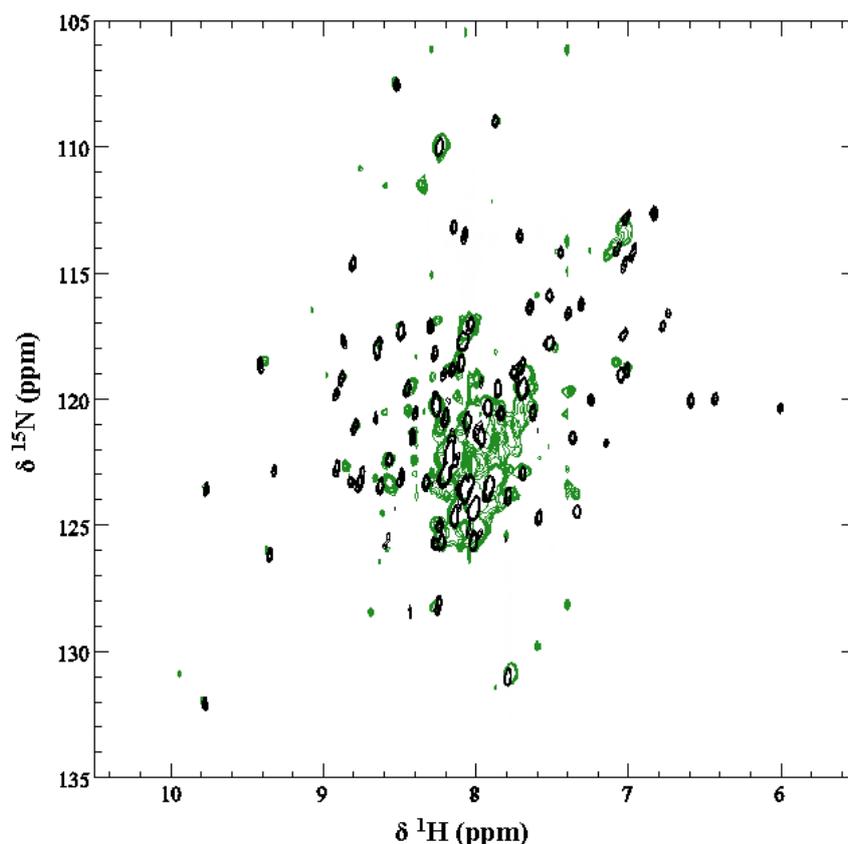


Abbildung 3.28: $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -TROSY-Spektren des ^{15}N -markierten AdxWT (schwarz) und ^{15}N -markierten AdxWT in Wechselwirkung mit Lu-CLaNP-5 gekoppelt an die AdR_B (grün).

Insgesamt 59 Reste, die eine Verschiebung zeigten, konnten identifiziert werden. In der

3 Ergebnisse

nachfolgenden Abbildung 3.29 sind die CSPs gegen die Aminosäurereste aufgetragen.

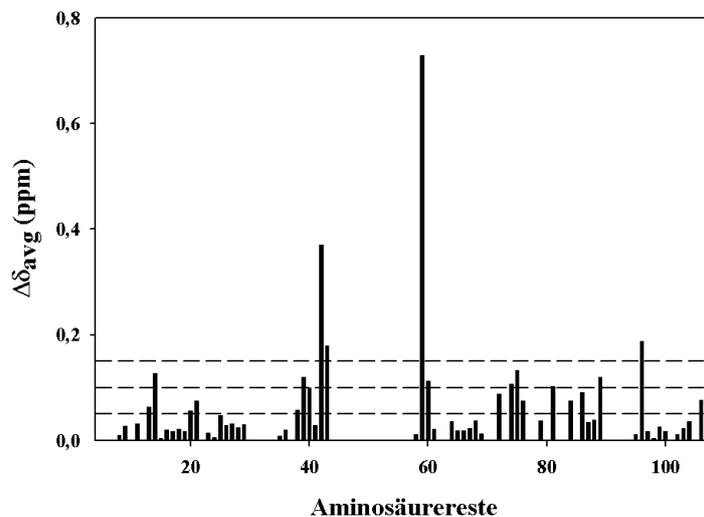


Abbildung 3.29: Chemische-Verschiebungsänderungs-Analyse des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT nach Komplexbildung mit AdR_B mit Lu-CLaNP-5. Die erhaltenen $\Delta\delta_{avg}$ sind gegen die Aminosäurereste aufgetragen. Zur besseren Übersicht wurden die Abstufungen 0,05, 0,10 und 0,15 ppm durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

In Abbildung 3.29 ist zu erkennen, dass die größte Verschiebung Phe59 mit 0,730 ppm zeigt. 4 Reste zeigten eine CSP von $> 0,15$ ppm, 7 Reste mit $> 0,10$ ppm und 11 Reste mit $> 0,05$ ppm ermittelt. 37 Aminosäurereste zeigten eine geringere Verschiebung als $< 0,05$ ppm. Der paramagnetische Charakter des $[2\text{Fe-2S}]$ -Clusters ermöglichte es nicht, die Zuordnung der Aminosäuren im Bereich von 44-56 und 90-94 durchzuführen.

Die erhaltenen CSPs wurden auf die Oberfläche des Adx projiziert. Abbildung 3.30 zeigt zwei Ansichten des Proteins.

3 Ergebnisse

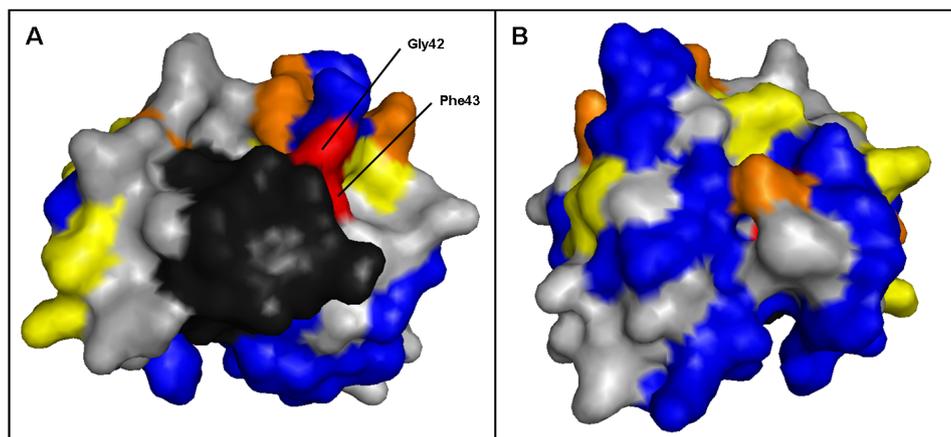


Abbildung 3.30: Chemische-Verschiebungsänderungs-Analyse des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT nach Komplexbildung mit AdR_B mit Lu-CLaNP-5. Die erhaltenen $\Delta\delta_{avg}$ des Adx sind auf die Oberfläche des Adx projiziert. Zur besseren Verdeutlichung der CSPs wurden die Reste mit $\Delta\delta_{avg} > 0,15$ rot, $\Delta\delta_{avg} > 0,10$ orange, $\Delta\delta_{avg} > 0,05$ gelb und $\Delta\delta_{avg} < 0,05$ blau markiert. Aminosäurereste, über die keine Aussage zu treffen ist, sind grau und die [2Fe-2S]-Region ist dunkelgrau gekennzeichnet. A: erste Ansicht, B: um 180° rotierte Ansicht. Die Aminosäurereste Gly42 und Phe43 mit einer Chemischen-Verschiebungsänderung von über 0,15 ppm wurden markiert.

Alle Aminosäurereste mit einer $\Delta\delta_{avg} > 0,15$ werden in der Tabelle 3.10 zusammengefasst.

Tabelle 3.12: Aufgeführt sind die Aminosäurereste des AdxWT mit einer Chemischen-Verschiebungsänderung ($\Delta\delta_{avg}$) von über 0,15 ppm.

Aminosäurerest	$\Delta\delta_{avg}$ (ppm)
Phe59	0,73
Gly42	0,37
Leu96	0,19
Phe43	0,18

Zu erkennen ist in Abbildung 3.30 ein ähnlicher Farbverlauf der CSPs in der Interaktion des AdxWT mit AdR wie mit Adx(4-108) und AdR. Die Aminosäurereste, welche sich in unmittelbarer Nähe am Eisen-Schwefel-Cluster befinden, sind dunkelgrau dargestellt. Um diese Region befinden sich vermehrt Aminosäurereste, die stärkere CSPs aufweisen. Auf der Rückseite des Adx kommt es zu geringeren CSPs der Reste, gekennzeichnet durch den Farbverlauf orange > gelb > blau. Anhand der großen CSPs um den Eisen-Schwefel-Cluster wird deutlich, dass das Adx mit seinem Kofaktor in Richtung der AdR

gerichtet ist.

AdR_A in Komplex mit $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT

Die AdR_A, an die Lu-CLaNP-5 gekoppelt wurde, wurde im Komplex mit $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT gemessen. Das diamagnetische Lutetium diente als Referenz, um die durch den Paramagneten Thulium in Tm-CLaNP-5 auftretende PCSs ermitteln zu können. Die resultierenden Spektren sind in der folgenden Abbildung 3.31 überlagert dargestellt.

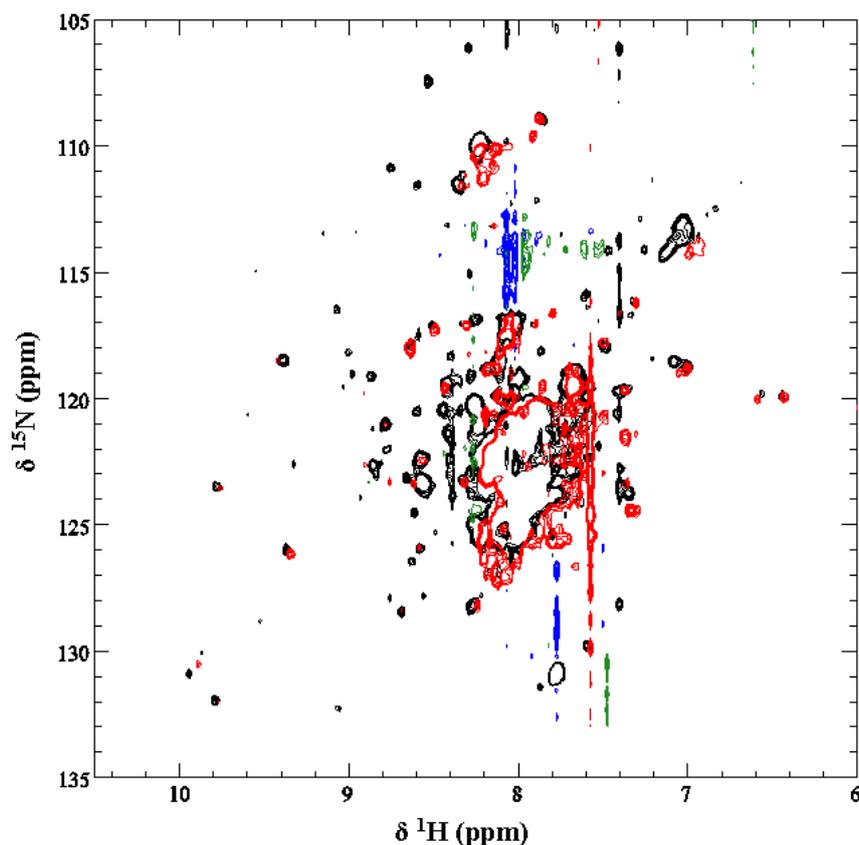


Abbildung 3.31: $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -TROSY-Spektren des ^{15}N -markierten AdxWT in Wechselwirkung mit Lu-CLaNP-5 (schwarz) gekoppelt an AdR_B bzw. Tm-CLaNP-5 (rot) gekoppelt an AdR_A zur Bestimmung der Pseudokontaktverschiebungen.

Die erhaltenen Spektren für die diamagnetische Probe (schwarz), als auch die paramagnetische Probe (rot) weisen im Bereich zwischen 7,5 und 8,5 ppm entlang der ^1H -Domäne stark überlagerte Signale, die aus der Aggregation des AdxWT-AdR-Komplexes während der Messungen resultieren. Dieser Komplex zeigte eine geringere Stabilität als der Adx(4-108)-AdR-Komplex. Die Auswertung der Resonanzen im Bereich zwischen 7,5 - 8,5 ppm war aufgrund der starken Aggregation nicht möglich, so dass keine PCSs

bestimmt werden konnten.

AdR_B in Komplex mit $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT

Auch die Interaktion zwischen AdxWT und AdR_B wurde untersucht, um Informationen über den C-terminalen Bereich des Adx zu erhalten. Gemessen wurden hierzu der Komplex aus AdxWT und AdR_B mit gekoppeltem Lu-CLaNP-5 (schwarz). Eine weitere Messung mit gekoppeltem Tm-CLaNP-5 wurde für die Bestimmung der PCSs durchgeführt. Die Spektren sind in der Abbildung 3.32 dargestellt.

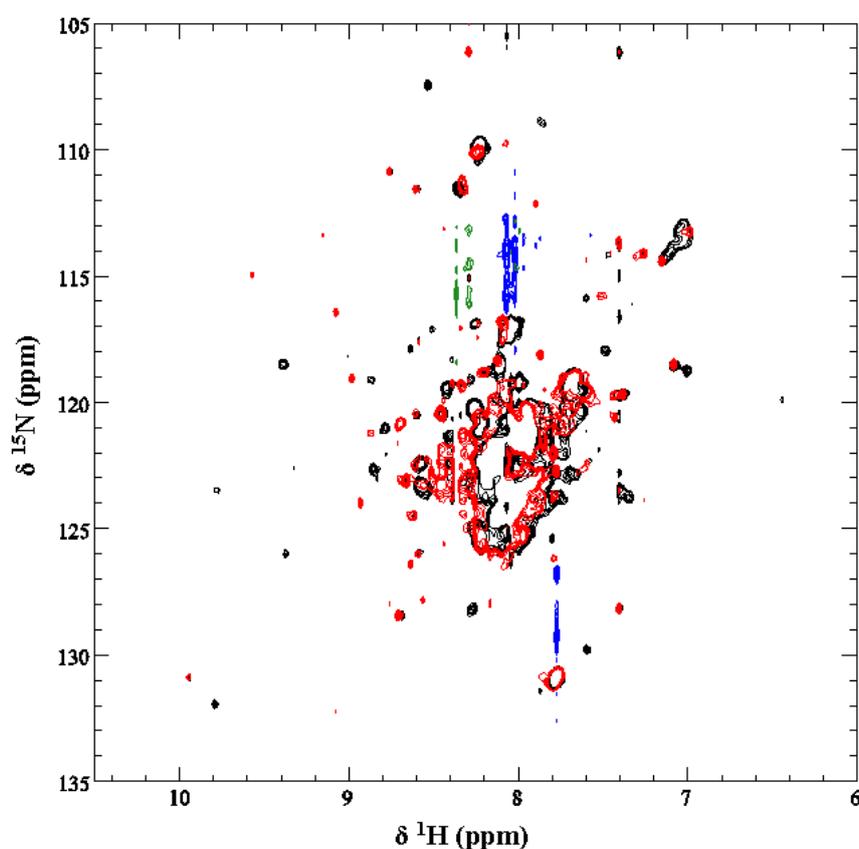


Abbildung 3.32: [^{15}N , ^1H]-TROSY-Spektren des ^{15}N -markierten AdxWT in Wechselwirkung mit Lu-CLaNP-5 (schwarz) bzw. Tm-CLaNP-5 (rot) gekoppelt an AdR_B zur Bestimmung der Pseudokontaktverschiebungen.

Auch für die Messungen der PCSs des AdxWT in Komplex mit AdR_B konnten keine Informationen erhalten werden, da aufgrund der starken Aggregation während der Messungen die Bereiche zwischen 7,5 und 8,5 ppm entlang der ^1H -Domäne nicht auswertbar waren.

Aufgrund der höheren Stabilität der verkürzten Form des Adx wurden die erhaltenen Daten aus den Experimenten der CSPs, PCSs und PREs für die Docking-Berechnungen herangezogen.

3.3.7 Strukturbestimmung des AdR-Adx-Komplexes

Die Docking-Berechnungen für den AdR-Adx(4-108)-Komplex wurden mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten der CSPs, der PCSs und der PREs durchgeführt. Die Struktur mit der geringsten Gesamtenergie wird in der folgenden Abbildung 3.33 gezeigt.

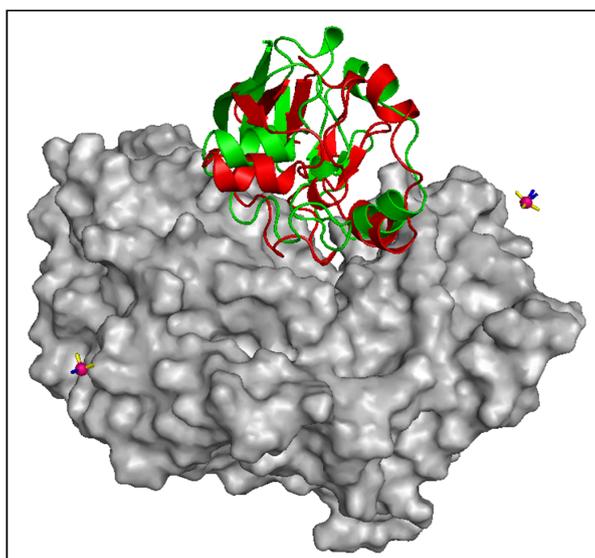


Abbildung 3.33: Dreidimensionale Struktur des AdR-Adx(4-108)-Komplexes, welcher durch die Docking-Berechnungen mit den verwendeten Chemischen-Verschiebungsänderungs-, Paramagnetischen-Relaxationsverstärkungs- und Pseudokontaktverschiebungs-Daten erhalten wurde. Dieser Komplex ist mit der kristallisierten Struktur übereinander gelegt dargestellt. Die AdR aus beiden Komplexen ist als Oberflächenstruktur in grau überlagert abgebildet. Die Lanthanoid-Ionen sind durch pinke Kugeln gekennzeichnet, wobei die angezeigten Achsen die Ausrichtung der X -Tensoren andeuten, mit der x - und y -Achse in gelb und der z -Achse in blau. Die Struktur des Adx aus den Docking-Berechnungen ist grün und die aus dem kristallisierten Komplex ist rot dargestellt.

Die AdR aus den Docking-Berechnungen und der Kristallstruktur (PDB Eintrag: 1E6E) ist als Oberflächenstruktur übereinander gelegt dargestellt. Während das Adx mit der niedrigsten Gesamtenergie (PDB Eintrag: 1AYF) in grün abgebildet ist, ist das Adx aus der Kristallstruktur (PDB Eintrag: 1E6E) in rot dargestellt. Zu erkennen ist deutlich, dass das aus den Docking-Berechnungen erhaltene Adx die gleiche Position

3 Ergebnisse

wie das Adx aus der kristallisierten Struktur einnimmt. Die Bindung des Adx an die AdR erfolgt in der Vertiefung zwischen der FAD- und NADPH-Domäne und der Eisen-Schwefel-Cluster zeigt in Richtung dieser Vertiefung, in der der Isoalloxazinring der AdR lokalisiert ist. Bei beiden Strukturen besitzt das Adx eine sehr ähnliche Entfernung zu den Lanthanoid-Ionen. Das Lanthanoid-Ion in der NMR-Sonde, die an die Cysteine C425 und C429 in AdR_A gekoppelt wurde, weist eine Entfernung zum C α der N37 in Adx von 30,8 Å für die Kristallstruktur und 31,8 Å für die Struktur mit der geringsten Gesamtenergie auf. Das Lanthanoid-Ion, das mittels der NMR-Sonde an die Cysteine C232 und C236 der AdR_B gekoppelt wurde, weist eine Entfernung zum C α der Aminosäure D86 in Adx von 23,3 Å für die Kristallstruktur und 23,6 Å für die Struktur aus den Docking-Berechnungen auf.

Im Vergleich zur kristallisierten Form ist das Adx aus den Docking-Berechnungen um die β -Faltblätter, welche aus den Aminosäuren 56-58 und 88-90 bestehen, leicht verdreht. Damit tritt eine Distanz von 0,7 Å zwischen den C α -Atomen des Restes His56 auf, für Leu90 liegt sie bei 1,8 Å. Die [2Fe-2S]-bindende Schleife ist im Vergleich zur Kristallstruktur in geringem Maße geneigt. Diese Neigung führt zu einer Vergrößerung des Abstandes zwischen dem Fe1 und dem zentrierten Stickstoff (N5) des FADs von 10,9 Å zu 15,0 Å. Diese ist aber immer noch innerhalb der kritischen Entfernung für den Elektronentransfer von 16 Å (Page *et al.*, 1999).

Abgebildet sind im Folgenden die vergrößerten Ansichten sowohl der kristallisierten Struktur in der das Adx rot dargestellt ist, als auch die aus den Docking-Berechnungen erhaltene Struktur mit dem Adx in grün. Die AdR ist in beiden Abbildungen grau dargestellt. Die Reste Arg211, Arg240 und Arg244 des primären Interaktionsbereiches der AdR und die Reste Asp72, Asp76 und Asp79 der Interaktionsdomäne des Adx sind gekennzeichnet. Gut zu erkennen ist in Abbildung 3.34, dass das Adx aus der berechneten Struktur geringfügig verdreht ist.

3 Ergebnisse

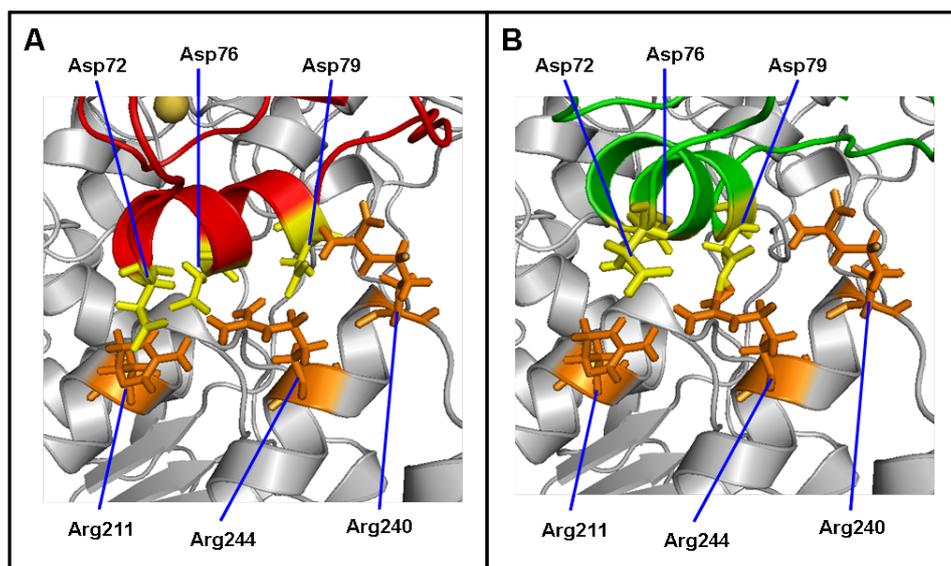


Abbildung 3.34: Vergrößerte Darstellung der dreidimensionalen Struktur des AdR-Adx(4-108)-Komplexes der Kristallstruktur (A) im Vergleich zu der Struktur, die aus den Docking-Berechnungen (B) erhalten wurde. Die AdR ist in grau dargestellt, während das Adx aus dem kristallisierten Komplex rot und das Adx aus den Docking-Berechnungen grün dargestellt wird. Gekennzeichnet sind die Reste Arg211, Arg240 und Arg244 der AdR und die Reste Asp72, Asp76 und Asp79 des Adx. Zu erkennen ist, dass das Adx aus den Docking-Berechnungen leicht verdreht ist.

Die Struktur aus den Docking-Berechnungen weist eine Gesamtenergie von 13,3 kcal/mol auf und liegt damit 19% niedriger als die Gesamtenergie der kristallisierten Form mit 15,8 kcal/mol. Die ermittelte Standardabweichung zwischen der berechneten Struktur und der Kristallstruktur beträgt 6,4 Å mit einem DRMS-Wert von 2,5 Å.

Verbunden mit den Docking-Berechnungen sind die Berechnungen der PCSs und PREs. Aufgetragen wurden die experimentell erhaltenen PCSs und PREs gegen die berechneten Werte für die Struktur mit der geringsten Gesamtenergie (●) und gegen die verwendeten Werte der Kristallstruktur (▽). Für die AdR_A-Mutante wurde eine Datenreihe PCSs ermittelt (Abbildung 3.35 A), während Experimente mit der AdR_B-Mutante sowohl PCSs (Abbildung 3.35 B), als auch PREs (Abbildung 3.36) lieferten.

3 Ergebnisse

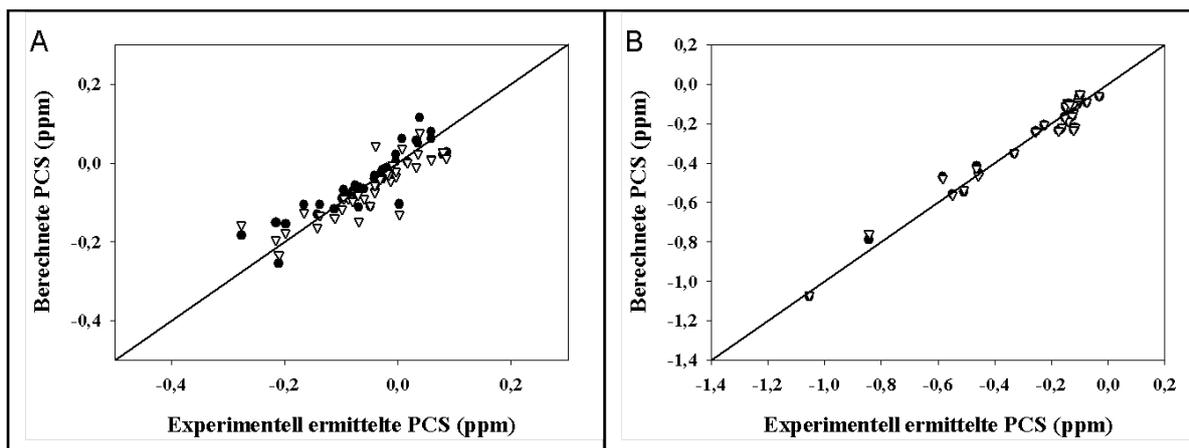


Abbildung 3.35: Die experimentell ermittelten Pseudokontaktverschiebungen sind gegen die berechneten Daten aus den Docking-Berechnungen (●) und aus der Kristallstruktur (▽) aufgetragen. Die ideale Korrelation zwischen beiden Datenreihen ist mit einer Diagonalen gekennzeichnet. Gemessen wurde die Interaktion des Adx(4-108) (A) mit AdR_A und (B) mit AdR_B. Die erhaltenen Q-Werte liegen bei (A) $Q = 0,210$ (●) und $Q = 0,233$ (▽) und für (B) $Q = 0,065$ (●) und $Q = 0,067$ (▽).

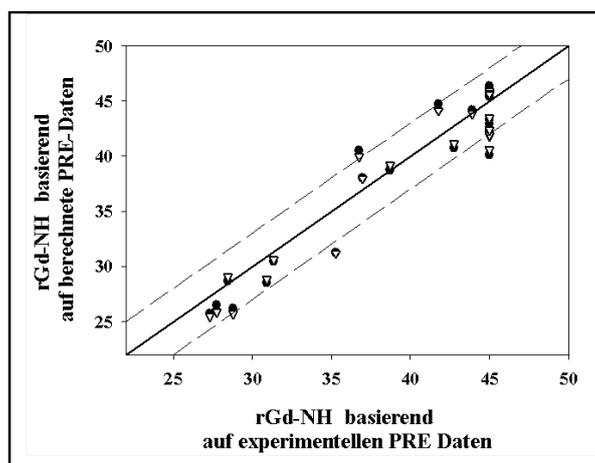


Abbildung 3.36: Die experimentell ermittelten Gd-NH Distanzen (\AA) sind gegen die berechneten Daten, die nach den Docking-Berechnungen erhalten wurden (●) und gegen die verwendeten Daten der Kristallstruktur (▽) aufgetragen. Die ideale Korrelation zwischen beiden Datenreihen ist mit einer Diagonalen gekennzeichnet. Die gestrichelten Linien geben die Fehlerspanne von $\pm 3 \text{\AA}$ an. Gemessen wurde die Interaktion des Adx(4-108) mit AdR_B. Die erhaltenen Q-Werte liegen bei $Q = 0,031$ (●) und $Q = 0,030$ (▽).

Der Vergleich der experimentell ermittelten Werte mit den Werten für die Struktur aus den Docking-Berechnungen mit der geringsten Gesamtenergie (●) und mit den Werten der Kristallstruktur (▽) kann durch einen Qualitätsfaktor beschrieben werden. Für die PCS-Daten der AdR_A-Mutante liegen diese bei $Q = 0,210$ für die berechnete Struktur

3 Ergebnisse

und bei $Q = 0,233$ für die Kristallstruktur. Für die AdR_B-Mutanten wurden die Werte $Q = 0,065$ (gelöste Struktur) und $Q = 0,067$ (Kristallstruktur) erhalten. Die Q -Werte für die PRE-Daten der AdR_B-Mutante liegen bei $Q = 0,031$ für die gelöste Struktur und bei $Q = 0,030$ für die Kristallstruktur. Anhand der erhaltenen Qualitätsfaktoren ist zu erkennen, dass die experimentell ermittelten Daten im Vergleich mit den berechneten Daten der gelösten Struktur, wie auch mit den Werten der Kristallstruktur eine sehr gute Übereinstimmung aufweisen.

Minimumbestimmung der Strukturlösungen

Für die erhaltenen Strukturen mit den geringsten Gesamtenergien wurde in Abbildung 3.37 deren Gesamtenergien aus den Einschränkungstermen gegen ihre Standardabweichung relativ zur Struktur mit der niedrigsten Gesamtenergie aufgetragen.

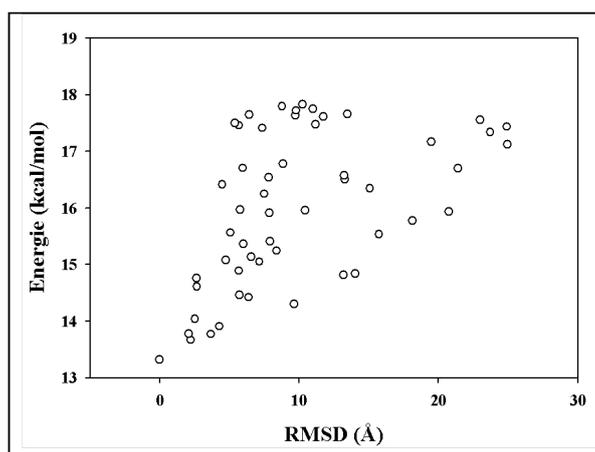


Abbildung 3.37: Populationsanalyse der Strukturen mit niedriger Gesamtenergie aus der Berechnung der Annäherung des Adx an die AdR unter Berücksichtigung von experimentellen Daten. Die Gesamtenergien der Docking-Berechnungen sind gegen ihre Standardabweichung (RMSD) relativ zu der geringsten Gesamtenergie von 13,3 kcal/mol aufgetragen.

Bei Betrachtung der Abbildung 3.37 fällt auf, dass die erhaltenen Gesamtenergien zu einem einzigen Minimum zusammenlaufen. Alle AdR-Adx-Strukturen, die aus den Docking-Berechnungen erhalten wurden, zeigten in großem Maße Übereinstimmung. Adx bindet in der Vertiefung zwischen der FAD- und NADPH-Domäne an die AdR. Der Eisen-Schwefel-Cluster des Adx ist in Richtung des Isoalloxazinrings der AdR gerichtet.

Die zehn Strukturen mit den niedrigsten Gesamtenergien bilden eine Ansammlung mit einer Standardabweichung von 3,2 Å.

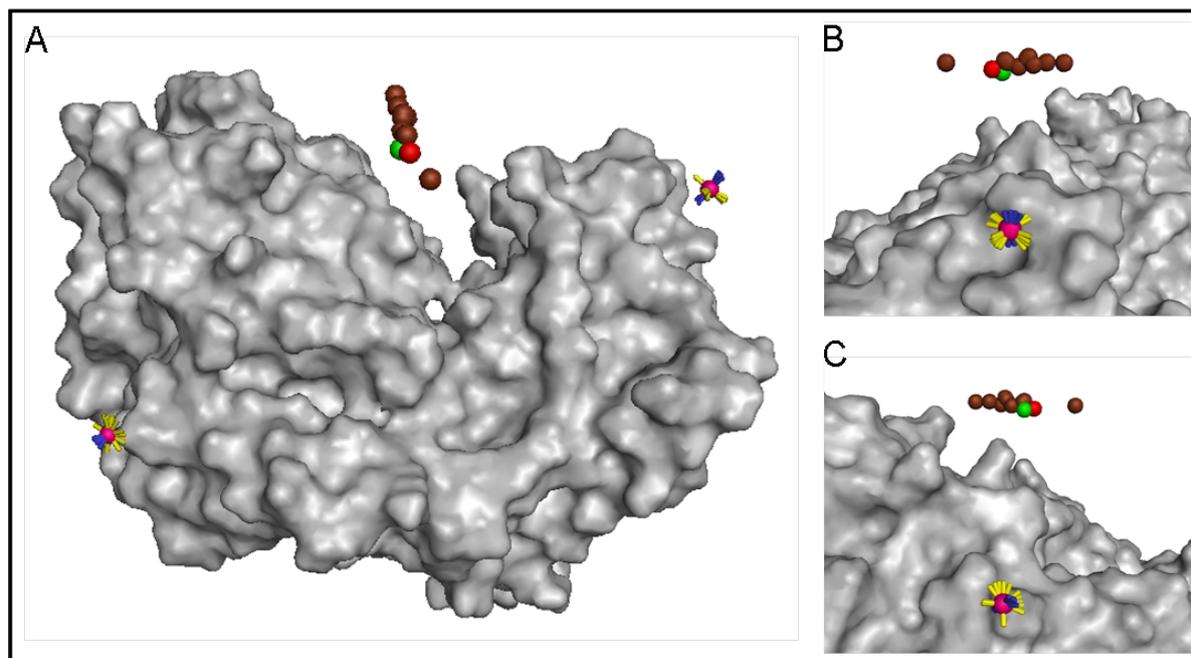


Abbildung 3.38: Populationsanalyse der Strukturen mit niedriger Gesamtenergie aus der Berechnung der Annäherung des Adx an die AdR unter Berücksichtigung von experimentellen Daten. (A) Dargestellt sind die AdR-Adx-Komplexe, der zehn Strukturen, welche die geringsten Gesamtenergien besitzen. AdR ist als Oberflächenstruktur dargestellt. Die Lanthanoid-Ionen sind als pinke Kugeln, ausgestattet mit einem Achsensystem, welche die X-Tensor-Ausrichtung darstellt, wiedergegeben. Die auf die AdR gerichtete z-Achse ist blau, während die x- und y-Achsen in gelb dargestellt sind. Die Massenschwerpunkte des Adx sind als Kugeln dargestellt. Die grüne Kugel steht für die erhaltene Struktur mit der geringsten Gesamtenergie, während die rote Kugel den Massenschwerpunkt des Adx im kristallisierten AdR-Adx-Komplex aufzeigt. Die braunen Kugeln stehen für die Massenschwerpunkte des Adx, die in weiteren geringen Gesamtenergien des Komplexes resultieren. (B, C) Detaillierte Ansicht der X-Tensoren der Thulium-Ionen, die an AdR_A (B), bzw. AdR_B (C) gekoppelt wurden.

In Abbildung 3.38 ist die AdR als Oberflächenstruktur (grau) dargestellt. Die Massenschwerpunkte der Adx, mit den zehn energetisch günstigsten Strukturen sind durch Kugeln repräsentiert und befinden sich alle in der Spalte zwischen den beiden AdR-Domänen auf einer gedachten Geraden in gleicher Entfernung zu den Lanthanoid-Ionen. Je mehr eine Struktur vom Minimum abweicht, desto höher ist ihre Gesamtenergie. Das Adx aus der Strukturlösung mit der geringsten Gesamtenergie wird als grüne Kugel, das Adx aus der Kristallstruktur, angezeigt als rote Kugel, befinden sich ebenfalls im Innern der Ansammlung.

3 Ergebnisse

Die vergrößerte Ansicht der Adx-Massenschwerpunkte aus der Perspektive der zwei unterschiedlichen Lanthanoid-Ionen wird in Abbildung 3.38 B und C angezeigt. Wie in diesen Abbildungen zu erkennen ist, rotiert der X -Tensor, während der Optimierung der Ausrichtung, überwiegend in der xy -Ebene, während die z -Achse in allen Strukturen mit niedriger Gesamtenergie sich kaum unterscheidet, wobei teilweise eine Umkehrung der Richtung beobachtet wurde. Die Beobachtung der relativen Beweglichkeit der x - und y -Achse kann mit der geringen Rhombizität des Tensors erklärt werden, das dazu führt, dass die PCSs weniger empfindlich für Veränderungen der x - und y -Achsen sind. Die größte Abweichung zeigten die X -Tensoren der Strukturen mit den höchsten Gesamtenergien.

4 Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit sollte die Interaktion zwischen den Proteinen AdR und Adx mittels der NMR-Spektroskopie, insbesondere der TROSY-Methode, untersucht werden. Diese beiden Proteine sind Komponenten der Steroidhormon-Biosynthese und nehmen darin eine essentielle Rolle ein. Die AdR erhält Elektronen vom NADPH und überträgt diese auf das Adx, welche diese wiederum auf Cytochrome P450 überträgt. Diese Enzyme vollziehen dann eine Vielzahl von Reaktionen (Ruckpaul, 1993; Sono *et al.*, 1996; Bernhardt, 1996; Guengerich, 2001; Bernhardt, 2006). AdR und Adx wurden bisher vielseitig untersucht. Mittels ortsgerichteter Mutagenese konnten die Aminosäuren Asp76 und Asp79 der Adx als essentielle Aminosäuren in der Wechselwirkung zur AdR identifiziert werden. Die Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen ist somit zum großen Teil elektrostatischer Natur (Coghlan & Vickery, 1991; Bernhardt, 1996; Vickery, 1997). Die AdR und das Adx wurden weiterhin in zahlreichen Untersuchungen auf ihre spektroskopischen und kinetischen Eigenschaften hin untersucht (Sagara *et al.*, 1993; Uhlmann *et al.*, 1994; Grinberg *et al.*, 2000; Schiffler *et al.*, 2004). Mittlerweile sind sowohl die AdR, als auch das Adx(4-108), sowie dessen Wildtyp-Form kristallisiert (Müller *et al.*, 1998; Ziegler *et al.*, 1999; Pikuleva *et al.*, 2000). 2001 gelang es darüber hinaus, den *cross-link*-Komplex AdR-Adx zu kristallisieren, so dass ein Einblick in die atomaren Wechselwirkungen zwischen der AdR und Adx möglich wurde (Müller *et al.*, 2001).

Das Hauptanliegen dieser Arbeit ist es, den Interaktionsbereich des Adx in Wechselwirkung mit seinem physiologischen Interaktionspartner AdR zu untersuchen und damit verbunden die Struktur dieses Komplexes mittels Docking-Berechnungen zu ermitteln. Die Voraussetzung für diese Studien waren AdR-Mutanten, die jeweils ein Cysteinpaar an definierten Positionen auf der Protein-Oberfläche besitzen. Diese Cysteinpaare wurden genutzt, um die Lanthanoid-ligierende NMR-Sonde CLaNP-5 über zwei Disulfidbrücken an das Protein zu koppeln.

Die Betrachtung des Strukturmodells der AdR (PDB Eintrag: 1E6E) ergab, dass die vorhandenen Cysteine nicht verwendet werden konnten, um Ln-CLaNP-5 zu binden. Abbildung 3.1 zeigt, dass die Cysteine C10, C74 und C364, lokalisiert in der FAD-Domäne,

Distanzen von über $8 \pm 2 \text{ \AA}$ aufweisen und damit zu weit voneinander entfernt sind (C364 - C10: $12,02 \text{ \AA}$; C10 - C74: $11,36 \text{ \AA}$). Die Distanz zwischen C145 und C322, die in der NADPH-Domäne liegen, beträgt zwar $7,13 \text{ \AA}$, dennoch konnten diese Cysteine nicht verwendet werden, da sie auf unterschiedlichen Schleifen lokalisiert sind (Abbildung 3.2). Die notwendige rigide Kopplung der NMR-Sonde wäre somit nicht gewährleistet.

Zusätzlich wurde geprüft, wie sich der AdRWT bei der Zugabe des Ln-CLaNP-5 verhält. Untersuchungen zeigten, dass das Protein in hohem Maß aggregierte. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass die NMR-Sonde eine unspezifische Bindung mit den Cysteinen des AdRWT eingeht. Um dieser Bindung vorzubeugen, sollten alle fünf Cysteine zu Serin mutiert werden. Dabei sah die Strategie zu Beginn der Arbeit vor, eine AdR-Fünffachmutante zu erzeugen. Hierzu wurden Voruntersuchungen in unserem Institut mit bereits vorliegenden AdR-Einfachmutanten durchgeführt, in denen jeweils eines der fünf Cysteine zu Serin mutiert worden war (Donauer, 2006). Diese wurden anschließend in Hinblick auf den korrekten Einbau des FADs mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Die Mutation einzelner Cysteine zu Serin nahm keinen Einfluss auf dessen Funktionalität (Donauer, 2006), so dass im Folgenden die AdR-Fünffachmutante (AdR_C10S/C74S/C145S/C322S/C364S) erzeugt wurde.

Hierzu stand die AdR-Dreifachmutante (pMOS_AdR_C10S/C145S/C364S) im Klonierungsvektor pMOSBlue zur Verfügung (Donauer, 2006). Nach erfolgter Umklonierung in den Vektor pCWori⁺ (Sagara *et al.*, 1987) wurden unterschiedliche Expressions- und Reinigungsversuche gestartet.

4.1 Heterologe Expression und Reinigung der AdR-Formen

Expression und Reinigung der AdR-Fünffachmutante

Nach der Klonierung der AdR-Fünffachmutante in den Vektor pCWori⁺ erfolgten mehrere Expressionsversuche. Es konnte gezeigt werden, dass die AdR-Fünffachmutante (AdR_C10S/C74S/C145S/C322S/C364S) zwar erfolgreich exprimiert werden konnte, aber ausschließlich in der Pelletfraktion detektiert wurde. Die AdR ist ein membran-

4 Diskussion und Ausblick

assoziiertes Protein. Aufgrund der Vermutung, dass sich die Löslichkeit durch die eingeführten Mutationen verändert haben könnte, wurde versucht, das Protein mittels Detergenzien zu solubilisieren. Die Versuche erfolgten unter Verwendung von Tween 20 und Natriumcholat, jeweils in Anwesenheit von 0,5 M NaCl zur Verstärkung der Solubilisierungswirkung (Rehm, 2006). Die AdR-Mutante wurde erneut in der Pelletfraktion detektiert. In Folge dessen wurde ein Nachweis auf Einschlusskörper durchgeführt, der ergab, dass das Protein in solche akkumulierte. Folglich wurden Koexpressionen in Anwesenheit der Chaperonplasmide pRDKJG und pREP4groESL durchgeführt (Caspers *et al.*, 1994). Die Chaperone beider Systeme konnten erfolgreich exprimiert und nachgewiesen werden (Abbildung 3.6), während die AdR-Mutante erneut nicht in löslicher Form nachweisbar war (Spur 4 und 8, Abbildung 3.6).

Die Expression erfolgte bis zu diesem Zeitpunkt in dem Expressionsvektor pCWori⁺, welche den *Lac*-, den *Tac*- und den *UV5*-Promoter, die alle bakteriellen Ursprungs sind, enthält. Oft sind diese Promoter nicht vollständig reguliert, so dass sie ein hohes Grundniveau der Expression unter nicht induzierten Bedingungen zeigen. (Wilms *et al.*, 2001). Aufgrund dieser unkontrollierten Expression könnte die Akkumulation der Mutante in Einschlusskörper verursacht werden. Als weiteres Expressionssystem wurde daher das Plasmid pET17b getestet, welches einen T7-Promoter mit viralem Ursprung enthält. Drei unabhängige Expressionsversuche durch Induktion mittels IPTG mit Endkonzentrationen von 0,25, 0,5 und 1 mM wurden analysiert. Die AdR-Mutante wurde erneut in der Pelletfraktion detektiert, so dass doch weiterhin der Expressionsvektor pCWori⁺ für die nachfolgenden Versuche verwendet wurde.

Ein weiterer Ansatz war es, Expressionen bei niedrigeren Temperaturen durchzuführen, um mit der dadurch verlangsamten Expression des Proteins eine funktionsfähige AdR-Mutante zu erzeugen. Mittels SDS-PAGE konnte in allen Versuchen gezeigt werden, dass die Expression der AdR-Mutante in einem hohen Maßstab erfolgte (Abbildung 3.3). Dennoch blieb der Versuch, eine funktionsfähige AdR-Fünffachmutante zu erhalten, ohne Erfolg.

Die Betrachtung der Wasserstoffbrückenbindungen könnte einen Hinweis auf die Instabilität des Proteins geben. In den folgenden Abbildungen sind die Wasserstoffbrückenbindungen, die von den Thiolgruppen der Cysteine des Wildtyps ausgehen denen der

Hydroxidgruppen der Mutanten zum Vergleich gegenübergestellt.

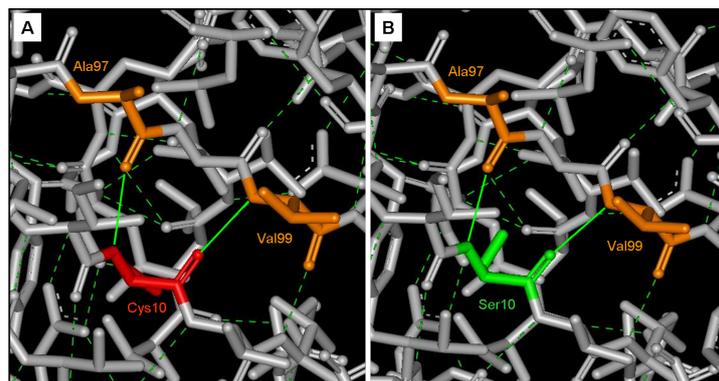


Abbildung 4.1: Wasserstoffbrückenbindungen, die von (A) Cys10 dargestellt als Stabmodell in rot und (B) Ser10 dargestellt als Stabmodell in grün, ausgebildet werden. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind für das Cys10 und das Ser10 identisch. Beide Aminosäuren bilden eine Wasserstoffbrückenbindung zum Ala97 und Val99 aus, die als orange Stabmodelle gekennzeichnet sind.

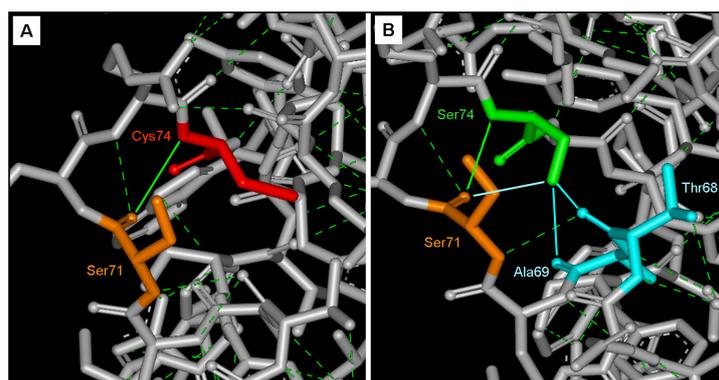


Abbildung 4.2: Wasserstoffbrückenbindungen, die von (A) Cys74 dargestellt als Stabmodell in rot und (B) Ser74 dargestellt als Stabmodell in grün, ausgebildet werden. Während Cys74 eine einzige Wasserstoffbrückenbindung zum Ser71 (orangefarbenes Stabmodell) ausbildet, bildet das Ser74 drei zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen aus. Davon wird eine weitere zum Ser71 ausgebildet und jeweils eine weitere zum Thr68 und Ala89, die in blau dargestellt sind.

4 Diskussion und Ausblick

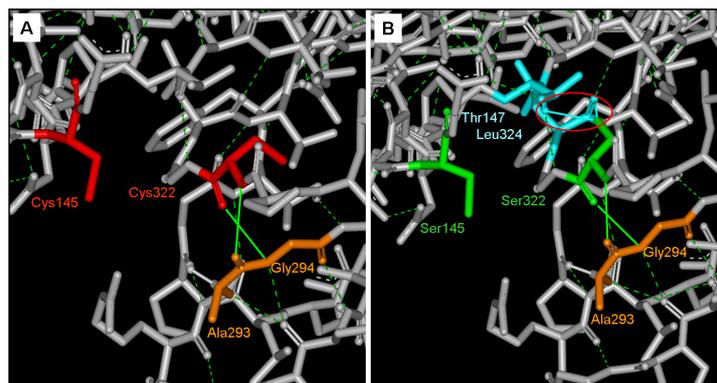


Abbildung 4.3: Wasserstoffbrückenbindungen, die von (A) Cys145 und Cys322 dargestellt als Stabmodell in rot und (B) Ser145 und Ser322 dargestellt als Stabmodell in grün, ausgebildet werden. Weder Cys145 noch Ser145 bilden Wasserstoffbrückenbindungen aus. Im Gegensatz dazu bildet Cys322 jeweils eine Wasserstoffbrückenbindung zum Ala293 und Gly294 (orange Stabmodelle) aus. Auch Ser322 zeigt die gleichen Bindungen, wobei es zusätzlich jeweils eine weitere Wasserstoffbrückenbindung sowohl zum Thr147, als auch zum Leu324 (blaue Stabmodelle) ausbildet.

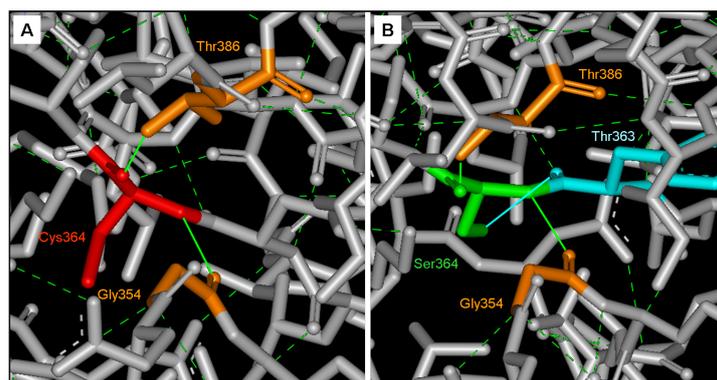


Abbildung 4.4: Wasserstoffbrückenbindungen, die von (A) Cys364 dargestellt als Stabmodell in rot und (B) Ser364 dargestellt als Stabmodell in grün, ausgebildet werden. Während Cys364 zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu Gly354 und Thr386 (orange Stabmodelle) ausbildet, bildet das Ser364 eine dritte Wasserstoffbrückenbindungen zum Thr363 aus, dargestellt in blau.

Wie in den Abbildungen 4.1 - 4.4 zu erkennen ist, gibt es für Cys10 und Cys145 nach der Mutation zum Serin keine Änderung in der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und damit keine Änderung in der Struktur. Im Gegensatz dazu bildet Ser74 drei weitere, Ser322 zwei weitere und Ser364 eine weitere Wasserstoffbrückenbindung aus. Es wurde nicht beobachtet, dass Bindungen aufgehoben wurden, was durch die polarere Hydroxidgruppe zu erklären ist.

Obwohl Wasserstoffbrückenbindungen die dreidimensionale Struktur von Proteinen stabilisieren, könnten die in der AdR-Fünffachmutante zusätzlich ausgebildeten, aber unerwünschten, Wasserstoffbrückenbindungen während der Faltung zu Verzerrungen und damit zur Destabilisierung des Proteins führen.

Möglicherweise nehmen die Cysteine auch während der Faltung eine essentielle Rolle ein, so dass durch ihre Mutation zu Serin der Faltungsprozess durch potentiell stärkere Wechselwirkungen gestört wird.

Expression und Reinigung der AdR-Dreifachmutante

Die Erzeugung einer AdR-Mutante, deren exponierte Cysteine zu Serin mutiert wurden, stand als Konsequenz aus den bisher durchgeführten Experimenten im Fokus. Die Detektion dieser Cysteine erfolgte durch zwei unabhängige Thiol-Gruppen-Bestimmungen. Für diese wurden die fünf AdR-Einfachmutanten, in denen jeweils eines der fünf Cysteine zu Serin mutiert wurde herangezogen. Der erste Test unter Anwendung des *Thiol and Sulfide Quantitation Kits* konnte kein klares Ergebnis darüber liefern, welche Cysteine exponiert vorliegen und welche nicht. Aufgrund der Tatsache, dass innerhalb der Versuchsreihen Unterschiede von bis zu einem Cystein pro Mutante erhalten wurden, wurde ein weiterer Test herangezogen. In diesem zweiten Test wurde DTNB eingesetzt. Der Vorteil dieses Tests liegt darin, dass die Proteine im nativen und denaturierten Zustand gemessen und aus ihrem Verhältnis die Anzahl der exponierten Cysteine, sowohl des AdRWT als auch der Mutanten bestimmt werden können. Der Test ergab, dass die Cysteine C74, C145 und C322 exponiert vorliegen, während C10 und C364 im Proteininneren lokalisiert sind. Im Folgenden sind die exponierten Cysteine in der Kristallstruktur dargestellt (Müller *et al.*, 1998).

4 Diskussion und Ausblick

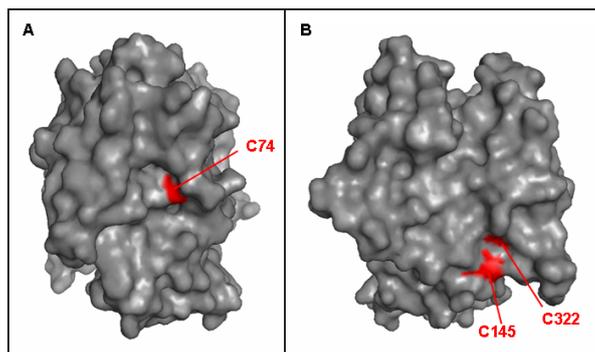


Abbildung 4.5: Oberflächenstruktur der AdR in grau. (A) Seitenansicht auf die NADPH-Domäne. In rot dargestellt ist das Cystein C74 (B) Seitenansicht auf die FAD-Domäne. Dargestellt in rot sind die Cysteine C145 und C322. Die Cysteine C10 und C364 sind nicht auf der AdR-Oberfläche lokalisiert.

Der Vergleich dieser Ergebnisse mit der Kristallstruktur ergab, dass die drei Cysteine C74, C145 und C322 auf der Oberfläche der AdR lokalisiert sind (Abbildung 4.5 A und B). Der Nachweis der exponierten Cysteine mittels DTNB bestätigte die Kristallstruktur. Folglich wurde die AdR-Dreifachmutante (AdR_C74S/C145S/C322S) mittels zielgerichteter Mutagenese hergestellt, exprimiert und chromatographisch gereinigt. Versuche, die Dreifachmutante zu exprimieren, führten, wie auch bei der Fünffachmutante zuvor, zu keinem löslichen Protein. Das Protein wurde wieder nur in der Pelletfraktion detektiert.

Daher wurden die bereits vorliegenden fünf AdR-Einfachmutanten nach ihrer Expression und Reinigung einem Test unterzogen, in dem geprüft wurde, welche der Einfachmutanten die höchste Stabilität bei Ln-CLaNP-5 Zugabe besaß (Universität Leiden, Niederlande). Die Mutanten AdR_C145S und AdR_C364S zeigten die höchste Stabilität bei der Zugabe der NMR-Sonde. Dieses Ergebnis ist dennoch überraschend, da mindestens zwei bzw. drei Cysteine exponiert vorliegen. Offensichtlich scheinen aber die beiden Cysteine C145 und C364 eine größere Erreichbarkeit für Ln-CLaNP-5 aufzuweisen. Obwohl das Cystein C364 im Innern der AdR lokalisiert ist, ist es aber vermutlich durch Konformationsänderungen gut für Ln-CLaNP-5 zugänglich.

Expression und Reinigung der Mutanten AdR_A und AdR_B

Für die Anbringung des Ln-CLaNP-5 war es notwendig AdR-Mutanten zu erzeugen, die jeweils ein exponiertes Cysteinpaar besitzen. Nach Auswahl der entsprechenden Positio-

nen für die Einführung der Cysteinpaare wurden mittels der ortsgerichteten Mutagenese die Mehrfachmutanten AdR_A (pBAR_AdR_C364S/S425C/K429C) und AdR_B (pBAR_AdR_C145S/C364S/Q232C/K236C) im Klonierungsvektor pMOSBlue hergestellt. Nach dem Klonieren in den Expressionsvektor pCWori⁺ wurde die Expression und Reinigung der Mehrfachmutanten durchgeführt.

Die Mutanten AdR_A und AdR_B ließen sich direkt beim ersten Versuch exprimieren, obwohl es sich um Mehrfachmutanten handelte. Frühere Versuche, Mehrfachmutanten zu erhalten, blieben dagegen erfolglos. Die Mutation mehrerer endogener Cysteine führt offensichtlich zu erheblichem Stabilitätsverlust, da sie während der Faltung eine stabilisierende Rolle einnehmen könnten. Im Gegensatz dazu führten die Mutationen von Resten zu Cystein an der Oberfläche der AdR zu keiner Destabilisierung.

Expressionsoptimierung aller AdR-Mutanten

Die Expression der fünf Einfachmutanten war erfolgreich, lieferte dennoch nicht ausreichende Mengen an Protein, um weitere Charakterisierungen durchführen zu können (Tabelle 3.3). Daher wurde zunächst das Chaperonplasmid pGro12 eingesetzt, um die Expressionsrate der Einfachmutanten zu erhöhen (Nishihara *et al.*, 1998). Auch wurden die Mehrfachmutanten AdR_A (AdR_C364S/S425C/K429C) und AdR_B (AdR_C145S/C364S/Q232C/K236C) nach erfolgreicher Mutagenese in JM109 Zellen mit pGro12 koexprimiert. Damit konnte die Expressionsrate bereits deutlich erhöht werden (Abbildung 4.6). Die Zugabe von Arabinose, welches für die Induktion der Chaperonexpression verwendet wird, führt zusätzlich zu osmotischem Stress, wodurch die Expressionsrate nochmals gesteigert wurde (Kagawa & Cao, 2001).

Der Versuch, eine weitere Erhöhung der Expressionsrate zu erzielen, erfolgte durch den Einsatz des *E. coli* Stammes C43(DE3) (Miroux & Walker, 1996). Dieser Stamm besitzt die Besonderheit, aufgrund von zwei bisher unbekannter Mutationen zusätzliche Membraneinstülpungen auszubilden. Diese zusätzlich vorhandene Oberfläche unterstützt die Expression von membranassoziierten bzw. membranintegrierten Proteinen. Das der Wechsel zu diesem Stamm die Expressionsrate weiter erhöhte, ist in Abbildung 4.6 (rote Balken) deutlich zu erkennen. Diese Maßnahme führte bis zu einem 13-fachen Anstieg der Expressionsrate. Das angewendete IPTG-Screening unterstützte zusätzlich die Selektion

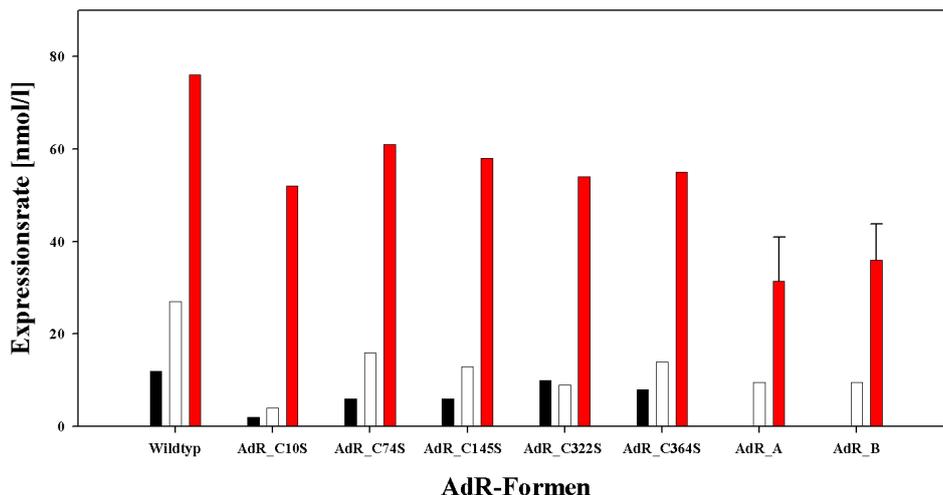


Abbildung 4.6: AdR-Expressionsraten unter Einsatz von (A) JM109 in schwarz, (B) JM109/pGro12 in weiss, (C) C43(DE3)/pGro12 in rot.

der Bakterien, die beide Expressionsplasmide enthielten.

Das in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Protokoll konnte durch den Einsatz des Stammes C43(DE3) und des Chaperonplasmids pGro12 erfolgreich optimiert werden.

Die Reinheit der Proteine wurde mittels SDS-PAGE überprüft und es zeigte sich, dass alle AdR-Formen mit hoher Reinheit vorlagen. Die Chaperone GroES/EL konnten während der Reinigung erfolgreich entfernt werden (Abbildung 3.8).

4.2 Charakterisierung der AdR-Mutanten

Um die Interaktion zwischen AdR und Adx untersuchen zu können, war die Einführung von Mutationen in die AdR notwendig. Da diese zu strukturellen sowie kinetischen Änderungen der AdR führen könnten, wurden diese eingehend charakterisiert. Eine veränderte Struktur könnte zu einer Störung oder sogar Unterbrechung der Interaktion zwischen AdR und Adx führen, die weitere Untersuchungen unmöglich machen würden.

Um erste Hinweise auf strukturelle Änderungen zu erhalten, wurden UV/Vis-Spektren aller AdR-Formen aufgenommen. Das Spektrum des oxidierten AdRWT weist Maxima bei 376 nm und 450 nm auf, sowie Schultern bei 425 nm und 475 nm (Abbildung 3.9 A und B). Für alle untersuchten AdR-Mutanten konnte das gleiche charakteristische Spektrum wie für den AdRWT erhalten werden (Sagara *et al.*, 1993).

Zur näheren Untersuchung der FAD-Region wurden im Folgenden CD-Spektren auf-

4 Diskussion und Ausblick

gezeichnet (Abbildung 3.10 A und B). Die im nahen UV (250 - 320 nm) und sichtbaren Bereich (320 - 650 nm) auftretenden Maxima und Minima zeigten dasselbe charakteristische Muster wie der AdRWT. Alle Spektren zeigten das typische CD-Spektrum für Flavoproteine nach der Edmonson-Klassifizierung (Edmondson & Tollin, 1971). Das FAD wurde somit korrekt eingebaut und die Umgebung des FADs wurde nicht verändert.

In Kombination mit der CD-Spektroskopie wurde die thermische Stabilität der Mutanten geprüft. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Demnach zeigten alle Einfachmutanten eine bis zu 5,4°C geringere Schmelztemperatur als der AdRWT (AdR_C10S: -2,9°C, AdR_C74S: -5,4°C, AdR_C145S: -2,2°C, AdR_C322S: -3,5°C und AdR_C364S: -4,6°C), während die Mehrfachmutanten ihrerseits eine um ca. 6°C geringere Schmelztemperatur (AdR_A: -6,3°C und AdR_B: -6,4°C) zeigten. Das für die Mutanten AdR_C10S und AdR_C145S erhaltene Ergebnis ist überraschend, da diese nach der Mutation keine veränderte Wasserstoffbrückenbindung aufweisen dürften.

Die Reduktion des Adx durch die AdR ist von besonderer Bedeutung. Findet der Elektronentransfer vom NADPH nicht über die AdR auf das Adx statt, ist die Elektronentransferkette unterbrochen, wodurch die Cytochrome P450 zu keiner Substratumwandlung befähigt wären. Um die Reduktionsfähigkeit der AdR-Mutanten zu prüfen, wurde der physiologische Reaktionspartner AdxWT herangezogen. Die Unterscheidung des oxidierten und reduzierten AdxWT erfolgte spektroskopisch. Die oxidierte Form des Adx besitzt drei Absorptionsmaxima bei 320, 414 und 455 nm (Grinberg *et al.*, 2000), während nach der Reduktion des Adx die Abnahme der Maxima bei 320 und 414 nm zu beobachten ist. Damit einher geht die Maximumausbildung bei 540 nm (Estabrook *et al.*, 1973). Wie in den Abbildungen 3.11 A und B zu erkennen ist, konnte das charakteristische Spektrum für den reduzierten AdxWT bei Einsatz aller AdR-Mutanten erhalten werden, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Elektronenübertragung auf AdxWT nicht gestört wurde.

Das Modellsystem, in dem die Elektronenübertragung über die AdR und Adx auf den artifiziellen Elektronenakzeptor Cytochrom *c* erfolgt, wurde eingesetzt, um die AdR-Mutanten näher charakterisieren zu können. Die Reduktion des Adx durch die AdR ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Elektronentransfer (Lambeth *et al.*, 1979; Geren *et al.*, 1984; Cupp & Vickery, 1989; Coghlan & Vickery, 1991; Uhlmann

4 Diskussion und Ausblick

et al., 1994). Somit können die für das Cytochrom *c* erhaltenen kinetischen Daten mit denen der AdR gleichgesetzt und verglichen werden.

Die erhaltenen K_m - (0,40 μM) und V_{max} -Werte (455 nmol Cyt c_{red}/min) für den AdRWT in Reaktion mit dem AdxWT liegen im Vergleich zu den von Hannemann *et al.* (2001) erhaltenen Daten etwas höher, mit einem K_m -Wert von 0,31 μM und einem V_{max} -Wert von 259 nmol Cyt c_{red}/min (Hannemann *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu wurden von Uhlmann *et al.* (1994) für den AdxWT K_m (5,9 nM) und V_{max} (7,4 nmol Cyt c_{red}/min) Werte im nanomolaren Bereich erhalten (Uhlmann *et al.*, 1994). Naheliegender ist, dass die verschiedenen Konzentrationen, sowie unterschiedlichen Verhältnisse der Proteine ein Grund für die unterschiedlichen Werte sind. Eingesetzt wurde eine AdR-Konzentration von 0,05 μM , sowie Cytochrom *c* mit einer Konzentration von 65 μM (Uhlmann *et al.*, 1994), während im Rahmen dieser Arbeit ein Verhältnis von 1:1:200 (AdR:Adx:Cytochrom *c*) eingesetzt wurde.

Die kinetischen Daten für den AdRWT in Reaktion mit Adx(4-108) zeigen im Vergleich zum AdxWT erhöhte Werte, wie sie auch von Uhlmann *et al.* (1994) erhalten wurden (Uhlmann *et al.*, 1994). Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit zeigten ebenfalls erhöhte K_m - (60 %) und V_{max} -Werte (5 %) im Vergleich des Adx(4-108) zum AdxWT auf.

Mittels des Cytochrom *c* Tests konnte also gezeigt werden, dass die AdR-Mutanten kaum Abweichungen zur Wildtyp-Form besitzen und in der Lage sind, die Elektronenübertragung auf Adx zu vollziehen und infolge dessen die Reduktion des Cytochrom *c* durchzuführen. Nur für die AdR_B-Mutante wurden wie in den Abbildungen 3.12 und 3.13 zu erkennen ist, ein 2-facher K_m -Wert und ein etwas geringerer Wert für V_{max} erhalten.

Um die Interaktion zwischen AdR und Adx genauer charakterisieren zu können, wurden Plasmonresonanzspektren aufgenommen. Damit wurden die Assoziations- (k_a) und Dissoziationsraten (k_d) des AdR zum Adx und die aus diesen Daten resultierende Dissoziationskonstante ($K_D=k_d/k_a$) ermittelt, die Aufschluss über die Stärke der Bindung der AdR zum AdxWT bzw. Adx(4-108) gibt. Die Interaktion zwischen diesen Komponenten, wie auch zwischen dem AdxWT und den Cytochrom P450 Enzymen, wie z.B. CYP11A1 wurde bereits vielseitig untersucht (Zöllner *et al.*, 2002, 2004; Schiffler *et al.*, 2004; Ber-

4 Diskussion und Ausblick

wanger *et al.*, 2010). Die erhaltenen Bindungskonstanten für die AdxWT-AdRWT Interaktion zeigten im Vergleich zu früheren Messungen eine erhöhte Assoziationsrate, sowie eine verringerte Dissoziationsrate. Dieses Ergebnis resultiert in einer höheren Affinität zwischen den Interaktionspartnern (Tabelle 3.7). Begründet werden kann dies durch das verwendete Biacore 2000 System (Zöllner *et al.*, 2004; Schiffler *et al.*, 2004), während in dieser Arbeit das Biacore 3000 System für die Analysen eingesetzt wurde. In der Reaktion des AdRWT und der Mutanten mit Adx(4-108) wurden für alle AdR-Formen K_D -Werte in der gleichen Größenordnung wie für den AdxWT erhalten, während die Einfachmutanten etwas größere Abweichungen zeigten.

Die Bestimmung der K_m -Werte erfolgte unter Verwendung des artifiziellen Elektrodenakzeptors Cytochrom *c*, welcher während der Reaktion im Überschuss vorlag (Geren *et al.*, 1984; Cupp & Vickery, 1989; Coghlan & Vickery, 1991; Uhlmann *et al.*, 1994). Unter dieser Bedingung kann der erhaltene K_m -Wert dem K_D -Wert gleichgesetzt werden (Lambeth & Kamin, 1979; Hannemann *et al.*, 2001). In den folgenden Tabellen 4.1 und 4.2 sind die K_m - und K_D -Werte aus den Experimenten gegenüber gestellt. Für die AdR_B-Mutante war aufgrund eines Defekts des Gerätes die Messung bis jetzt nicht möglich.

Tabelle 4.1: Vergleich der kinetischen Daten der AdR-Formen in Interaktion mit AdxWT.

AdR-Formen	AdxWT	
	K_m [μM]	K_D [μM]
Wildtyp	$0,40 \pm 0,20$	$0,24 \pm 0,04$
AdR_C10S	$0,55 \pm 0,05$	$0,76 \pm 0,08$
AdR_C74S	$0,55 \pm 0,17$	$0,44 \pm 0,09$
AdR_C145S	$0,58 \pm 0,15$	$0,56 \pm 0,10$
AdR_C322S	$0,51 \pm 0,08$	$0,60 \pm 0,03$
AdR_C364S	$0,54 \pm 0,06$	$0,57 \pm 0,10$
AdR_A	$1,28 \pm 0,52$	$0,20 \pm 0,04$
AdR_B	$0,79 \pm 0,12$	$0,34 \pm 0,09$

Tabelle 4.2: Vergleich der kinetischen Daten der AdR-Formen in Interaktion mit Adx(4-108).

AdR-Formen	Adx(4-108)	
	K_m [μM]	K_D [μM]
Wildtyp	$0,64 \pm 0,15$	$0,22 \pm 0,08$
AdR_C10S	$0,55 \pm 0,06$	$0,62 \pm 0,14$
AdR_C74S	$0,63 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,12$
AdR_C145S	$0,58 \pm 0,19$	$0,63 \pm 0,24$
AdR_C322S	$0,59 \pm 0,18$	$0,74 \pm 0,11$
AdR_C364S	$0,62 \pm 0,18$	$0,44 \pm 0,07$
AdR_A	$1,65 \pm 0,45$	$0,17 \pm 0,04$
AdR_B	$0,80 \pm 0,08$	-

4 Diskussion und Ausblick

Während die K_m - und K_D -Werte für die Einfachmutanten in Reaktion mit beiden Adx-Formen nur geringe Unterschiede zeigten, liegen die K_D -Werte für den AdRWT und die AdR-Mehrfachmutanten unter den K_m -Werten, die mit dem Cytochrom *c* Tests erhalten wurden. Eine eindeutige Klärung dieses Phänomens ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich.

Bisher wurde überprüft, ob die Mutationen in den AdR-Mutanten Einfluss auf die Wechselwirkung des AdR-Adx-Komplexes nehmen. Abschließend wurde überprüft, ob die geringen Unterschiede in der Interaktion zwischen den Reaktionspartnern den Substratumsatz beeinflussen. Als Substrat wurde 7-Dehydrocholesterol eingesetzt, das zu 7-Dehydropregnenolon umgesetzt wird (Slominski *et al.*, 2004). Für die Auswertung der Umsätze wurde nicht wie bisher der interne Standard Cortisol verwendet, sondern Cholecalciferol. Untersuchungen an unserem Institut zeigten, das Cholecalciferol als interner Standard besser geeignet war als Cortisol (Janocha *et al.*, in Vorbereitung), da dessen Retentionszeit von 1,5 min nicht mit dem Produktpeak überlappte (1,8 min). Die Retentionszeit für Cholecalciferol lag bei 6,1 min. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden die Retentionszeiten für die verwendete Säule bestimmt.

Aus den erhaltenen Daten wurden die k_{cat} -Werte für die AdR-Formen in Interaktion mit AdxWT und Adx(4-108) ermittelt. Die k_{cat} -Werte, die für die Mutanten erhalten wurden weisen gleiche k_{cat} -Werte auf wie die AdRWT-Form. Diese liegen in der gleichen Größenordnung wie sie bereits durch Schiffler *et al.* (2001) erhalten wurden. Der k_{cat} -Wert liegt für den AdR-Adx(4-108)-Komplex bei $31 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und ist damit 2,8-fach höher als der Wert für den AdR-AdxWT-Komplex mit $11 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Schiffler *et al.*, 2001). Diese Werte liegen um eine Größenordnung höher als die in dieser Arbeit erhaltenen k_{cat} -Werte für den AdR-Adx(4-108)-Komplex mit $22,8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und den AdR-AdxWT-Komplex mit $13,4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Ein möglicher Grund liegt in der Verwendung des heterolog exprimierten CYP11A1 in dieser Arbeit, während in früheren Untersuchungen das CYP11A1 aus den Nebennieren gereinigt und für Untersuchungen eingesetzt wurde (Schiffler *et al.*, 2001). Eine weitere Möglichkeit könnte auch in dem verwendeten Substrat Cholesterol zu finden sein (Schiffler *et al.*, 2001). Schließlich könnte es auch in der unterschiedlichen Pufferzusammensetzung begründet sein. Während in dieser Arbeit HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) mit 0,05 % Tween 20 verwendet wurde, wurde von Schiffler *et al.* (2001) 50 mM

4 Diskussion und Ausblick

KPP (pH 7,3) mit 0,1 M KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTE und 0,05% Natriumcholat verwendet. Wie bereits zuvor gezeigt wurde, lag der Umsatz im Schnitt um 74 % höher, wenn Adx(4-108) für die Umsatzreaktionen eingesetzt wurde (Schiffler *et al.*, 2001).

Die relative Produktbildung wurde im Folgenden für die AdR-Einfachmutanten und Mehrfachmutanten im Vergleich zum AdRWT aufgetragen (Abbildung 4.7).

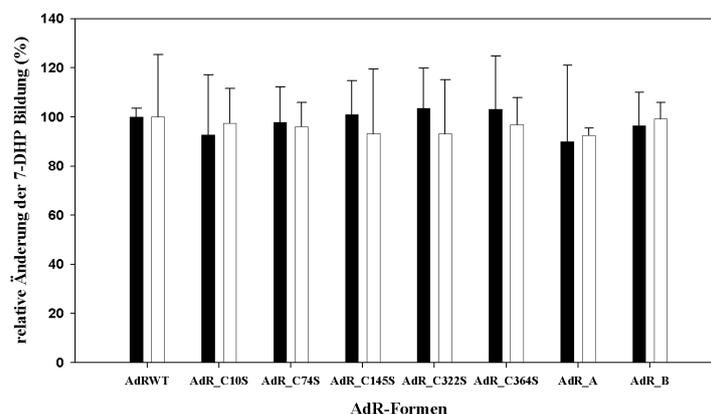


Abbildung 4.7: CYP11A1 abhängige 7-Dehydrocholesterol Umwandlung zu 7-Dehydropregnenolon in Anwesenheit der AdR-Formen und entweder AdxWT (schwarz) oder Adx(4-108) (weiss).

4.3 Paramagnetische NMR-Messungen

Die Untersuchung der Interaktion des AdR-Adx-Komplexes erfolgte mit der NMR-Spektroskopie, insbesondere der TROSY-Methode, mit der die Möglichkeit eröffnet wurde, größere Proteine, sowie Proteinkomplexe zu untersuchen (Pervushin *et al.*, 1997; Kay & Gardner, 1997; Gardner & Kay, 1998). Durch die optimierte Pulssequenz werden scharfe Resonanzsignale erhalten, die aufgrund ihrer geringeren Linienverbreiterung auswertbar sind (Pervushin *et al.*, 1997). Damit wurde es möglich, zunächst den Interaktionsbereich des 65 kDa großen AdR-Adx-Komplexes zu untersuchen. Gemessen wurden die CSPs der $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx in Ab- und Anwesenheit seines Komplexpartners.

Anschließend wurden Paramagneten eingesetzt, deren unterschiedliche Effekte genutzt wurden, um den Interaktionsbereich genauer untersuchen zu können (Otting, 2008). Verwendet wurden die Lanthanoide Thulium, welches PCSs verursacht und Gadolinium, das zu PREs führt. Diese Lanthanoide wurden in das Lanthanoid-chelatierende Molekül CLaNP-5 ligiert, welches dann über Disulfidbrücken an definierte Positionen der AdR-Oberfläche gekoppelt wurden. Der Vorteil, den der Einsatz dieser Lanthanoide bietet

ist, dass sie trotz ihrer sehr ähnlichen chemischen Eigenschaften, große Unterschiede in ihren paramagnetischen Eigenschaften zeigen. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um weitreichende Distanzinformationen zu erhalten. Durch den Einsatz dieser neuartigen NMR-Sonde wurden bereits Protein-Protein-Interaktionen untersucht (Vlasie *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009).

Bestimmung des Interaktionsbereiches des Adx in Reaktion mit der AdR durch die Bestimmung der Chemischen-Verschiebungsänderung

Um erste Informationen über den Interaktionsbereich des Adx zu erhalten, erfolgten NMR-Experimente des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) in Ab- und Anwesenheit seines Komplexpartners AdR. Durch die Überlagerung der Spektren konnten unterschiedlich starke CSPs mit bis zu 0,563 ppm beobachtet werden (Abbildung 3.16). Das Auftreten einiger weniger CSPs mit hohen Werten im Vergleich zu der großen Zahl der bestimmten CSPs, gibt Auskunft darüber, ob das Protein eine einzige Orientierung während der Wechselwirkung mit seinem Komplexpartner aufweist (Prudêncio & Ubbink, 2004; Worrall *et al.*, 2002, 2003).

Insgesamt wurden für 63 Amidgruppen CSPs ermittelt. Diese sind sowohl in der Kern-domäne (Asp5 - Cys55 und Gly91 - Pro108) als auch in der Interaktionsdomäne (His56 bis Leu90) lokalisiert, während für die Reste 44-56 und 90-94 aufgrund der Anwesenheit des Eisen-Schwefel-Clusters keine Signale beobachtet wurden.

Unter den Aminosäureresten mit großen CSPs befinden sich auch Asp39, Asp41 und Gly42, die sich in der Kerndomäne befinden (0,108 ppm, 0,050 ppm und 0,545 ppm), sowie Asp72, Asp76, Asp79 (0,171 ppm, 0,165 ppm und 0,171 ppm), die in der Interaktionsdomäne des Adx lokalisiert sind. Die Aminosäuren Asp76 und Asp79 konnten bereits durch ortsgerichtete Mutagenese und in der Kristallstruktur als die für die Interaktion essentiellen Aminosäuren identifiziert werden (Coghlan & Vickery, 1991; Vickery, 1997; Müller *et al.*, 2001).

Diese Aminosäurereste bilden eine Art Ring um den Eisen-Schwefel-Cluster (Abbildung 3.17). Insbesondere die Aminosäurereste Gly42 und Phe59 zeigten die größten CSPs (0,545 ppm bzw. 0,563 ppm). Auch die benachbarten Reste Phe43 und Glu60 zeigten große CSPs (0,251 ppm bzw. 0,236).

4 Diskussion und Ausblick

Um die Unterschiede des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT zum $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) während der Interaktion genauer zu untersuchen, wurden die CSPs des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT ermittelt. Die NMR-Messungen des AdR-Adx-Komplexes erfolgten mit der AdR_B-Mutante gekoppelt mit Lu-CLaNP-5, die aufgrund ihrer diamagnetischen Eigenschaft wie der AdRWT behandelt werden konnte. In dem Spektrum traten im Bereich von 7,5 - 8,5 ppm entlang der ^1H -Domäne Aggregationen auf, welche es verhinderten, dass für die bisher noch nicht zugeordneten Reste des AdxWT mögliche CSPs gefunden werden konnten. Dennoch war es möglich, insgesamt 59 CSPs für die AdxWT-Form zu ermitteln, die in der Abbildung 3.29 gegen die Aminosäurereste aufgetragen sind. Die größten CSPs konnten auch hier für die Reste Phe59 (0,730 ppm) und Gly42 (0,370) erhalten werden. Im direkten Vergleich beider Adx-Formen zeigten die Amidgruppen sehr ähnliche CSPs bei der Wechselwirkung mit dem Komplexpartner AdR wie in der folgenden Abbildung 4.8 zu erkennen ist.

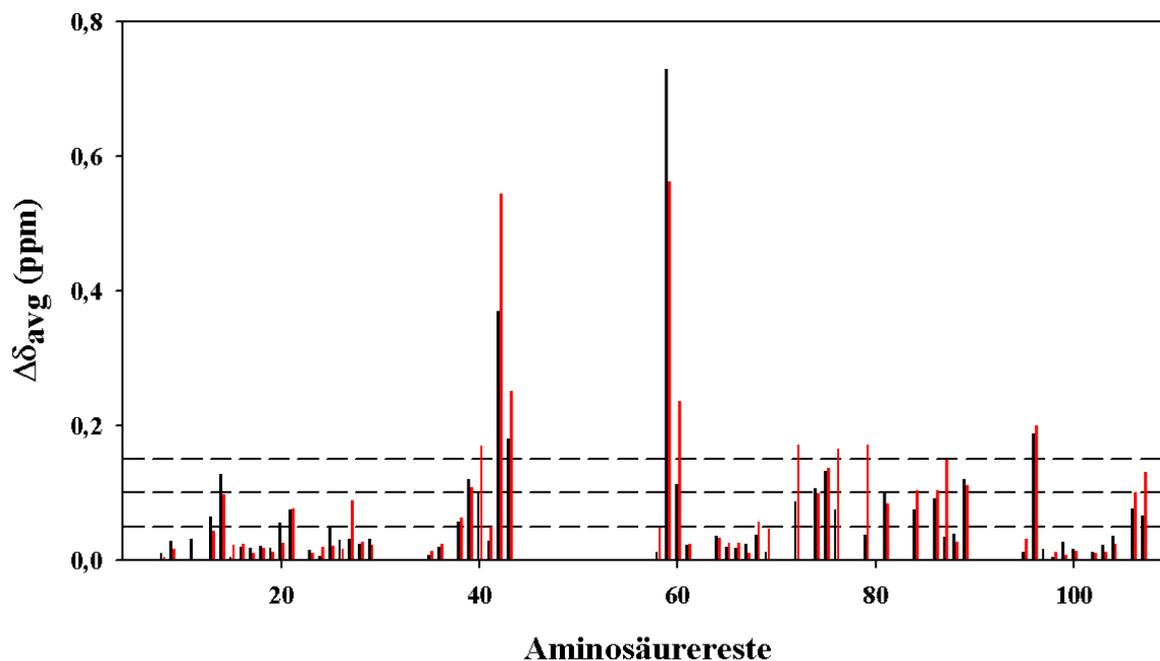


Abbildung 4.8: Chemische-Verschiebungsänderung des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT (schwarz) und $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) (rot) in Wechselwirkung mit der AdR, aufgetragen gegen die Aminosäurereste.

Worrall *et al.* (2003) untersuchte den Interaktionsbereich des AdxWT und des Adx(4-108) mit dem Cytochrom *c* mittels der NMR-Spektroskopie. Diese Untersuchungen ergaben, dass durch die Interaktion des Cytochrom *c* CSPs für die Reste Val34 und Asp39,

Asp41 und Gly42 der Kerndomäne sowohl mit dem AdxWT als auch der verkürzten Adx-Form beobachtet werden konnte (Worrall *et al.*, 2003).

Das Auftreten von vergleichsweise wenigen, aber großen CSPs weist während der Interaktion zweier Proteine auf eine einzelne Orientierung hin (Worrall *et al.*, 2003). Dies konnte auch für die Strukturbestimmungen für Cytochrom *f* und Plastocyanin aus Pflanzen sowie *Phormidium laminosum* beobachtet werden (Ubbink *et al.*, 1998; Crowley *et al.*, 2001). Auch die Bestimmungen der CSPs für das Adx in der Interaktion mit der AdR zeigten im Rahmen dieser Arbeit wenige, aber große CSPs, so dass auch hier von einer einzigen Orientierung bei der Interaktion mit der AdR ausgegangen werden kann.

Auswahl der Cysteinpaar-Positionen

Keines der endogenen Cysteine der AdR konnte aufgrund einer zu großen Distanz, bzw. der Position auf unterschiedlichen Schleifen des Proteins verwendet werden (Abbildung 3.1 und 3.2). Daher wurden zwei unterschiedliche Cysteinpaare mit einer Entfernung von 25-35 Å zum Adx mittels zielgerichteter Mutagenese in die AdR eingebracht, die sich auf jeweils einer α -Helix befinden. Dadurch kann die NMR-Sonde rigide angebracht werden. Die Cysteinpaare sind entweder auf der FAD-Domäne (S425C/K429C) oder auf der NADPH-Domäne (Q232C/K236C) lokalisiert (Abbildung 3.7), so dass die paramagnetischen Effekte auf das Adx-Rückgrat ausgehend von diesen Positionen untersucht werden konnte.

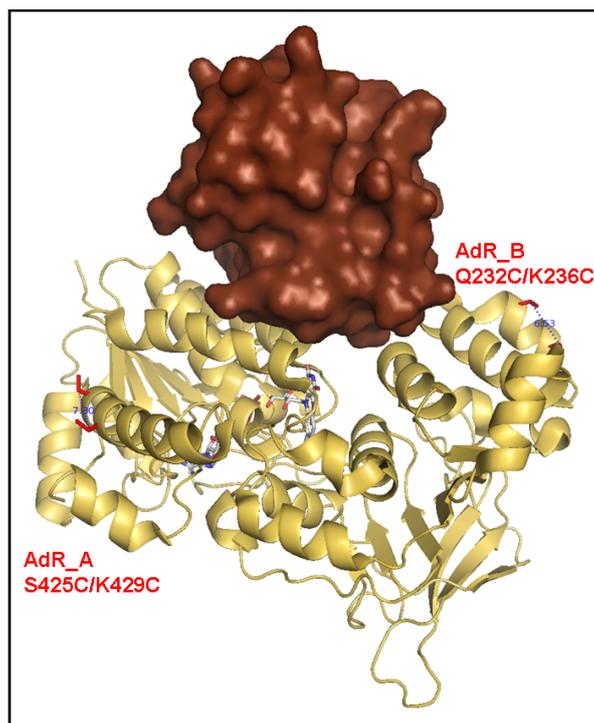


Abbildung 4.9: Abgebildet ist die dreidimensionale Struktur der AdR in gelb und die Oberflächenstruktur des Adx(4-108) in braun. Die Cysteinpaare S425C/K429C und Q232C/K236C sind als Stabmodell in rot dargestellt. Die Cysteinpaare sind in einer α -Helix lokalisiert. Deutlich zu erkennen ist auch, dass die Cysteinpaare eine ausreichende Entfernung besitzen, um die Interaktion zwischen den Komplexpartnern nicht zu stören.

Von besonderer Bedeutung ist, dass die Ankopplung der NMR-Sonde die Stabilität des Proteins nicht verringert, sowie die Interaktion zum Komplexpartner nicht gestört wird. In Abbildung 4.9 ist zu erkennen, dass diese Bedingungen erfüllt wurden.

Ln-CLaNP-5 Herstellung und Kopplung an die AdR

Für die nähere Untersuchung des Interaktionsbereiches des Adx wurde Ln-CLaNP-5 verwendet, das große Vorteile gegenüber anderen Sonden bietet. Sie wurde über zwei Disulfidbrücken spezifisch an die Oberfläche eines der Interaktionspartner gekoppelt. Hierzu wurden die Cysteinpaare in einer α -Helix eingefügt, wodurch wenig Bewegung ermöglicht wurde. In Kombination mit den gegenüberliegenden Pyridin-*N*-oxid-Gruppen, wurde die Rigidity der NMR-Sonde zusätzlich gewährleistet, wodurch der paramagnetische Effekt die größte Wirkung zeigte. Dass die Rigidity der NMR-Sonde von großer Bedeutung ist, konnte zuvor durch Untersuchungen gezeigt werden (Vlasie *et al.*, 2007; Keizers *et al.*, 2007, 2008). Frühere Untersuchungen ergaben auch, dass die Einarmbindung des

Ln-CLaNP-5.1 (Abbildung 4.10) schwächere PCSs auslöste (Keizers *et al.*, 2007).

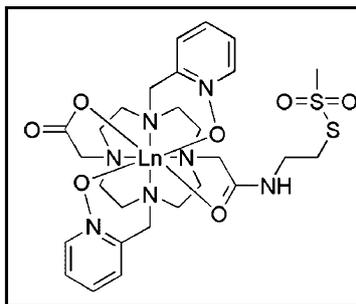


Abbildung 4.10: Strukturformel des einarmigen Ln-CLaNP-5.1 (Keizers *et al.*, 2007).

Für die Messungen der PCSs und PREs wurden die AdR-Mutanten AdR_A und AdR_B mit Ln-CLaNP-5 versehen. Die Ankopplung der NMR-Sonde erfolgte immer in zwei Schritten. Der erste Schritt beinhaltete die Reduktion der Thiolgruppen, gefolgt von der Ankopplung der NMR-Sonde im zweiten Schritt. Die Ausbeute lag im Schnitt zwischen 20 - 25 %.

Bestimmungen der Pseudokontaktverschiebungen des $^{15}\text{N}^2\text{H-Adx}(4-108)$ und $^{15}\text{N}^2\text{H-AdxWT}$ in Komplex mit AdR_A und AdR_B

Für die Ermittlung der PCSs wurden zunächst die AdR_A bzw. AdR_B mit entweder Lu-CLaNP-5 oder Tm-CLaNP-5 versehen und in Anwesenheit des $^{15}\text{N}^2\text{H-Adx}(4-108)$ gemessen.

Die Proteinkomplexe mit den Mutanten AdR_A und AdR_B gekoppelt mit Lu-CLaNP-5 zeigten dasselbe Spektrum wie dasjenige des $^{15}\text{N}^2\text{H-Adx}(4-108)$ in Wechselwirkung mit dem AdRWT. Somit besitzt die diamagnetische NMR-Sonde keinen Effekt auf das $^{15}\text{N}^2\text{H-Adx}(4-108)$. Auch kann man aufgrund der auftretenden Verschiebungen (Abbildung 3.20 und 3.22) davon ausgehen, dass die NMR-Sonde in allen Fällen erfolgreich an die AdR-Mutanten gekoppelt wurden. Die für die Mutanten AdR_A und AdR_B erhaltenen PCSs sind in der Abbildung 4.11 gegen die Aminosäurereste aufgetragen.

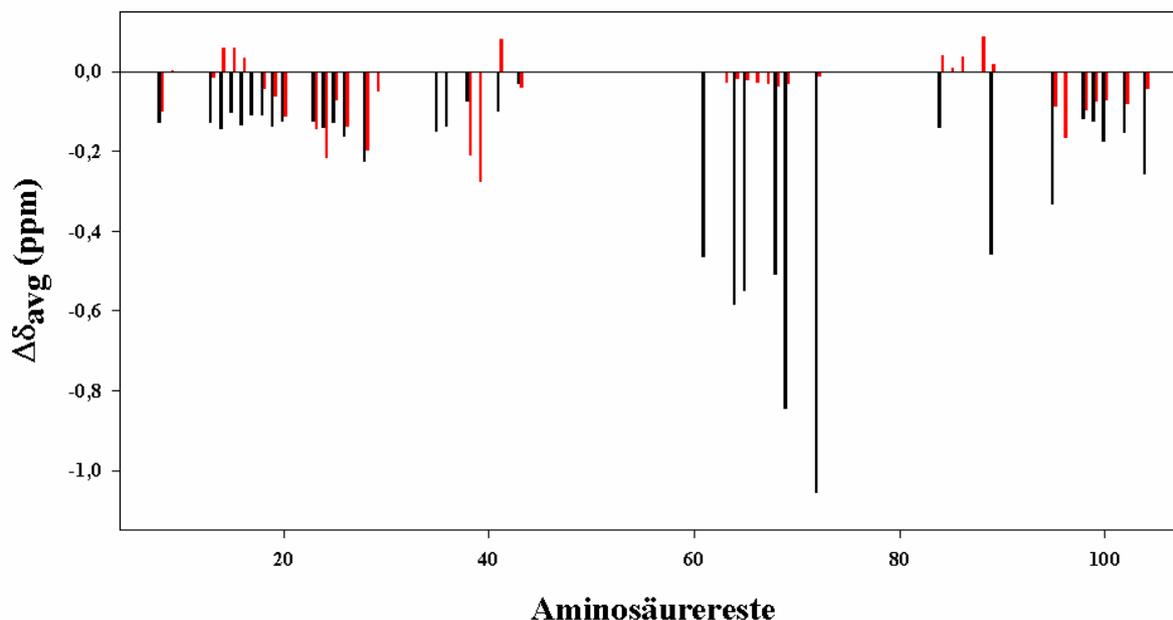


Abbildung 4.11: Pseudokontaktverschiebungen der $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) durch den Einfluss des Tm-CLaNP-5 gekoppelt an die AdR_A (rot) und an die AdR_B (schwarz), aufgetragen gegen die Aminosäurereste.

Im direkten Vergleich ist zu erkennen, dass die PCSs für die AdR_B-Mutante bis zu viermal höher liegen als für die AdR_A-Mutante. Hier wird noch einmal deutlich, dass der Effekt des Paramagneten Thulium in der NMR-Sonde distanzabhängig ist (Keizers *et al.*, 2008). Insgesamt 41 PCSs wurden für die AdR_A-Mutante und 33 PCSs wurden für die AdR_B-Mutante erhalten.

Neben den Mutanten AdR_A und AdR_B wurden zwei weitere Mutanten AdR_C (AdR_C364S/M352C/V357C) und AdR_D (AdR_C364S/K395C/H398C) auf dieselbe Art und Weise wie die Mutanten AdR_A und AdR_B hergestellt und für die NMR-Experimente herangezogen (siehe Anhang: Tabelle 5.1). In beiden Mutanten sind die Cysteinpaare, wie in Abbildung 4.12 zu erkennen ist, auf der FAD-Domäne lokalisiert.

4 Diskussion und Ausblick

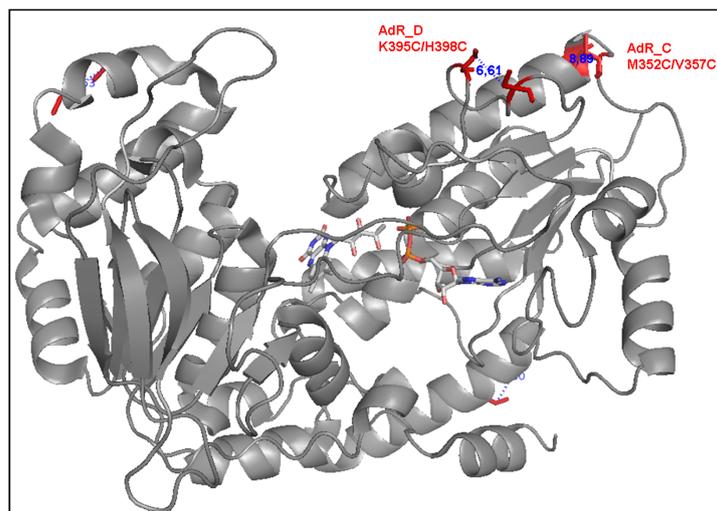


Abbildung 4.12: Dreidimensionale Struktur der AdR in grau. In der AdR-Mutante AdR_C ist das Cysteinpaar M352C/V357C eingefügt, während die Mutante AdR_D das Cysteinpaar K395C/H398C enthält. Die Cysteinpaare sind als Stabmodelle in rot dargestellt. Die Distanz zwischen den Cysteinen beträgt 6,61 Å für M352C/V357C und 8,89 Å für K395C/H398C.

Während die Markierung der Mutanten AdR_A und AdR_B mit guter Ausbeute erreicht wurde, war dies für die Mutanten AdR_C und AdR_D nicht möglich. Versuche die NMR-Sonde anzukoppeln wurden durchgeführt, aber die überlagerten Spektren der diamagnetischen und paramagnetischen Proben lieferten keine PCSs. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Markierung der Mutanten nicht erfolgte. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die gewählten Positionen aufgrund von möglichen geringen Konformationsänderungen der AdR zu keiner Zweiarm-Kopplung führten. Die Distanzen zwischen den Cysteinen lagen bei einer Entfernung von 6,61 Å für M352C/V357C und 8,89 Å für K395C/H398C und lagen somit innerhalb der benötigten Distanz von 8 ± 2 Å. Die Resonanzsignale, die durch eine eventuelle Einarm-Bindung an diese Cysteine erhalten worden wären, wären aufgrund der geringen Größe möglicherweise nicht detektierbar gewesen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden nur die PCSs für die Mutanten AdR_A und AdR_B in die Docking-Berechnungen einbezogen. Die Mutanten AdR_C und AdR_D wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Die Wildtyp-Form des Adx besitzt insgesamt 128 Aminosäurereste. Von großem Interesse war, ob das C-terminale Ende, welches die Reste 109-128 einschließt, während

der Interaktion mittels NMR-Spektroskopie bestimmt werden kann. Der Kristallstruktur nach befindet sich das C-terminale Ende des AdxWT in einer Grube zwischen der FAD- und NADPH-Domäne (Müller *et al.*, 2001).

Um diese Amidgruppen zu lokalisieren, wurden zunächst die Spektren der $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) und der $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT-Form gemessen. Die überlagerten Spektren sind in Abbildung 3.27 dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Resonanzsignale im Bereich von 7,5 - 8,5 ppm entlang der ^1H -Domäne auf die Anwesenheit des C-terminalen Endes des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT resultieren.

Im Folgenden sollten die PCS durch zwei Versuchsreihen ermittelt werden, wobei für beide Bestimmungen die AdR_B gekoppelt mit Lu-CLaNP-5 als Referenz diente. Gemessen wurden die PCSs, die durch die Kopplung des Tm-CLaNP-5 entweder an die AdR_A, bzw. an die AdR_B, entstanden. Allerdings traten in allen gemessenen Spektren starke Aggregationen auf, so dass die Zuordnung der Resonanzsignale, insbesondere in dem Bereich von 7,5 - 8,5 ppm entlang der ^1H -Domäne, nicht auswertbar waren.

Eine eindeutige Aussage, ob und wie stark PCSs aufgetreten sind, konnte nicht getroffen werden. Die starke Aggregation wurde nicht nur für den Komplex des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -AdxWT mit den AdR-Mutanten AdR_A und AdR_B beobachtet, sondern auch für den AdRWT. Daher kann nur vermutet werden, dass die Instabilität durch das flexible C-terminale Ende während der NMR-Messungen ausgelöst wird. Auch die TROSY-NMR lässt somit keine Aussage über die Position des C-Terminus im AdR-Adx-Komplex zu.

4.3.1 Bestimmung der Paramagnetischen-Relaxationsverstärkung des $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) in Komplex mit AdR_B

Zusätzlich zu Thulium, welches PCSs auslöst, wurde Gadolinium, welches zu PREs führt, als zweites Lanthanoid eingesetzt, um Distanzinformationen zu erhalten. Hierzu wurde Gd-CLaNP-5 an die AdR_B-Mutante gekoppelt und die Interaktion mit $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Adx(4-108) gemessen. Wenn sich Kerne mit einem Spin ungleich Null in Reichweite des Gadoliniums befinden, kommt es zur Linienverbreiterung, die mit einer Intensitätsabnahme einhergeht (Abbildung 3.24). Während der Markierung der AdR-Mutanten, aber auch

4 Diskussion und Ausblick

während der Messungen in Anwesenheit des Komplexpartners, wurde ab einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ Aggregation der Proteine beobachtet. Daher erfolgte die Berechnung der Distanzen zwischen dem Gadolinium und den Amidgruppen des Adx-Rückgrats mit den Formeln 2.5 und 2.6 (Battiste & Wagner, 2000; Vlasie *et al.*, 2008), die empfindlicher für niedrigere Proteinkonzentrationen sind.

Für die Normierung der Intensitätswerte wurde die Aminosäure Thr21 gewählt, die auf der Rückseite des Adx(4-108) lokalisiert ist und aufgrund einer Entfernung von über 45 \AA nicht dem Effekt des Gadoliniums unterliegt und deshalb keine Linienverbreiterung im NMR-Spektrum erfährt.

Insgesamt 24 Aminosäuren wurden für die Docking-Berechnungen in zwei Gruppen von Datensätzen eingeteilt, abhängig davon, ob das Intensitätsverhältnis den Wert 0,83 überschritten hat oder nicht. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass während der Docking-Berechnungen die Orientierung des Adx durch die Aminosäuren, die eine hohe Intensitätsabnahme zeigten, stärker beeinflusst wurde. Die erste Gruppe wies ein Intensitätsverhältnis bis zu 0,83 auf. Für diese Reste durften die Distanzen, die durch die PREs ermittelt wurden, während der Docking-Berechnungen eine Abweichung von $\pm 3 \text{ \AA}$ zeigen. Im Gegensatz dazu wurden, als zweite Gruppe, den Aminosäuren mit Intensitätsverhältnissen von über 0,83 Änderungen der Position von bis zu maximal 44 \AA , während der Docking-Berechnungen erlaubt.

Diese 24 Reste, für die Intensitätsabnahmen beobachtet wurden, wurden auf die Oberfläche des Adx(4-108) projiziert (Abbildung 3.26). Die Reste Ala81 und Ser88 zeigten die größte Intensitätsabnahme, liegen nahe beieinander und sind, wie in Abbildung 4.13 zu erkennen ist, zum Gadolinium in der an die AdR_B gekoppelte NMR-Sonde hin ausgerichtet.

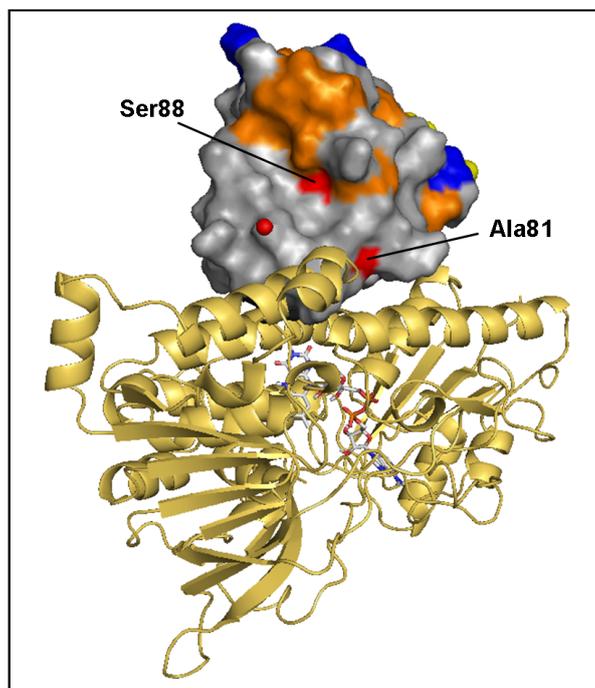


Abbildung 4.13: Paramagnetische-Relaxationsverstärkung (PRE). Abgebildet sind die dreidimensionale Struktur der AdR in gelb und die Oberflächenstruktur des Adx(4-108) in grau. Aufgetragen sind die erhaltenen R_2^{para} (Intensitätsabnahme) für die Amidgruppe auf der Adx(4-108)-Oberfläche, wobei die Intensitätsänderung mit R_2^{para} größer als 80 rot, R_2^{para} größer als 40 orange, R_2^{para} größer als 10 gelb und R_2^{para} kleiner als 10 blau markiert sind. Amidgruppen mit der höchsten Intensitätsabnahme zeigten die geringste Distanz zum Gadolinium, das in CLaNP-5 ligiert vorliegt, während die Reste mit abnehmender Intensitätsänderung zur Rückseite des Adx(4-108) hin verlaufen. Die markierten Reste Ala81 und Ser88 zeigten die größte Intensitätsabnahme. Gadolinium ist als rote Kugel dargestellt.

Docking-Berechnungen für den AdR-Adx(4-108)-Komplex

Der AdR-Adx(4-108)-Komplex wies während der NMR-Messungen eine viel höhere Stabilität als der AdR-AdxWT-Komplex auf, so dass für den Komplex AdR-Adx(4-108) die CSPs, PCSs und PREs bestimmt wurden. Für den AdR-AdxWT-Komplex konnten aufgrund hoher Aggregation nur die CSPs bestimmt werden. Die Docking-Berechnungen erfolgten, mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen, daher für den AdR-Adx(4-108)-Komplex.

Für diese wurden die Komponenten des X -Tensors miteinbezogen, die bei $55,3 \cdot 10^{-32} \text{ m}^3$ für die axiale Komponente und $6,9 \cdot 10^{-32} \text{ m}^3$ für die rhombische Komponente lagen. Frühere Studien zeigten, dass die Komponenten des X -Tensors unab-

4 Diskussion und Ausblick

hängig von der Position des Lanthanoids auf der Oberfläche des Proteins sind (Keizers *et al.*, 2008). Die Größe des X -Tensors ist allerdings von dem Lanthanoid selbst abhängig (Keizers *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2008; Otting, 2008). Die Ausnahme Gadolinium besitzt aufgrund seiner Elektronenkonfiguration mit sieben Elektronen in der f-Schale eine isotrope Verteilung, die zu keiner Verschiebung der Resonanzsignale, aber zu PREs führt. Allerdings zeigen auch Lanthanoide mit sehr geringem X -Tensor zusätzlich PRE (Otting, 2008).

Mit den empirisch bestimmten eingesetzten Einschränkungen wurde durch Berechnung eine Strukturlösung erhalten, die in Abbildung 3.33 dargestellt ist. Das Adx in dieser Struktur zeigte die gleiche Position und Orientierung wie das Adx aus der Kristallstruktur, ist aber um die β -Faltblätter leicht verdreht. Dies resultiert in einer energetisch günstigeren Struktur (13,3 kcal/mol), als sie für die Kristallstruktur erhalten wurde (15,8 kcal/mol). Damit liegt der Q-Gesamtwert für die Strukturlösung aus allen experimentell ermittelten und berechneten PCSs und PREs bei 0,10 und damit geringfügig unter dem Q-Wert von 0,11, der für die Kristallstruktur erhalten wurde. Der geringere Q-Gesamtwert für die Strukturlösung resultiert dabei aus dem geringeren Teilwert der PCSs, die für die Tm-CLaNP-5 gekoppelt an AdR_B erhalten wurde. Dieser liegt bei $Q = 0,21$ (PCS der Kristallstruktur: $Q = 0,23$).

Die Standardabweichung zwischen der berechneten Strukturlösung und der Kristallstruktur liegt bei 6,4 Å mit einem Distanz-Effektivwert (DRMS) von 2,5 Å. Der Unterschied zwischen diesen beiden Werten ist eine Konsequenz aus der Tatsache, dass die Strukturen zueinander rotiert und nicht verschoben sind (Kim *et al.*, 2008).

Das Resultat der Docking-Berechnungen hängt auch davon ab, wie stark die verschiedenen Einschränkungen PCS und PREs gewichtet werden. Mit der Annahme, dass die PCSs und PREs für die Berechnungen die gleiche Bedeutung haben, wurden die Energieterme für beide so ausgewählt, dass sie von ähnlicher Größenordnung sind und beide zur Festelegung der Struktur mit der geringsten Energie beitragen.

Eine mögliche Fehlerquelle für die, auf PREs basierende, Distanzberechnungen ist der Wert, der für die totale Korrelationszeit τ_c verwendet wird. τ_c beschreibt die Stärke der Molekülbewegung. Je kleiner ihr Wert ist, umso schneller ist die Molekülbewegung.

4 Diskussion und Ausblick

Auf der Kristallstruktur basierend wurde mittels der Software HYDRONMR (de la Torre *et al.*, 2000) ein Wert von $\tau_c = 52,0$ ns erhalten. Der Einfluss der τ_c auf die Strukturberechnung wurde durch den Einsatz von zunehmenden Zeiten im Bereich von 43,0 ns bis zu 57,0 ns überprüft. Der geringste Q-Wert, welcher die Distanzen berücksichtigt, die mittels PREs ermittelt wurden, wurde bei einer totalen Korrelationszeit von 47,0 ns erhalten. Die Q-Werte, die für zunehmende τ_c -Werte erhalten wurden, sind in Abbildung 4.14 aufgetragen. Der Einfluss der τ_c bleibt auf jeden Fall innerhalb des Fehlers des Q-Faktors, zumindest im Bereich von 43,0 - 53,0 ns und folglich wurden 49,0 ns eingesetzt.

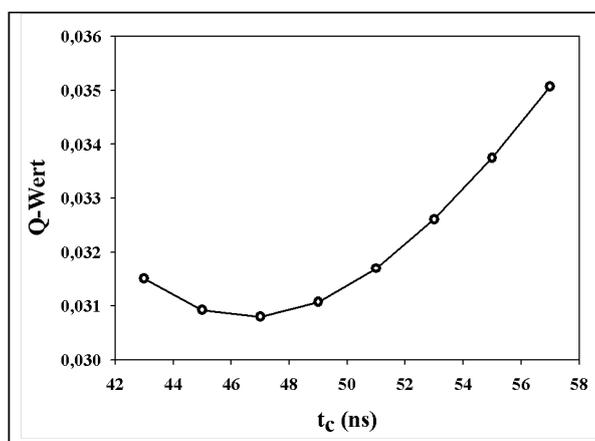


Abbildung 4.14: Optimierung des τ_c -Wertes. Die Bestimmung der Distanz zwischen dem Lanthanoid und den Amidgruppen, die auf Paramagnetische-Relaxationsverstärkung basiert, wurde mit τ_c -Werten im Bereich von 43,0 - 57,0 ns berechnet. Diese wurden in Bezug auf die Distanzen aus der besten Strukturlösung gesetzt. Aus diesen Plots wurden die erhaltenen Q-Werte gegen den jeweiligen τ_c -Wert aufgetragen.

Methoden zur Bestimmung der Proteinstruktur AdR-Adx

In dieser Arbeit gelang es, die Struktur des Komplexes der AdR und Adx in Lösung zu berechnen. Diese Struktur basiert auf den experimentell ermittelten Werten der CSPs, PCSs und PREs, die als Einschränkungen für die Docking-Berechnungen eingesetzt wurden. Gleichzeitig wurde geprüft, ob das Fehlen einer bzw. zweier Einschränkungen immer noch die Berechnung einer verlässlichen Struktur zulässt. Für die Docking-Berechnungen stehen mehrere Programm-Pakete wie z.B. Bigger oder Haddock (Palma *et al.*, 2000; Dominguez *et al.*, 2003) zur Verfügung, die für die Berechnungen von Protein-Komplexen eingesetzt werden können. Der Vorteil dieser Programm-Pakete liegt darin, dass nur ei-

ne geringe Anzahl experimentell bestimmter Parameter benötigt werden und dennoch oftmals gute Strukturlösungen erhalten werden.

Die Anwendung der Software Haddock (de Vries *et al.*, 2010) erfolgte zunächst ausschließlich unter Einsatz der experimentell bestimmten CSPs, um die Docking-Berechnungen für den AdR-Adx-Komplex durchzuführen. In der besten erhaltenen Strukturlösung war das Adx zwar zwischen beiden Domänen der AdR lokalisiert, allerdings auf der Rückseite des Isoalloxazinringes der AdR, wie in Abbildung 4.15 zu sehen ist.

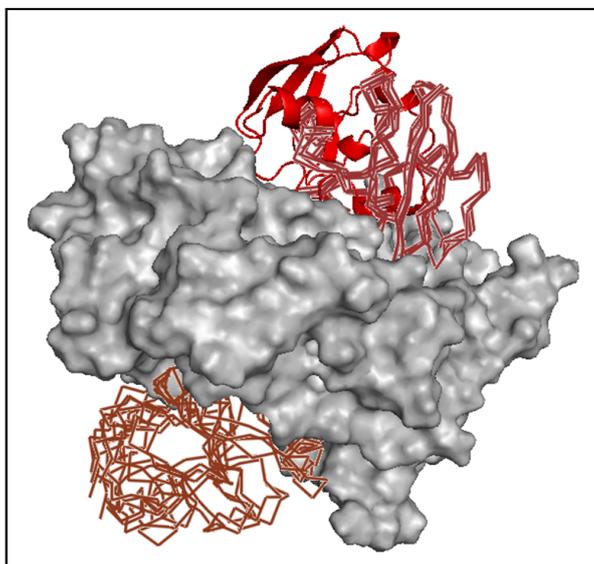


Abbildung 4.15: Resultat der Docking-Berechnungen des AdR-Adx-Komplexes unter Anwendung von Haddock (de Vries *et al.*, 2010). Abgebildet sind die Oberflächenstruktur der AdR (grau) und die dreidimensionale Cartoon-Struktur des Adx (rot) des kristallisierten Komplexes (PDB Eintrag: 1E6E). Aus den Haddock-Berechnungen wurden die zwei besten Gruppen, bestehend aus je vier Adx-Molekülen (PDB Eintrag: 1AYF) als dreidimensionale Schlauch-Strukturen (braun) dargestellt.

In der zweitbesten erhaltenen Strukturlösung war das Adx in derselben Position wie in der Kristallstruktur lokalisiert, lag aber etwas rotiert vor. Ähnliche Ergebnisse wurden auch unter Verwendung der Software XPLOR erhalten, wenn nur die CSPs eingesetzt wurden (Abbildung 4.16).

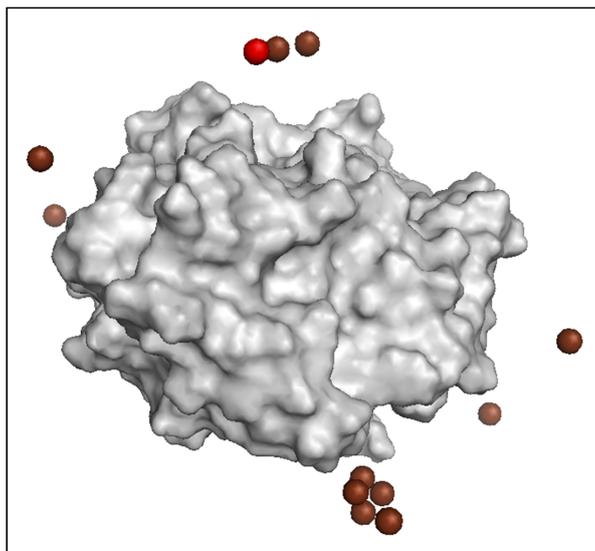


Abbildung 4.16: Dargestellt sind 11 Strukturösungen mit den niedrigsten Gesamtenergien für die AdR-Adx-Komplexe, die durch XPLOR erhalten wurden, wobei nur CSPs berücksichtigt wurden. Die Massenschwerpunkte der Adx-Moleküle (PDB Eintrag: 1AYF) aus den Docking-Berechnungen sind als braune Kugeln dargestellt, während der Massenschwerpunkt des Adx aus der Kristallstruktur als rote Kugel dargestellt ist (PDB Eintrag: 1E6E). Die AdR aus der Kristallstruktur ist als Oberflächenstruktur in grau abgebildet.

Zusammenfassen kann man an dieser Stelle sagen, dass in den erhaltenen Strukturösungen das Adx überwiegend zwischen der FAD- und NADPH-Domäne lokalisiert war. Genauso wie bei Haddock war in der energetisch günstigsten Struktur der Eisen-Schwefel-Cluster auf die Rückseite des FADs gerichtet. Wie diese Ergebnisse zeigen, sind für die Strukturlösung des AdR-Adx-Komplexes offensichtlich zusätzliche Informationen notwendig. Docking-Berechnungen, in denen zusätzlich zu den CSPs die PCS-Daten eingesetzt wurden, lieferten eine Strukturlösung mit einem deutlichen energetischem Minimum, bei der des weiteren das Adx mit seinem Eisen-Schwefel-Cluster in Richtung des FAD-Isoalloxazinrings gerichtet war. Die Unterschiede sind dabei nur minimal zu den Strukturösungen, die durch den zusätzlichen Einsatz der PREs als dritte Einschränkung erhalten wurden. Dabei ist bei der besten Strukturlösung ohne Verwendung der PRE-Daten der Eisen-Schwefel-Cluster um nur $0,5 \text{ \AA}$ vom FAD weg rotiert. Die 10 Strukturösungen mit den geringsten Gesamtenergien liegen, wie in Abbildung 4.17 zu erkennen ist, sehr nahe beieinander. Ihre Standardabweichung, die anhand der Daten des Proteinrückgrats bestimmt wurde, liegt bei $2,4 \text{ \AA}$, während für die Kristallstruktur eine Standardabweichung (RMDS) von $3,1 \text{ \AA}$ erhalten wurde.

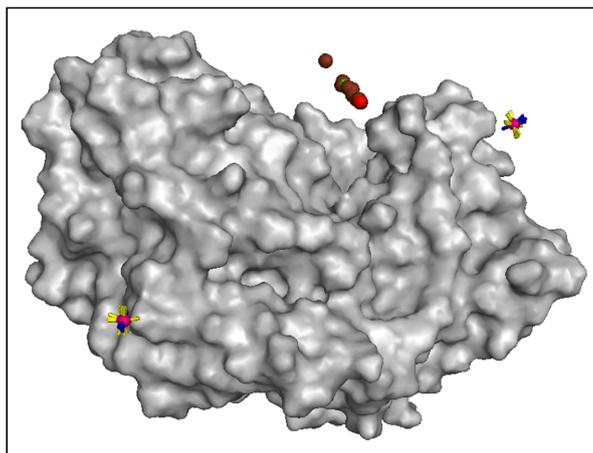


Abbildung 4.17: Dargestellt sind die zehn energetisch günstigsten AdR-Adx-Komplexe, die durch Docking-Berechnungen unter Verwendung der CSPs und PCSs erhalten wurden. Die AdR ist als Oberflächenstruktur (grau) dargestellt. Die Massenschwerpunkte der Adx-Moleküle sind als Kugeln dargestellt. Dabei gibt die grüne Kugel das Adx aus der Struktur mit der geringsten Gesamtenergie wieder (PDB Eintrag: 1AYF), während die rote Kugel den Massenschwerpunkt des Adx im kristallisierten AdR-Adx-Komplex zeigt (PDB Eintrag: 1E6E). Alle braunen Kugeln stehen für die Massenschwerpunkte des Adx (PDB Eintrag: 1AYF), die in geringen Gesamtenergien des Komplexes resultieren. Die Lanthanoid-Ionen sind als pinke Kugeln, ausgestattet mit einem Achsen-system, welches die X -Tensor-Ausrichtung darstellt, wiedergegeben. Die auf die AdR gerichtete z -Achse ist blau, während die x - und y -Achsen in gelb dargestellt sind.

Wie diese Untersuchungen zeigten, ist es möglich eine sinnvolle Strukturlösung basierend auf den CSP- und PCS-Daten zu erhalten. Die PRE-Daten verbessern dabei die Struktur nur minimal.

Die energetisch günstigste Struktur, die durch Einsatz aller drei Daten-Sätze erhalten wurde, ist in Abbildung 4.18 wiedergegeben.

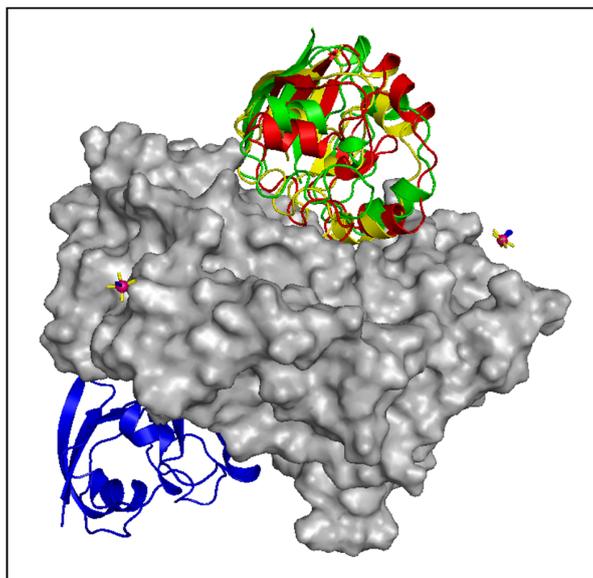


Abbildung 4.18: Dreidimensionale Struktur der energetisch günstigsten Strukturen des AdR-Adx-Komplexes, unter zunehmender Verwendung der einschränkenden Parameter für die Docking-Berechnungen. AdR ist als graue Oberflächenstruktur dargestellt. Adx ist als Cartoon-Struktur in blau bei ausschließlicher Verwendung der CSPs, in gelb unter Verwendung von CSPs und PCSs und in grün bei Einsatz aller drei Arten von Einschränkungen abgebildet. Das Adx aus der Kristallstruktur des AdR-Adx-Komplexes ist rot dargestellt. Die Lanthanoid-Ionen sind als pinke Kugeln, ausgestattet mit einem Achsensystem, welche die X -Tensor-Ausrichtung darstellt, wiedergegeben. Die auf die AdR gerichtete z -Achse ist blau, während die x - und y -Achsen in gelb dargestellt sind.

Grundsätzlich könnten auch die dipolaren Kopplungen der Aminosäurereste (*Residual Dipolar Coupling*, RDC) die Strukturaufklärung unterstützen. Die Sonde Ln-CLaNP-5 ist ein starkes Alignment Agens (Keizers *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009) und besitzt das Potential die RDCs zu liefern, welche zur Optimierung der Proteinstruktur herangezogen werden könnten (Prestegard & Kishore, 2001). Um jedoch die Anteile der RDC- und der PCS-Beiträge in den TROSY-Spektren von einander zu trennen, benötigt man zusätzlich das antiTROSY-Spektrum. Aufgrund der niedrigen Konzentration des AdR-Adx-Komplexes in den vermessenen Proben, konnte die hierfür notwendige Empfindlichkeit jedoch nicht erreicht werden.

Die Tatsache, dass die beste berechnete Lösung des AdR-Adx-Komplexes in hohem Maße der Kristallstruktur ähnelt, beantwortet die seit langem bestehende Frage nach der physiologischen Relevanz der *cross-linked* Kristallstruktur. Es zeigt sich, dass die kristallisierte Komplexstruktur auch die experimentellen Einschränkungen sehr gut erfüllt,

4 Diskussion und Ausblick

die durch die NMR-Messungen für den Komplex in Lösung gefunden wurden (Abbildung 3.33 - 3.36). In der Kristallstruktur sind Asp39 des Adx und Lys27 der AdR chemisch miteinander verknüpft. Obwohl diese künstliche kovalente Bindung möglicherweise Auswirkungen auf den Komplex gehabt haben könnte, sind die Entfernungen zwischen Adx und AdR in der besten berechneten Lösung nicht sehr unterschiedlich zu denen in der Kristallstruktur. Beispielsweise reduziert sich die Entfernung des Asp39 zum Lys27 von 8,9 Å in der Kristallstruktur auf 7,6 Å in der erhaltenen Strukturlösung (C α zum C α).

In den Untersuchungen des Interaktionsbereiches der Adx-Formen konnten für die Aminosäuren in dem Bereich von 44 - 56 und 90 - 94 aufgrund des paramagnetischen Charakters des Eisen-Schwefel-Clusters keine CSPs erhalten werden. Es zeigte sich auch, dass die Bestimmungen der PCSs essenziell für die Docking-Berechnungen waren. Der Einsatz der dritten Einschränkung PRE verbesserte die Struktur zwar, aber im geringen Maße. Dass aber auch Interaktionsbereiche und damit die Orientierung mittels CSPs und PREs durchführbar sind, war für die Untersuchung des Pseudoazurins in Komplex mit Nitrit Reduktase gezeigt werden (Vlasie *et al.*, 2008). Auch hier wurde das größere Protein die Nitrit Reduktase mit der NMR-Sonde Gd-CLaNP-5 versehen und dessen Interaktionsbereich in der Reaktion mit $^{15}\text{N}^2\text{H}$ -Pseudoazurin bestimmt. Allerdings wurde das paramagnetische Cu(II) in Pseudoazurin gegen Zink ausgetauscht, um Linienverbreiterung zu verhindern (Vlasie *et al.*, 2008). Es konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass der Austausch des Kupfers weder einen großen Effekt hinsichtlich der Stabilität der Struktur besaß (Prudêncio *et al.*, 2004), noch die Bindung zur Nitrit Reduktase störte (Impagliazzo *et al.*, 2007).

Der Eisen-Schwefel-Cluster des Adx ist über vier Cysteine kovalent gebunden (Müller *et al.*, 1998). Thermische Rückfaltungsversuche zeigten, dass das Adx nach der Auffaltung in die native Form wieder renaturierte (Bera *et al.*, 1999). Auch konnte gezeigt werden, dass die denaturierte Form des Adx wieder durch den Einbau des Eisen-Schwefel-Clusters in die native Form gebracht werden konnte (Uhlmann *et al.*, 1997; Bera *et al.*, 1999; Jose *et al.*, 2002). Damit würde die Möglichkeit bestehen, den paramagnetischen Cluster gegen ein diamagnetisches Metall auszutauschen. Die Substitution von paramagnetischen Zentren durch diamagnetische wie Gallium wurde

4 Diskussion und Ausblick

bereits genutzt, um den Interaktionsbereich zwischen Proteinen näher untersuchen zu können (Pochapsky *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2006). Da die Expression und Reinigung von deuteriertem und ^{15}N -markierten Adx bereits kompliziert ist, ist es zum jetzigen Zeitpunkt schwierig, ausreichende Mengen von deuteriertem und ^{15}N -markierten Adx herzustellen, in dem die prosthetische Gruppe gegen ein diamagnetisches Metall ausgetauscht werden kann.

Das Ziel dieser Arbeit, AdR-Mutanten herzustellen, welche für die Interaktionsbestimmungen zum Adx verwendet werden konnten, wurde erreicht. Die Expression und Reinigung war für die meisten AdR-Mutanten erfolgreich und durch eine Optimierung der Expressionsbedingungen wurde zusätzlich noch eine Erhöhung der Ausbeute erzielt. Die AdR-Einfachmutanten AdR_C10S, AdR_C74S, AdR_C145S, AdR_C322S und AdR_C364S und auch die AdR-Mehrfachmutanten AdR_A (AdR_C364S/S425C/K429C) und AdR_B (AdR_C145S/C364S/Q232C/K236C) besaßen im Vergleich zum AdRWT durchweg sehr ähnliche strukturelle und funktionale Eigenschaften. Die AdR-Mehrfachmutanten wurden anschließend für die Untersuchungen des Interaktionsbereiches des Adx(4-108) mit der Lanthanoid-ligierenden NMR-Sonde Ln-CLaNP-5 markiert und die Effekte der verschiedenen paramagnetischen Lanthanoide untersucht. Die Methode der TROSY-NMR-Experimente in Kombination mit paramagnetischen Lanthanoiden und deuteriertem und ^{15}N , ^2H -Adx ermöglichte es den 65 kDa großen AdR-Adx-Komplex zu untersuchen. Der Interaktionsbereich des Adx in Wechselwirkung mit seinem physiologischen Reaktionspartner konnte bestimmt werden, indem drei verschiedene Einschränkungen für die Docking-Berechnungen ermittelt wurden. Die aus den Docking-Berechnungen erhaltene Struktur besitzt eine sehr große Übereinstimmung mit der kristallisierten AdR-Adx-Struktur, die allerdings chemisch verknüpft wurde. Die Einbeziehung der PREs führte zu einer geringfügig besseren Struktur, als sie durch den alleinigen Einsatz der CSPs und PCSs ermittelt werden konnte. Die Kombination aus der paramagnetischen NMR-Spektroskopie insbesondere der TROSY-Methode mit der Bestimmung der Einschränkungen eröffnet damit den Weg, viele weitere Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Wie auch in dieser Arbeit weiterhin gezeigt werden konnte, ist es möglich, Proteininteraktionen zu untersuchen, obwohl einer der Interaktionspartner

4 Diskussion und Ausblick

eine paramagnetische prosthetische Gruppe trägt. Der AdR-Adx-Komplex konnte trotz des paramagnetischen Eisen-Schwefel-Clusters des Adx charakterisiert werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, ebenfalls weitere Interaktionen mit einem nicht austauschbaren Kofaktor zu untersuchen.

5 Veröffentlichungen

Berna Mersinli, Peter H.J. Keizers, Wolfgang Reinle, Julia Donauer, Yoshitaka Hiruma, Frank Hannemann, Mark Overhand, Rita Bernhardt, Marcellus Ubbink
A Solution Model of the Complex Formed by Adrenodoxin and Adrenodoxin Reductase Determined by Paramagnetic NMR

(eingereicht)

Teile dieser Arbeit wurden bei Posterpräsentationen vorgestellt.

October 2008: 5th Status Symposium der Volkswagenstiftung, Bad Kissingen, Deutschland.

Characterization of Interactions among AdR Mutants with Adx-wt and Adx(4-108).

Berna Mersinli, Julia Donauer, Frank Hannemann und Rita Bernhardt

October 2008: 5th Status Symposium der Volkswagenstiftung, Bad Kissingen, Deutschland.

The adrenodoxin - adrenodoxin reductase complex revealed by paramagnetic NMR.

Peter Keizers, Berna Mersinli, Wolfgang Reinle, Yoshi Hiruma, Frank Hannemann, Rita Bernhardt, Mark Overhand und Marcellus Ubbink

Juli 2009: FEBS Congress, Prag, Tschechien.

Solution structure of the adrenodoxin - adrenodoxin reductase complex.

Peter Keizers, Berna Mersinli, Wolfgang Reinle, Yoshi Hiruma, Frank Hannemann, Mark Overhand, Rita Bernhardt und Marcellus Ubbink

Oktober 2009: The 2009 NMRDG Meeting, Leiden, Niederlande.

Solution structure of the adrenodoxin - adrenodoxin reductase complex.

Peter Keizers, Berna Mersinli, Wolfgang Reinle, Yoshi Hiruma, Frank Hannemann, Mark Overhand, Rita Bernhardt und Marcellus Ubbink

Literaturverzeichnis

- van Aalten, D., Bywater, R., Findlay, J., Hendlich, M., Hooft, R. & Vriend, G. (1996) "PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules." *J Comput Aided Mol Des* 10(3): 255–62.
- Aliverti, A., Pandini, V., Pennati, A., de Rosa, M. & Zanetti, G. (2008) "Structural and functional diversity of ferredoxin-NADP(+) reductases." *Arch Biochem Biophys* 474(2): 283–91.
- Allegrozzi, M., Bertini, I., Janik, M., Lee, Y.M., Liu, G. & Luchinat, C. (2000) "Lanthanide-Induced Pseudocontact Shifts for Solution Structure Refinements of Macromolecules in Shells up to 40 Å from the Metal Ion" *J Am Chem Soc* 122: 4154–4161.
- Arano, Y., Uezono, T., Akizawa, H., Ono, M., Wakisaka, K., Nakayama, M., Sakahara, H., Konishi, J. & Yokoyama, A. (1996) "Reassessment of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) as a chelating agent for indium-111 labeling of polypeptides using a newly synthesized monoreactive DTPA derivative." *J Med Chem* 39(18): 3451–60.
- Atsuta, Y. & Okuda, K. (1978) "Isolation of rat liver mitochondrial ferredoxin and its reductase active in the 5beta-cholestane-3alpha, 7alpha, 12alpha-triol 26-hydroxylase." *J Biol Chem* 253(13): 4653–8.
- Banci, L., Bertini, I., Cavallaro, G., Giachetti, A., Luchinat, C. & Parigi, G. (2004) "Paramagnetism-based restraints for Xplor-NIH." *J Biomol NMR* 28(3): 249–61.
- Bartsch, R.G. (1978) "Purification of (4Fe-4S)₁₋₂-ferredoxins (high-potential iron-sulfur proteins) from bacteria." *Methods Enzymol* : 329–40.
- Bashir, Q., Volkov, A.N., Ullmann, G.M. & Ubbink, M. (2010) "Visualization of the encounter ensemble of the transient electron transfer complex of cytochrome c and cytochrome c peroxidase." *J Am Chem Soc* 132(1): 241–7.
- Battiste, J.L. & Wagner, G. (2000) "Utilization of site-directed spin labeling and high-resolution heteronuclear nuclear magnetic resonance for global fold determination of

- large proteins with limited nuclear overhauser effect data.” *Biochemistry* 39(18): 5355–65.
- Beckert, V., Dettmer, R. & Bernhardt, R. (1994) “Mutations of tyrosine 82 in bovine adrenodoxin that affect binding to cytochromes P45011A1 and P45011B1 but not electron transfer.” *J Biol Chem* 269(4): 2568–73.
- Beilke, D., Weiss, R., Löhr, F., Pristovsek, P., Hannemann, F., Bernhardt, R. & Rüterjans, H. (2002) “A new electron transport mechanism in mitochondrial steroid hydroxylase systems based on structural changes upon the reduction of adrenodoxin.” *Biochemistry* 41(25): 7969–7978.
- Beinert, H., Holm, R.H. & Münck, E. (1997) “Iron-sulfur clusters: nature’s modular, multipurpose structures.” *Science* 277(5326): 653–9.
- Beinert, H., Meyer, J. & Lill, R. (2004) *Encyclopedia of biological chemistry* Bd. 2 Elsevier, Amsterdam.
- Beinert, H. & Sands, R. (1960) “Studies on succinic and DPNH dehydrogenase preparations by paramagnetic resonance spectroscopy (EPR)” *Biochem Biophys Res Commun* 3: 41–46.
- Bera, A.K., Grinberg, A. & Bernhardt, R. (1999) “A step toward understanding the folding mechanism of bovine adrenodoxin.” *Archives of biochemistry and biophysics* 361(2): 315–22.
- Bernhardt, R. (1996) “Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species.” *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* : 137–221.
- Bernhardt, R. (2006) “Cytochromes P450 as versatile biocatalysts.” *J. Biotechnol.* 124(1): 128–145.
- Bertini, I., Donaire, A., Jiménez, B., Luchinat, C., Parigi, G., Piccioli, M. & Poggi, L. (2001a) “Paramagnetism-based versus classical constraints: an analysis of the solution structure of Ca Ln calbindin D9k.” *J Biomol NMR* 21(2): 85–98.

- Bertini, I., Janik, M.B.L., Lee, Y.M., Luchinat, C. & Rosato, A. (2001b) "Magnetic susceptibility tensor anisotropies for a lanthanide ion series in a fixed protein matrix." *J Am Chem Soc* 123(18): 4181–8.
- Bertini, I., Luchinat, C., Parigi, G. & Pierattelli, R. (2005) "NMR spectroscopy of paramagnetic metalloproteins." *Chembiochem* 6(9): 1536–49.
- Bertrand, P. & Gayda, J.P. (1979) "A theoretical interpretation of the variations of some physical parameters within the [2Fe-2S] ferredoxin group." *Biochim Biophys Acta* 579(1): 107–21.
- Berwanger, A., Eyrisch, S., Schuster, I., Helms, V. & Bernhardt, R. (2010) "Polyamines: naturally occurring small molecule modulators of electrostatic protein-protein interactions." *J Inorg Biochem* 104(2): 118–25.
- Bezkorovainy, A. (1980) *The iron-sulfur proteins: Biochemistry of nonheme iron*. Plenum, New York.
- Bruschi, M. & Guerlesquin, F. (1988) "Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins." *FEMS Microbiol Rev* 4(2): 155–75.
- Burova, T.V., Beckert, V., Uhlmann, H., Ristau, O., Bernhardt, R. & Pfeil, W. (1996) "Conformational stability of adrenodoxin mutant proteins." *Protein Sci* 5(9): 1890–7.
- Carrillo, N. & Ceccarelli, E. (2003) "Open questions in ferredoxin-NADP⁺ reductase catalytic mechanism." *Eur J Biochem* 270(9): 1900–15.
- Caspers, P., Stieger, M. & Burn, P. (1994) "Overproduction of bacterial chaperones improves the solubility of recombinant protein tyrosine kinases in *Escherichia coli*." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 40(5): 635–44.
- Ceccarelli, E., Arakaki, A., Cortez, N. & Carrillo, N. (2004) "Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases." *Biochim Biophys Acta* 1698(2): 155–65.

- Clore, G.M., Tang, C. & Iwahara, J. (2007) "Elucidating transient macromolecular interactions using paramagnetic relaxation enhancement." *Curr Opin Struct Biol* 17(5): 603–16.
- Coghlan, V.M., Cupp, J.R. & Vickery, L.E. (1988) "Purification and characterization of human placental ferredoxin." *Arch Biochem Biophys* 264(2): 376–82.
- Coghlan, V.M. & Vickery, L.E. (1991) "Site-specific mutations in human ferredoxin that affect binding to ferredoxin reductase and cytochrome P450_{scc}." *J Biol Chem* 266(28): 18606–18612.
- Coghlan, V.M. & Vickery, L.E. (1992) "Electrostatic interactions stabilizing ferredoxin electron transfer complexes. Disruption by conservative mutations." *J Biol Chem* 267(13): 8932–8935.
- Crespi, H.L., Rosenberg, R.M. & Katz, J.J. (1968) "Proton magnetic resonance of proteins fully deuterated except for ¹H-leucine side chains." *Science* 161(843): 795–6.
- Crowley, P.B., Otting, G., Schlarb-Ridley, B.G., Canters, G.W. & Ubbink, M. (2001) "Hydrophobic interactions in a cyanobacterial plastocyanin-cytochrome f complex." *J Am Chem Soc* 123(43): 10444–53.
- Cupp, J.R. & Vickery, L.E. (1989) "Adrenodoxin with a COOH-terminal deletion (des 116-128) exhibits enhanced activity." *J Biol Chem* 264(3): 1602–1607.
- Díaz-Moreno, I., Díaz-Quintana, A., De la Rosa, M.A. & Ubbink, M. (2005) "Structure of the complex between plastocyanin and cytochrome f from the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7119 as determined by paramagnetic NMR. The balance between electrostatic and hydrophobic interactions within the transient complex determines the relative orientation of the two proteins." *J Biol Chem* 280(19): 18908–15.
- Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G. & Schlichting, I. (2005) "Structure and chemistry of cytochrome P450." *Chem. Rev.* 105(6): 2253–2277.
- Derouet-Hümbert, E., Roemer, K. & Bureik, M. (2005) "Adrenodoxin (Adx) and CYP11A1 (P450_{scc}) induce apoptosis by the generation of reactive oxygen species in mitochondria." *Biol. Chem.* 386(5): 453–461.

- Dominguez, C., Boelens, R. & Bonvin, A.M. (2003) "HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information." *J Am Chem Soc* 125(7): 1731–7.
- Donauer, J. (2006) *Expressionsoptimierung von Adrenodoxin in Minimalmedien und Herstellung von Adrenodoxin-Reduktase Mutanten für NMR-Studien* Diplomarbeit Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften an der Universität des Saarlandes in der Fachrichtung.
- Dugad, L.B., La Mar, G.N., Banci, L. & Bertini, I. (1990) "Identification of localized redox states in plant-type two-iron ferredoxins using the nuclear Overhauser effect." *Biochemistry* 29(9): 2263–71.
- Dym, O. & Eisenberg, D. (2001) "Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins." *Protein Sci* 10(9): 1712–28.
- Edmondson, D. & Tollin, G. (1971) "Circular dichroism studies of the flavin chromophore and of the relation between redox properties and flavin environment in oxidases and dehydrogenases." *Biochemistry* 10(1): 113–24.
- Erdmann, B., Denner, K., Gerst, H., Lenz, D. & Bernhardt, R. (1995a) "Human adrenal CYP11B1: localization by in situ-hybridization and functional expression in cell cultures." *Endocr Res* 21(1-2): 425–435.
- Erdmann, B., Gerst, H., Bülow, H., Lenz, D., Bähr, V. & Bernhardt, R. (1995b) "Zone-specific localization of cytochrome P45011B1 in human adrenal tissue by PCR-derived riboprobes." *Histochem Cell Biol* 104(4): 301–307.
- Ernst, R.R. (1992) "Nobel Lecture. Nuclear magnetic resonance Fourier transform spectroscopy." *Biosci Rep* 12(3): 143–87.
- Estabrook, R., Suzuki, K., Mason, J., Baron, J., Taylor, W., Simpson, J., Purvis, J. & McCarthy, J. (1973) *Adrenodoxin: An iron-sulfur protein of adrenal cortex mitochondria* Academic Press.

- Feeny, J., Birdsall, B., Bradbury, A.F., Biekofsky, R.R. & Bayley, P.M. (2001) "Calm-
odulin tagging provides a general method of using lanthanide induced magnetic field
orientation to observe residual dipolar couplings in proteins in solution." *J Biomol
NMR* 21(1): 41–8.
- Fernández, C. & Wider, G. (2003) "TROSY in NMR studies of the structure and func-
tion of large biological macromolecules." *Curr Opin Struct Biol* 13(5): 570–80.
- Fiaux, J., Bertelsen, E.B., Horwich, A.L. & Wüthrich, K. (2002) "NMR analysis of a
900K GroEL GroES complex." *Nature* 418(6894): 207–11.
- Frolow, F., Harel, M., Sussman, J.L., Mevarech, M. & Shoham, M. (1996) "Insights into
protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a
halophilic 2Fe-2S ferredoxin." *Nat Struct Biol* 3(5): 452–8.
- Gardner, K.H. & Kay, L.E. (1998) "The use of 2H, 13C, 15N multidimensional NMR
to study the structure and dynamics of proteins." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* :
357–406.
- Garfinkel, D. (1958) "Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment compo-
sition of different microsomal fractions." *Arch. Biochem. Biophys.* 77(2): 493–509.
- Gay, G.L., Lindhout, D.A. & Sykes, B.D. (2004) "Using lanthanide ions to align troponin
complexes in solution: order of lanthanide occupancy in cardiac troponin C." *Protein
Sci* 13(3): 640–51.
- Geren, L.M., O'Brien, P., Stonehuerner, J. & Millett, F. (1984) "Identification of specific
carboxylate groups on adrenodoxin that are involved in the interaction with adreno-
doxin reductase." *J. Biol. Chem.* 259(4): 2155–2160.
- Gerstein, M. (1992) "A resolution-sensitive procedure for comparing protein surfaces
and its application to the comparison of antigen-combining sites." *Acta Crystallog.
sect. A* 48: 271–6.
- Grinberg, A.V. & Bernhardt, R. (1998) "Effect of replacing a conserved proline residue
on the function and stability of bovine adrenodoxin." *Protein Eng* 11(11): 1057–64.

Literaturverzeichnis

- Grinberg, A.V., Hannemann, F., Schiffler, B., Müller, J., Heinemann, U. & Bernhardt, R. (2000) "Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties." *Proteins* 40(4): 590–612.
- Grzesiek, S., Bax, A., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Hu, J.S., Kaufman, J., Palmer, I., Stahl, S.J. & Wingfield, P.T. (1996) "The solution structure of HIV-1 Nef reveals an unexpected fold and permits delineation of the binding surface for the SH3 domain of Hck tyrosine protein kinase." *Nat Struct Biol* 3(4): 340–5.
- Guengerich, F.P. (2001) "Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity." *Chem Res Toxicol* 14(6): 611–50.
- Gunsalus, I.C. & Sligar, S.G. (1978) "Oxygen reduction by the P450 monooxygenase systems." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 47: 1–44.
- Hannemann, F., Rottmann, M., Schiffler, B., Zapp, J. & Bernhardt, R. (2001) "The loop region covering the iron-sulfur cluster in bovine adrenodoxin comprises a new interaction site for redox partners." *J Biol Chem* 276(2): 1369–75.
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M. & Bernhardt, R. (2007) "Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains." *Biochim Biophys Acta* 1770(3): 330–344.
- Hansen, D.F. & Led, J.J. (2004) "Mapping the electronic structure of the blue copper site in plastocyanin by NMR relaxation." *J Am Chem Soc* 126(4): 1247–52.
- Hanukoglu, I. (1992) "Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis" *J Steroid Biochem Mol Biol* 43: 779–804.
- Hanukoglu, I., Rapoport, R., Weiner, L. & Sklan, D. (1993) "Electron leakage from the mitochondrial NADPH-adrenodoxin reductase-adrenodoxin-P450_{scc} (cholesterol side chain cleavage) system." *Arch Biochem Biophys* 305: 489–498.
- Hara, T. & Kimura, T. (1989a) "Active complex between adrenodoxin reductase and adrenodoxin in the cytochrome P-450_{scc} reduction reaction." *J Biochem* 105(4): 601–605.

- Hara, T. & Kimura, T. (1989b) "Purification and catalytic properties of a cross-linked complex between adrenodoxin reductase and adrenodoxin." *J Biochem* 105(4): 594–600.
- Hayaishi, D. & Nozaki, M. (1969) "Nature and mechanisms of oxygenases" *Science* 164: 389–396.
- Helgstrand, M., Kraulis, P., Allard, P. & Härd, T. (2000) "Ansig for Windows: an interactive computer program for semiautomatic assignment of protein NMR spectra." *J Biomol NMR* 18(4): 329–36.
- Horrocks, W.D. & Sipe, J.P. (1972) "Lanthanide Complexes as Nuclear Magnetic Resonance Structural Probes: Paramagnetic Anisotropy of Shift Reagent Adducts." *Science* 177(4053): 994–996.
- Hurley, J.K., Weber-Main, A.M., Stankovich, M.T., Benning, M.M., Thoden, J.B., Vanhooke, J.L., Holden, H.M., Chae, Y.K., Xia, B., Cheng, H., Markley, J.L., Martinez-Julvez, M., Gomez-Moreno, C., Schmeits, J.L. & Tollin, G. (1997) "Structure-function relationships in *Anabaena* ferredoxin: correlations between X-ray crystal structures, reduction potentials, and rate constants of electron transfer to ferredoxin:NADP⁺ reductase for site-specific ferredoxin mutants." *Biochemistry* 36(37): 11100–17.
- Hus, J.C., Marion, D. & Blackledge, M. (2000) "De novo determination of protein structure by NMR using orientational and long-range order restraints." *J Mol Biol* 298(5): 927–36.
- Ichikawa, Y. & Yamano, T. (1967) "Reconversion of detergent- and sulfhydryl reagent-produced P-420 to P-450 by polyols and glutathione." *Biochim Biophys Acta* 131(3): 490–7.
- Impagliazzo, A., Blok, A.J., Cliff, M.J., Ladbury, J.E. & Ubbink, M. (2007) "Redox-state-dependent complex formation between pseudoazurin and nitrite reductase." *J Am Chem Soc* 129(1): 226–33.
- Ishimura, K. & Fujita, H. (1997) "Light and electron microscopic immunohistochemistry

- of the localization of adrenal steroidogenic enzymes." *Microsc. Res. Techn.* 36: 445–453.
- Iwata, S., Saynovits, M., Link, T.A. & Michel, H. (1996) "Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome bc₁ complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution." *Structure* 4(5): 567–79.
- Jose, J., Bernhardt, R. & Hannemann, F. (2002) "Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*." *J Biotechnol* 95(3): 257–68.
- Kagawa, N. & Cao, Q. (2001) "Osmotic stress induced by carbohydrates enhances expression of foreign proteins in *Escherichia coli*." *Arch Biochem Biophys* 393(2): 290–6.
- Kakuta, Y., Horio, T., Takahashi, Y. & Fukuyama, K. (2001) "Crystal structure of *Escherichia coli* Fdx, an adrenodoxin-type ferredoxin involved in the assembly of iron-sulfur clusters." *Biochemistry* 40(37): 11007–12.
- Kay, L.E. & Gardner, K.H. (1997) "Solution NMR spectroscopy beyond 25 kDa." *Curr Opin Struct Biol* 7(5): 722–31.
- Keizers, P.H.J., Desreux, J.F., Overhand, M. & Ubbink, M. (2007) "Increased paramagnetic effect of a lanthanide protein probe by two-point attachment." *J Am Chem Soc* 129(30): 9292–3.
- Keizers, P.H.J., Saragliadis, A., Hiruma, Y., Overhand, M. & Ubbink, M. (2008) "Design, synthesis, and evaluation of a lanthanide chelating protein probe: CLaNP-5 yields predictable paramagnetic effects independent of environment." *J Am Chem Soc* 130(44): 14802–12.
- Kido, T. & Kimura, T. (1979) "The formation of binary and ternary complexes of cytochrome P-450_{scc} with adrenodoxin and adrenodoxin reductase.adrenodoxin complex. The implication in ACTH function." *J Biol Chem* 254(23): 11806–15.

- Kim, Y.C., Tang, C., Clore, G.M. & Hummer, G. (2008) "Replica exchange simulations of transient encounter complexes in protein-protein association." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35): 12855–60.
- Kimura, T. (1968) "Biochemical aspects of iron-sulfur linkage in nonheme iron protein, with special reference to adrenodoxin." *Structure and Bonding* 5 5: 1–40.
- Klingenberg, M. (1958) "Pigments of rat liver microsomes" *Arch. Biochem. Biophys.* 75(2): 376–386.
- Kumar, A., Wagner, G., Ernst, R.R. & Wüthrich, K. (1980) "Studies of J-connectives and selective 1H-1H Overhauser effects in H₂O solutions of biological macromolecules by two-dimensional NMR experiments." *Biochem Biophys Res Commun* 96(3): 1156–63.
- Lambeth, J.D., McCaslin, D.R. & Kamin, H. (1976) "Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex: catalytic and thermodynamic properties." *J Biol Chem* 251(23): 7545–50.
- Lambeth, J.D., Seybert, D.W. & Kamin, H. (1979) "Ionic effects on adrenal steroidogenic electron transport. The role of adrenodoxin as an electron shuttle." *J Biol Chem* 254(15): 7255–64.
- Lambeth, J.D., Seybert, D.W. & Kamin, H. (1980) "Adrenodoxin reductase . adrenodoxin complex. Rapid formation and breakdown of the complex and a slow conformational change in the flavoprotein." *J Biol Chem* 255(10): 4667–72.
- Lambeth, J.D., Seybert, D.W., Lancaster, J.R., Salerno, J.C. & Kamin, H. (1982) "Steroidogenic electron transport in adrenal cortex mitochondria." *Mol Cell Biochem* 45(1): 13–31.
- Lambeth, J. (1991) *Enzymology of mitochondrial sidechain cleavage by cytochrome P-450_{scc}*. Bd. 3 Mechanisms of Adrenal Steroidogenesis and Aspects of Regulation and Application, Berlin, Akademie Verlag.

Literaturverzeichnis

- Lambeth, J. & Kamin, H. (1979) "Adrenodoxin reductase.adrenodoxin complex. Flavin to iron-sulfur electron transfer as the rate-limiting step in the NADPH-cytochrome c reductase reaction." *J Biol Chem* 254(8): 2766–74.
- Lange, C., Cornvik, T., Díaz-Moreno, I. & Ubbink, M. (2005) "The transient complex of poplar plastocyanin with cytochrome f: effects of ionic strength and pH." *Biochim Biophys Acta* 1707(2-3): 179–88.
- Lauffer, R.B. & Brady, T.J. (1985) "Preparation and water relaxation properties of proteins labeled with paramagnetic metal chelates." *Magn Reson Imaging* 3(1): 11–6.
- Leonov, A., Voigt, B., Rodriguez-Castaneda, F., Sakhaii, P. & Griesinger, C. (2005) "Convenient synthesis of multifunctional EDTA-based chiral metal chelates substituted with an S-mesyrcysteine." *Chemistry* 11(11): 3342–8.
- Lewis, M.R. & Shively, J.E. (1998 Jan-Feb) "Maleimidocysteineamido-DOTA derivatives: new reagents for radiometal chelate conjugation to antibody sulfhydryl groups undergo pH-dependent cleavage reactions." *Bioconjug Chem* 9(1): 72–86.
- Link, T. (2001) *Handbook of metalloproteins*. Wiley, Chichester.
- Lottspeich (1998) *Bioanalytik* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Malee, M.P. & Mellon, S.H. (1991) "Zone-specific regulation of two messenger RNAs for P450c11 in the adrenals of pregnant and nonpregnant rats." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(11): 4731–5.
- Malkin, R. & Rabinowitz, J.C. (1966) "The reconstitution of clostridial ferredoxin." *Biochem Biophys Res Commun* 23(6): 822–827.
- Markley, J.L., Putter, I. & Jardetzky, O. (1968) "High-resolution nuclear magnetic resonance spectra of selectively deuterated staphylococcal nuclease." *Science* 161(847): 1249–51.
- Mason, H.S. (1957) "Mechanisms of Oxygen Metabolism" *Science* 125: 1185–1188.
- Mason, H.S., Fowlks, W.L. & Peterson, E. (1955) "Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex" *J. Am. Chem. Soc.* 77(10): 2914–2915.

- Medina, M. & Gómez-Moreno, C. (2004) "Interaction of Ferredoxin-NADP(+) Reductase with its Substrates: Optimal Interaction for Efficient Electron Transfer." *Photosynth Res* 79(2): 113–31.
- Meyer, J. (2008) "Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution." *J Biol Inorg Chem* 13(2): 157–70.
- Miroux, B. & Walker, J.E. (1996) "Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." *J Mol Biol* 260(3): 289–98.
- Müller, A., Müller, J., Müller, Y., Uhlmann, H., Bernhardt, R. & Heinemann, U. (1998) "New aspects of electron transfer revealed by the crystal structure of a truncated bovine adrenodoxin, Adx(4-108)." *Structure* 6(3): 269–280.
- Müller, J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K. & Heinemann, U. (2001) "Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis." *J. Biol. Chem.* 276(4): 2786–2789.
- Ortiz de Montellano, P.R. (1989) "Cytochrome P450 catalysis: radical intermediates and dehydrogenation reactions." *Pharmacol. Sci.* 10: 354–359.
- Morales, R., Charon, M.H., Hudry-Clergeon, G., Petillot, Y., Norager, S., Medina, M. & Frey, M. (1999) "Refined X-ray structures of the oxidized, at 1.3 Å, and reduced, at 1.17 Å, [2Fe-2S] ferredoxin from the cyanobacterium Anabaena PCC7119 show redox-linked conformational changes." *Biochemistry* 38(48): 15764–73.
- Mortenson, L.E., Valentine, R.C. & Carnahan, J.E. (1962) "An electron transport factor from Clostridium pasteurianum." *Biochem Biophys Res Commun* : 448–52.
- Moulis, J.M., Davasse, V., Golinelli, M.P., Meyer, J. & Quinkal, I. (1996) "The coordination sphere of iron-sulfur clusters: lessons from site-directed mutagenesis experiments" *J. Biol. Inorg. Chem.* 1: 2–14.
- Murakami, K. & Mason, H.S. (1967) "An electron spin resonance study of microsomal Fe." *J Biol Chem.* 242(6): 1102–1110.

- Nakamura, Y., Otsuka, H. & Tamaoki, B.I. (1966) "Requirement of a new flavoprotein and a non-heme iron-containing protein in the steroid 11-beta- and 18-hydroxylase system." *Biochim Biophys Acta* 122(1): 34–42.
- Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B. & Levin, W. (1987) "The P450 gene superfamily: recommended nomenclature." *DNA* 6(1): 1–11.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H. & Yura, T. (1998) "Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol* 64(5): 1694–9.
- Nordblom, G.D. & Coon, M.J. (1977) "Hydrogen peroxide formation and stoichiometry of hydroxylation reactions catalyzed by highly purified liver microsomal cytochrome P-450." *Arch Biochem Biophys* 180(2): 343–7.
- Nordblom, G.D., White, R.E. & Coon, M.J. (1976) "Studies on hydroperoxide-dependent substrate hydroxylation by purified liver microsomal cytochrome P-450" *Arch. Biochem. Biophys.* 175: 524–533.
- Oftebro, H., Saarem, K., Björkhem, I. & Pedersen, J.I. (1981) "Side chain hydroxylation of C27-steroids and vitamin D3 by a cytochrome P-450 enzyme system isolated from human liver mitochondria." *J Lipid Res* 22(8): 1254–64.
- Oftebro, H., Stormer, F.C. & Pedersen, J.L. (1979) "The presence of an adrenodoxin-like ferredoxin and cytochrome P-450 in brain mitochondria." *J Biol Chem* 254(11): 4331–4.
- Omura, T., Sanders, E., Estabrook, R., Cooper, D. & Rosenthal, O. (1966) "Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphopyridine nucleotide-cytochrome P-450 reductase." *Arch. Biochem. Biophys.* 117: 660–673.
- Omura, T. & Sato, R. (1964a) "Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature." *J. Biol. Chem.* 239(7): 2370–2378.

- Omura, T. & Sato, R. (1964b) "Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties" *Journal of Biological Chemistry* 239(7)(7): 2379–2385.
- Orme-Johnson, W.H. & Beinert, H. (1969) "Reductive titrations of iron-sulfur proteins containing two to four iron atoms." *J Biol Chem* 244(22): 6143–8.
- Otting, G. (2008) "Prospects for lanthanides in structural biology by NMR." *J Biomol NMR* 42(1): 1–9.
- Page, C.C., Moser, C.C., Chen, X. & Dutton, P.L. (1999) "Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction." *Nature* 402(6757): 47–52.
- Palma, P.N., Krippahl, L., Wampler, J.E. & Moura, J.J. (2000) "BiGGER: a new (soft) docking algorithm for predicting protein interactions." *Proteins* 39(4): 372–84.
- Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. & Wüthrich, K. (1997) "Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(23): 12366–71.
- Peterson, J.A., White, R.E., Yasukochi, Y., Coomes, M.L., O’Keeffe, D.E., Eble, R.E., Masters, B.S.S., Ballou, D.P. & Coon, M.J. (1977) "Evidence that purified liver microsomal cytochrome P450 is a one-electron acceptor." *J. Biol. Chem.* 252: 4431–4434.
- Pikuleva, I.A., Tesh, K., Waterman, M.R. & Kim, Y. (2000) "The tertiary structure of full-length bovine adrenodoxin suggests functional dimers." *Arch Biochem Biophys* 373(1): 44–55.
- Pingoud, A. & Urbanke, C. (1997) *Arbeitsmethoden der Biochemie*.
- Pintacuda, G., Hohenthanner, K., Otting, G. & Müller, N. (2003) "Angular dependence of dipole-dipole-Curie-spin cross-correlation effects in high-spin and low-spin paramagnetic myoglobin." *J Biomol NMR* 27(2): 115–32.

- Pintacuda, G., Keniry, M.A., Huber, T., Park, A.Y., Dixon, N.E. & Otting, G. (2004a) "Fast structure-based assignment of ^{15}N HSQC spectra of selectively ^{15}N -labeled paramagnetic proteins." *J Am Chem Soc* 126(9): 2963–70.
- Pintacuda, G., Moshref, A., Leonchiks, A., Sharipo, A. & Otting, G. (2004b) "Site-specific labelling with a metal chelator for protein-structure refinement." *J Biomol NMR* 29(3): 351–61.
- Pintacuda, G., Park, A.Y., Keniry, M.A., Dixon, N.E. & Otting, G. (2006) "Lanthanide labeling offers fast NMR approach to 3D structure determinations of protein-protein complexes." *J Am Chem Soc* 128(11): 3696–702.
- Pochapsky, T.C., Kuti, M. & Kazanis, S. (1998) "The solution structure of a gallium-substituted putidaredoxin mutant: GaPdx C85S." *J Biomol NMR* 12(3): 407–15.
- Porter, T.D. & Coon, M.J. (1991) "Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms." *J Biol Chem* 266(21): 13469–72.
- Porter, T.D. & Larson, J.R. (1991) "Expression of mammalian P450s in *Escherichia coli*." *Methods Enzymol* : 108–16.
- Prestegard, J.H. & Kishore, A.I. (2001) "Partial alignment of biomolecules: an aid to NMR characterization." *Curr Opin Chem Biol* 5(5): 584–90.
- Privalov, P.L. (1979) "Stability of proteins: small globular proteins." *Adv Protein Chem* 33: 167–241.
- Prudêncio, M., Rohovec, J., Peters, J.A., Tocheva, E., Boulanger, M.J., Murphy, M.E.P., Hupkes, H.J., Kusters, W., Impagliazzo, A. & Ubbink, M. (2004) "A caged lanthanide complex as a paramagnetic shift agent for protein NMR." *Chemistry* 10(13): 3252–60.
- Prudêncio, M. & Ubbink, M. (2004) "Transient complexes of redox proteins: structural and dynamic details from NMR studies." *J Mol Recognit* 17(6): 524–39.
- Rees, D.C. (2002) "Great metalloclusters in enzymology." *Annu Rev Biochem* : 221–246.
- Rehm, H. (2006) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics* Spektrum Akademischer Verlag.

- Röhrich, R., Englert, N., Troschke, K., Reichenberg, A., Hintz, M., Seeber, F., Balconi, E., Aliverti, A., Zanetti, G., Köhler, U., Pfeiffer, M., Beck, E., Jomaa, H. & Wiesner, J. (2005) "Reconstitution of an apicoplast-localised electron transfer pathway involved in the isoprenoid biosynthesis of *Plasmodium falciparum*." *FEBS Lett* 579(28): 6433–8.
- Ruckpaul, K. (1990) *Frontiers of biotransformation* Akademie Verlag, Berlin.
- Ruckpaul, K. (1993) "Cytochrom P450 abhängige Enzyme - Targetsysteme für die Arzneistoffentwicklung?" *Pharmazie unserer Zeit* 22: 296–304.
- Sagara, Y., Takata, Y., Miyata, T., Hara, T. & Horiuchi, T. (1987) "Cloning and sequence analysis of adrenodoxin reductase cDNA from bovine adrenal cortex." *J. Biochem.* 102(6): 1333–1336.
- Sagara, Y., Wada, A., Takata, Y., Waterman, M.R., Sekimizu, K. & Horiuchi, T. (1993) "Direct expression of adrenodoxin reductase in *Escherichia coli* and the functional characterization." *Biol Pharm Bull* 16(7): 627–30.
- Sambrook, J. & Russel, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Spring Harbor Laboratory Press.
- Sazanov, L.A. & Hinchliffe, P. (2006) "Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*." *Science* 311(5766): 1430–6.
- Schiffler, B., Kiefer, M., Wilken, A., Hannemann, F., Adolph, H.W. & Bernhardt, R. (2001) "The interaction of bovine adrenodoxin with CYP11A1 (cytochrome P450_{scc}) and CYP11B1 (cytochrome P450_{11β}). Acceleration of reduction and substrate conversion by site-directed mutagenesis of adrenodoxin." *J Biol Chem* 276(39): 36225–32.
- Schiffler, B., Zöllner, A. & Bernhardt, R. (2004) "Stripping down the mitochondrial cholesterol hydroxylase system, a kinetics study." *J Biol Chem* 279(33): 34269–76.
- Schulz, G. (1992) "Binding of nucleotides by proteins." *Curr Opin Struct Biol* 2: 61–67.
- Schwieters, C.D., Kuszewski, J.J., Tjandra, N. & Clore, G.M. (2003) "The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package." *J Magn Reson* 160(1): 65–73.

- Seeber, F., Aliverti, A. & Zanetti, G. (2005) "The plant-type ferredoxin-NADP⁺ reductase/ferredoxin redox system as a possible drug target against apicomplexan human parasites." *Curr Pharm Des* 11(24): 3159–72.
- Sligar, S.G. (1976) "Coupling of spin, substrate, and redox equilibria in cytochrome P450." *Biochemistry* 15: 5399–5406.
- Slominski, A., Zjawiony, J., Wortsman, J., Semak, I., Stewart, J., Pisarchik, A., Sweatman, T., Marcos, J., Dunbar, C. & C Tuckey, R. (2004) "A novel pathway for sequential transformation of 7-dehydrocholesterol and expression of the P450_{scc} system in mammalian skin." *Eur J Biochem* 271(21): 4178–88.
- Solomon, I. & Bloembergen, N. (1956) "Nuclear magnetic interactions in the HF molecule" *J Chem Phys* 25: 261–6.
- Sono, M., Roach, M.P., Coulter, E.D. & Dawson, J.H. (1996) "Heme-Containing Oxygenases." *Chem Rev* 96(7): 2841–2888.
- Stephens, P.J., Jollie, D.R. & Warshel, A. (1996) "Protein Control of Redox Potentials of Iron-sulfur Proteins." *Chem Rev* 96(7): 2491–2514.
- Studier, F. & Moffatt, B. (1986) "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J. Mol. Biol.* 189(1): 113–130.
- Su, X.C., McAndrew, K., Huber, T. & Otting, G. (2008) "Lanthanide-binding peptides for NMR measurements of residual dipolar couplings and paramagnetic effects from multiple angles." *J Am Chem Soc* 130(5): 1681–7.
- Su, X.C., Huber, T., Dixon, N.E. & Otting, G. (2006) "Site-specific labelling of proteins with a rigid lanthanide-binding tag." *Chembiochem* 7(10): 1599–604.
- Sugano, S., Miura, R. & Morishima, N. (1996) "Identification of intermediates in the conversion of cholesterol to pregnenolone with a reconstituted cytochrome p-450_{scc} system: accumulation of the intermediate modulated by the adrenodoxin level." *J Biochem* 120(4): 780–7.

- Suzuki, K. & Kimura, T. (1965) "An iron protein as a component of steroid 11-beta-hydroxylase complex." *Biochem Biophys Res Commun* 19: 340–5.
- Tagawa, K. & Arnon, D.I. (1962) "Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in the biological production and consumption of hydrogen gas." *Nature* 195: 537–43.
- Takeuchi, K., Tsubaki, M., Futagawa, J., Masuya, F. & Hori, H. (2001) "Adrenodoxin-cytochrome P450_{scc} interaction as revealed by EPR spectroscopy: comparison with the putidaredoxin-cytochrome P450_{cam} system." *J Biochem* 130(6): 789–97.
- Tei, L., Baranyai, Z., Botta, M., Piscopo, L., Aime, S. & Giovenzana, G.B. (2008) "Synthesis and solution thermodynamic study of rigidified and functionalised EGTA derivatives." *Org Biomol Chem* 6(13): 2361–8.
- de la Torre, J., Huertas, M.L. & Carrasco, B. (2000) "HYDRONMR: prediction of NMR relaxation of globular proteins from atomic-level structures and hydrodynamic calculations." *J Magn Reson* 147(1): 138–46.
- Tsukihara, T., Fukuyama, K., Nakamura, M., Katsube, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Wada, K., Hase, T. & Matsubara, H. (1981) "X-ray analysis of a [2Fe-2S] ferredoxin from *Spirulina platensis*. Main chain fold and location of side chains at 2.5 Å resolution." *J Biochem* 6: 1763–73.
- Ubbink, M., Ejdebäck, M., Karlsson, B.G. & Bendall, D.S. (1998) "The structure of the complex of plastocyanin and cytochrome f, determined by paramagnetic NMR and restrained rigid-body molecular dynamics." *Structure* 6(3): 323–35.
- Uhlmann, H. & Bernhardt, R. (1995) "The role of threonine 54 in adrenodoxin for the properties of its iron-sulfur cluster and its electron transfer function." *J Biol Chem* 270(50): 29959–66.
- Uhlmann, H., Iametti, S., Vecchio, G., Bonomi, F. & Bernhardt, R. (1997) "Pro108 is important for folding and stabilization of adrenal ferredoxin, but does not influence the functional properties of the protein." *Eur J Biochem* 248(3): 897–902.

- Uhlmann, H., Kraft, R. & Bernhardt, R. (1994) "C-terminal region of adrenodoxin affects its structural integrity and determines differences in its electron transfer function to cytochrome P-450." *J Biol Chem* 269(36): 22557–64.
- Usanov, S.A., Turko, I.V., Chashchin, V.L. & Akhrem, A.A. (1985) "Cross-linking studies of steroidogenic electron transfer: covalent complex of adrenodoxin reductase with adrenodoxin." *Biochim Biophys Acta* 832(3): 288–96.
- Usanov, S., Chashchin, V. & Akhrem, A. (1990) *Cytochrome P-450 dependent pathways of the biosynthesis of steroid hormones. Frontiers in Biotransformation*. Bd. 3 Akademie-Verlag, Berlin, Germany.
- Vickery, L.E. (1997) "Molecular recognition and electron transfer in mitochondrial steroid hydroxylase systems." *Steroids* 62(1): 124–7.
- Vlasie, M.D., Comuzzi, C., van den Nieuwendijk, A.M.C.H., Prudêncio, M., Overhand, M. & Ubbink, M. (2007) "Long-range-distance NMR effects in a protein labeled with a lanthanide-DOTA chelate." *Chemistry* 13(6): 1715–23.
- Vlasie, M.D., Fernández-Busnadiego, R., Prudêncio, M. & Ubbink, M. (2008) "Conformation of pseudoazurin in the 152 kDa electron transfer complex with nitrite reductase determined by paramagnetic NMR." *J Mol Biol* 375(5): 1405–15.
- de Vries, S.J., van Dijk, M. & Bonvin, A.M. (2010) "The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking" *Nat Prot* : in press.
- Wada, A., Mathew, P.A., Barnes, H.J., Sanders, D., Estabrook, R.W. & Waterman, M.R. (1991) "Expression of functional bovine cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 (P450_{scc}) in *Escherichia coli*." *Arch Biochem Biophys* 290(2): 376–80.
- Wagner, G. (1993) "Prospects for NMR of large proteins." *J Biomol NMR* 3(4): 375–85.
- Waki, N., Hiwatashi, A. & Ichikawa, Y. (1986) "Purification and biochemical characterization of hepatic ferredoxin (hepatoredoxin) from bovine liver mitochondria." *FEBS Lett* 195(1-2): 87–91.

- White, P.C. (2001) "Steroid 11 beta-hydroxylase deficiency and related disorders." *Endocrinol Metab Clin North Am* 30(1): 61–79, vi.
- White, R. (1991) "The involvement of free radicals in the mechanisms of monooxygenases." *Pharmacol. Ther.* 49: 21–42.
- Wöhnert, J., Franz, K.J., Nitz, M., Imperiali, B. & Schwalbe, H. (2003) "Protein alignment by a coexpressed lanthanide-binding tag for the measurement of residual dipolar couplings." *J Am Chem Soc* 125(44): 13338–9.
- Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syldatk, C., Mattes, R., Siemann, M. & Altenbuchner, J. (2001) "High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the Escherichia coli rhaBAD promoter." *Biotechnol Bioeng* 73(2): 95–103.
- Worrall, J.A.R., Liu, Y., Crowley, P.B., Nocek, J.M., Hoffman, B.M. & Ubbink, M. (2002) "Myoglobin and cytochrome b5: a nuclear magnetic resonance study of a highly dynamic protein complex." *Biochemistry* 41(39): 11721–30.
- Worrall, J.A.R., Reinle, W., Bernhardt, R. & Ubbink, M. (2003) "Transient protein interactions studied by NMR spectroscopy: the case of cytochrome C and adrenodoxin." *Biochemistry* 42(23): 7068–76.
- Xu, X., Keizers, P.H.J., Reinle, W., Hannemann, F., Bernhardt, R. & Ubbink, M. (2009) "Intermolecular dynamics studied by paramagnetic tagging." *J. Biomol. NMR* 43(4): 247–254.
- Xu, X., Kim, S.K., Schurmann, P., Hirasawa, M., Tripathy, J.N., Smith, J., Knaff, D.B. & Ubbink, M. (2006) "Ferredoxin/ferredoxin-thioredoxin reductase complex: Complete NMR mapping of the interaction site on ferredoxin by gallium substitution." *FEBS Lett* 580(28-29): 6714–20.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." *Gene* 33(1): 103–19.

- Young, L., Murphy, G., Kelly, S., Smith, T., Cunningham, S. & J.McKenna, J. (2003) “Differential production of adrenal steroids by purified cells of the human adrenal cortex is relative rather than absolute.” *Eur J Endocrinol* 148(1): 139–45.
- Zanetti G, Binda C, A.A. (2001) *Handbook of metalloproteins* Wiley, Chichester.
- Ziegler, G., Vonrhein, C., Hanukoglu, I. & Schulz, G. (1999) “The Structure of Adrenodoxin Reductase of Mitochondrial P450 Systems: Electron Transfer for Steroid Biosynthesis” *J. Mol. Biol.* 289: 981–990.
- Zöllner, A., Nogués, I., Heinz, A., Medina, M., Gómez-Moreno, C. & Bernhardt, R. (2004) “Analysis of the interaction of a hybrid system consisting of bovine adrenodoxin reductase and flavodoxin from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119.” *Bioelectrochemistry* 63(1-2): 61–65.
- Zöllner, A., Hannemann, F., Lisurek, M. & Bernhardt, R. (2002) “Deletions in the loop surrounding the iron-sulfur cluster of adrenodoxin severely affect the interactions with its native redox partners adrenodoxin reductase and cytochrome P450(scc) (CYP11A1).” *J. Inorg. Biochem.* 91(4): 644–654.

Anhang

Aminosäuresequenzen

Aminosäuresequenz des AdRWT

Markiert sind die fünf Cysteine C10, C74, C145, C322 und C364 des AdRWT.

STQEQTPQIC VVGSGPAGFY TAQHLLKHHS RAHVDIYEKQ LVPFGLVRFV VAPDHPEVKN	60
VINTFTQTAR SDRCAFYGNV EVGRDVTVQE LQDAYHAVVL SYGAEDHQAL DIPGEELPGV	120
FSARAFVGWY NGLPENRELA PDLSCDTAVI LGQGNVALDV ARILLTPPDH LEKTDITEAA	180
LGALRQSRVK TWIVGRRGP LQVAFTIKEL REMIQLPGTR PMLDPADFLG LQDRIKEAAR	240
PRKRLMELLL RTATEKPGVE EAARRASASR AWGLRFFRSP QQVLPSPDGR RAAGIRLAVT	300
RLEGIGEATR AVPTGDVEDL PCGLVLSSIG YKSRPIDPSV PFDPKLGVVP NMEGRVVDVP	360
GLYCSGWVKR GPTGVITTTM TDSFLTQIL LQDLKAGHLP SGPRPGSAFI KALLDSRGVW	420
PVSFSDWEKL DAEVSRGQA SGKPREKLLD PQEMLRLLGH	480

Aminosäuresequenz der AdR-Fünffachmutante

Markiert sind die fünf Serine S10, S74, S145, S322 und S364 des AdRWT.

STQEQTPQIS VVGSGPAGFY TAQHLLKHHS RAHVDIYEKQ LVPFGLVRFV VAPDHPEVKN	60
VINTFTQTAR SDRSAFYGNV EVGRDVTVQE LQDAYHAVVL SYGAEDHQAL DIPGEELPGV	120
FSARAFVGWY NGLPENRELA PDLSSDTAVI LGQGNVALDV ARILLTPPDH LEKTDITEAA	180
LGALRQSRVK TWIVGRRGP LQVAFTIKEL REMIQLPGTR PMLDPADFLG LQDRIKEAAR	240
PRKRLMELLL RTATEKPGVE EAARRASASR AWGLRFFRSP QQVLPSPDGR RAAGIRLAVT	300
RLEGIGEATR AVPTGDVEDL P SGLVLSSIG YKSRPIDPSV PFDPKLGVVP NMEGRVVDVP	360
GLYSSGWVKR GPTGVITTTM TDSFLTQIL LQDLKAGHLP SGPRPGSAFI KALLDSRGVW	420
PVSFSDWEKL DAEVSRGQA SGKPREKLLD PQEMLRLLGH	480

Anhang

Aminosäuresequenz der AdR_A

Markiert ist das Cysteinpaar C425C/K429C, das auf der FAD-Domäne lokalisiert sind.

STQEQTPQIC VVGSGPAGFY TAQHLLKHHS RAHVDIYEKQ LVPFGLVRFV VAPDHPEVKN	60
VINTFTQTAR SDRCAFYGNV EVGRDVTVQE LQDAYHAVVL SYGAEDHQAL DIPGEELPGV	120
FSARAFVGWY NGLPENRELA PDLSCDTAVI LGQGNVALDV ARILLTPPDH LEKTDITEAA	180
LGALRQSRVK TWIVGRRGP LQVAFTIKEL REMIQLPGTR PMLDPADFLG LQDRIKEAAR	240
PRKRLMELL L RTATEKPGVE EAARRASASR AWGLRFFRSP QQVLPSPDGR RAAGIRLAVT	300
RLEGIGEATR AVPTGDVEDL PCGLVLSSIG YKSRPIDPSV PFDPKLGVVP NMEGRVVDVP	360
GLYCSGWVKR GPTGVITTTM TDSFLTQIIL LQDLKAGHLP SGPRPGSAFI KALLDSRGVW	420
PVSFCDWECL DAEVSRGQA SGKPREKLLD PQEMLRLLGH	480

Aminosäuresequenz der AdR_B

Markiert ist das Cysteinpaar Q232C/K236C, das auf der NADPH-Domäne lokalisiert sind.

STQEQTPQIC VVGSGPAGFY TAQHLLKHHS RAHVDIYEKQ LVPFGLVRFV VAPDHPEVKN	60
VINTFTQTAR SDRCAFYGNV EVGRDVTVQE LQDAYHAVVL SYGAEDHQAL DIPGEELPGV	120
FSARAFVGWY NGLPENRELA PDLSCDTAVI LGQGNVALDV ARILLTPPDH LEKTDITEAA	180
LGALRQSRVK TWIVGRRGP LQVAFTIKEL REMIQLPGTR PMLDPADFLG LCDRICEAAR	240
PRKRLMELL L RTATEKPGVE EAARRASASR AWGLRFFRSP QQVLPSPDGR RAAGIRLAVT	300
RLEGIGEATR AVPTGDVEDL PCGLVLSSIG YKSRPIDPSV PFDPKLGVVP NMEGRVVDVP	360
GLYCSGWVKR GPTGVITTTM TDSFLTQIIL LQDLKAGHLP SGPRPGSAFI KALLDSRGVW	420
PVSFSDWEKL DAEVSRGQA SGKPREKLLD PQEMLRLLGH	480

Oligonukleotide

Aufgelistet sind die Oligonukleotide, die für die Mutagenese der Mutanten AdR_C (AdR_C364S/M352C/V357C) und AdR_D (AdR_C364S/K395C/H398C) verwendet wurden.

Anhang

Tabelle 5.1: Sequenzen der *QuikChange* Mutagenese Primer

Primer	Primersequenz 5'→3'	Verwendungszweck
AdR_C_for	GTT GTC CCC AAT TGT GAG GGA CGC GTT TGT GAT GTG CCA GGC CTC TAC	M352C/V357C in AdR_C364S
AdR_C_rev	CTG GCA CAT CAC AAA CGC GTC CCT CAC AAT TGG GGA CAA CCC CGA G	M352C/V357C in AdR_C364S
AdR_D_for	CAG GAC CTG TGT GCC GGC TGC CTG CCG TCT GGC	K395C/H398C in AdR_C364S
AdR_D_rev	GCC AGA CGG CAG GCA GCC GGC ACA CAG GTC CTG	K395C/H398C in AdR_C364S

Plasmidkarten

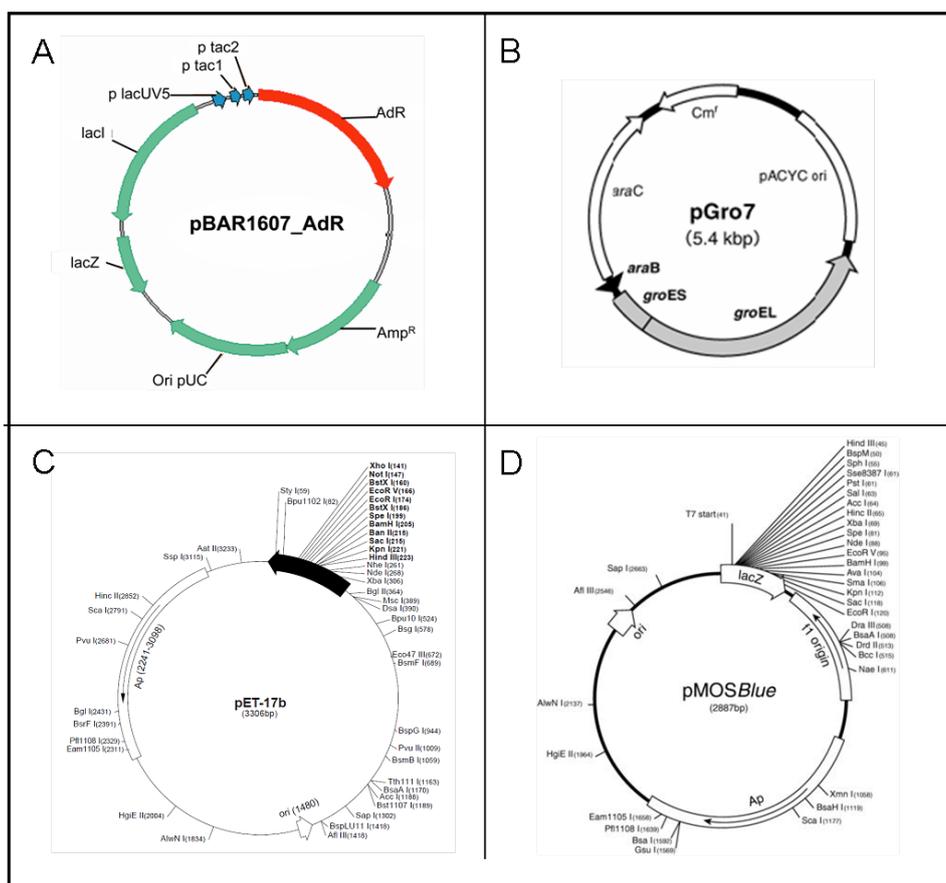


Abbildung 5.1: Plasmidkarten. (A) Expressionsvektor für die AdR (Sagara *et al.*, 1993) (B) Expressionsvektor pGro7. Der Unterschied zum verwendeten Chaperonplasmid pGro12 liegt im Resistenzgen. pGro12 besitzt das Resistenzgen für Kanamycin (Nishihara *et al.*, 1998) (C) Expressionsvektor pET17b (Novagen) (D) Klonierungsvektor pMOSBlue (GE Healthcare)

Pseudokontaktverschiebungen

Pseudokontaktverschiebungen des Adx(4-108) im Komplex mit der AdR_A

Tabelle 5.2: Ermittelte PCS aus der Interaktion AdR_A und Adx(4-108).

Adx(4-108) Reste	PCS (ppm)	Adx(4-108) Reste	PCS (ppm)
Thr8	-0,098	Ile63	-0,026
Val9	0,003	Phe64	-0,016
Asn13	-0,013	Glu65	-0,019
Arg14	0,059	Lys66	-0,028
Asp15	0,059	Leu67	-0,030
Gly16	0,033	Glu68	-0,037
Glu17	-0,003	Ala69	-0,031
Thr18	-0,041	Asp72	-0,010
Leu19	-0,060	Leu84	0,039
Thr20	-0,112	Thr85	0,007
Gly23	-0,142	Asp86	0,035
Lys24	-0,215	Ser88	0,086
Ile25	-0,069	Arg89	0,017
Gly26	-0,138	Ser95	-0,087
Ser28	-0,198	Leu96	-0,166
Leu29	-0,049	Lys98	-0,096
Leu38	-0,210	Ala99	-0,075
Asp39	-0,276	Met100	-0,070
Asp41	0,080	Asn102	-0,080
Phe43	-0,039	Thr104	-0,041
Gln61	-0,003		

Pseudokontaktverschiebungen des Adx(4-108) im Komplex mit der AdR_B

Tabelle 5.3: Ermittelte PCS aus der Interaktion AdR_B und Adx(4-108).

Adx(4-108) Reste	PCS (ppm)	Adx(4-108) Reste	PCS (ppm)
Thr8	-0,127	Asp41	-0,099
Asn13	-0,126	Phe43	-0,031
Arg14	-0,143	Gln61	-0,464
Asp15	-0,103	Phe64	-0,583
Gly16	-0,134	Glu65	-0,549
Glu17	-0,107	Glu68	-0,509
Thr18	-0,109	Ala69	-0,843
Leu19	-0,138	Asp72	-1,054
Thr20	-0,123	Leu84	-0,141
Gly23	-0,123	Arg89	-0,457
Lys24	-0,139	Ser95	-0,332
Ile25	-0,127	Lys98	-0,118
Gly26	-0,162	Ala99	-0,123
Ser28	-0,225	Met100	-0,174
Gln35	-0,149	Asn102	-0,153
Asn36	-0,136	Thr104	-0,255
Leu38	-0,075		

Marker

DNA-Marker „Smartladder“ Eurogentec

Prestained Protein Marker - Broad Range P7708S NEB

Säulenmaterial

Adx-Sepharose Institut für Biochemie (Herr Wolfgang Reinle)

Superdex200 GE Healthcare

Source 30Q GE Healthcare

Enzyme

<i>Bmr</i> I	Promega
<i>Dpn</i> I	Promega
<i>Hind</i> III	Promega
<i>Nde</i> I	Promega
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Roche
T4 Ligase	Epicentre Biotechnologies
Taq DNA-Polymerase	Q-BIOgene
Lysozym	Serva

Kits

Nucleobond ^R Midi Plasmid Preparation Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel
QuikChange TM Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Thiol and Sulfide Quantitation Kit (T-6060)	Molecular Probes

Materialien

Amicon	Millipore
Carl Roth GmbH	Nunc GmbH
Falcon	peqLab
Fisher Scientific	Qiagen GmbH
Greiner GmbH	Tetenal Photowerk
Macherey-Nagel GmbH & Co KG	TPP Techno Plastic Products AG

Chemikalien

Amersham Pharmacia Biotech	Invitrogen BV
Acros Organics	Kodak
Appligene	Merck
BD	Messer Griesheim
Biacore	MWG Biotech GmbH
Biochrom KG Seromed	New England Biolabs
Bio-Rad Laboratories	Promega
BioTez GmbH	Q-Biogene
Biozym GmbH	Qiagen
Clontech Laboratories GmbH	Roche Molecular Biochemicals
Difco Laboratories	Roth
Dulbeco	Santa Cruz
Euriso-top	Serva GmbH & Co KG
Eurogentec	Sifin
Fuji, Raytest	Sigma-Aldrich
Fluka AG	Stratagene
Gibco/BRL GmbH	VWR
Grüssing	

Geräte

Autoklav	LVSA 50/70 Zirbus
ÄKTA-Prime	Pharmacia
CD-Spektrometer	Jasco 715 Spektropolarimeter
Chromatographiesystem	Äkta prime Amersham
Elektrophorese Apparatur	Sigma-Aldrich System
Elektroporator	Easyject Prima Equibio
Geltrockner	Gel dryer model 583 Bio-Rad
HPLC	Jasco LC900 Serie
Inkubator	NewBrunswick Scientific
Kühlzentrifuge	Beckmann Coulter Avanti J-20 (Rotor JLA 8.1000)
Kühlzentrifugen	Sigma 3K18, 3K30 (Rotoren 12153, 19776)
NMR-Röhrchen	Shigemi-Röhrchen, Shigemi Inc.
NMR-Spektrometer	Bruker Avance DMX 600 Spektrometer
PCR-Gerät	Peltier Thermal Cycler PTC-200 Bio-Rad
Sonikator	Emich USD 30
Vakuumverdampfer	Univapo 100H, RS Laborgeräte
SPR-Gerät	Biacore 3000
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer „5436“
Ultraschallgerät	USD 30, 2/8 Zoll Sonotrode, Fa. Emich
Ultrazentrifuge	Hitachi Himac CP75 β (Rotor P45)
UV/Vis-Spektralphotometer	Shimadzu UV2101PC

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Rita Bernhardt.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Rita Bernhardt für die interessante und vielseitige Aufgabenstellung bedanken. Ihre stete Diskussionsbereitschaft und fortwährendes Interesse am Fortgang der Arbeit machten es erst möglich, dass aus dieser Aufgabenstellung auch die vorliegende, vollständige Dissertation entstehen konnte.

Herrn Prof. Dr. Marcellus Ubbink möchte ich für die sehr freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die gute Zusammenarbeit danken. Hiermit hatte ich die großartige Möglichkeit eine tiefe Einsicht in eine faszinierende und zukunftsweisende Methode der NMR-Spektroskopie zu erhalten.

Herrn Dr. Frank Hannemann danke ich für die zahlreichen Diskussionen und für die Ideen, die in entscheidenden Momenten eine große Hilfe waren. Auch möchte ich mich für das abschließende Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Peter H.J. Keizers. Mit seiner Hilfe und Geduld wurde es mir möglich einen Einblick in die große Welt der NMR zu erhalten. Auch danke ich ihm für die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen.

Dr. Anja Berwanger, Britta Wilzewski, Dr. Thoa Kim Nguyen und Dr. Huy-Hoang Nguyen, sowie Dr. Yogan Kathri und Martin Wörner wurden in den letzten Jahren zu sehr guten Freunden, deren Motivation und Hilfestellungen, bei einer Tasse Kaffee, immer eine tolle Unterstützung waren.

Bei meinen Freundinnen und Kolleginnen Ming-Kwai Tin und Antje Eiden-Plach möchte ich mich für die fachlich und persönlich bereichernden Unterhaltungen danken,

Danksagung

die mich während meiner Promotionszeit begleitet haben.

Auch möchte ich herzlich Michael Kleser, Sabrina Bleif, Michael Ringle sowie Dr. Anja Berwanger, Ming-Kwai Tin und Jens Neunzig für die tolle Atmosphäre in unserem gemeinsamen, zum „Chemikerlabor“ deklarierten, Labor bedanken. Mein Dank gilt auch Daniela Rauf, Anna Hobler und Simon Janocha.

Mein Dank geht auch an die technischen Assistenten Katharina Bompais und insbesondere Wolfgang Reinle, der große Mühen in die Expression der markierten Adx-Formen gesteckt hat.

Allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Arkadaşlığımız uzun senelerden beri süren Melis Gündoğar'a bu özel ve heyecanlı zamanda yanımda olup beni desteklediği için çok teşekkür ederim.

Dr. Anja Berwanger, die in kürzester Zeit zu einer sehr guten Freundin geworden ist, danke ich für die wertvollen Gespräche und die vielen gemeinsamen Unternehmungen.

Von Herzen danke ich Familie Ehlig für ihre Liebe und Unterstützung.

Annem Besime Mersinli, babam Hüseyin Avni Mersinli ve kardeşim Mustafa Mersinli. Bana hep güvendiler, desteklerini ve sevgilerini eksik etmediler. Sevgili aileme candan teşekkür ederim.

Garlef Ehlig, meinem besten Freund und Ehemann danke ich für seine Liebe und Geduld, die mir während meiner Promotion, trotz der großen Distanz, ausnahmslos eine große Unterstützung war.