

**Die dreidimensionale Struktur von  
Alliinase aus Knoblauch  
in verschiedenen Kristallformen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades**  
*Doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biochemiker Edmund Bartholomeus Küttner  
geboren am 28.10.1975 in Weimar (Thüringen)

Erstgutachter:	Univ.-Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld
Zweitgutachter:	Univ.-Prof. Dr. Siegmund Reißmann
Drittgutachter:	Dr. habil. Tim Clausen
Termin der Doktorprüfung:	16.12.2004
Termin der Verteidigung:	06.06.2005

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	1
1.1 Allisatin.....	1
1.2 Knoblauch.....	4
1.2.1 Zeugnisse der Geschichte.....	4
1.2.2 Ursprung des Namens und botanische Einordnung.....	5
1.2.3 Inhaltsstoffe.....	6
1.2.4 Medizinische Wirkungen.....	8
1.3 Alliinase.....	11
1.3.1 Verbreitung.....	11
1.3.2 Zelluläre Lokalisierung und Funktion.....	11
1.3.3 Biochemische Eigenschaften der Knoblauch-Alliinase.....	12
1.3.4 Vergleich von Alliinasen.....	16
1.4 Pyridoxal-5'-phosphat-abhängige Enzyme.....	19
1.4.1 Überblick.....	19
1.4.2 Klasseneinteilung.....	19
1.4.2.1 Aspartat-Aminotransferase-Familie.....	20
1.4.2.2 Tryptophan-Synthase $\beta$ -Untereinheit-Familie.....	22
1.4.2.3 Alanin-Racemase-Familie.....	23
1.4.2.4 D-Aminosäure-Aminotransferase-Familie.....	23
1.4.2.5 Glykogen-Phosphorylase-Familie.....	24
1.4.3 Kofaktorbindung.....	26
1.5 EGF-Domänen.....	28
1.5.1 Herkunft und Übersicht.....	28
1.5.2 Domärentypen.....	28
1.5.2.1 Klassische EGF-ähnliche Domäne.....	28
1.5.2.2 $\text{Ca}^{2+}$ -bindende EGF-ähnliche Domäne.....	30
1.5.2.3 Laminin-EGF-ähnliche Domäne.....	31
1.5.2.4 Integrin-EGF-ähnliche Domäne.....	31
1.5.2.5 Knotine.....	32
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	34

<b>2.</b>	<b>MATERIALIEN AND METHODEN</b>	<b>35</b>
2.1	Materialien	35
2.1.1	Laborausrüstung	35
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	36
2.1.3	Chemikalien und Enzyme	37
2.1.4	Pufferlösungen	37
2.1.5	Knoblauch	37
2.2	Methoden	38
2.2.1	Biochemische Methoden	38
2.2.1.1	Proteinreinigung	38
2.2.1.2	Aktivitätstest und MICHAELIS-MENTEN-Kinetik	39
2.2.1.3	$K_i$ -Bestimmung von HEPES	40
2.2.1.4	UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektroskopie	40
2.2.2	Kristallographische Methoden	40
2.2.2.1	Kristallisation	40
2.2.2.2	IEF-PAGE von Alliinasekristallen	41
2.2.2.3	Schweratomderivatisierung	41
2.2.2.4	Meßdatensammlung	41
2.2.2.5	Meßdatenprozessierung- und verarbeitung	42
2.2.2.6	Phasenbestimmungen	44
2.2.2.6.1	SIRAS	45
2.2.2.6.2	Molekularer Ersatz	47
2.2.2.7	Strukturmodellbau und -verfeinerung - Kristallform IV	48
2.2.2.7.1	Initiales Modell	48
2.2.2.7.2	Manueller Modellbau	49
2.2.2.7.3	Modellverfeinerung	49
2.2.2.8	Strukturmodellbau und -verfeinerung - Kristallform III	50
2.2.2.8.1	Initiales Modell	50
2.2.2.8.2	Manueller Modelbau	50
2.2.2.8.3	Modellverfeinerung	50
2.2.2.9	Strukturmodellbau und -verfeinerung - Kristallform I	51
2.2.2.9.1	Initiales Modell	51
2.2.2.9.2	Modellverfeinerung	51

2.2.3	Vergleichende, modellierende und graphische Methoden	51
2.2.3.1	Sequenz- und Kristallstrukturvergleiche	51
2.2.3.2	Molekülgröße, lösungsmittelzugängliche Oberflächen	52
2.2.3.3	Interaktionslängen	52
2.2.3.4	Winkelangaben	52
2.2.3.5	„Offen-geschlossen“-Strukturvergleich	52
2.2.3.6	Substratmodellierung	53
2.2.3.7	Erstellung von Abbildungen	53
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>54</b>
3.1.	Qualitäts- und Aktivitätstests	54
3.1.1	Alliinase-Identitätstest	54
3.1.2	Reinheitsüberprüfung	54
3.1.3	Alliinase verschiedener Knoblauch-Herkunftsgebiete	55
3.1.4	MICHAELIS-MENTEN-Kinetik	55
3.1.5	$K_i$ -Bestimmung von HEPES	57
3.2	UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektroskopie	58
3.3	Kristallisation	59
3.3.1	Kristallform I - $P2_1$	59
3.3.2	Kristallform II - $C222_x$	60
3.3.3	Kristallform III - $P2_1$	61
3.3.4	Kristallform IV - $P2_12_12_1$	62
3.3.5	Mikroheterogenität der Kristalle	64
3.4	Native Datensammlung und -prozessierung	65
3.4.1	Kristallform I	65
3.4.2	Kristallform II	65
3.4.3	Kristallform III	65
3.4.4	Kristallform IV	65
3.5	Lösen des Phasenproblems, Strukturmodellbau, Verfeinerung	68
3.5.1	Kristallform IV	68
3.5.1.1	Herstellung von Schweratomderivat-Kristallen	68
3.5.1.2	Datensammlung an Schweratomderivat-Kristallen	68
3.5.1.3	Lokalisierung der Schweratompositionen	70
3.5.1.4	Phasenbestimmung mittels SIRAS	71
3.5.1.5	Initiales Strukturmodell	73

3.5.1.6	Manueller Strukturmodellbau und Verfeinerung.....	73
3.5.1.7	Finales Strukturmodell.....	75
3.5.2	Kristallform III.....	77
3.5.2.1	Phasenbestimmung mittels molekularem Ersatz.....	77
3.5.2.2	Manueller Modellbau und Verfeinerung.....	77
3.5.2.3	Finales Strukturmodell.....	78
3.5.3	Kristallform I.....	80
3.5.3.1	Phasenbestimmung mittels molekularem Ersatz.....	80
3.5.3.2	Vorläufiges Strukturmodell.....	81
3.6	Strukturbeschreibung der Alliinase.....	83
3.6.1	Primärstruktur.....	83
3.6.2	Sekundärstruktur.....	84
3.6.3	Tertiärstruktur.....	85
3.6.3.1	N-terminale Domäne.....	86
3.6.3.2	Zentrale Domäne.....	86
3.6.3.3	C-terminale Domäne.....	88
3.6.3.4	Prolinreste.....	89
3.6.3.5	Intramolekulare Domänen-Kontakte.....	89
3.6.4	Quartärstruktur.....	91
3.6.4.1	Dimeraufbau.....	91
3.6.4.2	Intermolekulare Monomer-Kontakte.....	91
3.6.4.3	C <sub>α</sub> -Positionsabweichungen zwischen Monomeren A und B.....	94
3.6.4.4	ω-Dihedralwinkel-Abweichungen.....	95
3.6.5	Bindungsstellen für Heteroatome.....	97
3.6.5.1	Kofaktormoleküle.....	97
3.6.5.2	Inhibitormoleküle.....	100
3.6.5.3	Zuckerketten.....	104
3.6.5.4	Chlorid-Ionen.....	108
3.6.5.5	Sulfat-Ionen.....	109
3.6.5.6	Wassermoleküle.....	112
3.6.5.7	Besonderheiten der Alliinasestruktur in Kristallform III.....	113
3.6.6	Temperaturfaktorverteilung im Dimer - Kristallformen III, IV.....	115
3.6.7	C <sub>α</sub> -Strukturabweichungen zwischen Kristallformen III und IV.....	116

## Inhaltsverzeichnis

3.6.8	Kristallpackung - Kristallformen I, III, IV	117
3.6.8.1	Kristallform I	117
3.6.8.2	Kristallform III	119
3.6.8.3	Kristallform IV	120
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>121</b>
4.1	Enzymreinheit und -aktivität	121
4.1.1	Mikroheterogenität	121
4.1.2	Spezifische Enzymaktivität	121
4.1.3	MICHAELIS-MENTEN-Parameter	122
4.1.4	HEPES als Inhibitor der Enzymreaktion	123
4.2	UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektroskopie	123
4.3	Kristallisation	124
4.3.1	Verwandtschaft der Kristallformen	124
4.3.2	pH-Wert-Abhängigkeit der PEG-Kristallformen	127
4.3.3	Mikroheterogenität in den Kristallen	129
4.4	Alliinasestruktur	129
4.4.1	Faltungsvergleich mit PLP-abhängigen Enzymen	129
4.4.2	Faltungsvergleich mit EGF-ähnlichen Domänen	133
4.4.3	Funktion der EGF-ähnlichen Domäne	136
4.4.4	Kofaktorbindung im Vergleich mit anderen PLP-Enzymen	138
4.4.5	Funktion der Chlorid-Ionen	140
4.4.6	Funktion der Sulfat- und Phosphat-Ionen	142
4.4.7	Funktion der Zuckerketten	143
4.4.8	Substratbindungsmodell und Reaktionsmechanismus	145
4.4.8.1	Substratbindungsmodell	145
4.4.8.2	Reaktionsmechanismus	148
4.4.9	„Offene“ oder „geschlossene“ Konformation?	152
4.4.10	Ursachen der Dihedralwinkelabweichungen	154
4.4.11	Bedeutung der „angespannten“ Schleife S204→L211	154
4.5	Einfluß von W182 auf die Enzymreaktion?	157
4.6	Mutagenesevorschläge zur Veränderung der Alliinasespezifität	158
4.7	Sequenzvergleich Alliinasen	160
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>166</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>168</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>7.</b>	<b>ANHANG</b> .....	181
7.1	Disulfidbrücken.....	181
7.2	Intramolekulare Domänenkontakte.....	181
7.3	Intermolekulare Monomerkontakte.....	184
7.4	$\omega$ -Dihedralwinkelabweichungen $> 3 \sigma$ .....	186
7.5	Kristallkontakte.....	187
	7.5.1 Kristallform III.....	187
	7.5.2 Kristallform IV.....	188
7.6	Ursachen ungewöhnlicher Dihedralwinkel.....	189
7.7	$\omega$ -Winkel der „angespannten“ Schleife von PLP-Klasse I-Enzymen.....	190
7.8	Sequenzvergleiche von Alliinasen.....	194
<b>8.</b>	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b> .....	195
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	196
<b>10.</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	197

# ABBILDUNGSINDEX

	Seite
1.1 Prof. Dr. Arthur STOLL (1919).....	1
1.2 Allisatin-Packungseinheit der ehemaligen Firma Sandoz mit 30 Originalkapseln.....	1
1.3 Dr. Ewald Franz SEEBECK (April 1946).....	2
1.4 Deutscher Knoblauch kurz vor der Ernte.....	6
1.5 Schwefelhaltige, von $\gamma$ -Glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteinen abgeleitete Knoblauchinhaltsstoffe.....	7
1.6 Erubosid B, ein Saponin aus dem Knoblauch.....	8
1.7 S-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxidlyase-Reaktion.....	13
1.8 PLP als internes Aldimin mit dem Enzym.....	19
1.9 Reaktionsdiversität PLP-abhängiger Enzyme, deren Katalyse über ein externes Aldimin verläuft.....	20
1.10 Dimerdarstellungen der fünf PLP-Enzymfamilien.....	21
1.11 Topologiezeichnungen der fünf PLP-Enzymfamilien.....	22
1.12 Gemeinsame sieben Strukturelemente der PLP-Enzymfamilien in den PLP-bindenden Domänen.....	26
1.13 Phosphatbindungstasche („phosphate-binding cup“) der PLP-abhängigen Enzyme.....	27
1.14 EGF-Domärentypen und Knotine.....	29
1.15 T-Knotenfaltung.....	33
2.1 Kopplung der Alliinasereaktion mit sekundärer Enzymreaktion.....	39
3.1 Elutionsprofil der Gelfiltration.....	54
3.2 SDS-PAGE von Alliinase.....	54
3.3 Reaktionsgeschwindigkeit- und LINEWEAVER-BURK-Plots der Alliinasereaktion.....	56
3.4 Alliinaseaktivität unter HEPES-Einfluß.....	57
3.5 UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektren der Alliinase.....	58
3.6 Kristallphotos der Kristallformen I, II.....	59
3.7 Kristallphotos der Kristallform III.....	61
3.8 Kristallphotos der Kristallform IV.....	62
3.9 $11^\circ$ -Präzessionsdiffraktionsaufnahme der 0kl-Ebene eines $P2_12_12_1$ -Alliinasekristalls.....	63
3.10 IEF-PAGE pH 3-9 von Alliinase und wiederaufgelösten Alliinasekristallen.....	64
3.11 Oszillationsdiffraktions-Ausschnitte von Kristallen der Kristallformen III, IV.....	66
3.12 Theoretisches Absorptionsverhalten der Elemente Au und U im Energiebereich 4-25 keV.....	69
3.13 HARKER-Schichten in der anomalen PATTERSON-Synthese des $K[AuCl_4]$ - Derivats.....	71
3.14 ElektronendichtepLOTS für enantiomere Lösungsensembles der anomalen PATTERSON-Karte.....	72
3.15 RAMACHANDRAN-Plot der finalen Kristallform IV-Alliinasestruktur.....	76
3.16 Stereodarstellung des Proteinabschnitts H88-R89-M90 in Monomer A von Kristallform IV.....	76
3.17 RAMACHANDRAN-Plot der finalen Kristallform III-Alliinasestruktur.....	79
3.18 Elektronendichtekarten in den aktiven Zentren der Kristallform I-Alliinasestruktur.....	82
3.19 Primärstrukturanalyse durch Interpretation von Elektronendichtekarten.....	83
3.20 Sekundärstrukturverteilung der Alliinase.....	84
3.21 Alliinasemonomer.....	85
3.22 Detailansicht der Alliinasedomänen.....	87

## Abbildungsindex

3.23	Verteilung der Prolinreste in der dreidimensionalen Alliinasestruktur.....	89
3.24	Domänen-Interaktionen im Alliinase monomer.....	90
3.25	Alliinasedimer.....	92
3.26	Kontaktzonen im Alliinasedimer.....	93
3.27	Miteinander wechselwirkende gleichartige Aminosäuren beider Monomere entlang der Dimerachse.....	93
3.28	Dimerisierung der N-terminalen $\alpha$ -Helices über vier Methioninreste.....	94
3.29	Abweichende C $\alpha$ -Positionen zwischen den Monomeren A und B.....	95
3.30	Nicht-planare Peptidbindungen in Monomer B.....	95
3.31	Kofaktorbindung - Internes Aldimin.....	97
3.32	Kofaktorbindung - Interaktionen mit dem Apoprotein.....	99
3.33	HEPES-Bindung im aktiven Zentrum.....	100
3.34	HEPES-Interaktionen im aktiven Zentrum von Monomer B.....	101
3.35	$\alpha$ -Aminoacrylat-Bindung im aktiven Zentrum.....	102
3.36	Geminales Diamin oder Aldimin-Mix?.....	103
3.37	Interaktionen von $\alpha$ -Aminoacrylat im aktiven Zentrum von Monomer B.....	103
3.38	N-Glykosylierungsstellen im Dimerüberblick.....	104
3.39	N-Glykosylierungsstellen im Detail.....	105
3.40	Interaktionen der Zuckerketten mit dem Protein.....	106
3.41	Konformationsunterschiede der Fucosereste in den N146-Glykanen.....	107
3.42	Chloridbindungsstellen der Alliinase.....	108
3.43	Sulfatbindungsstellen der Alliinase in der Übersicht.....	109
3.44	Sulfatbindungsstellen der Alliinase im Detail.....	111
3.45	Wasserbindungsstellen der Alliinase.....	112
3.46	$\alpha$ -Aminoacrylatbindung in den aktiven Zentren der Alliinasestruktur von Kristallform III.....	113
3.47	Dritte Glykosylierungsstelle (N191-B) der Alliinasestruktur von Kristallform III.....	114
3.48	Temperaturfaktorverteilung im Dimer der Kristallformen III, IV.....	116
3.49	C $\alpha$ -Strukturabweichungen zwischen den Alliinasestrukturen der Kristallformen III und IV.....	117
3.50	Molekülpackung in den drei Kristallformen I, III, IV.....	118
4.1	Mögliche Protonierungs- und Substitutionsformen des internen Aldimins.....	123
4.2	Kristallkontakte ausgewählter Gutamatreste in Kristallform III.....	128
4.3	Strukturvergleich der Alliinase mit anderen PLP-Enzymen.....	131
4.4	Alliinase-EGF-ähnliche Domäne im Vergleich mit anderen EGF-ähnlichen Domänen.....	134
4.5	Die EGF-ähnliche Domäne als möglicher Interaktionspartner eines alliinasebindenden Proteins.....	136
4.6	Modell der N-terminalen Domänenbewegung nach Oxidation von Met2 und Met6.....	137
4.7	PLP-Bindung im Vergleich mit ACCS und AroAT.....	139
4.8	Rekrutierung hydrophober Aminosäureseitenketten zum benachbarten aktiven Zentrum.....	141
4.9	N146-Glykanrest am Eingang des aktiven Zentrums des Nachbarmonomers.....	144
4.10	Alliinase-Antikörper-Epitop.....	144
4.11	Substratbindungs-Modell.....	146
4.12	Substrat-Sulfoxid-Ähnlichkeit des HEPES.....	148

## Abbildungsindex

4.13	Vorhergesagte Alliinase-Reaktion.....	149
4.14	Externes Produktaldimin und geminales Produktdiamin der Kristallform III.....	150
4.15	„Offen/Geschlossen“-Strukturvergleich von Alliinase mit AAT.....	152
4.16	„Angespannte“ Schleife S204→L211.....	155
4.17	W182 in Relation zum aktiven Zentrum.....	158
4.18	Dendrogramm der sequenzbekannten Alliinasen verschiedener Pflanzen.....	160
4.19	Sequenzvergleich von Alliinasen verschiedener Pflanzen.....	161
4.20	Sequenzvergleich der Alliinasen aus <i>Allium sativum</i> und <i>Allium cepa</i> .....	162
4.21	Spekulatives Tetramer-Modell der Alliinase aus <i>Allium cepa</i> .....	164

## TABELLENINDEX

	Seite
1.1	Einteilung von Alliinasen nach ihren pH-Optima ..... 18
1.2	Superfamilie der PLP-abhängigen Enzyme mit bekannten dreidimensionalen Strukturen ..... 24
3.1	Spezifische Enzymaktivitäten von Alliinasen verschiedener Präparationen regionaler Knoblauchpflanzen ..... 55
3.2	Kinetische Enzymparameter von Alliinasen verschiedener Knoblauchherkunft ..... 56
3.3	Charakteristika der Alliinase-Kristallformen ..... 64
3.4	Datensammlungs- und Prozessierungsstatistiken der Alliinase-Kristallformen ..... 67
3.5	Datensammlungs- und Prozessierungsstatistiken der kokristallisierten Schweratomderivate ..... 70
3.6	Phasierungsstatistiken für Schweratomlösungen aus der anomalen PATTERSON-Karte ..... 72
3.7	Verfeinerungsstatistiken der REFMAC-Läufe 1-6 für Kristallform IV ..... 74
3.8	Temperaturfaktoren des finalen Alliinasemodells für Kristallform IV ..... 75
3.9	Statistik des molekularen Ersatzes für Kristallform III ..... 77
3.10	Verfeinerungsstatistiken der REFMAC-Läufe 1-5 für Kristallform III ..... 78
3.11	Temperaturfaktoren des finalen Alliinasemodells für Kristallform III ..... 80
3.12	Statistik des molekularen Ersatzes für Kristallform I ..... 81
4.1	Winkelabweichungen der Alliinase-Kristallformen III, IV zur „offenen“ und „geschlossenen“ Konformation von AAT ..... 153
4.2	Mutagenesekonzepte zur Veränderung der Alliinase-Substratspezifität ..... 159
7.1	Charakteristika der Alliinase-Disulfidbrücken ..... 181
7.2	Intramolekulare Domänenkontakte, klassische Wasserstoffbrücken $\leq 3,5 \text{ \AA}$ ..... 181
7.3	Intramolekulare Domänenkontakte, sonstige schwache Wechselwirkungen $\leq 4 \text{ \AA}$ ..... 182
7.4	Intermolekulare Monomerkontakte, klassische Wasserstoffbrücken $\leq 3,5 \text{ \AA}$ ..... 184
7.5	Intermolekulare Monomerkontakte, sonstige schwache Wechselwirkungen $\leq 4 \text{ \AA}$ ..... 184
7.6	Differenzen der $\omega$ -Winkel zu $180^\circ$ bzw. $0^\circ$ in Monomer A, B ..... 186
7.7	Kristallkontakte Kristallform III, klassische Wasserstoffbrücken $\leq 3,5 \text{ \AA}$ ..... 187
7.8	Kristallkontakte Kristallform III, sonstige schwache Wechselwirkungen $\leq 4 \text{ \AA}$ ..... 187
7.9	Kristallkontakte Kristallform IV, klassische Wasserstoffbrücken $\leq 3,5 \text{ \AA}$ ..... 188
7.10	Kristallkontakte Kristallform IV, sonstige schwache Wechselwirkungen $\leq 4 \text{ \AA}$ ..... 188
7.11	Mögliche Ursachen von Dihedralwinkelabweichungen ..... 189
7.12	$\omega$ -Dihedralwinkel der „angespannten“ Schleife von PLP-Klasse I-Enzymen ..... 190
7.13	Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten von Alliinasen verschiedener Pflanzen ..... 194

## ABKÜRZUNGEN

Å	Ångström (1 Å = 0,1 nm)
AA	$\alpha$ -Aminoacrylat
AAT	Aspartat-Aminotransferase
ACCS	1-Aminocyclopropan-1-carboxylat-Synthase
ACSO	S-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxide
AE	Asymmetrische Einheit
A-EGF	Alliinase-EGF
AlaR	Alanin-Racemase
AMAONAT	Adenosylmethionin-8-amino-7-oxononanoat-Aminotransferase
AroAT	Aromatische Aminosäure-Aminotransferase
ASA	<i>Allium sativum</i> -Agglutinin
BICINE	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
cb-EGF	Ca <sup>2+</sup> -bindender EGF
CBL	Cystathionin- $\beta$ -Lyase
CD	circular dichroism (Zirkulardichroismus)
CGL	Cystathionin- $\gamma$ -Lyase
CGS	Cystathionin- $\gamma$ -Synthase
CSB	cystinstabilisiertes $\beta$ -Faltblatt
DAAT	D-Aminosäure-Aminotransferase
DAPDC	Diaminopimelat-Decarboxylase
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
EGF	epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
fom	figure of merit
FPLC	fast protein liquid chromatography (schnelle Proteinflüssigchromatographie)
GABAAT	$\gamma$ -Aminobuttersäure-Aminotransferase
GP	Glykogen-Phosphorylase
HB-EGF	heparinbindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPAT	Histidinolphosphat-Aminotransferase

## Abkürzungen

I-EGF	Integrin-EGF
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
kDa	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
L-EGF	Lamin-EGF
mCBS	Menschliche Cystathionin- $\beta$ -Synthase
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MGL	Methionin- $\gamma$ -Lyase
NADH	Nicotinamadenindinukleotid, reduzierte Form
NBS	N-Bromosuccinimid
NMWL	Nominales Molekulargewichtslimit
NCS	non-crystallographic symmetry (nichtkristallographische Symmetrie)
OASS	O-Acetylserin-Sulphydrylase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCI	potato carboxypeptidase inhibitor (Kartoffel-Carboxypeptidase-Inhibitor)
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol (z.B. PEG-8000, Molekulargewicht von 8000)
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
R <sub>rim</sub>	redundancy-independent merging (rim, Redundanz unabhängiger) R factor (Faktor)
R <sub>pim</sub>	precision-indicating merging (pim, Präzision anzeigender) R factor (Faktor)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEC	S-Ethyl-L-cystein
SECS	S-Ethyl-L-cysteinsulfoxid
SIRAS	single isomorphic replacement with anomalous scattering (einfacher isomorpher Ersatz unter Einbeziehung der anomalen Streuung)
TA	Threonin-Aldolase
TAT	Tyrosin-Aminotransferase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrpS/TrpS $\beta$	Tryptophansynthase/Tryptophansynthase- $\beta$ -Untereinheit
rms	root-mean-square (Wurzel aus den gemittelten Quadraten)

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Allisatin

Die Knoblauchtabletten Kwai<sup>®</sup> (Lichtwer Pharma) und Ilja Rogoff<sup>®</sup> (Roche) gehören schon seit vielen Jahren zu den bekanntesten pflanzlichen Nahrungsergänzungsmitteln in Deutschland. Allerdings stellen sie nicht die ersten Knoblauchpräparate auf dem deutschen Markt dar. Vielmehr war es die Schweizer Firma Sandoz, heute Teil des Novartis-Konzerns, welche Pioniergeist auf diesem Sektor bewies. Bereits am 18. Juni 1924 stellte sie in Deutschland den Antrag auf patentrechtlichen Schutz für ein *Verfahren zur Herstellung von Allium-Präparaten* (Patentnummer 432053). Nach diesem wurden die abgetrockneten Knollen des Knoblauchs (*Allium sativum*) fein gehäckselt und mit Aktivkohle vermahlen, welche die Geruchsstoffe einschloß und das Knoblaucharoma zum Erliegen brachte. Basierend auf diesem Verfahren lancierte 1925 Prof. Dr. Arthur STOLL (Abb. 1.1) als damaliger Leiter der erst 1917 ins Leben gerufenen pharmakologischen Abteilung die Einführung eines Knoblauchpräparates auf dem deutschen Markt, kurz nachdem die Konkurrenz von Clement & Johnson (London) ihr Knoblauchprodukt names Yadil Antiseptic<sup>®</sup> bereits ein Jahr zuvor in Großbritannien beworben hatte (Firmenarchiv Novartis AG, Bestand Sandoz H-211.001, Anzeigenausschnitt aus *The Chemical and Druggist*, supplement, 24.4.1924). Als Name entschied man sich für eine naheliegende Ableitung aus dem lateinischen Namen *Allium sativum* und taufte das Erzeugnis folglich Allisatin<sup>®</sup> (Abb. 1.2). Das Präparat war für den Einsatz bei Verdauungsstö-



**Abb. 1.1** Prof. Dr. Arthur STOLL (1919). Mit freundlicher Genehmigung des Firmenarchivs der Novartis AG.



**Abb. 1.2** Allisatin-Packungseinheit der ehemaligen Firma Sandoz mit 30 Originalkapseln. Mit freundlicher Genehmigung des Firmenarchivs der Novartis AG.

## Einleitung

rungen, die im Zusammenhang mit mikrobiellen Infektionen stehen, angedacht. Albert SCHWEITZER, der das Mittel in den Tropen äußerst erfolgreich zur Therapie der Amöbenruhr verwendete, brachte STOLL in einem längerem Brief seine Begeisterung über das Produkt zum Ausdruck (FRITZ, 1992). Neben den Behandlungsmöglichkeiten bei Infektionen der Darmflora zeigte das Sandoz'sche Knoblauchpräparat schon zu jener Zeit auch Therapieerfolge auf den Gebieten der Arteriosklerose, des Bluthochdrucks, Hypertonie bei Jugendlichen sowie der Beeinflussung subjektiver Beschwerden (STOLL, 1940). Allisatin hielt sich viele Jahre nach seiner Einführung erfolgreich am Markt, und so war es auch 1949 noch in Deutschland erhältlich, wie STOLL dem Arzt Dr. Walter SCHWERDT in einem Brief auf dessen Anfrage hin mitteilte (STOLL, 1949). Nach schließlich über 44 Jahren der Produktion verlieren sich im August 1969 die Spuren von Allisatin letztendlich auch bei der Sandoz AG (Firmenarchiv Novartis AG, Bestand Sandoz H-302.009, 3. Quartalsbericht Produktion Pharma 1969).

Die Knoblauchforschung bei der Sandoz AG bestand bei der Markteinführung von Allisatin nur im Studium seiner medizinischen Wirkungen und dehnte sich zunächst nicht auf die Suche nach den eigentlichen Wirksubstanzen aus. Erst Anfang der vierziger Jahre beschäftigten sich zum einen BRUNNER (1941) mit *Untersuchungen über eine glycosidische Substanz aus Allium sativum* und andererseits RENZ (siehe SEEBECK, 1945a) mit der *Isolierung von Knoblauchöl in gebundener Form*. Eine wahrhafte Wiederbelebung und die aus heutiger Sicht bedeutendsten Fortschritte in der *Allium*-Forschung begannen bei der Sandoz AG jedoch erst ab dem 1. Mai 1944 (Firmenarchiv Novartis AG, Bestand Sandoz C-203.000, Ewald Seebeck) mit der Einstellung von Dr. Ewald Franz SEEBECK (Abb. 1.3). Der damals 30jährige Apotheker erhielt als erste Aufgabe, seinem Vorgesetzten STOLL einen aktuellen Bericht der damalig bekannten Knoblauchwirkungen zu erstellen (SEEBECK, 1944). Bereits im darauffolgenden Jahr isolierte er schon die ersten schwefelhaltigen, schwefelfreien und stickstoffhaltigen Fraktionen des Knoblauchs (SEEBECK, 1945a). Um SEEBECK für seine zukünftigen Untersuchungen mit ausreichend Pflanzenmaterial versorgen zu können, wurde veranlaßt, in der Nähe von Basel im Ort Reinach ein firmeneigenes Versuchsfeld von 200 m<sup>2</sup> anzulegen. Dieses sollte ihn mit wenigstens 200 kg



**Abb. 1.3** Dr. Ewald Franz SEEBECK (April 1946). Mit freundlicher Genehmigung von Andi SEEBECK.

## Einleitung

frischen Zinken (Knoblauchzehen) versorgen (KUSSMAUL, 1945). SEEBECK bezeichnete die extrahierte, schwefelhaltige Substanz als Alliin (SEEBECK, 1945a) und übernahm damit den schon Jahrzehnte zuvor durch RUNDQVIST (1909, 1910) verwendeten Begriff. Allerdings hatte dieser eine weniger reine Verbindung vorliegen und war bei der Namensgebung der irrigen Auffassung, es handle sich um ein Glykosid. Der schwedische Forscher beschrieb zudem als erster ein von ihm isoliertes Enzympräparat namens Allisin. Es vermochte anscheinend sein rotbraunes Alliinpulver enzymatisch zu spalten, da er nach dessen Zugabe das Auftreten von Knoblauchgeruch beobachten konnte (SEEBECK, 1945a). SEEBECK wiederholte die Versuche von RUNDQVIST, doch wies sein ebenfalls weißes Fermentpulver keine Aktivität auf. Er nahm an, daß der Geruch auf Spuren von sogenanntem Knoblauchöl (seiner Meinung nach Diallyl-disulfid) zurückginge, da er selbst bei Wasserauflösung von zuvor vollkommen geruchlosen Knoblauchextrakten nach einiger Zeit den markanten Duft wahrnehmen konnte (SEEBECK, 1945a). Die Vermutung über die Beteiligung eines Ferments im Knoblauch wurde 1945 wiederum von CAVALLITO *et al.* in New York betont, als sie die Mitwirkung eines Enzyms bei der Entstehung des von ihnen entdeckten, schwefelhaltigen Allicins aus einem ihnen noch unbekanntem Vorläufermolekül diskutierten. SEEBECK hatte seine Erkenntnisse zum Alliin bislang nicht publiziert und war so im Vorteil, als daß ihm nun neben der Ausgangsverbindung Alliin auch das Produkt Allicin bekannt war. In der Folgezeit konzentrierte SEEBECK sein Engagement neben der Untersuchung weiterer *Allium*-Arten wie Bärlauch (SEEBECK, 1945b) oder Zwiebel (SEEBECK, 1945c) auf die Erforschung der fermentativen Spaltung des geruchlosen Alliins hin zu einem Antibiotikum (SEEBECK, 1946). In Ausgabe 12 der regelmäßig von SEEBECK an STOLL verfaßten *Allium*-Berichte tauchte am 14. April 1947 für das Ferment erstmalig die Bezeichnung Alliinase auf. Noch im gleichen Jahr veröffentlichten STOLL & SEEBECK schließlich in ihrer ersten Publikation zum Thema Knoblauch die Erkenntnisse zu Alliin und Alliinase und schlugen offiziell den Namen Alliinase für das alliinspaltende Enzym des Knoblauchs vor (STOLL & SEEBECK, 1947).

## **1.2 Knoblauch**

### **1.2.1 Zeugnisse der Geschichte**

Die ersten historischen Erwähnungen der Knoblauchs gehen auf die Jahre 2600-2100 vor unserer Zeitrechnung und die sumerischen Völker des Zweistromlandes zurück (KOCH & HAHN, 1988). Allerdings soll eine auf 3000 v. Chr. datierte babylonische Keilschrifttafel auch schon das Rezept für ein Tonikum enthalten haben, dem beachtliche Mengen Knoblauch zugefügt wurden (KOCH & HAHN, 1988). Das zu dieser Zeit bereits als Gewürz- und Heilpflanze domestizierte Gewächs dürfte jedoch von noch viel älteren Hochkulturen des Indus abstammen (KOCH & HAHN, 1988). Von dort breitete sich die Pflanze auch nach Indien, China und Ägypten aus (KOCH & HAHN, 1988). Die in den Lehrbüchern der Sanskrit-Medizin *Ayurveda* (Medizin des Lebens) enthaltenen Sammelwerke der altindischen Ärzte CHARAKA, SUSRUTA und VAGBHATA preisen den Knoblauch (*Mahushuea* genannt) als das Allheilmittel gegen eine Vielzahl von Beschwerden wie z.B. Hautausschlag, Appetitlosigkeit, Verdauungsbeschwerden, Husten, Magersucht, Rheuma, Unterleibserkrankungen, Milzvergrößerung und Hämorrhoiden (KOCH & HAHN, 1988). Mit der indischen Medizin gelangte die Pflanze auch nach Tibet und China, wo sie *Suan* oder *Chia-Suang* genannt wurde. Das indische BOWER-Manuskript (HOERNLE, 1893-1897) beschreibt den Knoblauch als ein Zusatz von Liebestränken (KOCH & HAHN, 1988). Im alten Ägypten waren Knoblauch und Zwiebeln geweihte Pflanzen, wie PLINIUS der Jüngere berichtete (KOCH & HAHN, 1988). Darauf spottete der römische Satiriker JUVENAL, daß die Götter Ägyptens wohl im Gemüsegarten wüchsen (KOCH & HAHN, 1988). Tatsächlich wurden Knollenreste als Grabbeigaben der Pharaonengräber von Assasif bei Theben (SCHWEINFURTH, 1887) und dem bekannten TUTENCHAMUN entdeckt (KOCH & HAHN, 1988). Die gehobene ägyptische Bevölkerung nutzte das Gewächs neben Zwiebeln monatlich in einer dreitägigen Kur als Brech- und Abführmittel zu reinigenden Zwecken (KOCH & HAHN, 1988). Für die 360000 Arbeiter an den Großen Pyramiden sollen über 20 Jahre hinweg Rettiche, Zwiebeln und Knoblauch im Wert von umgerechnet ca. 8,6 Mio € angeschafft worden sein, um sie bei Kräften zu halten, wie HERODOT erzählte (FEIX, 1995). Die Verwendung durch die Ägypter ist auch im *Papyrus Ebers* (EBERS, 1875) belegt, das unter 800 Arzneizubereitungen 22 mit Knoblauch als Zutat enthält. Die nachfolgenden Kulturen der Araber, Griechen und Römer schätzten den Knoblauch u.a. zur Behandlung von Bandwürmern, Schlangenbissen, Schädlingen, Hautausschlag, Menstruationsbeschwerden sowie in der Zahn- und Tiermedizin (KOCH & HAHN, 1988). Die antiken Gelehrten, Schriftsteller und Philosophen ARISTOTELES, HIPPOKRATES, ARISTOPHANES, PYTHAGO-

## Einleitung

RAS, GALENUS und PLINIUS der Ältere würdigten die heilenden und kräftigen Einflüsse der Pflanze in ihren Schriften (KOCH & HAHN, 1988). Bei den Israeliten findet der Knoblauch Erwähnung im Alten Testament: „...Wir gedenken der Fische, die wir in Ägypten umsonst aßen, und [...] des Knoblauchs“ (4. Buch Mose, Kapitel 11, Vers 5). Einer alten Tradition zufolge aßen die Athleten in Olympia frischen Knoblauch vor dem Wettkampf (KOCH & HAHN, 1988). In Griechenland zeigte sich aber auch erstmals eine Abneigung gegen den Knoblauch (dort *σκόροδον* = Skorodon genannt), da der Besuch mancher Tempel, z.B. der Aphrodite, nach dessen Genuß nicht gestattet war (KOCH & HAHN, 1988). Mit steigendem Wohlstand wuchs auch in Rom die Aversion gegen die hier als *Alliinae* bekannte Pflanze für die noble Küche (KOCH & HAHN, 1988). Demgegenüber erhielten die römischen Legionäre ein Eintopfartiges Gericht, das neben vielen anderen deftigen Zutaten auch reichlich Knoblauch enthielt (KOCH & HAHN, 1988). Seit den Griechen und Römern galt die Pflanze in Form von aufgehängenen Knollen oder als bloßes Wandgemälde als Schutz vor bösen Geistern oder Krankheiten und behielt diese Mystifizierung z.T. noch bis in die Gegenwart (KOCH & HAHN, 1988). Eine Verarbeitung findet dieser Aberglauben z.B. in Bram STOKERS Roman *Dracula* (1897), nach dem vom Knoblauch ein für Vampire abschreckender Effekt ausgeht. Eindeutiger zu erklären sind dagegen Beschreibungen aus dem Mittelalter. Als die Große Pest in Europa herrschte, waren z.B. die jüdischen Bewohner Basels von weit weniger Opfern betroffen, da sie regelmäßig Knoblauch konsumierten (KOCH & HAHN, 1988). Jüngere Zeugnisse über die milde antibiotische Wirkung der Lauchgewächse stammen von PASTEUR (1858). Der Tropenarzt Albert Schweitzer behandelte die Amöbenruhr mit dem eingangs erwähntem *Allisatin* (SIMON, 1932). In heutiger Zeit ist der Knoblauch vor allem der Küche und Volksmedizin von Asien, Indien, Frankreich sowie Süd- und Osteuropa vorbehalten. Mit gestiegenem Gesundheitsbewußtsein der Menschen eroberte die Knolle jedoch in den letzten Jahren auch zunehmend die Kochtöpfe der Mittel- und Nordeuropäer. „Unterstützung“ bei einer gesünderen Lebensweise erhalten die Verbraucher durch die vielfältigen Knoblauchprodukte, welche die Pharmaproduzenten auf den Markt bringen.

### **1.2.2 Ursprung des Namens und botanische Einordnung**

Knoblauch heißt auf Lateinisch *Allium sativum* Linné (LINNÉ, 1770). Der Name *Allium* leitet sich wahrscheinlich von *olere* [lat.] = riechen, wegen des strengen Geruchs der Gewächse, ab (KOCH & HAHN, 1988). Möglicherweise ist auch das griechische Wort *ἄλλεσθαι* (hallesthai) für „herausspringen“, womit das gleichzeitige Herausbrechen der Zehen aus einer Knoblauchknolle gemeint ist, der namentliche Ursprung (KOCH & HAHN, 1988). Allerdings

## Einleitung

gibt es auch Hinweise, daß die römische Bezeichnung *Allium* über *alum* (Beinwell) von den altindischen Begriffen *áluh* oder *álukám* abgeleitet wurde. Die altindischen Substantive sind mit „Knolle, eßbare Wurzel“ zu übersetzen (KOCH & HAHN, 1988). Das deutsche Wort ‚Knoblauch‘ entwickelte sich über mehrere Lautverschiebungen aus dem althochdeutschen ‚chlofa-lauh‘ oder ‚chlobilouh‘ und dem altsächsischen ‚clofloc‘ (KOCH & HAHN, 1988). *Allium sativum* fällt unter die Familie der *Alliaceae* in die Ordnung der *Asparagales*. Die Gattung *Allium* umfaßt weit mehr als 600 Arten, die in Europa, Nordamerika, Nordafrika und Asien verbreitet sind (KOCH & HAHN, 1988). Die Wildform des Knoblauchs, *Allium longicuspis*, soll aus der kirgisischen Steppe (REGEL, 1875), die ersten Kulturformen aus Zentralasien (HYAMS, 1971) stammen. Die Art wird in vier Varietäten aufgeteilt: *sativum*, *ophioscorodon*, *longicuspis* und eine subtropische (MAASS & KLAAS, 1995). Die zu den Schuppenzwiebeln zählende Pflanze (Abb. 1.4) bildet ein meist weißlich bis leicht violett gefärbtes Speicherblatt (botanisch keine echte Knolle) aus, welches auf die Größe einer menschlichen Faust heranwachsen kann. In diesem ordnen sich unter wenigen Hüllblättern um die Sproßachse 4-20 Niederblätter (Zehen) auf einer Basalplatte an, von der kurze Wurzeln ausgehen. Am Ende des 30-90 cm langen, vor der Reife mehrfach eingerollten Stiels bilden sich 20-30 kleine sogenannte Brutzwiebeln aus, zwischen denen auch die unfruchtbaren Blüten erscheinen. Die Vermehrung findet dementsprechend meist vegetativ statt (KOCH & HAHN, 1988).



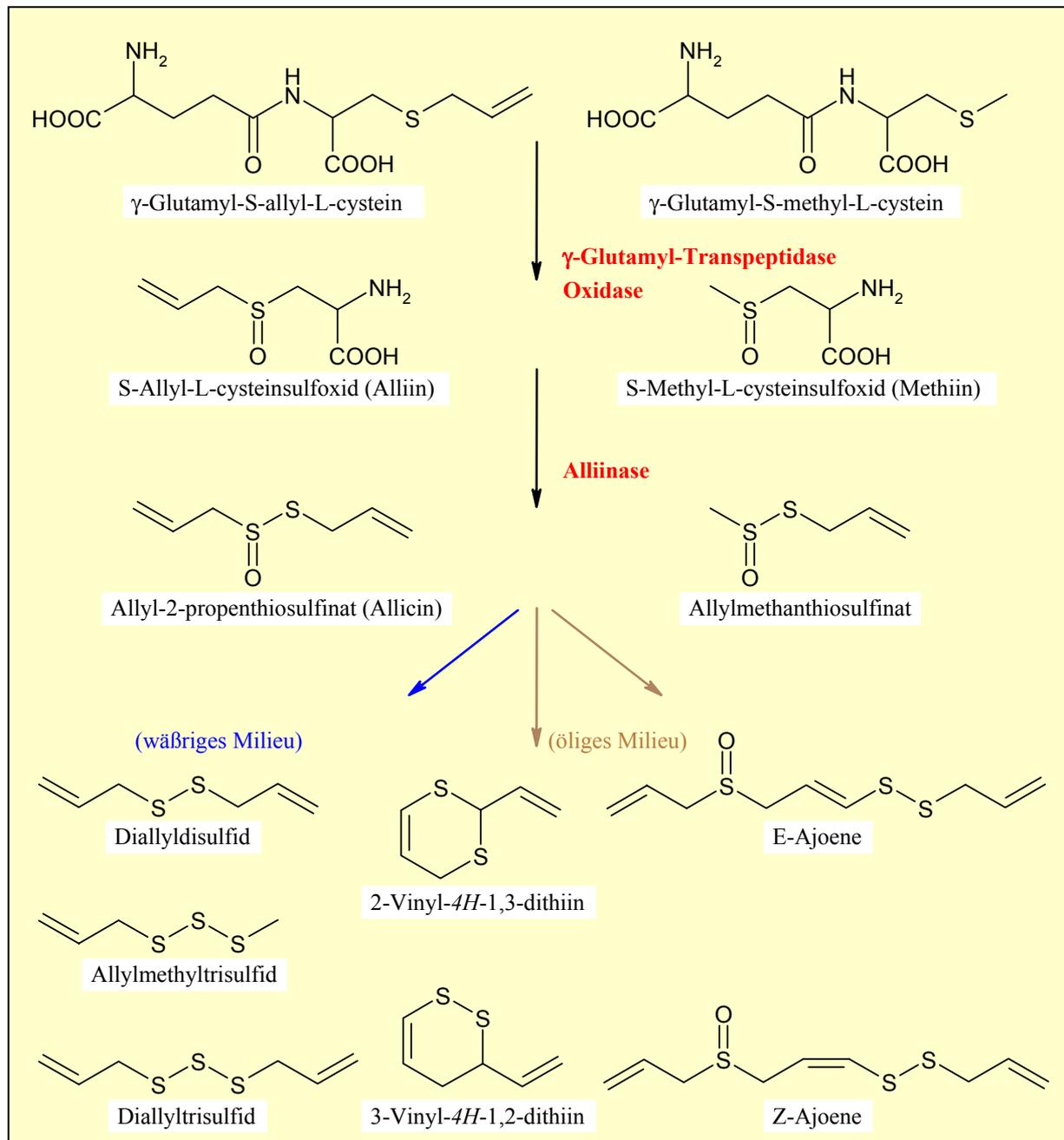
**Abb. 1.4** Deutscher Knoblauch kurz vor der Ernte. Pflanzen aus eigenem Anbau.

### **1.2.3 Inhaltsstoffe**

Der Knoblauch enthält als seine beiden wichtigsten Stoffklassen schwefelhaltige und schwefelfreie Verbindungen. Bekannt ist er jedoch zumeist für seine niedermolekularen Schwefelsubstanzen, zu denen vor allem die  $\gamma$ -L-Glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteine, die S-(+)-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxide und die Thiosulfinate zu zählen sind (Abb. 1.5). Erstere stellen Speicherformen dar, aus denen die Cysteinsulfoxide unter Mitwirkung einer  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase und einer noch nicht identifizierten Oxidase gebildet werden. Die Thiosulfina-

## Einleitung

te entstehen aus den Cysteinsulfoxiden erst bei Verletzen der Knolle und gehen auf die Mit-  
hilfe des Enzyms Alliinase zurück. Als sekundäre Schwefelverbindungen entwickeln sich aus  
den Thiosulfinaten die Di-, Tri- und höhere Alk(en)ylsulfide und im öligen Milieu die cycli-  
schen Vinyldithiine sowie Ajoene (Abb. 1.5) (KOCH & LAWSON, 1996).

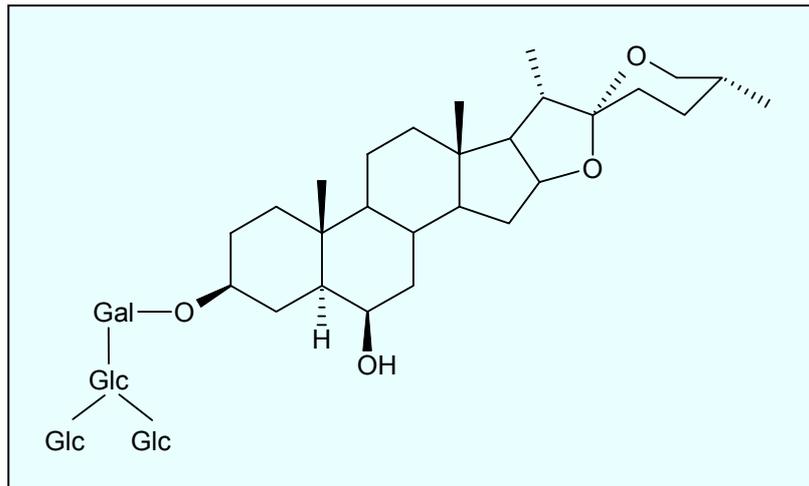


**Abb. 1.5** Schwefelhaltige, von  $\gamma$ -Glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteinen abgeleitete Knoblauchinhaltsstoffe. Aus KOCH & LAWSON, 1996.

Aus der eingangs vorgestellten Klasse der schwefelfreien Knoblauchinhaltsstoffe sollen exemplarisch nur das Arginin als Hauptkomponente der freien Aminosäuren (PARTHASARATHI & SASTRY, 1959), ferner das Erubosid B (Abb. 1.6) als Mitglied der Steroid- und Tri-

## Einleitung

terpenglycoside (Saponine; MATSUURA, 2001) sowie Adenosin und Guanosin herausgegriffen werden. Interessanterweise liegen die letztgenannten Nucleoside in der unverletzten Knoblauchknolle noch nicht vor, sondern treten erst nach dem Aufbrechen zutage. Ihre Freisetzung erinnert daher an das Auftreten von Allicin, mit dem Unterschied, daß sie weitaus langsamer gebildet werden, da ein Maximumspiegel erst nach acht Stunden erreicht wird (KOCH & LAWSON, 1996). Darüber hinaus lassen sich auch Dipeptide des Typs X-Y (X=Ser, Gly, Phe, Asn; Y= Tyr, Phe) aus dem Knoblauch isolieren (SUETSUNA, 1998).



**Abb. 1.6** Erubosid B, ein Saponin aus dem Knoblauch. Aus MATSUURA, 2001.

### 1.2.4 Medizinische Wirkungen

Knoblauch ist mit seinen vielfältigen Inhaltsstoffen zu den pleiotropen Arzneimitteln zu rechnen, welche sich durch multifaktorielle Angriffsorte und Facettenreichtum in ihrem Wirkungsspektrum auszeichnen (SIEGEL *et al.*, 1999). Zu den pharmakologischen Wirkungen gehören Effekte auf das Herz- und Kreislaufsystem, die Wirkung als Antibiotikum, Antioxidantium, Antidiabetikum, Leberschutzmittel oder Schwermetallgegengift, aber auch krebshemmende und immunmodulatorische Eigenschaften.

Zu den Wirkungen auf der Ebene des Herz- und Kreislaufsystems sind die Senkung des Cholesterol- und Triglyceridspiegels, die Erniedrigung des Blutdrucks sowie die Blutgerinnungshemmung zu rechnen (KOCH & LAWSON, 1996; SIEGEL *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 2001). Die fettspiegelsenkenden Eigenschaften werden hauptsächlich dem Allicin zugeschrieben (KOCH & LAWSON, 1996). Darüber hinaus wurde auch von den Saponinen als cholesterolsenkende Substanzen berichtet (MATSUURA, 2001). Zu einer Blutdrucksenkung tragen neben dem enthaltenen Adenosin (KOCH & LAWSON, 1996), welches durch polar-lipophile Substanzen wie Allicin und Alliin besser resorbiert wird, auch die  $\gamma$ -Glutamylcysteine sowie die Dipeptide des Typs X-Y

## Einleitung

(X=Ser, Gly, Phe, Asn; Y= Tyr, Phe) bei (KOCH & LAWSON, 1996; SINGH *et al.*, 2001). Der Blutspiegel des vasodilatatorischen Adenosins wird aufgrund der Hemmung der Adenosindeaminase durch einen bisher nicht identifizierten Knoblauchinhaltsstoff weiter erhöht (KOCH *et al.*, 1992; MELZIG *et al.*, 1995). Die  $\gamma$ -Glutamylcysteine als auch die erwähnten Dipeptide tragen ihrerseits zur Blutdrucksenkung bei, indem sie das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibieren (ELBL, 1991; SUETSUNA, 1998). Die blutgerinnungshemmenden Eigenschaften gehen auf die Inhibition der Blutplättchenaggregation durch z.B. Ajoene und 2-Vinyl-4H-1,3-dithiin zurück (APITZ-CASTRO *et al.*, 1983; BLOCK *et al.*, 1984). Die Bedeutung als Antibiotikum verdankt der Knoblauch vor allem dem Allicin und Ajoene, welche ein ausgesprochen breites Wirkungsspektrum gegenüber gram-positiven und gram-negativen Bakterien der Gattungen *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Salmonella* sowie *Escherichia* aufweisen (HARRIS *et al.*, 2001). Es wird angenommen, daß Allicin durch die Hemmung von cysteinhaltigen Enzymen (RABINKOV *et al.*, 1998; GALLWITZ *et al.*, 1999) und der RNA-Synthese (FELDBERG, *et al.*, 1988) wirkt. Ähnlich weitreichend sind die dokumentierten Fälle zur fungiziden Wirkung von Allicin und Ajoene z.B. auf die humanpathogenen Pilze *Aspergillus fumigatus* [Erreger der Aspergillose], *Candida albicans* [Erreger der Candidiasis] (HUGHES & LAWSON, 1991) und *Cryptococcus neoformans* [Erreger der Cryptococcose] (DAVIS *et al.*, 1990) als auch auf pflanzenschädliche Pilze wie *Alternaria solani* [Erreger der Kartoffel-Dürrfleckenkrankheit], *Colletotrichum sp.* [Erreger der Erdbeerfruchtfäule] oder *Fusaria lini* [Erreger der Flachswelke] (SINGH *et al.*, 1990). Im Bereich der humanpathogenen Protozoen wurde eine starke Hemmung durch Knoblauchinhaltsstoffe wie Diallyltrisulfid, Allicin oder Ajoene bei *Entamoeba histolytica* [Erreger der Amöbendysenterie] (MIRELMAN *et al.*, 1987), *Trypanosoma sp.* (LUN *et al.*, 1994) oder *Plasmodium berghei* (PEREZ *et al.*, 1994) beobachtet. Bei *Trypanosoma cruzi* ließ sich zeigen, daß die Phosphatidylcholinbiosynthese beeinträchtigt wird (URBINA *et al.*, 1993). Zudem wurde mit dem Cysteinrest im aktiven Zentrum der Trypanothionreduktase ein Schlüsselangriffspunkt für Ajoene aufgedeckt (GALLWITZ *et al.*, 1999). Zu den Viren, welche unter Knoblaucheinfluß im Wachstum gestört sind, zählen unter anderem die Influenzaviren A+B (FENWICK & HANLEY, 1985), Cytomegalovirus (FANG *et al.*, 1999), Rhinovirus, HIV, Herpes simplex Virus 1 (TSAI *et al.*, 1985) und 2 (WEBER *et al.*, 1992) sowie Rotavirus (REES *et al.*, 1993). Seitens makroskopischer Erreger ist in der Volksmedizin schon lange bekannt, daß z.B. Haken- und Spulwürmer bei Menschen und Tieren durch regelmäßige Knoblauchgaben überwunden werden können (siehe dazu Referenzen in KOCH & LAWSON, 1996). Weniger bekannt dagegen ist der insektizide Effekt von Knoblauchstoffen, wie am Beispiel des Ajoenes auf die Spinnmilbe gezeigt wurde (SINGH *et al.*, 1996). Neben den, durch äußere Pathogene verursachten Erkrankungen, vermögen die Inhaltsstoffe vor allem von

## Einleitung

„gealtertem“ Knoblauchextrakt - der Wert beruht hier auf der Bildung der Allicinfolgeprodukte - auch manche wenige Krebsformen zu beeinflussen (siehe Referenzen in AGARWAL, 1996; KOCH & LAWSON, 1996). Neben den allgemeinen *in vitro*-Erfolgen bei speziellen Krebszelllinien gibt es auch epidemiologische Beweise zu krebsvorbeugenden Eigenschaften, wie bei einer großen Studie in China (20 g Knoblauch/Tag) zur Verringerung der Magenkrebssterblichkeit auf etwa 9 % der Fälle gegenüber geringerem Knoblauchkonsum eindrucksvoll gezeigt werden konnte (DAUSCH & NIXON, 1990; AGARWAL, 1996). Zu den krebsvorbeugenden Aspekten trägt sicher auch die Erhöhung der Anzahl der natürlichen Killerzellen um 140 % bei, die infolge eines täglichen Konsums von 0,5 g Knoblauch je kg Körpergewicht über drei Wochen hinweg beobachtet wurde (KANDIL *et al.*, 1987). Einfluß dürften auch die antioxidativen Merkmale des Knoblauchs bei der Krebsentstehung nehmen, wie sie z.B. in Form verringerter Peroxid- sowie erhöhter Glutathionspiegel und gesteigerter Superoxiddismutase- sowie Katalaseaktivität in den Geweben zum Ausdruck kommen (SHEELA & AUGUSTI, 1995). Ferner entstehen in Blut und Leber aus dem Allicin und den Allylsulfiden das Allylmercaptan, welches selbst ein starkes Antioxidant darstellt (EGEN-SCHWIND *et al.*, 1992; LAWSON & WANG, 1993). In dem Zusammenhang steht auch die Leberschutzwirkung bei Einwirkung von Toxinen wie z.B. Acetaminophen oder Brombenzol (IQBAL & ATHAR, 1998), deren Neigung zur Radikalbildung durch die antioxidativen Organoschwefelverbindungen des Knoblauchs abgemildert wird (SINGH *et al.*, 2001). Die Bleivergiftungserscheinungen bei Bergarbeitern einer bulgarischen Bleimine ließen sich durch Knoblauchgabe beträchtlich verringern (PETKOV *et al.*, 1965). Auch gegenüber Organoquecksilber- und Cadmiumverbindungen zeigt sich eine vergleichbare Gegengiftwirkung, wie sie von klassischen Verbindungen (z.B. 2,3-Dimercaptobernsteinsäure) bekannt ist (siehe Referenzen in KOCH & LAWSON, 1996). Ein weiteres und in der Volksmedizin bereits lang bekanntes Feld der Knoblauchwirkungen umfaßt die Behandlung des leichten Diabetes. So zeigte sich bei Diabetespatienten, welche täglich 10-15 g der frischen Alliumpflanze (MAHLER & PASTERNY, 1924) oder 800 mg Alliin/Allicin in Form von Knoblauchpulvertabletten (KIESEWETTER *et al.*, 1991) zu sich nahmen, eine signifikante Abnahme des Blut- und Urinzuckerspiegels. Zuletzt sei noch eine weitere volksmedizinisch relevante Wirkung des Knoblauchs angesprochen. Es wird erzählt, daß regelmäßiger Konsum der Pflanze zu einer Erhöhung bzw. Aufrechterhaltung der Potenz beitragen kann. Der Effekt beruht wahrscheinlich auf dem hohen Gehalt an Arginin, aus dem durch NO-Synthase vermehrt NO freigesetzt wird und zur besseren Durchblutung verantwortlicher Blutgefäße führt.

## **1.3 Alliinase**

### **1.3.1 Verbreitung**

Alliinase hat bisher maßgeblich durch die Pflanzengattung *Allium* Bekanntheit erlangt. Das hier ubiquitär anzutreffende Enzym wurde außer in *A. sativum* [Knoblauch] (Knolle: STOLL & SEEBECK, 1947; Wurzel: DOKEN *et al.*, 2001) auch in *A. chinense* [Rakkyo] (TSUNO, 1958), *A. cepa* [Zwiebel] (Knolle: SCHWIMMER *et al.*, 1960; Blatt: CLARK, 1993; Wurzel: LANCASTER *et al.*, 2000a), *A. porrum* [Porree] (WON & MAZELIS, 1989), *A. fistulosum* [Winterzwiebel] (FUJITA *et al.*, 1990), *A. ascalonicum* [Schalotte] (VAN DAMME *et al.*, 1992), *A. ursinum* [Bärlauch] (LANDSHUTER *et al.*, 1994), *A. tuberosum* [Chinesischer Schnittlauch] (MANABE *et al.*, 1998), *A. giganteum* [Riesenlauch], *A. wakegi* [Wakegi] (KAMINISHI *et al.*, 1999), *A. schoenoprasum* [Schnittlauch] (DOKEN *et al.*, 2001), *A. jesdianum*, *A. hymenorrhizum*, *A. obliquum*, *A. saxatile*, *A. sphaerocephalon* [Kugellauch], *A. stipitatum*, *A. subhirsutum*, *A. victorialis* [Lange Siegwurz] (KREST *et al.*, 2000), *A. altynolicum*, *A. chevsuricum*, *A. globosum*, *A. senescens* (KEUSGEN *et al.*, 2002) gefunden.

Darüber hinaus konnten Alliinasen bei Pflanzen wie einigen *Brassicaceae* (MAZELIS, 1963), *Thulbahia violacea* [Zimmerknoblauch] (JACOBSON *et al.*, 1968), aus Chile stammenden Zierpflanzen der Gattung *Leucocoryne* (LANCASTER *et al.*, 2000b) sowie *Oryza sativa* [Reis] (YU *et al.*, 2002; GOFF *et al.*, 2002) identifiziert werden. Jedoch ist die Verbreitung nicht auf das Pflanzenreich beschränkt, wie die Berichte von Alliinasen in Mikroorganismen wie *Bacillus subtilis* (MURAKAMI, 1960) oder *Penicillium corymbiferum* (DURBIN & UCHTYTILL, 1971) beweisen.

Des weiteren wurden alliinaseähnliche Enzyme z.B. aus Pflanzen wie *Acacia lophanta* (SCHWIMMER & KJÆR, 1959), *Brassica oleracea* var. *botrytis* [Brokkoli] (HAMAMOTO & MAZELIS, 1963) und *Acacia farnesia* [Cassia-Blütenöl] (MAZELIS & CREVELING, 1975) als auch aus Mikroorganismen und Pilzen wie *Pseudomonas cruciviae* (NOMURA *et al.*, 1962), *Lentinus edodes* [Shiitake-Pilz] (IWAMI & YASUMOTO, 1980) und *Mucor javanicus* (KITAMURA *et al.*, 1997) isoliert. Diese Enzyme zeigen ein erweitertes Substratspektrum, das sie von den „echten“ Alliinasen abgrenzt. Die Autoren zollen diesem Umstand zumeist schon durch die Einordnung in andere Enzymklassen Rechnung.

### **1.3.2 Zelluläre Lokalisierung und Funktion**

10-12 % des Gesamtproteingehalts des Knoblauchs entfallen auf die Alliinase, welche konzentriert in den parenchymatischen Zellen der Leitbündelscheide vorliegt (ELLMORE &

## Einleitung

FELDBERG, 1994). Diese Zellen enthalten viel granuläre Vakuolen, welche als Lagerstätten für ein 40 kDa-Protein, vermutlich die Alliinase, identifiziert wurden (ELLMORE & FELDBERG, 1994). Im Zusammenhang mit dieser intrazellulären Form der Sekretion könnte die auf der Ebene der Aminosäuresequenz nachgewiesene Existenz einer zum epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) ähnlichen Domäne stehen (KÜTTNER, 1999). Die Substrate der Alliinase, die S-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxide (z.B. Alliin), werden bei *Allium sativum* nur im Cytosol der Speichermesophyllzellen, jedoch nicht in direkter Nähe zum Leitbündel vorgefunden (KOCH & LAWSON, 1996). Sie sind so dem direkten Zugriff und der Spaltung durch die Alliinase entzogen. Erst mit dem Aufbrechen oder Verletzen der Pflanze treten beide Partner in Kontakt, und die enzymatische Reaktion, verbunden mit der Bildung der Spaltprodukte, kann ablaufen. Diese strikte Kompartimentierung der Reaktionspartner legt den Schluß nahe, daß das Alliin-Alliinasesystem die primitive Form eines pflanzlichen Verteidigungsmechanismus gegen Parasiten und Pathogene ist (ELLMORE & FELDBERG, 1994; BLOCK, 1992 und siehe Referenzen dort). Die Bedeutung des Enzyms für den Knoblauch wird durch die Tatsache unterstrichen, daß es über den gesamten Lebenszyklus hinweg auf hohem Level exprimiert wird. Auch die absterbenden Knollen am Ende der Vegetationsperiode enthalten weiterhin Alliinase. Demzufolge können Anteile des Enzyms in die umgebenden Erdbereiche gelangen und so den sich neu entwickelnden Knollen zusätzlichen Parasitenschutz gewähren (SMEETS *et al.*, 1997b).

Eine völlig neue Sichtweise der physiologischen Alliinasefunktion warf die Beobachtung von LANCASTER *et al.* (2000c) auf. Nach dieser weist die Alliinase von auf schwefelarmen Böden wachsenden Zwiebeln eine um bis zu 1,3-1,7fach höhere spezifische Aktivität auf wie die aus Vergleichspflanzen von sonst identischem, aber schwefelreichem Kultursubstrat. Es ist bekannt, daß unter Schwefelmangel die Expression von Enzymen zur Schwefelaufnahme und -wiedergewinnung ansteigt (siehe Referenzen in LANCASTER *et al.*, 2000c). Angesichts der bei niedrigem Bodenschwefelgehalt absinkenden Konzentrationen von S-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxiden (ACSO) in Zwiebeln (RANDLE *et al.*, 1995) wird für die Alliinase eine endogene Rolle zur Remobilisierung von Schwefel aus ACSO vermutet (LANCASTER *et al.*, 2000c).

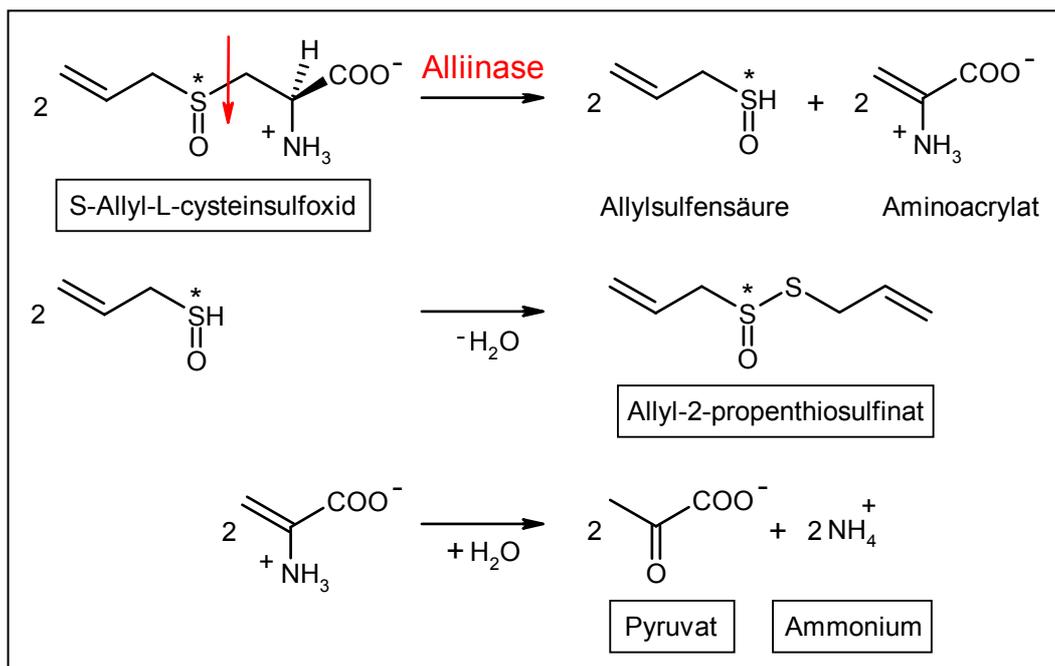
### **1.3.3 Biochemische Eigenschaften der Knoblauch-Alliinase**

Die S-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxidlyase (E.C. 4.4.1.4), auch unter der Bezeichnung Alliinlyase oder Alliinase bekannt, gehört zur Familie der Pyridoxal-5'-phosphat(PLP)-abhängigen Enzyme, wie bereits GORYACHENKOVA 1952 bewies. Die physiologische Form der

## Einleitung

Alliinase ist ein Homodimer (NOCK & MAZELIS, 1986) mit Monomeren von jeweils 448 Aminosäureresten und einem Molekulargewicht von circa 51,5 kDa (VAN DAMME *et al.*, 1992). Der Kofaktor PLP ist kovalent mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lys<sup>251</sup> (KITAMURA *et al.*, 1997) in Form einer Schiff'schen Base verbunden und verleiht der Enzymlösung die charakteristische gelbe Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 430 nm (KAZARYAN & GORYACHENKOVA, 1978).

Die Alliinase katalysiert als C <sub>$\beta$</sub> -S <sub>$\gamma$</sub> -Lyase die  $\alpha,\beta$ -Elimination an S-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxiden (Abb. 1.7). Als Reaktionsprodukte entstehen Aminoacrylat und S-Alk(en)ylsulfensäure. Das Aminoacrylat wird nichtenzymatisch zu Ammonium und Pyruvat dialysiert, während die S-Alk(en)ylsulfensäuremoleküle spontan zu Alk(en)ylthiosulfinaten kondensieren (Abb. 1.7) und zu flüchtigen, geruchsintensiven, niedermolekularen Organoschwefelverbindungen weiterreagieren (BLOCK, 1992). Möglichweise existiert ein separates Enzym, das die Kondensation der S-Alk(en)ylsulfensäuremoleküle vermittelt, da die reale Kondensationsgeschwindigkeit 10fach über dem theoretischen Wert liegt (LAWSON & HUGHES, 1992).



**Abb. 1.7** S-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxidlyase-Reaktion. Gezeigt am Beispiel des Umsatzes von S-Allyl-L-cysteinsulfoxid (Alliin) zu Allyl-2-propenthiosulfinat (Allicin). \* symbolisiert ein chirales Schwefelatom.

Als geeignete Substrate sind S-Methyl-, S-Ethyl-, S-Propyl- und S-Allyl-L-cysteinsulfoxid zu nennen (STOLL & SEEBECK, 1949; MAZELIS & CREWS, 1968). Liegt der Schwefel in besagten Cysteinderivaten nicht als Sulfoxid vor, so ist keine Spaltung zu verzeichnen (STOLL & SEEBECK, 1949). Darüber hinaus bevorzugt das Enzym die (+)-Stereoisomere der

## Einleitung

Sulfoxide gegenüber den entsprechenden (-)-Konfigurationen (STOLL & SEEBECK, 1951). Genaue Untersuchungen im Falle des Alliins (S-Allyl-L-cysteinsulfoxid) ergaben, daß (-)-Alliin etwa vier- bis fünfmal langsamer umgesetzt wird als das (+)-Isomer (KREST & KEUSGEN, 1999a; KREST *et al.*, 2000). Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit wird für Alliin, das natürliche Hauptsubstrat, erreicht. Danach folgen S-Ethyl-, S-Methyl-, S-Butyl- und S-Propyl-L-cysteinsulfoxid (MAZELIS & CREWS, 1968). Demgegenüber inhibieren die nicht als Sulfoxid vorliegenden Cysteinverbindungen mit S-t-Butyl-L-cystein am stärksten, schwächer mit S-Propyl-, S-Ethyl- und S-Allyl-L-cystein und schließlich kaum noch in Form des S-Methyl-L-cysteins (JANSEN *et al.*, 1989b). Die Inaktivierung des PLP-Kofaktors wird auch durch allgemein gegen die Schiff'sche Base gerichtete Inhibitoren wie z.B.  $\beta$ -Cyano-L-alanin, Carboxymethoxylamin, Hydroxylamin, L-Cystein und Cycloserin erreicht (KAZARYAN *et al.*, 1979). Diese Komponenten wirken als Suizidsubstrate und bilden z.T. irreversible, zyklische Addukte aus (BRAUNSTEIN & GORYACHENKOVA, 1984).

Die Alliinase ist ein mesophiles Enzym, das im Temperaturbereich von 30-35 °C seine größte Spaltaktivität an Alliin bzw. S-Ethyl-L-cysteinsulfoxid entfaltet (JANSEN *et al.*, 1989a). Die unterschiedliche Temperatursensitivität der Alliinase zur Freisetzung der von Alliin, 1-Propenyl-L-cysteinsulfoxid (Isoalliin) oder Methyl-L-cysteinsulfoxid (Methiin) abgeleiteten S-Alk(en)ylthiosulfinate brachte LAWSON & HUGHES (1992) auf die Idee, von der Existenz zweier Isoenzyme in der Knoblauchknolle auszugehen, isoliert wurden sie bisher noch nicht. Eines spaltet nach ihrer Auffassung vornehmlich Alliin und Isoalliin, ist bei 60 °C stabil und katalysiert im pH-Bereich pH 4,5-5 am effizientesten. Hingegen soll ein zweites Enzym eher das Methiin bevorzugen, Hitzesensitivität bei 60 °C aufweisen und vorzugsweise im neutralen Milieu (pH 6,5-7) hochaktiv sein. Auch LAWSON & WANG (1994; in KOCH & LAWSON, 1996) beobachteten einen Temperatureinfluß auf das Bildungsverhältnis verschiedener S-Alk(en)ylthiosulfinate aus frischem, im ganzen erhitzten oder naturbelassenem Knoblauch. Jedoch räumten LAWSON & HUGHES (1992) auch die Möglichkeit ein, daß die beiden Aktivitäten von einem einzigen Enzym stammen könnten, welches während der Reinigung aus Knoblauchtrockenpulver eventuelle Kofaktoren verlor.

Tatsächlich wird, entgegen vorheriger Ausführungen, z.B. für das pH-Optimum der Alliinasereaktion in der Literatur wiederholt der Wert pH 6,5 genannt (MAZELIS & CREWS, 1968; JANSEN *et al.*, 1989a; RABINKOV *et al.*, 1994), nahe dem Isoelektrischen Punkt (IEP) von pH 6,35 (RABINKOV *et al.*, 1994). Allerdings berichten JANSEN *et al.* (1989a) bei ihrer Knoblauch-Alliinase von einem IEP von pH 4,9. Zudem zeigt ihre Enzympräparation eine Verschiebung des Extinktionsmaximums nach 419 nm. Die Autoren weisen ferner auf das

## Einleitung

Vorliegen eines zweiten Kofaktors (Flavin) hin, dessen Existenz von anderen Gruppen noch nicht bestätigt werden konnte.

Ebensowenig verifiziert wurden die Beobachtungen von MAZELIS & CREWS (1968), nach denen die Alliinaseaktivität um bis 35 % durch die Anwesenheit von Metallionen ( $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  und  $Co^{2+}$ ) stimuliert wird. Unterstützung fand indes der durch KREST & KEUSGEN (1999b) gefundene Stabilisierungseffekt, der von NaCl auf die Enzymaktivität ausgeht. So zeigt sich für NaCl auch ein positiver Einfluß zur Aufrechterhaltung der Dimerkonstitution (KÜTTNER, 1999).

Übereinstimmende Erkenntnisse, mit Ausnahme der von JANSEN *et al.* (1989a) isolierten Alliinase mit zusätzlichem mutmaßlichen Flavinkofaktor, herrschen über den Charakter der Alliinase als Glykoprotein. Der Grad der Glykosylierung wird mit 5,5-6 % angegeben (NOCK & MAZELIS, 1986; RABINKOV *et al.*, 1994). Von den auf Sequenzebene vorliegenden, vier möglichen N-Glykosylierungsstellen ( $Asn^{19}$ ,  $Asn^{146}$ ,  $Asn^{191}$ ,  $Asn^{328}$ ; VAN DAMME *et al.*, 1992) werden nur zwei *in vivo* tatsächlich genutzt (SMEETS *et al.*, 1997a), wobei  $Asn^{146}$  bereits bestätigt wurde (RABINKOV *et al.*, 1995). Berichten von NOCK & MAZELIS (1987) zufolge bestehen die Glykane zu einem großen Teil aus Mannose- (43 %) und Glucoseeinheiten (34 %).

Der hohe Mannoseanteil der Glykosylreste würde erklären, weshalb sich bei der Reinigung aus frischem Knoblauch neben freier Alliinase auch ein Komplex mit dem mannosebindenden Knoblauchlektin *Allium sativum*-Agglutinin I (ASA-I) isolieren läßt. Der 1:1-Komplex enthält je Alliinasemonomer ein Lektinheterodimer mit einem Molekulargewicht von 25 kDa (12,5 + 11,5 kDa) (RABINKOV *et al.*, 1995; SMEETS *et al.*, 1997a). Das Lektin liegt in der intakten Knoblauchzehe noch getrennt vom Enzym in den Kortikalzellen rund um die Leitbündelscheide vor. (WEN *et al.* identifizierten 1995 unter denaturierenden Bedingungen ein 14 kDa-Protein, bei dem es sich vermutlich um die monomere Form des Lektins handelt). Folglich wird erst nach Zellaufschluß der Komplex aus Alliinase und Lektin gebildet. Das Addukt ist zeitlich deutlich stabiler als freie Alliinase und trägt auf diesem Wege neben den für mannosebindende Lektine aus Monocotyledonen bekannten insektiziden Eigenschaften (HILDER *et al.*, 1995; POWEL *et al.*, 1995; RAHBÉ *et al.*, 1995) auch zur längeren Aufrechterhaltung der Alliinasereaktion mit ihrer antimikrobiellen Abwehrfunktion bei (PEUMANS *et al.*, 1997). Aus der Kristallstruktur von ASA-I (CHANDRA *et al.*, 1999; RAMACHANDRAIAH *et al.*, 2002) sind drei unterschiedliche Mannosebindungsstellen bekannt, die zur Erklärung von stabilen kreuzverzweigten Alliinase-Lektin-Netzwerken (SMEETS *et al.*, 1997a) dienen können. Allerdings bliebe eine Mannosebindungsstelle des Lektins unter der Voraussetzung, daß

## Einleitung

die zwei verschiedenen Glykosylreste der Alliinase speziell durch eine andere Mannosebindungsstelle des ASA-I erkannt werden, unbesetzt (SMEETS *et al.*, 1997a). Dabei ist zu vermerken, daß für die lektinkomplexierte Alliinase ein durchaus höherer Glykosylierungsgrad vermutet wird bzw. der Funktion des Komplexes nicht übermäßig Bedeutung zugemessen werden sollte, da es sich möglicherweise auch nur um ein Reinigungsartefakt handeln könnte (SMEETS *et al.*, 1997a). Das parallele Vorliegen beider Proteine, Alliinase und ASA-I, im Nektar von *Allium porrum* [Porree] (PEUMANS *et al.*, 1997) widerspricht jedoch dieser Theorie. Interessanterweise sind die Honigbienen als Insekten resistent gegen den toxischen Alliinase-Lektin-Mix, welcher fast die gesamten Nektarproteine ausmacht, und vermögen ihn vollständig in Honig umzuwandeln (PEUMANS *et al.*, 1997). Das menschliche Verdauungssystem ist hingegen nicht in der Lage, Alliinase und Lektin komplett abzubauen, da für beide Proteine Antikörper im Blut nachgewiesen wurden (TSCHERNYCHEV *et al.*, 1995). Dies ist um so erstaunlicher, da die Alliinase unterhalb von pH 3,5 denaturiert wird (LAWSON & HUGHES, 1992) und die Magen-Darm-Passage nicht unbeschadet überstehen sollte. Das mit <sup>156</sup>SKVVAH<sup>161</sup> identifizierte Erkennungsepitop des Alliinaseantikörpers liegt ausgesprochen nahe der Glykosylierungsstelle Asn<sup>146</sup>. Daher wird vermutet, daß auch der Glykosylrest an der Epitopbildung beteiligt ist (TSCHERNYCHEV *et al.*, 2000).

### **1.3.4 Vergleich der Alliinasen**

Die bisher aus verschiedenen Organismen isolierten (siehe Kapitel 1.3.1) und biochemisch näher charakterisierten Alliinaseenzyme lassen den Schluß zu, daß es innerhalb der Alliinasen zwei Gruppen von Enzymen gibt, die sich im Hinblick auf das pH-Optimum, der Einflußnahme durch Metallionen sowie des Oligomerisierungsstatus unterscheiden (JACOBSON *et al.*, 1968; MAZELIS, 1993). Zur Gruppe I lassen sich die Vertreter aus *Allium chinense*, *A. odorum*, *A. sativum*, *A. ursinum* sowie *Tulbaghia violacea* und zur Gruppe II die Alliinasen aus *A. cepa*, *A. fistulosum*, *A. porrum*, *A. tuberosum* und *Brassica oleracea* var. *pompejana* zählen (Tab. 1.1). Die Mitglieder ersterer Fraktion weisen pH-Optima im sauren bis neutralen Milieu (pH 5,6-7) auf, hingegen zeigen die Angehörigen der zweiten Gruppe eher in neutraler bis alkalischer Lösung (pH 7-8,6) die höchsten Aktivitäten. Ferner besteht im Falle der Gruppe II-Alliinasen die Tendenz zu größeren physiologischen Aggregatformen wie Tetra- oder Oktameren, wogegen bei den Gruppe I-Enzymen bislang nur von Di- oder Trimeren berichtet wurde.

Die Vorstellung der Existenz eines einzelnen Alliinaseenzym bzw. nur in wenigen Aminosäureresten unterschiedlichen Isoformen innerhalb einer *Allium*-Spezies, wie sie auf-

## Einleitung

grund von cDNA-Isoformen in *A. sativum* vermutet wurde (VAN DAMME *et al.*, 1992; RABINKOV *et al.*, 1994, MANABE *et al.*, 1998), ist klar mit der Entdeckung einer wurzelspezifischen Alliinase in *A. cepa* (LANCASTER *et al.*, 2000a) widerlegt worden. Diese zeigt nur etwa 53 % Sequenzidentität zum verwandten, knollenexprimierten Enzym und weist zusätzlich eine schwache, bis dato nicht für Alliinasen berichtete Spaltaktivität an Cystin auf. Auch das genannte Enzym der Zwiebelknolle weicht mit der von ihm berichteten Cystein-S-Derivat- $\beta$ -Lyaseaktivität (KITAMURA *et al.*, 1997) an S-(2-Chloro-6-nitrophenyl)-L-cystein von der sonst strikten Cysteinsulfoxidspaltaktivität der Alliinasen ab. Kürzlich wurde in der SWISS-PROT-Datenbank (O'DONOVAN *et al.*, 2002) ein unvollständiger Sequenzeintrag einer Alliinase aus der Wurzel von *A. sativum* veröffentlicht (Q94EJ9; DOKEN *et al.*, 2001). Bereits RABINKOV *et al.* (1994) erkannten, daß es eine wurzelständige Alliinase in *A. sativum* geben muß, die im Sinne des Knollenenzym vergleichbare Aktivität zeigt aber durch spezifische Antikörper gegen die Knollenalliinase nicht markiert werden konnte.

Innerhalb der *Allium*-Alliinasen herrscht, soweit berichtet, eine hohe Sequenzidentität. So besteht zwischen dem Enzym aus *A. sativum* und dem aus *A. cepa* bzw. *A. ascalonicum* eine 88%ige Identität in der Primärstruktur, die mit 98 % innerhalb der beiden letzten Arten noch höher ausfällt (VAN DAMME *et al.*, 1992). Eine geringere Identität wurde bei der Alliinase aus *A. tuberosum* vorgefunden (MANABE *et al.*, 1998). Sie beträgt zu den Enzymen aus *A. sativum* 64 % und *A. cepa* bzw. *A. ascalonicum* 69 %. Noch geringere Sequenzidentität ist bei der schon erwähnten Wurzelalliinase aus *A. cepa* gegeben, die nur etwa 50 % gleiche Aminosäuren mit den Knollenenzymen aus *A. sativum*, *A. cepa*, *A. ascalonicum* aufweist. Darüber hinaus liegen in der SWISS-PROT-Datenbank (O'DONOVAN *et al.*, 2002) weitere Einträge von Alliinasesequenzen anderer Spezies vor, die noch keinen Eingang in die internationale Literatur und Diskussion fanden. Darunter befinden sich neben partiellen Sequenzen anderer *Allium*-Arten wie *A. fistulosum* (ID: Q94EJ8), *A. schoenprasum* (ID: Q94EK1, Q9SW81, Q9XGT6), *A. chinense* (ID: Q94EK4, Q9LKP6), *A. wakegi* (ID: Q94EK5, Q9XFH5), *A. giganteum* (ID: Q9SW84) auch die vollständigen Einträge von Reis (ID: Q942G4, Q942G1) oder *Arabidopsis thaliana* (ID: Q9FE98).

## Einleitung

**Tab. 1.1** Einteilung von *Alliin*asen nach ihren *pH-Optima*. (JACOBSON *et al.*, 1968; MAZELIS, 1993; ergänzt um neue Beispiele.)

Gruppe	Spezies	pH-Optimum (Puffer)	UE <sup>a</sup>	M <sup>2+</sup> -abhängig	Referenz	
I	<i>Allium chinense</i>	5,6-6,5 (Acetat-Phosphat-Bellonard)	k.A. <sup>b</sup>	Mg	TSUNO, 1958	
	<i>Allium odorum</i>	5,6-6,5 (Acetat-Phosphat-Bellonard)	k.A.	---	TSUNO, 1958	
	<i>Allium sativum</i>	5-8 (Citrat; Phosphat; Borat)	k.A.	k.A.	STOLL & SEEBECK, 1949	
		6,5 (Phosphat)	2	Mg, Fe, Mn, Co	MAZELIS & CREWS, 1968	
		6,5 (Phosphat)	2	---	JANSEN <i>et al.</i> , 1989a	
		6,5 (Phosphat)	2	k.A.	RABINKOV <i>et al.</i> , 1994	
		7,0 (Phosphat)	k.A.	k.A.	KREST <i>et al.</i> , 2000	
	<i>Allium sphaerocephalon</i>	7,0 (Phosphat)	k.A.	k.A.	KREST <i>et al.</i> , 2000	
	<i>Allium ursinum</i>	6,0 (Phosphat)	3	Cu, Fe	LANDSHUTER <i>et al.</i> , 1994	
	<i>Penicillium corymbiferum</i>	6,5 (Phosphat)	k.A.	---	DURBIN & UCHYTI, 1971	
	<i>Thulbaghia violacea</i>	6,6 (Phosphat)	k.A.	Cu	JACOBSON <i>et al.</i> , 1968	
	II	<i>Allium cepa</i>	7,4-7,6 (Phosphat, Acetat)	k.A.	k.A.	SCHWIMMER & MAZELIS, 1963
			8,0-8,2 (Tris)	k.A.	k.A.	
8,5-8,8 (Pyrophosphat)			k.A.	k.A.	"	
7,6 (Phosphat)			k.A.	k.A.	"	
8,0 (Tricine)			3	k.A.	MAZELIS & TOBKIN, 1978	
k.A.			4	k.A.	NOCK & MAZELIS, 1987	
k.A.			1,3,6,7	k.A.	CLARK <i>et al.</i> , 1998	
<i>Allium cepa</i> <sub>Wurzel</sub>		(8,0) (Tricine)	1	k.A.	LANCASTER <i>et al.</i> , 2000	
<i>Allium fistulosum</i>		7,0 (Phosphat)	4	k.A.	FUJITA <i>et al.</i> , 1990	
<i>Allium hymenorrhizum</i>		7,5 (Phosphat)	k.A.	k.A.	KREST <i>et al.</i> , 2000	
<i>Allium jesdianum</i>		7,5 (Phosphat)	k.A.	k.A.	KREST <i>et al.</i> , 2000	
<i>Allium obliquum</i>		7,5 (Phosphat)	k.A.	k.A.	KREST <i>et al.</i> , 2000	
<i>Allium porrum</i>		8,0 (Tricine)	8,12	k.A.	WON & MAZELIS, 1989	
		6,1-6,9 (Phosphat, Tris)	2,6	---	LOHMÜLLER <i>et al.</i> , 1994	
<i>Allium saxatile</i>		7,5 (Phosphat)	k.A.	k.A.	KREST <i>et al.</i> , 2000	
<i>Allium stipitatum</i>		7,5 (Phosphat)	k.A.	k.A.	KREST <i>et al.</i> , 2000	
<i>Allium subhirsutum</i>		7,5 (Phosphat)	k.A.	k.A.	KREST <i>et al.</i> , 2000	
<i>Allium tuberosum</i>		6,5-7,0 (Phosphat)	k.A.	k.A.	MANABE <i>et al.</i> , 1998	
		8,0-8,5 (Tris)	k.A.	k.A.	"	
<i>Allium victorialis</i>		7,5 (Phosphat)	k.A.	k.A.	KREST <i>et al.</i> , 2000	
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>pompejana</i>		8,4 (Borat)	k.A.	k.A.	MAZELIS, 1963	
		9,2 (Glycin)	k.A.	k.A.	"	

<sup>a</sup> UE = Untereinheiten im physiologischen Oligomer.

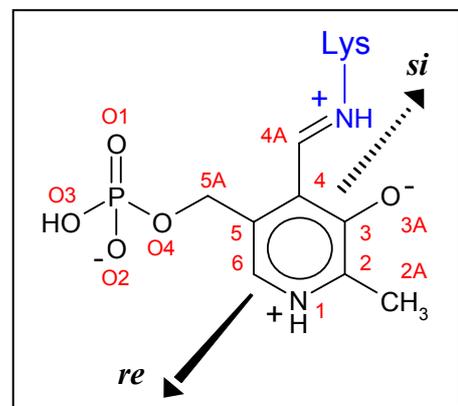
<sup>b</sup> k.A. = keine Angaben zu diesem Punkt im Literaturzitat.

<sup>c</sup> --- = kein Effekt festzustellen.

## 1.4 Pyridoxal-5'-phosphat-abhängige Enzyme

### 1.4.1 Überblick

Die Gruppe der Enzyme, welche das Vitamin-B<sub>6</sub>-Derivat PLP (Abb. 1.8) als Kofaktor nutzen, umfaßt Mitglieder fast aller sechs Enzymklassen. Einzig in der Klasse der Ligasen wurde bislang noch kein PLP-Enzym identifiziert. Die Vielseitigkeit des Kofaktors erlaubt die Katalyse eines Spektrums der unterschiedlichsten enzymatischen Reaktionen, wie Synthese-, Eliminase-, Transferase-, Racemase- oder Mutasereaktionen an Aminosäuresubstraten sowie davon abgeleiteten Verbindungen als auch Reaktionen des Polysaccharidmetabolismus. Der gemeinsame Kofaktor liegt im aktiven Zentrum der Enzyme mit seinem C4A-Atom kovalent gebunden an das N<sub>ε</sub>-Atom eines Lys-Rests des Proteins in Form einer Schiff'schen Base als internes Aldimin vor (Abb. 1.8), welchem die Proteine ihre gelbliche Farbe verdanken (BARANOWSKI *et al.*, 1957; KENT *et al.*, 1958). Das interne Aldimin wird, mit Ausnahme der polysaccharidmetabolisierenden Enzyme, bei der Bindung des Substrates mit seiner C<sub>α</sub>-Aminogruppe durch ein externes Aldimin ausgetauscht, und folglich wird das Lys-N<sub>ε</sub> entlassen. Im nächsten Reaktionsschritt kommt es durch Abspaltung eines der C<sub>α</sub>-Substituenten zur Bildung eines Intermediats, oft ein Chinon, das als Verzweigungspunkt für den weiteren Reaktionsverlauf und die Diversität der PLP-katalysierten Reaktionen verantwortlich ist (Abb. 1.9; SCHNEIDER *et al.*, 2000).



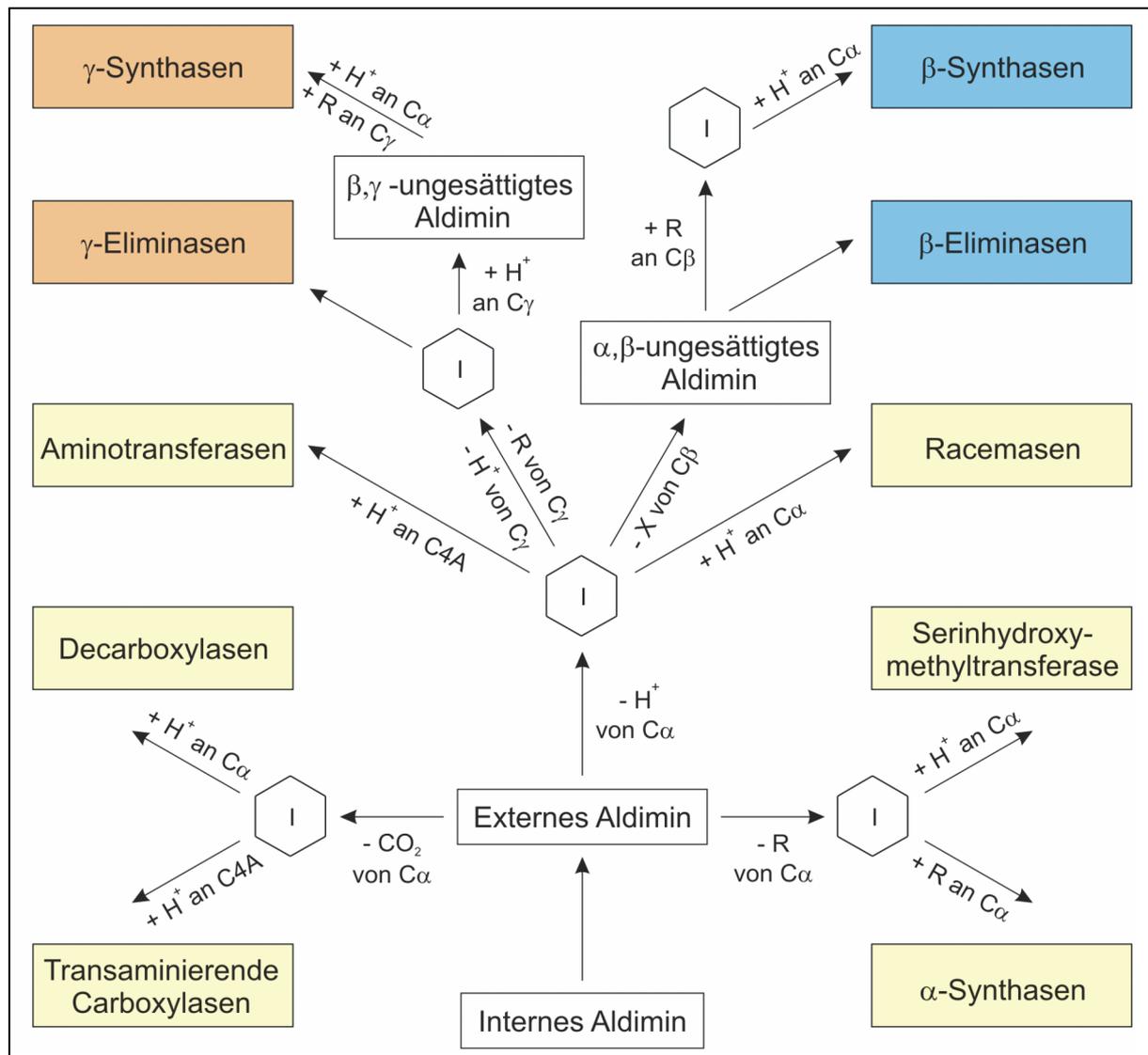
**Abb. 1.8** PLP als internes Aldimin mit dem Enzym. PLP = schwarz mit roten Atomnummern, blau = Enzym. Pfeile markieren die Molekülseiten (*re/si*).

### 1.4.2 Klasseneinteilung

Ein Vergleich und der Versuch der Einteilung der PLP-Enzyme erfolgte zunächst nach dem an der Reaktion beteiligten Kohlenstoffatom des Substrates ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Klassen; Abb. 1.9), wobei in Bezug auf die Sequenz eine entfernte Verwandtschaft zwischen der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Gruppe auffiel (ALEXANDER *et al.*, 1994). Die zunehmende Zahl aufgeklärter PLP-Proteinkristallstrukturen erlaubte es später, die Klassifizierung nach der dreidimensionalen Struktur fortzusetzen. Auf dieser Basis lassen sich fünf verschiedene Familien, benannt nach ihren jeweiligen Erstmitgliedern, mit zur Zeit mindestens 50 verschiedenen Strukturen unterscheiden (Tab. 1.2): I. →  $\alpha$ -Familie bzw. Aspartat-Aminotransferase (AAT)-Familie, II. →  $\beta$ -Familie bzw. Tryptophan-Synthase- $\beta$ -Untereinheit (TrpS $\beta$ )-Familie, III. → Alanin-Racemase (AlaR)-Familie,

## Einleitung

IV. → D-Alanin-Aminotransferase- bzw. D-Aminosäure-Aminotransferase (DAAT)-Familie und V. → Glykogen-Phosphorylase (GP)-Familie (GRISHIN *et al.*, 1995; JANSONIUS, 1998; SCHNEIDER *et al.*, 2000, CHRISTEN & MEHTA, 2001).



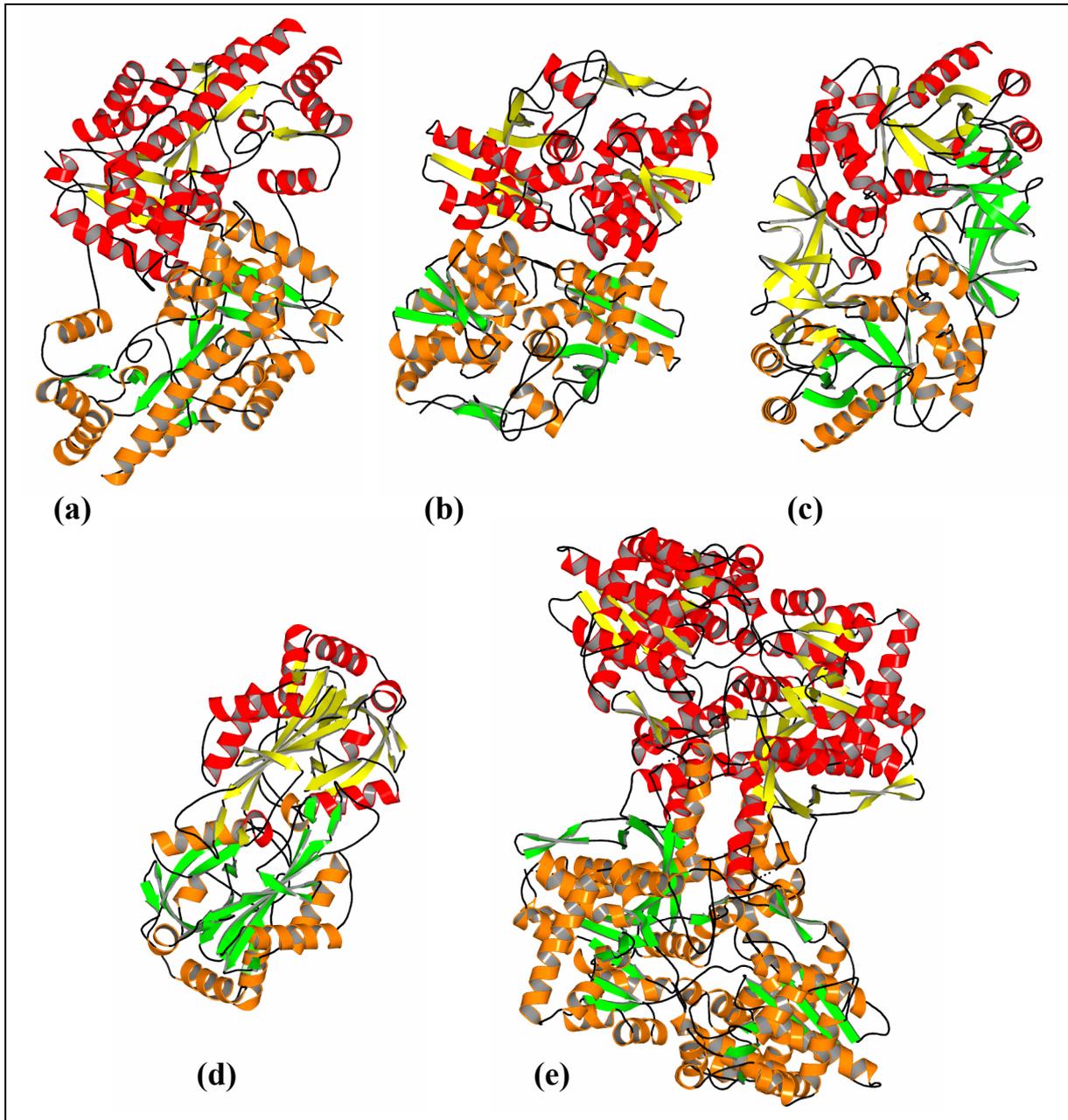
**Abb. 1.9** Reaktionsdiversität PLP-abhängiger Enzyme, deren Katalyse über ein externes Aldimin verläuft. Die Klassen sind nach den reaktiven C-Atomen farblich codiert dargestellt: gelb = C<sub>α</sub> (α-Klasse), blau = C<sub>β</sub> (β-Klasse), orange = C<sub>γ</sub> (γ-Klasse). „I“ verdeutlicht intermediäre Reaktionszustände, z.B. ein Chinon. Nach SCHNEIDER *et al.*, 2000.

### 1.4.2.1 Aspartat-Aminotransferase-Familie

Die zur Zeit umfangreichste Faltungsfamilie I (AAT) umfaßt Proteinstrukturen von 39 verschiedenen Enzymen, welche vorwiegend als „S“-förmige Homodimere (Abb. 1.10a), in manchen Fällen auch als größere Aggregate, katalytisch aktiv sind (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Ihre Untereinheiten besitzen als gemeinsame Domänen die zentrale, kofaktorbindende Domäne mit einem gemischten siebensträngigen β-Faltblatt, das beidseitig von α-Helices flankiert

## Einleitung

wird, sowie eine kleinere C-terminale Domäne, die aus einem drei- bis viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt aufgebaut ist und einseitig von  $\alpha$ -Helices begleitet wird (Abb. 1.11a; SCHNEIDER *et al.*, 2000). Der variable N-terminale Abschnitt, welcher als dritte Domäne zu verstehen ist, trägt z.T. auch zur zentralen bzw. C-terminalen Domäne bei. Ausgehend von der



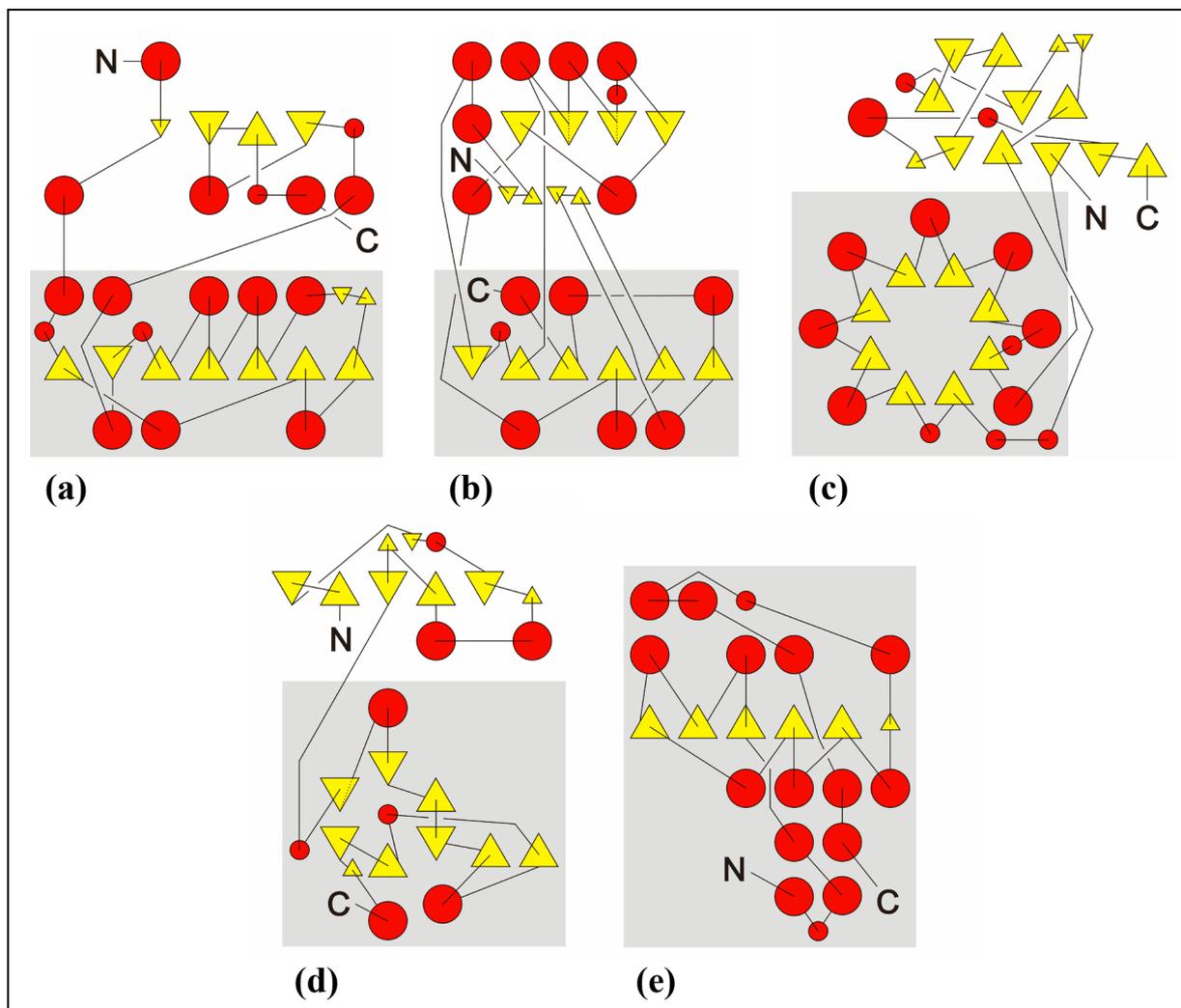
**Abb. 1.10** Dimerdarstellungen der fünf PLP-Enzymfamilien. (a) I. Asp-Aminotransferase [PDB: 1AJS; RHEE *et al.*, 1997], (b) II. Trp-Synthase- $\beta$ -Untereinheit [PDB: 1QOP; WEY-AND & SCHLICHTING, 1999], (c) III. Ala-Racemase [PDB: 1BD0; STAMPER *et al.*, 1998], (d) IV. D-Aminosäure-Aminotransferase [PDB: 3DAA; PEISACH *et al.*, 1998], (e) V. Glykogen-Phosphorylase [PDB: 1H5U; OIKONOMAKOS *et al.*, 2002]. Die Proteinrückgrate mit Blick entlang der zweizähligen Symmetrieachsen sind anhand der Sekundärstruktur je Monomer farbig verschieden wiedergegeben:  $3_{10}$ / $\alpha$ -Helices = rot (orange),  $\beta$ -Faltblattstränge = gelb (grün), Schleifen = schwarz (gepunktete Bereiche sind nicht im Modell enthalten).

## Einleitung

N-terminalen Domäne konnten die Mitglieder in nunmehr acht Subklassen unterteilt werden (Tab. 1.2; SCHNEIDER *et al.*, 2000). Ein konservierter Aspartatrest im aktiven Zentrum sorgt für die Stabilisierung des Kofaktors über dessen Pyridiniumstickstoff (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

### 1.4.2.2 Tryptophan-Synthase- $\beta$ -Untereinheit-Familie

Die zweite Faltungsfamilie mit TrpS als Prototyp bildet Homodimere oder  $\alpha_2\beta_2$ -Tetramere aus (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Im Falle der Tetramere (TrpS) stellt die  $\beta$ -Untereinheit die katalytische PLP-Domäne dar (Abb. 1.10b), während die  $\alpha$ -Untereinheit regulierend wirkt (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Hingegen weisen die homodimeren Mitglieder entweder die



**Abb. 1.11** Topologiezeichnungen der fünf PLP-Enzymfamilien.  $3_{10}$ / $\alpha$ -Helices sind als rote Kreise und  $\beta$ -Faltblattstränge in Form von gelben Dreiecken symbolisiert. Die PLP-bindenden Domänen sind grau hinterlegt. (a) I: Asp-Aminotransferase [PDB: 1AJS; RHEE *et al.*, 1997]; (b) II: Trp-Synthase- $\beta$ -Untereinheit [PDB: 1QOP; WEYAND & SCHLICHTING, 1999]; (c) III: Ala-Racemase [PDB: 1BD0; STAMPER *et al.*, 1998]; (d) IV: D-Aminosäure-Aminotransferase [PDB: 3DAA; PEISACH *et al.*, 1998]; (e) V: Glykogen-Phosphorylase [PDB: 1H5U; OIKONOMAKOS *et al.*, 2002], nur die PLP-bindende Domäne dargestellt.

## Einleitung

regulative Domäne in der gleichen Untereinheit auf (Threonin-Deaminase) oder sie stehen nicht unter der allosterischen Kontrolle einer Regulator-domäne (O-Acetylserin-Sulfhydrylase, OASS) [SCHNEIDER *et al.*, 2000]. Die Faltung der PLP-bindenden Region umfaßt zwei Domänen: Eine N-terminale Domäne mit einem viersträngigen parallelen  $\beta$ -Faltblatt, das von  $\alpha$ -Helices umgeben ist, und eine C-terminale Domäne, welche aus einem sechssträngigen gemischten  $\beta$ -Faltblatt mit flankierenden  $\alpha$ -Helices besteht (Abb. 1.11b; SCHNEIDER *et al.*, 2000). Die Stabilisierung des Kofaktors über dessen Pyridiniumstickstoff wird von Aminosäuren Serin oder Cystein übernommen (SCHNEIDER *et al.*, 2000; YAMADA *et al.*, 2003). Diese fungieren als Wasserstoffdonatoren in der Wasserstoffbrückenbindung zum Pyridiniumstickstoff und verbieten so dessen Protonierung und folglich chinoide Zwischenzustände (YAMADA *et al.*, 2003).

### **1.4.2.3 Alanin-Racemase-Familie**

Die AlaR-Familie als III. Klasse bildet Homodimere (Abb. 1.10c), deren Monomere aus zwei Domänen aufgebaut sind: Eine PLP-bindende  $(\beta/\alpha)_8$ -Faßdomäne sowie eine hauptsächlich aus  $\beta$ -Strängen bestehende Domäne (Abb. 1.11c, SCHNEIDER *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu den beiden vorigen Familien I und II ist der Kofaktor hier mit seiner *si*-Seite (vergleiche Abb. 1.8) zum Solvent hin gerichtet (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Zur Fixierung des PLP über die N1-Position dient entweder überraschend ein Argininrest (AlaR, hypothetisches Hefeprotein), welcher die Nichtprotonierung des Pyridiniumstickstoffs nahelegt, oder mehr erwartungsgemäß ein Glutamatrest (Ornithin-Decarboxylase; Diaminopimelat-Decarboxylase, DAPDC) (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

### **1.4.2.4 D-Aminosäure-Aminotransferase-Familie**

Die DAAT steht als Beispiel für die vierte Familie, welche Homodimere (DAAT, Abb. 1.10d; 4-Amino-4-deoxychorismat-Lyase) oder -hexamere (Verzweigt-kettige Aminosäure-Aminotransferase) aufweist (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Die N-terminale Domäne wird von einem sechssträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt mit zwei einseitig angelagerten  $\alpha$ -Helices aufgebaut. Die größere zweite C-terminale Domäne ist ein Pseudo- $\beta$ -Faß, das sich aus zwei viersträngigen  $\beta$ -Faltblättern zusammensetzt und von wenigen  $\alpha$ -Helices umgeben ist (Abb. 1.11d, SCHNEIDER *et al.*, 2000). Wie bei der Familie der AlaR ist der Kofaktor auch hier mit seiner *si*-Seite (vergleiche Abb. 1.8) zum Solvent hin exponiert (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Die PLP-Stabilisierung über eine Salzbrücke mit dem Pyridiniumstickstoff erfüllt ebenso ein Glutamatrest (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

## Einleitung

### 1.4.2.5 Glykogen-Phosphorylase-Familie

Die fünfte Familie beinhaltet die polysaccharidmetabolisierenden Enzyme mit der GP (Abb. 1.10e) als das von allen Familien zuerst dreidimensional aufgeklärte PLP-Enzym (WEBER *et al.*, 1978; SPRANG & FLETTERICK, 1979). Das aus vielen Domänen bestehende Protein besitzt eine C-terminale Domäne von etwa 360 Aminosäureresten, die eine Dinukleotidfaltung mit einem sechssträngigen parallelen  $\beta$ -Faltblatt aufweist (Abb. 1.11e) und das PLP bindet. Das Kofaktorringsystem wird entgegen den vorigen Klassen nicht als elektrophiles Moment zur Steuerung einer Reaktion genutzt; statt dessen ist nur die Phosphatgruppe bei der Katalyse eines Protonentransfers beteiligt. Ausdruck dafür ist auch das Fehlen einer spezifischen Erkennung des Pyridiniumstickstoffs seitens des Proteins, welche das Ringelektronensystem modulieren würde (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

**Tab. 1.2** Superfamilie PLP-abhängiger Enzyme mit bekannten dreidimensionalen Strukturen. (SCHNEIDER *et al.*, 2000; ergänzt um neue PDB-Einträge)

Enzym	Spezies	PDB	Referenz
<b>Faltungsklasse I</b>			
<b>1. Aminotransferase-SK I<sup>a</sup></b>			
▶ Aspartat-Aminotransferase	Huhn (Mitochondrium)	7AAT	MCPhALEN <i>et al.</i> , 1992a
	Huhn (Cytosol)	2CST	MALASHKEVICH <i>et al.</i> , 1995
	Schwein (Cytosol)	1AJR	RHEE <i>et al.</i> , 1997
	<i>Escherichia coli</i>	1ARS	OKAMOTO <i>et al.</i> , 1994
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1YAA	JEFFERY <i>et al.</i> , 1999
	<i>Thermus thermophilus</i>	1BJW	NAKAI <i>et al.</i> , 1999
	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	1GDE	URA <i>et al.</i> , 2001
	<i>Phormidium lapideum</i>	1J32	KIM <i>et al.</i> , n.p. <sup>b</sup>
▶ Aromatische Aminosäuren-Aminotransferase	<i>Paracoccus denitrificans</i>	1AY4	OKAMOTO <i>et al.</i> , 1998
▶ Tyrosin-Aminotransferase	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	1DJU	MATSUI <i>et al.</i> , 2000
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	1BW0	BLANKENFELDT <i>et al.</i> , 1999
	<i>Escherichia coli</i>	3TAT	KO <i>et al.</i> , 1999
▶ 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat-Synthase	Apfel	1B8G	CAPITANI <i>et al.</i> , 1999
	Tomate	1IAX	HUAI <i>et al.</i> , 2001
▶ Mal-Y	<i>Escherichia coli</i>	1DF2	CLAUSEN <i>et al.</i> , 2000a
▶ Cystalysin	<i>Treponema denticola</i>	1C7N	KRUPKA <i>et al.</i> , 2000
▶ L-Histidinolphosphat-Aminotransferase	<i>Escherichia coli</i>	1FG7	SIVARAMAN <i>et al.</i> , 2001
	<i>Thermotoga maritima</i>	1UU1	FERNANDEZ <i>et al.</i> , 2004
▶ Threonin-O-3-phosphat-Decarboxylase	<i>Salmonella enterica</i>	1LKC	CHEONG <i>et al.</i> , 2002
<b>2. Aminotransferase-SK II</b>			
▶ Dialkylglycin-Decarboxylase	<i>Burkholderia cepacia</i>	2DKB	TONEY <i>et al.</i> , 1993
▶ Glutamat-1-semialdehyd-Aminomutase	<i>Synechococcus</i> sp.	4GSA	HENNING <i>et al.</i> , 1997
▶ Ornithin-Aminotransferase	Mensch	2OAT	STORICI <i>et al.</i> , 1999a
▶ $\omega$ -Aminosäure:Pyruvat-Aminotransferase	<i>Pseudomonas putida</i>	-	WATANABE <i>et al.</i> , 1989
▶ 8-Amino-7-oxononanoat-Synthase	<i>Escherichia coli</i>	1BS0	ALEXEEV <i>et al.</i> , 1998
▶ Diaminopelargonsäure-Synthase	<i>Escherichia coli</i>	1QJ5	KACK <i>et al.</i> , 1999
▶ GABA-Aminotransferase	Schwein	1GTX	STORICI <i>et al.</i> , 1999b
▶ Adenosylmethionin-8-amino-7-oxononanoat-Aminotransferase	<i>Escherichia coli</i>	1DTY	ALEXEEV <i>et al.</i> , n.p.
▶ DOPA-Decarboxylase	Schwein	1JS3	BURKHARD <i>et al.</i> , 2001
▶ Glutamat-Decarboxylase	<i>Escherichia coli</i>	1PMM	CAPITANI <i>et al.</i> , 2003a
<b>3. Phosphoserin-Aminotransferase-SK</b>			
▶ Phosphoserin-Aminotransferase	<i>Bacillus circulans</i>	1BT4	HESTER <i>et al.</i> , n.p.
	<i>Escherichia coli</i>	1BJN	HESTER <i>et al.</i> , 1999
▶ NifS-ähnliches Protein	<i>Thermotoga maritima</i>	1EG5	KAISER <i>et al.</i> , 2000

## Einleitung

### Fortsetzung

Enzym	Spezies	PDB	Referenz
▶ Cystin-C-S-Lyase (C-DES)	<i>Synechocystis</i> spec.	1ELU	CLAUSEN <i>et al.</i> , 2000b
▶ CsdB	<i>Escherichia coli</i>	1CON	FUJI <i>et al.</i> , 2000
▶ 2-Aminoethylphosphonat-Transaminase	<i>Salmonella typhimurium</i>	1M32	CHEN <i>et al.</i> , 2002
▶ Alanin:Glyoxylat-Aminotransferase	Mensch	1H0C	ZHANG <i>et al.</i> , 2003
▶ IscS	<i>Escherichia coli</i>	1P3W	CUPP-VICKERY <i>et al.</i> , 2003
▶ Protein TT0402 (hypothetische AAT)	<i>Thermus thermophilus</i>	1IUG	KATSURA, <i>et al.</i> , 2004
<b>4. Tyrosin-Phenol-Lyase-SK</b>			
▶ Tyrosin-Phenol-Lyase	<i>Citrobacter freundii</i>	1TPL	ANTSON <i>et al.</i> , 1993
	<i>Erwina herbicola</i>	-	PLETNEV <i>et al.</i> , 1997
▶ Tryptophan-Indol-Lyase (Tryptophanase)	<i>Proteus vulgaris</i>	1AX4	ISUPOV <i>et al.</i> , 1998
<b>5. Cystathionin-β-Lyase-SK</b>			
▶ Cystathionin-β-Lyase	<i>Escherichia coli</i>	1CL1	CLAUSEN <i>et al.</i> , 1996
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1IBJ	BREITINGER <i>et al.</i> , 2001
▶ Cystathionin-γ-Synthase	<i>Escherichia coli</i>	1CS1	CLAUSEN <i>et al.</i> , 1998
	<i>Nicotiana tabacum</i>	1QGN	STEEGBORN <i>et al.</i> , 1999
▶ Methionin-γ-Lyase	<i>Pseudomonas putida</i>	1GC0	MOTOSHIMA <i>et al.</i> , 2000
▶ Cystathionin-γ-Lyase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1N8P	MESSERSCHMIDT <i>et al.</i> , 2003
<b>6. Ornithin-Decarboxylase-SK</b>			
▶ Prokaryotische Ornithin-Decarboxylase	<i>Lactobacillus</i> spec.	1ORD	MOMANY <i>et al.</i> , 1995
<b>7. Serin-Hydroxymethyltransferase-SK</b>			
▶ Serin-Hydroxymethyltransferase	Mensch	1BJ4	RENWICK <i>et al.</i> , 1998
	Kaninchen	1CJ0	SCARSDALE <i>et al.</i> , 1999
	<i>Escherichia coli</i>	1DFO	SCARSDALE <i>et al.</i> , 2000
	Maus	1EJI	SZEBENYI <i>et al.</i> , 2000
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	1KKJ	TRIVEDI <i>et al.</i> , 2002
	<i>Thermotoga maritima</i>	1JG8	KIELKOPF & BURLEY, 2002
▶ Threonin-Aldolase			
<b>8. 3-NH<sub>2</sub>-5-OH-Benzoesäuresynthase-SK</b>			
▶ 3-NH <sub>2</sub> -5-OH-Benzoesäure-Synthase	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	1B9H	EADS <i>et al.</i> , 1999
▶ ArnB-Aminotransferase	<i>Salmonella typhimurium</i>	1MDO	NOLAND <i>et al.</i> , 2002
<b>Faltungsklasse II</b>			
▶ Tryptophan-Synthase β-Untereinheit	<i>Salmonella typhimurium</i>	1UBS	RHEE <i>et al.</i> , 1996
▶ O-Acetylserin-Sulphydrylase	<i>Salmonella typhimurium</i>	1OAS	BURKHARD <i>et al.</i> , 1998
▶ Threonin-Deaminase	<i>Escherichia coli</i>	1TDJ	GALLAGHER <i>et al.</i> , 1998
▶ 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat-Deaminase	<i>Hansenula saturnus</i>	1F2D	YAO <i>et al.</i> , 2000
	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	1J0A	FUJINO <i>et al.</i> , n.p.
▶ Cystathionin-β-Synthase	Mensch	1JBQ	MEIER <i>et al.</i> , 2001
▶ Threonin-Synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E5X	THOMAZEAU <i>et al.</i> , 2001
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1KL7	GARRIDO-FRANCO <i>et al.</i> , 2002
	<i>Thermus thermophilus</i>	1UIM	OMI <i>et al.</i> , 2003
<b>Faltungsklasse III</b>			
▶ Alanin-Racemase	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	1SFT	SHAW <i>et al.</i> , 1997
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1RCQ	LEMAGUERES <i>et al.</i> , 2003
▶ Eukaryotische Ornithin-Decarboxylase	Maus	7ODC	KERN <i>et al.</i> , 1999
	<i>Trypanosoma brucei</i>	1QU4	GRISHIN <i>et al.</i> , 1999
	Mensch	1D7K	ALMRUD <i>et al.</i> , 2000
▶ Hypothetisches Hefeprotein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1B54	ESWARAMOORTHY <i>et al.</i> , 2003
▶ Diaminopimelat-Decarboxylase	<i>Methanococcus jannashii</i>	-	RAY <i>et al.</i> , 2002
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1HKV	GOKULAN <i>et al.</i> , 2003
▶ Serin-Dehydratase	Ratte	1PWH	YAMADA <i>et al.</i> , 2003
<b>Faltungsklasse IV</b>			
▶ D-Aminosäure-Aminotransferase	<i>Bacillus</i> spec.	1DAA	SUGIO <i>et al.</i> , 1995
▶ Verzweigt-kettige-Aminosäure-Aminotransferase	<i>Escherichia coli</i>	1A3G	OKADA <i>et al.</i> , 1997
	Mensch	1EKF	YENNAWAR <i>et al.</i> , 2001
▶ 4-Amino-4-deoxychorismat-Lyase	<i>Escherichia coli</i>	1ET0	NAKAI <i>et al.</i> , 2000
<b>Faltungsklasse V</b>			
▶ Glykogen-Phosphorylase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	LIN <i>et al.</i> , 1996
	Kaninchen	1A8I	GREGORIOU <i>et al.</i> , 1998

## Einleitung

### Fortsetzung

Enzym	Spezies	PDB	Referenz
▶ Maltodextrin-Phosphorylase	<i>Escherichia coli</i>	1AHP	O'REILLY <i>et al.</i> , 1997
▶ Glucosamin-6-phosphat-Synthase <sup>c</sup>	<i>Escherichia coli</i>	1MOQ	TEPLYAKOV <i>et al.</i> , 1998

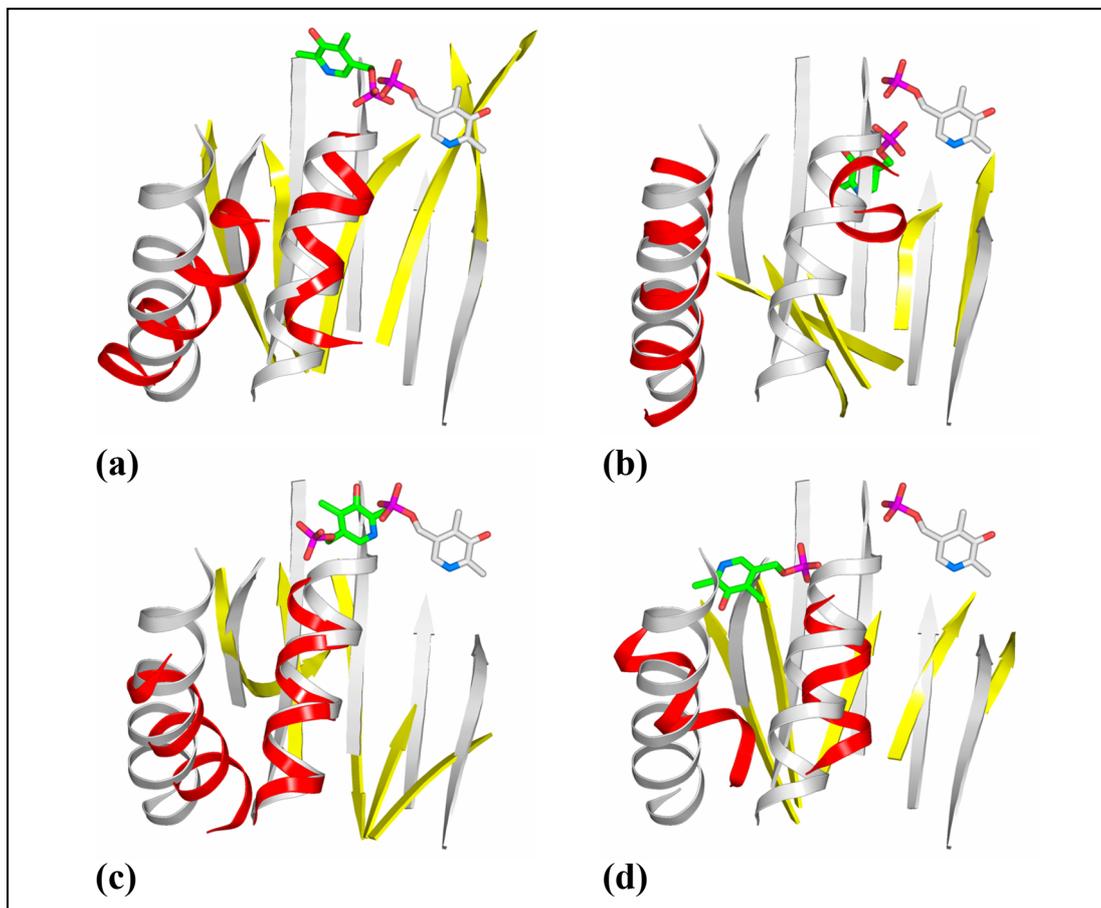
<sup>a</sup> SK = Subklasse.

<sup>b</sup> n.p. = Kristallstruktur außer in der Proteindatenbank (BERMAN *et al.*, 2000) noch nicht publiziert und beschrieben.

<sup>c</sup> Glucosamin-6-phosphat-Synthase ist kein PLP-abhängiges Enzym.

### 1.4.3 Kofaktorbindung

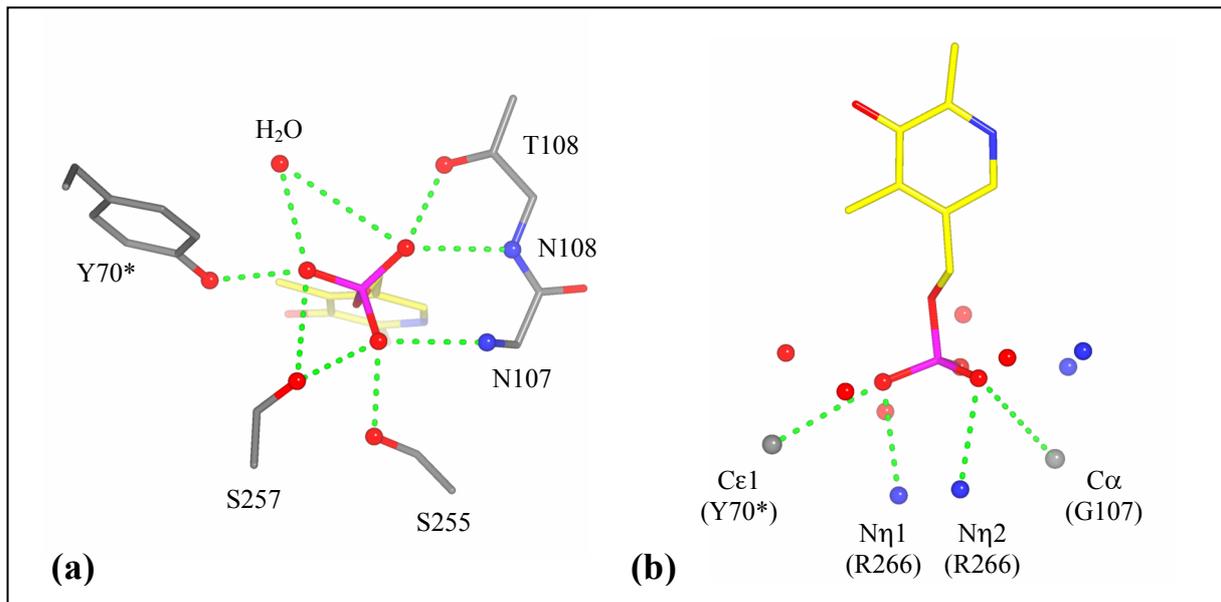
Alle fünf Familien der PLP-abhängigen Enzyme weisen im Bereich der Kofaktorbindungsdomäne sieben äquivalente Sekundärstrukturelemente auf. Dazu gehören fünf  $\beta$ -Faltblattstränge und zwei  $\alpha$ -Helices (Abb. 1.12), die ein Gerüst zur Positionierung von Schlüssel-



**Abb. 1.12** Gemeinsame sieben Strukturelemente der PLP-Enzymfamilien in den PLP-bindenden Domänen. Überlagerungen der Proteinrückgrate ( $\alpha$ -Helices in rot,  $\beta$ -Faltblätter in gelb) samt PLP-Stabmodellen (C-Atome in grün) von (a) TrpS $\beta$  [PDB: 1QOP; WEYAND & SCHLICHTING, 1999], (b) AlaR [PDB: 1BD0; STAMPER *et al.*, 1998], (c) DAAT [PDB: 3DAA; PEISACH *et al.*, 1998] und (d) GP [PDB: 1H5U; OIKONOMAKOS *et al.*, 2002] mit dem Proteinrückgrat von AAT (grau; PDB: 1AJS; RHEE *et al.*, 1997) und seinem PLP als Stabmodell (C-Atome in grau). Die strukturell homologen Aminosäurereste (DENESSIOUK *et al.*, 1999) dienten als Orientierungsmatrix im Programm *LSQKAB* (KABSCH, 1976).

## Einleitung

resten für die Stabilisierung des PLP bilden (DENESSIOUK, *et al.*, 1999). Ausgehend davon lokalisierten DENESYUK *et al.* (2002) eine Konstellation von Aminosäureresten („phosphate-binding cup“), welche spezifisch die Phosphatgruppe des PLP erkennen. Die Phosphatgruppe wird von Aminosäureresten oder alternativ Wassermolekülen, die auf zwei gedachten, parallelen Schichten um das Phosphat herum angeordnet sind (Abb. 1.13), fest koordiniert. Die erste Schicht enthält 5-7 und die zweite Schicht 3-7 mögliche Interaktionspartner, deren Positionen oft durch analoge Aminosäurereste besetzt sind oder im Falle der sogenannten Verankerungshelix („anchoring helix“) unverändert bleiben.



**Abb. 1.13** Phosphatbindungstasche („phosphate-binding cup“) der PLP-abhängigen Enzyme. Gezeigt ist am Beispiel der Aminosäurereste von AAT (C-Atome in grau, PDB: 1AJS; RHEE *et al.*, 1997) die zweisechichtige Anordnung der Bindungspartner der Phosphatgruppe des Kofaktors (C-Atome in gelb): erste Schicht (a) und zweite Schicht (b) [Ansicht (a) um  $+90^\circ$  entlang x-Achse gedreht], jeweils mit Interaktionen  $< 4,1 \text{ \AA}$  (.....). Y70\* stammt vom Nachbarmonomer. Erstellt nach Abb. 2 aus DENESYUK *et al.* (2002), wobei interagierende Atome als Kugeln von der Stabdarstellung hervorgehoben sind.

## **1.5 EGF-Domänen**

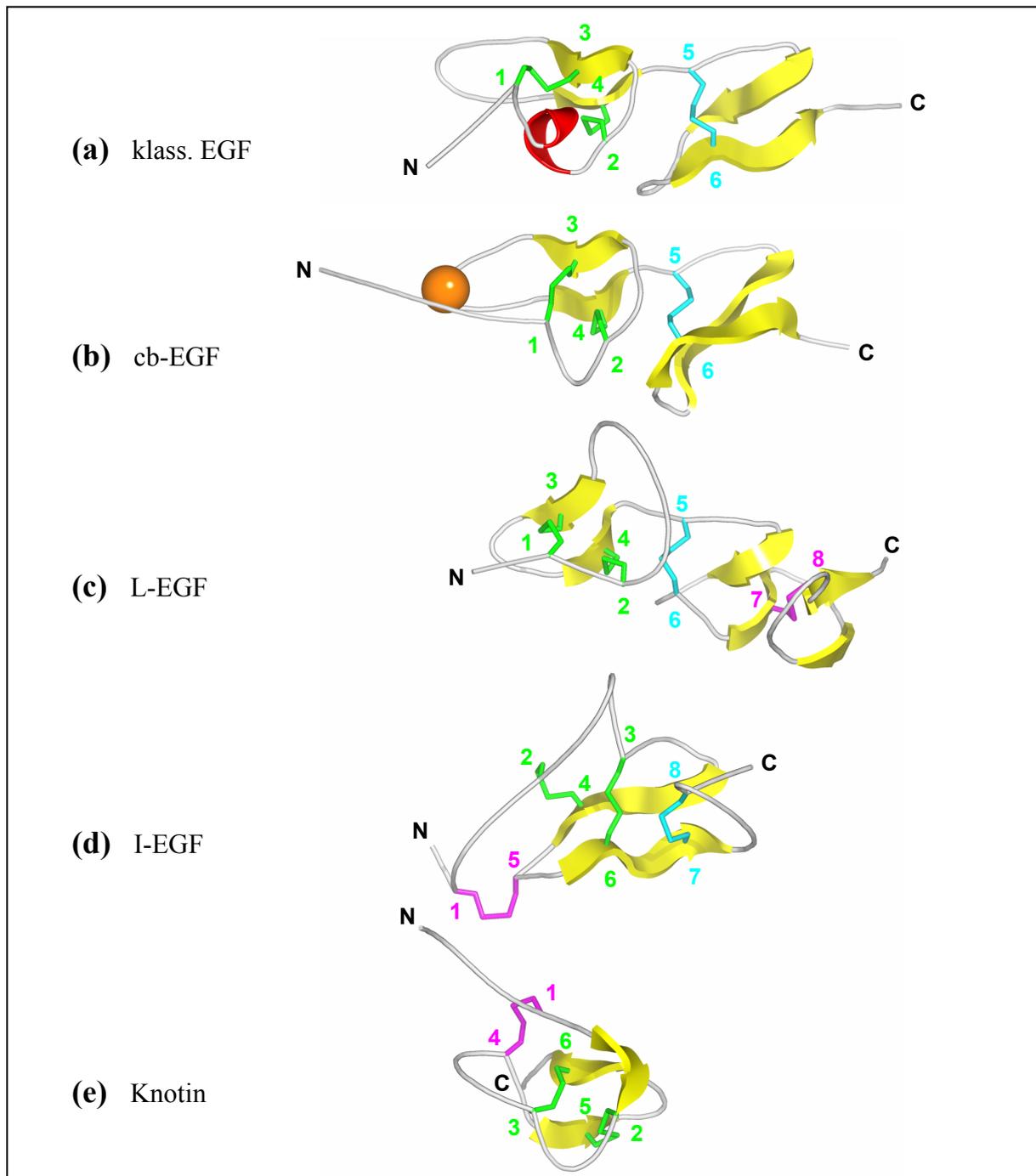
### **1.5.1 Herkunft und Übersicht**

Der klassische und namensgebende Vertreter dieses Faltungstyps ist der menschliche epidermale Wachstumsfaktor. Das in seiner Primärstruktur 53 Aminosäurereste lange (SAVAGE *et al.*, 1972) und durch drei Disulfidbrücken verstärkte Polypeptid bindet hochaffin an den membranständigen EGF-Rezeptor, der daraufhin dimerisiert und seine intrazellulären Tyrosinkinasedomänen transautokatalytisch aktiviert. Infolgedessen wird eine Signaltransduktionskaskade initiiert, die in der Stimulation der DNA-Synthese und Zellproliferation resultiert (CARPENTER *et al.*, 1978; CARPENTER & COHEN, 1990). EGF-Domänen werden nicht selten in mehrfacher Kopie vorwiegend in extrazellulär lokalisierten Proteinen oder membranständigen Rezeptor- und Matrixproteinen vorgefunden (CAMPELL & BORK, 1993). Des Weiteren wurde auch über EGF-Domänen in intrazellulären Peroxidasen und Cyclooxygenasen berichtet (TOH *et al.*, 1992). Die Auffassung, nach der EGF-Domänen nur in tierischen und in wenigen Fällen viralen oder protozoalen Proteinen präsent sind (CAMPELL & BORK, 1993), wird in zunehmendem Maße mit der wiederholten Beobachtung pflanzlicher Vertreter auf sequentieller Ebene konfrontiert (HE *et al.*, 1996; SHIMADA *et al.*, 1997; LAVAL *et al.*, 1999; CAO *et al.*, 2000). Mit der Rolle der EGF-Domäne verbinden sich, soweit im einzelnen schon bekannt, Funktionen wie die Vermittlung von spezifischen Protein-Protein-Interaktionen als auch Platzhalter- (CAMPELL & BORK, 1993) und Regulationsaufgaben innerhalb desselben Multi-domänenproteins (BEGLOVA *et al.*, 2002; RUDENKO *et al.*, 2002). Bislang wurden mindestens vier unterschiedliche EGF-Domänenklassen beschrieben, die sich in Anzahl der Aminosäurereste sowie Disulfidmuster unterscheiden: die klassische EGF-ähnliche Domäne sowie die Ca<sup>2+</sup>-bindende, die Laminin-Typ und die Integrin-Typ EGF-ähnliche Domäne. Darüber hinaus gibt es Gründe (BLANCO-APARICIO *et al.*, 1998), die disulfidverbrückten Knotine als EGF-verwandte Strukturen mit in den Vergleich einzubeziehen.

### **1.5.2 Domärentypen**

#### **1.5.2.1 Klassische EGF-ähnliche Domäne**

Die klassische EGF-ähnliche Domäne umfaßt durchschnittlich 45 Aminosäurereste und ist durch das Disulfidbrückenmuster „Cys1-Cys3, Cys2-Cys4, Cys5-Cys6“ gekennzeichnet (CAMPELL & BORK, 1993). Ihre Sekundärstruktur besteht aus einem zentralen zweisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt und zusätzlichen kurzen Elementen von  $\beta$ -Faltblattsträngen oder  $\alpha$ -Helices. Die sich ableitende dreidimensionale Struktur (Abb. 1.14a) ist von ellipsoider



**Abb. 1.14** *EGF-Domänentypen und Knotine*. Proteinrückgrat- und Cystinbrückendarstellungen von **(a)** Faktor VII - 2. EGF-Domäne (1PDB: 1DAN, Reste 88-132; BANNER *et al.*, 1996), **(b)** Fibrillin - 1. EGF-Domäne (PDB: 1EMN, Reste 2124-2168; DOWNING *et al.*, 1996), **(c)** Laminin- $\gamma$ 1III4 (PDB: 1KLO, Reste 64-121; STETEFELD *et al.*, 1996), **(d)** Integrin- $\beta$ 2 - 3. EGF-Domäne (PDB: 1L3Y; BEGLOVA *et al.*, 2002) und **(e)** CPI (PDB: 4CPA; REES & LIPSCOMB, 1982).  $\beta$ -Stränge sind gelb, eine  $3_{10}$ -Helix ist rot und Schleifen sind grau hervorgehoben. Disulfidbrücken-Farbcode: grün = T-Knoten, blau = nur in EGF-Domänen, violett = speziell; Numerierung entspricht der relativen Position. In **(b)** ist das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion als orange Kugel verdeutlicht. Die Domänen-Orientierung erfolgte mit dem Programm *LSQKAB* (CCP4, 1994), wobei die T-Knoten-Cystinbrücken **(e)** oder zusätzlich **(a-d)** die in EGF-Domänen konservierte dritte Cystinbrücke als Fixpunkte dienten. In **(d)** und **(e)** wurde aus Übersichtsgründen um  $-90^\circ$  bzw.  $-10^\circ$  entlang der x-Achse gedreht.

## Einleitung

Form und die N- und C-Termini liegen auf entgegengesetzten Molekülseiten (BORK *et al.*, 1996). Unter den dreidimensional bekannten Strukturbeispielen finden sich neben dem eigentlichen EGF (COOKE *et al.*, 1987) und dem Gewebewachstumsfaktor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ; HARVEY *et al.*, 1991) z.B. Enzyme der Blutgerinnung wie die Faktoren VIIa [2. EGF-Domäne, siehe Abb. 1.14a] (BANNER *et al.*, 1996) und Xa [2. EGF-Domäne] (BRANDSTETTER *et al.*, 1996) sowie Thrombomodulin [4.+6. EGF-Domäne] (FUENTES-PRIOR *et al.*, 2000), auch membranständige Vertreter wie der Diphtherietoxinrezeptor (HB-EGF; LOUIE *et al.*, 1997), der Low-Density-Lipoprotein(LDL)-Rezeptor [3. EGF-Domäne] (RUDENKO *et al.*, 2002), die Matrixproteine E- und P-Selectin (SOMERS *et al.*, 2000) sowie Nidogen-1 (KVANSAKUL *et al.*, 2001), das Merozoit-Oberflächenprotein-1 des Malariaerregers *Plasmodium* (CHITARRA *et al.*, 1999) und die Cyclooxygenase (PICOT *et al.*, 1994). Bisher nur sequentiell bekannt sind EGF-ähnliche Domänen von pflanzlichen Proteinen wie z.B. den *Arabidopsis thaliana* EGF-ähnlichen Proteinen (AtELP1-5; LAVAL *et al.*, 1999). Zu den durch Kristallstrukturen verifizierten Funktionen und Bindungspartnern einzelner Beispiele läßt sich aufführen, daß die Wachstumsfaktoren EGF und TGF $\alpha$  beide in 1:1-Komplexen an den EGF-Rezeptor binden (OGISO *et al.*, 2002; GARRET *et al.*, 2002). Vergleichbar stellt sich auch die Situation des Diphtherietoxinrezeptors (enthält die EGF-ähnliche Domäne) und seinem Liganden Diphtherietoxin dar (LOUIE, *et al.*, 1997). Ein weiteres Interaktionbeispiel ist das transmembrane Thrombomodulin, welches Thrombin mit der fünften und sechsten EGF-Domänen bindet und daraufhin Protein C aktiviert, welches die Fibrinolyse stimuliert (FUENTES-PRIOR *et al.*, 2000). Der Blutgerinnungsfaktor VIIa bildet über seine beiden EGF-Domänen mit dem Gewebefaktor (TF) einen reaktiven Komplex, der Faktor IX und als Folge die nachgeschaltete Gerinnungskaskade aktiviert (BANNER *et al.*, 1996).

### **1.5.2.2 $Ca^{2+}$ -bindende EGF-ähnliche Domäne**

Die zweite Klasse der  $Ca^{2+}$ -bindenden EGF-ähnlichen (cb-EGF) Domänen (Abb. 1.14b) unterscheidet sich von der zuvor behandelten EGF-ähnlichen-Gruppe durch die Komplexierung eines strukturgebenden  $Ca^{2+}$ -Ions am N-Terminus (BORK *et al.*, 1996) mittels konservierter negativer oder polarer Aminosäurereste (SELANDER-SUNNERHAGEN *et al.*, 1992; RAO *et al.*, 1995). Das  $Ca^{2+}$ -Ion verbrückt auf diese Weise die Umkehrschleife, welche die zwei zentralen  $\beta$ -Faltblattstränge verbindet, mit dem N-Terminus der Domäne (RAO *et al.*, 1995). Die Disulfidverknüpfungen sind dagegen unverändert. Eine Tandemanordnung von zwei cb-EGF-Domänen wurde in den dreidimensionalen Strukturen des Matrixproteins Fibril-

## Einleitung

lin-1 (DOWNING *et al.*, 1996; 1. EGF-Domäne siehe Abb. 1.14b) und des LDL-Rezeptors [1.+2. EGF-Domäne] (SAHA *et al.*, 2001) beobachtet. Im Falle des Fibrillin gestatten die Tandemwiederholungen den Aufbau von Mikrofibrillen (DOWNING *et al.*, 1996), wobei den cd-EGF-Domänen im LDL-Rezeptor eine Rolle bei der intramolekularen Domänenenumordnung zukommt, die zur Freisetzung der LDLs im Endosom führt (RUDENKO *et al.*, 2002). Ebenso wurde bei  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierten Enzymen der Blutgerinnung wie Faktor VII [1. EGF-Domäne] (BANNER *et al.*, 1996), IX (RAO *et al.*, 1995) sowie X [1. EGF-Domäne] (KAMATA *et al.*, 1998) oder Thrombomodulin [5. EGF-Domäne] (FUENTES-PRIOR *et al.*, 2000) von Raumstrukturen mit cb-EGF-Domänen berichtet.

### **1.5.2.3 Laminin-EGF-ähnliche Domäne**

Ein dritter und mit 50-60 Aminosäureresten längerer Typ einer EGF-ähnlichen Domäne, der Laminin-EGF (L-EGF), wurde erstmals in einer Tandemanordnung in den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten der Laminine, einer Gruppe von Matrixproteinen, gefunden (BECK *et al.*, 1990). Anhand der Kristallstruktur der 4. EGF-Domäne aus Laminin- $\gamma$ 1 ( $\gamma$ 1III4, Abb. 1.14c) wurde deutlich, daß eine zusätzliche Disulfidbrücke am C-Terminus vorliegt, welche das klassische Cysteinverknüpfungsmuster um das Paar „Cys7-Cys8“ ergänzt (STETEFELD *et al.*, 1996). Die  $\gamma$ 1III4-Domäne weist ein Bindungsstelle für das Matrixprotein Nidogen-1 auf (PÖSCHL *et al.*, 1996). Andere, jedoch nur auf Primärstrukturebene bekannte Beispiele für L-EGF-ähnliche Domänen befinden sich in weiteren Matrixproteinen wie z.B. Netrin, Agrin, Perlecan und Usherin (HOHENESTER & ENGEL, 2002). Die Funktionen dieser Domäne sind noch nicht charakterisiert, allerdings werden strukturelle Platzhalterrollen diskutiert (HOHENESTER & ENGEL, 2002).

### **1.5.2.4 Integrin-EGF-ähnliche Domäne**

Ein mit durchschnittlich nur 37 Aminosäureresten etwas kleinerer, vierter Typ von EGF-ähnlichen Domänen wurde anhand der NMR-Struktur (Abb. 1.14d) der dritten cysteinreichen Domäne der Integrin- $\beta$ 2-Rezeptoruntereinheit als Integrin-EGF(I-EGF)-ähnliche Domäne beschrieben (BEGLOVA *et al.*, 2002). Die beiden zentralen  $\beta$ -Faltblattstränge sind aufgrund der Deletion von vier hochkonservierten Resten gegenüber der klassischen EGF-ähnlichen Domäne in ihrer Länge verkürzt. Eine zusätzliche Disulfidbrücke am N-Terminus, eingeschoben vor Cys1 und zwischen Cys3 und Cys4 (Cysteinanzahlweise der klassischen EGF-ähnlichen Domäne), führt zu einem neuartigen Disulfidverknüpfungsmuster der Art

## Einleitung

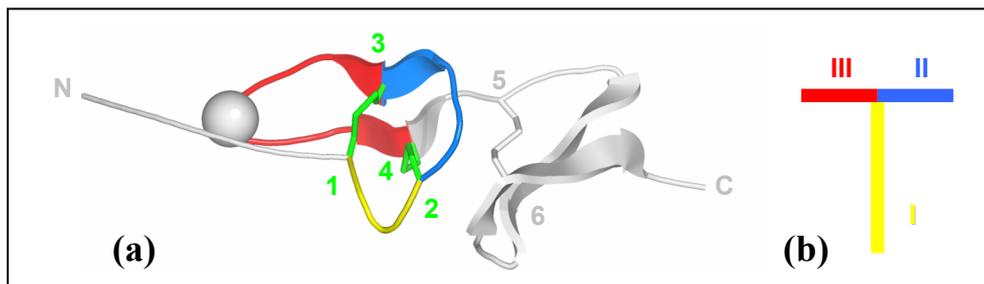
„Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6, Cys7-Cys8“. Die neue Disulfidbrücke ist strukturell analog zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexierung in der cb-EGF-ähnlichen Domäne und fixiert den N-Terminus an die Umkehrschleife zwischen den zwei zentralen  $\beta$ -Faltblattsträngen. Des Weiteren ist die Schleife zwischen Cys2 und Cys3 länger als im klassischen Sinne. In Anbetracht dessen und der Fixierung des N-Terminus erhält die Domäne die Form einer, wie es die Autoren beschreiben, Raketenspitze (BEGLOVA *et al.*, 2002). Die Funktion der membrandurchspannenden, heterodimeren Integrine, welche im Falle der  $\beta$ 2-Untereinheit vier I-EGF-ähnliche Domänen enthalten, ist u.a. die Vermittlung von dynamischen Kontakten zwischen extrazellulären Adhäsionsmolekülen und dem intrazellulären Actincytoskelett (HUMPHRIES, 2000). Der extrazelluläre Bereich der Integrine geht bei Aktivierung in eine ausgestreckte Konformation über (DU *et al.*, 1993). Die zweite und dritte I-EGF-ähnliche Domäne regulieren in diesem Zusammenhang die taschenmesserartige Öffnungsbewegung (BEGLOVA *et al.*, 2002). Auf Sequenzebene wurden auch I-EGF-ähnliche Domänen von den pflanzlichen *Arabidopsis*-Proteinen AtELP1-5 bekannt, welche bereits den klassischen Typ aufweisen (LAVAL *et al.*, 1999).

### **1.5.2.5 Knotine**

Diese nicht unter dem EGF-Domänentyp geführten, jedoch auch von drei Disulfidbrücken stabilisierten sowie mit maximal 40 Aminosäureresten (GAO *et al.*, 2001) vergleichsweise kleinen Proteine umfassen sowohl pflanzliche Proteinaseinhibitoren als auch Kegelschnecken- und Spinnentoxine (LIN & NUSSINOV, 1995). Angesichts der berichteten antagonistischen Wirkung des Kartoffel-Carboxypeptidase-Inhibitors (PCI, Abb. 1.14e) auf EGF und einer direkten Bindungskompetition um den EGF-Rezeptor (BLANCO-APARICIO *et al.*, 1998) erscheint es geboten, die zugehörige Proteinklasse mit in den EGF-Domänenvergleich einzubeziehen. Die Bezeichnung Knotine bzw. Cystin-Knoten verweist darauf, daß die dritte Disulfidbrücke (Cys3-Cys6) das von der ersten (Cys1-Cys4) und zweiten (Cys2-Cys5) Disulfidbrücke eingeschlossene Polypeptidsegment durchkreuzt (Abb. 1.14e; LE-NGUYEN *et al.*, 1990; PALLAGHY *et al.*, 1994). Die Knotinfaltung läßt sich auf das Motiv eines cystinstabilisierten  $\beta$ -Faltblatts (CSB) reduzieren (HEITZ *et al.*, 1999) - eine Kerneinheit, die in vergleichbarer Form allerdings auch in antihämostatischen Blutegelproteinen (z.B. Hirudin, ASCENZI *et al.*, 1998) sowie EGF-Domänen gefunden und als T-Knoteninfaltung definiert wurde (LIN & NUSSINOV, 1995; POLITICELLI *et al.*, 1999). Diese Struktureinheit ist gekennzeichnet durch einen Aminosäurebereich von drei kurzen, meist nicht mehr als sieben Reste umfas-

## Einleitung

senden Schleifen, die durch zwei Disulfidbrücken (allgemein: Cys1-Cys3, Cys2-Cys4) in der Form des Buchstaben „T“ fixiert sind (POLTICELLI *et al.*, 1999; Abb. 1.15). Dabei symbolisieren die sich auf entgegengesetzten Seiten erstreckenden Schleifen II (Cys2...Cys3, Abb. 1.15) und III (Cys3...Cys4, Abb. 1.15) die Arme und die senkrecht dazu liegende Schleife I (Cys1...Cys2, Abb. 1.15) den Stamm des „T“s. Die Sequenzidentitäten zwischen den Mitgliedern der T-Knotenfaltung sind nicht signifikant, wobei allerdings die Brückencysteine und die vor oder nach ihnen in der Sequenz mit geladenen Aminosäuren besetzten Positionen konserviert sind. Letztere helfen dabei, die drei Schleifen zum Lösungsmittel hin zu ziehen, wodurch die T-Form der Faltung entsteht (POLTICELLI *et al.*, 1999). Unterschiede in der T-Knotenfaltung ergeben sich für eine dritte Disulfidbrücke, welche im Falle der Knotine (dort: Cys1-Cys4; Abb. 1.14e) den N-Terminus mit der Schleife II verknüpft, bei den EGF-Domänen zwei C-terminale Bereiche (dort: Cys5-Cys6; Abb. 1.14a-d) und in den Blutegelpoteinen zwei N-terminale Segmente (dort: Cys1-Cys2; nicht gezeigt) miteinander verbindet (LIN & NUSSINOV, 1995; ASCENZI *et al.*, 1998).



**Abb. 1.15** *T-Knotenfaltung*. Proteinrückgratdarstellung von Fibrillin (a) (1. EGF-Domäne; PDB: 1EMN, Reste 2124-2168; DOWNING *et al.*, 1996) wie in Abb. 1.14b, wobei die T-Knotenfaltung (LIN & NUSSINOV, 1995; POLTICELLI *et al.*, 1999) und die zwei sie bestimmenden Disulfidbrücken farblich hervorgehoben wurden. Zur Verdeutlichung der „T“-Form (b) sind die Proteinbereiche unterschiedlich eingefärbt und in (b) numeriert.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die vielfältigen Eigenschaften des Knoblauchs gehen maßgeblich auf das Wirken eines einzelnen, bisher strukturbioologisch kaum beleuchteten Proteins zurück - der Alliinase. Dieses bei der Pflanzengattung *Allium* vorherrschende C-S-Lyase-Enzym sollte am Beispiel Knoblauch hinsichtlich seiner dreidimensionalen Struktur im Detail charakterisiert werden. Ausgehend von diesen Erkenntnissen waren die molekularen Prinzipien für die Regioselektivität gegenüber den (+)-S-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxid-Substraten zu erschließen, welche bisher ebenfalls Gegenstand von Spekulationen waren. Eine vermutete Strukturverwandtschaft zur Klasse I der PLP-Enzyme (z.B. Aspartat-Aminotransferase) sollte ebenso erörtert werden wie die vorausgesagte neuartige N-terminale EGF-ähnliche Domäne in Bezug auf bekannte EGF-Strukturen. Abschließend wurde beabsichtigt, einen Ausblick über mögliche gentechnische Modifikationen der Alliinase zur Veränderung der Reaktionsspezifität zu werfen. Diese Vorschläge sollten dazu dienen, neuartige Knoblauchwirkstoffe herzustellen oder andere organische Synthesen regioselektiv zu katalysieren.

Für das Vorhaben war es notwendig, ausgehend von ersten bekannten Kristallisationsbedingungen (KÜTTNER, 1999), hochgeordnete Einkristalle mit einer Diffraktion von mindestens 2 Å Auflösung zu züchten, die mittels röntgenstrukturanalytischer Methoden untersucht werden konnten. Diese umfaßten neben der Diffraktionsdatensammlung an nativen auch die an schweratoms substituierten Kristallen, welche die fehlende Informationen zur Überwindung des kristallographischen Phasenproblems beisteuerten. Neben den kristallographischen Arbeiten sollten zusätzliche biochemische Methoden wie z.B. chromatographische Verfahren, Enzymaktivitätstests, UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektroskopie bei der Beantwortung der Fragestellungen helfen.

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Laborausstattung

Ausrüstungsgegenstand	Hersteller
<b>Proteinreinigung und -analyse</b>	
Mixer	Waring (New Hartford, CT, USA)
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus Instruments (Hanau)
Zentrifuge Avanti 30	Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA)
Magnetrührer Variomag Monotherm	H+P Labortechnik (München)
UV/Vis-Spektrophotometer Spekol	Zeiss (Jena)
UV/Vis-Spektrophotometer Cary 4E	Varian (Darmstadt)
Fluoreszenz-Spektrophotometer LS-50	Perkin Elmer (Überlingen)
Quarzküvetten Suprasil	Helma, Roth (Karlsruhe)
Laborwaagen BP210D, PT2100	Sartorius (Göttingen)
pH-Meter CD 840	Schott (Mainz)
Wasserfiltersystem Milli-Qplus 185	Millipore (Freiburg)
FPLC-Systeme samt Zubehör und Säulen;	
PAGE-Phast-System	Amersham Biosciences (Freiburg)
Präzisionspipetten	Eppendorf (Berlin)
<b>Kristallisation</b>	
Mikroskop SZH100 binocular	Olympus (Hamburg)
Mikroskop Stemi 1000 binocular	Zeiss (Jena)
<b>Diffractionsdatensammlung</b>	
Röntgeneratore FR591 (Drehanode)	Nonius (Delft, Niederlande)
Präzessionskamera	Nonius (Delft, Niederlande)
Detektoren MAR300, MAR345, MARCCD	MAR Research (Hamburg)
Cryostat Controller 600-Serie	Oxford Cryosystems (Oxford, UK)
Cryojet	Oxford Instruments (Wiesbaden)
Graphitmonochromator	Huber (Rimsting)
Osmic-Spiegelmonochromator	Osmic (Northwood Troy, MI, USA)
<b>Computerhardware</b>	
Indy Workstation; O2 Graphics workstation;	
Origin 200 Server	SGI (Mountain View, CA, USA)
Digital 433au	Compaq (Houston, CA, USA)
PC-Systeme mit AMD K2 - 450 MHz	Wavelight (Jena)
PC-System mit C3 Ezra - 866 MHz	Selbstbau (E.B. KÜTTNER)
PC-System mit Intel Pentium III - 1 GHz	Selbstbau (E.B. KÜTTNER)
PC-System mit Intel Pentium IV - 3 GHz	Selbstbau (E.B. KÜTTNER)

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmittel	Hersteller
<b>Proteinreinigung und -analyse</b>	
ConA-Sepharose; $\gamma$ -Globulin; Phast-Fertiggele 12,5 % PA, IEF pH 3-9; Phast-SDS-Pufferstreifen, -auftragskämme 6/4; Markerproteine-Kit LMW (14,4-94 kDa); Markerproteine-Kit isoelektrische Fokussierung; Coomassiefarbkonzentrat Phast-BlueR; Silberfärbekit	Amersham Biosciences (Freiburg)
Konzentratoren Centricon Plus-20 30000 Molekulargewicht; Spritzenaufsatzfilter Millex 0,45 $\mu$ m $\gamma$ -Globulin;	Millipore (Freiburg)
Protein-Assay Konzentrat; Einmalküvetten Polysteren 1,5 ml SDS/ $\beta$ -ME-Probenpuffer BSA	BioRad (München) Abteilungsbestände IMB (Jena) Serva (Heidelberg)
Dialysekassetten „Slide-A-Lyzer“ Dialysemembranen 6000 Molekulargewicht; Einmalspritzen 1/5/10/20 ml Pipettenspitzen 2,5/20/200/1000 $\mu$ l; Reaktionsgefäße 0,75/1,5/2,5 ml Parafilm	Pierce (Rockford, IL, USA) Roth (Karlsruhe) Eppendorf (Berlin) Pechiney Plastic Packaging (Menasha, WI, USA)
<b>Kristallisation, Datensammlung</b>	
HR2-110, Screen I; HR2-112, Screen II; HR2-211, Grid Screen (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Kristallisationsplatten VDX (24 Reservoir); Glasabdeckplättchen 22 mm (silikonisiert); Glaskapillaren (0,1-1 mm); Vormontierte Kryoloops; Kryoloopröhrchen mit Magnetfußkappe; Kryoloopröhrchenhalter aus Aluminium; Kryoloopröhrchenzange; Kristallmikromanipulationswerkzeuge; Kryo-Dewar	
Vakuumsilikonfett (Dow Corning) Paraffinöl “highly liquid” Panjellyöl (Ghee)	Hampton (Laguna Niguel, CA, USA) Merck (Darmstadt) Persönliche Probe von Dr. Santosh PANJIKAR (damals: IMB, Jena; heute: EMBL, Hamburg)
Photochemikalien	W. Loy GmbH (Stein)

### 2.1.3 Chemikalien und Enzyme

Verbindung	Anbieter
Alliin (Racemat)	ICN Biomedicals (Eschwege)
S-Ethyl-L-cystein; Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid; Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert (NADH)	Sigma (Taufkirchen)
CaCl <sub>2</sub> ; Glycerin; HEPES; MES; MgCl <sub>2</sub> ; MnCl <sub>2</sub> ; NaCl; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Pefabloc; TRIS; Lactatdehydrogenase (LDH) aus Rinderherz (2 U/ $\mu$ l); Polyethylenglykol (PEG)-4000, 6000, 8000;	Merck (Darmstadt)
Pyridoxal-5'-phosphat	Fluka (Taufkirchen)
K[AuCl <sub>4</sub> ]	Aldrich (Taufkirchen)

### 2.1.4 Pufferlösungen

Alle Angaben sind auf eine Temperatur von 20 °C bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurde zum Ansetzen der Lösungen und Puffer MilliQ-Wasser verwendet.

Puffer	Komponenten
<b>Präparationspuffer A</b>	0,05 M HEPES, 1 mM Pefabloc, 10 % (v/v) Glycerin, 20 $\mu$ M PLP, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM MnCl <sub>2</sub> , 3 mM NaN <sub>3</sub> , mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt.
<b>Präparationspuffer B</b>	Wie Präparationspuffer A + 0,5 M NaCl, ohne Pefabloc.
<b>Präparationspuffer C</b>	Wie Präparationspuffer B + 0,1 M Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid.
<b>Präparationspuffer D</b>	0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,15 M NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 20 $\mu$ M PLP, 3 mM NaN <sub>3</sub> , mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.
<b>Kristallisationspuffer</b>	5 mM HEPES, 10 % (v/v) Glycerin, 20 $\mu$ M PLP, 3 mM NaN <sub>3</sub> , mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.
<b>Concanavalin A-Säule-Waschpuffer I/II</b>	0,1 M NaCH <sub>3</sub> COO ( <b>I</b> ) oder 0,1 M Tris ( <b>II</b> ), 0,5 M NaCl, mit CH <sub>3</sub> COOH auf pH 4,5 ( <b>I</b> ) oder mit HCl auf pH 8,5 ( <b>II</b> ) eingestellt.
<b>Concanavalin A-Säule-Lagerpuffer</b>	0,1 M NaCH <sub>3</sub> COO, 1 M NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM MnCl <sub>2</sub> , 6 mM NaN <sub>3</sub> , mit CH <sub>3</sub> COOH auf pH 6,0 eingestellt.
<b>Aktivitätstestpuffer</b>	0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , mit NaOH auf pH 6,5 eingestellt.
<b>Spektroskopiepuffer</b>	Präparationspuffer D ohne PLP-Zusatz.

### 2.1.5 Knoblauch

Abgetrocknete Knollen französischer und spanischer Herkunft: Globus-Filiale (Jena-Isserstedt). Frische Knollen ägyptischer Herkunft: Tegut-Filiale (Jena, Goethegalerie). Frisch geerntete deutsche Knollen: eigener Anbau (Isseroda bei Weimar).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Biochemische Methoden**

#### **2.2.1.1 Proteinreinigung**

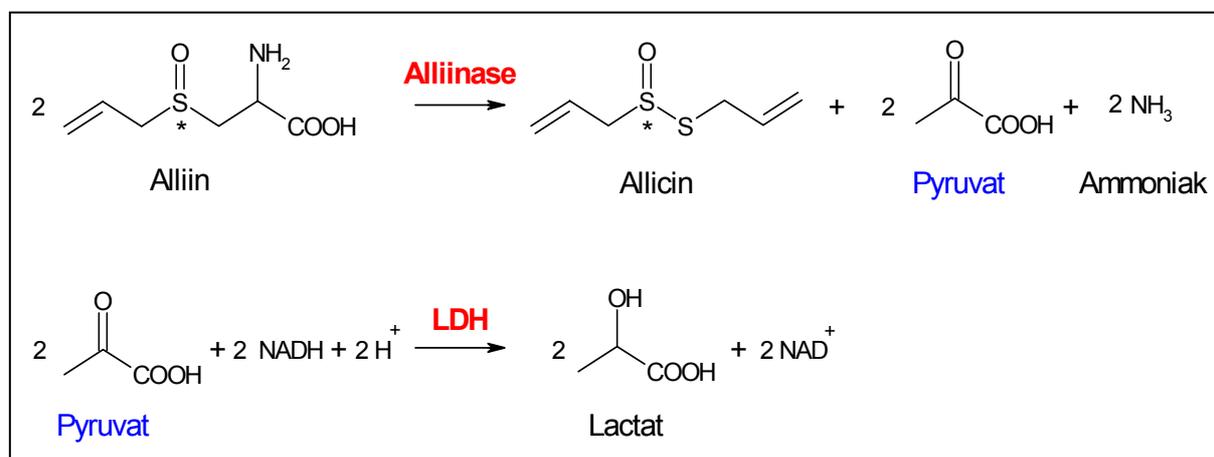
Das Reinigungsschema orientierte sich an der von RABINKOV *et al.* (1995) publizierten Methode. Sie umfaßt drei Abschnitte: Polyethylenglykol (PEG)-Präzipitation, Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographie. Die Schritte wurden, bis auf das anfängliche Schälen der Knollen, bei 4 °C ausgeführt. 120 g Knoblauchzehen wurden zusammen mit 180 ml Präparationspuffer A in zwei Portionen bei 4 °C in einem Mixer 1 min bei Höchstdrehzahl zerkleinert und durch ein doppellagiges Baumwolltuch filtriert. Zum Entfernen unlöslicher Zellbestandteile wurde das Rohfiltrat 30 min bei 20000 g zentrifugiert. Zum Überstand wurde schrittweise PEG-8000 bis zu einem Anteil von 25 % (m/v) unter Rühren hinzugegeben, schließlich wurde 20 min sanft weitergerührt. Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation bei 20000 g und 20 min Dauer vom löslichen Überstand abgetrennt. Die Pellets wurden zweimal vorsichtig mit etwas destilliertem Wasser abgespült und schließlich anteilig in 240 ml Präparationspuffer A resolubilisiert. Zum Klären von nichtlöslichem Material erfolgte an dieser Stelle eine letzte Zentrifugation von 10 min bei 20000 g und eine darauffolgende Filtrierung durch 0,45 µm-Spritzenaufsatzfilter. Die klare Proteinlösung wurde dann an der FPLC-Anlage bei einer Flußrate von 2 ml/min auf eine zuvor mit 450 ml Präparationspuffer B bei gleicher Flußrate voräquilibrierten Concanavalin A-Säule (75 ml Säulenvolumen) geleitet und über Nacht bei einer Flußrate von 2 ml/min mit 1,8 l nachgewaschen. Am nächsten Morgen erfolgte die Elution gebundener Alliinase durch 150 ml Präparationspuffer C bei einer Flußrate von 2 ml/min. Geeignete Elutionsfraktionen wurden vereinigt und auf ein Volumen unter 10 ml eingeeengt und über Nacht stehengelassen. Am dritten Tag wurde die Alliinase einer Gelfiltration bei einer Flußrate von 1 ml über eine zuvor mit 660 ml Präparationspuffer D voräquilibrierten Superdex 200 26/60-Säule (330 ml Säulenvolumen) unterzogen (240 ml Elutionsvolumen). Die gewünschten Fraktionen wurden auf unter 1 ml eingeeengt, so daß die Lösung eine zitronen- bis goldgelbe Farbe annahm, die einem Proteingehalt von 10-30 mg/ml entsprach. Der Proteingehalt wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) und den Proteinen Rinderserumalbumin (BSA) sowie  $\gamma$ -Globulin als Standards bestimmt. Die Reinheit der Alliinase konnte mittels SDS- und Isolelektrischer Fokussierung (IEF)-Polyacrylamidgелеlektrophorese (PAGE) an einem Phast-Gelelektrophoresesystem überprüft werden.

### 2.2.1.2 Aktivitätstest und MICHAELIS-MENTEN-Kinetik

Der mit racemischem Alliin durchgeführte Ansatz richtete sich nach dem von RABINKOV *et al.* (1994) verwendeten Alliinaseaktivitätstest, der sich seinerseits an den Arbeiten von SCHWIMMER & MAZELIS (1963) orientierte: Die Alliinasereaktion wird mit einer zweiten Enzymreaktionen gekoppelt, der Umsetzung des von der Alliinase gebildeten Pyruvats unter NADH-Verbrauch durch LDH (Abb. 2.1). Der Verbrauch an NADH entspricht dabei dem stöchiometrischen Umsatz an Substrat. In einem Reaktionsvolumen von 300 µl befanden sich: 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,5), 25µM PLP, 0,2 mM NADH, 3 Einheiten LDH, 6 mM Alliin und eine Alliinaseprobe von 10-50 ng. Zur Bestimmung der K<sub>M</sub>- und v<sub>max</sub>-Werte wurde die Alliinkonzentration zwischen 0,1-12 mM bei konstant 50 ng Alliinase variiert. Nach Enzymzugabe war die Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke (d) über 1 min zu verfolgen. Aus dem Extinktionsabfall ΔE ergab sich die spezifische Alliinaseaktivität:

$$A_{\text{spezifisch}} = \frac{300 \cdot \Delta E}{d \cdot \epsilon_{\text{NADH}} \cdot m_{\text{Alliinase}}} \cdot \left[ \frac{1}{1} \right] \quad \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} = \frac{\text{Unit}}{\text{mg}} \right]$$

wobei ε<sub>NADH</sub> (5211 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>) den spezifischen Absorptionskoeffizienten des NADH für diesen Puffer darstellte (KÜTTNER, 1999). Eine Einheit (Unit, U) der Alliinaseaktivität entsprach der Freisetzung von 1 µmol Pyruvat pro Minute.



**Abb. 2.1** Kopplung der Alliinasereaktion mit sekundärer Enzymreaktion. \* = chirales S-Atom

Die Bestimmungen der MICHAELIS-MENTEN-Konstante K<sub>M</sub> (MICHAELIS & MENTEN, 1913) und v<sub>max</sub> erfolgte entweder mittels linearer Regression anhand von LINEWEAVER-BURK-Plots (1/v über 1/[S]; LINEWEAVER & BURK, 1934) oder nicht-linearer Regression unter Anwendung einer Demoverision des Programms *EZ-Fit* (Perrella Scientific, Amherst, NH, USA; [www.jlc.net.net/~fperrell](http://www.jlc.net.net/~fperrell)). Die enzymatische Wechselzahl k<sub>cat</sub> berechnete sich zu k<sub>cat</sub> = v<sub>max</sub>/E<sub>T</sub>,

wobei die totale Enzymmenge,  $E_T$ , 50 ng betrug, welche  $9,26 \cdot 10^{-13}$  mol an aktiven Zentren entsprach, wenn das apparente Molekulargewicht mit ca. 54000 je Monomer (inklusive 5,5 % Glykosylierung) zu Grunde gelegt wurde.

### **2.2.1.3 $K_i$ -Bestimmung von HEPES**

Der zuvor beschriebene Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung wurde hinsichtlich der Zugabe von HEPES im Konzentrationsbereich 0-252 mM bei gleichbleibendem Volumen ergänzt. Die dazu verwendeten zehnfach konzentrierten Stammlösungen von HEPES wurden zuvor auf pH 6,5 eingestellt, um eine pH-Veränderung des Ansatzes auszuschließen. Die eingesetzte Alliinkonzentration betrug 6 mM und die Alliinasemenge 100 ng. Die Absorptionsverläufe nach Enzymzugabe wurden, wie im vorigen Kapitel erklärt, bei 430 nm verfolgt und daraus Reaktionsgeschwindigkeiten,  $v_i$ , berechnet.

Die Ermittlung von  $K_i$ -Werten basierte auf linearer Regression, wobei in einem Diagramm  $(v_0/v_i)-1$  über der Inhibitorkonzentration  $I$  aufgetragen wurde und sich aus dem Anstieg der Ausgleichsgeraden der apparente Wert  $K_{i(app)}$  ergab. Bei bekannter MICHAELIS-MENTEN-Konstante  $K_M$  und Substratkonzentration  $S$  (6 mM) berechnete sich  $K_i$  wie folgt:

$$K_i = \frac{K_{i(app)} \cdot S}{1 + \frac{S}{K_M}} \quad [\text{mM}].$$

### **2.2.1.4 UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektroskopie**

Um störende Einflüsse des PLP-Kofaktors zu vermeiden, mußte die noch in Präparationspuffer D vorliegende Alliinase in einen PLP-freien Puffer überführt werden. Dies geschah mittels zweimaliger Dialyse gegen Spektroskopiepuffer. Die Alliinase wurde vor dem Vermessen bei Raumtemperatur auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. Die UV/Vis-Messungen erfolgten mit frischer (3 Tage nach Aufbrechen der Knollen) oder älterer (12 Tage nach Präparationsstart) Alliinase sowie die Fluoreszenz-Aufnahmen mit der 12 Tage alten Alliinaselösung.

## **2.2.2 Kristallographische Methoden**

### **2.2.2.1 Kristallisation**

Vor Beginn der Kristallisation war es notwendig, die Alliinaselösung zweimal über Nacht gegen Kristallisationspuffer zu dialysieren. Die Kristallisationsansätze erfolgten in VDX-Platten mit 24 Reservoirplätzen nach der Hängetropfen - zum Teil auch der Sitztropfen -

Dampf-Diffusionsmethode bei 4 oder 20 °C. Die Reservoirvolumina betragen 1 ml und die Tropfen setzten sich aus gleichen Anteilen Protein- und Reservoirlösung zusammen (zum Beispiel 4 µl + 4 µl). Die anfängliche Suche nach neuen Kristallisationsbedingungen basierte auf den Hampton Crystal-Screens I und II sowie dem Hampton (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Grid-Screen, welche nach gefundenen Einzelkonditionen manuell verfeinert wurden wie die schon bekannten initialen Kristallisationsbedingungen (KÜTTNER, 1999).

#### **2.2.2.2 IEF-PAGE von Alliinasekristallen**

Für jede der Kristallformen wurden äquivalente Mengen an Kristallvolumina ausgewählt, die sich aus folgenden Kristallgrößen zusammensetzten [Größenangaben in µm]: Typ I = 200 x 60 x 30, 150 x 40 x 30, 220 x 50 x 20; Typ II = drei Stück 150 x 100 x 80 und Typ III = zwei Stück ca. 200 lang. Die Kristalle wurden jeweils einzeln viermalig in 10 µl frischer Originalreservoirlösung gewaschen und von möglichem anhaftendem Proteinpräzipitat befreit, wobei der verwendete Kryoloop zwischen jedem Transfer stets mit Ethanol/Wasser (PEG-Reservoir) oder Wasser/Ethanol/Wasser ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Reservoir) gereinigt wurde, um mitgeschleppte Kontaminationen zu vermeiden. Schließlich wurden die Kristalle in 10 µl Puffer E (enthält 0,15 M NaCl) aufgelöst bzw. zerrieben. Die Spuren eines IEF-Phastgels (Bereich pH 3-9) wurden mit jeweils 4 µl der angefertigten Kristalllösungen sowie 4 µl eines IEF-Proteinstandardmix (zehnfach zur Originalkonzentration verdünnt) und einer 1 µg-Probe von Alliinase vor Kristallisation beladen, das Gel in der Phast-Apparatur (Amersham Biosciences) fokussiert und die Proteinbanden nach Fokussierung mittels der Silberfärbung entwickelt.

#### **2.2.2.3 Schweratomderivatisierung**

Die Suche nach geeigneten Schweratomderivaten der Alliinase erfolgte sowohl durch das Tränken von Kristallen in millimolar mit den entsprechenden Schweratomverbindungen substituierten Reservoirlösungen (ein bis mehrere Stunden) oder durch die Kokristallisation in Gegenwart millimolarer Konzentrationen des gewählten Schwermetallsalzes.

#### **2.2.2.4 Meßdatensammlung**

Erste Diffraktionstest- sowie Präzessionsaufnahmen wurden an in Glaskapillaren von 0,1-1 mm Durchmesser montierten Kristallen bei Raumtemperatur an Drehanoden-Röntgeneratoren ausgeführt. Sollten die Kristalle bei 100 K vermessen werden, so waren diese mit getrocknetem Paraffinöl vorzubehandeln (RIBOLDI-TUNNICLIFFE & HILGENFELD, 1999). Das

Paraffinöl mußte dazu auf kurz oberhalb seiner Schmelztemperatur abgekühlt werden, bevor die mit einem Kryoloop aus dem Kristallisationstropfen gefischten Kristalle für einen kurzen Moment (1 s) durch das Öl gezogen und sogleich im 100 K-Stickstoffstrom schockgekühlt wurden. Alternativ dazu konnten weniger gut streuende Kristalle auch mehrfach in indischem Butterfett (Ghee), das zuvor durch Handwärme verflüssigt wurde, gewaschen werden. Der Kristall wurde zunächst vom Kristallisationstropfen direkt in den 100 K-Stickstoffstrom gebracht. Anschließend wurde der Kristall aus dem Stickstoffstrom herausgenommen und für wenige Sekunden (< 10 s) in Ghee gebadet und gleich darauf in den Stickstoffstrom zurückgebracht (PANJIKAR, 2001). Diese Auftau/Kühlprozedur wurde viermal ausgeführt.

Zur Verifizierung der Raumgruppe wurde im Falle einer Kristallform auch auf die Verwendung einer Präzessionskamera (BUERGER, 1964) mit klassischem Fotofilm bei Raumtemperatur zurückgegriffen. Dazu wurde von einem in einer Kapillare montierten Kristall zunächst ein Stillphoto (40 min) aufgenommen, daraus Korrekturwerte berechnet und eine 2°-Kleinwinkelpräzessionsaufnahme (5 h) gestartet. Anhand dieser wurde der Kristall nochmals in seiner Orientierung optimiert und die 11°-Großwinkelpräzession (24 h) begonnen.

Datensätze von nativen Alliinasekristallen wurden an den EMBL-Meßplätzen X11 und BW7B des Deutschen Elektronensynchrotrons (DESY) in Hamburg mit einer MARCCD-Kamera und einem MAR345-Flächendetektor bzw. auf der Labor-Röntgenanlage (Drehanoden-Röntgengenerator Nonius FR591) ebenfalls mit einem MAR345-Flächendetektor gesammelt. Zwei Schwermetallderivatkristalle wurden am Meßplatz XRD des ELETTRA-Synchrotrons in Trieste (Italien) mit einer MARCCD-Kamera vermessen.

#### **2.2.2.5 Meßdatenprozessierung und -verarbeitung**

Die aufgezeichneten Datensätze wurden mit dem *HKL*-Programmpaket (OTWINOWSKI & MINOR, 1997) sowie dem Programm *RMERGE* (WEISS & HILGENFELD, 1997; WEISS, 2001) ausgewertet. Die Qualität der Daten konnte anhand verschiedener Merkmale beurteilt werden. So war das primäre Kriterium mit dem Diffraktionslimit [ $\text{\AA}$ ] der Kristalle gegeben, wobei hier ein kleinerer Wert mit höherer Detailauflösung und besserer Strukturinformation verbunden war. Ferner gab der  $R_{\text{merge}}$ -Faktor Aufschluß darüber, wie gut die Intensitäten  $I$  gemessener Röntgenreflexe  $hkl$  ( $h, k, l$  = Millersche Indizes) verschiedener Meßaufnahmen oder symmetrieverwandter Positionen miteinander korrelierten.  $R_{\text{merge}}$  berechnete sich mit dem Programm *SCALEPACK* des *HKL*-Programmpakets (OTWINOWSKI & MINOR, 1997) wie folgt:

$$R_{\text{merge}} = 100 \sum_{hkl} \sum_i \left| \overline{I(hkl)} - I_i(hkl) \right| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl) \quad [\%]$$

Allerdings stieg der Faktor  $R_{\text{merge}}$  bei wachsender Redundanz der Meßdaten an. Der redundanzunabhängige Faktor  $R_{\text{r.i.m.}}$  („redundancy-independent merging R factor“; WEISS & HILGENFELD, 1997; WEISS, 2001) kompensierte dies durch die Einführung eines Korrekturwertes, der die Multiplizität  $N$  eines gemessenen Reflexes berücksichtigte. Er berechnete sich mit dem Programm *RMERGE* (WEISS & HILGENFELD, 1997; WEISS, 2001) nach:

$$R_{\text{r.i.m.}} = 100 \sum_{\text{hkl}} (N/(N-1))^{1/2} \sum_i \left| \overline{I(\text{hkl})} - I_i(\text{hkl}) \right| / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl}) \quad [\%]$$

Ein weiteres Qualitätskriterium stellte der Faktor  $R_{\text{p.i.m.}}$  („precision-indicating merging R factor“; WEISS & HILGENFELD, 1997; WEISS, 2001) dar. Dieser beschrieb, wie genau die Intensitäten der Röntgenreflexe in Bezug auf ihre mittleren Intensitäten gemessen wurden und ermittelte sich mit dem Programm *RMERGE* (WEISS & HILGENFELD, 1997; WEISS, 2001) wie folgt:

$$R_{\text{p.i.m.}} = 100 \sum_{\text{hkl}} (1/(N-1))^{1/2} \sum_i \left| \overline{I(\text{hkl})} - I_i(\text{hkl}) \right| / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl}) \quad [\%]$$

Der Quotient  $I/\sigma$  gab an, um welchen Faktor die mittleren Reflexintensitäten höher sind als die Standardabweichung  $\sigma$  und steht für das Signal-Rausch-Verhältnis. Insbesondere in der höchsten Auflösungsschale waren Werte von  $I/\sigma = 2$  bei der Festlegung der Auflösungsgrenze nicht zu unterschreiten.

Die Redundanz beschrieb, wie oft jeder Reflex durchschnittlich gemessen wurde. Ein anderes Merkmal zur Datenqualität - die Vollständigkeit - war ein Ausdruck dafür, inwieweit alle für die jeweilige Raumgruppe und die gesetzte Auflösungsgrenze möglichen Röntgenreflexe gemessen bzw. ausgewertet werden konnten.

Im Falle von Schweratomderivatdatensätzen ließ sich anhand eines anomalen Skalierungsfaktor  $R_{\text{anom}}$  mittels des Programms *SCALEPACK* des *HKL*-Programmpakets (OTWINOWSKI & MINOR, 1997) ein Eindruck über die Größe der anomalen Streubeiträge gewinnen.  $R_{\text{anom}}$  ergab sich aus den Reflexintensitäten von  $(\text{hkl})$  sowie ihren zugehörigen *FRIEDEL*-Partnern  $(-\text{h}-\text{k}-\text{l})$  (FRIEDEL, 1913) wie folgt:

$$R_{\text{anom}} = 100 \sum_{\text{hkl}} \left| I(\text{hkl}) - I(-\text{h}-\text{k}-\text{l}) \right| / \sum_{\text{hkl}} \overline{I(\text{hkl})} \quad [\%]$$

Die Datenreduktion und Umwandlung von Reflexintensitäten in Strukturaktoren erfolgte mit den Programmen *SCALEPACK2MTZ* und *CAD* (CCP4, 1994). Die Strukturaktoren  $F$  standen mit den Reflexintensitäten  $I$  in folgender Beziehung:

$$F^2(\text{hkl}) = I(\text{hkl})$$

Das Programm *TRUNCATE* (FRENCH & WILSON, 1978) skalierte die gemessenen Strukturfaktoramplituden  $F_{\text{obs}}$  mit einem Skalierungsfaktor und ergab  $F_{\text{absolut}}$ . Der Skalierungsfaktor sowie der mittlere Temperaturfaktor  $B$  wurde dazu einem WILSON-Plot entnommen. Dieser WILSON-Plot war die graphische Auftragung von  $\ln(\overline{f}/F_{\text{obs}}^2)$  über  $4\sin^2\theta/\lambda^2$  [ $f$  - Atomstrefaktor,  $\theta$  - Reflektionswinkel]. Ihm lag die Annahme zugrunde, daß die Atome zufällig in der asymmetrischen Einheit verteilt sind (WILSON, 1949). Anhand einer Ausgleichsgerade nach der Methode der kleinsten Quadrate ließ sich für den höheren Auflösungsbereich ( $< 5,5 \text{ \AA}$ ) aus dem negativen Wert des Anstiegs der Regressionsgeraden der mittlere Temperaturfaktor  $B$  sowie aus der Exponentialfunktion des negativen x-Koordinatenschnittpunktes der Skalierungsfaktor entnehmen.

Die Strukturfaktoren der Schwermetall Datensätze wurden mit dem Programm *SCALEIT* (HOWELL & SMITH, 1992) auf die Strukturfaktoren der nativen Datensätze skaliert sowie einer Temperaturfaktor-Korrektur unterzogen. Eine Bewertung darüber, inwieweit sich die Strukturfaktoren des Derivatdatensatz ( $F_{\text{PH}}$ ) zum Nativdatensatz ( $F_{\text{P}}$ ) isomorph verhielten, war über den durch *SCALEIT* (HOWELL & SMITH, 1992) erhältlichen Skalierungsfaktor  $R_{\text{scale-to-native}}$  möglich:

$$R_{\text{scale-to-native}} = 100 \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{PH}}(\text{hkl}) - F_{\text{P}}(\text{hkl})| / \sum_{\text{hkl}} \overline{F_{\text{P}}(\text{hkl})} \quad [\%]$$

Von den nativen Datensätze wurden mittels der Programme *UNIQUE* (CCP4, 1994) und *FREERFLAG* (BRÜNGER, 1992) eine zufällige Testfraktion an Reflexen für die spätere Verifizierung in der Strukturverfeinerung abgetrennt.

#### **2.2.2.6 Phasenbestimmungen**

Jeder Röntgenreflex ( $hkl$ ) wurde durch einen Strukturfaktor  $F(hkl)$  sowie einer zugeordneten Phase  $\alpha(hkl)$  beschrieben. Mittels dieser kombinierten Information ließ sich unter Verwendung des Elementarzellvolumens  $V$  eine Elektronendichterteilung  $\sigma(xyz)$  für jeden Raumpunkt mit den Koordinaten ( $xyz$ ) definieren:

$$\sigma(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{\text{hkl}} F(\text{hkl}) \cdot \exp\{-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(\text{hkl})\}$$

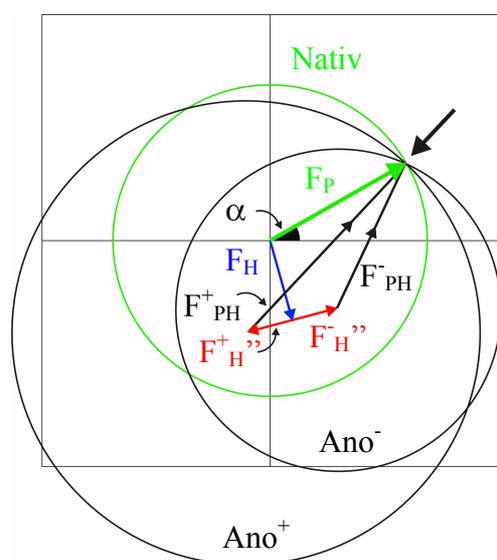
Die Strukturfaktoren  $F(hkl)$  konnten, wie im vorigen Kapitel gezeigt, aus den Reflexintensitäten abgeleitet werden. Die Phaseninformationen  $i\alpha(hkl)$  blieben der direkten Messung verschlossen und stellten das kristallographische Phasenproblem dar.

Die Struktur der Alliinase wurde in drei verschiedenen Kristallformen bestimmt (siehe Kapitel 3.5). Im Falle der Kristallform IV erfolgte die Phasenbestimmung durch einfachen iso-

morphen Ersatz unter Einbeziehung anomaler Streuung (SIRAS, siehe Kapitel 2.2.2.6.1), während die Phasen der Kristallformen III und I mit Hilfe des auf diese Weise bestimmten Strukturmodells durch die Methode des molekularen Ersatzes (siehe Kapitel 2.2.2.6.2) ermittelt wurden.

### 2.2.2.6.1 SIRAS

Anhand eines Schweratomderivats, das bei nur einer Röntgenwellenlänge vermessen wurde, konnten die gesuchten Phaseninformationen in Form eines SIRAS-Ansatzes bestimmt werden. Die richtige Phase  $\alpha$  ließ sich anschaulich durch die HARKER-Konstruktion (HARKER, 1956) erfassen (Abb. 2.2).



**Abb. 2.2** HARKER-Konstruktion zur Bestimmung der Phase  $\alpha$  mittels SIRAS.  $F_P$  = nativer Strukturfaktor,  $F^+_{PH}/F^-_{PH}$  = anomale Schweratomderivatstruktur Faktoren,  $F_H$  = isomorpher Schweratomstrukturfaktor,  $F^+_{H''}/F^-_{H''}$  = anomale Schweratomstruktur Faktoren. Der Schnittpunkt der drei HARKER-Kreise (Nativ,  $Ano^+$ ,  $Ano^-$ ) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet und ergibt die Phase  $\alpha$ .

Aus den anomalen Differenzen der Struktur Faktoren [BIJVOET-Paare, ( $F^+_{PH}, F^-_{PH}$ ); BIJVOET, 1949] wurden mit dem Programm *FFT* (IMMIRZI, 1966) anomale PATTERSON-Karten (PATTERSON, 1934) berechnet. Die verwendete anomale Differenz-PATTERSON-Funktion  $P_{ano}$  definierte sich für den Raumpunkt ( $uvw$ ) nach:

$$P_{ano}(uvw) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} (|F^+_{PH}| - |F^-_{PH}|)^2 \cdot \exp\{-2\pi i(hu + kv + lw)\}$$

Die PATTERSON-Funktion ist eine Autokorrelationsfunktion der Elektronendichte und so fand sich für jedes Atom ein Differenzvektor zu sich selbst (Ursprungspack) sowie jedem anderen Atom in der PATTERSON-Karte vor. Da die anomalen Struktur Faktoren ( $F^+_{PH}$  und  $F^-_{PH}$ ) herangezogen wurden, traten hier die anomal streuen Atome zu Tage, welche das FRIEDEL-Gesetz (FRIEDEL, 1913) verletzen [somit  $F(hkl) \neq F(-h-k-l)$ ]. Bei vorhandener Rotationssymmetrie in den Proteinkristallen ergaben sich Differenzvektoren zwischen Atomen und ihren symmetrieverwandten Positionen. Diese kamen senkrecht zur Symmetrieebene auf raumgruppenspezifischen Ebenen, den HARKER-Schichten (HARKER, 1956), zu liegen. Die Positionen der Intensitäts-

maxima der Differenzvektoren wurden mit dem Programm *PEAKMAX* (CCP4, 1994) ermittelt und dienten als Ausgangspunkt zur manuellen Berechnung der Schweratombindungsstellen.

Die zwei aus der anomalen PATTERSON-Karte ermittelten enantiomorphen Schweratom-Sets wurden anschließend parallel mit Hilfe des Programms *MLPAHRE* (CCP4, 1994) und der Methode der maximalen Wahrscheinlichkeit („maximum likelihood“; BRICOGNE, 1991) auf Position, Besetzungsgrad und isotropen Temperaturfaktor hin verfeinert. Diese Parameter und die daraus zugänglichen Schweratom-Strukturfaktoren  $F_{H^+(\text{calc})}$  und  $F_{H^-(\text{calc})}$  wurden dabei so verändert, daß sich maximale Wahrscheinlichkeiten ergaben, für die gemessenen Strukturfaktoren  $F_{PH}^+$  und  $F_{PH}^-$  Ausgangspunkt zu sein. Auf dieser Grundlage berechnete *MLPHARE* (CCP4, 1994) native Phaseninformationen  $\alpha$ . Zur Beurteilung der Phaseninformation dienten der Cullis-R-Faktor (CULLIS *et al.*, 1961), die „figure of merit“ (fom) sowie die Phasenstärke:

$$R_{\text{Cullis}} = \frac{\sum_{hkl} |F_{PH} - |F_P + F_{H(\text{calc})}||}{\sum_{hkl} |F_{PH} - F_P|}$$
$$\text{Phasenstärke} = \frac{\sum_{hkl} |F_{H(\text{calc})}|}{\sum_{hkl} |F_{PH} - |F_P + F_{H(\text{calc})}||}$$
$$\text{fom} = \frac{\sum_{hkl} P(\alpha) - \cos(\alpha_{\text{best}} - \alpha)}{\sum_{hkl} P(\alpha)}$$

Während beim Cullis-R-Faktor (CULLIS *et al.*, 1961) Werte  $< 1,0$  anzustreben waren, so sollte die Phasenstärke Werte  $> 1,0$  annehmen. Die „figure of merit“ [ $\alpha$  - wahrscheinlichste Phase,  $\alpha_{\text{best}}$  - mittlere Phase zwischen  $\alpha(F_{PH}^+)$  und  $\alpha(F_{PH}^-)$ ] hingegen stand für die Qualität der bestimmten Phasen. Bei einem Wert von 1,0 wäre der Phasenfehler  $0^\circ$  gewesen, entsprechend z.B. bei 0,74  $\rightarrow 42^\circ$  oder 0,5  $\rightarrow 60^\circ$ , wobei fom = 0 bedeutete, daß alle Phasen gleichmäßig wahrscheinlich gewesen wären. Die experimentellen Phasen wurden anschließend mit dem Programm *DM* (COWTAN, 1994) einer Phasenverbesserung unterzogen, welche die Optionen Lösungsmittelglättung und Histogrammanpassung beinhaltet. Das Programm *DM* (COWTAN, 1994) berechnete zunächst eine Elektronendichtekarte mittels experimenteller Phaseninformationen und an dieser führte es im realen Elektronendichteraum Modifikationen durch. Durch reverse Fouriertransformation der modifizierten Elektronendichte wurden neue Strukturamplituden und Phasenwinkel errechnet, die mit den experimentell bestimmten verglichen wurden und eine Gewichtung erhielten. Der Wichtungsfaktor gestattete die Neukombination von experimentellen mit modifizierten Größen aus denen eine neue Elektronendichte für einen weiteren Dichtemodifikationszyklus berechnet werden konnte. Die Entscheidung darüber, welche der beiden Schweratomstrukturen die richtige darstellte, konnte durch Inspektion von Elektronendichtekarten getroffen werden, die mittels der Programme *CAD* (CCP4, 1994), *FFT* (IMMIRZI, 1966) berechnet und mittels der Programme *NPO* und *PLTDEV* (CCP4, 1994) graphisch dargestellt wurden.

2.2.2.6.2 *Molekularer Ersatz*

Die dreidimensionale Struktur der Alliinase in einer neuen Raumgruppe konnte nach der Methode des molekularen Ersatzes und mit Hilfe der Programme *AMORE* (NAVAZA, 1994, 2001) und *PDBSET* (CCP4, 1994) aufgeklärt werden. Dabei wurde die bekannte Struktur einer Raumgruppe als Suchmaske zum Auffinden der Phaseninformation der unbekannt Struktur einer anderen Raumgruppe genutzt. Zunächst wurden jedoch die Strukturfaktoren der neuen Raumgruppe im Programmteil *AMORE-sortfun* eingelesen (Überführung der binären [hkl, F,  $\sigma F$ ]-Datei in eine Klartextdatei). Der methodische Phasierungsansatz ging davon aus, daß bei geringer Auflösung ( $> 4 \text{ \AA}$ ) Details beider Proteinstrukturen in den Hintergrund treten und die Molekülumrisse der gesuchten und der bekannten Struktur zur Überdeckung gebracht werden können. Dazu wurde mit der Programmoption *AMORE-tabling* die bekannte Alliinase-Dimerstruktur mit dem Masseschwerpunkt auf den Koordinatenursprung verschoben und die Dimerachsen entlang der Koordinatensystems ausgerichtet. Anschließend wurde das Suchmodell in theoretische Strukturfaktoren im Auflösungsbereich  $20\text{-}3 \text{ \AA}$  umgewandelt. Die Überführung der bekannten auf die gesuchte Struktur stellte eine 6-dimensionale Transformation (drei Rotations- und drei Translationsterme) dar, die allerdings in eine Suche nach dem Rotations- und dem Translationsterm aufgetrennt wurde. Die Rotationssuche erfolgte durch die Überlagerung der PATTERSON-Funktionen beider Strukturen. Da die PATTERSON-Funktionen aufgrund ihrer Definition (Differenzvektoren zwischen den Atomen) den selben Ursprung hatten, ließ sich in der Programmoption *AMORE-rotfun* die sogenannte Kreuzrotationsfunktion im Auflösungsbereich  $20\text{-}4 \text{ \AA}$  bestimmen, nach der die PATTERSON-Funktion der bekannten Struktur auf die der unbekannt abgebildet wurde. Dazu mußten jedoch vorher die Strukturfaktoren der gesuchten Struktur auf eine Zelle der Größe  $a = 140 \text{ \AA}$ ,  $b = 112 \text{ \AA}$  und  $c = 100 \text{ \AA}$  umgeschrieben werden, deren Größe sich aus den Dimensionen der minimalen Größe des Suchmodells sowie dem Integrationsradius für die Überlagerung der PATTERSON-Funktionen zusammensetzten. Beide Größen wurden dem anfänglichen *AMORE-tabling* entnommen. Der Rotationsmatrix wurde mit der Programmoption *AMORE-trafun* ein Translationsterm zugeordnet, wobei über die Korrelation der Strukturfaktoren und abgeleiteten Reflexintensitäten des Suchmodells mit denen der unbekannt Struktur sowie des  $R_{\text{Faktors}}$  eine Aussage über die Richtigkeit der Translationslösung getroffen werden konnte. Schließlich wurde die Rotations/Translationmatrix mit der Programmoption *AMORE-fitfun* mittels einer ‚rigid-body‘-Verfeinerung noch optimiert. Im Falle von mehr als einem zu erwartendem Alliinasedimer für die asymmetrische Einheit war die Suche nach einer zweiten Rotations/Translationmatrix zu wiederholen, wobei die erste Rotations/Translationslösung in den Programmoptionen *AMORE-rotfun/tabfun* als bekannt vorausgesetzt wurde und sich sogenannte ‚locked‘-Kreuzrotations- und ‚locked‘-Translationsfunktionen

ergaben. Die verfeinerten Transformationslösungen wurden abschließend auf das Suchmodell der bekannten Alliinasestruktur mit dem Programm *PDBSET* (CCP4, 1994) angewendet und somit das Startmodell für den anschließenden Proteinmodellbau erhalten.

### **2.2.2.7 Strukturmodellbau und -verfeinerung - Kristallform IV**

#### *2.2.2.7.1 Initiales Modell*

Ausgehend von initialen Phaseninformationen und nativen Strukturfaktoren gestattete es das Modellbauprogramm *ARP/wARP v5.0* (PERRAKIS *et al.*, 1997), schon einen beträchtlichen Teil des Alliinasemodells zu bauen. Die *wARP*-Routine berechnete dazu aus den nativen Strukturfaktoren und den verbesserten Phasen des SIRAS-Ansatzes (Kapitel 2.2.2.6.1) eine initiale Elektronendichte und interpretierte sie als isolierte, sogenannte freie Atome. Als freie Atome wurden Elektronendichtemaxima von mindestens 0,9 Standardabweichungen interpretiert, die voneinander 1,0-3,3 Å entfernt lagen. In der nachfolgenden *ARP*-Routine wurden die Positionen der freien Atome verfeinert, wobei Atome mit Elektronendichtemaxima geringer als 1,5 Standardabweichungen in der *SIGMAA*-gewichteten (READ, 1986) ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}}$ )-Elektronendichtekarte [m - „figure of merit“ = Phasenwahrscheinlichkeit, D - Koordinatenfehler nach LUZATTI-Plot (LUZATTI, 1952),  $F_{\text{obs}/\text{calc}}$  - gemessene/berechnete Strukturfaktoren,  $\alpha_{\text{calc}}$  - Phasen] entfernt wurden. Aus den identifizierten Atompositionen ließen sich neue Phaseninformation berechnen, die mit den initialen kombiniert wurden und in der nächsten *wARP*-Runde zum Auffinden neuer freier Atome mit Elektronendichtemaxima > 3,2 (nach Zyklus 14 auf 3,0 abgesenkt) Standardabweichungen in der ( $mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}}$ )-Differenzelektronendichtekarte dienten. Nach 15 *ARP/wARP*-Zyklen wurden die bisher gefundenen freien Atome zu Hauptkettenbereichen zusammengesetzt, wobei nicht zuordnungsfähige freie Atome im Modell verblieben. Sie stellten zusammen mit den schon identifizierten Hauptkettenfragmenten das im weiteren verwendete Hybridmodell dar. Neue freie Atome wurden im Abstand von 2,3-3,3 Å in Bezug auf Hauptkettenatome eingebaut und nach jeweils 10 *ARP/wARP*-Zyklen zu Hauptkettenbereichen vereinigt. Nach insgesamt 95 *ARP/wARP*-Zyklen wurde das untere Limit zum Entfernen freier Atome auf 1,2 Standardabweichungen in der ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}}$ )-Elektronendichtekarte abgesenkt. Erst nach Zyklus 96 - anstatt 95 - wurde zu Hauptkettenbereichen zusammengefaßt. Nach insgesamt 196 Zyklen mit *ARP/wARP* mußten die Kettenfragmente manuell entsprechend ihrer Monomerzugehörigkeit der Reihenfolge nach zugeordnet werden. Im letzten Schritt des Programms *ARP/wARP* wurden die kompletten Aminosäureseitenketten dem Modell hinzugefügt, wobei die von RABINKOV *et al.* (1994) publizierte Alliinasesequenz als Basis für die Zuordnung diente.

2.2.2.7.2 *Manueller Modellbau*

Weitere Strukturbereiche sowie Heteroatome („Nicht-Protein“-Atome: Kofaktoren, Inhibitoren, Zuckerketten, Ionen, Wassermoleküle) wurden manuell mit dem Programm *O* (JONES *et al.*, 1991) und mit Hilfe von *SIGMAA*-gewichteten ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Elektronen- und ( $mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Differenzelektronendichtekarten, für die asymmetrische Einheit aus jeweils aktueller Phaseninformation mit dem Programm *FFT* (IMMIRZI, 1966) erzeugt und mit dem Programm *MAPMASK* (CCP4, 1994) auf den tatsächlichen Umriß des Proteinmodells erweitert, vervollständigt. Fehlorientierungen des Imidazolrings bzw. der Säureamidgruppe der Seitenketten von Histidinen bzw. Asparaginen und Glutaminen konnten - soweit möglich - mit Bezug auf die Temperaturfaktoren der beteiligten Atome und optimalen Wasserstoffbrücken- Bindungspartnern korrigiert werden. Das Interpretieren von Heteroatomen wie Chlorid- und Sulfationen richtete sich zusätzlich auch nach einer anomalen ( $F_{\text{obs}}^+ - F_{\text{obs}}^-$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Differenzelektronendichtekarte, welche von einem bei der Röntgenwellenlänge von 2 Å vermessenen Kristall (Tab. 3.5, Spalte 3) und berechneter Phaseninformation ( $\alpha_{\text{calc}}$ ) aus dem Modellbau zur Verfügung stand. Die verwendeten Heteroatomgruppen entstammten entweder hochaufgelösten Beispielproteinen aus der Proteindatenbank (BERMAN *et al.*, 2000) wie z.B. für PLP, HEPES, Zuckermoleküle, Sulfate, oder wurden im Falle des  $\alpha$ -Aminoacrylats (AA) eigenhändig im Programm *SYBYL v6.7* (TRIPOS Inc., St. Louis, MO, USA) energieminiert konstruiert.

2.2.2.7.3 *Modellverfeinerung*

Zwischen den manuellen Bauzyklen sowie abschließend wurde das Modell mit dem Programm *REFMAC v4.0* (MURSHUDOV *et al.*, 1997) unter Beteiligung der Hilfsprogramme *MAKEDICT* sowie *PROTIN* (CCP4, 1994) verfeinert. Modifizierte Aminosäuren, welche entweder den Kofaktor (Lys), den Kofaktor mit Inhibitor (Lys) oder Zuckerketten (Asn) trugen, mußten dafür mittels *MAKEDICT* und manueller Editierung in die *REFMAC*-Verfeinerungsbibliothek („dictionary“) von festen Bindungslängen, -winkeln und Planaritätskenndaten übertragen werden. Dieser Vorgang wurde bis zu einem dritten Verfeinerungslauf mit den jeweils neuen Koordinaten wiederholt, bevor die modifizierten Aminosäuren für den vierten *REFMAC*-Lauf schließlich zuvor mit dem Programm *SYBYL* energieminiert und letztmalig in der Verfeinerungsbibliothek verändert wurden. Das Programm *PROTIN* war für die Übergabe der Verfeinerungsbibliothek als auch der Definition von *cis*-Prolin-Resten und Disulfidbrücken für *REFMAC* notwendig. Der Strukturverfeinerungsprozeß bestand in der ersten Runde aus zwei Phasen: Einer „*rigid body*“-Verfeinerung (Proteinmodell als starrer Körper betrachtet) im Auflösungsbereich 20-2,5 Å und einer „*restrained*“-Verfeinerung (Bindungslängen, -winkel und Planaritätskenndaten an „dictionary“-Werte angenähert) im Auflösungsbereich 20-1,53 Å bei

jeweils isotroper Temperaturfaktor-Verfeinerung. In späteren Runden kam nur noch die „*restrained*“-Verfeinerung zum Einsatz. Die experimentellen Meßdaten wurden anfangs mit 50 %, ab der dritten Runde mit 60 % in der Verfeinerung gewichtet. Die Reglementierungen zur maximalen Abweichung der Temperaturfaktoren für Atome entlang definierter Molekülbereiche (Haupt- oder Seitenkette) wurden mit den gesetzten Limits von 1,5 / 2,5 / 5,0 / 10,0 Å<sup>2</sup> [Werte für Hauptkettenbindungen / Hauptkettenwinkel / Seitenkettenbindungen / Seitenkettenwinkel] leicht gegenüber den Standardwerten gelockert. Ein Testsatz von 2 % der unabhängigen Reflexe (3190 Reflexe), die nicht einen Teil des regulären („working“) Reflexsets darstellten, diente zur objektiven Einschätzung des Verfeinerungsverlaufs über die Ausgabe des R<sub>free</sub>-Faktors (BRÜNGER, 1992).

$$R_{\text{free}} = 100 \sum_{\text{hkl}(\text{free})} \left| |F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}| \right| / \sum_{\text{hkl}(\text{free})} |F_{\text{obs}}| \quad [\%]$$

Daneben wurde auch der aus den Reflexen des regulären („working“) Reflexsets berechnete R<sub>work</sub>-Faktor zur Einschätzung des Verfeinerungsgangs genutzt.

$$R_{\text{work}} = 100 \sum_{\text{hkl}(\text{work})} \left| |F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}| \right| / \sum_{\text{hkl}(\text{work})} |F_{\text{obs}}| \quad [\%]$$

Eine weitere qualitative Beurteilung des jeweiligen Zwischenmodells sowie des finalen Modells wurde anhand der Testprogramme *PROCHECK* (LASKOWSKI *et al.*, 1993), *WHAT IF / WHAT CHECK* (VRIEND, 1990; HOOFT *et al.*, 1996) und *SFCHECK* (VAGUINE *et al.*, 1999) getroffen.

### **2.2.2.8 Strukturmodellbau und -verfeinerung - Kristallform III**

#### *2.2.2.8.1 Initiales Modell*

Das aus der Methode des molekularen Ersatzes erhaltene Modell enthielt bereits die komplette, aus Kristallform IV verfügbare Proteinhauptkette samt Aminosäureseitenketten.

#### *2.2.2.8.2 Manueller Modellbau*

Analog wie für Kristallform IV unter Kapitel 2.2.2.7.2 beschrieben, erfolgte auch hier die Korrektur sowie Interpretation von Strukturbereichen und Heteroatomen anhand der entsprechenden (2mF<sub>obs</sub>-DF<sub>calc</sub>, α<sub>calc</sub>)-Elektronen- und (mF<sub>obs</sub>-DF<sub>calc</sub>, α<sub>calc</sub>)-Differenzelektronen-dichtekarten. Benötigte Heteroatome wie PLP, AA, Chlorid und Zucker wurden der Struktur von Kristallform IV entlehnt und mit dem Programm *LSQKAB* (KABSCH, 1976) in ihrer Position vororientiert.

#### *2.2.2.8.3 Modellverfeinerung*

Die Verfeinerung über fünf Runden wurde, analog wie für Kristallform IV in Kapitel 2.2.2.7.3 erläutert, mit den Programmen *MAKEDICT*, *PROTIN* (CCP4, 1994) und *REFMAC v4.0* (MURSHUDOV *et al.*, 1997) ausgeführt. Die *REFMAC*-Verfeinerungsbibliothek („dictionary“)

wurde dazu um den Eintrag eines Phosphatmoleküls, das der Cambridge Strukturdatenbank (www.csdb.com) entnommen wurde, erweitert. Die experimentellen Meßdaten wurden mit 25 % Beitrag gewichtet. Der Reflextestsatz zur Berechnung des freien R-Faktors ( $R_{\text{free}}$ , BRÜNGER, 1992) enthielt 3 % der unabhängigen Reflexe (1152 Reflexe). Eine Überprüfung des finalen Modells erfolgte mit den Testprogrammen *PROCHECK* (LASKOWSKI *et al.*, 1993), *WHAT IF / WHAT CHECK* (VRIEND, 1990; HOOFT *et al.*, 1996) und *SFCHECK* (VAGUINE *et al.*, 1999).

### **2.2.2.9 Strukturmodellbau und -verfeinerung - Kristallform I**

#### *2.2.2.9.1 Initiales Modell*

Wie schon bei Kristallform III zuvor, war das anfängliche Modell aus der Phasenbestimmung des molekularen Ersatzes vollständig, so daß gleich zur Verfeinerung übergegangen werden konnte.

#### *2.2.2.9.2 Modellverfeinerung*

In Anbetracht der niedrigen Auflösung der Meßdaten (4 Å) wurde das Modell mit dem Programm *REFMAC v4.0* (MURSHUDOV *et al.*, 1997) nur im „*rigid body*“-Modus verfeinert. Dazu wurden die beiden Dimere der asymmetrischen Einheit als voneinander unabhängige starre Körper definiert und die Temperaturfaktoren des Lösungsmittelbereiches im Programm auf den festen Wert von  $100 \text{ \AA}^2$  gesetzt. Der Reflextestsatz zur parallelen Bestimmung des freien R-Faktors ( $R_{\text{free}}$ , BRÜNGER, 1992) enthielt 7,5 % der unabhängigen Reflexe (993 Reflexe).

### **2.2.3 Vergleichende, modellierende und graphische Methoden**

#### *2.2.3.1 Sequenz- und Kristallstrukturvergleiche*

Paarweise bzw. multiple Alliinasesequenzvergleiche wurden mit dem Sequenzanalysepaket *UW-GCG v9.0* (DEVEREUX *et al.*, 1984) bzw. *INDONESIA* (MADSEN *et al.*, 2002; <http://xray.bmc.uu.se/~dennis/>) im Standardmodus und den Programmoptionen *bestfit* sowie *pileup* durchgeführt. Bei den der SWISS-PROT-Datenbank (BAIROCH & APWEILER, 1999) entnommenen, vollständigen und nicht redundanten Sequenzen handelte es sich im einzelnen um: Q01594 (*Allium sativum*, Knoblauch), P31757 (*Allium cepa*, Zwiebel), P31756 (*Allium ascalonicum*, Schalotte), Q9M7L9 (*Allium cepa*<sub>Wurzel</sub>, Zwiebel<sub>Wurzel</sub>), O04927 (*Allium tuberosum*, Chinesischer Schnittlauch), Q9FE98 (*Arabidopsis thaliana*, Ackerschmalwand), Q942G1 (*Oryza sativa*, Reis). Unvollständige Sequenzen lagen wie folgt vor: Q94EJ8 (*Allium fistulosum*, Winterzwiebel), Q94EJ9 (*Allium sativum*<sub>Wurzel</sub>, Knoblauch<sub>Wurzel</sub>), Q94EK1 (*Allium schoenoprasum*, Schnittlauch), Q944EK4 (*Allium chinense*, Chinesische Schalotte), Q94EK5 (*Allium wakegi*,

Wakegi), Q9SW84 (*Allium giganteum*, Riesenlauch). Für einen redundanten Vergleich zwischen *Allium sativum* und *Allium cepa* wurden zudem die Einträge Q41233 (*Allium sativum*, Knoblauch), Q43366 und Q995YV1 (*Allium cepa*, Zwiebel) herangezogen.

Dreidimensionale Strukturvergleiche erfolgten mit dem Internet-DALI-Server (HOLM & SANDER, 1993; <http://www2.ebi.ac.uk/dali/>) oder mittels der Programme *ALIGN* (COHEN, 1997) sowie *LSQKAB* (KABSCH, 1976).

Für einen strukturbasierten Sequenzvergleich wurden die aus *ALIGN* (Cohen, 1997) erhaltenen gegenübergestellten Sequenzen mit dem Programm *INDONESIA* (MADSEN *et al.*, 2002; <http://xray.bmc.uu.se/~dennis/>) hinsichtlich der Sequenzverwandtschaft geprüft.

Überlagerungen der kofaktorbindenden Aminosäuren sowie des PLP im aktiven Zentrum von Alliinase der Kristallform IV (Monomer B) mit entsprechenden Positionen verwandter Proteinstrukturen erfolgten mit dem Programm *LSQKAB* (KABSCH, 1976). Die Aminosäurereste wurden mit ihren C<sub>α</sub>-Positionen und innerhalb der PLP-Phosphat-bindenden  $\alpha$ -Helices zusätzlich mit den vollständigen Hauptkettenatomen überlagert. Die PLP-Moleküle wurden mit allen Atomen einbezogen.

#### **2.2.3.2 Molekülgröße, lösungsmittelzugängliche Oberflächen**

Zur Ermittlung der Raumdimensionen wurde auf die Ausgabe der kleinsten Molekülzelle der Programmoption *tabling* aus *AMORE* (NAVAZA, 1994) zurückgegriffen und zu den x-, y- und z-Werten je 2 Å für die van-der-Waals-Radien der Randatome addiert. Die quantitative Berechnung von lösungsmittelzugänglichen Proteinoberflächen wurde mit dem Programm *AREAIMOL* (LEE & RICHARDS, 1971) umgesetzt.

#### **2.2.3.3 Interaktionslängen**

Die Längen der intramolekularen Domänen-, der intermolekularen Monomer- sowie der Kristallkontakte wurden mit dem Programm *CONTACT* (CCP4, 1994) ermittelt. Andere Distanzen wurden am Modell manuell im Programm *O* (JONES *et al.*, 1991) bestimmt.

#### **2.2.3.4 Winkelangaben**

Die Orientierungen der nicht-kristallographischen Symmetrieachsen in Bezug auf die Einheitszellachsen wurden in Form der Winkel zwischen den entsprechenden Achsen graphisch manuell bestimmt. Die Bindungswinkel zwischen Atomen wurden am Modell manuell im Programm *O* (JONES *et al.*, 1991) bestimmt. Im Falle von C–H $\cdots$  $\pi$ -Wasserstoffbrückenbindungen (BRANDL *et al.*, 2001) wurden dem Modell zuvor die theoretischen H-Atome mit dem Programm *HGEN* (CCP4, 1994) hinzugefügt.

### **2.2.3.5 „Offen-geschlossen“-Strukturvergleich**

Die Monomere der Kristallform IV-Alliinasestruktur wurden im ersten Schritt jeweils mit den Strukturen der „offenen“ (PDB: 7AAT; MCPHALEN *et al.*, 1992a) bzw. „geschlossenen“ (PDB: 1AMA; MCPHALEN *et al.*, 1992b) mitochondrialen Hühner-AAT mittels des Programms *ALIGN* (COHEN, 1997) im Standardmodus überlagert. Zuvor mußten die Alliinasemonomere sowie die AAT auf die Aminosäurereste 100-299 bzw. 74-312 reduziert werden. Der Bereich entsprach der zwischen Alliinase und AAT strukturell konservierten zentralen Domäne. Aus den erhaltenen Rotationsmatrizen und mit Hilfe des Programms *LSQKAB* (KABSCH, 1976) wurden neue, vollständige Alliinasemonomere erzeugt. Im zweiten Überlagerungsschritt mit dem Programm *ALIGN* (COHEN, 1997) wurden nur die C-terminalen Domänen von Alliinase und AAT berücksichtigt, entsprechend den Aminosäureresten 300-425 (A-Monomer) [300-427, B-Monomer] bzw. 313-410. Der dabei für die resultierende Rotationsmatrix alternativ ausgegebene Winkelrotationswert entlang eines Vektors wurde als Maß der Strukturähnlichkeit der Alliinasemonomere mit den „offen/geschlossen“-Strukturen der AAT erachtet.

### **2.2.3.6 Substratmodellierung**

Die möglichen Bindungsmodi des Substrates Alliin im aktiven Zentrum von Alliinase beruhten auf der Kristallform IV-Struktur. Hierbei dienten die Carbonylgruppe, das C $\alpha$ - und das N-Atom des gebundenen AA-Moleküls als Ausgangspunkt für die Modellierung der verschiedenen Stereoisomere des Alliins mittels des Programms *SYBYL v6.7* (TRIPOS Inc., St. Louis, MO, USA). Die Moleküle wurden dazu in *SYBYL* aufgebaut und anschließend nur in ihren C $\alpha$ -C $\beta$ -S $\gamma$ -C $\delta$ -Torsionswinkeln verändert. Vor der Darstellung im Molekülgrafikprogramm mußten die Koordinaten der Substratmodelle bzw. des Alliinasedimers mit dem Programm *LSQKAB* (KABSCH, 1976) auf den gleichen Koordinatenursprung bewegt werden, da die anfängliche Orientierung in *SYBYL* verloren ging.

### **2.2.3.7 Erstellung von Abbildungen**

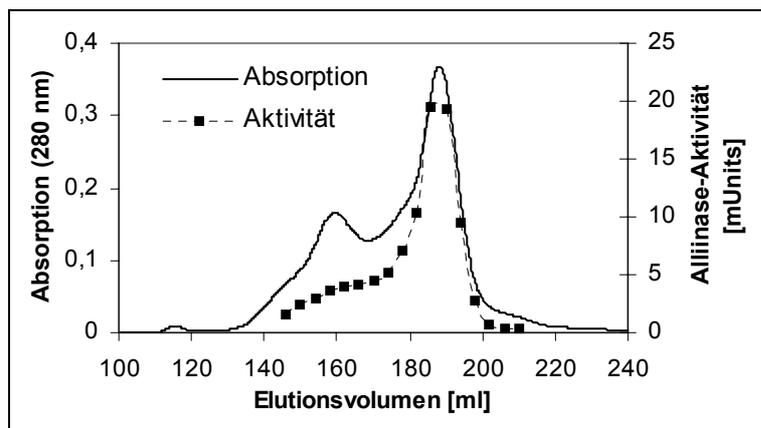
Schematische Abbildungen wurden mit dem Programm *COREL DRAW v9.0* (Corel Corporation, 1999), Liniendiagramme mit dem Programm *MS-EXCEL 2000* (Microsoft, 1999), Formeldiagramme mit dem Programm *ISIS-DRAW v2.4* (MDL Information Systems, 2001) sowie Proteinstrukturen und Elektronendichtedarstellungen mit dem Programm *PY-MOL v0.86-0.95* (DELANO, 2002) hergestellt und z.T. mit dem Programm *PHOTOSHOP v5.5* (Adobe Systems, 1999) arrangiert. Andere, hier nicht genannte Ressourcen sind bei den jeweiligen Abbildungen erwähnt. Postskriptformate wurden mit dem Programm *GVIEW v4.31* (Ghostgum Software, 2003) in andere Grafikformate konvertiert.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Qualitäts- und Aktivitätstests

##### 3.1.1 Alliinase-Identitätstest

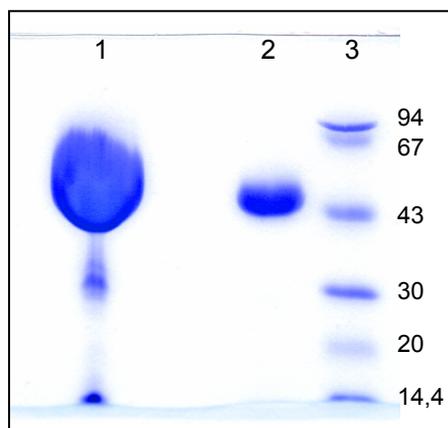
Im letzten Reinigungsschritt (Gelfiltration) korrelierte das zweite Absorptionsmaximum des Elutionsdiagramms eindeutig mit der parallel von einzelnen Fraktionen vermessenen Alliinaseaktivität. Die entsprechenden Fraktionen mit höchster Aktivität wurden weiterverwendet.



**Abb. 3.1** Elutionsprofil der Gelfiltration. Für ausgewählte Fraktionen wurde die Alliinase-Aktivität vermessenen.

##### 3.1.2 Reinheitsüberprüfung

Die Verifizierung mittels SDS-PAGE (Abb. 3.2) erbrachte, daß die präparierte Alliinaselösung ausreichend sauber und für die geplante Kristallisation geeignet war. Hingegen bedenklich in Bezug auf die molekulare Reinheit waren die Resultate, welche aus einer isoelektrischen Fokussierung vorlagen. Die Proteinlösung offenbarte sich als ein Gemisch von verschiedenen Ladungsspezies und zeigte ein multiples Bandenmuster in der IEF-PAGE (vergleiche dazu Abb. 3.10, Kapitel 3.3.5).



**Abb. 3.2** SDS-PAGE von Alliinase. Die Spuren des Polyacrylamidgels (12,5 %) enthalten: 1. = 50 µg Alliinase, 2. = 5 µg Alliinase, 3. = Molekulargewichtsstandardproteingemisch mit Angabe des Molekulargewichts in kD.

### 3.1.3 Alliinasen verschiedener Knoblauch-Herkunftsgebiete

Im Laufe der Arbeit wurde Alliinase aus Knoblauchknollen französischer, deutscher, spanischer und ägyptischer Herkunft präpariert. Dabei offenbarte sich in Bezug auf die maximale spezifische Aktivität des Enzyms eine Tendenz nach der Reihenfolge ägyptische > deutsche > spanische > französische Knollen (Tab. 3.1). Bis auf eine Ausnahme (letzte Präparation mit deutschem Knoblauch) erzielten frische Pflanzen, die noch eine grünfleischige Schale aufwiesen, die höheren Enzymaktivitäten, allen voran die Alliinase aus frischen ägyptischen Zehen mit 660 Units/mg.

**Tab. 3.1** Spezifische Enzymaktivitäten von Alliinasen verschiedener Präparationen regionaler Knoblauchpflanzen.

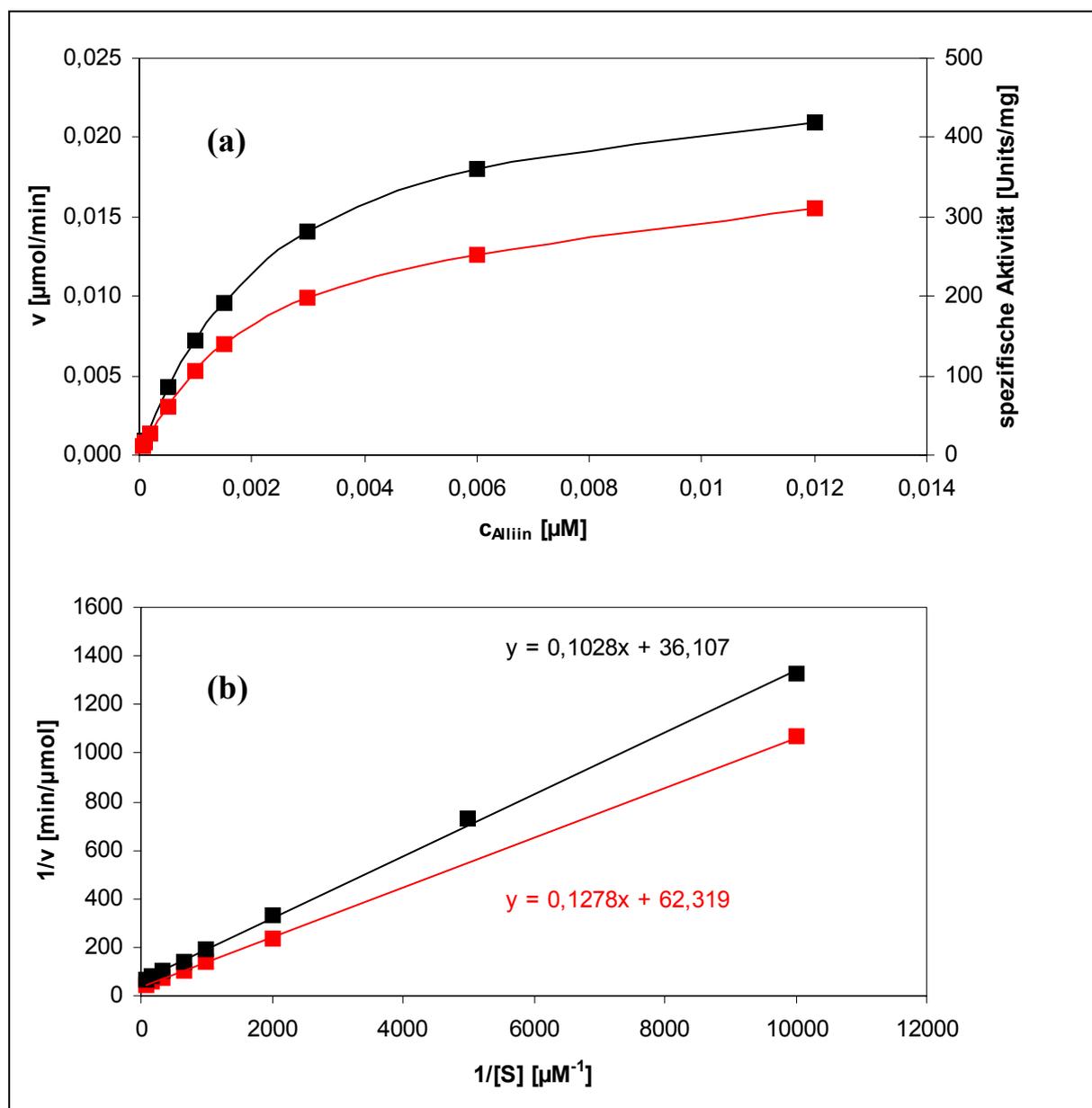
Herkunft	Spez. Aktivität [Units/mg]
Spanien <sup>a</sup>	419 ± 4
Spanien <sup>a</sup>	411 ± 6
Ägypten <sup>f</sup>	660 ± 16
Frankreich <sup>a</sup>	349 ± 8
Spanien <sup>a</sup>	446 ± 20
Deutschland <sup>f</sup>	556 ± 16
Ägypten <sup>a</sup>	437 ± 15
Frankreich <sup>a</sup>	360 ± 4
Deutschland <sup>f</sup>	252 ± 7

<sup>a</sup> = abgetrocknete, weiße Knollen,

<sup>f</sup> = frische, grüne Knollen.

### 3.1.4 MICHAELIS-MENTEN-Kinetik

Von den beiden letzten in Tab. 3.1 aufgeführten Alliinasen französischer bzw. deutscher Herkunft wurden aus den Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen (Abb. 3.3a) die kinetischen Parameter wie die MICHAELIS-MENTEN-Konstante ( $K_M$ ), die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ), die Enzymwechselzahl ( $k_{cat}$ ) sowie die enzymatische Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) aus LINEWEAVER-BURK-Plots (Abb. 3.3b) oder mittels des Programms *EZ-Fit* bestimmt (Tab. 3.2.). Danach erreichte die französische Probe Kinetikwerte, die für eine schnellere und effektivere Substratumsetzung sprechen. Eine Ausnahme bildet anscheinend der durch lineare Regression bestimmte  $K_M$ -Wert der deutschen Alliinase; allerdings lieferte die nicht-lineare Regression den höheren  $K_M$ -Wert.



**Abb. 3.3** Reaktionsgeschwindigkeit- und LINEWEAVER-BURK-Plots der Alliinasereaktion. Zur Messung gelangte Alliinase aus Knollen deutscher (-■-) und französischer (-■-) Herkunft. (a) Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit verschiedener Alliinkonzentrationen, (b) LINEWEAVER-BURK-Plots mit Angabe der Regressionsgeradenfunktion.

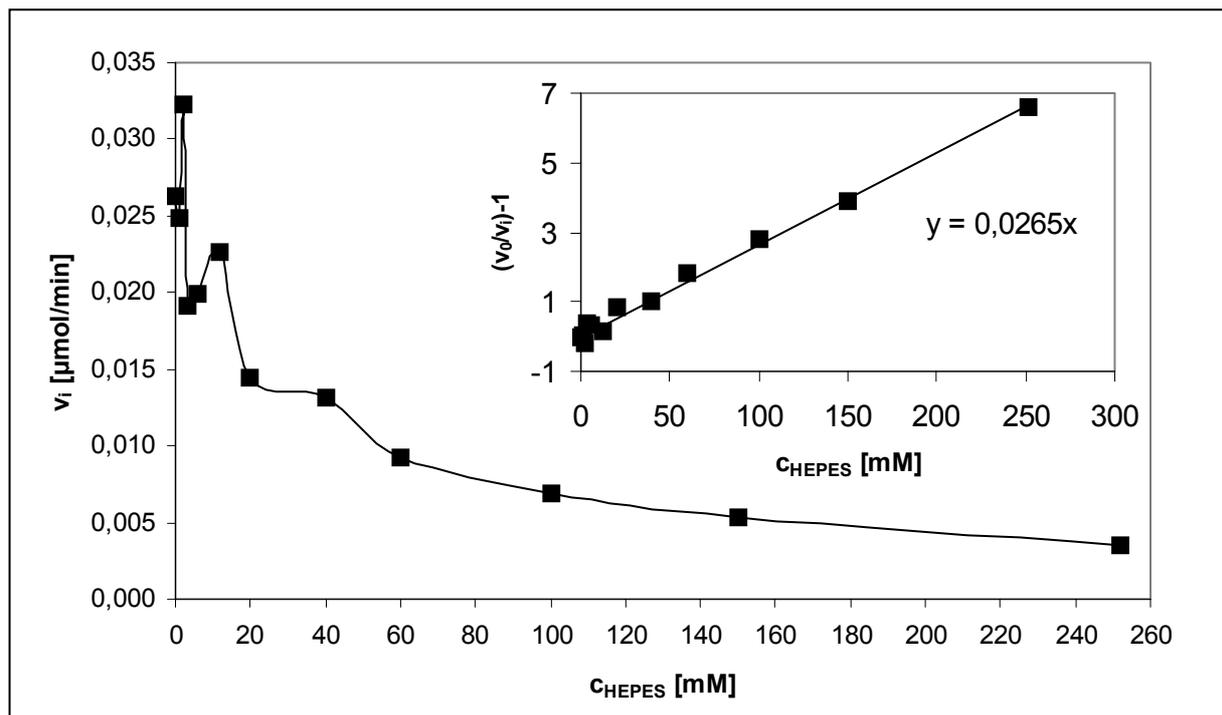
**Tab. 3.2** Kinetische Enzymparameter von Alliinasen verschiedener Knoblauchherkunft.

Herkunft	$K_M$ [mM]	$v_{\max}$ [mUnits]	$v_{\max}$ [Units/mg]	$k_{\text{cat}}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{\text{cat}}/K_M$ [(M·s) <sup>-1</sup> ]
Frankreich	2,8 (2,4)	27,7 (25,1)	554 (502)	499 (452)	$1,7 \cdot 10^5$ ( $1,9 \cdot 10^5$ )
Deutschland	2,1 (2,6)	16,0 (18,6)	320 (372)	288 (335)	$1,4 \cdot 10^5$ ( $1,3 \cdot 10^5$ )

Werte in runden Klammern entstammen nicht-linearer Regression, wogegen die übrigen Werte basierend auf linearer Regression ermittelt wurden.

### 3.1.5 $K_i$ -Bestimmung von HEPES

Die Puffersubstanz HEPES zeigt inhibitorische Wirkung auf die Alliinaseaktion, wie am Beispiel des Enzyms aus deutschem Knoblauch (letzter Eintrag, Tab. 3.1) belegt werden konnte und in Abb. 3.4 zu sehen ist. Allerdings fällt auf, daß im Bereich unterhalb von 60 mM auch z.T. ungewöhnliche aktivatorische Einflüsse zu Tage treten. Aus der Auftragung von  $(v_0/v_i)-1$  über  $c_{\text{HEPES}}$  konnte der Wert für  $K_{i(\text{app})}$  mit  $0,0265 \text{ mM}^{-1}$  bestimmt werden. Aus diesem ergibt sich, je nach zugrunde gelegter Regressionsmethode (linear bzw. nicht-linear) zur Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante  $K_M$ , ein  $K_i$ -Wert von 6,9 bzw. 8,0 mM. Der Wert sollte jedoch mit Vorsicht behandelt werden, da er sich in einem Konzentrationsbereich wiederfindet, der von relativer HEPES-Aktivierung gekennzeichnet ist. Trotzdem ist von einer inhibitorischen Wirkung von HEPES auszugehen und im Hinblick auf die üblicherweise verwendeten Pufferkonzentrationen von 100 mM ist eine Beeinträchtigung der Alliinase-Reaktionsgeschwindigkeit und ein Rückgang auf ca. ein Viertel des Ausgangswertes (Abb. 3.4) in jedem Fall gegeben.

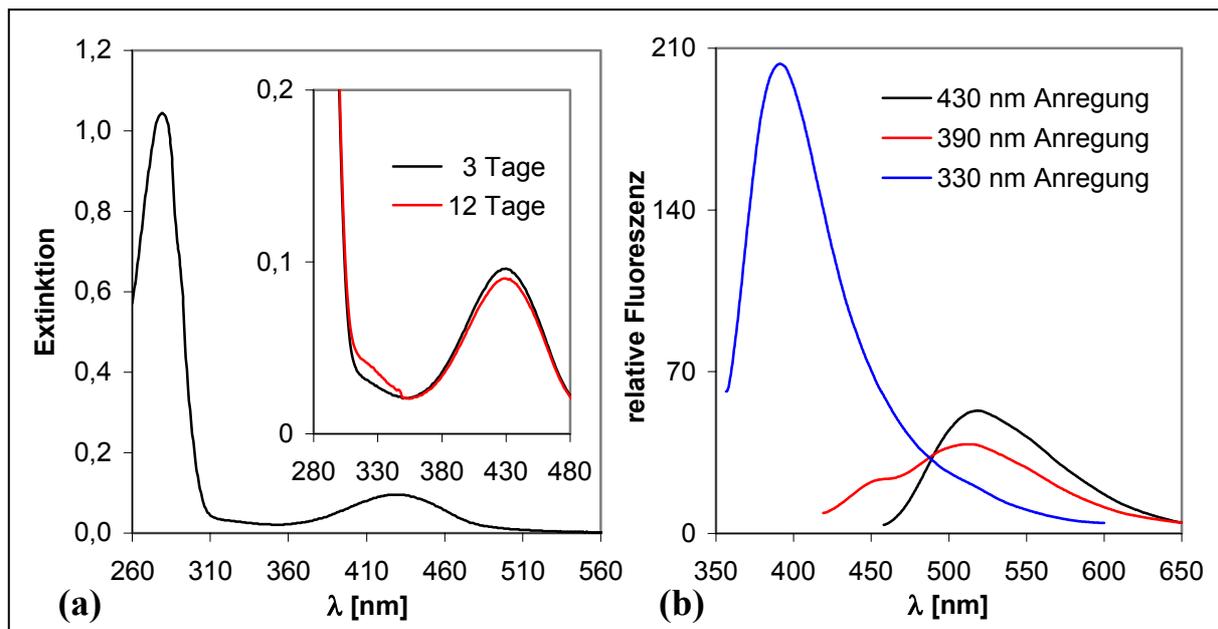


**Abb. 3.4** Alliinaseaktivität unter HEPES-Einfluß. Das kleinere, eingesetzte Diagramm verdeutlicht die  $K_i$ -Bestimmung mittels linearer Regression; die Funktion der Regressionsgeraden ist zusätzlich wiedergegeben.

### 3.2 UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektroskopie

Eine AlliinaseLösung mit der Konzentration 1 mg/ml zeigte im Spektrum von 260-560 nm zwei charakteristische Banden bei 280 und 430 nm, wobei das Verhältnis der beiden Extinktionswerte ca. 10:1 betrug (Abb. 3.5). Wurde die EnzymLösung 12 Tage bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt, so ist das Auftreten einer schwachen Schulter bei 330 nm, verbunden mit einer Intensitätsabnahme der 430 nm-Bande, zu beobachten (Abb. 3.5a).

Erfolgte eine Fluoreszenzanregung mit 430 nm, so emittierte die Alliinase ein Spektrum, das ein Maximum bei 519 nm aufwies (Abb. 3.5b). Wurde dagegen eine kürzere Wellenlänge von 390 nm gewählt, so war die in der Intensität schwächere Fluoreszenzbande hypsochrom zu 511 nm verschoben und zeigte eine Schulter bei ca. 460 nm (Abb. 3.5b). Eine weitere Verringerung der Anregungswellenlänge auf 330 nm, entsprechend der 330 nm-Schulter des UV/Vis-Spektrum der 12 Tage alten Alliinase (Abb. 3.5a), führte zu einer stark ausgeprägten Fluoreszenzbande bei 391 nm (Abb. 3.5b).



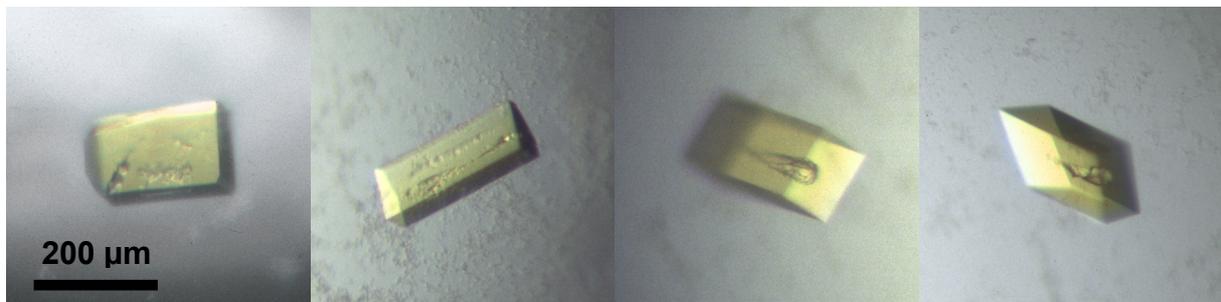
**Abb. 3.5** UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektren der Alliinase. **(a)** UV/Vis-Spektrum, der eingesetzte Bereich zeigt einen Ausschnitt vergrößert und weist zusätzlich den Extinktionsverlauf für eine 12 Tage alte Proteinprobe auf. **(b)** Emissionsspektren bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen.

### 3.3 Kristallisation

Die gegebenen Voraussetzungen zur Kristallisation eines naturbelassenen, pflanzlichen Glykoproteins mit bekannter Mikroheterogenität in der IEF stellten eine ernstzunehmende Herausforderung dar. Allerdings bildeten die schon gefundenen, initialen Kristallisationsbedingungen (KÜTTNER, 1999) eine solide Basis zur weiteren Verbesserung der Kristallqualität. Essentiell und mit kaum einer Ausnahme zeigte sich der Anspruch der Kristallisationsfähigkeit an die „Frische“ der Alliinase. Ein nur wenige Tage zuvor (< 1 Woche) präpariertes Protein war die beste Voraussetzung. Als ebenfalls förderlich erwies sich für alle Kristallformen die Verwendung des Inhibitors S-Ethyl-L-cystein (JANSEN *et al.*, 1989b), ohne dessen Zugabe (1 mM) die Reproduzierbarkeit deutlich zurückging. Die Alliinase konnte in vier Kristallformen kristallisiert werden: zwei monoklinen und zwei orthorhombischen.

#### 3.3.3 Kristallform I - P2<sub>1</sub>

Die Ausgangsposition zur weiteren Optimierung bildeten die bekannten Konditionen (KÜTTNER, 1999) der monoklinen Kristallform I (Tab. 3.3). Die durch Anwesenheit des Kofaktors gelb gefärbten Kristalle (Abb. 3.6) erschienen in Gegenwart von 16-20 % (w/v) PEG-4000, 6000 oder 8000, im sauren Milieu (0,1 M MES, mit NaOH auf pH 5,4-6,1 eingestellt) und einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml bei 4 °C innerhalb der ersten Nacht und wuchsen im Zeitraum von 2-3 Wochen auf etwa maximal 250 x 120 x 90 µm heran. Längere Exemplare waren mehr nadelförmig und in Breite und Schichtdicke weitaus schmaler. Dabei ist zu vermerken, daß die Kristalle stets in Gegenwart von diffussem bis feinkörnigem Proteinniederschlag entstanden. Eine Verlagerung des Ansatzes nach 20 °C führte zu noch mehr Niederschlag, verhinderte aber die Kristallisation nicht vollständig. Die Form der Kristalle erinnerte an einen länglichen Quader, der nicht selten eine abgeschrägte Kantenfläche aufwies. Zudem waren die Kristalle stets von Wachstumsstörungen in Form von teilweise eingeschlossenen Hohlräumen gekennzeichnet. Die Diffraktionsqualität der Kristalle erreichte auf der Labor-



**Abb. 3.6** Kristallphotos der Kristallformen I, II. Die ersten drei Kristalle (von links aus gezählt) gehören zu Form I, der vierte Kristall zu Form II.

## Ergebnisse

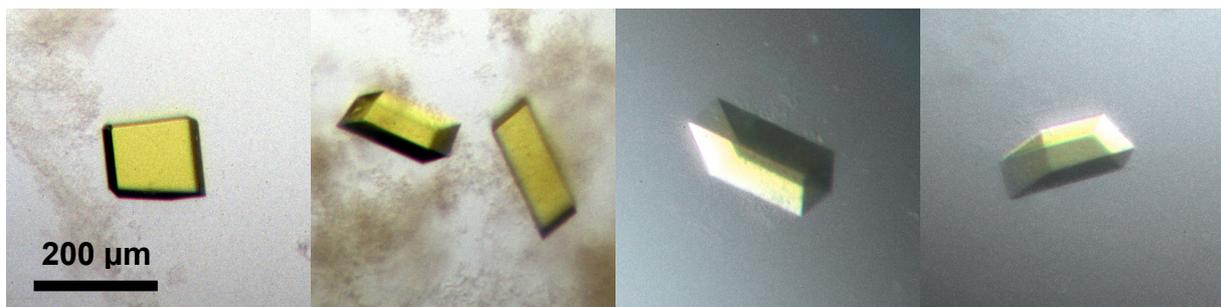
Röntgenanlage eine Auflösung von nur etwa 5,5 Å, bei Einsatz von Synchrotronstrahlung jedoch bis ca. 2,7 Å. Als monokline Raumgruppe konnte  $P2_1$  zugeordnet werden, da die 2n-Reflexe entlang der b-Achse das Vorliegen einer Schraubenachse belegten. Der Lösungsmittelgehalt (MATTHEWS, 1968) wies einen Wert von ca. 49 % auf, unter der Annahme daß vier Monomere je asymmetrischer Einheit vorlagen (Tab. 3.3). Die Reproduzierbarkeit dieser Kristallform war bei frischem Proteinmaterial hinreichend gut, jedoch profitierten ältere Chargen (> 2 Wochen bei 4 °C-Lagerung) oder zuvor eingefrorene Alliinase durch den Einsatz von Mikrokeimen („Microseeding“). Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte zudem ein Eindruck zur Korridorbreite der Kristallkeimbildungs- bzw. Kristallwachstumszone gewonnen werden. So trat spontane Kristallisation und damit verbundene Keimbildung erst ab 16-19 % (w/v) PEG auf, wogegen eingebrachte Mikrokeime schon bei 10-11 % des Fällungsmittels das Wachstum initiierten. Weiterhin fiel auf, daß pH-Werte von pH 5,7-6,1 auch mit höheren PEG-Konzentration (> 19 %) Kristalle lieferten. Die Mikrokeime wurden in Form einer Suspension (0,5 µl) aus wenigen (1-5) kleinen (< 100 µm) in 10-20 µl Originalreservoirlösung zerdrückten Kristallen den Tropfen zugefügt. Verdünnungsstufen von 50-200fach dieser Impflösung bewährten sich als am besten geeignet. Des weiteren mußten diese Suspensionen stets frisch zubereitet werden, um wirksam zu sein.

### **3.3.2 Kristallform II - C222<sub>x</sub>**

An einem unter ähnlichen Bedingungen (Tab. 3.3) wie Form I gewachsenen Kristall (Abb. 3.6, erster von rechts) wurde eine neue Raumgruppe (C222<sub>x</sub>) beobachtet (KÜTTNER, 1999). Morphologisch ließ sich der Kristall nicht von seinen im gleichen Kristallisationsansatz vorliegenden Form I-Begleitern unterscheiden. Eine mögliche Schraubenachse konnte infolge unzureichender Meßdaten nicht verifiziert werden. Aus den Parametern der Einheitszelle ging der vergleichsweise geringe Lösungsmittelgehalt (MATTHEWS, 1968) von 36 % hervor, bei einem Monomer pro asymmetrischer Einheit. Die Diffraktion des Kristalls reichte auf der Labor-Röntgenanlage bis ca. 3 Å Auflösung.

### 3.3.3 Kristallform III - P2<sub>1</sub>

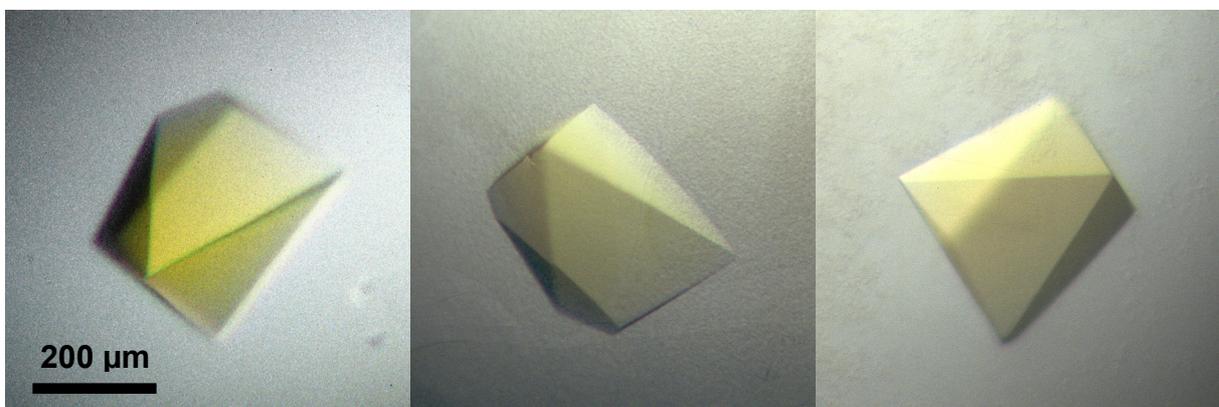
Bei den Anstrengungen, die bisherigen Kristalle mit einer Auflösung von 3 Å hin zum Ziel von mindestens 2 Å zu verbessern, brachte eine Negativerfahrung den entscheidenden Lösungsansatz. So wurde bei einer Präparationsserie mit spanischem Knoblauch das NaCl im Kristallisationspuffer beibehalten. Das Protein sollte dadurch, außer im Falle der pH-Pufferkomponente, keiner zu großen Schwankung der Ionenstärke beim Übergang von der Präparation hin zur Kristallisation ausgesetzt werden. Das Ergebnis war faktisch das Ausbleiben jeglicher Kristallisation und legte die Vermutung nahe, die Alliinase aus spanischem Knoblauch sei nicht kristallisierbar. Ungeachtet dessen zeigten die Kristallisationstropfen einen homogenen, feineren und z.T. weniger Proteinniederschlag als in Abwesenheit von NaCl. Eine Abhilfe schaffte hier wiederum das Einbringen von Mikrokeimen, die zunächst aus Kristallen der ohne NaCl gewachsenen Kristallform I zubereitet wurden. Später dienten ausschließlich schon unter NaCl-Anwesenheit entstandene Kristalle als Keimquellen. Sie bewiesen eine höhere Zuverlässigkeit bei der Entstehung von Kristallen. Bemerkenswert an denen unter sonst gleichen Kristallisationsbedingungen wie Kristallform I - mit Ausnahme des Zusatzes von 0,15 M NaCl (Tab. 3.3) - wachsenden Kristallen war ihre verbesserte Morphologie. Von der äußeren Form her blieb sie unverändert, jedoch waren die Kristalle meist makellos und kaum von Wachstumsstörungen betroffen (Abb. 3.7). Sie erschienen ebenfalls nach der ersten Nacht und benötigten einen ähnlich langen Zeitraum von 2-3 Wochen, um ihre etwas kleinere Endgröße von maximal 200 x 70 x 50 µm zu erreichen. Neben der vervollkommenen optischen Erscheinungsform vollzog sich auch auf der Ebene der Einheitszelle eine Zunahme der Kristallordnung: Die Raumgruppe blieb mit P2<sub>1</sub> bestehen, wie die starken 2n-Reflexe entlang der 0k0-Achse bestätigten. Es halbierte sich jedoch die Länge der c-Achse und auch die b-Achse nahm ab. Als Folge sank der Lösungsmittelgehalt (MATTHEWS, 1968) auf ca. 39 % ab unter der Annahme, daß die asymmetrische Einheit nur noch zwei Monomere enthielt (Tab. 3.3). Die Diffraktionsqualität dieser Kristallform lag um fast eine Å-Einheit höher als Typ I mit nunmehr 1,9 Å Auflösung (Abb. 3.11a, siehe Kapitel 3.4.4) bei Verwendung von Synchrotronstrahlung.



**Abb. 3.7** Kristallphotos der Kristallform III. Der Kofaktor färbt die Kristalle gelb.

### 3.3.4 Kristallform IV - $P2_12_12_1$

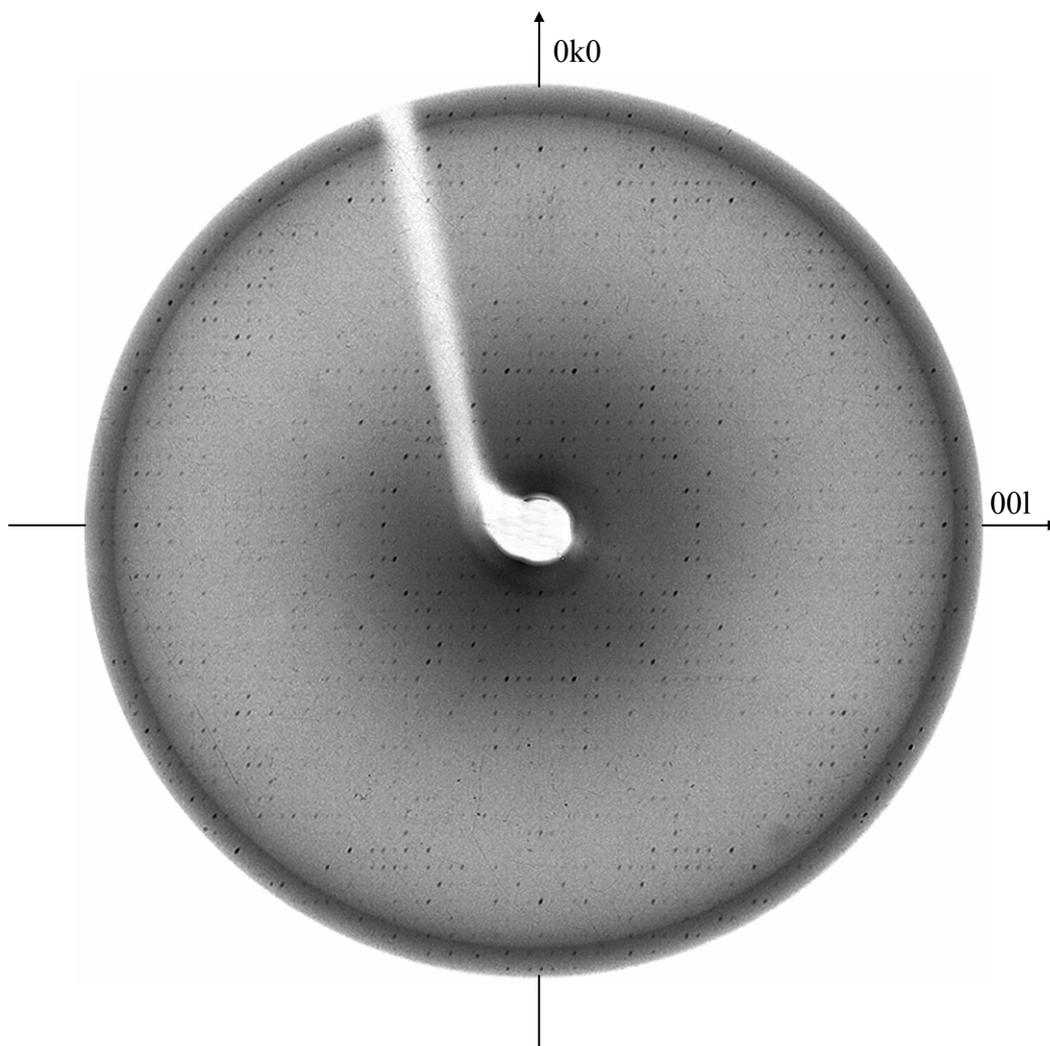
Die vierte und bisher beste Alliinase-Kristallform ist einem Temperaturwechsel zu verdanken. So führten planmäßige Testansätze mit dem Fällungsmittel Ammoniumsulfat mit Konzentrationen bis zu 3 M in der bisher bevorzugten Temperaturzone von 4 °C zu keinerlei beobachtbarem Ergebnis. Die Kristallisationstropfen blieben nach Monaten noch klar und unverändert. Nach 10 Monaten des Wartens, ohne den geringsten sichtbaren Proteinniederschlag in den Tropfen, drängte sich eine Temperaturveränderung und das Umstellen der Ansätze nach 20 °C auf. Nach weiteren drei Monaten ungestörter Ruhezeit ergaben sich kräftig gelb gefärbte Kristalle mit einem bipyramidalen Habitus (Abb. 3.8.). In wiederholten Experimenten konnte belegt werden, daß nicht die gestaffelten Temperaturen, sondern allein der höhere Wert von 20 °C ausschlaggebend war. Das Erscheinen der Kristalle lag mit 2-4 Wochen auch deutlich unter der anfänglichen Zeitspanne. Das Wachstum indes konnte sich über 1-2 oder mehrere Monate hinziehen und die Kristalle erreichten Größen bis zu vereinzelt 550 x 500 x 250 µm. Als positiv - jedoch nicht zwingend - erwies sich, wie schon bei Kristallform III, der Zusatz von NaCl zum Kristallisationsansatz. Nur war hier das Animpfen mit Mikrokeimen nicht nötig. Der tolerierte pH-Bereich war mit den Eckwerten pH 6,0 und 8,5 sehr breit, hingegen waren die erforderlichen Ammoniumsulfat-Konzentrationen von mindestens 3,0 M vergleichsweise hoch (Tab. 3.3). Oberhalb von 3,4 M nahm die Anzahl der Kristalle spürbar zu und die Größe entsprechend ab. Die orthorhombische Raumgruppe, der nun schon bis zu 1,5 Å Auflösung (Abb. 3.11b, siehe Kapitel 3.4) bei Einsatz von Synchrotronstrahlung bzw. 2,1 Å auf der laboreigenen Anlage streuenden Kristalle, wurde zu  $P2_12_12_1$  bestimmt. Die drei Schraubenachsen konnten nicht nur anhand der gemessenen 2n-Reflexe für die 00l-, 0k0- und h00-Achse, sondern auch in einer klassischen Präzessionsaufnahme von einem Kristall bei Raumtemperatur für die 0kl-Ebene (Abb. 3.9) verifiziert wurden. Die Zelldimensionen eines auf 100 K gekühlten Kristalls waren im Vergleich zu einem bei Raumtemperatur vermessenen



**Abb. 3.8** Kristallphotos der Kristallform IV. Das PLP verleiht die gelbe Färbung.

## Ergebnisse

Exemplar erwartungsgemäß kleiner (Tab. 3.3), wobei sich die a-Achse hierbei mit über 2 % am komprimierbarsten zeigte. Das Volumen der Einheitszelle verringerte sich dabei um ca. 4 %. Entsprechend sank der Lösungsmittelgehalt (MATTHEWS, 1968) um 2 % auf ca. 50 % ab, unter der Annahme von zwei Allinasemonomeren in der asymmetrischen Einheit. Bei dieser Kristallform konnte durch den Einsatz von Mikrokeimen eine Ausnahme im Hinblick auf die nötige Verwendung von frischer Alliinase zur Kristallisation beobachtet werden. In der Regel überstand das Enzym das Einfrieren und die Lagerung bei -18 °C trotz 10%iger Glycerinzugabe nicht ohne erhebliche Einbußen seiner Kristallisationsfähigkeit. Diese konnte hier allerdings durch den Zusatz von 0,15 M NaCl fast auf ursprüngliches Niveau zurückgebracht werden.



**Abb. 3.9**  $11^\circ$ -Präzessionsdiffraktionsaufnahme der  $0kl$ -Ebene eines  $P2_12_12_1$ -Alliinasekristalls. Die Darstellung ist 1,5fach vergrößert zum Original, um die  $2n$ -Reflexe entlang der  $0k0$ - und  $00l$ -Achsen besser erkennen zu können.

**Tab. 3.3** Charakteristika der Alliinase-Kristallformen.

Kristallform	I	II	III	IV
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>	C222 <sub>x</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Kristallisationsbedingungen	16-20 % (w/v) PEG-4000, 6000, 8000; 0,1 M MES pH 5,4-6,1	16-20 % (w/v) PEG-4000, 6000, 8000; 0,1 M MES pH 5,4-6,1	16-20 % (w/v) PEG-4000, 6000, 8000; 0,1 M MES pH 5,4-6,1 0,15 M NaCl	3-3,4 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 0,1 M MES, HEPES, TRIS pH 6-8,5; (0,15 M NaCl)
Maximale Größe [mm]	0,25 x 0,12 x 0,09	0,2 x 0,1 x 0,05	0,2 x 0,07 x 0,05	0,55 x 0,5 x 0,25
Zellparameter				
a [Å]	56,0	55,7	57,0	68,4 (70,0) <sup>a</sup>
b [Å]	114,3	97,7	98,3	101,1 (102,0)
c [Å]	163,1	153,9	82,6	155,7 (156,8)
α [°]	90	90	90	90
β [°]	93,4	90	109,1	90
γ [°]	90	90	90	90
V <sub>m</sub> [Å <sup>3</sup> /Da] <sup>b</sup>	2,4	1,9	2,0	2,5 (2,6)
LM-Gehalt [%] <sup>c</sup>	48,7	36,2	38,9	50,4 (52,3)
Monomere/AE <sup>d</sup>	4	1	2	2

<sup>a</sup> Werte in runden Klammern beziehen sich auf den 294 K-Datensatz.

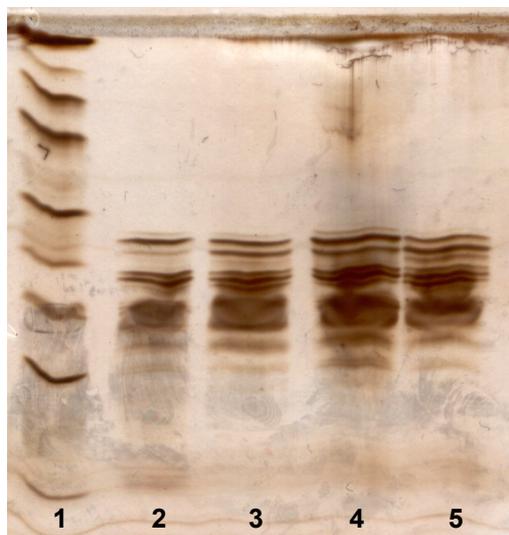
<sup>b</sup> V<sub>m</sub> = MATTHEWS-Koeffizient (MATTHEWS, 1968).

<sup>c</sup> LM-Gehalt = Lösungsmittelgehalt mit dem wahrscheinlichsten Wert (MATTHEWS, 1968) bei Annahme eines Molekulargewichts von 51500 für ein Proteinmonomer zuzüglich 5,5 % Glykosylierung (NOCK & MAZELIS, 1986) [54000].

<sup>d</sup> AE = Asymmetrische Einheit.

### 3.3.5 Mikroheterogenität der Kristalle

Die eingangs angesprochene Mikroheterogenität der Enzymlösung blieb erstaunlicherweise auch nach der Kristallisation erhalten. So offenbarten sich die IEF-Bandenmuster der drei Kristallformen I, III und IV als nahezu identisch mit der zur Kristallisation verwendeten Alliinaselösung, wie eine IEF-PAGE von wiederaufgelösten Kristallen belegte (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10** IEF-PAGE pH 3-9 von Alliinase und wiederaufgelösten Alliinasekristallen. Die Gelspuren enthalten: 1 = IEF-Standardproteinemix, 2 = Alliinaselösung vor Kristallisation, 3 = Form I-Kristall, 4 = Form III-Kristall und 5 = Form IV-Kristall.

## **3.4 Native Datensammlung und -prozessierung**

### **3.4.1 Kristallform I**

Ein Datensatz eines bis zu 2,7 Å Auflösung streuenden Kristalls der Form I ( $P2_1$ ) wurde bei 100 K am Speichering der ESRF in Grenoble (Frankreich) gesammelt. Dieser zeigte jedoch Beeinträchtigungen der Diffraktion durch das Vorliegen von störenden Eisringreflexen, hervorgerufen durch eine inhomogene Schockkühlung in Gegenwart von Paraffinöl und der Eisbildung am Kristall. Infolgedessen lagen die auswertbare Auflösung bei 4 Å und die Meßdaten bei 87 % Vollständigkeit (Tab. 3.4).

### **3.4.2 Kristallform II**

Ein Kristall der Form II, welcher unter Anwendung der Ghee-Prozedur auf 100 K tiefgekühlt wurde, zeigte auf der Labor-Röntgenanlage nach einmaliger Schockkühlung kaum Diffraktion. Diese entwickelte sich erst nach dreimaligem Wechsel von Schockkühlen, Auftauen und Ghee-Waschung des Kristalls auf bis ca. 3 Å. Leider ließen sich nur die ersten 22 Meßaufnahmen (Tab. 3.4) zur Datenauswertung verwenden, da der Kristall rasch an Diffraktion verlor. Folglich war eine weiterführende kristallographische Charakterisierung der Raumgruppe  $C222_x$  nicht möglich.

### **3.4.3 Kristallform III**

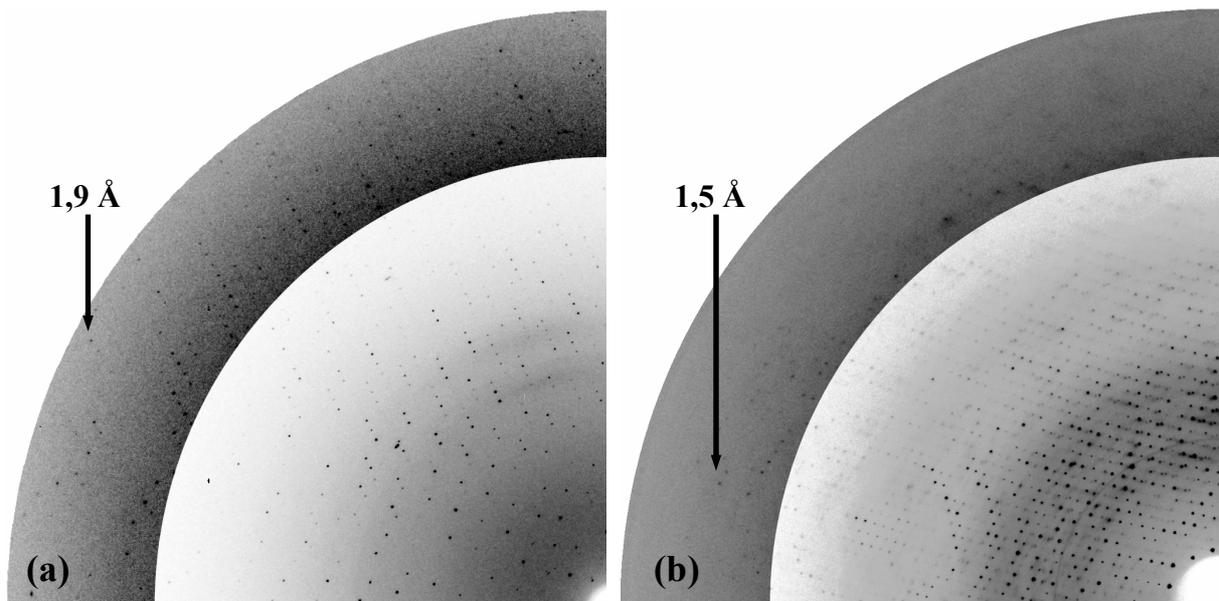
An einem Exemplar der dritten Kristallform mit der Raumgruppe  $P2_1$  wurden am Hamburger DESY Messungen bis zu einer maximalen Auflösung von etwa 1,9 Å (Abb. 3.11a) vorgenommen. Die Schockkühlung auf eine Temperatur von 100 K erfolgte unter Verwendung des Gefrierschutzmittels Paraffinöl. Aufgrund des Versagens der Stickstoffkühlung als Folge eines Pumpenschadens mußte die Datensammlung bei nur 78 % Vollständigkeit (Tab. 3.4) vorzeitig abgebrochen werden, da Eisbildung am Kristall mit verbundenem Diffraktionsverlust auftraten.

### **3.4.4 Kristallform IV**

Ein Kristall der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  wurde am Hamburger DESY bei 100 K unter Verwendung des Gefrierschutzmittels Paraffinöl vermessen. Hierbei gelang es, Daten bis zu einer Auflösung von 1,5 Å (Abb. 3.11b) zu sammeln, wobei nacheinander zwei verschiedene Röntgenstrahlungsdosen zum Einsatz kamen. Es ergaben sich aus diesem Grund zwei Teildatensätze für die Reflexe der höheren (bis 1,53 Å) bzw. der mittleren (bis 2 Å) Auflösung, wel-

## Ergebnisse

che anschließend in einem hinreichend redundanten, vollständigen Datensatz zusammengefaßt wurden (Tab. 3.4). Die Kristalle der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  erwiesen sich auch im ungekühlten Zustand (294 K) als ausreichend langzeitstabil gegenüber der Röntgenstrahlung der Laboranlage und erreichten eine Diffraction mit 2,1 Å maximaler Auflösung. Vor diesem Hintergrund war es möglich, einen Datensatz bei Raumtemperatur (Tab. 3.4, Spalte 3) zu sammeln, der ähnlich redundant wurde wie die Synchrotronmessung dieser Kristallform. Während des Vorhabens, die Diffraktionsauflösung weiter zu steigern, konnte beim Test von Kristallen mit mehr als 300 µm maximaler Kantenlänge ein Versagen des Gefrierschutzmittel Paraffinöl beobachtet werden. Diese Kristalle wiesen stets - auch bei längerer Tränkzeit - einen Eisreflexering in der Diffraction auf. Jedoch bot sich hier alternativ das einstündige Tränken der Kristalle in einer Lösung, die sich aus den Komponenten der Reservoirlösung plus zusätzlich 10 % (v/v) Glycerin zusammensetzte, an. Allerdings konnte durch die größeren Kristalle kein Hinzugewinn beim Diffraktionslimit von 1,5 Å verbucht werden.



**Abb. 3.11** Oszillationsdiffraktions-Ausschnitte von Kristallen der Kristallformen III, IV. (a) III =  $P2_1$  (Details siehe Tab. 3.3), (b) IV =  $P2_12_12_1$  (Details siehe Tab. 3.3). Ein äußerer Ringbereich ist nachträglich abgedunkelt worden, um die für die erreichte Auflösung (siehe Pfeile) relevanten Reflexe besser sichtbar zu machen. Es ist zu beachten, daß die Aufnahmen nicht im Originalmaßstab wiedergegeben werden konnten.

**Tab. 3.4** Datensammlungs- und Prozessierungsstatistiken der *Alliinase*-Kristallformen.

Kristallform	I	II	III	IV	IV
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>	C222 <sub>x</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Temperatur [K]	100	100	100	100	294
Anzahl Kristalle	1	1	1	1	1
pH-Wert (Puffer)	6,0 (MES)	5,9 (MES)	6,0 (MES)	7,4 (HEPES)	7,0 (HEPES)
Größe [µm]	190x120x90	170x100x40	200x70x50	300x300x200	550x350x250
Röntgenquelle	ID14.2 (ESRF)	Drehanode	X11 (DESY)	BW7B (DESY)	Drehanode
λ [Å]	0,9326	1,5418	0,9080	0,8423	1,5418
Detektortyp	MARCCD	MAR300	MARCCD	MAR345	MAR345
Krist. <=> Detekt. [mm]	180	280	240	230+260	175
Δφ [°] / Aufnahme	1	1	1	1	0,75
Anzahl Aufnahmen	182	22	93	205+205	200
Maximale Auflösung [Å]	4,0	3,2	1,87	1,53	2,1
Äußerste Schale [Å]	4,09-4,0	3,31-3,2	1,91-1,87	1,56-1,53	2,15-2,1
Reflexe insgesamt <sup>a</sup>	41324	n.b. <sup>b</sup>	125292	928820	391419
Unabhängige Reflexe <sup>a</sup>	14551	n.b.	55570	160747	66312
Redundanz <sup>a</sup>	2,8 (1,7) <sup>c</sup>	n.b.	2,3 (1,9)	5,8 (3,7)	5,9 (5,6)
Vollständigkeit [%]	86,5 (53,9)	n.b.	78,3 (79,9)	98,9 (99,6)	99,8 (100)
I/σ	11,8 (7,5)	n.b.	13,1 (2,1)	20,3 (2,1)	14,8 (3,8)
Mosaizität [°]	1,44	n.b.	1,11	0,54	0,24
R <sub>merge</sub> [%]	6,6 (8,7)	n.b.	5,6 (36,2)	5,5 (51,0)	9,5 (42,8)
R <sub>rim</sub> [%] <sup>a</sup>	7,7 (12,8)	n.b.	7,0 (47,7)	6,0 (59,3)	10,5 (48,0)
R <sub>pim</sub> [%] <sup>a</sup>	4,2 (8,2)	n.b.	4,2 (30,7)	2,2 (29,5)	4,3 (20,1)
WILSON-B-Faktor [Å <sup>2</sup> ] <sup>d</sup>	n.b.	n.b.	18,2	20,7	25,1

<sup>a</sup> Werte mit dem Programm *RMERGE* (WEISS & HILGENFELD, 1997; WEISS, 2001) berechnet.

<sup>b</sup> n.b. = nicht bestimmt.

<sup>c</sup> Angaben in runden Klammern beziehen sich auf die äußerste Auflösungsschale.

<sup>d</sup> Werte aus den WILSON-Plots des Programms *TRUNCATE* (FRENCH & WILSON, 1978) entnommen.

## **3.5 Lösen des Phasenproblems, Strukturmodellbau, Verfeinerung**

### **3.5.1 Kristallform IV**

#### ***3.5.1.1 Herstellung von Schweratomderivat-Kristallen***

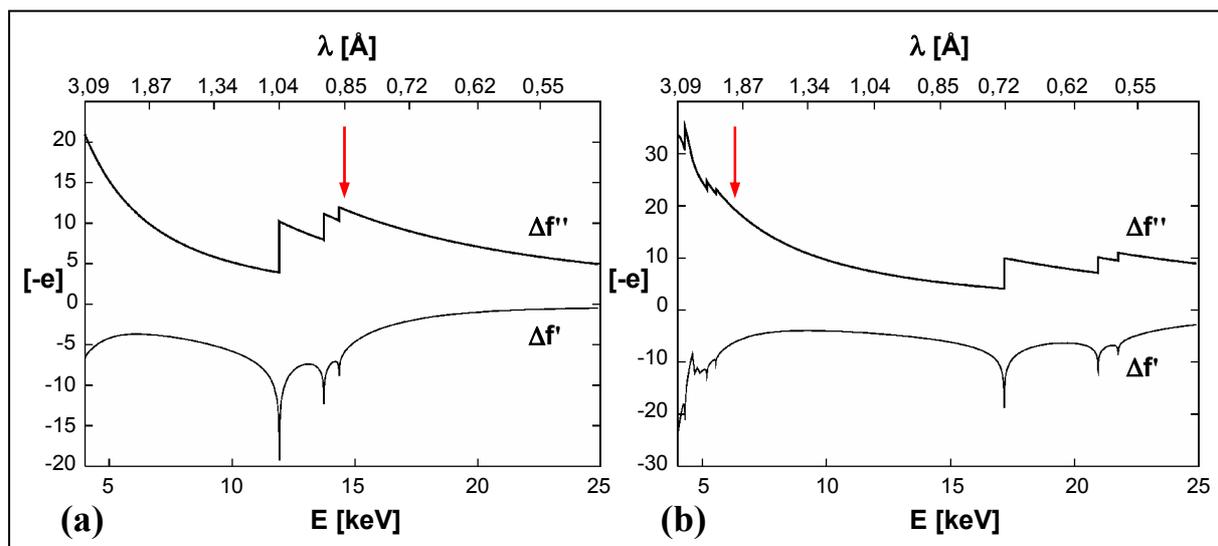
Die Kristallform IV mit der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  stellte den geeignetsten Testkandidat für die Suche nach möglichen Schweratomderivaten dar, da sie aufgrund ausgezeichneter Reproduzierbarkeit und Diffraktionsverhalten den anderen Kristallformen weit überlegen war. Es zeigte sich in Versuchen, bei denen die Kristalle in mit Schweratomsalzen substituierten Reservoirlösungen getränkt wurden, daß einzelne Verbindungen in millimolaren Konzentrationen einwirken konnten, ohne den Kristallen äußerlich sichtbaren Schaden zuzufügen. Andererseits gab es mit Uranylacetat,  $UO_2(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ , und Kaliumtetrachloroaurat,  $K[AuCl_4]$ , auch sehr aggressive Stoffe, die schon bei 1 mM und darunter zur Zerstörung der Kristalle führten. Es wurde daher auf die Kokristallisation in Gegenwart (1 mM) der beiden Verbindungen zurückgegriffen. Die verwendeten Konzentration des Fällungsmittels Ammoniumsulfat blieben mit 3,3 M konstant und der pH-Wert wurde im Bereich pH 5,4-9,0 variiert. Die erhaltenen Kristalle sahen identisch aus zu der nativen Form, nur blieben sie mit deutlich unter 200  $\mu m$  maximaler Kantenlänge hinter deren Größe zurück.

#### ***3.5.1.2 Datensammlung an Schweratomderivat-Kristallen***

Schließlich wurde jeweils ein Exemplar der beiden Derivate, die auf der Laboranlage bis 3 Å ( $K[AuCl_4]$ -Kristall) bzw. 3,5 Å ( $UO_2(CH_3COO)_2$ -Kristall) diffraktierten, am italienischen Synchrotron ELETTRA in Basovizza/Trieste vermessen. Die gewählten Meßwellenlängen der Röntgenstrahlung wurden so ausgesucht, daß sich zusätzlich möglichst maximale anomale Streubeiträge seitens des eingebrachten Schweratoms ergeben würden. Vor diesem Hintergrund fiel die Wahl beim  $K[AuCl_4]$ -Kristall auf die Au-LI-Absorptionskante mit einer Wellenlänge von 0,855 Å (14,5 keV), da hier das Element Gold einen sehr hohen anomalen Streuanteil  $\Delta f''$  aufweist (Abb. 3.12a). Ursprünglich war die Messung an diesem Kristall jedoch als eine multiple anomale Dispersions (MAD)-Datensammlung geplant und die LI-Kante gegenüber der LIII-Kante ( $\lambda = 1$  Å) nur irrtümlich ausgesucht worden. Im Nachhinein erwies sich dieses Vorgehen aber als richtig, da der Kristall aufgrund eines Kollimatorschadens beim zweiten Datensatz der multiplen Wellenlängenmessung durch Eisbildung an Diffraktionsauflösung und -qualität verlor. Somit lag zumindest ein vollständiger Datensatz mit maximalen anomalen Streubeiträgen in bestmöglicher Qualität vor. Im Falle des  $UO_2(CH_3COO)_2$ -

## Ergebnisse

Kristalls fiel die Wahl hingegen auf  $\lambda = 2 \text{ \AA}$ , da dies im angebotenen Meßwellenlängenbereich einen noch vergleichsweise hohen anomalen Streubeitrag  $\Delta f''$  für Uran (Abb. 3.12b) erlaubte, ohne schon zu große Absorptionsverluste an der Luft zu erleiden. Die Kristalle streuten bis zu einer Auflösung von  $2,1 \text{ \AA}$  (K[AuCl<sub>4</sub>]-Kristall) bzw.  $2,55 \text{ \AA}$  (UO<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>-Kristall) und ihre Vermessungen ergaben vollständige, redundante Datensätze (Tab. 3.5). Der anomale R-Faktor ( $R_{\text{anom}}$ ) des mit UO<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> kokristallisierten Kristalls lag trotz vergleichsweise hoher Redundanz unter dem Präzisions-R-Faktor ( $R_{\text{pim}}$ ) und zudem betrug der Skalierungs-R-Faktor ( $R_{\text{scale-to-native}}$ ) zum nativen P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>-Datensatz (Tab 3.4, Spalte 5) weniger als 20 %. Dies sprach gegen eine erfolgreiche UO<sub>2</sub>-Bindung. Folglich wurde der K[AuCl<sub>4</sub>]-Datensatz in den weiteren Phasierungsschritten bearbeitet. Nichtsdestotrotz sollte der  $2 \text{ \AA}$ -Meßwellenlänge-Datensatz beim späteren Strukturmodellbau nutzbringend zum Einsatz kommen. Denn aufgrund der langen Wellenlänge spielten zunehmend auch anomale Streubeiträge anderer Elemente wie S, P oder Cl eine Rolle, und es ließen sich Informationen zu diesen aus den Daten entnehmen.



**Abb. 3.12** Theoretisches Absorptionsverhalten der Elemente Au und U im Energiebereich 4-25 keV. (a) = Au, (b) = U. Die Pfeile symbolisieren die zur Messung jeweils ausgewählte Wellenlänge.  $\Delta f''$  = anomaler Streubeitrag,  $\Delta f'$  = dispersiver Streubeitrag. Die Diagramme entstanden unter Einbeziehung der Internetseite für anomale Streuung (<http://www.bmsc.washington.edu/scatter>).

**Tab. 3.5** Datensammlungs- und Prozessierungsstatistiken der kokristallisierten Schweratom-derivate.

Verwendete Substanz	K[AuCl <sub>4</sub> ]	UO <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter		
a [Å]	69,5	68,8
b [Å]	101,3	101,3
c [Å]	155,9	156,2
α; β; γ [°]	90; 90; 90	90; 90; 90
Anzahl Kristalle	1	1
pH-Wert (Puffer)	9,0 (BICINE)	8,2 (TRIS)
Maximale Kristallkantenlänge [μm]	140	150
Temperatur [K]	100	100
Gefrierschutzmittel	Paraffinöl	Paraffinöl
Röntgenquelle	XRD (ELETTRA)	XRD (ELETTRA)
λ [Å]	0,855	2,0
Detektortyp	MARCCD	MARCCD
Kristall <=> Detektor [mm]	180	75
Δφ [°] / Aufnahme	0,5	1
Anzahl Aufnahmen	360	360
Maximale Auflösung [Å]	2,1	2,55
Äußerste Schale [Å]	2,15-2,1	2,61-2,55
Reflexe insgesamt <sup>a</sup>	483408	479805
Unabhängige Reflexe <sup>a</sup>	64801	36184
Redundanz <sup>a</sup>	7,5 (7,5) <sup>b</sup>	13,3 (12,3)
Vollständigkeit [%]	99,8 (99,5)	99,4 (92,2)
I/σ	21,8 (5,6)	27,4 (6,7)
Mosaizität [°]	0,34	0,58
R <sub>merge</sub> [%]	8,9 (33,0)	10,1 (39,4)
R <sub>rim</sub> [%] <sup>a</sup>	9,6 (35,4)	10,6 (41,2)
R <sub>pim</sub> [%] <sup>a</sup>	3,5 (12,8)	2,9 (11,5)
R <sub>anom</sub> [%]	5,3 (13,8)	2,3 (10,9)
R <sub>scale-to-native</sub> [%] <sup>c</sup>	32,8 (40,7)	17,9 (25,1)
WILSON-B-Faktor [Å <sup>2</sup> ] <sup>d</sup>	22,9	34,0

<sup>a</sup> Werte mit dem Programm *RMERGE* (WEISS & HILGENFELD, 1997; WEISS, 2001) berechnet.

<sup>b</sup> Angaben in runden Klammern beziehen sich auf die äußerste Auflösungsschale.

<sup>c</sup> Werte mit dem Programm *SCALEIT* (HOWELL & SMITH, 1992) im isotropen Skalierungsmodus berechnet.

<sup>d</sup> Werte aus den WILSON-Plots des Programms *TRUNCATE* (FRENCH & WILSON, 1978) entnommen.

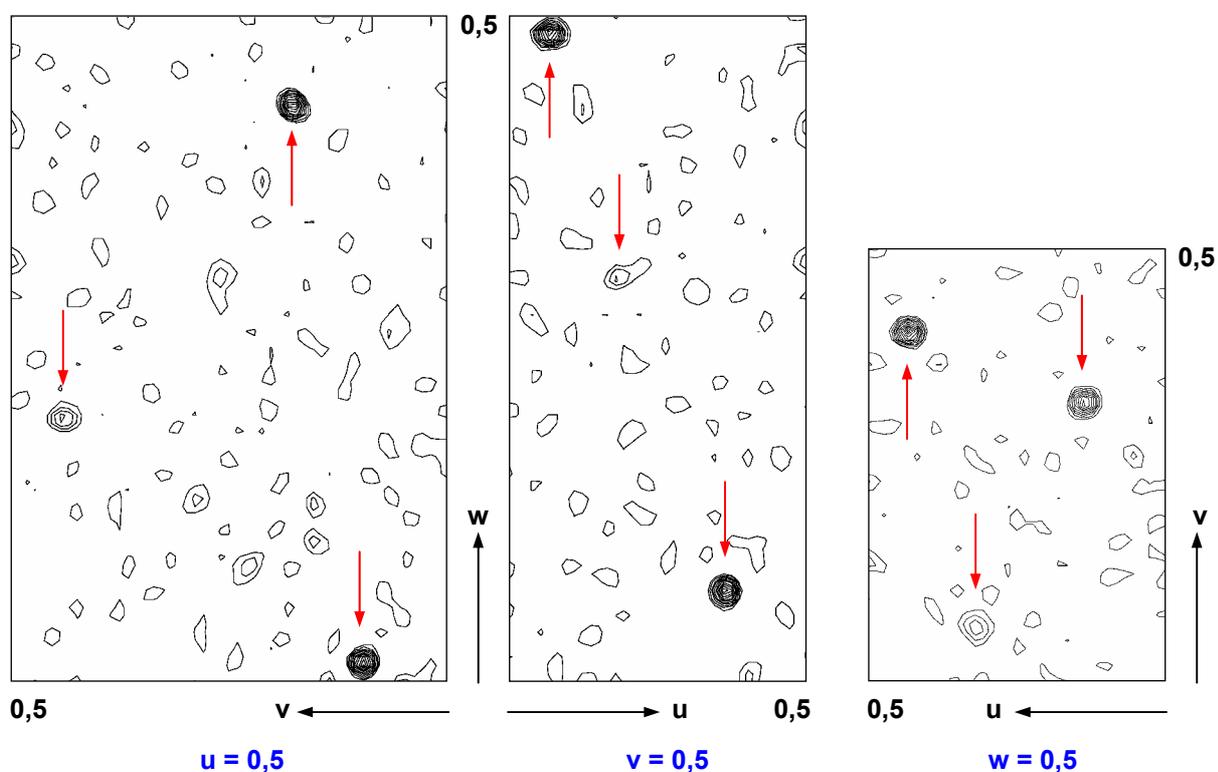
### 3.5.1.3 Lokalisierung der Schweratompositionen

Aus einer mit dem Programm *FFT* (IMMIRZI, 1966) berechneten anomalen PATERSON-Synthese des K[AuCl<sub>4</sub>]-Datensatzes ließen sich in den drei für die Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> charakteristischen HARKER-Schichten (HARKER, 1956) von u = 0,5, v = 0,5 und w = 0,5 drei

## Ergebnisse

Maxima erkennen: zwei mit sehr hoher und eines mit geringerer Intensität (Abb. 3.13). In der asymmetrischen Einheit mußten folglich drei Goldatome vorliegen, wobei zwei mit hoher Affinität und ein drittes mit niedrigerem Besetzungsgrad gebunden hatten. Basierend auf den Koordinaten der Maxima wurden zwei mögliche Lösungen von in der PATTERSON-Funktion nicht unterscheidbaren Goldpositionen bestimmt (fraktionelle Koordinaten):

<i>Ensemble 1</i>				<i>Ensemble 2</i>			
	x	y	z		x	y	z
Au-1	0,465	0,298	0,005	Au-1	0,535	0,702	0,993
Au-2	0,818	0,839	0,215	Au-2	0,182	0,161	0,785
Au-3	0,091	0,032	0,60	Au-3	0,909	0,968	0,401



**Abb. 3.13** HARKER-Schichten in der anomalen PATTERSON-Synthese des  $K[AuCl_4]$ -Derivats. Dargestellt sind die vw-, uw- und uv-Plots für die jeweiligen Schichten  $u = 0,5$ ,  $v = 0,5$ ,  $w = 0,5$ . Die PATTERSON-Karte ist in Abstufungen von  $1 \sigma$  konturiert. Rote Pfeile verweisen auf die drei charakteristischen Maxima.

### 3.5.1.4 Phasenbestimmung mittels SIRAS

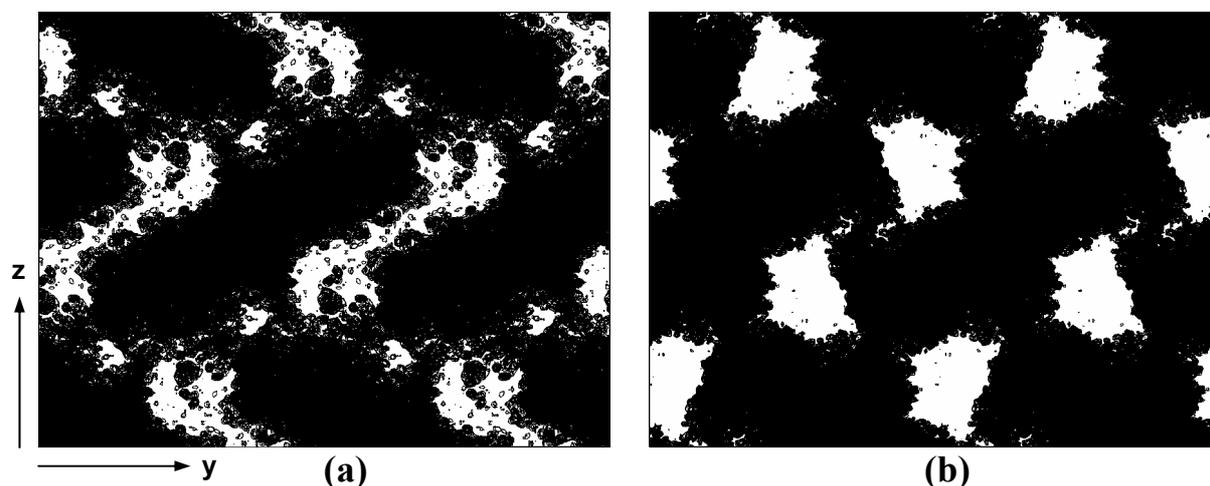
Die Entscheidung darüber, welche der in der anomalen PATTERSON-Karte berechnete Goldpositionen die richtige Lösung darstellte, konnte nur über den direkten Vergleich der Phasenparameter und der jeweils abgeleiteten Elektronendichtekarten gefällt werden. Nach Verfeinerung der Goldkoordinaten mit dem Programm *MLPHARE* (CCP4, 1994) in Form

eines SIRAS-Ansatzes für den Auflösungsbereich von 20-2,1 Å traten erwartungsgemäß noch keine signifikanten Unterschiede in den Güteigenschaften (Tab. 3.6) auf. Erst die Phasenverbesserung mit dem Programm *DM* (COWTAN, 1994) erbrachte für die zweite Lösungsvariante in der Phasenwahrscheinlichkeit („figure of merit“, fom) bereits einen leicht höheren, besseren Wert. Letztendlich sollte aber der Blick auf die mit den überarbeiteten Phaseninformationen und den nativen Struktur Faktoren des 1,53 Å-Datensatzes generierten Elektronendichtekarten über die Auswahl entscheiden. Anhand dieser war zweifelsfrei zu erkennen, daß die Phasen der zweiten Gruppe von Goldpositionen die bessere Elektronendichte mit klar definierten Lösungsmittelbereichen und ferner erste Eindrücke über den molekularen Umriß des Alliinasedimers lieferten (Abb. 3.14). Im weiteren Verlauf der Verfeinerung wurde konsequenterweise auf die Phaseninformation der zweiten PATTERSON-Lösung zurückgegriffen.

**Tab. 3.6** Phasierungsstatistiken für Schweratomlösungen aus der anomalen PATTERSON-Karte.

	nach <i>MLPHARE</i>			nach <i>DM</i>
	Phasenstärke	R <sub>cullis</sub> -Faktor	fom	fom
Ensemble 1	0,89 / 1,01 <sup>a</sup>	0,83 / 0,86 <sup>a</sup>	0,3342	0,708
Ensemble 2	0,89 / 1,01 <sup>a</sup>	0,83 / 0,86 <sup>a</sup>	0,3337	0,728

<sup>a</sup> Werte für zentrische / azentrische Reflexe.



**Abb. 3.14** Elektronendichteplots für enantiomere Lösungsensembles der anomalen PATTERSON-Karte. (a) Lösung 1, (b) Lösung 2. Die Elektronendichtekarten wurden mit verbesserten Phaseninformationen und nativen Struktur Faktoren mittels *FFT* (IMMIRZI, 1966) berechnet und für das Raumelement  $2y \cdot 1z$  entlang  $1x$  mit Hilfe von *NPO* und *PLTDEV* (CCP4, 1994) gezeichnet.

### **3.5.1.5 Initiales Strukturmodell**

Ein erstes Modell entstand mit dem Proteinbauprogramm *ARP/wARP v5.0* (PERRAKIS *et al.*, 1997), dem die nativen Strukturfaktoren des 1,53 Å-Datensatzes sowie die Phaseninformationen bis 2,1 Å Auflösung aus dem SIRAS-Ansatz als Startwerte dienen. Das zunächst erzeugte Modell von freien Atomen umfaßte 7630 Atome bei einem  $R_{\text{work}}$ -Faktor ( $R_{\text{free}}$ -Faktor) von 42,1 (41,1) %, welcher nach 16 Runden Verfeinerung bereits auf 24,9 (34,5) % absank. Die daraufhin erstmals zusammengesetzten Hauptkettenbereiche umfaßten schon eine Zahl von 528 Aminosäurereste, die sich auf 45 Einzelketten verteilten. Im weiteren sequentiellen Verlauf des Einbaus und der Verfeinerung neuer freier Atome und dem Identifizieren zusätzlicher bzw. zusammengefügt Hauptkettenbereiche verringerte sich die Zahl der vorliegenden Proteinketten auf 13 bei nunmehr 8243 Atomen und 813 gefundenen Aminosäureresten. Ferner ging der  $R_{\text{work}}$ -Faktor ( $R_{\text{free}}$ -Faktor) auf 18,9 (25,2) % zurück. Die eingebauten Aminosäurereste wurden bisher nur in Form von Glycinen, Serinen und Valinen unterschieden, entsprechend danach, ob sich an ihrer Stelle eine Aminosäure ohne Seitenkette, ohne  $C_{\beta}$ -verzweigter Seitenkette oder mit  $C_{\beta}$ -verzweigter Seitenkette vorfand. Für die positive Zuordnung der richtigen Aminosäuren mußten die 13 erhaltenen Kettenfragmente (A-M) manuell mit dem Molekülbetrachtungsprogramm *RASMOL* ([www.bernstein-plus-sons.com/software/rasmol/](http://www.bernstein-plus-sons.com/software/rasmol/)) auf ihre korrekte Zusammengehörigkeit zu einem der beiden Alliinaseomomere hin sortiert werden. Für die fortan als Monomer A geltende Untereinheit traf dies in der Reihenfolge E-B-F-G-H-I-J sowie im Monomer B mit A-C-D-K-L-M zu. Abschließend wurden mit *ARP/wARP v5.0* (PERRAKIS *et al.*, 1997) für beide Monomere die Aminosäureseitenketten anhand der bekannten Alliinasesequenz eingebaut.

### **3.5.1.6 Manueller Modellbau und Verfeinerung**

Das Modell sollte nun einer intensiven visuellen Inspektion samt verbundener Korrektur mit dem Proteinmodellbauprogramm *O* (JONES *et al.*, 1991) unterzogen werden. So wurden zunächst die noch verbliebenen Schleifenbereiche mit Aminosäureresten aufgefüllt, wobei im günstigsten Fall die eventuell im Nachbarmonomer schon gebauten Reste als Matrize dienen konnten, welche mit dem Programm *LSQKAB* (KABSCH, 1976) in Position rotiert wurde. Dagegen mußten Schleifenbereiche, die in beiden Monomeren noch nicht vorlagen, durch manuelles Einsetzen von Aminosäureresten interpretiert werden. Mitunter verlangten Zuordnungsfehler in der Sequenz den nachträglichen Austausch von Seitenketten. Die kurz vor Ende der *ARP/wARP*-Routine temporär verfügbare  $(2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Elektronen-

## Ergebnisse

dichtekarte gestattete aufgrund des verwendeten Hybridmodells bereits an dieser Stelle, jeweils ein Kofaktormolekül (PLP) pro Monomer einzusetzen. Mit diesen Veränderungen erreichte der  $R_{\text{work}}$ -Faktor ( $R_{\text{free}}$ -Faktor) nach der ersten Verfeinerungsrunde mit dem Programm *REFMAC v4.0* (MURSHUDOV *et al.*, 1994) einen Wert von 26,8 (28,7) % (Tab. 3.7). In den folgenden fünf anschließenden Bau-, Verifizierungs- und Verfeinerungszyklen kamen sukzessiv Atome, Ionen und Moleküle wie einzelne Atome ( $C_{\alpha}$ , C, O) der ersten Aminosäure beider Monomere, ein weiterer Aminosäurerest in Kette A, Zuckermoleküle von vier N-Glykosilierungsstellen, Chlorid-Ionen, Sulfat-Ionen, Inhibitormoleküle wie HEPES und AA sowie Wassermoleküle zum Modell hinzu. Der  $R_{\text{work}}$ -Faktor ( $R_{\text{free}}$ -Faktor) verringerte sich dabei kontinuierlich (Tab. 3.7). Für manche der eingebauten Heteroatome ließ die Elektronendichte nur eine Verfeinerung mit einer Besetzung von 50 % zu (Tab. 3.7). Ebenso in 50%iger Teilbesetzung wurden die alternativen Konformationen von fünfzehn Aminosäureseitenketten (V15, S63, S80, S144, M226, D267, Y277 und K295 in Monomer A sowie V15, V115, S144, M226, D256 und Y277 in Monomer B) und eines Hauptkettenbereichs (Peptidbindung 122-123 in Monomer A) verfeinert. Die Orientierungen der Aminosäureseitenketten von Histidinen, Asparaginen und Glutaminen wurden überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

**Tab. 3.7** Verfeinerungsstatistiken der *REFMAC*-Läufe 1-6 für Kristallform IV.

	1. Lauf	2. Lauf	3. Lauf	4. Lauf	5. Lauf	6. Lauf
Auflösung	20-1,53 Å	20-1,53 Å	20-1,53 Å	20-1,53 Å	20-1,53 Å	20-1,53 Å
Atome	6873	7377	7715	7902	7978	7996
AS MonA <sup>a</sup>	2-424	2-424	(1)2-425 <sup>b</sup>	(1)2-425 <sup>b</sup>	(1)2-425 <sup>b</sup>	(1)2-425 <sup>b</sup>
AS MonB <sup>a</sup>	2-427	2-424	(1)2-427 <sup>b</sup>	(1)2-427 <sup>b</sup>	(1)2-427 <sup>b</sup>	(1)2-427 <sup>b</sup>
PLP	2	2	2	2	2	2
Zucker	-	3 (3 Ketten)	7 (4 Ketten)	10 (4 Ketten)	10 (4 Ketten)	10 (4 Ketten)
Chloride	-	2	2	2	2	2
Sulfate	-	9	13	14 (7) <sup>c</sup>	12 (5) <sup>c</sup>	11 (4) <sup>c</sup>
HEPES	-	-	-	2 <sup>d</sup>	2 <sup>d</sup>	2 <sup>d</sup>
AA	-	-	-	-	1 <sup>d</sup>	1 <sup>d</sup>
Wasser	-	411	680	781 (8) <sup>c</sup>	825	830 (1) <sup>c</sup>
Dist. > 3 $\sigma$ <sup>e</sup>	64	12	13	13	15	14
Dist. > 5 $\sigma$ <sup>e</sup>	37	0	0	0	0	0
Dist. > 10 $\sigma$ <sup>e</sup>	32	0	0	0	0	0
$R_{\text{work}}$ -Faktor [%]	26,81	21,66	20,24	19,89	19,64	19,29
$R_{\text{free}}$ -Faktor [%]	28,71	23,51	22,95	22,81	22,31	22,07

<sup>a</sup> AS MonA/B = Aminosäuren im Monomer A/B.

<sup>b</sup> Aminosäure 1 ist nur mit den Atomen  $C_{\alpha}$ , C und O vertreten.

<sup>c</sup> (...) = Anzahl der Moleküle, welche davon nur mit 50 % Besetzung verfeinert wurden.

<sup>d</sup> Moleküle nur mit 50 % Besetzung verfeinert.

<sup>e</sup> Dist. = Anzahl der Distanzabweichungen größer als 3/5/10 Standardabweichungen.

### 3.5.1.7 Finales Strukturmodell

Das aktuelle Modell umfaßt 7996 Atome, wobei davon 6914 auf Proteinatome, 165 auf kovalent gebundene Heteroatome und 917 auf nicht-kovalent gebundene Heteroatome entfallen. Von den 852 gebauten kompletten Aminosäureresten ist das A-Monomer mit nur 424 (2-425) Resten etwas kürzer charakterisiert als das B-Monomer mit 426 (2-427). Die N-terminale Aminosäure ist jeweils nur in Form der C<sub>α</sub>-, C- und O-Atome sichtbar. Am C-Terminus fehlen dem Modell bis zu Position 448 je nach Monomer 23 (A) bzw. 21 (B) Reste. Die Elektronendichte war für diese Bereiche ungeordnet und nicht interpretierbar. Bei den Heteroatomen handelt es sich um zwei PLP-Moleküle, vier Zuckerketten mit insgesamt zehn Zuckerresten, zwei Chlorid-Ionen, elf Sulfat-Ionen, zwei HEPES-Moleküle, ein AA-Molekül sowie 830 Wassermoleküle (Tab. 3.7). Die mittleren Temperaturfaktoren des B-Monomers liegen signifikant unter denen des A-Monomers, wie für die Hauptkettenatome (-17 %), Seitenkettenatome (-14 %) sowie den Kofaktor (-18 %) in Tab 3.8 ersichtlich ist. Die Standardabweichungen für Bindungslängen betragen 0,011 Å sowie die für Winkel 2,2°. Im RAMACHANDRAN-Plot (Abb. 3.15) liegen 90,9 % aller Nicht-Gly/Pro-Aminosäurereste mit ihren φ/ψ-Winkeln in den meistbevorzugten Zonen, weitere 8,8 % entfallen auf die zusätzlich erlaubten Bereiche und lediglich die Aminosäure R89 befindet sich für beide Monomere trotz eindeutiger Elektronendichte (Abb. 3.16) in den noch erlaubten („generously allowed“) Gebieten. Keine der Nicht-Gly/Pro-Aminosäurereste weist unerlaubte φ/ψ-Winkel auf. Von den 38 Pro-Resten nehmen acht (vier je Monomer) eine *cis*-Konformation an. 15 Aminosäureseitenketten (9 für Monomer A und 6 für Monomer B) sowie der Hauptkettenbereich einer Aminosäure in Monomer A sind durch zwei alternative

**Tab. 3.8** Temperaturfaktoren des finalen Alliinasemodells für Kristallform IV.

Ø B-Faktoren [Å <sup>2</sup> ]	Monomer A	Monomer B	Dimer gesamt
Hauptkettenatome	24,1	20,6	22,4
Seitenkettenatome	27,6	24,3	25,9
PLP, AA	26,0	22,0	23,8
Zucker	44,7 (6) <sup>a</sup>	45,1 (4) <sup>a</sup>	44,9
Chloride	18,4 (1) <sup>a</sup>	19,4 (1) <sup>a</sup>	18,9
HEPES	25,4 (1) <sup>a</sup>	26,8 (1) <sup>a</sup>	26,1
Sulfate	46,3 (6) <sup>a</sup>	34,4 (5) <sup>a</sup>	40,7
Wasser			34,9

---

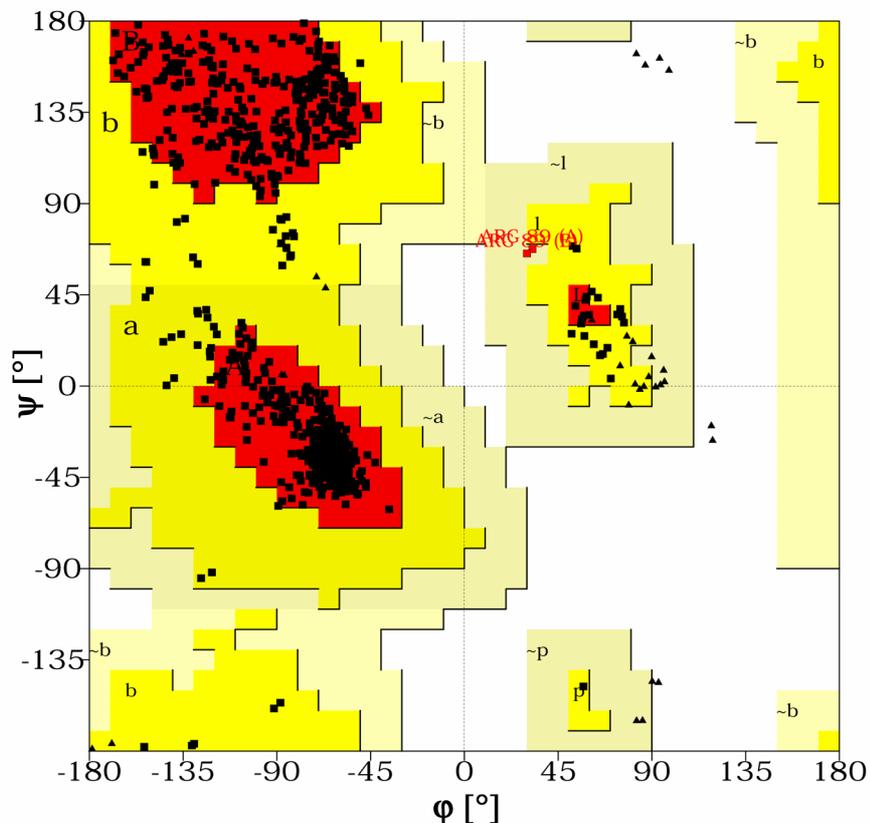
*Standardabweichungen der B-Faktoren [Å<sup>2</sup>]<sup>b</sup> entlang*

Hauptkettenbindungen	0,9
Hauptkettenwinkel	1,4
Seitenkettenbindungen	3,4
Seitenkettenwinkel	4,6

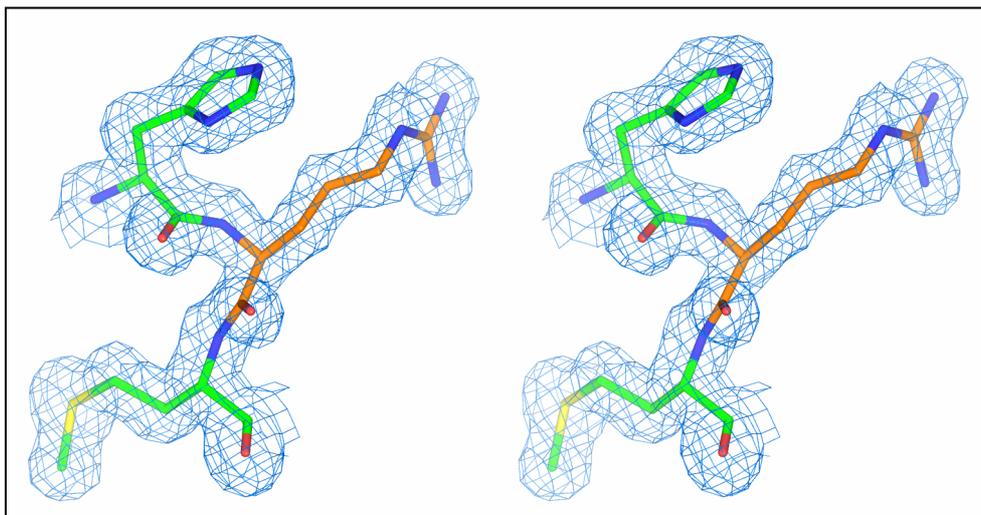
<sup>a</sup> Klammerwerte geben die jeweilige Anzahl der Heteroatome/moleküle an.

<sup>b</sup> Zielwerte Temperaturfaktoren während der Verfeinerung jeweils 1,5 / 2,5 / 5 / 10 Å<sup>2</sup>.

Konformationen charakterisiert. Der mittlere Koordinatenfehler aus einem LUZATTI-Plot (LUZATTI, 1952) ist 0,18 Å. Die dreidimensionalen Koordinaten und Strukturfaktoren wurden in der Proteinendatenbank (BERMAN *et al.*, 2000) unter dem Zugriffscode 1LK9 veröffentlicht.



**Abb. 3.15** RAMACHANDRAN-Plot der finalen Kristallform IV-Alliinasestruktur. Meistbevorzugte Bereiche (A, B, L) = rot, zusätzlich erlaubte Zonen (a, b, l, p) = gelb, noch erlaubte Gebiete (~a, ~b, ~l, ~p) = hellgelb. Nicht-Gly-Reste (■), Gly-Reste (▲), R89 (■). Erstellt mit dem Programm PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993).



**Abb. 3.16** Stereodarstellung des Proteinabschnitts H88-R89-M90 in Monomer A von Kristallform IV. Die Aminosäuren sind als Stabmodelle und die  $(2mF_{obs} - DF_{calc}, \alpha_{calc})$ -Elektronendichte ab  $1 \sigma$  wiedergegeben. Der im RAMACHANDRAN-Plot (Abb. 3.15) in den noch erlaubten Bereichen liegende Rest R89 ist orange von den anderen Aminosäureresten hervorgehoben.

### 3.5.2 Kristallform III - P2<sub>1</sub>

#### 3.5.2.1 Phasenbestimmung mittels molekularem Ersatz

Die Phaseninformation wurde anhand der Methode des molekularen Ersatzes und dem Programm *AMORE* (NAVAZA, 1994) erhalten. Als Suchmodell diente die zuvor durch SIRAS-Ansatz bestimmte dimere Struktur der Kristallform IV (P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>), welche zuvor um die Heteroatome reduziert wurde. In der PATTERSON-Kreuzrotationsfunktion wurden zwei Lösungen gefunden (Tab. 3.9), denen in der darauffolgenden PATTERSON-Translationsfunktionssuche eindeutig jeweils ein Translationsvektor zugeordnet werden konnte (Tab 3.9). Die Qualitätsparameter beider Lösungen verbesserten sich nach Verfeinerung der Rotations- und Translationssterme weiter, wobei diese sehr nahe beisammen lagen (Tab. 3.9). Trotzdem wurde der ersten Lösung mit einem R-Faktor von 30,5 % der Vorzug für die spätere Strukturverfeinerung gegeben.

**Tab. 3.9** Statistik des molekularen Ersatzes bei Kristallform III.

Lösung	Eulerwinkel			Translationsvektor			CC_F <sup>a,e</sup>	RF <sup>b,e</sup>	CC_I <sup>c,e</sup>	CC_P <sup>d,e</sup>
	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	tx	ty	tz				
Rotationssuche										
1	214,02	83,98	161,34	0	0	0	34,5	47,8	40,8	27,7
2	145,49	84,19	198,41	0	0	0	33,6	48,0	39,9	28,0
-----										
Translationssuche										
1	214,02	83,98	161,34	0,1333	0	0,3864	63,7	35,4	63,0	-
2	145,49	84,19	198,41	0,3667	0	0,1250	60,8	36,4	60,9	-
-----										
Verfeinerung										
1	214,03	84,26	161,26	0,1388	0	0,3857	73,1	30,5	74,8	-
2	145,39	84,39	198,19	0,3626	0	0,1176	72,7	30,8	74,3	-

<sup>a</sup> CC\_F = Korrelationskoeffizient zwischen Strukturfaktoramplituden des Kristalls mit berechneten Strukturfaktoramplituden des Suchmodells.

<sup>b</sup> RF = Klassischer R-Faktor zwischen Strukturfaktoramplituden des Kristalls mit berechneten Strukturfaktoramplituden des Suchmodells.

<sup>c</sup> CC\_I = Korrelationskoeffizient zwischen Reflexintensitäten des Kristalls mit berechneten Reflexintensitäten des Suchmodells.

<sup>d</sup> CC\_P = Korrelationskoeffizient zwischen den PATTERSON-Karten des Kristalls und des Modells, bezogen auf einen definierten Suchradius, zentriert auf den PATTERSON-Kartensprung.

<sup>e</sup> Werteangaben in %.

#### 3.5.2.2 Manueller Modellbau und Verfeinerung

Das aus dem molekularen Ersatz bezogene initiale Modell wurde nach einem ersten „rigid body“- und nachfolgendem „restrained“-Verfeinerungslauf mit *REFMAC v4.0* (MURSHUDOV *et al.*, 1997) hinsichtlich falscher Hauptketten- oder Seitenkettenverläufe überprüft

## Ergebnisse

und korrigiert. Ferner wurden sukzessiv Heteroatome wie PLP, AA, Chlorid, Zucker, Phosphat und Wasser in der Elektronendichte interpretiert und dem Modell hinzugefügt. Die Seitenketten der Aminosäuren S63, E170, K239 und K423 in Monomer A sowie V15, N19, K177, E268, K305 und R312 in Monomer B wiesen zwei alternative Konformationen auf, welche durch die Verfeinerung mit jeweils 50 % Besetzung Berücksichtigung fanden. Asparagin-, Glutamin- und Histidinseitenketten wurden in Bezug auf die Orientierung zu Wasserstoffbindungspartnern überprüft und gegebenenfalls angepaßt. Die Verbesserung der  $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ -Faktoren im Verlauf der Verfeinerung über fünf Runden ist aus Tab. 3.10 ersichtlich.

**Tab. 3.10** Verfeinerungsstatistiken der REFMAC-Läufe 1-5 für Kristallform III.

	1. Lauf	2. Lauf	3. Lauf	4. Lauf	5. Lauf
Auflösung	30-1,87 Å				
Atome	6862	6981	7291	7475	7511
AS MonA <sup>a</sup>	(1)2-425 <sup>b</sup>				
AS MonB <sup>a</sup>	(1)2-427 <sup>b</sup>				
PLP	-	2	2	2	2
Zucker	-	4 (4 Ketten)	7 (4 Ketten)	10 (5 Ketten)	11 (5 Ketten)
Chloride	-	2	2	2	2
AA	-	-	2	2	2
Phosphat	-	-	-	1	1
Wasser	-	-	259 (8) <sup>c</sup>	389	415
Dist. > 3 $\sigma$ <sup>e</sup>	73	35	20	14	14
Dist. > 5 $\sigma$ <sup>e</sup>	9	1	0	0	0
Dist. > 10 $\sigma$ <sup>e</sup>	-	0	0	0	0
$R_{\text{work}}$ -Faktor [%]	28,33	25,43	22,04	20,23	19,88
$R_{\text{free}}$ -Faktor [%]	32,25	30,02	27,57	25,96	25,85

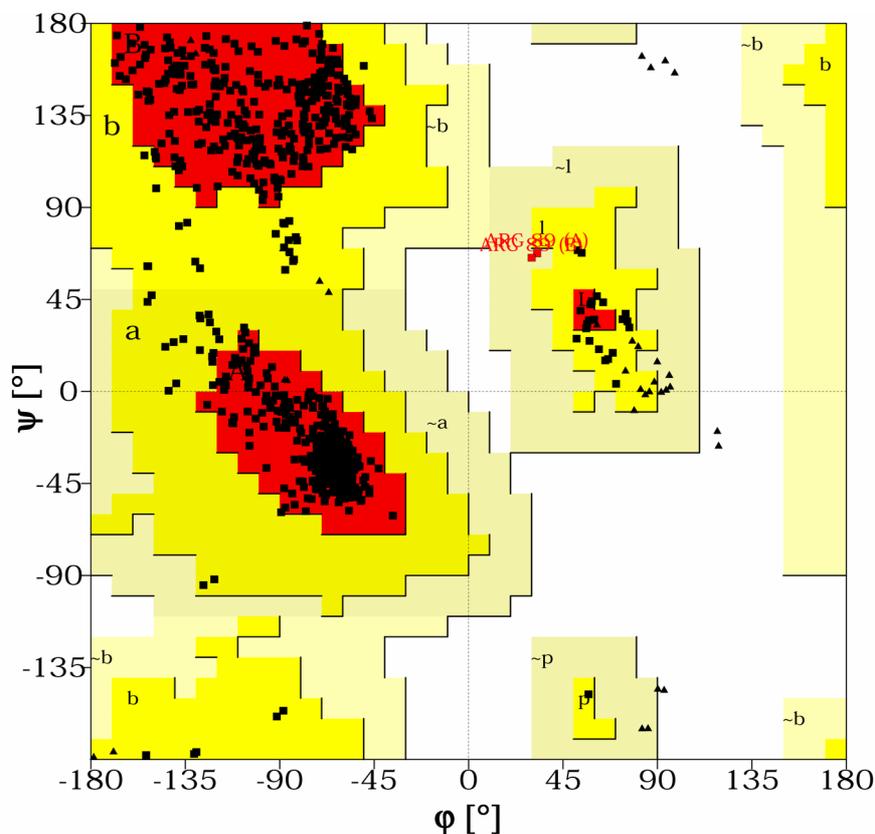
<sup>a,b,c,e</sup> = siehe Fußnoten Tab. 3.7

### 3.5.2.3 Finales Strukturmodell

Das derzeitige Modell beinhaltet 7511 Atome, wobei sich 6908 auf Proteinatome, 181 auf kovalent gebundene Heteroatome und 422 auf nicht-kovalent gebundene Heteroatome verteilen. Die Proteinhauptkette ist nur mit den Aminosäureresten 2-424 in Monomer A und 2-427 in Monomer B in der Elektronendichte definiert. Das N-terminale Lysin ist nur in Form der Hauptkettenatome sichtbar und die C-terminalen Aminosäuren bis Position 448 sind in der Elektronendichte ungeordnet. Die interpretierten Heteroatome umfassen zwei PLP-Moleküle, fünf Zuckerketten mit insgesamt elf Zuckerresten, zwei Chlorid-Ionen, zwei AA-Moleküle, ein Phosphat-Ion sowie 415 Wassermoleküle (Tab. 3.7). Die mittleren Temperaturfaktoren der Haupt- und Seitenkettenatome des A-Monomers liegen leicht (3-4 %) unter denen des B-Monomers. Dagegen weisen die Kofaktor- und Substratome ein entgegengesetztes Verhalten

## Ergebnisse

auf (+16 %), wie aus Tab 3.11 ersichtlich wird. Die Standardabweichungen für Bindungslängen betragen 0,009 Å sowie die für Winkel 2,2°. 88,3 % aller Nicht-Gly/Pro-Aminosäurereste liegen im RAMACHANDRAN-Plot (Abb. 3.17) mit ihren  $\phi/\psi$ -Winkeln in den meistbevorzugten Zonen, weitere 11,4 % entfallen auf die zusätzlich erlaubten Bereiche und nur die Aminosäure R89 besetzt für beide Monomer die noch erlaubten („generously allowed“) Gebiete. Keine der Nicht-Gly/Pro-Aminosäurereste ist durch unerlaubte  $\phi/\psi$ -Winkelkombinationen charakterisiert. Acht Prolinreste (vier je Monomer) befinden sich in *cis*-Konformation. Zehn Aminosäureseitenketten (vier für Monomer A und sechs für Monomer B) sind durch zwei alternative Konformationen bestimmt. Der mittlere Koordinatenfehler aus einem LUZATTI-Plot (LUZATTI, 1952) beträgt 0,21 Å.



**Abb. 3.17** RAMACHANDRAN-Plot der finalen Kristallform III-Alliinasestruktur. Meistbevorzugte Bereiche (A, B, L) = rot, zusätzlich erlaubte Zonen (a, b, l, p) = gelb, noch erlaubte Gebiete (~a, ~b, ~l, ~p) = hellgelb. Nicht-Gly-Reste (■), Gly-Reste (▲), R89 (■). Erstellt mit dem Programm PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993).

**Tab. 3.11** *Temperaturfaktoren des finalen Alliinasemodells für Kristallform III.*

$\emptyset$ B-Faktoren [ $\text{\AA}^2$ ]	Monomer A	Monomer B	Dimer gesamt
Hauptkettenatome	19,9	20,7	20,3
Seitenkettenatome	23,0	23,7	23,4
PLP, AA	19,3	16,7	18,0
Zucker	30,8 (3) <sup>a</sup>	47,5 (8) <sup>a</sup>	42,9
Chloride	20,2 (1) <sup>a</sup>	18,2 (1) <sup>a</sup>	19,2
Phosphat			42,1
Wasser			24,8

---

*Standardabweichungen der B-Faktoren [ $\text{\AA}^2$ ]<sup>b</sup> entlang*

Hauptkettenbindungen	0,8
Hauptkettenwinkel	1,2
Seitenkettenbindungen	4,1
Seitenkettenwinkel	5,1

<sup>a,b</sup> = siehe Fußnoten Tab. 3.8

### 3.5.3 Kristallform I

#### 3.5.3.1 Phasenbestimmung mittels molekularem Ersatz

In analoger Weise wie schon bei Kristallform III konnte auch die erste der Alliinase-Kristallformen durch Anwendung der Methode des molekularen Ersatzes und dem Programm *AMORE* (NAVAZA, 1994) phasiert werden. Die um die Heteroatome befreite  $P2_12_12_1$ -Struktur stellte das Suchmodell dar. In der asymmetrischen Einheit dieser Kristallform sollten aufgrund der Zellparameter (Tab. 3.3) vier Monomere bzw. zwei Dimere vorliegen. Folgerichtig mußte der molekulare Ersatz zweimal ausgeführt werden, d.h. in einem Lauf wurde das erste Dimer und im nächsten Lauf das zweite Dimer in seiner Orientierung lokalisiert. Für das erste Dimer ergaben sich in der PATTERSON-Kreuzrotationskarte sechs mögliche Lösungen, für die parallel ein zugehöriger Translationsterm bestimmt wurde (Tab. 3.12). Die anschließend verfeinerten Vektorterme lagen für die ersten vier Lösungen in ihren Güteparametern eng beisammen (Tab. 3.12). Nichtsdestotrotz wurde die zweite Lösung ausgewählt, als feste Position des ersten Dimers für die zweite Translationssuche nach dem verbliebenen Dimer zu dienen. Der zweite Lauf der PATTERSON-Translationssuche mit den übrigen fünf Rotationslösungen erbrachte für die fünfte Lösung den besten R-Faktor von 40,9 % (Tab. 3.12), welcher sich in der Verfeinerung zusammen mit der Position des ersten Dimers (Lösung 2) weiter auf 39,1 % verbesserte (Tab. 3.12). Lösung 2 und 5 stellten daher das Modell für die asymmetrische Einheit dar.

Tab. 3.12 Statistik des molekularen Ersatzes für Kristallform I.

Lösung	Eulerwinkel			Translationsvektor			CC_F <sup>a,e</sup>	RF <sup>b,e</sup>	CC_I <sup>c,e</sup>	CC_P <sup>d,e</sup>
	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	tx	ty	tz				
Rotationsuche										
1	27,42	90,00	18,29	0	0	0	24,7	52,4	29,7	15,7
2	332,81	90,00	341,09	0	0	0	24,4	52,4	29,3	15,9
3	152,21	90,00	197,87	0	0	0	24,4	52,5	29,4	15,7
4	207,51	90,00	161,75	0	0	0	23,9	52,5	29,0	15,9
5	204,36	85,19	172,68	0	0	0	19,1	54,5	25,3	8,8
6	197,18	40,69	148,49	0	0	0	14,8	55,8	21,0	8,2
-----										
Translationssuche - 1. Lauf										
1	27,42	90,00	18,29	0,2667	0	0,4702	32,8	48,3	32,4	-
2	332,81	90,00	341,09	0,2333	0	0,0298	32,1	48,6	30,3	-
3	152,21	90,00	197,87	0,2333	0	0,0298	31,9	48,7	31,6	-
4	207,51	90,00	161,75	0,2667	0	0,4702	29,8	49,2	29,2	-
5	204,36	85,19	172,68	0,2667	0	0,4762	21,0	52,4	21,8	-
6 <sup>f</sup>	197,18	40,69	148,49	0,0167	0	0,0238	8,7	55,7	11,2	-
-----										
Verfeinerung - 1. Lauf										
1	27,10	89,89	18,24	0,2705	0	0,4714	33,1	47,6	32,5	-
2	333,57	90,06	341,19	0,2311	0	0,0274	33,9	47,3	32,7	-
3	152,90	90,11	198,22	0,2296	0	0,0286	33,1	47,6	32,5	-
4	206,44	89,94	161,20	0,2689	0	0,4726	33,9	47,3	32,7	-
5	203,05	84,37	172,97	0,2708	0	0,4773	22,9	51,3	23,4	-
6	197,90	40,37	147,70	0,0183	0	0,0247	7,6	55,3	9,5	-
-----										
Translationssuche - 2. Lauf (Lösung 2 aus dem 1. Verfeinerungslauf fixiert)										
1 <sup>f</sup>	27,42	90,00	18,29	0,7701	0,5182	0,9709	47,5	44,5	44,9	-
3 <sup>f</sup>	152,21	90,00	197,87	0,2298	0,0180	0,0290	46,9	44,6	44,5	-
4 <sup>f</sup>	207,51	90,00	161,75	0,7688	0,4823	0,9727	47,0	44,9	44,1	-
5	204,36	85,19	172,68	0,2711	0,5218	0,4774	54,0	40,9	54,3	-
6 <sup>f</sup>	197,18	40,69	148,49	0,1183	0,9426	0,9393	23,8	51,6	24,9	-
-----										
Verfeinerung - 2. Lauf										
2	333,58	90,03	341,33	0,2315	0	0,0273	57,2	39,1	56,4	
5	202,79	84,28	173,26	0,2713	0,5215	0,4776	57,2	39,1	56,4	

Fußnoten a-e: siehe Erklärungen in Tab. 3.9.

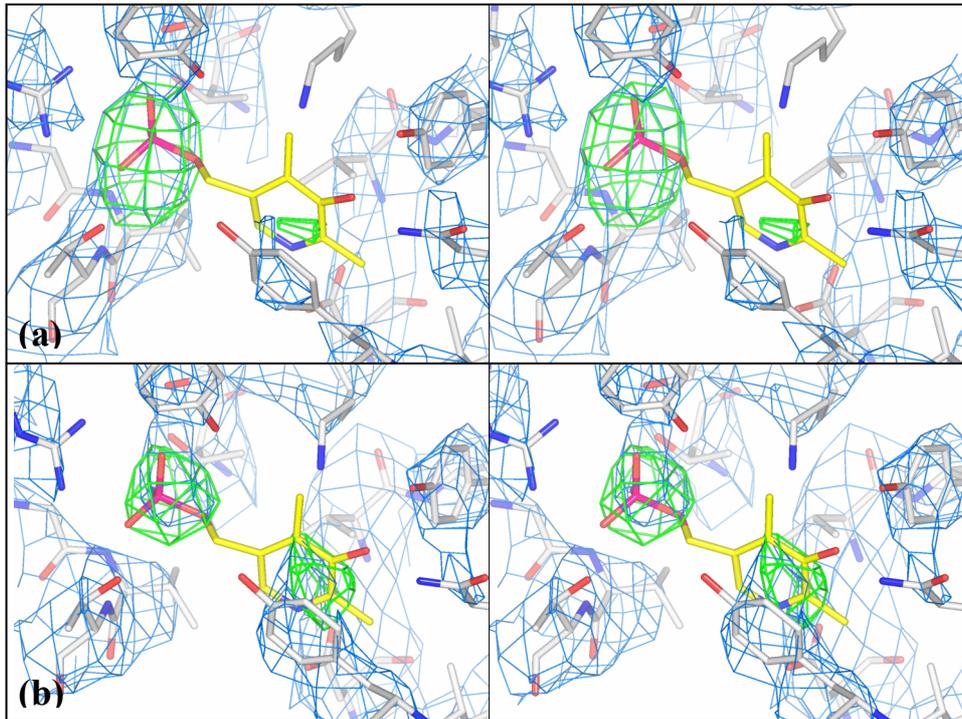
<sup>f</sup> nur die erste Translationslösung für die verwendete Rotationslösung angegeben.

### 3.5.3.2 Vorläufiges Strukturmodell

Nach einmaliger „rigid body“-Verfeinerung mit *REFMAC v4.0* (MURSHUDOV *et al.*, 1997) im Auflösungsbereich 25-4 Å sanken die R-Faktoren  $R_{\text{work}}$  und  $R_{\text{free}}$  auf 36,1 % bzw. 37,4 % ab. Eine Inspektion der  $(2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Elektronendichtekarte offenbarte für beide Dimere in der asymmetrischen Einheit eine für die Auflösung von 4 Å angemessene  $(2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Elektronendichtequalität, in der sich z.T. auch die Aminosäureseitenket-

## Ergebnisse

ten abzeichneten (Abb. 3.18a,b). Die Richtigkeit des Modells kann anhand der ( $mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}}$ )-Differenzelektronendichtekarte des Kofaktors PLP verifiziert werden, da er nicht zum Suchmodell im molekularen Ersatz gehörte. So zeichnete sich der Kofaktor in den insgesamt vier aktiven Zentren der zwei Dimere (gezeigt für Monomer A des 1. Dimers und Monomer B des 2. Dimers, Abb. 3.18a,b) mit deutlicher positiver Differenzelektronendichte ( $> 3 \sigma$ ) für die Phosphatgruppe und den Pyridiniumring ab (Abb. 3.18a,b).



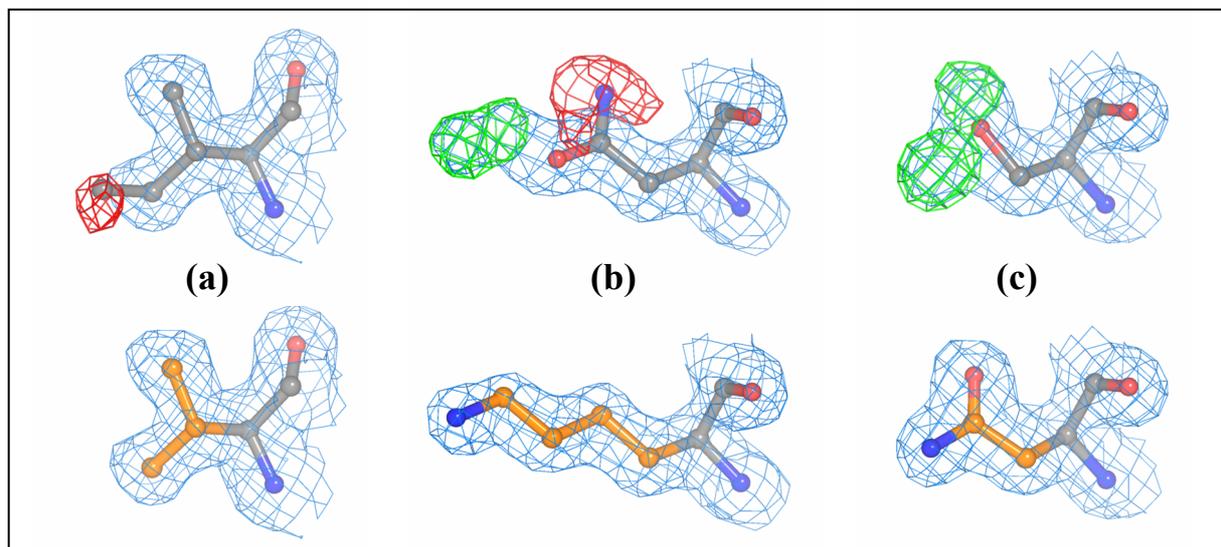
**Abb. 3.18** Elektronendichtekarten in den aktiven Zentren der Kristallform I-Alliinasestruktur. Stereodarstellung der ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}}$ )-Elektronendichtekarte (Konturierung:  $1 \sigma$ ) und der ( $mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}}$ )-Differenzelektronendichtekarte (Konturierung:  $3 \sigma$ ) in Verbindung mit den Stabmodellen der Aminosäurereste (graue C-Atome), welche in bis zu  $4 \text{ \AA}$  Abstand zum Kofaktor PLP (gelbe C-Atome) lagen. (a) Dimer 1 (Untereinheit A) sowie (b) Dimer 2 (Untereinheit B) der asymmetrischen Einheit. Das PLP war nicht Teil der Kristallform I-Struktur, sondern wurde aus der Kristallform IV-Struktur durch Überlagerung im Programm *PYMOL* (DELANO, 2002) bezogen.

### 3.6 Strukturbeschreibung der Alliinase

Angesichts der höheren Auflösung der P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>-Kristallstruktur wird dieses Modell auf den folgenden Seiten beschrieben, ausgenommen die vergleichende Tertiärstruktur- und Kristallkontaktanalyse sowie signifikante Unterschiede bei gebundenen Heteroatomen.

#### 3.6.1 Primärstruktur

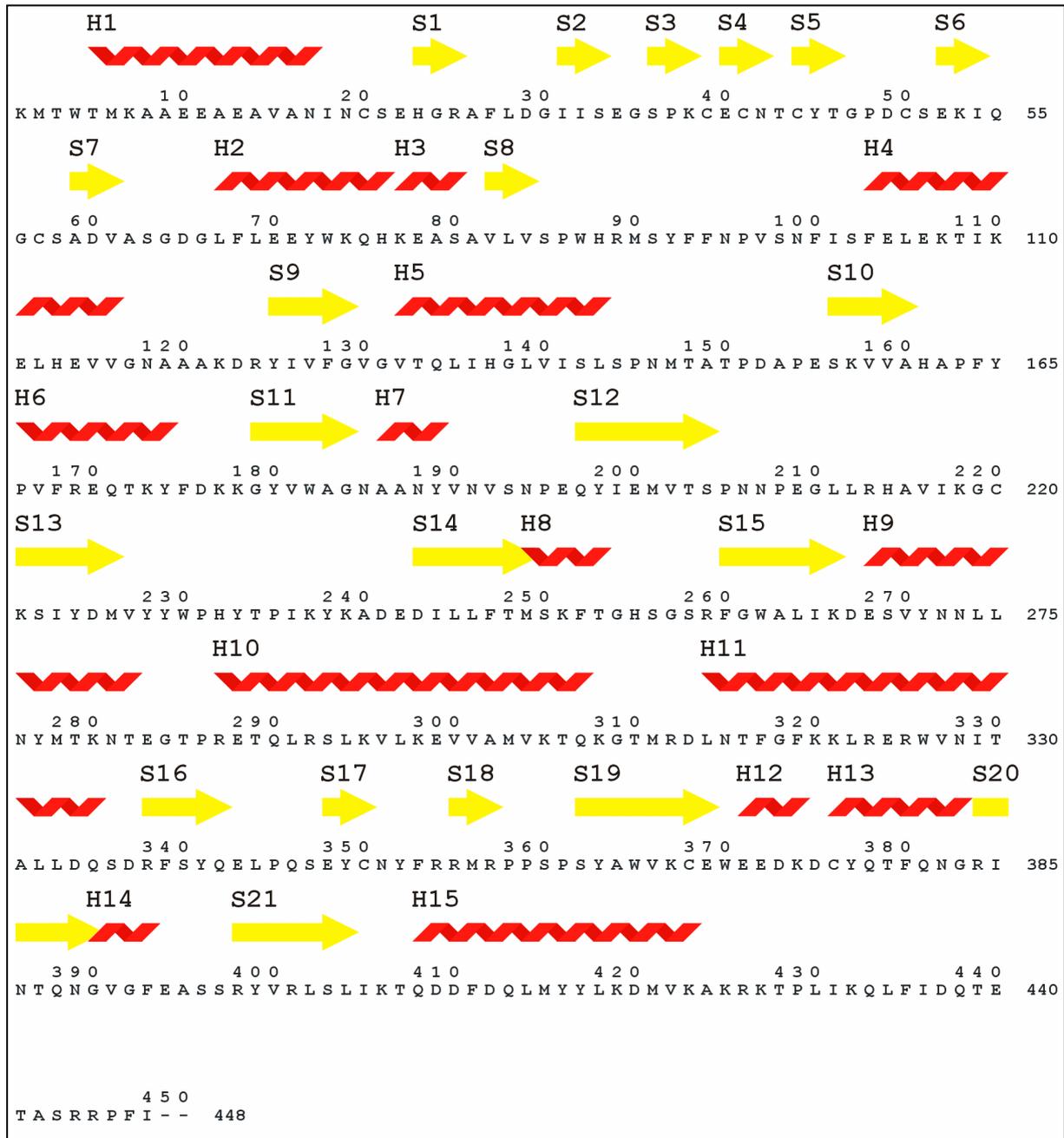
In der SWISSPROT-Datenbank (O'DONOVAN *et al.*, 2002) existieren für die Knoblauch-Alliinase mit den Sequenzen von RABINKOV *et al.* (1994) und VAN DAMME *et al.* (1992) zwei Einträge, die sich in sechs Aminosäurepositionen unterscheiden: 176 (D/N), 300 (I/V), 367 (N/K), 389 (S/N), 436 (T/I) und 438 (E/Q). Die Reste 436 und 438 sind in der Elektronendichte nicht sichtbar. Auch für die Position 176 gestalten sich Aussagen zur Unterscheidung schwierig, da der Aminosäurerest an der Proteinoberfläche liegt und der Umriß der Elektronendichte keine zweifelsfreie Unterscheidung von Asp und Asn erlaubt. Dagegen zeigt sich die Situation bei den Positionen 300, 367 und 389 eindeutiger. Hier gestattet die ( $mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Differenzelektronendichtekarte (Abb. 3.19) eine sichere Interpretation im Sinne der von VAN DAMME *et al.* (1992) publizierten Alliinasesequenz. Die Primärstruktur des nach der RABINKOV-Sequenz gebauten Alliinasemodells ist deshalb für die entsprechenden Positionen 300, 367 bzw. 389 durch die Aminosäurereste Valin, Lysin bzw. Asparagin definiert.



**Abb. 3.19** Primärstrukturanalyse durch Interpretation von Elektronendichtekarten. Drei der zwischen RABINKOV *et al.* (1994) [obere Reihe] und VAN DAMME *et al.* (1992) [untere Reihe] unterschiedlichen Alliinasesequenzpositionen können anhand der ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Elektronen- (blau, Konturierung:  $1 \sigma$ ) und ( $mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Differenzelektronendichtekarten (grün/rot, Konturierung:  $+3/-3 \sigma$ ) für die vorliegende Alliinase zweifelsfrei zugeordnet werden. (a) = I300/V300, (b) = N367/K367, (c) = S389/N389. Die Atome wurden entsprechend ihres Atomtyps eingefärbt (C = grau, orange; N = blau; O = rot).

### 3.6.2 Sekundärstruktur

Auf der Ebene der Sekundärstruktur weist die Alliinase einen 35,9 %igen Anteil von  $3_{10}$ - bzw.  $\alpha$ -Helices sowie 22,5 %  $\beta$ -Faltblattbereiche auf, die sich auf 15  $3_{10}$ / $\alpha$ -Helices und 21  $\beta$ -Faltblattstränge verteilen (Abb. 3.20). Die Helices 7, 12 und 14 stellen  $3_{10}$ -Helices dar. Zu-dem beginnt die Helix 2 mit einer  $3_{10}$ -Helixwindung, um danach  $\alpha$ -helikalen Charakter



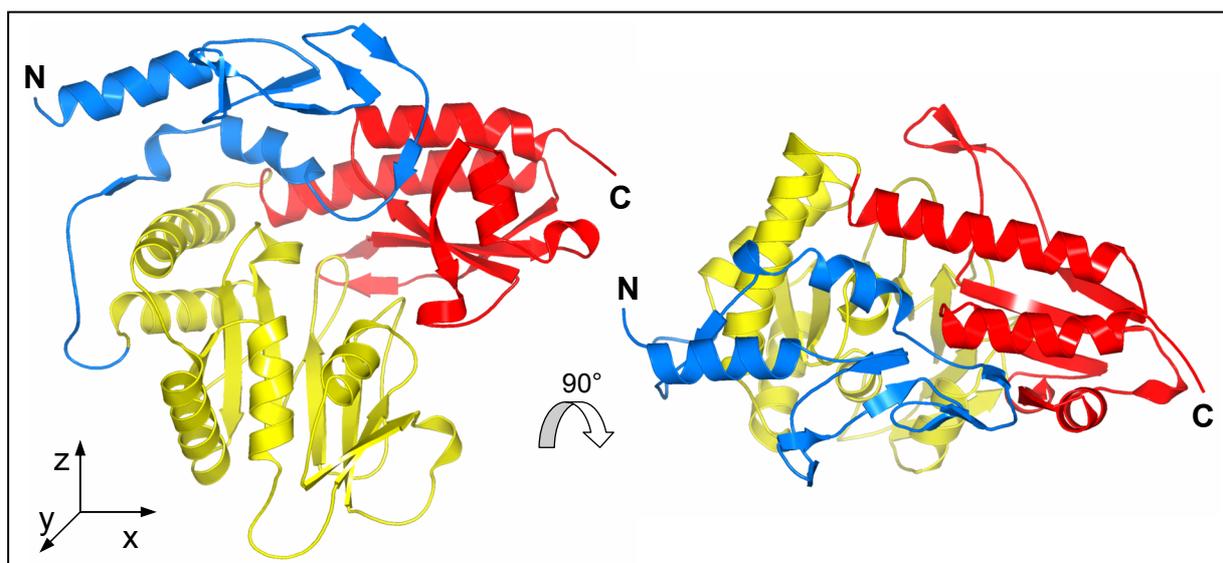
**Abb. 3.20** Sekundärstrukturverteilung der Alliinase. Die  $3_{10}$ - und  $\alpha$ -Helices (rote Helices) sowie  $\beta$ -Faltblattstränge (gelbe Pfeile) sind oberhalb der Aminosäuresequenz in numerierter Reihenfolge (H1-H15 bzw. S1-S21) dargestellt. Die Zuordnung der Sekundärstruktur basiert auf dem DSSP-Algorithmus (KABSCH & SANDER, 1983) und manueller Korrektur unter Berücksichtigung des Wasserstoffbrückenbindungsmusters.

## Ergebnisse

anzunehmen. Der N-Terminus der Alliinase startet ab Position fünf mit einer 13 Aminosäurereste umfassenden  $\alpha$ -Helix (H1), an die sich ein ca. 50 Aminosäurereste langer Bereich mit sieben kurzen  $\beta$ -Faltblattsträngen (S1-S7) anschließt. Die Kette setzt sich mit einer in zwei Teile gespaltenen  $\alpha$ -Helix (H2, H3) und einem kurzen  $\beta$ -Faltblattstrang (S8) fort. Auf diesen folgt nach mehr als 17 Aminosäureresten mit nicht-helikaler bzw. nicht-strangartiger Sekundärstruktur ein zentraler Bereich von etwa 180 Aminosäureresten, der fast ausschließlich abwechselnd  $3_{10}$ / $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstränge aufweist: H4, S9, H5, S10, H6, S11, H7, S12, [S13, S14], H8, S15, H9. Eine Ausnahme davon stellen die drei nacheinander ohne Helixunterbrechung vorliegenden  $\beta$ -Faltblattstränge S12, S13 und S14 dar. Nach nunmehr zwei Drittel Länge geht die Proteinkette in die beiden größten  $\alpha$ -Helices der Alliinase, welche jeweils 21 (H10) und 22 (H11) Aminosäurereste beinhalten, über. Der verbleibende, letzte Hauptkettenabschnitt umfaßt sechs  $\beta$ -Faltblattstränge (S16, S17, S18, S19, S20, S21), wobei zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen S19 und S20 eine  $3_{10}$ -Helix (H12) und eine  $\alpha$ -Helix (H13) sowie zwischen S20 und S21 eine  $3_{10}$ -Helix (H14) eingeschoben sind. Der in der Kristallstruktur sichtbare Teil des C-Terminus endet mit einer 16 Aminosäurereste langen  $\alpha$ -Helix (H15).

### 3.6.3 Tertiärstruktur

Das Alliinasemonomer setzt sich auf der tertiären Strukturebene aus drei abgrenzbaren Domänen zusammen (Abb. 3.21): N-terminale Domäne (Aminosäurereste 1-100), zentrale Domäne (Aminosäurereste 101-310), C-terminale Domäne (Aminosäurereste 311-427).



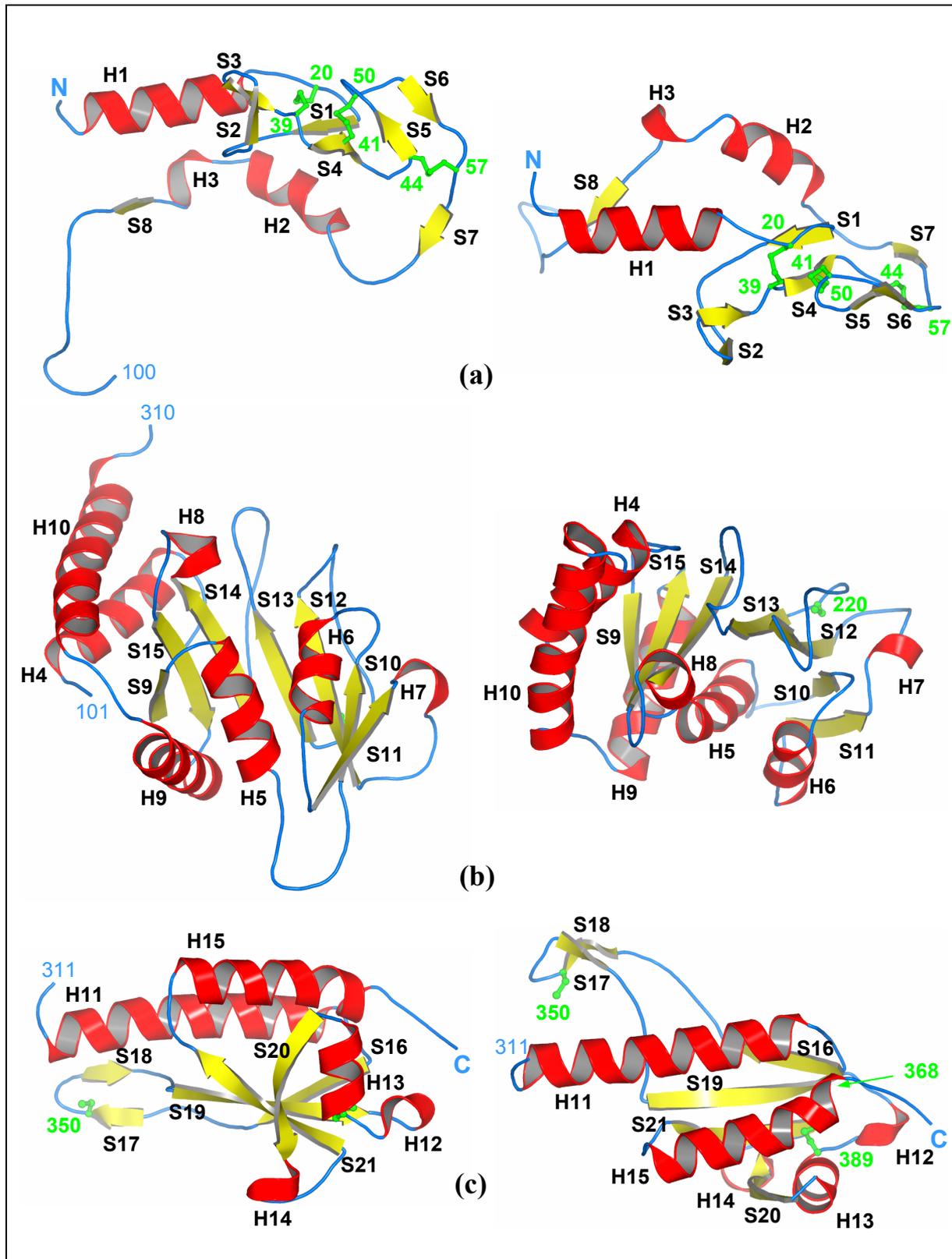
**Abb. 3.21** *Alliinasemonomer*. Proteinrückgratdarstellung von Monomer B mit farblich abgesetzten Domänen: N-terminale (blau), zentrale (gelb) sowie C-terminale (rot) Domäne. Die Termini sind mit N und C markiert.

### **3.6.3.1 N-terminale Domäne**

Die erste Alliinasedomäne (Abb. 3.22a) ist maßgeblich durch eine EGF-ähnliche Subdomäne definiert. Dabei wird das zentrale  $\beta$ -Faltblatt der EGF-Domäne durch die  $\beta$ -Faltblattstränge S1 und S4 und das C-terminale  $\beta$ -Faltblatt durch die  $\beta$ -Faltblattstränge S5 und S6 ausgebildet. In der Schleife des zentralen  $\beta$ -Faltblatts existiert ein weiteres  $\beta$ -Faltblatt mit den  $\beta$ -Faltblattsträngen S2 und S3. Die EGF-Domäne wird durch drei linkshändige Disulfidbrücken (Torsionswinkel siehe Anhang 7.1) der Verknüpfung Cys1-Cys2 (C20-C39), Cys3-Cys5 (C41-C50) sowie Cys4-Cys6 (C44-C57) stabilisiert. Die erste Disulfidbrücke verbindet den N-Terminus der EGF-Domäne mit der Schleife des zentralen  $\beta$ -Faltblatts. Die zweite Disulfidbrücke verknüpft das zentrale  $\beta$ -Faltblatt (S4) mit der Schleife des C-terminalen  $\beta$ -Faltblatts. Schließlich fixiert die dritte Disulfidbrücke den C-Terminus der EGF-Domäne mit dem C-terminalen  $\beta$ -Faltblatt (S5). Nach der EGF-Subdomäne folgt ein kurzer  $\beta$ -Faltblattstrang (S7), wobei darauf die Proteinkette nach einer Schleife in Richtung N-Terminus zurückläuft. Auf diesem Wege liegen zwei  $\alpha$ -Helices (H2, H3) und ein  $\beta$ -Faltblattstrang (S8). Hierauf ändert die Proteinkette abermals die Richtung und setzt sich entgegengesetzt vom N-Terminus in Form einer 17 Aminosäurereste umfassenden Schleife zur zentralen Domäne hin fort.

### **3.6.3.2 Zentrale Domäne**

Die mit 210 Aminosäureresten größte Einzeldomäne (Abb. 3.22b) der Alliinase beinhaltet knapp die Hälfte (49 %) der in der Elektronendichte sichtbaren Proteinkette. Die Domäne startet nach einer kurzen Umkehrschleife mit einer 14 Aminosäurereste langen, senkrecht zur z-Achse des Monomers (vergleiche Abb. 3.21 links) verlaufenden  $\alpha$ -Helix (H4). Hierauf folgt ein siebensträngiges gemischtes  $\beta$ -Faltblatt des Typs „S, S+6, S+5, S+4, S+3, S+1, S+2“, wobei bis auf den antiparallelen „S+6“- $\beta$ -Faltblattstrang (S15) alle übrigen sechs  $\beta$ -Faltblattstränge (S9, S14, S13, S12, S10, S11) parallel zueinander verlaufen. Das gesamtheitlich linksgängig gekippte  $\beta$ -Faltblatt wird mit einer Ausnahme (die  $3_{10}$ -Helix H7) nur auf der konkaven Innenseite durch vier  $\alpha$ -Helices (H5, H6, H8, H9) begleitet. Die jeweils in der Weise eines  $\alpha$ -Helixbündels miteinander interagierenden  $\alpha$ -Helices H6  $\rightarrow$  H5  $\rightarrow$  H9 sind nacheinander um ca. 55° gedreht (graphisch, visuelle Messung). Demgegenüber finden sich auf der konvexen  $\beta$ -Faltblattaußenseite nur Schleifenelemente wieder. Nach der das  $\beta$ -Faltblatt abschließenden  $\alpha$ -Helix (H9) folgt die letzte  $\alpha$ -Helix (H10) der zentralen Domäne, bei der es sich um die zweitgrößte  $\alpha$ -Helix der Alliinase mit 21 Aminosäureresten handelt.



**Abb. 3.22** Detailansicht der Alliinasedomänen. Proteinrückgratdarstellung der N-terminalen (a), zentralen (b) und C-terminalen (c) Domäne aus Monomer B, wobei die rechte Orientierung aus einer Drehung um 90° entlang der x-Achse resultiert. Cysteinreste sind als grüne Kugelstabmodelle hinzugefügt. Die Beschriftungen unterscheiden sich farblich wie folgt: Termini und Aminosäurerestnummern der Hauptkette = blau, Numerierung der  $\beta$ -Faltblätter und  $\alpha$ -Helices = schwarz, Cysteinreste = grün.

## Ergebnisse

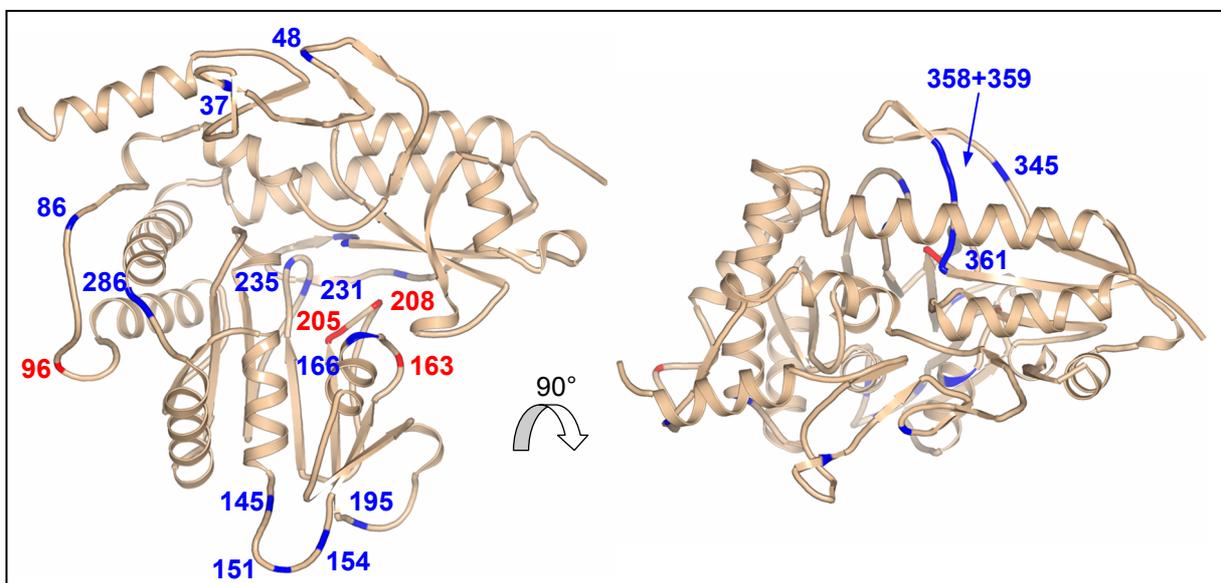
Diese verläuft, wie bereits die erste  $\alpha$ -Helix der Domäne (H4), senkrecht zur z-Achse des Monomers (vergleiche Abb. 3.21 links). Beide  $\alpha$ -Helices interagieren vergleichbar dem Leucin-Reißverschluß-Motiv (ELLENBERGER *et al.*, 1992) - allerdings über entgegengerichtete  $\alpha$ -Helices - miteinander und die Helixachsen sind dabei um ca.  $30^\circ$  (graphisch, visuelle Messung) zueinander gedreht. Die Domäne enthält in der Schleife zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen S12 und S13 einen freien, nicht in einer Disulfidbrücke involvierten Cysteinrest (C220).

### **3.6.3.3 C-terminale Domäne**

Die dritte Domäne (Abb. 3.22c) beginnt mit der größten  $\alpha$ -Helix (H11) der Alliinase, welche eine Länge von 22 Aminosäureresten aufweist. Sie verläuft im rechten Winkel zur Vorgänger- $\alpha$ -Helix H10 (vergleiche Abb. 3.21 rechts), die der zentralen Domäne zugeordnet wird. Wie diese, so liegt auch die  $\alpha$ -Helix H11 senkrecht zur Monomer-z-Achse vor (vergleiche Abb. 3.21 links). Darauf folgt der erste  $\beta$ -Faltblattstrang (S16) eines viersträngigen, antiparallelen, gesamtheitlich nach links gekippten  $\beta$ -Faltblatts des Typs „S, S+3, S+5, S+4“ (S16, S19, S21, S20). Der vierte  $\beta$ -Faltblattstrang (S20) zeigt im Vergleich zu den übrigen eine besonders stark ausgeprägte Rechtskipfung. Zwischen dem ersten (S16) und zweiten  $\beta$ -Faltblattstrang (S19) ist eine 19 Aminosäuren lange  $\beta$ -Haarnadelschleife mit einem kurzen  $\beta$ -Faltblatt (S17, S18) eingeschoben. Diese Schleife befindet sich zwar auf gleicher horizontaler Ebene wie das viersträngige  $\beta$ -Faltblatt, doch weist sie von der C-terminalen Domäne fort. Das viersträngige  $\beta$ -Faltblatt ist, mit Ausnahme von  $3_{10}$ -Helix H14, nur auf der zur Monomeraußenseite hin gewandten Fläche von  $3_{10}$ - oder  $\alpha$ -Helices umrahmt. Zu diesen zählen neben der ersten  $\alpha$ -Helix H11 eine  $3_{10}$ -Helix (H12) sowie zwei weitere  $\alpha$ -Helices (H13, H15). Die Domäne ist durch eine rechtshändige Disulfidbrücke (C368-C376, Torsionswinkel siehe Anhang 7.1), die zwischen dem C-Terminus des  $\beta$ -Faltblattstrangs S19 und dem N-Terminus der  $\alpha$ -Helix H13 ausgebildet wird, stabilisiert. Ein weiterer, jedoch nicht an Disulfidbrücken beteiligter Cysteinrest (C350) befindet sich am C-Terminus des  $\beta$ -Faltblattstrangs S17 der  $\beta$ -Haarnadelschleife.

### 3.6.3.4 Prolinreste

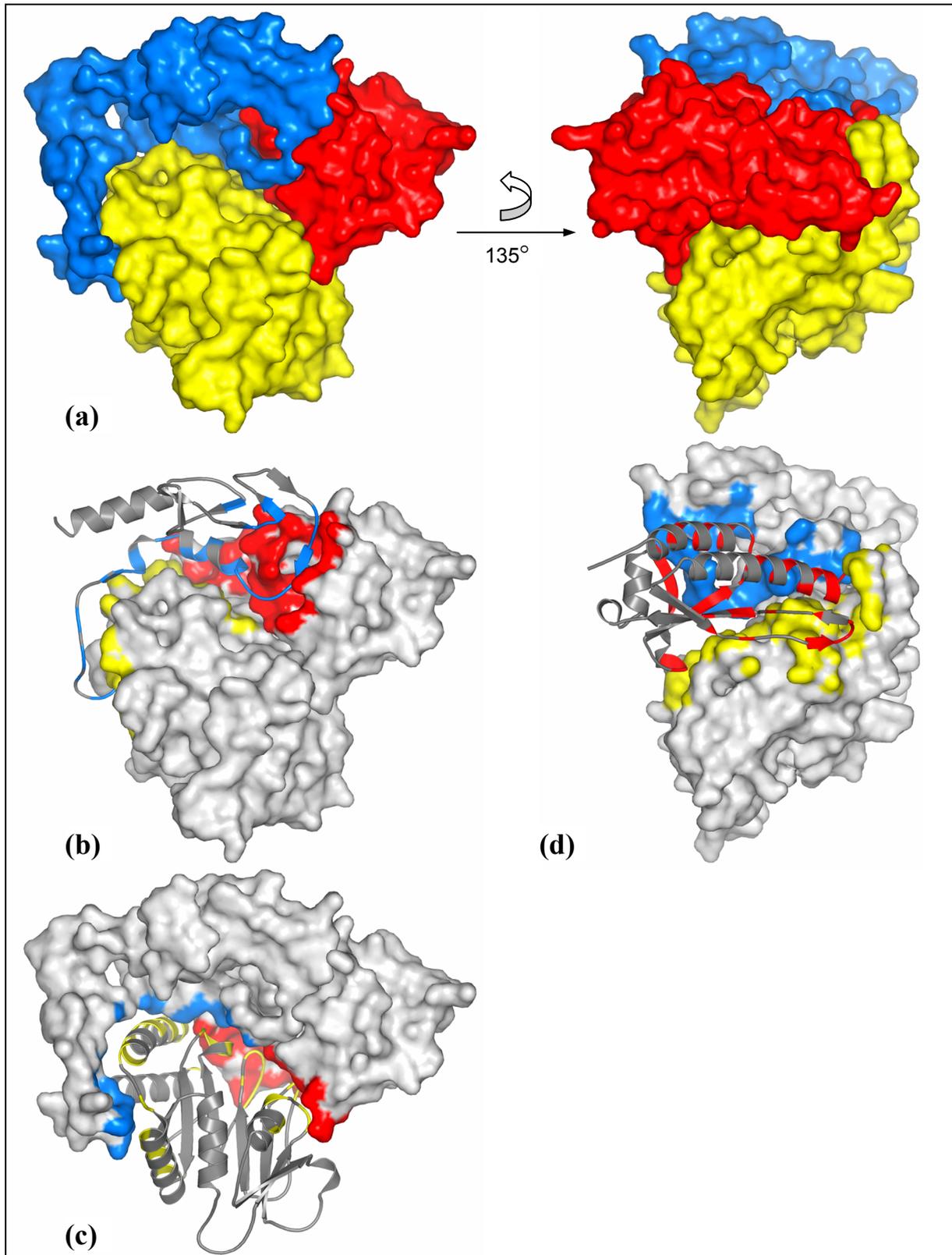
Die in ihrer Beweglichkeit eingeschränkte und somit strukturstabilisierende Iminosäure Prolin ist in der Alliinasestruktur an 19 Positionen der Proteinkette (37, 48, 86, 96, 145, 151, 154, 163, 166, 195, 205, 208, 231, 235, 286, 345, 358, 359, 361) vertreten. Vorwiegend finden sich die Prolinreste in Schleifen und an den Enden von Sekundärstrukturelementen (Abb. 3.23). Eine Häufung von Prolinresten kann in den Schleifen zwischen den Sekundärstrukturelementen H5-S10 (P145, P151, P154), S10-H6 (P163, P166), S12-S13 (P205, P208), S13-S14 (P231, P235) sowie S16-S19 (P358, 359, 361) beobachtet werden. Auffallend ist dabei, daß drei (P163, P205, P208) der vier *cis*-Prolinreste in naher Gesellschaft zu weiteren sechs *trans*-Prolinresten (P166, P231, P235, P358, P359, P361) im Bereich der Grenzfläche von zentraler zu C-terminaler Domäne anzutreffen sind.



**Abb. 3.23** Verteilung der Prolinreste in der dreidimensionalen Alliinasestruktur. *Trans*-Prolinreste sind blau, *cis*-Prolinreste hingegen rot in der Proteinrückgratdarstellung von Monomer B hervorgehoben und numeriert.

### 3.6.3.5 Intramolekulare Domänen-Kontakte

Das Monomer (siehe Abb. 3.24a) ist durch ein ausgedehntes Netz von Interaktionen zwischen den N-terminalen, zentralen und C-terminalen Domänen stabilisiert (siehe Anhang 7.2). Die N-terminale Domäne wechselwirkt (Abb. 3.24b) mit den beiden übrigen Domänen über die  $\beta$ -Faltblattstränge S1, S4 und S5 sowie der Schleife zwischen S6-S7 der EGF-ähnlichen Subdomäne als auch in großen Teilen mit dem nach dem  $\beta$ -Faltblattstrang S7 bis zur zentralen Domäne angeschlossenen Kettenbereich. Dieser Proteinabschnitt erstreckt sich, vom  $\beta$ -Faltblattstrang S7 kommend, horizontal auf der zentralen Domäne entlang, zieht an ihr nach



**Abb. 3.24** Domänen-Interaktionen im Alliinase-monomer. **(a)** Molekulare Oberflächen der N-terminalen (blau), zentralen (gelb) und C-terminalen Domäne (rot). **(b)-(d)** Kombinierte Darstellung molekularer Oberflächen (hellgrau) sowie Proteinrückgrate (dunkelgrau; **(b)** N-terminale, **(c)** zentrale, **(d)** C-terminale Domäne). In Domänen-Kontakte ( $\leq 4$  Å Abstand) involvierte Oberflächen- oder Proteinrückgratbereiche wurden entsprechend ihres Domänentyps eingefärbt (siehe **(a)**).

## Ergebnisse

dem  $\beta$ -Faltblattstrang S8 herab, um daraufhin leicht ansteigend in diese überzugehen (Abb. 3.24b). Die zentrale Domäne wird von den N- und C-terminalen Domänen kappenartig von einer Seite überstülpt (Abb. 3.24c). Dabei interagierende Aminosäurereste finden sich neben den beiden großen  $\alpha$ -Helices H9 und H10 auch auf den kleineren H4 und H8 ebenso wie in den zur Oberseite des siebensträngigen  $\beta$ -Faltblatts gerichteten Schleifenregionen zwischen den Elementen S10-H6, S12-S13 und S13-S14 wieder (Abb. 3.24c). Die C-terminale Domäne ist wie bereits die N-terminale Domäne in ausgiebigen Wechselwirkungen mit ihren beiden Begleitdomänen involviert (Abb. 3.24d). Einzig die  $3_{10}$ -Helix H12 und  $\alpha$ -Helix H13 ist nicht an intramolekularen Domänenkontakten beteiligt. Demgegenüber tragen in großem Maße die  $\beta$ -Faltblattstränge S20 und S21, die  $\beta$ -Haarnadelschleife (S17, S18) sowie die kurze  $\alpha$ -Helix H14 als auch die langen  $\alpha$ -Helices H11 und H15 zu Interaktionen mit den beiden anderen Domänen bei. Der  $\beta$ -Faltblattstrang S20 bildet zusammen mit dem  $\beta$ -Faltblattstrang S7 der N-terminalen Domäne ein kurzes, paralleles  $\beta$ -Faltblatt aus (vergleiche Abb. 3.21 links). Die C-terminale Domäne fixiert als strukturelles Bindeglied die N-terminale Domäne mit der zentralen Domäne (Abb. 3.24a).

### **3.6.4 Quartärstruktur**

#### **3.6.4.1 Dimeraufbau**

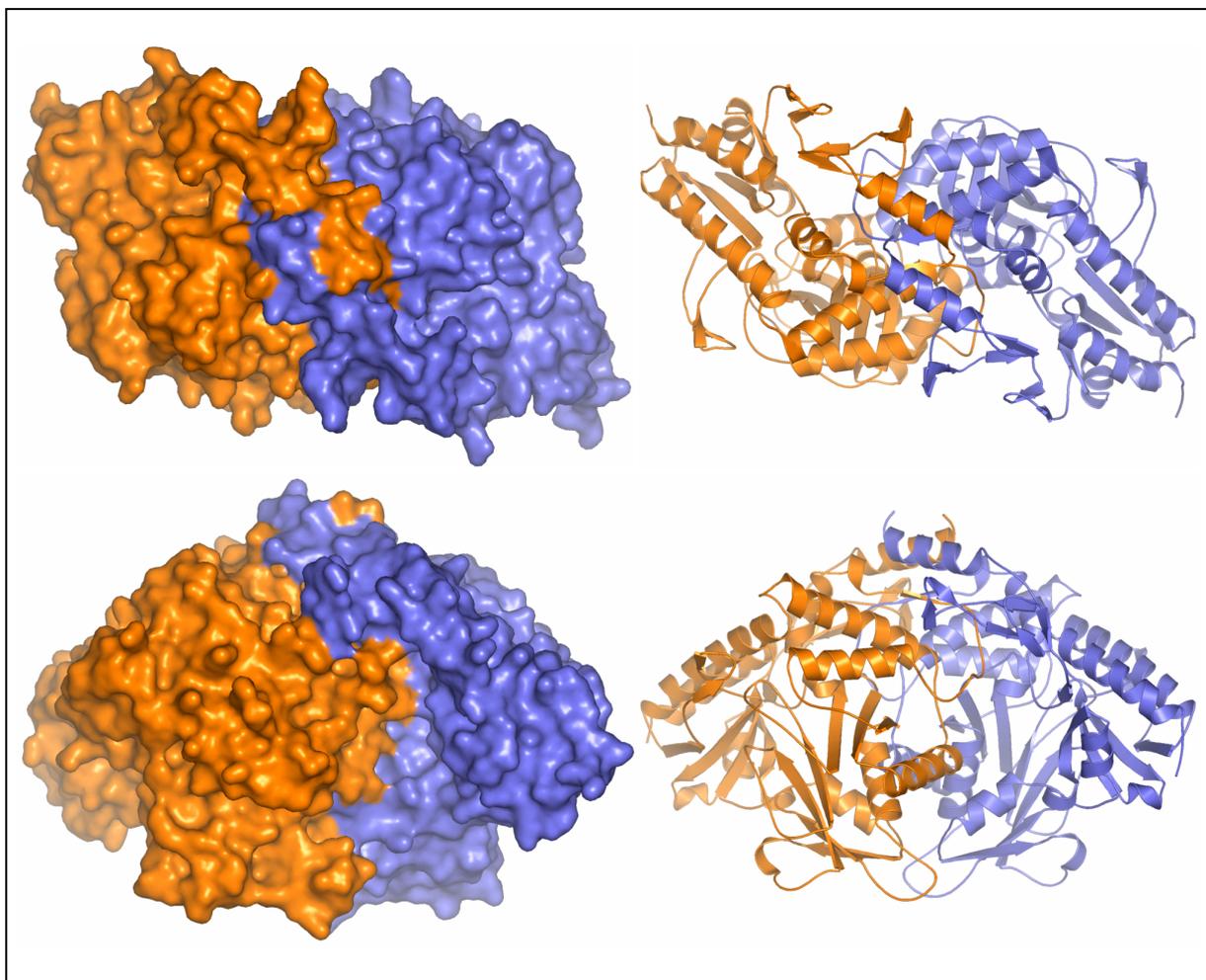
Die quarternäre Struktur der Alliinase stellt im Kristall ein Homodimer dar, welches Zweifachrotationssymmetrie entlang einer Dimerachse aufweist (Abb. 3.25). Die räumliche Ausdehnung des Dimers beträgt ca.  $101 \text{ \AA} \times 73 \text{ \AA} \times 61 \text{ \AA}$ , ohne einbezogene Heteroatome. Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche des Alliinasedimers umfaßt etwa  $31100 \text{ \AA}^2$ . Durch die enge Verbindung der beiden Untereinheiten ist je Monomer eine Fläche von ca.  $4700 \text{ \AA}^2$  vom Lösungsmittel abgeschirmt.

#### **3.6.4.2 Intermolekulare Monomer-Kontakte**

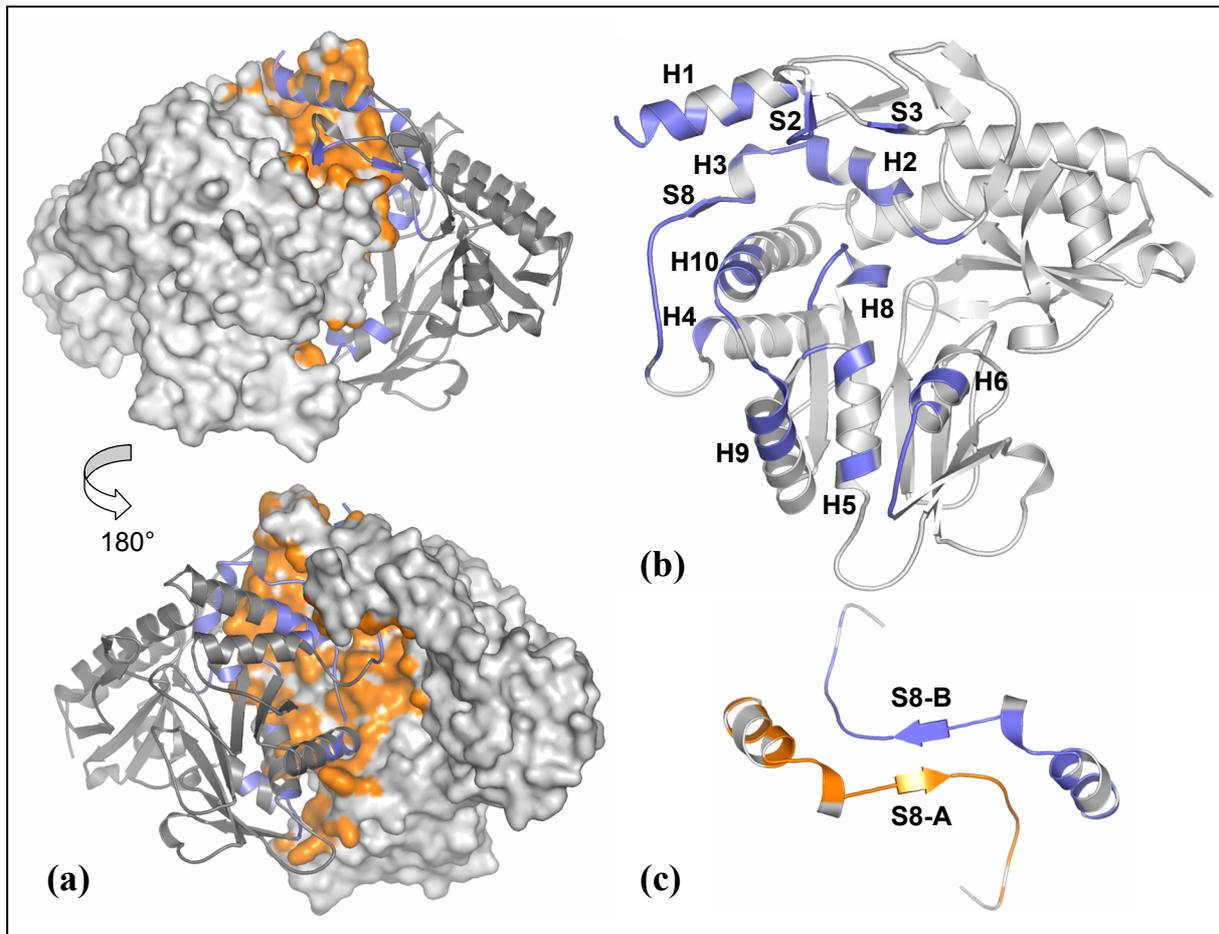
Bei der Ausbildung des Alliinasedimers sind Aminosäurereste der N-terminalen sowie der zentralen, jedoch nicht der C-terminalen Domäne beteiligt (Abb. 3.26a). In der N-terminalen Domäne steuern die  $\alpha$ -Helix H1, die  $\beta$ -Faltblattstränge S2 und S3 der EGF-Subdomäne, die  $\alpha$ -Helices H2 und H3 sowie der  $\beta$ -Faltblattstrang S8 und die nachfolgende Schleife Aminosäurereste zur Dimerisierung bei. In der zentralen Domäne stammen die Aminosäurereste von den drei  $\alpha$ -Helices (H9, H5, H6) der konkaven  $\beta$ -Faltblattseite sowie den N-Termini der  $\alpha$ -Helices H4 und H10 und nicht zuletzt der kurzen  $\alpha$ -Helix H8 (Abb. 3.26b).

## Ergebnisse

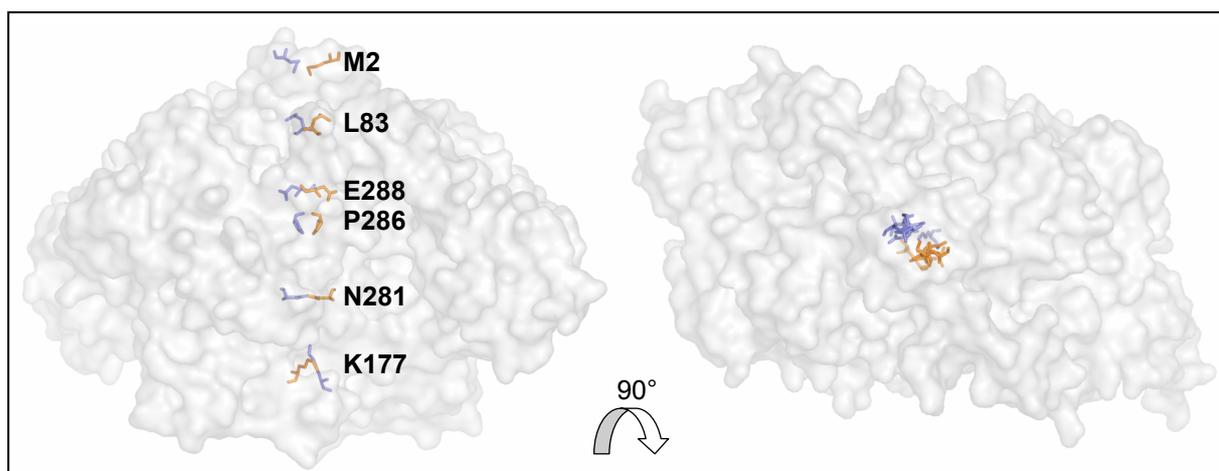
Die Kontakte zwischen den Monomeren sind aufgrund der zweizähligen Rotationssymmetrie des Dimers meist spiegelbildlich vorhanden (vergleiche Anhang 7.3). Entlang der Symmetrieachse ergeben sich hingegen einmalige, direkte Interaktionen zwischen gleichen Aminosäureresten der verschiedenen Monomere. Im einzelnen trifft dies für die Aminosäurereste 2, 83, 177, 281, 286 und 288 zu (Abb. 3.27). Der  $\beta$ -Faltblattstrang S8 findet im gleichen  $\beta$ -Faltblattstrang des Nachbarmonomers seinen Partner zur Ausbildung eines kurzen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts (Abb. 3.26c). Die N-terminalen  $\alpha$ -Helices H1 dimerisieren über vier Methioninreste, welche durch ein Netzwerk von hydrophoben Wechselwirkungen und van-der-Waals-Kontakten stabilisiert sind (Abb. 3.28).



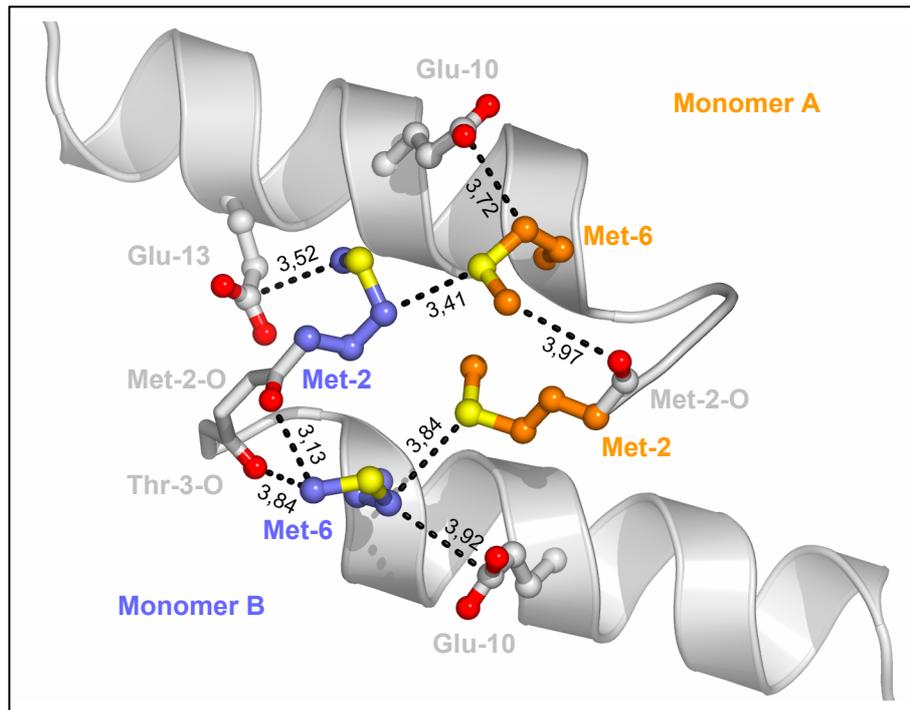
**Abb. 3.25** *Alliinasedimer*. Darstellung der molekularen Oberfläche und des Proteinrückgrats (Monomer A = orange, Monomer B = blauviolett). Obere Reihe = Blick auf die zweizählige Symmetrieachse, untere Reihe = Seitenansicht (im Vergleich zu oberer Reihe  $-90^\circ$  um die x-Koordinate gedreht). Außer dem Kofaktor PLP wurden keine weiteren Heteroatome im Oberflächenmodell berücksichtigt. Maßstab: 1 cm  $\approx$  11 Å.



**Abb. 3.26** Kontaktzonen im Alliinasedimer. (a) Kombinierte Oberflächen- und Rückgratdarstellung (Molekulare Oberfläche = Monomer A, Proteinrückgrat = Monomer B). (b) Monomer B mit gekennzeichneten interagierenden Sekundärstrukturbereichen. (c) Antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt in Proteinrückgratdarstellung, welches im Alliinasedimer entsteht. Oberflächen- und Rückgratbereiche, deren zugehörige Aminosäurereste  $\leq 4 \text{ \AA}$  voneinander entfernt liegen, sind entsprechend ihrem Monomertyp eingefärbt (orange = A, blauviolett = B).



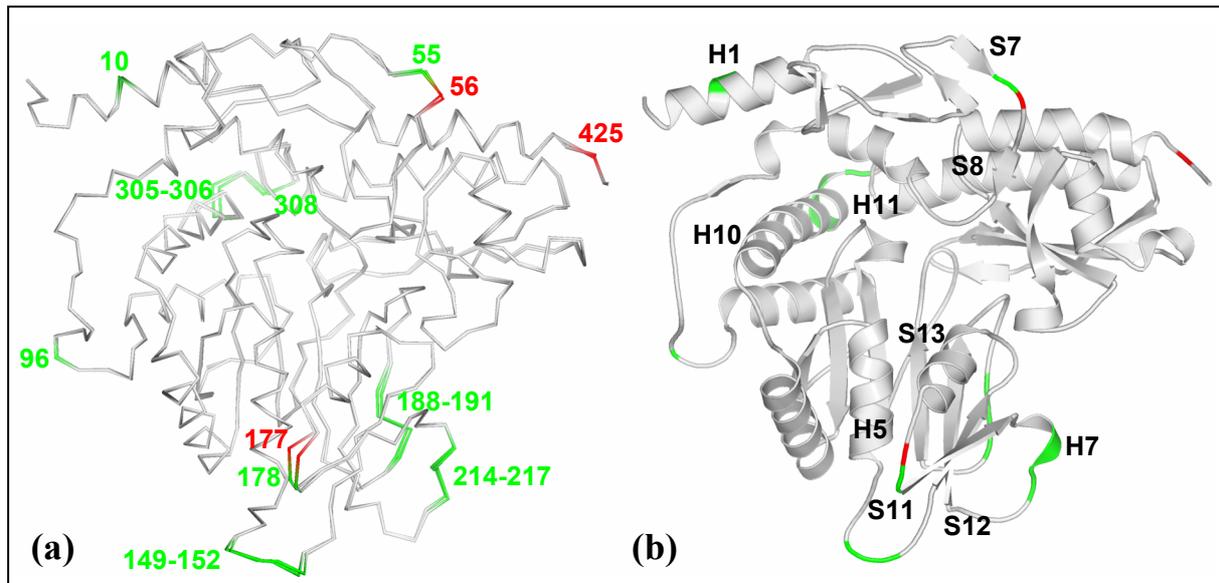
**Abb. 3.27** Miteinander wechselwirkende gleichartige Aminosäuren beider Monomere entlang der Dimerachse. Kombinierte Darstellung aus molekularer Oberfläche des Alliinasedimers und Stabmodellen der entsprechenden Aminosäureresten aus Monomer A (orange) und aus Monomer B (blauviolett).



**Abb. 3.28** Dimerisierung der N-terminalen  $\alpha$ -Helices über vier Methioninreste. Die  $\alpha$ -Helices sind als Proteinrückgrat- und die Methionin- sowie die mit ihnen interagierenden Aminosäurereste als Kugelstabmodelle dargestellt. Interaktionen ( $\leq 4$  Å) der Methioninreste mit umliegenden Aminosäureresten sind als schwarze Punktlinien angedeutet und mit Längenangaben in der Einheit Å versehen.

### 3.6.4.3 $C_{\alpha}$ -Positionsabweichungen zwischen Monomeren A und B

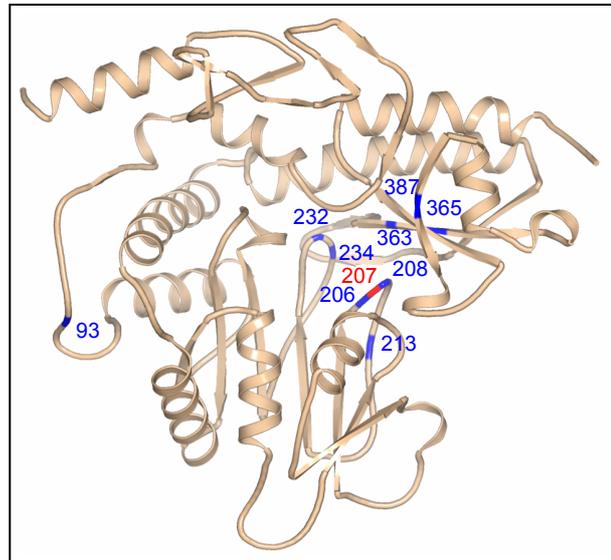
Die mittlere Standardabweichung der  $C_{\alpha}$ -Atompositionen beider Monomere liegt für die N-terminale sowie die zentrale Domäne mit 0,33 Å bzw. 0,34 Å etwa gleichauf wie für die Betrachtung des gesamten Monomers (0,36 Å). Nur die C-terminalen Domänen ergeben im Einzelvergleich mit 0,23 Å Standardabweichung einen etwas geringen Wert. Bei genauerer Analyse zeigt sich, daß die  $C_{\alpha}$ -Positionen der Aminosäurereste 10, 55, 96, 149-152, 188-191, 214-217, 305-306 und 308 bzw. 56, 177 und 425 mehr als zwei bzw. drei Standardabweichungen zwischen den Monomeren differieren (Abb. 3.29). Diese Bereiche liegen auf der  $\alpha$ -Helix H1, der Schleife der EGF-ähnlichen Domäne zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen S7 und S8, der *cis*-Pro-Schleife zum Ende der N-terminalen Domäne, der Schleife nach der  $\alpha$ -Helix H5, der Schleife kurz vor Beginn des  $\beta$ -Faltblattstranges S11, der  $3_{10}$ -Helix H7 und nachfolgender Schleife, der Schleife zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen S12 und S13, dem Ende der  $\alpha$ -Helix H10 und dem Beginn der  $\alpha$ -Helix H11 sowie dem C-Terminus (Abb. 3.29).



**Abb. 3.29** Abweichende  $C_{\alpha}$ -Positionen zwischen den Monomeren A und B. (a) Überlagerung der  $C_{\alpha}$ -Verläufe beider Monomere, (b) Proteinrückgrat-Darstellung von Monomer B.  $C_{\alpha}$ -Positionen bzw. zugehörige Proteinrückgratbereiche sind nach der Standardabweichung der  $C_{\alpha}$ -Positionen farbcodiert: grau <  $2\sigma$ , grün =  $2-3\sigma$ , rot >  $3\sigma$ . Im Text erwähnte Aminosäurereste sowie Sekundärstrukturelemente sind beschriftet.

### 3.6.3.4 $\omega$ -Dihedralwinkel-Abweichungen

Die theoretisch planare Peptidbindung differiert für die Peptidbindungen der Aminosäurereste 92, 207, 208 und 232 in Monomer A sowie 93, 206-208, 213, 232, 234, 363, 365 und 387 in Monomer B um mehr als drei Standardabweichungen ( $8,3^{\circ}$ ) vom Mittelwert ( $177,1^{\circ}$ ), folglich  $11,1^{\circ}$  von der planaren Konformation. Das B-Monomer weist eine größere Anzahl und höhere Werte bei  $\omega$ -Winkelabweichungen auf als Monomer A (Anhang 7.4, Tab. 7.6), welche sich zudem - bis auf Position 93 - in der Kontaktzone zwischen zentraler und C-terminaler Domäne konzentrieren (Abb. 3.30). Die Schleife mit den Aminosäureresten S204 bis L211 (nicht gezeigt) stellt die Region mit der höchsten torsionalen „Anspannung“ (= Planaritätsabweichung der Peptidbindung) beider Alliinase-monomere dar. Ferner enthält diese „ange-



**Abb. 3.30** Nicht-planare Peptidbindungen in Monomer B. Proteinrückgratdarstellung mit farblich abgesetzten sowie beschrifteten Aminosäuren, deren  $\omega$ -Dihedralwinkel mehr als  $3\sigma$  (blau) bzw.  $5\sigma$  (rot) vom Mittelwert abweichen.

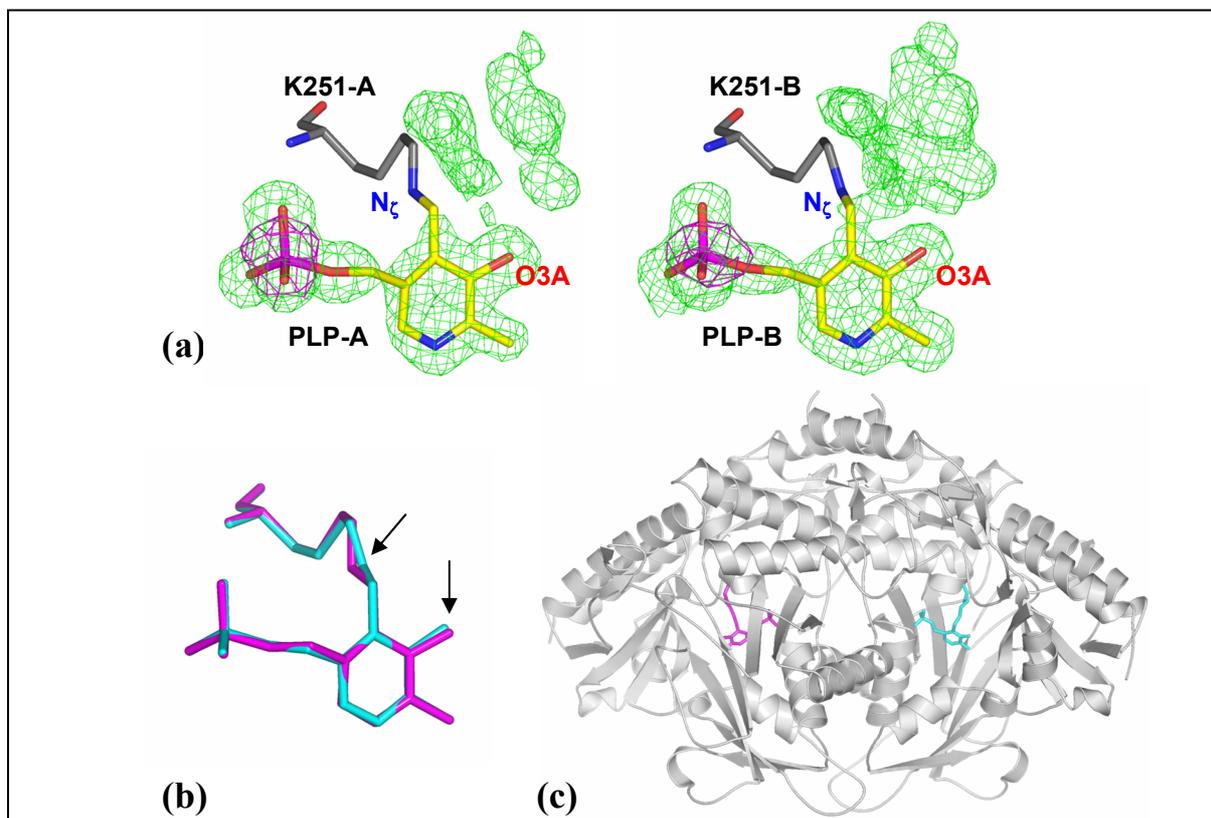
## Ergebnisse

spannte“ Schleife zwei *cis*-Proline (205, 208), wobei der  $\omega$ -Winkel von P208 (24,5°; Anhang 7.4, Tab. 7.6) mit mehr als fünf Standardabweichungen (Abb. 3.30) erheblich vom planaren Fall differiert. Auch die *trans*-Peptidbindungen N206-N207 sowie P208-E209 liegen mit z.T. mehr als drei Standardabweichungen bzw. 16° Differenz zu 180° (Anhang 7.4, Tab. 7.6) nicht mehr planar vor.

### 3.6.5 Bindungsstellen für Heteroatome

#### 3.6.5.1 Kofaktormoleküle

Die  $(mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Differenzelektronendichte an der  $N_{\zeta}$ -Position des Aminosäurerests K251 konnte für beide Monomere in großen Teilen jeweils durch die Anwesenheit eines kovalent gebundenen PLP-Moleküls (internes Aldimin) erklärt werden (Abb. 3.31a). Die korrekte Orientierung des Kofaktors wurde anhand der anomalen  $(F_{\text{obs}}^+ - F_{\text{obs}}^-, \alpha_{\text{calc}})$  Differenzelektronendichte verifiziert, welche für die Phosphoratom Maxima von 6,7  $\sigma$  (Monomer A) bzw. 8,8  $\sigma$  (Monomer B) aufweist (Abb. 3.31a). Beide K251-PLP-Addukte unterscheiden sich leicht in der Lage des  $N_{\zeta}$ -Atoms des Lysins und des O3A-Atoms des PLP (Abb. 3.31b). Dabei ist das  $N_{\zeta}$ -Atom vom O3A-Atom in Monomer A mit 3,69 Å weiter entfernt als in Monomer B mit 3,20 Å. In beiden Fällen verhindert eine ungünstige Geometrie die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung. Die Kofaktorbindungsstellen der Monomere liegen auf voneinander

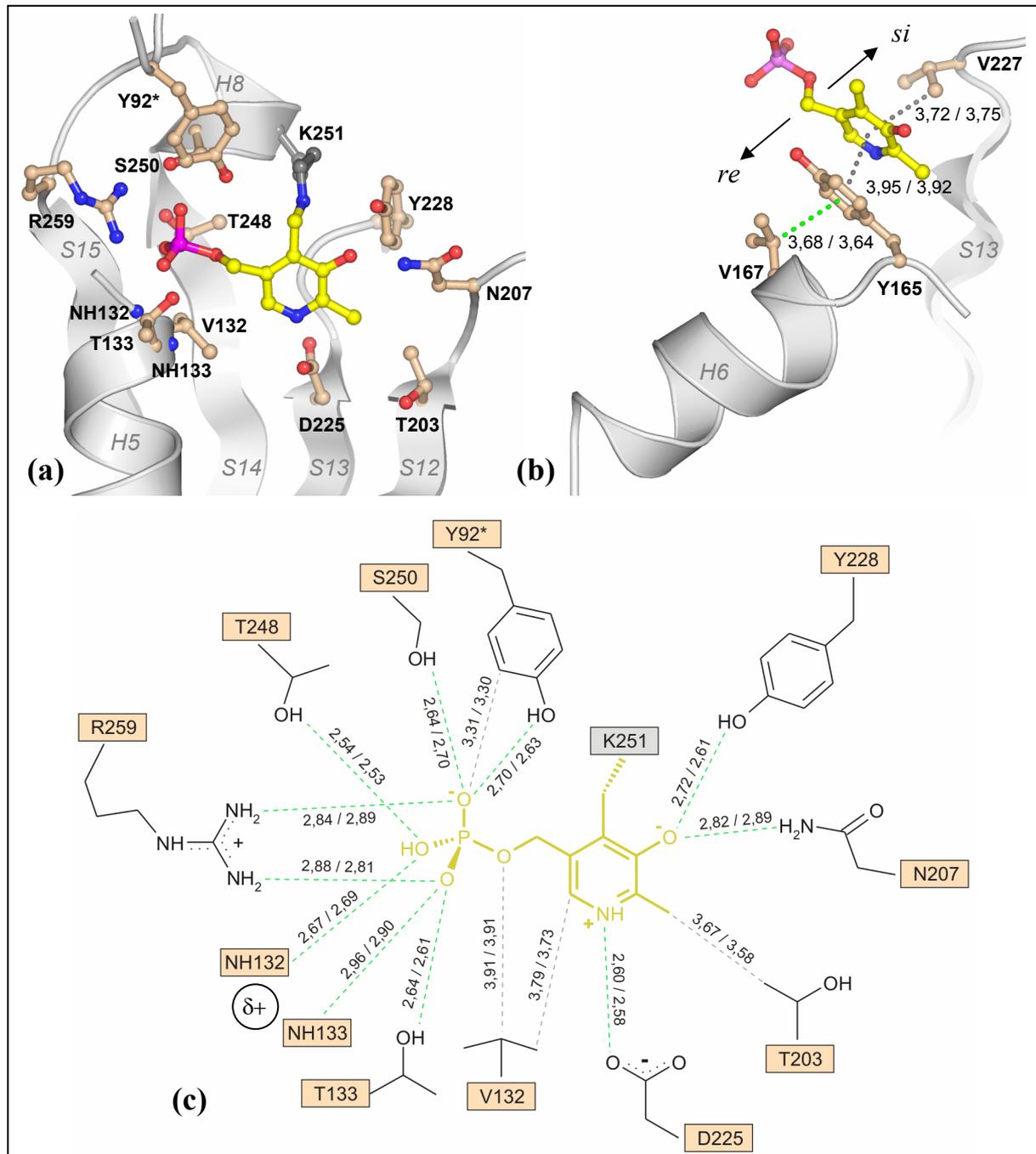


**Abb. 3.31** Kofaktorbindung - Internes Aldimin. **(a)**  $(mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Differenzelektronendichtekarten (grün, Konturierung: 3  $\sigma$ ) mit Lys251-PLP-Addukten als Stabmodelle für beide Monomere. C-Atome von Lys251 = grau, von PLP = gelb. Zusätzlich ist die anomale  $(F_{\text{obs}}^+ - F_{\text{obs}}^-, \alpha_{\text{calc}} - 90^\circ)$ -Differenzelektronendichtekarte (violett, Konturierung: 3  $\sigma$ ) für den 2 Å-Messwellenlänge-Datensatz gezeigt. Die nicht durch PLP interpretierte Elektronendichte wird in den Kapiteln 3.6.5.2 / 3.6.5.3 diskutiert. Zur Phasenberechnung ( $\alpha_{\text{calc}}$ ) wurden alle Heteroatome im Bereich der aktiven Zentren herausgelassen. **(b)** Überlagerte Lys251-PLP-Addukte, Pfeile verweisen auf die Atome  $N_{\zeta}$  und O3A. **(c)** Alliinasedimer als Proteinrückgrat sowie Lys251-PLP-Addukte als Stabmodelle. In **(b)** + **(c)** sind die Lys251-PLP-Addukte entsprechend der Monomertzugehörigkeit eingefärbt (violett = Monomer A, hellblau = Monomer B).

## Ergebnisse

abgewandten Seiten des Dimers (Abb. 3.31c). Das PLP-Molekül ist neben der kovalenten Bindung an K251 durch zehn weitere Aminosäurereste nicht-kovalent mittels Wasserstoffbrücken-, Dipol-Dipol-, Stapel- sowie van-der-Waals-Wechselwirkungen innerhalb der zentralen Alliinasedomäne auf der konkaven Seite des siebensträngigen  $\beta$ -Faltblatts fixiert (Abb. 3.32a-c). Der Pyridiniumstickstoff N1 bildet eine sehr kurze Salzbrücke (2,60 / 2,58 Å - Distanzen in Monomer A / B) zur Carboxylgruppe von D225 auf dem  $\beta$ -Faltblattstrang S13 aus (Abb. 3.32a,c). Die C2A-Methylgruppe steht im van-der-Waals-Kontakt (3,67 / 3,58 Å) mit der Methylgruppe von T203 des  $\beta$ -Faltblattstrangs S12 (Abb. 3.32a,c). Die phenolische C3-OH-Gruppe wird durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäureresten N207 (2,82 / 2,89 Å) und Y228 (2,72 / 2,61 Å) stabilisiert, welche auf *si*-seitigen Schleifen, C-terminal zu den  $\beta$ -Faltblattstränge S12 und S13, liegen (Abb. 3.32a,c). Der Pyridiniumring ist durch die Aminosäurereste Y165 und V227 beidseitig fixiert (Abb. 3.32b). Dabei gehen Y165 und V227 eine Stapelwechselwirkung (3,92 / 3,95 Å) bzw. einen hydrophoben Kontakt (3,72 / 3,75 Å) mit dem Ringsystem ein. V227 entstammt der *si*-seitigen Schleife, C-terminal zu  $\beta$ -Faltblattstrang S13, und Y165 der *re*-seitigen  $\alpha$ -Helix H6. Letzterer Aminosäurerest ist seinerseits durch einen hydrophoben Kontakt mit V167 stabilisiert, welcher anhand der Geometrie auch als C-H $\cdots$  $\pi$ -Wasserstoffbrückenbindung (BRANDL *et al.*, 2001) aufgefaßt werden kann ( $\angle$  C-H $\cdots$  $\pi$  = 144° / 168° in Monomer A / B). Die Phosphatgruppe des Kofaktors stellte den am ausführlichsten durch das Apoprotein erkannten Bereich des PLP dar. Das Nachbarmonomer steuert mit Y92\* einen Aminosäurerest zur PLP-Interaktion bei (Abb. 3.32a,c). Dieser beteiligt sich mit der OH-Gruppe an einer kurzen Wasserstoffbrückenbindung (2,70 / 2,63 Å) und gleichzeitig mit der Kante des Phenolrings an einem van-der-Waals-Kontakt (3,31 / 3,30 Å) zum PLP-Phosphat. Auf dem Proteinabschnitt mit dem  $\beta$ -Faltblattstrang S14, der  $\alpha$ -Helix H8 und der verbindenden Schleife zum  $\beta$ -Faltblattstrang S15 befinden sich neben K251 ( $\alpha$ -Helix H8) weitere, mit der Phosphatgruppe wechselwirkende Aminosäurereste (Abb. 3.32a,c). So bildet T248 die kürzeste Wasserstoffbrückenbindung (2,54 / 2,53 Å) von allen mit dem PLP interagierenden Aminosäureresten aus. S250 und R259 weisen eine Wasserstoff- bzw. Salzbrückenbindung (2,64 / 2,70 Å bzw. 2,84+2,88 / 2,81+2,89 Å) mit dem PLP-Phosphat auf. Neben der Guanidinogruppe von R259 trägt auch das positive Helixdipolmoment der  $\alpha$ -Helix H5 zur Stabilisierung der negativen Ladung der Phosphatgruppe bei (Abb. 3.32c). Die  $\alpha$ -Helix H5 bildet zudem mit den Hauptkettenstickstoffen der Positionen V132 und T133 Wasserstoffbrückenbindungen (2,67 / 2,69 Å und 2,96 / 2,90 Å) zu den Phosphatsauerstoffen aus (Abb. 3.32c). Darüber hinaus stehen auch die Seitenketten von V232 und

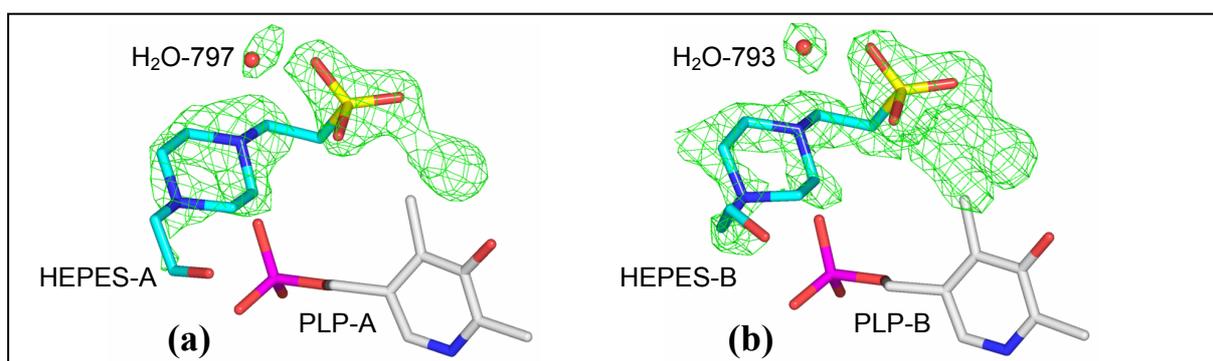
T233 in van-der-Waals-Wechselwirkung (3,91 / 3,91 Å) bzw. Wasserstoffbrückenbindung (2,64 / 2,61 Å) zum PLP-Phosphat (Abb. 3.32a,c). Einen zweiten van-der-Waals-Kontakt (3,79 / 3,73 Å) bildet V232 mit dem C5-Atom des Pyridiniumrings aus (Abb. 3.32a,c).



**Abb. 3.32** Kofaktorbindung - Interaktionen mit dem Apoprotein. **(a)+(b)** Kugelstabmodell Darstellungen von PLP mit interagierenden Aminosäureresten ( $\leq 4$  Å Abstand, beschriftet) in Kombination mit zugehörigen Proteinrückgratbereichen (Sekundärstrukturlemente beschriftet). **(c)** Schematische Darstellung der Interaktionen aus **(a)**. In **(b)+(c)** sind H-Brücken durch grüne sowie hydrophobe, van-der-Waals- und Stapel-Wechselwirkungen durch graue Punktlinien verdeutlicht und die Distanzen (Monomer A / B) in der Einheit Å wiedergegeben. In **(b)** sind die PLP-Molekülseiten (*re/si*) eingezeichnet. Das Dipolmoment der Helix H5 wurde in **(c)** als  $\delta^+$  symbolisiert. Y92\* ist ein Aminosäurerest des anderen Monomers.

### 3.6.5.2 Inhibitormoleküle

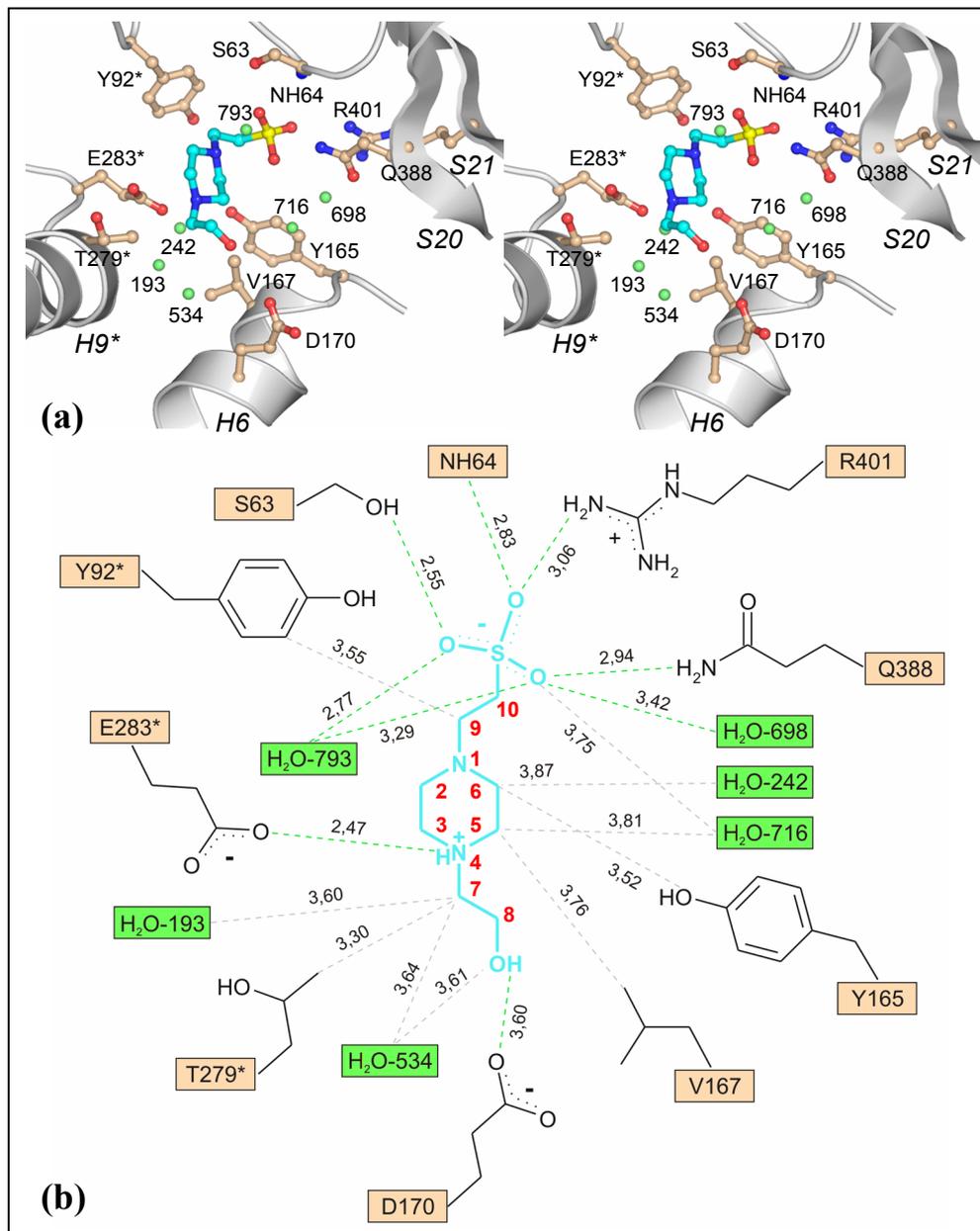
Wie im vorigen Kapitel (Abb. 3.31a) ersichtlich wurde, konnte die  $(mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Differenzelektronendichtekarte am kofaktorbindenden Lys-Rest beider Monomere nicht vollständig durch den Einbau der PLP-Moleküle erklärt werden. In Anbetracht des zur Kristallisation verwendeten pH-Puffers HEPES wurde die verbliebene positive  $(mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Differenzelektronendichte jeweils als ein Wasser- ( $\text{H}_2\text{O}$ -797 bzw.  $\text{H}_2\text{O}$ -793) sowie ein zu 50 % besetztes HEPES-Molekül mit der deutlich hervortretenden Sulfonylgruppe interpretiert (Abb. 3.33). Die Bindung des HEPES-Moleküls erfolgt für beide Monomere in analoger Weise (nicht gezeigt), so daß im Detail nur auf Monomer B eingegangen wird (Abb. 3.34). Beide Monomere tragen mit Aminosäureresten zur Erkennung des HEPES-Moleküls bei (Abb. 3.34a). Die Sulfonylgruppe stellt hierbei den am intensivsten und nur mit Aminosäureresten aus den N- und C-terminalen Domänen des selben Monomers in Wechselwirkungen begriffenen Molekülbereich dar. So sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Sulfonylgruppe und den Seitenketten von S63 (2,55 Å), Q388 (2,94 Å) und R401 (3,06 Å) sowie dem Hauptkettenstickstoff von G64 (2,83 Å) ausgebildet (Abb. 3.34b). Ferner stehen zwei Wassermoleküle über eine gegabelte ( $\text{H}_2\text{O}$ -793 - 2,77 / 3,29 Å) bzw. schwache Wasserstoffbrückenbindung ( $\text{H}_2\text{O}$ -698 - 3,42 Å) in Kontakt mit der Sulfonylgruppe (Abb. 3.34b). Der Piperazinring des HEPES wird vom Protein anhand einer sehr kurzen Wasserstoffbrückenbindung (2,47 Å) zwischen dem HEPES-N4-Atom und der Carboxylgruppe von E283\* erkannt. Dazu muß das N4-Atom protoniert vorliegen (Abb. 3.34b). Weitere Molekülbereiche des HEPES interagieren nur über schwache Wechselwirkungen mit Aminosäureresten des Proteins bzw. mit Wassermolekülen auf der Proteinoberfläche (Abb. 3.34a). Im einzelnen sind dies Kontakte der Aminosäurereste Y92\* mit dem HEPES-C9-Atom (3,55 Å), T279\* mit dem HEPES-C7-Atom (3,30 Å), D170 mit



**Abb. 3.33** HEPES-Bindung im aktiven Zentrum. Darstellung der  $(mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Differenzelektronendichtekarte (grün, Konturierung:  $3 \sigma$ ) sowie Stabmodellen von HEPES und PLP sowie Wassermolekülen (rote Kugeln) für Monomer A (a) und B (b). Zur Berechnung der Phaseninformation  $\alpha_{\text{calc}}$  wurden außer dem PLP alle Heteroatome im Bereich der aktiven Zentren herausgelassen. Die nicht durch HEPES oder  $\text{H}_2\text{O}$ -797 / 793 interpretierte Elektronendichte wird in Abb. 3.35 erklärt.

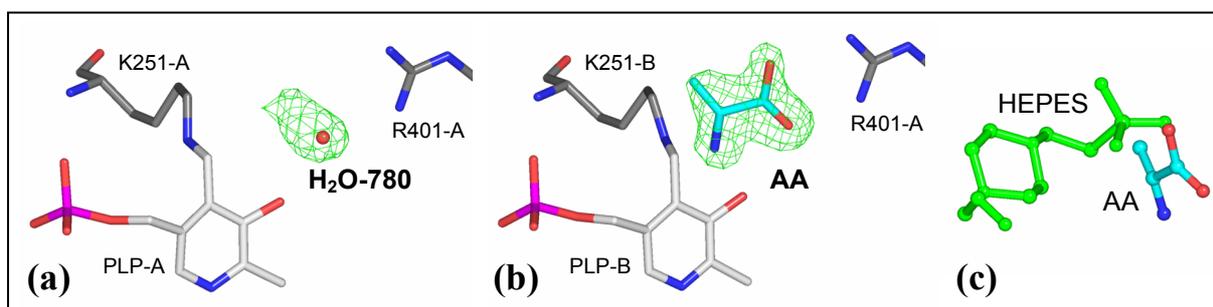
## Ergebnisse

dem HEPES-O8-Atom (3,60 Å), V167 mit dem HEPES-C5-Atom (3,76 Å), Y165 mit dem HEPES-C6-Atom (3,52 Å) sowie der Wassermoleküle H<sub>2</sub>O-193 und H<sub>2</sub>O-534 mit dem HEPES-C7-Atom (3,60 Å und 3,64 Å), H<sub>2</sub>O-534 mit den HEPES-O8-Atom (3,61 Å), H<sub>2</sub>O-716 mit den HEPES-C7-Atom und der Sulfonylgruppe (3,81 Å und 3,75 Å) und H<sub>2</sub>O-242 mit dem HEPES-C6-Atom (3,87 Å) (Abb. 3.34b).

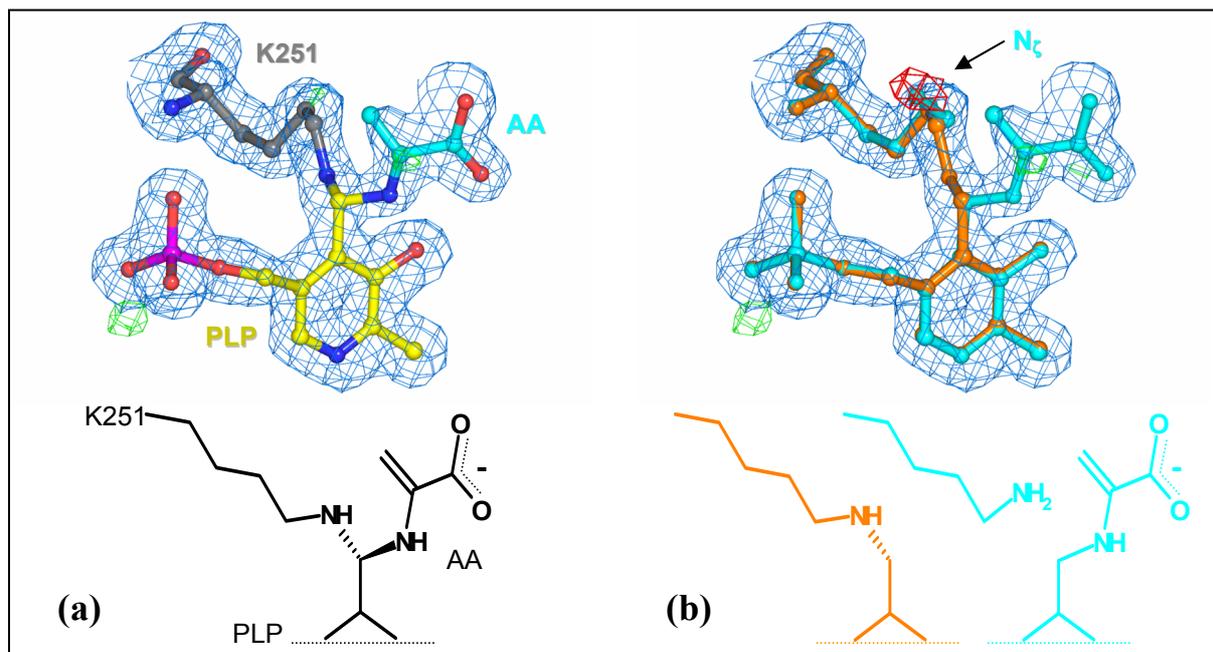


**Abb. 3.34** HEPES-Interaktionen im aktiven Zentrum von Monomer B. **(a)** Stereo-Darstellung von HEPES (C-Atome in hellblau) und im Abstand  $\leq 4$  Å angeordneten Aminosäureresten als Kugelstabmodelle mit beteiligten Proteinrückgratbereichen (Sekundärstrukturlelemente beschriftet) sowie Wassermolekülen (grüne Kugeln, numeriert). **(b)** Schematische Darstellung des Teildbildes **(a)** mit durch Punktlinien symbolisierten HEPES-Wechselwirkungen zum Protein oder Wassermolekülen (grün = Wasserstoffbrückenbindungen, grau = hydrophobe und van-der-Waals-Interaktionen). \* = Aminosäurerest oder Sekundärstrukturlelement des Nachbarmonomers. Die HEPES-Atome sind in **(b)** rot numeriert.

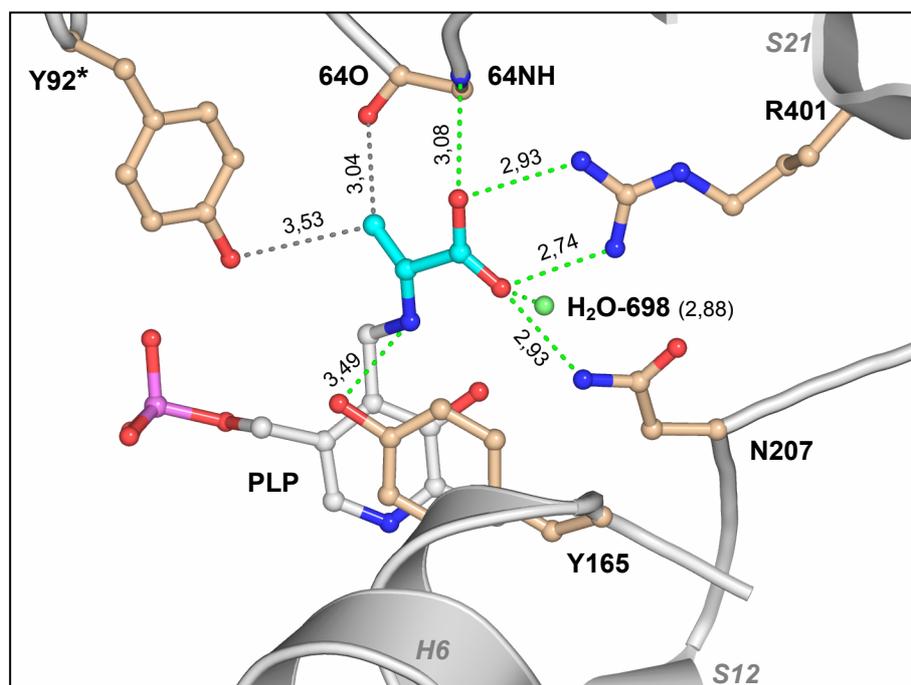
Die Elektronendichte der aktiven Zentren beider Monomere wurde durch den Einbau der HEPES-Moleküle noch nicht vollständig interpretiert (Abb. 3.33). Es verblieben in der ( $mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Elektronendichtekarte weiterhin positive Differenzelektronendichten, die in den Monomeren jedoch unterschiedlich ausgeprägt sind (Abb. 3.35a,b). So konnte in Monomer A der Differenzelektronendichte nur ein Wassermolekül (100 % Besetzung) zugeordnet werden (Abb. 3.35a). Im Gegensatz dazu wurde in Monomer B die größer ausgeprägte Differenzelektronendichte und in Anbetracht des zur Kristallisation verwendeten Inhibitors S-Ethyl-L-cystein als ein AA-Molekül interpretiert (Abb. 3.35b). Ein Indiz für die richtige Position der AA-Carboxylatgruppe stellt die nahe gelegene positiv geladene Guanidinogruppe der Aminosäure R401 dar (Abb. 3.35b). Der Besetzungsgrad des AA-Moleküls wurde zu 50 % festgelegt, da das zuvor gefundene HEPES-Molekül mit einem der Sulfonylsauerstoffe die gleiche Position beansprucht wie einer der AA-Carboxylsauerstoffe (Abb. 3.35c). Die kovalente Bindung von AA über seine Aminogruppe an das C4A-Atom des Kofaktors wurde als geminales Diamin verfeinert (Abb. 3.36a). Die Alternative eines Gemischs aus 50 % internem (Lys-PLP) und 50 % externem Aldimin (PLP-AA) konnte aufgrund der sich ergebenden negativen Differenzelektronendichte am  $N_{\zeta}$ -Atom des Lys-Rests des externen Aldimin nicht unterstützt werden (Abb. 3.36a). Das AA-Molekül wird neben der kovalenten Kofaktorbindung durch sieben Interaktionen mit Aminosäureresten beider Monomere im aktiven Zentrum verankert (Abb. 3.37). Die zwei wichtigsten steuert in Form einer Salzbrücke die Seitenkette des schon erwähnten Aminosäurerests R401 (2,74 Å und 2,94 Å) vom  $\beta$ -Faltblattstrang S21 der C-terminalen Domäne bei (Abb. 3.37). Weitere Wasserstoffbrückenbindungen zur AA-Carboxylgruppe bilden der Hauptkettenstickstoff von G64 (3,08 Å) der N-terminalen Domäne, die Seitenkette von N207 (2,93 Å) aus der Schleife nach dem  $\beta$ -Faltblattstrang S12 in der zentralen Domäne und ein



**Abb. 3.35**  $\alpha$ -Aminoacrylat-Bindung im aktiven Zentrum. (a) + (b) Darstellung der ( $mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Differenzelektronendichtekarten (grün, Konturierung:  $3\sigma$ ) sowie der Stabmodelle von K251, R401 (nur teilweise sichtbar), PLP und AA und einem Wassermolekül (rote Kugel) für Monomer A (a) und Monomer B (b). Zur Berechnung der Phaseninformation  $\alpha_{\text{calc}}$  wurden  $H_2O-780$  und AA aus dem Modell entfernt. (c) Kugelstabmodelle von HEPES und AA im aktiven Zentrum von Monomer B.



**Abb. 3.36** Geminales Diamin oder Aldimin-Mix? Darstellung von  $(m2F_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Elektronendichte- (blau, Konturierung:  $1 \sigma$ ) und  $(mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Differenzelektronendichtekarten (grün/rot, Konturierung:  $+3/-3 \sigma$ ) sowie Kugelstabmodellen und alternativ Strichzeichnungen von K251, PLP und AA. (a) Geminales Diamin mit 50 % besetztem AA. (b) Jeweils 50 % besetztes internes (orange) und externes (hellblau, N<sub>ε</sub> mit Pfeil versehen) Aldimin.



**Abb. 3.37** Interaktionen von  $\alpha$ -Aminoacrylat im aktiven Zentrum von Monomer B. Darstellung von AA, interagierenden Aminosäureresten (beschriftet) und PLP als Kugelstabmodelle mit zugehörigen Sekundärstrukturelementen (beschriftet) als Proteinrückgrate sowie einem Wassermolekül (grüne Kugel). Y92\* stammt vom Nachbarmonomer. Wasserstoffbrückenbindungen (grüne Punktlinien) sowie van-der-Waals-Interaktionen (graue Punktlinien) sind mit Längenangaben [ $\text{\AA}$ ] wiedergegeben (bei H<sub>2</sub>O-698 Länge in Klammern).

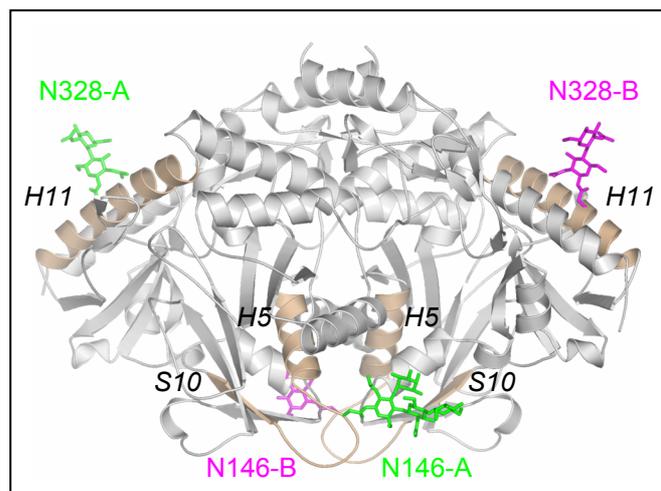
## Ergebnisse

Wassermolekül (2,88 Å) aus (Abb. 3.37). Die AA-Aminogruppe ist in einer schwachen Wasserstoffbrückenbindung (3,49 Å) zu Y165 involviert (Abb. 3.37), einem Aminosäurerest der  $\alpha$ -Helix H6 aus der zentralen Domäne. Van-der-Waals-Kontakte existieren zwischen dem AA-C $\beta$ -Atom und dem Carbonylsauerstoff von G64 (3,04 Å) der N-terminalen Domäne sowie der Seitenkette von Y92\* (3,53 Å) der N-terminalen Domäne des Nachbarmonomers (Abb. 3.37).

### 3.6.5.3 Zuckerketten

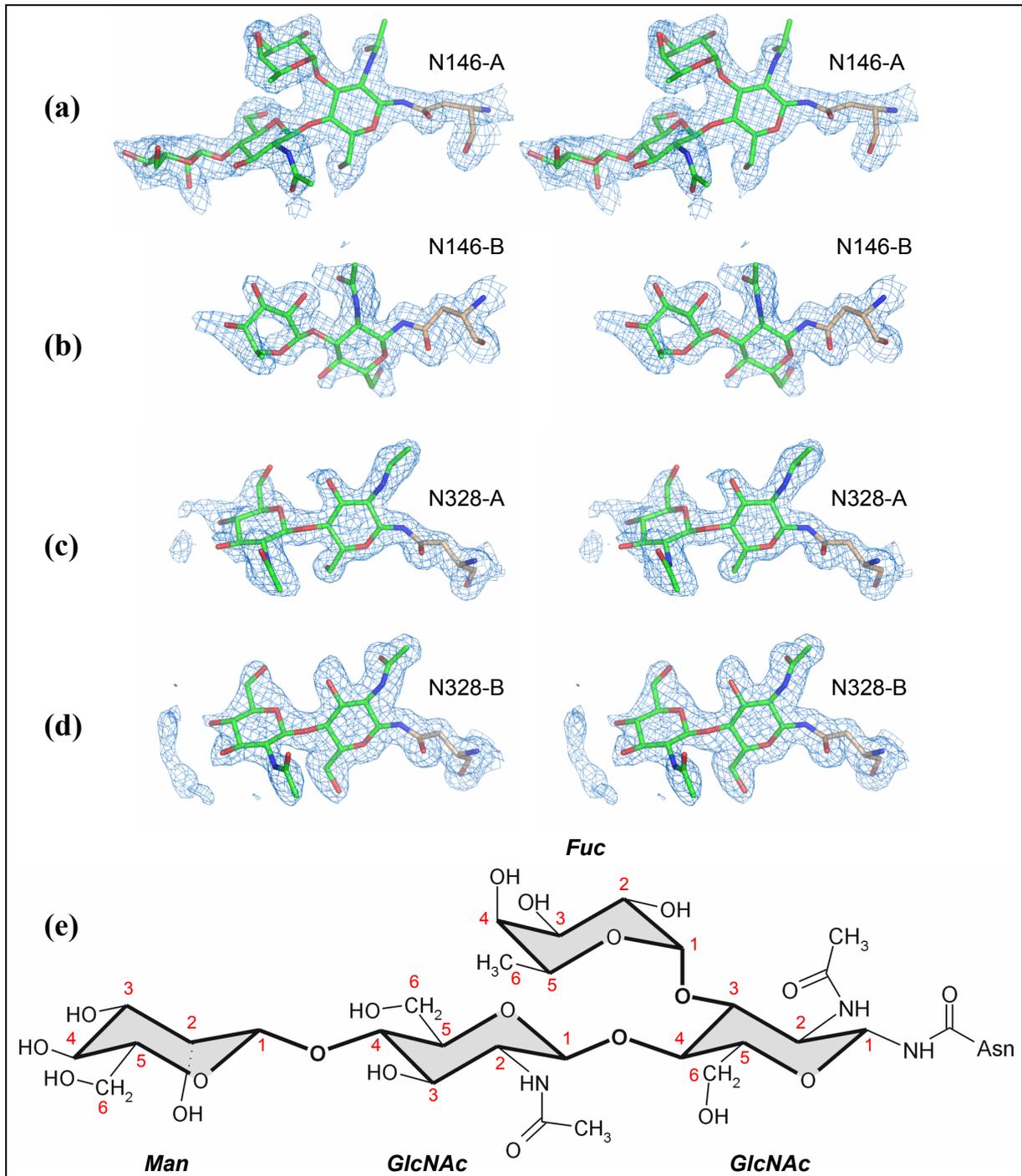
In der Alliinasestruktur wurden je Monomer zwei N-Glykosylierungsstellen gefunden: N146 und N328 (Abb. 3.38). Die erste Position (N146) befindet sich im Monomer-Monomer-Kontaktbereich auf der Schleife zwischen der  $\alpha$ -Helix H5 und dem  $\beta$ -Faltblattstrang S10. Die zweite Zuckerbindungsstelle (N328) liegt auf der  $\alpha$ -Helix H11 und damit auf der anderen Molekülseite. Die vier Zuckerketten waren in der ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}}$ )-Elektronendichtekarte unterschiedlich gut definiert (Abb. 3.39a-d). Das größte Asn-Zuckeraddukt konnte für die Position N146 in Monomer A bestimmt werden (Abb. 3.39a). Der verzweigte Glykanrest enthält vier Zuckerreste (zweimal N-Acetyl- $\alpha$ -D-Glucosamin, GlcNAc;  $\alpha$ -L-Fucose, Fuc;  $\alpha$ -D-Mannose, Man), welche in der Form Man( $\beta$ 1-4)-GlcNAc( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]-GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn verknüpft vorliegen (Abb. 3.39e). Die gleiche Position (N146) der B-Kette ist in der ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}}$ )-Elektronendichtekarte lediglich als ein GlcNAc-Rest und Fucose definiert (Abb. 3.39b). Die Glykosylierungsstelle N328 ist in der ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}}$ )-Elektronendichtekarte für beide Monomere jeweils nur in Form der ersten zwei GlcNAc-Reste sichtbar (Abb. 3.39c,d).

Die Glykane stehen, neben der kovalenten Bindung zur Amidgruppe des entsprechenden Asn-Rests, über ihren ersten GlcNAc- sowie den Fucoserest in weiteren nicht-kovalenten Wechselwirkungen mit dem Protein (Abb. 3.40a-d). Die N146-gebundenen Glykane bilden aufgrund ihrer Lage im Bereich der Monomer-Monomer-Kontaktzone Interaktionen ( $\leq 4\text{Å}$ )



**Abb. 3.38** N-Glykosylierungsstellen im Dimer-Überblick. Kombinierte Proteinrückgratdarstellung mit beige hervorgehobenen, zuckerbindenden Sekundärstrukturelementen (beschriftet) sowie Asn-Zuckerketten als farbige Stabmodelle (grün = Monomer A, violett = B).

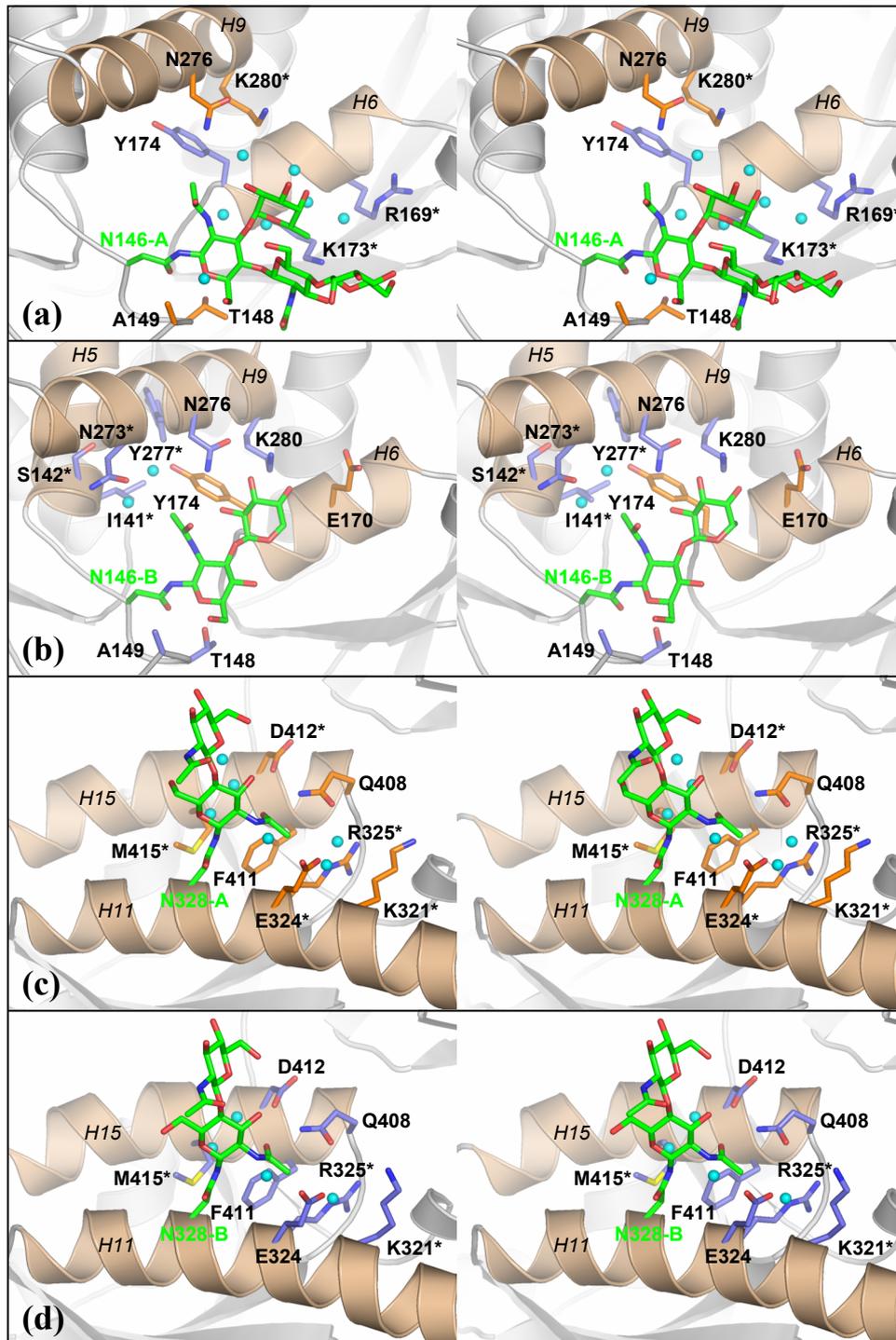
mit Aminosäureresten beider Monomere aus (Abb. 3.40a,b). Direkte Kontakte der N146-A-Zuckerkette, ohne die Nutzung von verbrückenden Wassermolekülen, zeigen sich zu T148, A149 (beide aus der Schleife zwischen  $\alpha$ -Helix H5 und  $\beta$ -Faltblattstrang S10) und N276 ( $\alpha$ -Helix H9) des eigenen Monomers sowie Y174 ( $\alpha$ -Helix H6) von Monomer B (Abb. 3.40a).



**Abb. 3.39** *N*-Glykosylierungsstellen im Detail. (a)-(d) Stereodarstellungen der vier Zuckerketten (C-Atome = grün) mit jeweiligen Asn-Resten (C-Atome = beige) als Stabmodelle mit finaler ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Elektronendichtekarte (blau, Konturierung:  $1 \sigma$ ). (e) Sesselform-Strichzeichnung der Zuckerkette an N146-A, GlcNAc = N-Acetyl- $\alpha$ -D-Glucosamin, Fuc =  $\alpha$ -L-Fucose, Man =  $\alpha$ -D-Mannose. Zuckerring-C-Atome rot beschriftet.

## Ergebnisse

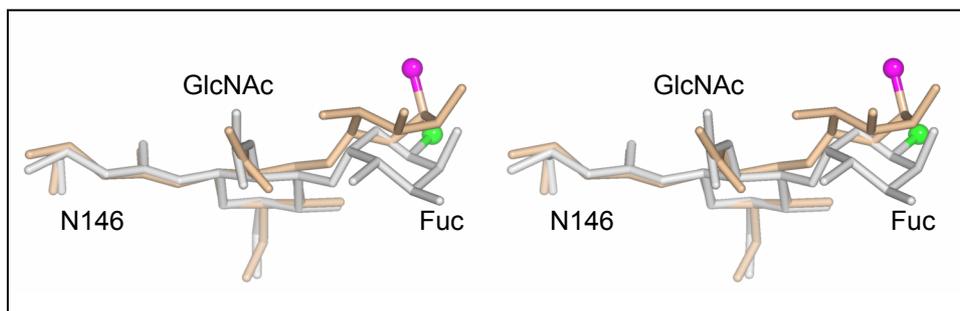
Durch die Einbeziehung von sieben verbrückenden Wassermolekülen interagiert das N146-A-Glykan indirekt auch mit K280 ( $\alpha$ -Helix H9) des eigenen Monomers sowie mit den



**Abb. 3.40** Interaktionen der Zuckerketten mit dem Protein. (a)-(d) Kombinierte Stereodarstellungen aus Stabmodellen der Asn-Glykan-Addukte [(a) N146-A, (b) N146-B, (c) N328-A, (d) N328-B, grüne C-Atome], im Abstand von  $\leq 4$  Å interagierenden Aminosäureresten (beschriftet, \* = nur Interaktionen ( $\leq 4$  Å) mit den Brückenwassermolekülen; orange C-Atome = Monomer A, blauviolette C-Atome = Monomer B) und Brückenwassermolekülen (hellblaue Kugeln) sowie dem Proteinrückgrat des Dimers.  $\alpha$ -Helices, die Interaktionsreste beisteuern, sind farblich beige abgesetzt und kursiv beschriftet.

## Ergebnisse

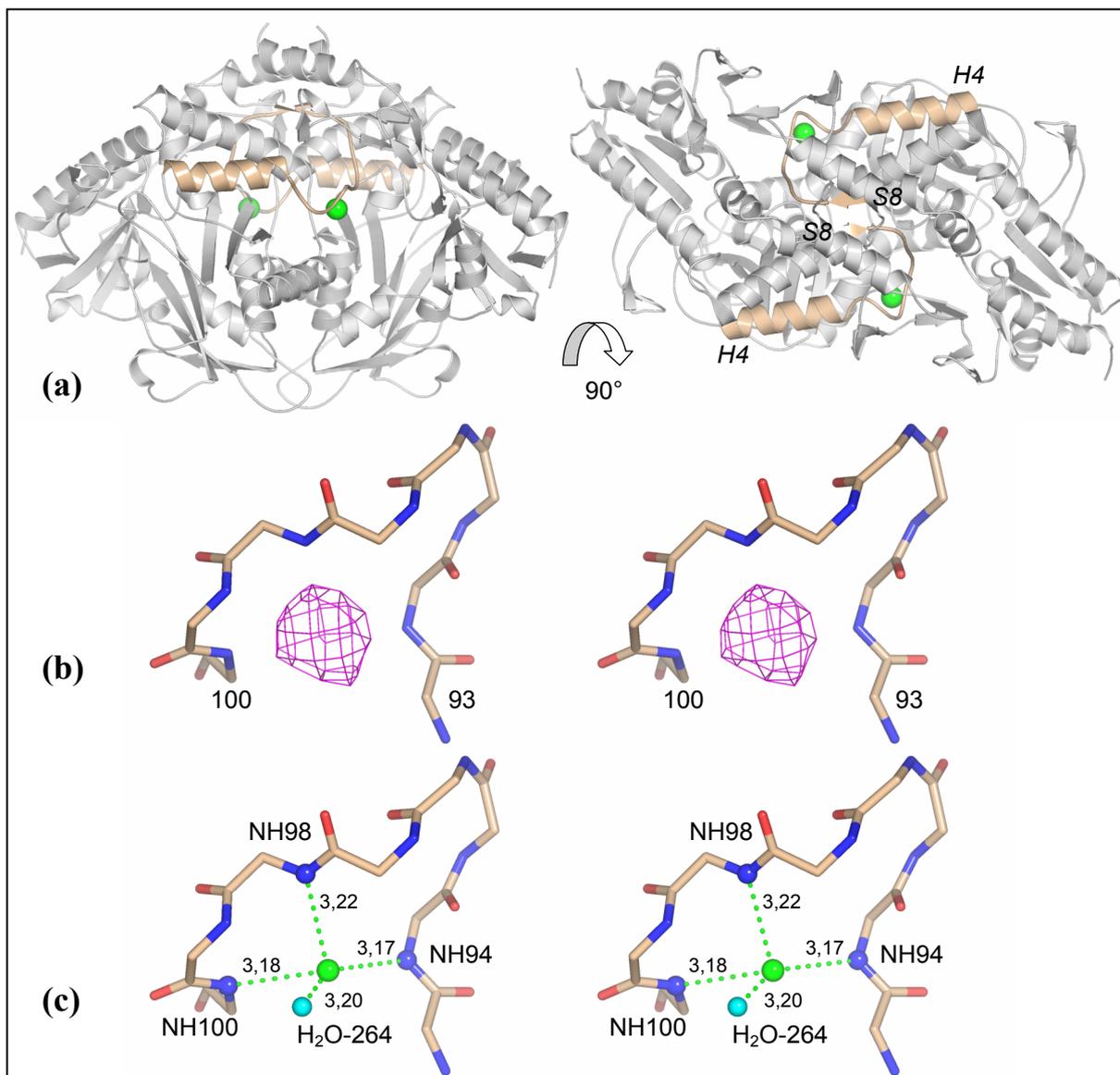
Aminosäurereste R169 und K173 (beide aus  $\alpha$ -Helix H6) des Nachbarmonomers (Abb. 3.40a). Der N146-gebundene Zuckerrest in Monomer B interagiert ausschließlich in direkter Weise ebenso mit den Aminosäureresten T128, A149, N276 und K280 des eigenen sowie E170 und Y174 des benachbarten Monomers (Abb. 3.40b). Über zwei Brückenwassermoleküle steht das N146-B-Glykan außerdem indirekt in Kontakt zu den Aminosäureresten I141, S142 (beide aus  $\alpha$ -Helix H5), N273 und Y277 (beide aus  $\alpha$ -Helix H9) des eigenen Monomers (Abb. 3.40a). Die höhere Anzahl an direkten Interaktionen und geringerer Anzahl von Wassermolekülen in der Dimerisierungszone für den Zuckerrest an N146-B geht einher mit einer Konformationsumlagerung des Fucoserests. Nimmt dieser im A-Monomer noch die Sesselform ein, so kippt er in Monomer B in die Wannenform um. Infolge der Umlagerung ändert sich die Position der C6-Methylgruppe der Fucose von äquatorial nach axial (Abb. 3.41). Zudem zeigt der Fucoserest einen kürzeren Abstand zum Nachbarmonomer (vergleiche Abb. 3.40a,b; 3.41). Die N328-gebundenen Zuckerketten wechselwirken nur mit Aminosäureresten des eigenen Monomers. Das Glykan in Monomer A interagiert direkt mit Q408 und F411 (beide aus  $\alpha$ -Helix H15), sowie über sechs Brückenwassermoleküle mit E324, K321, R325 (alle drei aus  $\alpha$ -Helix H11) und D412, M415 (beide aus  $\alpha$ -Helix H15) (Abb. 3.40c). Die N328-Zuckerkette des B-Monomers befindet sich in Kontakt mit den entsprechend gleichen Aminosäureresten des eigenen Monomers, jedoch existieren nur vier verbrückende Wassermoleküle und E324 sowie D412 stehen in direkter Wechselwirkung mit dem Glykan (Abb. 3.40d).



**Abb. 3.41** Konformationsunterschiede der Fucosereste in den N146-Glykanen. Stereodarstellung der überlagerten Stabmodelle der Glykane (grau = N146-A-, beige = N146-B-Glykan) anhand der Asn- und der ersten GlcNAc-Reste. Die Fucose-C6-Methylgruppen sind zusätzlich als Kugeln wiedergegeben (grün = N146-A-, violett = N146-B-Glykan).

## 3.6.5.4 Chlorid-Ionen

In der Schleifenregion zwischen dem  $\beta$ -Faltblattstrang S8 und der  $\alpha$ -Helix H4 wurde in beiden Monomeren ein nicht-kovalent gebundenes Chlorid-Ion lokalisiert (Abb. 3.42a). Diese Positionen wiesen neben den größten Maxima von 19-20  $\sigma$  in der  $(mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Differenzelektronendichtekarte nach der ersten Verfeinerungsrunde auch die höchsten Maxima von 10  $\sigma$  in der anomalen  $(F^+_{\text{obs}} - F^-_{\text{obs}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Differenzelektronendichtekarte (Abb. 3.42b) des bei 2 Å Wellenlänge gemessenen Datensatzes auf. In Anbetracht der Bindungsregion zwischen



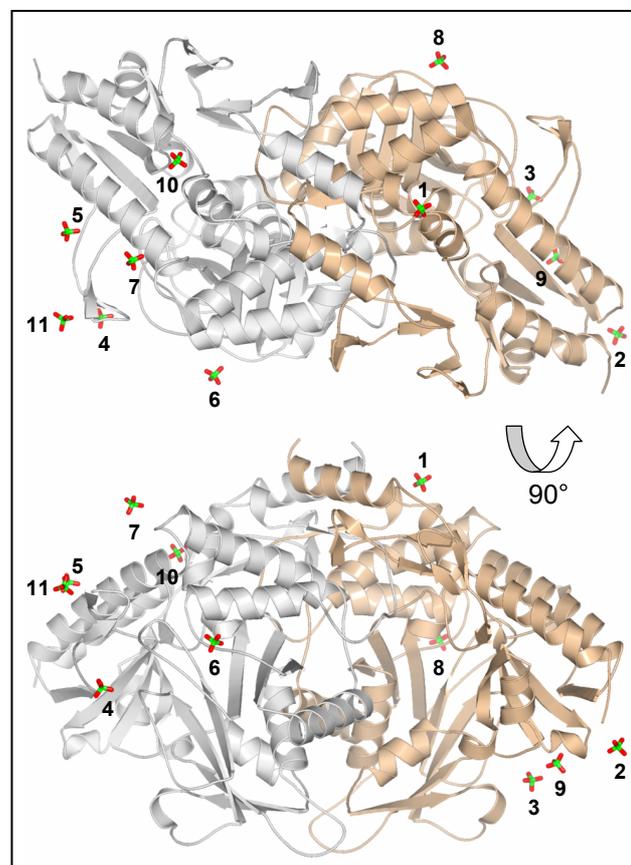
**Abb. 3.42** Chloridbindungsstellen der Alliinase. **(a)** Alliinasedimer als Proteinrückgrat mit beige hervorgehobenen Sekundärstrukturbereichen (beschriftet) und Chlorid-Ionen als grüne Kugeln. **(b)+(c)** Stereodarstellungen der Proteinhauptkette als Stabmodell für die Aminosäurereste 93-100 in Monomer A, sowie **(b)** der anomalen  $(F^+_{\text{obs}} - F^-_{\text{obs}}, \alpha_{\text{calc}} - 90^\circ)$ -Differenzelektronendichtekarte (Konturierung: 3  $\sigma$ ) oder **(c)** Chlorid-Ion (grün) mit Interaktionspartnern als Kugeln und Wechselwirkungen in Form von Punktlinien mit Längenangabe in der Einheit Å. Zur Berechnung von  $\alpha_{\text{calc}}$  wurden die Chlorid-Ionen aus dem Modell entfernt.

## Ergebnisse

Hauptkettenstickstoffen konnte von einem Anion ausgegangen werden. Da NaCl bei der Reinigung und zum Teil während der Kristallisation Verwendung fand, sowie im Einklang mit den Maxima in der anomalen Differenzelektronendichtekarte, wurden die besagten Positionen als Chlorid-Ionen interpretiert. Die Chlorid-Ionen bilden jeweils neben drei Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hauptkettenaminogruppen der Aminosäurereste 94 (3,17 bzw. 3,12 Å Länge für Monomer A bzw. B), 98 (3,22 bzw. 3,19 Å) und 100 (3,18 bzw. 3,16 Å) auch eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Lösungsmittelmolekül (3,20 bzw. 3,13 Å) aus (Abb. 3.42c). Die Liganden zeigen eine verzerrt trigonal pyramidale Anordnung, wobei das Chlorid-Ion nicht im Zentrum sondern näher an der Basis der gedachten Pyramide liegt (Abb. 3.42c).

### 3.6.5.5 Sulfat-Ionen

Auf der Alliinase wurden elf Bindungsstellen für Sulfat-Ionen lokalisiert, die mit einer Ausnahme (Sulfat 6 und 8) unsymmetrisch über das Dimer verteilt vorliegen (Abb. 3.43). Das B-Monomer weist fünf, das A-Monomer sechs Bindungspositionen auf. Die Sulfat-Ionen 4, 5, 6, 7, 10 und 11 im Monomer A liegen alle auf der vom aktiven Zentrum abgewandten Monomerseite vor. Fünf dieser Sulfate (4, 5, 7, 10 und 11) konzentrieren sich im Bereich der beiden großen  $\alpha$ -Helices H11 und H15 sowie der  $\beta$ -Haarnadelschleife (S17+S18) der C-terminalen Domäne. Im Monomer B reihen sich drei Sulfat-Ionen (2, 9 und 3) in der Kontaktzone von zentraler und C-terminaler Domäne auf. Das Sulfat 6 des Monomers A, welches der Position 8 des anderen Monomers entspricht, sowie das isolierte Sulfat 1 liegen abseits der beiden erwähnten Gruppen. Zur Identifizierung der Sulfat-Ionen diente neben der meist deutlich tetraedrisch ausgeprägten ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Elektronendichte vor allem das Vorliegen eines

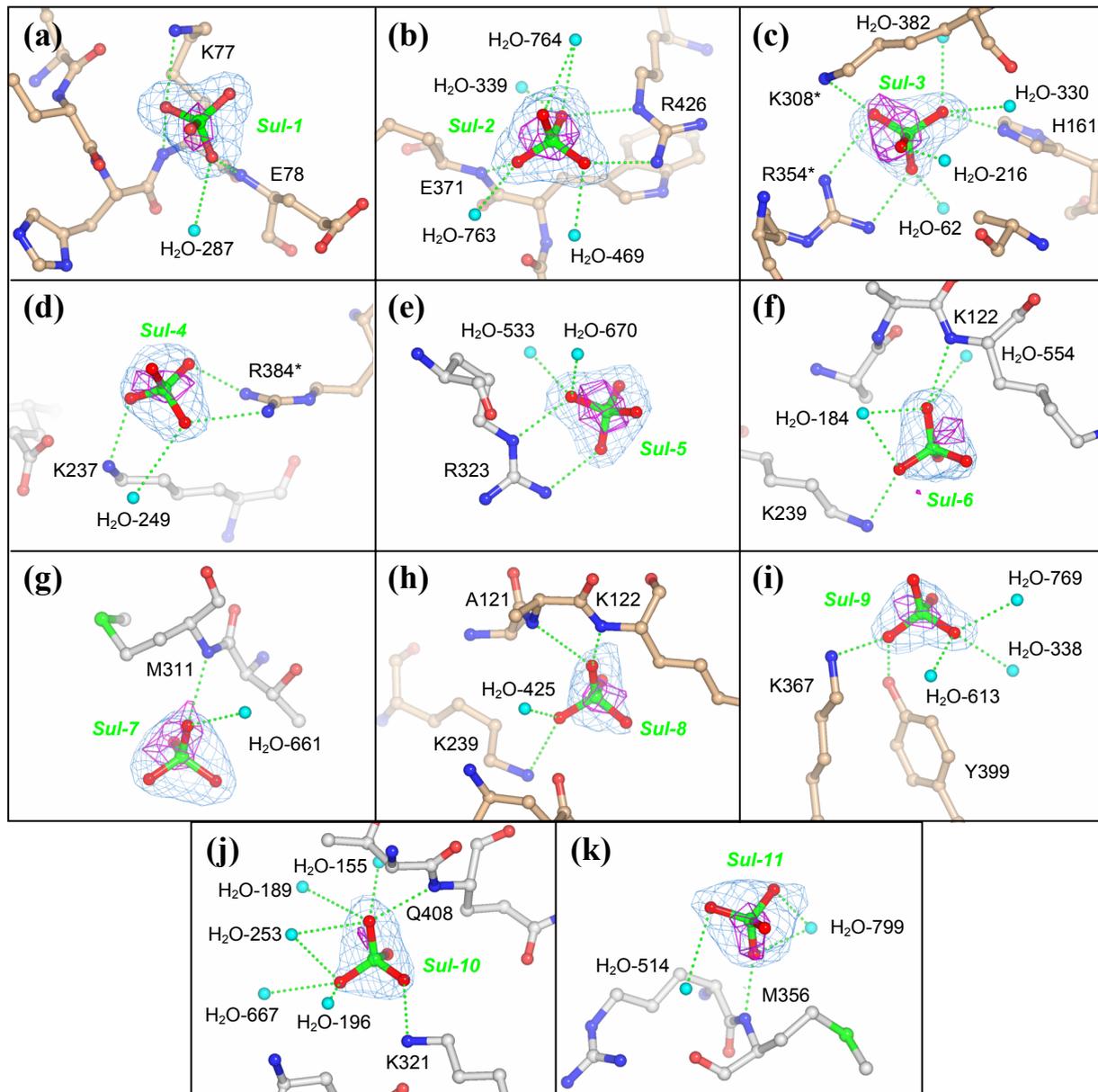


**Abb. 3.43** Sulfatbindungsstellen der Alliinase in der Übersicht. Das Alliinasedimer ist in Proteinrückgratdarstellung (Monomer B = beige) und die Sulfat-Ionen (numeriert) sind als Stabmodelle wiedergegeben.

Sulfat-Ionen diente neben der meist deutlich tetraedrisch ausgeprägten ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Elektronendichte vor allem das Vorliegen eines

## Ergebnisse

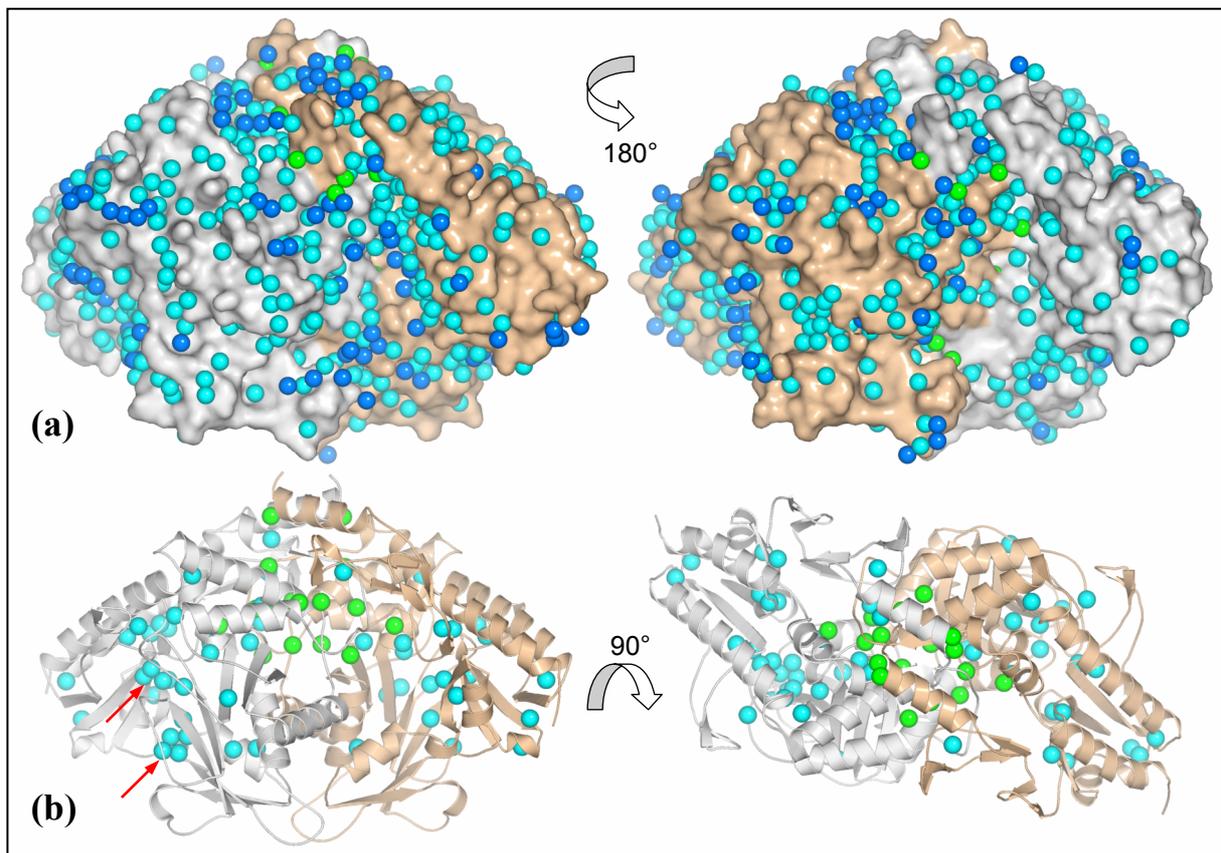
Maximums ( $> 3 \sigma$ ) in der anomalen ( $F_{\text{obs}}^+ - F_{\text{obs}}^-$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Differenzelektronendichtekarte als Indiz für das Sulfat-Schwefelatom (Abb. 3.44a-k). Die Sulfate 6, 8, 9 und 10 konnten nur mit 50%iger Besetzung verfeinert werden. In der Detailansicht (Abb. 3.44a-k) zeigen sich für fast alle Sulfatmoleküle, mit Ausnahme von 7 und 11, positiv geladene Aminosäureseitenketten wie Arg, Lys oder His als Bindungspartner. Daneben werden ebenso häufig Proteinhauptkettenstickstoffe sowie Wassermoleküle beobachtet, welche mit den Sulfatsauerstoffen interagieren. Sulfat 1 wechselwirkt mit dem Seitenketten- $N_{\zeta}$ -Atom und dem Hauptkettenstickstoff von K77-B (B = B-Monomer) sowie dem Wassermolekül 287 (Abb. 3.44a). Sulfat 2 bildet eine doppelte Wasserstoffbrückenbindung zu R426-B, sowie jeweils einfache zum Hauptkettenstickstoff von E371-B und vier Wassermolekülen (339, 469, 763, 764) aus (Abb. 3.44b). Sulfat 3 weist neben den Kontakten zu H161-B und vier Wassermolekülen (62, 216, 330, 382) auch Wasserstoffbrückenbindungen mit den Seitenketten der Aminosäuren K308-B und R354-B eines kristallographisch symmetrieverwandten Dimers auf (Abb. 3.44c). Auch das Sulfat 4 liegt auf einem Kristallkontakt und interagiert gleichzeitig mit K237-A (A = A-Monomer) und dem Wassermolekül 249 des eigenen Dimers sowie R384-B eines kristallographischen Nachbardimers (Abb. 3.44d). Sulfat 5 wird neben den zwei Wassermolekülen 533 und 670 nur durch eine doppelte Wasserstoffbrückenbindung zu R323-A fixiert (Abb. 3.44e). Sulfat 6 steht in Interaktionen mit dem  $N_{\zeta}$ -Atom von L239-A und dem Hauptkettenstickstoff von K122-A sowie den zwei Wassermolekülen 184 und 554 (Abb. 3.44f). Sulfat 7 hat keinen positiven Aminosäureseitenkettenrest als Bindungspartner, sondern wird nur über den Hauptkettenstickstoff von M311-A und einem Wassermolekül (661) gebunden (Abb. 3.44g). Das zu Sulfat 6 im Dimer symmetrische Sulfat 8 (Abb. 3.44h) interagiert auch mit einem Lys-Rest (K239-A), im Gegensatz zu Sulfat 6 aber mit zwei Hauptkettenstickstoffen (A121-A und K122-A) sowie nur einem Wassermolekül (425). Sulfat 9 weist neben den Kontakten zu K367-B und drei Wassermolekülen (338, 613, 769) auch eine Wasserstoffbrückenbindung zur phenolischen OH-Gruppe von Y399-B auf (Abb. 3.44i). Ausgiebige Interaktionen mit fünf Wassermolekülen (155, 189, 196, 253, 667) sind für Sulfat 10 zu beobachten, das zudem auch Kontakte mit dem Hauptkettenstickstoff von Q408-A und der Seitenkette von K321 ausbildet (Abb. 3.44j). Dem Sulfat 11 fehlt es, wie schon Sulfat 7, an einer positiv geladenen Aminosäureseitenkette zur Kompensation der negativen Ladung. Ferner ist es nur über den Hauptkettenstickstoff von M356-A und zwei Wassermolekülen (514, 799) gebunden (Abb. 3.44k).



**Abb. 3.44** Sulfatbindungsstellen der Alliinase im Detail. (a)-(k) Sulfate 1-11. Die Sulfate und dazu im Abstand von  $\leq 4$  Å liegende Aminosäuren sind als Kugelstabmodelle (Monomer A = graue C-Atome, Monomer B = beigefarbene C-Atome, \* = symmetrieverwandtes Dimer), sowie mit den Sulfaten interagierende Wassermoleküle als hellblaue Kugeln dargestellt. Wechselwirkungen in Form von klassischen Wasserstoffbrücken sind als grüne Punktlinien verdeutlicht. Zusätzlich sind die  $(2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Elektronendichte- (blau, Konturierung:  $1 \sigma$ ) und die anomale  $(F_{\text{obs}}^+ - F_{\text{obs}}^-, \alpha_{\text{calc}} - 90^\circ)$ -Differenzelektronendichtekarte (violett, Konturierung:  $3 \sigma$ ) wiedergegeben. Zur Berechnung von  $\alpha_{\text{calc}}$  wurden im Falle der anomalen Elektronendichtekarte die Sulfate aus dem Modell entfernt. In (f) ist nur eine der beiden alternativen Hauptkettenkonformationen für die Peptidbindung 122-123 gezeigt.

### 3.6.5.6 Wassermoleküle

Insgesamt konnten am Alliinasedimer 830 gebundene Wassermoleküle durch parallele Interpretation von  $(mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Differenzelektronendichte- sowie  $(2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Elektronendichtekarten lokalisiert werden. Von diesen entfielen nach manueller Inspektion im Programm *PyMOL* (DELANO, 2002) 762 auf Wassermoleküle, welche im Kontakt mit der umgebenden Lösungsmittelphase stehen (Abb. 3.45a). 277 bzw. 301 dieser Wassermoleküle interagieren entweder mit Monomer A oder B und 36 mit beiden Monomeren. 148 der Oberflächenwasser liegen im Abstand von mehr als 3,5 Å vom Protein entfernt vor und bilden die zweite Hydratationssphäre oder gehören mit zu den Wassermolekülen, welche hydrophobe Aminosäureseitenketten abdecken. Die verbliebenen 68 Wassermoleküle liegen unter der Proteinoberfläche verborgen (Abb. 3.45b), wobei 29 oder 22 bzw. 17 nur mit Monomer A oder B bzw. beiden Monomeren Kontakte ausbilden. Die mittleren Temperaturfaktoren der an der

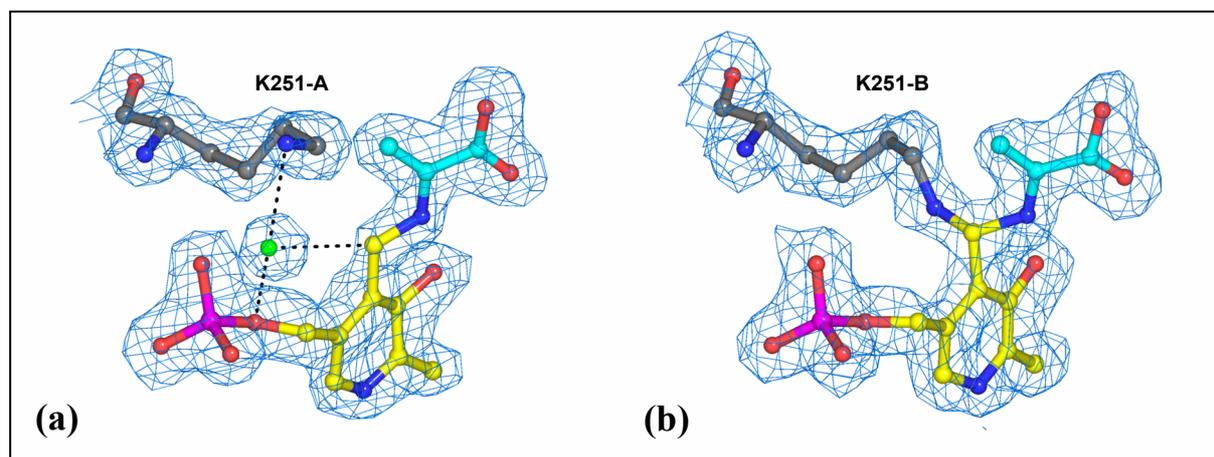


**Abb. 3.45** Wasserbindungsstellen der Alliinase. **(a)** Oberflächenwassermoleküle. **(b)** Unter der Proteinoberfläche verborgene Wassermoleküle. Die Wassermoleküle sind farbkodiert: hellblau = Interaktion nur mit einem Monomer (Distanz  $\leq 3,5$  Å), grün = Interaktion mit beiden Monomeren (Distanz  $\leq 3,5$  Å), dunkelblau = Moleküle (Distanz  $> 3,5$  Å), welche über andere Wassermoleküle mit dem Protein wechselwirken. Die Alliinase ist in **(a)** mit der molekularen Oberfläche (außer PLP keine weiteren Heteroatome inbegriffen) sowie in **(b)** als Proteinerückgrat dargestellt (Monomer B = beige). In **(b)** deuten rote Pfeile auf größere Aggregate von verborgenen Wassermolekülen im Monomer A.

Oberfläche und der im Proteininneren gelegenen Wassermoleküle zeigen mit  $35,9 \text{ \AA}^2$  und  $23,8 \text{ \AA}^2$  deutliche Unterschiede. Bei der Anordnung der Wassermoleküle auf der Oberfläche ist keine statistische Verteilung festzustellen. Vielmehr konzentrieren sich die Moleküle in Furchen sowie Höhlungen und bilden so teilweise perlenschnurartig oder traubenförmig aussehende Aggregate aus (Abb. 3.45a). Im Vergleich der beiden Dimerseiten ist zu beobachten, daß die dem aktiven Zentrum des B-Monomers zugewandte Molekülseite signifikant mehr Wassermoleküle gebunden hat (Abb. 3.45a). In Monomer A existieren unter den Wassermolekülen im Proteininneren oft größere Aggregate als im B-Monomer, vor allem in der Übergangszone von zentraler zu C-terminaler Domäne (siehe Pfeile in Abb. 3.45b).

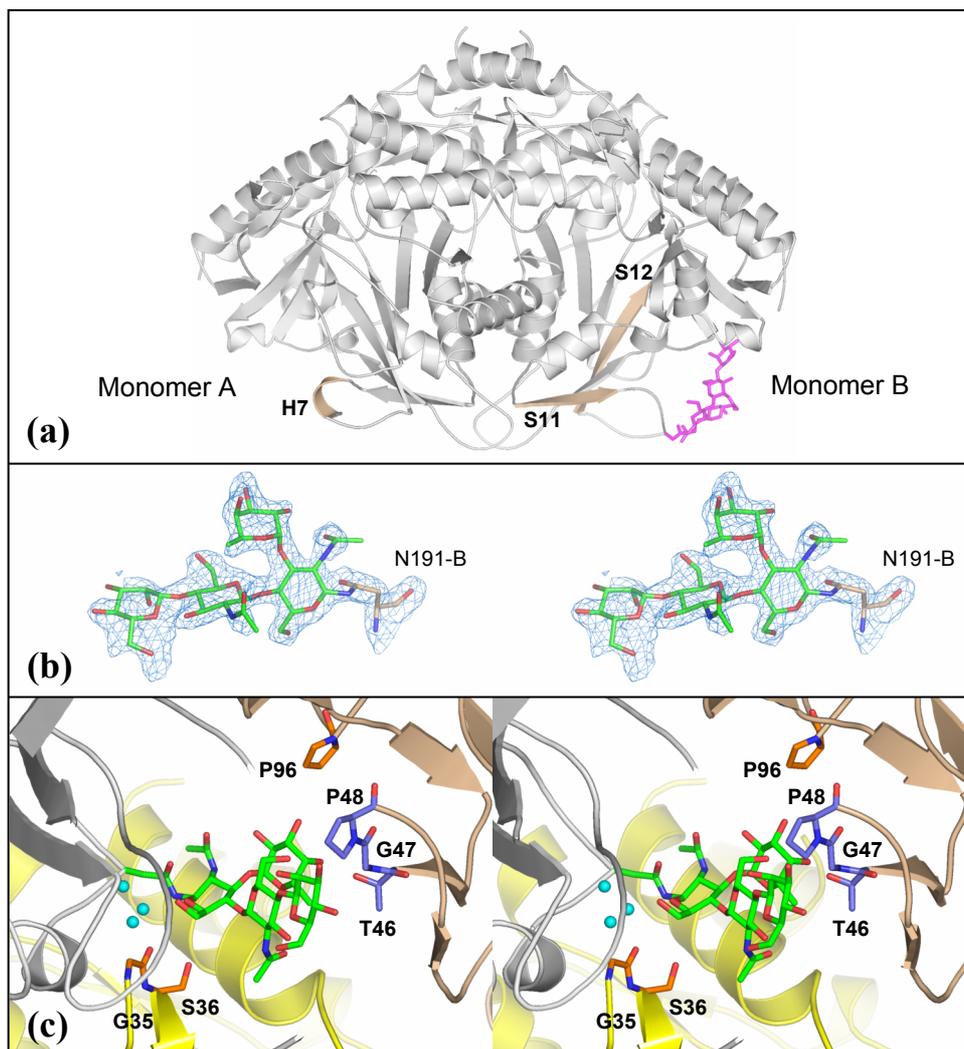
### 3.6.5.7 Besonderheiten der Alliinasestruktur in Kristallform III

In den aktiven Zentren beider Monomere wurde jeweils ein vollbesetztes AA-Molekül gefunden (Abb. 3.46a,b). Im Falle des A-Monomers konnte es als externes Aldimin (Abb. 3.46a) und in Monomer B als geminales Diamin (Abb. 3.46b) in der  $(2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Elektronendichtekarte interpretiert werden. In Monomer A wurde zusätzlich ein Wassermolekül zwischen PLP und K251 gefunden, das drei Interaktionen mit diesen eingeht (K251-N $\zeta$ :  $2,83 \text{ \AA}$ , PLP-C4A:  $2,92 \text{ \AA}$ , PLP-O4P:  $2,62 \text{ \AA}$ ; Abb. 3.46a) und dessen B-Faktor ( $26,4 \text{ \AA}^2$ ) leicht über dem von K251-N $\zeta$  ( $25,0 \text{ \AA}^2$ ) liegt. Es gab anhand der Elektronendichte keine Hinweise auf die Bindung von HEPES im aktiven Zentrum, wie für Kristallform IV beschrieben.



**Abb. 3.46**  $\alpha$ -Aminoacrylatbindung in den aktiven Zentren der Alliinasestruktur von Kristallform III. Kugelstabmodell­darstellung von K251 (graue C-Atome), PLP (gelbe C-Atome) und AA (hellblaue C-Atome) sowie eines Wassermoleküls (H<sub>2</sub>O-395; grüne Kugel; mögliche Interaktionen als schwarze Punktlinien) und der zugehörigen  $(2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}})$ -Elektronendichtekarte (Konturierung:  $1 \sigma$ ) für Monomer A (a) und Monomer B (b).

Eine zweite Spezialität der Alliinasestruktur von Kristallform III liegt mit einer dritten, in der Kristallform IV bisher nicht beobachteten Glykosylierungsstelle an Asn 191 der B-Kette vor. Diese befindet sich auf der Außenseite des siebensträngigen  $\beta$ -Faltblatts der zentralen Domäne in der Schleife zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen S11 und S12 (Abb. 3.47a), welche ferner nicht mehr zur Ausbildung der kurzen  $3_{10}$ -Helix H7 befähigt ist (vergleiche A-Monomer in Abb. 3.47a). Das Glykan umfaßt vier Zuckereinheiten (zweimal GlcNAc, Fuc, Man), welche in der schon von den Glykosylierungsstellen an N146 und N328 bekannten Verknüpfungsweise Man( $\beta$ 1-4)-GlcNAc( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn



**Abb. 3.47** Dritte Glykosylierungsstelle (N191-B) der Alliinasestruktur von Kristallform III. (a) Lage des N191-B-Glykans (violette Stabmodell) im Dimer (Proteinrückgratdarstellung) mit beschrifteten und beige hervorgehobenen Sekundärstrukturelementen. (b) Stereodarstellung des N191-B-Glykans als Stabmodell (Asn, C-Atome beige) und zugehöriger ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Elektronendichtekarte (Konturierung:  $1 \sigma$ ). (c) Stereodarstellung des N191-B-Glykans mit möglichen Interaktionspartnern ( $\leq 4 \text{ \AA}$ ) als Stabmodelle aus kristallographisch symmetrieverwandten Dimeren (glykaneigenes Dimer, grau; erstes Symmetriedimer, gelb; zweites Symmetriedimer, beige; A-Monomerreste, C-Atome orange; B-Monomerreste, C-Atome blauviolett) sowie Wassermolekülen (hellblaue Kugeln).

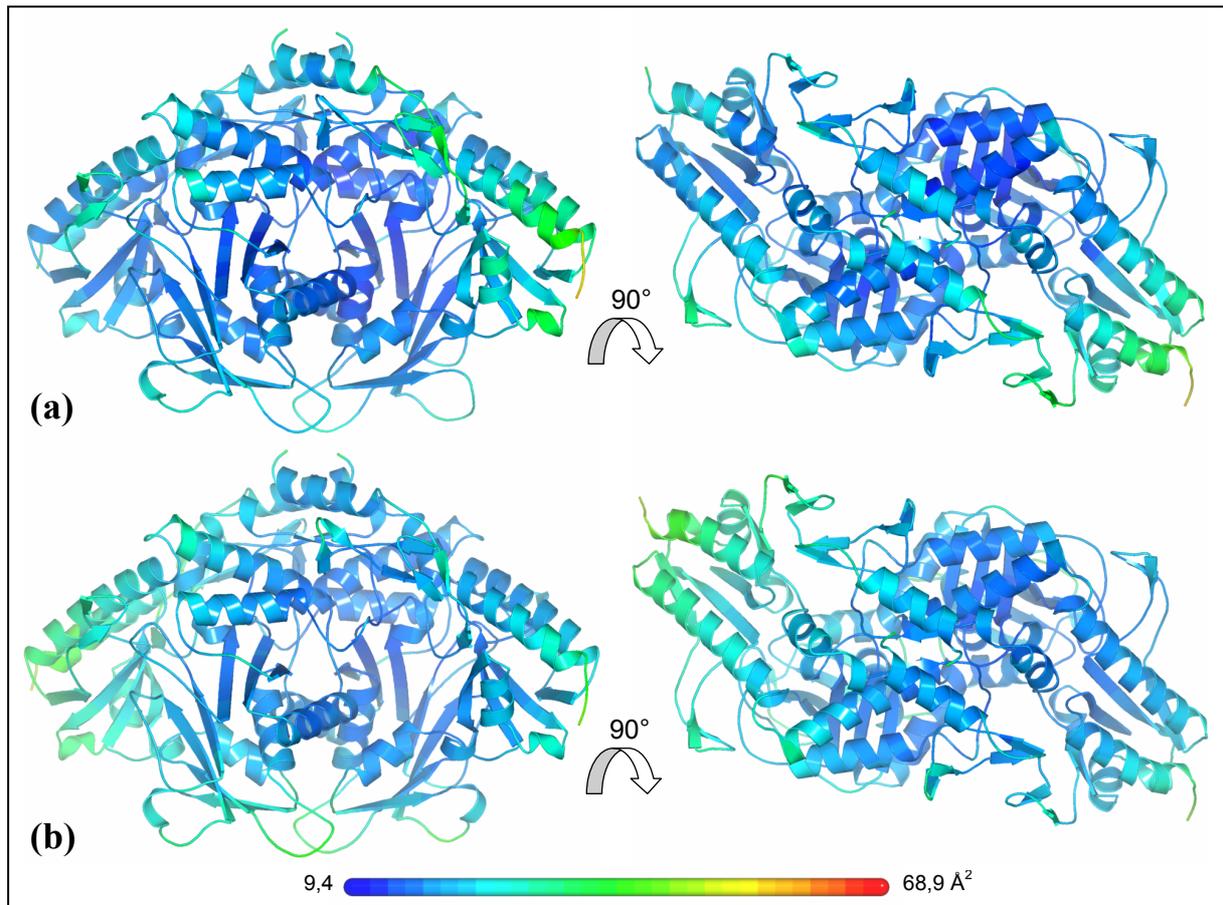
## Ergebnisse

vorliegen (Abb. 3.47b). Die Zuckerkette steht nur über drei Wassermoleküle im Kontakt mit dem Protein. Allerdings bildet der Zuckerrest Kristallkontakte ( $\leq 4 \text{ \AA}$ ) zu zwei kristallographisch symmetrieverwandten Dimeren aus (Abb. 3.47c). Beide Dimere interagieren mit Aminosäureresten einer ihrer EGF-ähnlichen Domänen (G35 und S36 des A-Monomers im ersten Dimer bzw. T46, G47 und P48 des B-Monomers im zweiten Dimer) sowie im Falle des zweiten Dimers mit dem *cis*Pro-Rest 96 des A-Monomers. Der durchschnittliche Temperaturfaktor der Atome im Glykan liegt mit  $54 \text{ \AA}^2$  höher als die der Atome in den übrigen vier Glykosylierungsstellen.

Bei der dritten Besonderheit in Bezug auf gebundene Heteroatome handelt es sich um ein als Phosphat-Ion interpretiertes Molekül. Die Bindungsstelle ist identisch mit der ersten Sulfatbindungsposition (vergleiche Kapitel 3.6.5.5 sowie Abb. 3.44a). Da dem Kristallisationsansatz der Kristallform III kein Sulfat zugesetzt wurde, die Alliinase jedoch während der Reinigung mit 0,1 M Phosphatpuffer Kontakt hatte, wurde die tetraedrische Elektronendichte der betreffenden Position (nicht gezeigt) als Phosphat interpretiert.

### **3.6.6 Temperaturfaktorverteilung im Dimer - Kristallformen III, IV**

Die Temperaturfaktoren der Hauptkettenatome sind für beide Kristallformen ( $P2_1$  und  $P2_12_12_1$ ) ungleichmäßig über das jeweilige Dimer verteilt (Abb. 3.48a,b). Gemeinsam zeigen die zentralen Domänen die niedrigsten B-Faktoren, die C-terminalen Domänen sowie Teile der EGF-ähnlichen Domänen hingegen weisen die höheren Temperaturfaktoren im Dimer auf. Bei den C-terminalen Domänen ist zudem zwischen den Monomeren ein Unterschied festzustellen, welcher sich bei den Kristallformen III und IV umgekehrt ausprägt. Es findet sich für den monoklinen Fall im B-Monomer (Abb. 3.48a) und für die orthorhombische Kristallform im A-Monomer (Abb. 3.48b) die beweglichere C-terminale sowie EGF-ähnliche Domäne wieder. In der Kristallform IV treffen die höheren B-Faktoren auch für die übrigen Domänen des A-Monomers zu, wie bereits mit den durchschnittlichen Temperaturfaktoren in Kapitel 3.5.1.7 (Tab. 3.8) der Monomere zum Ausdruck kam. Diesem Trend zu niedrigen Temperaturfaktoren in Monomer B kommt mit der zentralen Domäne auch die Kristallform III nach (Abb. 3.48b), wie sich bereits in den B-Faktoren der PLP-Moleküle - trotz ähnlicher Werte für die Hauptkettenatome der Monomere - in Kapitel 3.5.2.3 (Tab. 3.11) andeutete. In beiden Kristallformen stellt die  $\beta$ -Haarnadelschleife der C-terminalen Domäne aus Monomer B (siehe Abb. 3.48a,b rechts der Rotationspfeile) das beweglichere Pendant zu seinem Vertreter im A-Monomer dar.



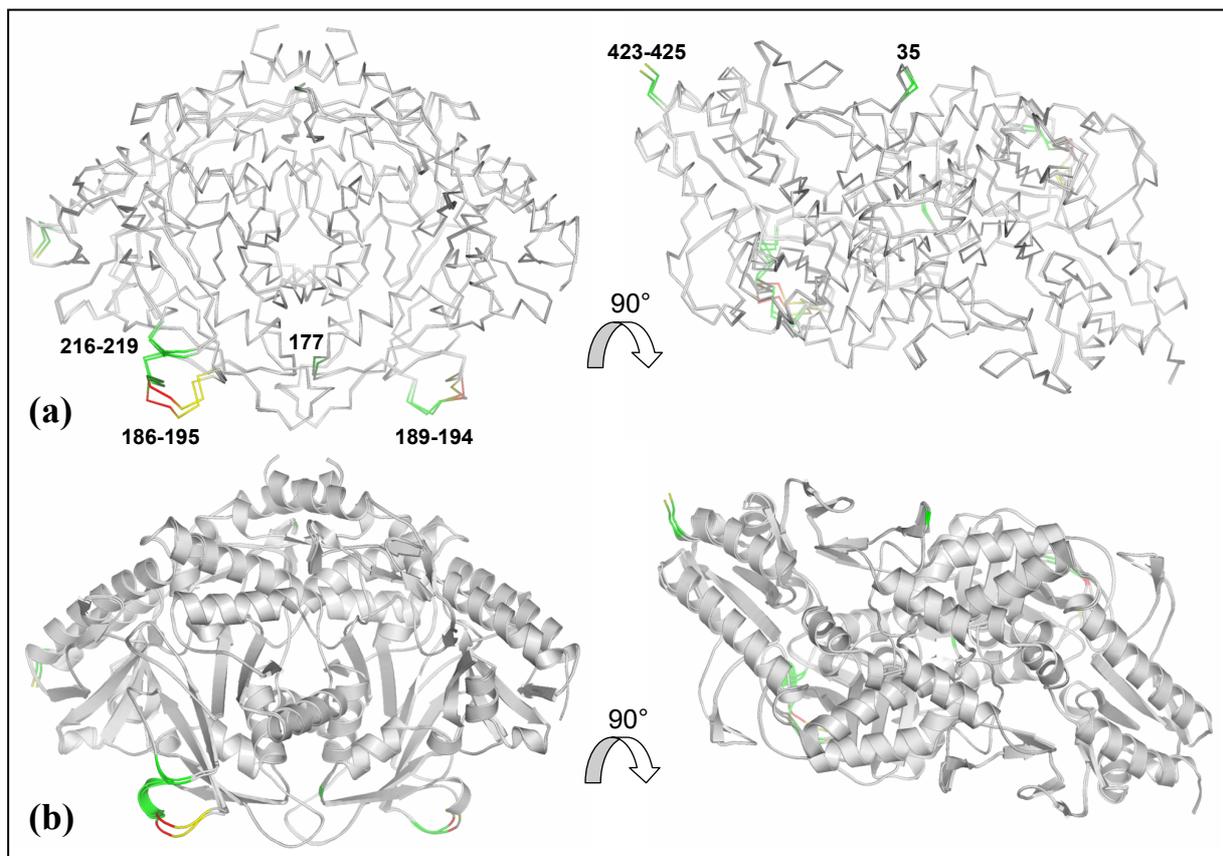
**Abb. 3.48** Temperaturfaktorverteilung im Dimer der Kristallformen III, IV. Proteinrückgratdarstellungen der Alliinasestrukturen (links A-Monomer, rechts B-Monomer) der Kristallformen III (a) und IV (b). Die Farbgebung erfolgte nach den B-Faktoren der Hauptkettenatome, wobei die Werte von dunkelblau über grün nach rot linear ansteigen (siehe Balken).

### 3.6.7 $C_{\alpha}$ -Strukturabweichungen zwischen Kristallformen III und IV

Die mittlere Standardabweichung der  $C_{\alpha}$ -Atome in den Alliinasedimeren beträgt 0,45 Å (848 verglichene  $C_{\alpha}$ -Positionen). Betrachtet man die Monomere getrennt, so fällt die mittlere Standardabweichung für die B-Monomere niedriger (0,36 Å) und für die A-Monomere höher (0,47 Å) aus [Ein Kreuzvergleich der Monomere (A mit B bzw. B mit A) würde als beste Übereinstimmung 0,42 Å Standardabweichung ergeben]. Es spiegelt sich so die Situation wider, daß in Monomer A vier und in Monomer B nur zwei Regionen in der Proteinhauptkette mehr als zwei Standardabweichungen zwischen den beiden Kristallformen differieren (Abb. 3.49a,b). Beide Monomere zeigen für den Schleifenbereich mit der kurzen  $3_{10}$ -Helix H7, welcher die  $\beta$ -Faltblattstränge S11 und S12 der zentralen Domäne verbindet (Aminosäuren 186-195 für Monomer A bzw. 189-194 für Monomer B), die größten Abweichungen zwischen den Kristallformen (Abb. 3.49a). In Form III ist die Lage der Hauptkette im B-Monomer so verändert, daß die  $3_{10}$ -Helix nicht mehr ausgebildet werden kann (Abb. 3.49b). Die

## Ergebnisse

drei weiteren, nur im A-Monomer gefundenen Zonen von  $C_{\alpha}$ -Positionsabweichungen sind die Umkehrschleife des zentralen  $\beta$ -Faltblatts der EGF-ähnlichen Domäne (Aminosäure 35, Abb. 3.49a), das Ende der Schleife zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen S12 und S13 der zentralen Domäne (Aminosäuren 216-219, Abb. 3.49a) sowie der C-Terminus (Aminosäuren 423-425, Abb. 3.49). Die Aminosäure 177, gelegen in der Verbindungsschleife von  $\alpha$ -Helix H6 und  $\beta$ -Faltblatt S11 der zentralen Domäne, bildet im B-Monomer die zweite Region, welche sich in der  $C_{\alpha}$ -Position mehr als zwei Standardabweichungen zwischen beiden Kristallform unterscheidet (Abb. 3.49a).



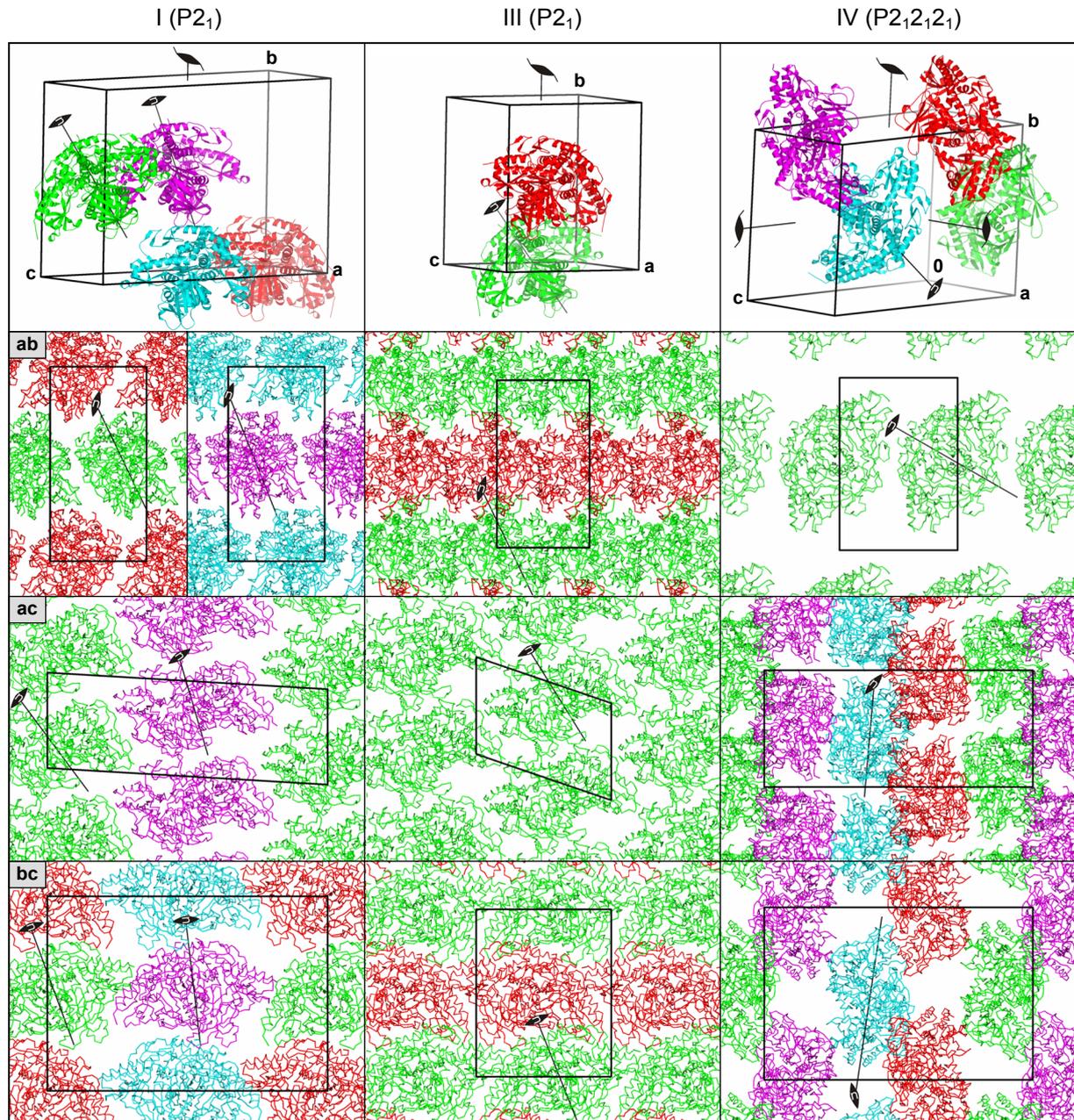
**Abb. 3.49**  $C_{\alpha}$ -Strukturabweichungen zwischen den Alliinasestrukturen der Kristallformen III und IV. Überlagerte  $C_{\alpha}$ -Verläufe (a) sowie Proteinrückgrate (b) [links A-Monomer, rechts B-Monomer] wurden je nach Standardabweichung der  $C_{\alpha}$ -Atome eingefärbt (grau  $< 2 \sigma$ , grün  $> 2 \sigma$ , gelb  $> 3 \sigma$ , rot  $> 5 \sigma$ ).  $C_{\alpha}$ -Atome  $> 2 \sigma$  Standardabweichung sind nummeriert. Zur Überlagerung gelangten die  $C_{\alpha}$ -Positionen 2-425 beider Monomere der Dimere.

### 3.6.8 Kristallpackung - Kristallformen I, III, IV

#### 3.6.8.1 Kristallform I

Die monokline Einheitszelle enthält vier Alliinasedimere, deren Anordnung zur Ausbildung der kristallographischen 2<sub>1</sub>-Schraubenachse entlang der b-Achse führt (Abb. 3.50, erste

Reihe, links). Die asymmetrische Einheit ( $1a \cdot 0,5b \cdot 1c$ ) ist mit zwei Dimeren (siehe z.B. grünes und violettes Dimer in Abb. 3.50, linke Spalte) besetzt. Diese zwei vergleichsweise ähnlich positionierten Dimere weisen indes leichte Unterschiede in den Orientierungen ihrer



**Abb. 3.50** Molekülpackung in den drei Kristallformen I, III, IV. Die Kristallformen I (linke Spalte), III (mittlere Spalte) und IV (rechte Spalte) sind in Form der Einheitszelle (erste Reihe, Dimere als Proteinrückgrate) bzw. als Molekülschichten (ab-Schicht, zweite Reihe; ac-Schicht, dritte Reihe; bc-Schicht, vierte Reihe; Dimere als  $C_{\alpha}$ -Verläufe) dargestellt. Ferner sind kristallographische und für die Moleküle einer asymmetrischen Einheit die nicht-kristallographischen (n) Symmetrieachsen eingezeichnet. Die wiedergegebene Molekülschichtdicke entspricht der Länge der asymmetrischen Einheit. Für Kristallform I wurde die Darstellung der ab-Schicht für  $c = 0-0,5$  (links) und  $c = 0,5-1$  (rechts) aufgeteilt. Die Farbgebung der Dimere wurde so gewählt, daß unterschiedlich farbige Dimere die Einheitszelle aufbauen.

## Ergebnisse

nicht-kristallographischen Symmetrie (NCS)-Achsen in Bezug auf die Koordinatenachsen der Einheitszelle auf. So zeigt in der Ansicht der ab-Kristallschicht (Abb. 3.50, zweite Reihe, links) das erste Dimer (grün) mit 25° Neigung zur b-Achse eine stärkere Kippung als das zweite Dimer (violett) mit nur 21°. Im Falle der bc-Kristallschicht (Abb. 3.50, vierte Reihe, links) beträgt die Schräge der NCS-Achsen entlang der b-Achse für das erste Dimer (grün) 20°, jedoch für das zweite Dimer (violett) nur 7°. Aus Sicht der ac-Kristallschicht betrachtet (Abb. 3.50, dritte Reihe, links), sind die NCS-Achsen der Dimere jeweils 37° (grünes Dimer) und 15° (violetteres Dimer) zur a-Achse geneigt.

Ein Dimer (unabhängig welches der beiden Dimere der asymmetrischen Einheit) ist im Kristallverband von zehn weiteren Dimeren umgeben (8 Å maximaler Suchabstand, nicht gezeigt). Eine fundierte Aussage zu Aminosäureresten, die am Aufbau der Kristallkontakte beteiligt sind, und eine Bestätigung der zuvor genannten zehn Dimerkontaktpartner (anhand von Interaktionen < 4 Å Abstand) sind angesichts der niedrigen Auflösung von nur 4 Å nicht möglich.

### **3.6.8.2 Kristallform III**

In der monoklinen Einheitszelle befinden sich zwei Dimere, die so zueinander angeordnet sind, daß sich entlang der b-Achse eine kristallographische 2<sub>1</sub>-Schraubenachse ausbildet (siehe grünes und rotes Dimer in Abb. 3.50, erste Reihe, Mitte). Folgerichtig liegt in der asymmetrischen Einheit (1a · 0,5b · 1c) ein Dimer vor. Die NCS-Achse des Dimers ist, jeweils für die ab-, ac- bzw. bc-Kristallschichten gesehen, 26° zur b-Achse, 32° zur a-Achse bzw. 21° zur b-Achse geneigt (Abb. 3.50, mittlere Spalte, zweite bis vierte Reihe).

Ein Alliinasedimer ist im Kristallgitter von zwölf weiteren Dimermolekülen umrahmt (nicht gezeigt). Die Aminosäuren N19, E34, G35, Q55, Q75, D123, D152, K157, N191, Q197, Y198, E268, K305, D334 und E343 aus Monomer A sowie E34, G47, Q55, E78, H161, H187, N194, H214, D267, E268, Q346, Y349, M356, N382, R384, D420 und K423 aus Monomer B beteiligen sich an Kristallkontakten ( $\leq 3,5$  Å) in Form von klassischen Wasserstoff- und Salzbrückenbindungen (siehe Anhang 7.5.1, Tab. 7.7). Auch die Zuckerkette an Position N191 des B-Monomers ist in Kristallkontakte  $\leq 3,5$  Å involviert (siehe Anhang 7.5.1, Tab. 7.7), wobei ein ungünstiger Interaktionswinkel zum Hauptkettenstickstoff von G47 des Monomers B sowie die hohen B-Faktoren des Glykans mit über 54 Å<sup>2</sup> zu beachten sind. Weitere, schwächere Kristallkontakte im Abstandsbereich 3,5-4 Å bildet die N191-B-Zuckerkette ebenso aus, wie auch die Aminosäurereste G56, P154, S193, T306, S336 und E371 des A-Monomers und S51, N188, Y189, Y238 und G283 des B-Monomers (siehe Anhang 7.5.1, Tab. 7.8).

### **3.6.8.3 Kristallform IV**

Die orthorhombische Einheitszelle setzt sich aus vier Alliinasedimeren zusammen, welche so arrangiert sind, daß sich entlang der drei Zellachsen  $2_1$ -Schraubenachsen formieren (Abb. 3.50, erste Reihe, rechts). Daraus ergibt sich, daß die asymmetrische Einheit mit einem Dimer vertreten ist. Die NCS-Achse des Dimers liegt, für die ac-Kristallebene betrachtet (Abb. 3.50, dritte Reihe, rechts), mit nur  $5^\circ$  Neigung vergleichsweise nahe der kristallographischen a-Achse. Weiter von einer Zellachse entfernt, präsentiert sich mit  $8^\circ$  Neigungswinkel zur b-Achse die Dimer-NCS-Achse aus Sicht der bc-Kristallschicht (Abb. 3.50, vierte Reihe, rechts). In der ab-Ebene (Abb. 3.50, zweite Reihe, rechts) liegt die NCS-Achse des Dimer schließlich  $30^\circ$  zur a-Achse gekippt vor.

Das Alliinasedimer steht im Kristallverband zu acht weiteren Dimeren im Kontakt (nicht gezeigt). In Monomer A bilden die Aminosäurereste K7, E34, G35, H214, M226, K239, D241, E242, N351 und R354 sowie in Monomer B Q55, R213, H214, A215, K237, K305, T306, Q307, K308, R323, S347, R354, N382, R384, K425, R426 klassische Wasserstoff- oder Salzbrückenbindungen (siehe Anhang 7.5.2, Tab. 7.9) zur Aufrechterhaltung des Kristallgitters aus. Nicht zu vergessen sind auch zwei Sulfat-Ionen, die auf diesem Wege zur Verbrückung der Aminosäurereste A187 und H161 (beide B-Monomer) bzw. K237 (A-Monomer) eines Dimers mit den Aminosäureresten K308 und R354 (beide B-Monomer) bzw. R348 (B-Monomer) zweier Nachbardimere beitragen (siehe Anhang 7.5.2, Tab. 7.9). Folgende weitere Aminosäuren beteiligen sich mit Wechselwirkungen von 3,5-4 Å Distanzabstand an schwächeren Kristallkontakten: E10, I32, S193, K218, T224, K237, Y238, A240 und Y349 aus Monomer A sowie E34, P48, I54, G56, L212, V216, T310, Q346, Y349 und M356 aus Monomer B (siehe Anhang 7.5.2, Tab. 7.10).

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Enzymreinheit und -aktivität

#### 4.1.1 Mikroheterogenität

Die in der IEF beobachtete Mikroheterogenität der isolierten Alliinaseprobe ist nicht zweifelsfrei geklärt. Ein Gemisch verschiedener Glykosylierungsstufen wäre für das aus der natürlichen Umgebung isolierte Protein allerdings als Hauptgrund der Ladungsdiversität zu vermuten. Leider verschlossen sich die möglichen verschiedenen Zuckerketten in der Elektronendichte einer Verifizierung. Als alternative Ursache der multiplen Banden im IEF-Gel kann das Vorliegen von Isoenzymen mit leichten Sequenzvariationen letztlich nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dagegen spräche jedoch die durch unterschiedliche Aminosäuren ausgehende Störung der lokalen Proteinstruktur und folglich der Mehrdeutigkeit bis hin zur Nichtordnung der Elektronendichte für diese Regionen. Im Bereich des C-Terminus, dessen mehr als 20 Aminosäurereste in der Elektronendichtekarte nicht zu lokalisieren waren, befinden sich zwei der sechs zwischen den Alliinasesequenzen von VANDAMME *et al.* (1992) und RABINKOV *et al.* (1994) variierenden Aminosäurepositionen. Doch ist die fehlende Elektronendichte kein schlüssiges Argument, an dieser Stelle Sequenzvariation durch Isoenzyme zu vermuten, da für drei der vier anderen Position eindeutige Aminosäuren in der Elektronendichte zugeordnet werden konnten (Kapitel 2.6.1).

#### 4.1.2 Spezifische Enzymaktivität

Eine spezifische Alliinaseaktivität von bis zu 660 Units/mg für das aus frischen grünen ägyptischen Knollen isolierte Enzym stellt den bislang höchsten für die Knoblauch-Alliinase bzw. einer Alliinase generell berichteten Aktivitätswert dar. Die bisherige Spitzenposition hielt eine Alliinasepräparation von spanischem Knoblauch von JANSEN *et al.* (1989a) mit einem spezifischen Aktivitätswert von 390 Units/mg. Die von diesen Autoren isolierte Alliinase unterscheidet sich allerdings in einigen Punkten wie fehlende Glykosylierung, Homogenität in der IEF-PAGE, einem IEP von pH 4,9 sowie dem vermuteten zweiten Kofaktor (Flavin) deutlich von dem in dieser Arbeit verwendeten Enzym sowie bisherigen Alliinasen (vergleiche Kapitel 1.3.4). Die bis dato zweithöchste spezifische Aktivität von 332 Units/mg erreichte eine von KREST & KEUSGEN (1999a) beschriebene Alliinase aus chinesischem Knoblauch, die auch über ConA-Sepharose aufgereinigt wurde. Interessanterweise zeigt die im Rahmen dieser Arbeit aus spanischen Knollen isolierte Alliinase mit 411-419 Units/mg einen ähnlichen Wert wie die zuvor genannte Präparation spanischen Knoblauchs von JANSEN *et al.* (1989a)

mit 390 Units/mg und ist so Beleg für die Vergleichbarkeit der Aktivitäten. Die Ursachen für die von verschiedenen Herkunftsgebieten differierenden Alliinaseaktivitäten bleiben ungewiß. Eine Erklärung könnten unterschiedliche Glykosylierungszustände geben, da Veränderungen in der Glykosylierung die Struktur und Aktivität von Proteinen beeinflussen können (TAYLOR & DRICKAMER, 2003). Der Zuckerrest an Position N146 wäre aufgrund seiner Lage zum aktiven Zentrum des Nachbarmonomers ein geeigneter Kandidat für die Modulation des Substratzutritts zum aktiven Zentrum (vergleiche Kapitel 4.4.7). Eine andere Isoform in den ägyptischen Knollen käme auch als Ursache für die hohe Aktivität in Frage. Allerdings erbrachte die Inspektion der Elektronendichte einer unverfeinerten Struktur aus P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>-Kristallen des hochaktiven Enzyms keine andere Strukturinformation für die Aminosäurepositionen, welche für die Struktur der Alliinase aus französischem Knoblauch bereits der Sequenz von VANDAMME *et al.* (1992) zugeordnet wurden (Kapitel 3.6.1). Die für frischen Knoblauch gefundenen, meist höheren Alliinaseaktivitäten stehen möglicherweise mit Alterungs- und Umwandlungerscheinungen in den abgetrockneten Knollen im Zusammenhang. Unbeantwortet verbleibt an dieser Stelle, weshalb die von frischen deutschen Knollen der gleichen Herkunft und Sorte im darauffolgenden Erntejahr isolierte Alliinase nur noch knapp die Hälfte der spezifischen Enzymaktivität aufwies.

### **4.1.3 MICHAELIS-MENTEN-Parameter**

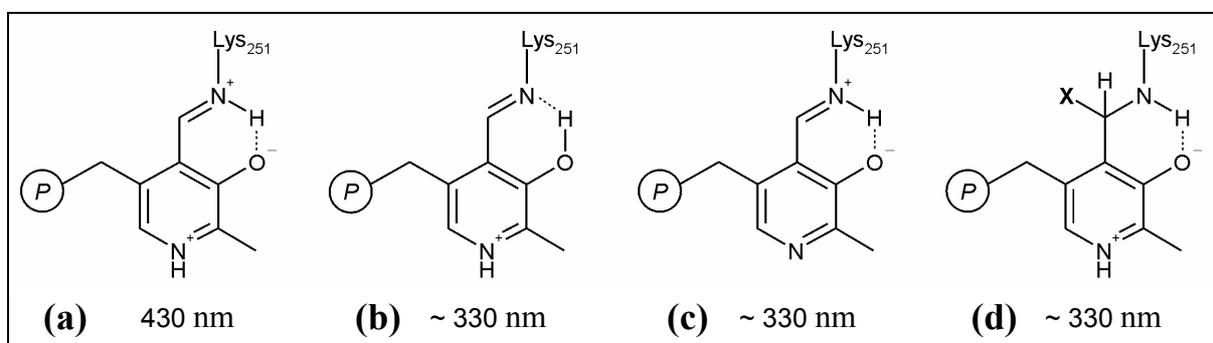
Die ermittelten  $K_M$ - bzw.  $v_{max}$ -Werte der deutschen und französischen Alliinasepräparationen von jeweils 2,1 und 2,8 mM bzw. 27,7 und 16 mUnits/min (= 554 und 320 Units/mg) entsprechen von der Größenordnung her den bisher aus der Literatur für die Knoblauch-Alliinase bekannten Aktivitätsparametern. So berichteten für den  $K_M$ -Wert KAZARYAN & GORYACHENKOVA (1978) 0,5 mM, MAZELIS & CREWS (1968) 6 mM, NOCK & MAZELIS (1986) 3,3 mM, JANSEN *et al.* (1989a) 2,2 mM, RABINKOV *et al.* (1994) 1,1 mM, KREST & KEUSGEN (1999a) 1,6 mM und KREST *et al.* (2000) 1,25 mM. Die kleineren und so für eine effizientere Alliinase sprechenden Werte von KAZARYAN & GORYACHENKOVA (1978), KREST & KEUSGEN (1999a) sowie KREST *et al.* (2000) haben ihre Ursache in der Verwendung des reinen (+)-Alliinsteroisomers anstelle des racemischen Alliins der anderen Autoren, wie schon JANSEN *et al.* (1989a) erkannte. Der  $v_{max}$ -Wert der französischen Enzympräparation bestätigt die von JANSEN *et al.* (1989a) mit 308 Units/mg sowie die von KREST & KEUSGEN (1999a) mit 332 Units/mg gefundenen Werte. Allerdings übersteigt die maximale Enzymaktivität aus deutschen Pflanzen die Literaturwerte um fast das doppelte und könnte auf das frisch geerntete Ausgangsmaterial zurückzuführen sein.

#### 4.1.4 HEPES als Inhibitor der Enzymreaktion

Die Pufferkomponente HEPES wirkt inhibierend auf die Alliinasereaktion. Gleichwohl aber ist die konzentrationsabhängige Inhibition von nicht erklärbaren Aktivierungseinflüssen begleitet. Allerdings kann bei der für die Kristallisation eingesetzten Konzentration (100 mM) zweifellos von einer durch HEPES ausgehenden Hemmwirkung gesprochen werden, wie die auf ein Viertel zurückgehende Enzymaktivität beweist. HEPES ähnelt mit der Ethyl-Sulfonylgruppe sehr einem racemischen Alliinmolekül mit der Sulfoxidgruppe und dem angehängten Allylrest. So überrascht es nicht, in der dreidimensionalen Struktur der Kristallform IV das HEPES-Molekül mit seiner Sulfonylgruppe im aktiven Zentrum gebunden wiederzufinden. Es ergeben sich daraus zusätzliche Hinweise über die mögliche Bindung des Substrates Alliin im aktiven Zentrum der Alliinase, wie in Kapitel 4.4.8.1 ausgeführt.

#### 4.2 UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektroskopie

Das neben der Proteinabsorptionsbande von 280 nm für eine frische Proteinlösung beobachtete Extinktionsmaximum bei 430 nm ist dem in der Ketoenaminform (Abb. 4.1a) als internes Aldimin gebundenen Kofaktor PLP zuzuschreiben (BRAUNSTEIN & GORYACHENKOVA, 1984). Die nach 12 Tagen verzeichnete sehr schwache Absorptionsschulter bei 330 nm ließe sich, wie an der C-S-Lyase Cystalysin gezeigt (BERTOLDI *et al.*, 2002), entweder als Enolaminform des internen Aldimins (Abb. 4.1b), einer Form mit deprotoniertem Pyridiniumstickstoff (Abb. 4.1c) oder einer als substituiertes Aldamin bezeichneten Spezies (Abb. 4.1d) verstehen. Eine Deprotonierung des Pyridiniumstickstoffs kann angesichts der sehr kurzen Wasserstoffbrücke zum Aspartylrest 225 (< 2,6 Å Abstand) als sehr unwahrscheinlich betrachtet werden. Das Emissionsspektrum bei Anregung mit 330 nm weist mit dem Fluoreszenzmaximum bei 390 nm auf das Vorliegen des substituierten Aldamins und nicht der Enol-



**Abb. 4.1** Mögliche Protonierungs- und Substitutionsformen des internen Aldimins. Strichzeichnungen der Ketoenaminform (a), der Enolaminform (b), der Form mit deprotoniertem Pyridiniumstickstoff (c) und der durch den Liganden X substituierten Aldaminform (d), jeweils mit Angabe des Absorptionsmaximums. Nach BERTOLDI *et al.* (2002).

## Diskussion

imininform hin, da für ein substituiertes Aldamin die Fluoreszenz bei 390 nm und für das Enolimin bei 510 zu erwarten ist (HAYACHI *et al.*, 1993; RO *et al.*, 1996). Als mögliche Substitutionspartner für das Aldamin kommen in der Alliinase Y92\* (3,57 Å Abstand, \* = Aminosäure aus Nachbarmonomer der Kristallform IV) oder Y228 (3,72 Å Abstand, Monomer A der Kristallform IV) in Frage. Der erste Tyrosinrest wurde analog bereits von BERTOLDI *et al.* (2002) für Cystalysin (dort Y64\*; KRUPKA *et al.*, 2000) vorgeschlagen, wobei das zur Alliinaseposition Y228 analoge H206 in Cystalysin (KRUPKA *et al.*, 2000) aufgrund eines Abstand  $> 4$  Å nicht favorisiert wurde (BERTOLDI *et al.*, 2002). Das mit dem PLP-Ring in Stapelwechselwirkung stehende Y165 ist in der Alliinase mit mehr als 4 Å Distanz zum PLP-C4A-Atom, wie schon für Y123 des Cystalysins (KRUPKA *et al.*, 2000) erkannt (BERTOLDI *et al.*, 2002), ein weniger wahrscheinlicher Partner zur Bildung des substituierten Aldamins. BERTOLDI *et al.* (2002) geben an, daß eine deprotonierte, negativ geladene Spezies eher für den nukleophilen Substitutionsschritt geeignet wäre. Angesichts der zwischen Y92\* und dem PLP-Phosphat ausgebildeten Wasserstoffbrücke würde ein Phenolat-Anion zu elektrostatischen Abstoßungen und zur Destabilisierung der Kofaktorbindung führen. Y228 dagegen könnte bei Deprotonierung zusätzlich durch Wasserstoffbrücken zum Aldaminstickstoff (3,57 Å Abstand in Monomer A von Kristallform IV) sowie zur OH-Gruppe von Y363 (2,69 Å Abstand in Monomer A von Kristallform IV) stabilisiert werden. Allerdings sähe sich Y363 auch einer elektrostatischen Abstoßung zur 3A-OH-Gruppe des PLP ausgesetzt, wenn diese deprotoniert verbliebe. Weshalb die Absorptionsschulter bei 330 nm erst nach 12 Tagen und nicht schon bei frisch isolierter Alliinase sichtbar wurde, ist unbestimmt. Eventuell führen Alterungsvorgänge oder langsame Umwandlungsprozesse erst zur Ausbildung eines Teils des substituierten Aldamins. Überraschenderweise gab es auch Enzympräparationen, die eine 330 nm-Absorptionsschulter bereits direkt nach der Reinigung vorwiesen (Daten nicht gezeigt). Das bei einer Fluoreszenzanregung mit 430 nm emittierte Maximum der Ketoenaminform bei 519 nm verschob sich bei kurzwelligerer Anregungswellenlänge (390 nm) hypsochrom zu 511 nm und führte zur Ausbildung einer Schulter bei 460 nm. Das Erscheinen dieser Schulter deutet möglicherweise auf die Beteiligung anderer Protonierungsstufen der Schiff'schen Base hin, deren Identität jedoch nicht geklärt ist.

### **4.3 Kristallisation**

#### **4.3.1 Verwandtschaft der Kristallformen**

Schon vor Aufklärung der dreidimensionalen Strukturen von drei der vier Kristallformen drängte sich aufgrund ähnlicher quaderförmiger Morphologie und vergleichbarer Zelldimensionen die Vermutung auf, daß die Formen I-III miteinander verwandt sind. Zudem

## Diskussion

wachsen ihre Kristalle unter gleichartigen Rahmenbedingungen mit 16-20 % der Fällungsmittel Polyethylenglykol 4000/6000/8000 und im leicht sauren Milieu von pH 5,4-6,1. Die Kristallform II (C222<sub>x</sub>) stellt von den Einheitszelldimensionen ( $a = 55,7 \text{ \AA}$ ,  $b = 97,7 \text{ \AA}$ ,  $c = 153,9 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ) und dem Lösungsmittelgehalt (36,2 %) her eine geschrumpfte Version der Kristallform I (P2<sub>1</sub>) mit einer größeren Einheitszelle ( $a = 56,0 \text{ \AA}$ ,  $b = 114,3 \text{ \AA}$ ,  $c = 163,1 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 93,4^\circ$ ) und höherem Lösungsmittelanteil (48,7 %) dar. Die Kristallform III (P2<sub>1</sub>) hingegen, welche durch Addition von 0,15 M NaCl zum sonst gleichen Kristallisationsansatz wie die Formen I und II entsteht, spiegelt in den Zelldimensionen ( $a = 57,0 \text{ \AA}$ ,  $b = 98,3 \text{ \AA}$ ,  $c = 82,6 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta = 109,1^\circ$ ) und dem Lösungsmittelwert (38,9 %) eine entlang der b-Achse um ca. 16 Å geschrumpfte und für die c-Achse halbierte Zelle der Kristallform I wider. Alternativ könnte Form III im Vergleich zu Form II auch als eine auf knapp die Hälfte in der c-Achse, bei fast gleichen Dimensionen für a und b, verkürzte Zelle beschrieben werden. Für die unter gänzlich verschiedenen Kristallisationsbedingungen (> 3 M Ammoniumsulfat, pH 6-8,5) gefundene Form IV (P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>) läßt sich ein Zusammenhang zur anderen orthorhombischen Kristallform II (C222<sub>x</sub>) finden. Die P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>-Einheitszelle ist zwar in der a-Achse um ca. 13 Å vergrößert, doch ähneln die übrigen beiden Achsen ( $b = 101,1 \text{ \AA}$ ,  $c = 155,9 \text{ \AA}$ ) den entsprechenden Dimension der C222<sub>x</sub>-Zelle ( $b = 97,7 \text{ \AA}$ ,  $c = 153,9 \text{ \AA}$ ).

Die gelösten Raumstrukturen der Kristallformen I und III bestätigen die Verwandtschaft beider Formen. Die doppelte Länge der c-Achse von Form I geht einher mit der doppelten Anzahl von Dimeren pro asymmetrischer Einheit. Die Orientierungen beider Dimere bilden die Ursache für die Verwandtschaft zu Kristallform III. So ist eines der beiden Dimere aus der asymmetrischen Einheit von Form I sehr ähnlich positioniert wie das einzige Dimer der asymmetrischen Einheit von Form III. Das zweite Dimer der asymmetrischen Einheit von Form I hingegen weist leichte, aber signifikante Abweichungen der Orientierung zum ersten Dimer auf. Die NCS beider Dimere der AE ist mit einer Rotation von 179,9° und einer Translation von {0,03 0,99 -0,11} - außer im Falle der z-Translation - sehr nahe einer kristallographischen Symmetrie mit {0 1 0} Translation, da die Rotation von  $\approx 180^\circ$  der dimereigenen NCS-Achse entspricht. Im Detail stellt sich die Situation wie folgt dar: Das erste Dimer aus Form I ist mit seiner NCS-Achse in den ab-, bc- und ac-Ebenen jeweils um 25° (zur b-Achse), 20° (zur b-Achse) bzw. 37° (zur a-Achse) geneigt (vergleiche Abb. 3.50, zweite-vierte Reihe, links, grünes oder rotes Dimer). Das einzelne Dimer aus Form III weist mit den Neigungswinkeln seiner NCS-Achsen in den ab-, bc- und ac-Ebenen von jeweils 26° (zur b-Achse), 21° (zur b-Achse) bzw. 32° (zur a-Achse) sehr ähnliche Werte auf (vergleiche Abb. 3.50, zweite-vierte Reihe,

## Diskussion

Mitte). Das zweite Dimer aus Form I ist in der Kippung der NCS-Achsen in den ab-, bc- und ac-Ebenen jeweils um  $21^\circ$  (zur b-Achse),  $7^\circ$  (zur b-Achse) bzw.  $15^\circ$  (zur a-Achse) (vergleiche Abb. 3.50, zweite-vierte Reihe, links, hellblaues oder violettes Dimer) deutlich verschieden zur Lage des Dimers in Form III. Neben der halbierten c-Achse lassen sich weitere Zellachsenveränderungen beim Übergang von Form I nach III anhand der Molekülpackung nachvollziehen. Die Kompression der b-Achse rührt daher, daß die Molekülschichten in Form III deutlich enger zusammengerückt sind (vergleiche Abb. 3.50, zweite Reihe, Mitte und links). Die Länge der a-Achse bleibt mit  $56 \text{ \AA}$  (I) gegenüber  $57 \text{ \AA}$  (III) nahezu unverändert, da entlang dieser Achse keine signifikant gestauchtere Molekülschichtpackung für die Form III beobachtet werden konnte (vergleiche Abb. 3.50, dritte Reihe, links und Mitte). Unbeantwortet bleibt allerdings, inwiefern das zur Kristallisation bei Form III eingesetzte NaCl zur Ausbildung der anderen Kristallform beitrug. Bis auf P96 im A-Monomer gibt es keine weiteren in Kristallkontakten einbezogene Aminosäurereste aus der chloridbindenden Schleife (Positionen 92-100), die durch zusätzlich anwesendes  $\text{Cl}^-$  von einer Stabilisierung der Chloridbindungsschleife und damit der Ausbildung von wichtigen Kristallkontakten profitiert hätten. Selbst die von P96 vermittelte schwache Wechselwirkung zur Zuckerkette an N191 im B-Monomere eines Nachbardimers ist mit einem Abstand von  $3,67 \text{ \AA}$  nicht als tatsächlich ausschlaggebend anzusehen. Ein möglicherweise als Wassermolekül fehlinterpretiertes  $\text{Na}^+$ -Ion konnte nach Überprüfung der in Kristallkontakten involvierten Wassermoleküle hinsichtlich der für  $\text{Na}^+$ -Ionen charakteristischen Geometrieparameter (HARDING, 2002) nicht identifiziert werden. Ferner ungeklärt bleibt, warum die Kristallform III nicht spontan zur Kristallisation befähigt ist. Vielleicht ist die Ausbildung eines stabilen Kristallkeimes in der Form III energetisch nicht begünstigt. Beantwortet ist jedoch die Frage, wieso Mikrokeime der Form I die Kristallisation von Form III initiieren können. Da in Form I jede zweite ab-Molekülschicht in Richtung der c-Achse sehr ähnlich zum Kristallgitter von Form III ist, besteht an einer geeigneten Kristallbruchstelle eine fast ideale Ausgangsfront für das fortgesetzte Wachstum von Form III.

Die Beziehung der Kristallform II ( $\text{C}222_x$ ) zur Form I bleibt aufgrund der nicht gelösten dreidimensionalen Struktur im Detail weiter ungeklärt. Es sei aber daran erinnert, daß der vermessene  $\text{C}222_x$ -Kristall mehrfach im Gefrierschutzmittel Ghee getränkt und eingefroren sowie aufgetaut wurde. Die wasserentziehende Wirkung des Butterfettes Ghee (PANJIKAR, 2001) könnte mit dem wechselnden Einfrieren/Auftauen für eine Umwandlung der Kristallform I nach II gesorgt haben. So schrumpfte die Zelle in der b-Achse auf einen ähnlichen Wert wie die Länge in Form III. Eventuell stellt dieser Wert die maximale Komprimierbarkeit der Moleküle entlang der b-Achse dar. Die c-Achse hingegen wurde nicht halbiert, wie in

## Diskussion

Form III, wengleich sie sich auch um ca. 10 Å reduzierte. Somit ist davon auszugehen, daß weiterhin vier Dimere, entsprechend einem Monomer pro asymmetrischer Einheit, in der Einheitszelle vorliegen. Die entlang der c-Achse vermutete Schraubenachse in Form II liegt jedoch in Form I nicht vor und würde eine komplette Umorientierung der Dimere bedürfen. Allerdings hilft hier eine Umskalierung der Achsen von b nach c in Form II, um diesem Problem zu entgegnen und die vermeintliche c-Schraubenachse in eine b-Schraubenachse zu überführen. Die nah beieinander liegenden  $\beta$ -Winkel von 93,4 bzw. 90° von Form I bzw. II deuten auch auf die mögliche Einheitszellumwandlung hin.

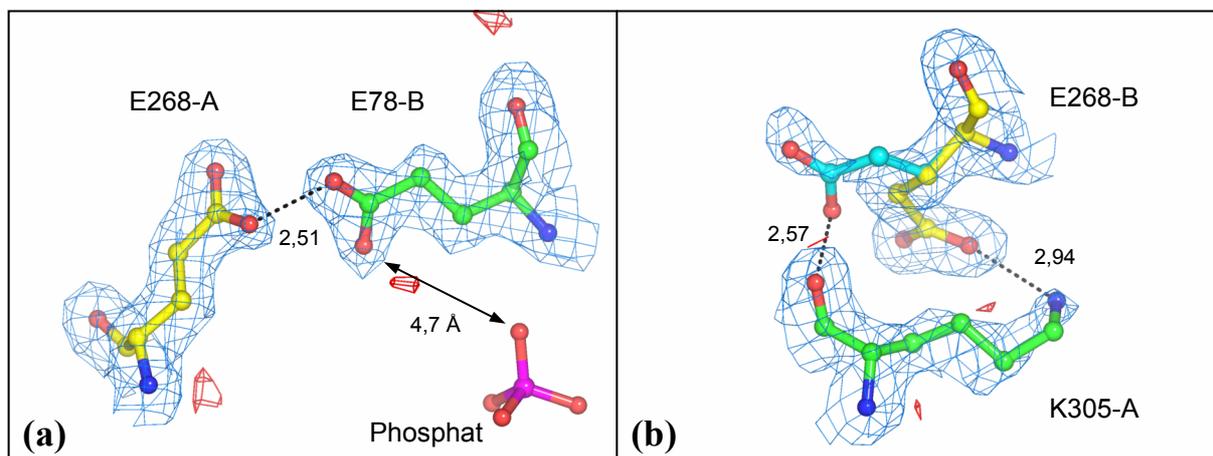
Aus der Molekülpackung von Kristallform IV (vergleiche Abb. 3.50, rechte Spalte) läßt sich ablesen, daß die eingangs nur anhand der Einheitszellparameter gestellte These zur eventuellen Verwandtschaft mit Kristallform II nicht haltbar ist. Die ähnlichen Längen der b- und c-Achsen sind als zufällig anzusehen. Denn sollte Form II mit Form I verwandt sein, so wäre die Anordnung der Moleküle im Kristallgitter von Form II grundverschieden zu Form IV. Hinzu kommt in Form IV das Vorliegen von Schraubenachsen entlang aller drei Achsen und in Form II nur entlang einer Achse.

Trotz der unterschiedlichen Kristallpackung von Form III und IV, werden die Aminosäurereste G35 des A-Monomers, Q55, H214, N282 und R384 des B-Monomers sowie E34 und K305 des A- und/oder B-Monomers in beiden Molekülpackungen zur Ausbildung von Kristallkontakten ( $\leq 3,5$  Å) genutzt (vergleiche Anhang 7.5, Tab 7.7/7.9). Schwächere Interaktionen ( $> 3,5$ -4 Å) zwischen Dimeren des Kristallverbands werden in beiden Kristallformen von den Resten G56 und Y238 des A- und/oder B-Monomers bestritten (vergleiche Anhang 7.5, Tab. 7.8/7.10). Es entsteht daher der Eindruck, daß bestimmte Aminosäurereste in der Alliinase dazu prädestiniert sind, auch in nicht-verwandten Raumgruppen eine tragende Rolle bei der Ausbildung von Kristallkontakten zu spielen, wengleich ihre jeweiligen Partner variabel sind.

### **4.3.2 pH-Wert-Abhängigkeit der PEG-Kristallformen**

Für die mit den Fällungsmitteln PEG-4000/6000/8000 gezüchteten Kristallformen I-III lag der optimale pH-Wert mit pH 5,4-6,1 im leicht sauren Bereich. Höhere Werte hin zu einem neutralen bis schwach basischen Milieu führten zur Veränderung der Morphologie von quaderförmigen hin zu farnartig miteinander verwachsen Kristallen (nicht gezeigt). Die Beschränkung auf den pH-Korridor ließe sich anhand der Struktur von Form III auf drei an Kristallkontakten beteiligte Glutamatreste (E268 im A- und B-Monomer, E78 im B-Monomer; vergleiche Anhang 7.5, Tab. 7.7) zurückführen, die zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in zwei Fällen protoniert vorliegen müßten und die Notwendigkeit des sauren pH-Wertes zur Kri-

stallisation erklären könnten. E268-A bildet eine sehr kurze (2,51 Å) Wasserstoffbrückenbindung mit E78-B eines Nachbardimers aus (Abb. 4.2a). Es ist am wahrscheinlichsten, daß E78-B protoniert vorliegt, da die vorangehende Aminosäure K77-B ein Phosphat-Ion bindet. Trotz des Abstandes von 4,7 Å zum Phosphat-Ion (Abb. 4.2a) wäre die Protonierung von E78-B im Vergleich zu E268-A vorteilhafter, da es zu weniger elektrostatischen Abstoßungen mit dem Phosphat-Ion führen würde, als das Szenario eines protonierten E268-A und eines deprotonierten E78-B. Der Kristallkontakt eines dritten Glutamatrestes, E268-B, wäre indes minder von einer weiteren pH-Werterhöhung und somit Deprotonierung betroffen. E268-B greift bereits hauptsächlich mit einer alternativen Konformation auf das N $\zeta$ -Atom von K305 des A-Monomers eines Nachbardimers zurück (wie durch die besser definierte Elektronendichte ersichtlich; Abb. 4.2b) und könnte so den Verlust des alternativen Kontaktes mit der Hauptkettencarbonylgruppe von K305-A (Abb. 4.2b) kompensieren. Sollten in den zu Kristallform III verwandten Formen I und II die Glutamatrest E268-A und E78-B ebenfalls einen wichtigen Kristallkontakt ausbilden, so könnte der Verlust der Interaktion bei ansteigendem pH-Wert auch für diese Kristallformen den notwendigen leicht saueren pH-Wert zur Ausbildung der optimaleren Kristallmorphologie erklären. Demgegenüber sei vermerkt, daß in Kristallform IV keine Glutamat- oder Aspartatreste in Kontakte untereinander oder zu Hauptkettencarbonylgruppen ( $\leq 3,5$  Å) involviert sind (vergleiche Anhang 7.5.2, Tab. 7.9). Daher könnte der breitere pH-Wertbereich (pH 6-8,5) besser bei der Ausbildung der Kristallkontakte toleriert werden.



**Abb. 4.2** Kristallkontakte ausgewählter Glutamatreste in Kristallform III. Kugelstabmodell Darstellung von E268 aus Monomer A, E78 aus Monomer B und eines Phosphat-Ions **(a)** sowie E268 aus Monomer B und K305 aus Monomer A **(b)** samt der für die Aminosäuren zugehörigen ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Elektronen- und ( $mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ )-Differenzelektronendichtekarte [blau bzw. rot, Konturierung: 1 bzw. -3  $\sigma$ ]. Die C-Atome der Aminosäuren verschiedener Dimere sind grün bzw. gelb gefärbt. In **(b)** ist eine zweite alternative Konformation von E268-B mit hellblauen C-Atome wiedergegeben. Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen sind als Punktlinien mit Längenangabe [Å] eingezeichnet.

### **4.3.3 Mikroheterogenität in den Kristallen**

Die Heterogenität einer Proteinprobe ist für eine beabsichtigte Kristallisation im allgemeinen von entscheidender Rolle (MCPHERSON, 1999). Allerdings gibt es auch Beispiele, in denen mikroheterogene Gemische von Proteinisofomen kristallisiert wurden, doch in den Kristallen jeweils nur eine Spezies vorgefunden wurde (KJELDGAARD *et al.*, 1993; HOGG, 2001; HOGG *et al.*, 2002). Der Kristallisation fiel sozusagen eine Reinigungsfunktion auf molekularer Ebene zu, wie sie in der organischen Chemie regelmäßig in Form des Umkristallisierens genutzt wird. Allerdings war dieser Effekt nicht bei der mikroheterogenen Alliinase-Lösung zu beobachten (Kapitel 3.3.5). Es stellt sich daher die Frage, ob Unterschiede der Aminosäuresequenz oder der Glykosylierung wahrscheinlicher sind, in den Strukturen von Form III bzw. IV toleriert zu werden. Geht man davon aus, daß Sequenzisofomen vorrangig für die schon zwischen den Alliinase-Sequenzen von VANDAMME *et al.* (1992) und RABINKOV *et al.* (1994) als abweichend gefundenen Stellen auftreten könnten, so müßten diese Positionen in der Elektronendichte multiple Konformationen bzw. ungeordnete Elektronendichte aufweisen. Doch ist dieses nicht der Fall, und die Aminosäuren wurden zweifelsfrei zugeordnet. Folglich können multiple Glykosylierungsstufen als die wahrscheinlichste Ursache der Beibehaltung der Ladungsdiversität und damit Mikroheterogenität erachtet werden. Die gefundenen, maximal drei Zuckerketten eines Alliinase-monomers sind bis auf eine Ausnahme (Glykan an N191 im B-Monomer der Kristallform III) nicht an Kristallkontakten beteiligt und ragen in Lösungsmittel Hohlräume hinein. Es ist somit vorstellbar, daß unterschiedlich modifizierte Glykane ebenso die Lösungsmittelbereiche ausfüllen und daher die Kristallpackung nicht beeinträchtigen. In Bezug zum Glykosylrest an N191-B in Kristallform III ist zu sagen, daß die hohen Temperaturfaktoren der Atome in diesem Glykan ( $< 54 \text{ \AA}^2$ ) darauf hindeuten, daß auch diese Zuckerkette als sehr beweglich und flexibel anzusehen ist. Die durch sie ausgebildeten Kristallkontakte sollten deshalb nicht maßgeblich und zwingend notwendig zur Erhaltung der Molekülpackung in Form III sein und eine variable Glykosylierung auch für diese Zuckerkette im Kristallverband toleriert werden.

## **4.4 Alliinasestruktur**

### **4.4.1 Faltungsvergleich mit PLP-abhängigen Enzymen**

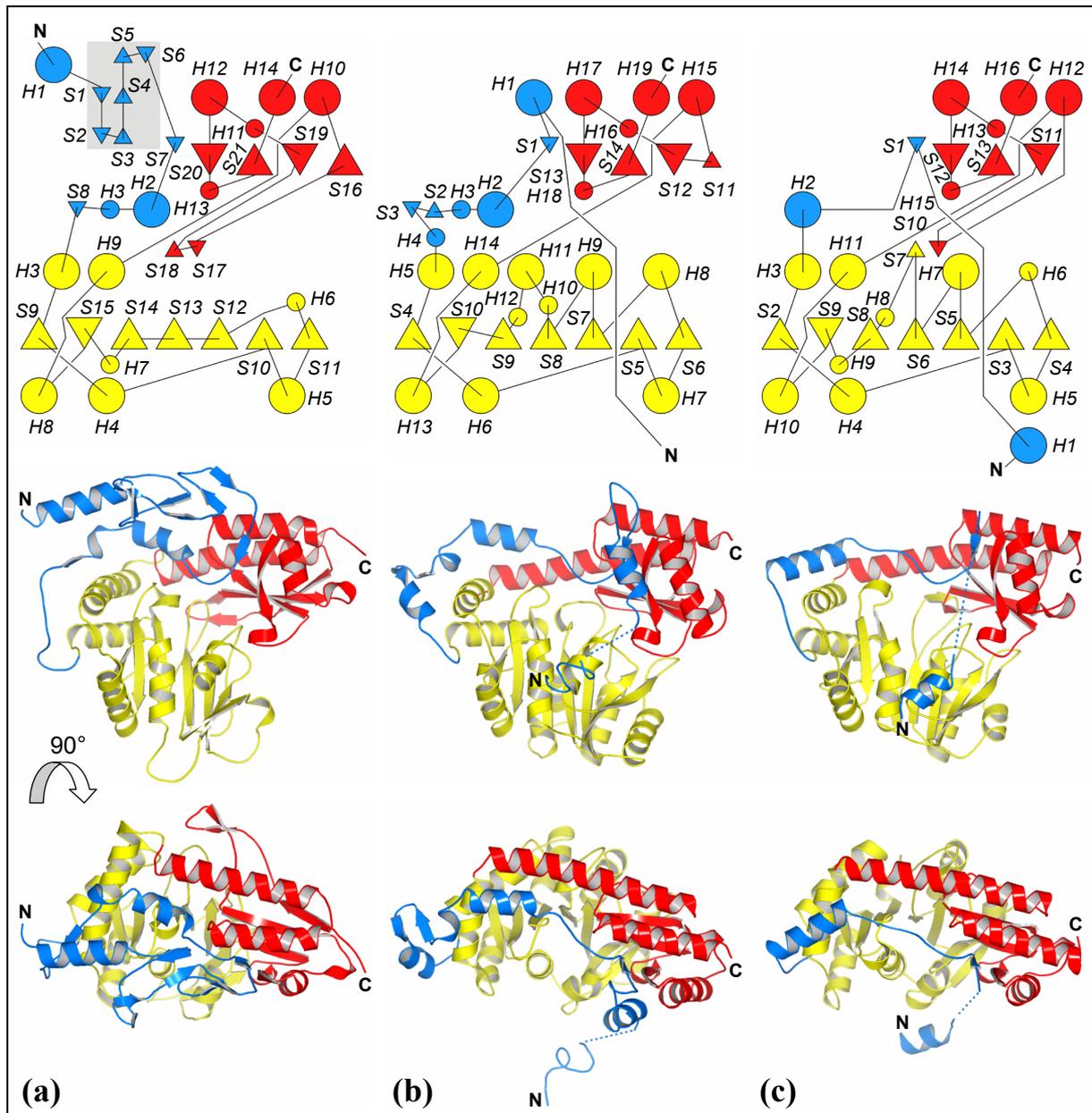
Physiologisch aktive Alliinase bildet in Lösung und im Kristall ein Homodimer aus, das mit seiner S-förmigen Gestalt entlang der zweizähligen Dimersymmetrieachse ähnlich zur Struktur des klassischen PLP-abhängigen Enzyms AAT (MCPHALEN *et al.*, 1992) ist. Folglich

## Diskussion

läßt sich die Alliinase in die Faltungsklasse I der PLP-Enzyme (SCHNEIDER *et al.*, 2000) einordnen. Der detaillierte Strukturvergleich auf Basis der C $\alpha$ -Hauptkettenverläufe mit einzelnen Mitgliedern der verschiedenen Subklassen beweist für das Knoblauchenzym ferner die Zugehörigkeit zur Aminotransferase Subklasse I (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Hierbei stellen die 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat-Synthase (ACCS, Abb. 4.3b; CAPITANI *et al.*, 1999) als Beispiel eines Enzyms mit C-S-Lyase-Aktivität und die Aromatische Aminosäure-Aminotransferase (AroAT, Abb. 4.3c; MATSUI *et al.*, 2000) als Vertreter der Aminotransferasen die PLP-Enzyme mit der engsten dreidimensionalen Strukturverwandtschaft dar. So betragen die mittleren Fehlerabweichungen der C $\alpha$ -Hauptkettenverläufe zwischen Alliinase und ACCS bzw. AroAT 1,96 Å bzw. 1,93 Å bei 301 bzw. 285 überlagerten C $\alpha$ -Positionen. Die darauf basierenden Sequenzidentitäten (-ähnlichkeiten) von Alliinase mit ACCS bzw. AroAT liegen bei nur 10 (29) % bzw. 13 (31) %. Die Sekundärstrukturanteile von Alliinase sind mit 36 %  $3_{10}$ -/ $\alpha$ -Helixanteil niedriger und mit 23 %  $\beta$ -Faltblattbeitrag höher als die entsprechenden Werte von ACCS mit 48 % und 18 % bzw. AroAT mit 39 % und 18 %.

Die deutlichsten Strukturunterschiede zwischen Alliinase und ACCS sowie AroAT zeigen sich bereits in den N-terminalen Domänen. Zwar weisen diese jeweils am N-Terminus eine  $\alpha$ -Helix (H1 in Alliinase und AroAT, Abb. 4.3a,c) bzw. helixartigen Hauptkettenverlauf (ACCS, Abb. 4.3b) auf, doch ist diese in Alliinase nicht vom Monomer weggerichtet (Abb. 4.3a-c). Die sich anschließende EGF-ähnliche Subdomäne der Alliinase ist in ACCS und AroAT nicht wiederzufinden und sorgt für den höheren  $\beta$ -Faltblattgesamtanteil der Alliinase. Jedoch ist der C-terminale Bereich der EGF-Domäne mit der Schleife zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen S6 und S7 auch in ACCS (Abb. 4.3b) und teilweise sichtbar in AroAT (Abb. 4.3c) ausgebildet. Diese Schleife enthält in Alliinase an Position 57 den sechsten disulfidverbrückten Cysteinrest, welcher in ACCS durch einen Glycin- (CAPITANI *et al.*, 1999) und in AroAT durch einen Aspartatrest (MATUSI *et al.*, 2000) substituiert ist. Der sich anschließende Kettenverlauf bis zur zentralen Domäne enthält mit der  $\alpha$ -Helix H2 (Numerierung für alle drei Enzyme identisch, Abb. 4.3a-c) ein vergleichbares Strukturelement, welches in AroAT (Abb. 4.3c) etwas C-terminal verlagert ist. Die kurze, darauffolgende  $\alpha$ -Helix H3 (Alliinase und ACCS, Abb. 4.3a,b) ist in AroAT (Abb. 4.3c) als Teil der  $\alpha$ -Helix H2 zu verstehen. Der  $\beta$ -Faltblattstrang S8 (Alliinase, Abb. 4.3a) hat mit dem Element S2 in ACCS (Abb. 4.3b) gewiß einen ähnlichen Vertreter, doch findet der  $\beta$ -Faltblattstrang in Alliinase nicht im gleichen Monomer seinen Bindungspartner und ist zudem anders orientiert. Die letzte Schleife der N-terminalen Domäne von Alliinase (Abb. 4.3a), welche ein Chlorid-Ion bindet, ist in ACCS und AroAT um vier bis fünf

Aminosäurereste kürzer gestaltet (Abb. 4.3b,c). Mit der nun beginnenden zentralen Domäne eines siebensträngigen, gemischten  $\beta$ -Faltblatts zeigen sich signifikante Unterschiede im Hinblick auf den Helixanteil der drei PLP-Enzymstrukturen. Sind die drei  $\alpha$ -Helices auf der



**Abb. 4.3** Strukturvergleich der Alliinase mit anderen PLP-Enzymen. Die obere Reihe zeigt Topologiediagramme sowie die mittlere und untere die dazugehörige Proteinrückgratdarstellungen von Alliinase (a), ACCS (PDB: 1B8G, CAPITANI *et al.*, 1999) (b) und AroAT (PDB: 1DJU, MATSUI *et al.*, 2000) (c) mit farblich abgesetzten Domänen: N-terminale (blau), zentrale (gelb) und C-terminale (rot) Domäne. In den Topologiediagrammen sind  $3_{10}$ - $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstränge als Kreise bzw. Dreiecke symbolisiert.  $3_{10}$ - $\alpha$ -Helices mit  $< 8$  und  $\beta$ -Faltblattstränge mit 3 Aminosäureresten sind als kleinere Kreise bzw. Dreiecke verdeutlicht. Zusätzlich sind die  $3_{10}$ - $\alpha$ -Helices (H) und  $\beta$ -Faltblattstränge (S) in den Topologiediagrammen numeriert sowie in Alliinase die EGF-ähnlichen Domäne grau hinterlegt. In der Elektronendichte von ACCS und AroAT ungeordnete Hauptkettenbereiche sind als gepunktete Verläufe gekennzeichnet.

## Diskussion

konkaven  $\beta$ -Faltblattinnenseite noch gemeinsam in allen drei Enzymen vertreten (Abb. 4.3a-c), so werden in Alliinase (Abb. 4.3a) auf der konvexen  $\beta$ -Faltblattaußenseite die fünf  $3_{10}$ -/ $\alpha$ -Helices von ACCS (H8-12, Abb. 4.3b) bzw. zumindest die drei  $3_{10}$ -/ $\alpha$ -Helices von AroAT (H6-8, Abb. 4.3c) nur noch als Schleifenelemente ausgebildet. Als direkte Folge erklärt sich damit der geringere  $3_{10}$ -/ $\alpha$ -Helixgesamtanteil der Alliinase, welcher nur ansatzweise durch die kurze  $\alpha$ -Helix H6 (Abb. 4.3a) kompensiert wird. Weitere Unterschiede der zentralen Domäne betreffen die Schleife zwischen der  $\alpha$ -Helix H4 und dem  $\beta$ -Faltblattstrang S10 in Alliinase (Abb. 4.3a), welche hier um sieben bis neun Aminosäurereste länger ausfällt als in ACCS oder AroAT (Abb. 4.3b,c). Der  $\beta$ -Faltblattstrang S11 ist in Alliinase kürzer ausgeprägt als in den beiden anderen PLP-Enzymstrukturen (Abb. 4.3b,c), wodurch auch der sich anschließende  $\beta$ -Faltblattstrang S12 weniger lang ausfällt, da ihm die Hauptkettenbindungspartner in S11 fehlen (Abb. 4.3a). In der dritten, C-terminalen Domäne sind bis auf die ausgedehnte  $\beta$ -Haarnadelschleife der Alliinase ( $\beta$ -Faltblattstränge S17 und S18, Abb. 4.3a) keine Unterschiede gegenüber den Topologien von ACCS oder AroAT zu erkennen (Abb. 4.3b,c). Es herrscht ein viersträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt vor, das einseitig von drei großen  $\alpha$ -Helices gesäumt ist (Abb. 4.3a-c). Die erwähnte  $\beta$ -Haarnadelschleife der Alliinase ist strukturell verwandt zu dem in AroAT zwischen zentraler und C-terminaler Domäne ausgebildeten kurzen, zweisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt der  $\beta$ -Faltblattstränge S7 und S10 (Abb. 4.3c). Die entsprechenden Schleifenbereiche der zentralen und C-terminalen Domänen liegen in Alliinase und ACCS ähnlich vor, aber unzureichend positioniert, um zur Ausbildung des Interdomänen- $\beta$ -Faltblatts befähigt zu sein (Abb. 4.3a,b). Trotz gleicher Topologien der C-terminalen Domänen, ergeben sich für die Alliinase kleine Unterschiede in Bezug auf die Längen von zwei der drei großen  $\alpha$ -Helices. Die erste  $\alpha$ -Helix der Domäne, welche zugleich die größte  $\alpha$ -Helix des Moleküls darstellt, fällt in Alliinase (H10, Abb. 4.3a) kürzer aus als die entsprechenden  $\alpha$ -Helices von ACCS (H17, Abb. 4.3b) und AroAT (H14, Abb. 4.3c). Als Ursache ist die verlängerte  $\alpha$ -Helix H9 in Alliinase zu sehen, die einen N-terminaleren Beginn von  $\alpha$ -Helix H10 sterisch behindert (Abb. 4.3a). Das zweite Beispiel einer in Alliinase kürzer ausgeprägten  $\alpha$ -Helix stellt das Element H12 dar (Abb. 4.3a). In AroAT ist die entsprechende  $\alpha$ -Helix (H14, Abb. 4.3c) um eine Windung und in ACCS schon mehr als zwei Windungen (H17, Abb. 4.3b) länger. Die fast identische Position der C-Termini aller drei Enzymstrukturen (Abb. 4.3a-c) wirft die Frage nach dem tatsächlichen C-Terminus in Alliinase auf. Die bisherigen Erkenntnisse zur vollständigen Aminosäuresequenz (VANDAMME *et al.*, 1992; RABINKOV *et al.*, 1995) gingen stets von cDNA,

## Diskussion

nicht aber von realem Protein aus. Vorausgesetzt, die Alliinase hätte die 20 in der Elektronendichte vermißten Aminosäuren im Reife- oder Translokationsprozeß verloren, dann könnte das theoretisch auf ca. 49000 verringerte Molekulargewicht durch den Glykosylierungsanteil von 5,5-6 % (NOCK & MAZELIS, 1986; RABINKOV *et al.*, 1994) maskiert werden. Doch sollte, bis durch eine C-terminale Sequenzierung widerlegt, von der Anwesenheit des C-terminalen Kettenbereichs ausgegangen werden, der allerdings sehr beweglich und in der Elektronendichte ungeordnet ist. In der Sekundärstrukturvorhersage, die außer der EGF-ähnlichen Domäne, anderen  $\beta$ -Faltblattsträngen (S7, S16, S17, S18) sowie kleineren  $3_{10}$ - $\alpha$ -Helices (H3, H6, H7, H8, H12, H14) positionell stets die richtige Aussage machte, könnte der C-terminale Proteinbereich eine kurze  $\alpha$ -Helix von etwa zwei Windungen enthalten (KÜTTNER, 1999).

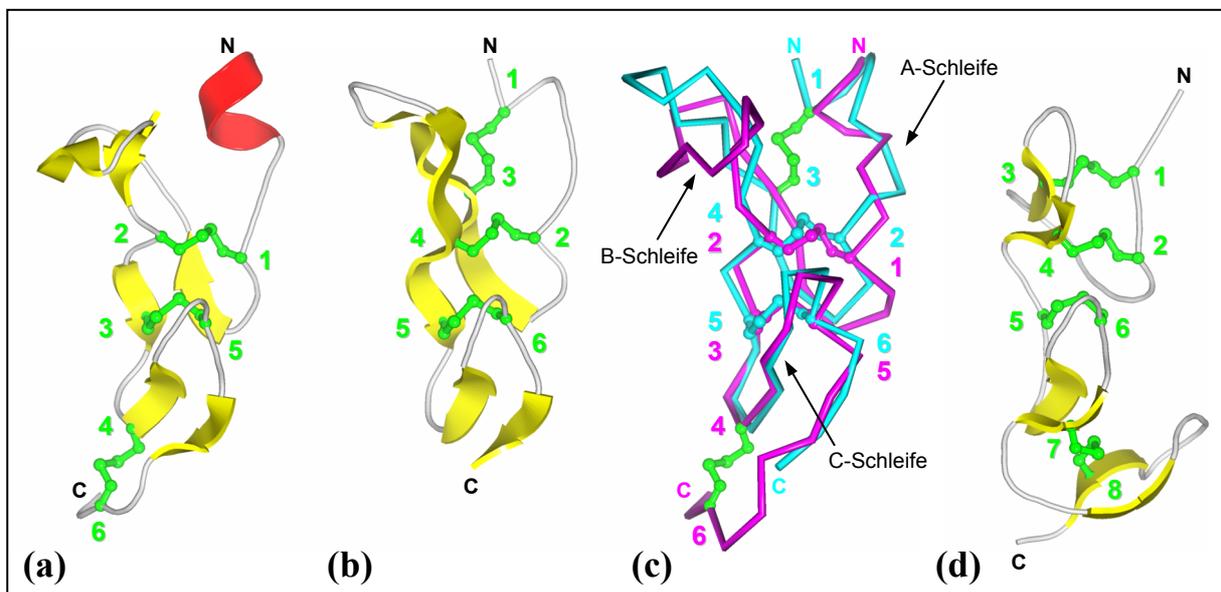
Eine die C-terminale Domäne stabilisierende Disulfidbrücke, wie sie in der Alliinase mit dem Cystin C368-C378 ausgebildet ist, wurde bisher in keinem anderen PLP-Enzym gefunden. Hingegen sind anders positionierte Disulfidbrücken auch von den PLP-abhängigen Enzymen  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Aminotransferase (GABAAT; STORICI *et al.*, 1999b), der menschlichen Cystathionin- $\beta$ -Synthase (mCBS; MEIER *et al.*, 2001) und der DAPDC (RAY *et al.*, 2002; GOKULAN *et al.*, 2003) bekannt. In GABAAT und mCBS liegen die Cysteine nur drei Positionen auseinander und befinden sich entweder zu Beginn (GABAAT, STORICI *et al.*, 1999b) oder kurz nach (mCBS, MEIER *et al.*, 2001) der kofaktorphosphatstabilisierenden  $\alpha$ -Helix der zentralen Domäne. Bei DAPDC ist die Cystinbrücke intermolekular zwischen beiden Monomeren ausgebildet und der näher zum C-Terminus gelegene Cysteinrest bindet mit seiner Carbonylgruppe die Kofaktor-OH-Gruppe des Nachbarmonomers (RAY *et al.*, 2002; GOKULAN *et al.*, 2003).

### **4.4.2 Faltungsvergleich mit EGF-ähnlichen Domänen**

Für die Knoblauch-Alliinase wurde bereits auf Sequenzebene eine EGF-ähnliche Domäne vorausgesagt (KÜTTNER, 1999). Die nun vorliegende Kristallstruktur (Abb. 4.4a) bestätigt die Existenz dieser für PLP-Enzyme bislang einmaligen Domäne. Sie umfaßt ca. 47 Aminosäurereste (E13-A59) und reicht teilweise in die N-terminale  $\alpha$ -Helix H1 hinein. Die vorgefundene Disulfidbrückenverknüpfung von „C1-C2, C3-C5, C4-C6“ steht nicht im Einklang mit dem für EGF-Domänen bekannten Cystinmuster von „C1-C3, C2-C4, C5-C6“ (BORK *et al.*, 1996). In einem dreidimensionalen Strukturvergleich mittels des DALI-Internetdienstes (<http://www2.ebi.ac.uk/dali/>; HOLM & SANDER, 1993) wurde das Fragment des Diphtherietoxinrezeptors (Abb. 4.4b, LOUIE *et al.*, 1997), auch heparinbindender EGF-ähnlicher Wach-

## Diskussion

stumsfaktor (HB-EGF) genannt, als die ähnlichste Struktur zur EGF-ähnlichen Domäne der Alliinase (A-EGF) identifiziert. Die mittlere Standardabweichung der  $C_{\alpha}$ -Positionen von HB-EGF und A-EGF beträgt 1,88 Å bei 37 überlagerten  $C_{\alpha}$ -Paaren (Abb. 4.4c). Die beste Übereinstimmung zeigt sich für den Bereich der C-Schleife mit dem zweiten  $\beta$ -Faltblattstrang des zentralen  $\beta$ -Faltblatts sowie dem C-terminalen  $\beta$ -Faltblatt (Abb. 4.4c). Bereits durch höhere Standardabweichungen sind die Kettenabschnitte der A-Schleife gekennzeichnet (Abb. 4.4c). Noch größere Unterschiede sind für die B-Schleifen zu beobachten (Abb. 4.4c). Das zentrale  $\beta$ -Faltblatt ist im HB-EGF länger ausgebildet als in A-EGF (Abb. 4.4a,b). Basierend auf den überlagerten  $C_{\alpha}$ -Positionen von 41 Aminosäureresten ergibt sich eine Sequenzidentität (-ähnlichkeit) des HB-EGF mit A-EGF von 21 (29) %. Neben den vier disulfidverbrückten Cysteinresten (C21, C40, C42 und C51 in Alliinase) sind auch die Aminosäurereste H23, G24, P37, Y45 und G48 (Alliinase-Zählung) konserviert. Mit Position H23 beginnt der erste Strang des zentralen  $\beta$ -Faltblatts, und Y46 liegt im ersten Strang des C-terminalen  $\beta$ -Faltblatts (nicht gezeigt). Durch eine Stapelwechselwirkung ihrer aromatischen Seitenketten tragen die beiden Aminosäurereste zur Stabilisierung der Domäne bei. G24 folgt nach H23 im ersten  $\beta$ -Faltblattstrang; eine Seitenkette würde hier zu Komplikationen mit dem gegenüberliegenden



**Abb. 4.4** *Alliinase-EGF-ähnliche Domäne im Vergleich mit anderen EGF-ähnlichen Domänen.* Proteinrückgratdarstellungen der A-EGF-Domäne (Aminosäurereste 13-59) **(a)**, HB-EGF (Aminosäurereste 107-147; PDB: 1XDT, LOUIE *et al.*, 1997) **(b)** und L-EGF (Aminosäurereste 64-121; PDB: 1KLO, STETEFELD *et al.*, 1996) **(d)** sowie überlagerte  $C_{\alpha}$ -Verläufe der A-EGF-Domäne (violett) und HB-EGF (hellblau) in **(c)**. Disulfidbrücken sind als Kugelstabmodelle der Cystine samt relativer Positionsnummer der beteiligten Cysteinreste wiedergegeben. In **(c)** wird auf die anhand des klassischen EGF-Disulfidmusters entstehenden Schleifen (A: C1-C2, B: C3-C4, C: C5-C6) hingewiesen; nicht-homologe Cystinbrücken sind grün wiedergegeben.

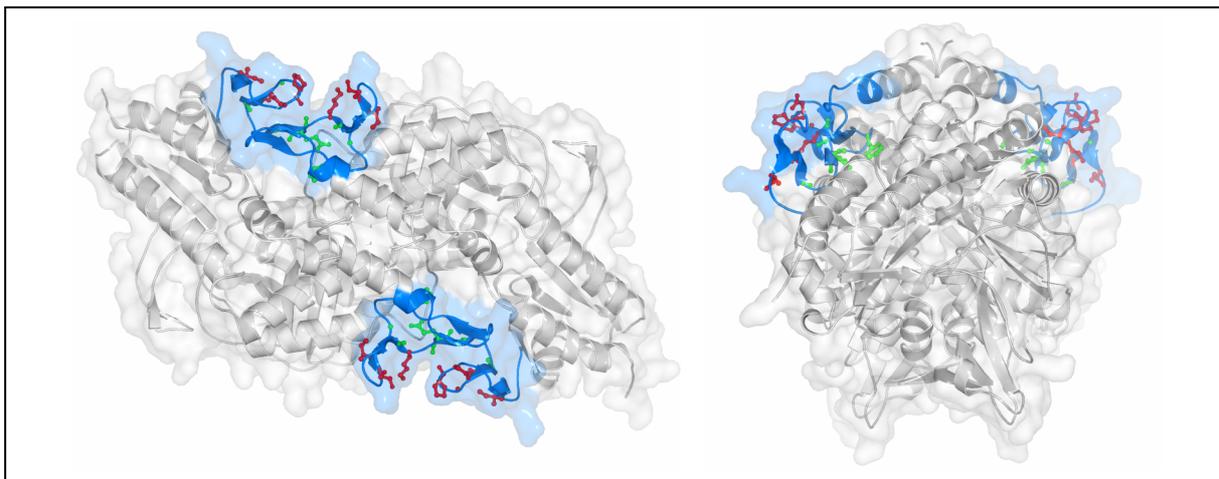
## Diskussion

$\beta$ -Faltblattstrang sowie den beiden zentralen Disulfidbrücken führen (nicht gezeigt). P38 liegt am Ausgang der B-Schleife und G47 in der C-Schleife kurz vor dem vierten konservierten Cystein (C51) (nicht gezeigt). Anhand der gegenübergestellten HB-EGF-Struktur wird deutlich, weshalb die A-EGF-Domäne vom bekannten Disulfidbrückenmuster der EGF-Domänen abweicht. So ist in A-EGF die erste, N-terminale Disulfidbrücke ausgelassen und statt dessen wurde C-terminal eine neue (C44-C51) ausgebildet. Dadurch transformiert sich das Disulfidbrückenmuster von „C1-C3, C2-C4, C5-C6“ nach „C1-C2, C3-C5, C4-C6“, wobei die erste und zweite Cystinbrücke der A-EGF-Domäne äquivalent zur zweiten und dritten des HB-EGF ist (Abb. 4.4c). Die ausgetauschten Cysteinpositionen in Alliinase (V15 und A26) wären räumlich und distanzmäßig in der Lage, auch eine Disulfidbrücke auszubilden, da ihr  $C_{\alpha}$ - $C_{\alpha}$ -Abstand (6,09 Å) fast identisch mit dem entsprechenden der Cysteine in HB-EGF (5,98 Å) ist. Der Verzicht auf Disulfidbrücken innerhalb einer EGF-Domäne ist nicht neu und wurde schon beim Merozoit-Oberflächenprotein-1-Fragment des Malariaerregers *Plasmodium* beschrieben (CHITARRA *et al.*, 1999). Diesem aus zwei EGF-ähnlichen Domänen aufgebauten Protein fehlt es in der ersten Domäne an der zweiten zentralen Disulfidbrücke (entspricht der ersten ausgebildeten Disulfidbrücke in Alliinase), da die beiden Cysteinreste durch ein Val (wie V15 in Alliinase) bzw. Trp ersetzt wurden (CHITARRA *et al.*, 1999). Demzufolge verletzen die EGF-ähnlichen Domänen aus dem Malaria-Merozoit-Oberflächenprotein-1-Fragment und der Alliinase die für EGF-Domänen und Knotine geltende Regel von zwei zentralen, konservierten Disulfidbrücken der T-Knotenfaltung (POLTICELLI *et al.*, 1999). Die neue, C-terminale Disulfidverknüpfung der A-EGF-Domäne erinnert an die vierte, ebenfalls C-terminale Cystinbrücke der EGF-ähnlichen Domäne aus Laminin (Abb. 4.4d; STETEFELD *et al.*, 1996). Allerdings liegt dort der erste Cysteinrest der entsprechenden Disulfidbrücke auf dem zweiten Strang des in EGF-Domänen häufig zu findenden C-terminalen  $\beta$ -Faltblatts (CAMPBELL & BORK, 1993) und nicht auf dem ersten wie in Alliinase (vergleiche Abb. 4.4a,d). Als Folge davon sind die beiden Cysteinreste in der Sequenz von L-EGF nach den drei vorigen Cysteinpaaren (C7-C8 in Bezug auf C1...C6) angeordnet und nicht wie in Alliinase mit einer Position vor und nach dem letzten Cystein eingeschoben. Andere, bislang nur sequenzmäßig bekannte EGF-ähnliche Domänen aus Pflanzenproteinen wurden entweder dem klassischen EGF-ähnlichen (HE *et al.*, 1996; SHIMADA *et al.*, 1997, LAVAL *et al.*, 1999; CAO *et al.*, 2000) oder dem Integrin-Typ (LAVAL *et al.*, 1999) zugeschrieben. Folgerichtig ist die EGF-ähnliche Domäne der Alliinase als ein neuer, fünfter Typ von EGF-Domänen anzusehen.

#### 4.4.3 Funktion der EGF-ähnlichen Domäne

Über den Hintergrund der Notwendigkeit einer EGF-ähnlichen Domäne für das Knoblauchenzym gibt es noch keine gesicherten Erkenntnisse. Mit der Lagerung der Alliinase in Vakuolen (ELLMORE & FELDBERG, 1994) ist der Zusammenhang zu den sezernierten Proteinen (intrazellulär für Alliinase) gegeben, welche nicht selten EGF-Domänen enthalten (FALQUET *et al.*, 2002). EGF-ähnliche Domänen wurden in Pflanzen bei membranständigen Proteinen beschrieben, die als vakuoläre Sortierungsrezeptoren fungieren (SHIMADA *et al.*, 1997; CAO *et al.*, 2000), in den intrazellulären Vesikelverkehr involviert sind (LAVAL *et al.*, 1999) oder nach Pathogeninfektion exprimierte Ser/Thr-Kinasen mit Zellwand-Zellmembran-Verknüpfungsfunktion darstellen (HE *et al.*, 1996). Obwohl es sich bei der Alliinase nicht um ein membranständiges Enzym handelt, sind Zusammenhänge in Bezug auf Vakuoleneinlagerung und Pathogenabwehr erkennbar. Letztere Option wurde bisher allerdings nur auf die alliinfreisetzende Enzymreaktion zurückgeführt (ELLMORE & FELDBERG, 1994; BLOCK, 1992, und Referenzen dort).

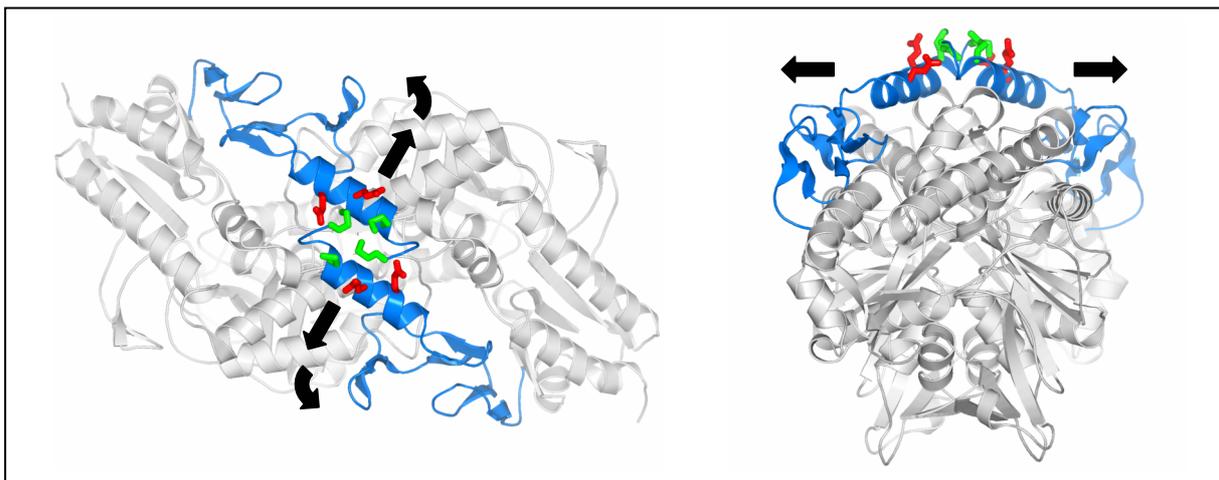
Da EGF-Domänen als Bindungspartner für andere Proteine (CAMPBELL & BORK, 1993) oder Domänen des eigenen Proteins (BEGLOVA *et al.*, 2002; RUDENKO *et al.*, 2002) agieren, ist die Existenz eines möglichen alliinasebindenden Proteins bzw. Rezeptors naheliegend. Auch eine Beteiligung der Domäne bei pharmakologischen Knoblauchwirkungen, die bisher nicht expliziten Inhaltsstoffen zugeordnet wurden, ist nicht ausgeschlossen. Die EGF-ähnliche Domäne der Alliinase weist mit mehr als  $2400 \text{ \AA}^2$  lösungsmittelzugänglicher Oberfläche ausreichend Zutritt für ein hypothetisches Bindeprotein auf (Abb. 4.5), da von biologisch relevanten Protein-Protein-Interaktionen



**Abb. 4.5** Die EGF-ähnliche Domäne als möglicher Interaktionspartner eines alliinasebindenden Proteins. Kombinierte Darstellung des Proteinrückgrats und der molekularen Oberfläche in zwei Ansichten. Die EGF-ähnlichen Domänen sind blau hervorgehoben und die zu HB-EGF strukturäquivalenten, mit Diphtherietoxin interagierenden Aminosäurereiste des HB-EGF-Diphtherietoxinkomplex (LOUIE *et al.*, 1997) sind als Kugelstabmodelle (rot  $> 25 \text{ \AA}^2$ , grün  $< 25 \text{ \AA}^2$  lösungsmittelzugängliche Oberfläche) wiedergegeben.

## Diskussion

bekannt ist, daß sie mehr als  $700 \text{ \AA}^2$  und oft etwa  $1000 \text{ \AA}^2$  Kontaktfläche einbinden (LO CONTE *et al.*, 1999). Die Strukturähnlichkeit zum HB-EGF rechtfertigt die Annahme, daß in der A-EGF-Domäne ähnliche Aminosäurereste den Kontakt mit einem möglichen Bindungspartner bestreiten, wie es zwischen HB-EGF und Diphtherietoxin (LOUIE *et al.*, 1997) der Fall ist. Von den strukturäquivalenten Aminosäurereste der Alliinase sind I32, S33, K38, Y45, G47 (nur Monomer B), P48, D49, I54 mit mehr als  $25 \text{ \AA}^2$  lösungsmittelzugänglicher Oberfläche sehr gut, allerdings F27, G30, P37, C39, E40, C41, C44, G47 (Monomer A) mit  $< 25 \text{ \AA}^2$  lösungsmittelzugänglicher Oberfläche weniger spontan zur Interaktion mit einem Bindeprotein befähigt (Abb. 4.5). Die letzte Gruppe von Aminosäureresten weist in der Alliinase in Richtung Proteininneres und könnte nur durch eine Molekülordnung Lösungsmittelzugänglichkeit erhalten. Die Beweglichkeit der N-terminalen Domänen ist jedoch aufgrund der Fixierung über die beiden H1- $\alpha$ -Helices blockiert. Vorstellbar wäre, daß die beiden Methioninreste 2 und 6 zu Beginn der  $\alpha$ -Helices im extrazellulären Medium oxidiert werden und ihnen eine Redoxregulationsaufgabe bei der Dimerisierung zukommt, wie es am Beispiel des Methioninreißverschluß des Mip-Proteins (RIBOLDI-TUNNICLIFFE *et al.*, 2001) diskutiert wird (VOGEL, persönliche Mitteilung). Unterstützt durch die umgebenden Glutamatreste 10 und 13 würden sich die oxidierten Methioninreste abstoßen und zum Ausscheren der N-terminalen Domäne führen (Abb. 4.6), wodurch auch die zuvor verdeckten A-EGF-Domänenbereiche für ein Bindungsprotein zugänglich wären. Gegen diese N-terminale Domänenbewegung würde das Freiwerden von hydrophoben Proteinbereichen sprechen, die jedoch durch das unbekannte Bindeprotein abgedeckt werden



**Abb. 4.6** Modell der N-terminalen Domänenbewegung nach Oxidation von Met2 und Met6. Proteinrückgratdarstellung der Alliinase mit blau hervorgehobenen N-terminalen Bereichen (Positionen 2-59) sowie M2 und M6 als grüne bzw. E10 und E13 als rote Stabmodelle. Die Pfeile symbolisieren eine hypothetische Ausschermung der N-terminalen  $\alpha$ -Helices samt nachfolgender A-EGF-Domänen aufgrund der Oxidation von M2 sowie M6 und ergebender Abstoßungen untereinander bzw. mit E10 sowie E13.

## Diskussion

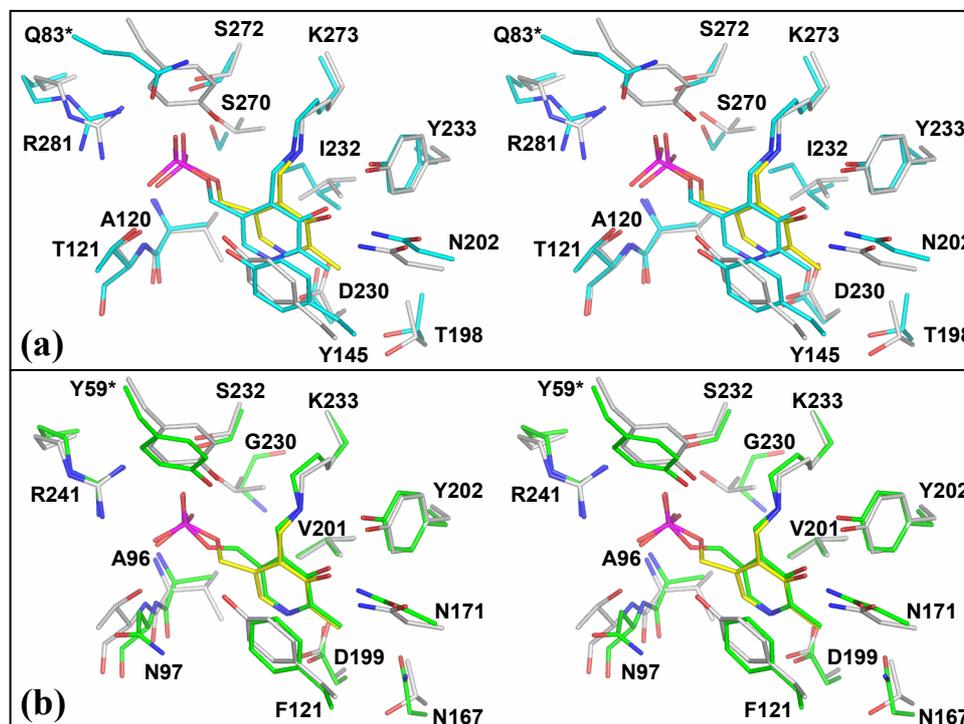
könnten. Die Beobachtung, daß bei 4 °C gelagerte Alliinase, trotz zugesetztem NaCl und Glycerin, nach 2-3 Wochen zur Aggregation neigt, ließe sich durch besagte, exponierte hydrophobe Proteinoberflächen erklären. Die Interaktionen zwischen HB-EGF und Diphtherietoxin (LOUIE *et al.*, 1997) oder TGF $\alpha$  bzw. EGF und dem EGF-Rezeptor (GARRETT *et al.*, 2002; OGISO *et al.*, 2002) beruhen neben den Wechselwirkungen des Rezeptors mit Hauptkettencarbonylsauerstoffen auch auf spezifischen Seitenketten zur Erkennung der EGF-Domäne durch den Rezeptor. Sowohl EGF, TGF $\alpha$  und HB-EGF als auch mehr als zehn mitogene Peptide sind in der Lage, an den EGF-Rezeptor zu binden (siehe Referenzen in GROENEN *et al.*, 1994). Sie weisen neben den drei Disulfidbrücken auch zwei Glycine (erstes Gly = zwei Positionen vor dem dritten Cys-Rest, entspricht G24 in Alliinase vor zweitem Cys-Rest; zweites Gly = drei Positionen vor sechstem Cys-Rest, entspricht G47 in Alliinase vor fünften Cys-Rest) und ein Arginin (eine Position vor dem sechstem Cys-Rest, entspricht D55 in Alliinase) als konservierte Aminosäuren auf (GARRETT *et al.*, 2002). Darüber hinaus erwies sich in den Komplexstrukturen des EGF-Rezeptors mit TGF $\alpha$  (GARRETT *et al.*, 2002) sowie EGF (OGISO *et al.*, 2002) die hydrophobe Aminosäure Leu, fünf Positionen nach dem sechstem Cys-Rest der klassischen EGF-Domäne gelegen, als ebenso notwendig zur effektiven Rezeptorerkennung. In der Alliinase ist das erwähnte Leu durch das polarere Q55 ersetzt. Die genannten Aminosäurereste Arg und Leu des TGF $\alpha$ /EGF werden vom EGF-Rezeptor durch ein invariantes Asp bzw. eine Tasche aus hydrophoben Aminosäureresten erkannt (GARRETT *et al.*, 2002; OGISO *et al.*, 2002). Da in Alliinase das positiv geladene Arg gegen das negativ geladene D55 und das apolare Leu gegen das polarere Q55 ausgetauscht sind, kann geschlußfolgert werden, daß die EGF-ähnliche Domäne der Alliinase aufgrund unvereinbarer Bindungspartner wahrscheinlich nicht an den EGF-Rezeptor binden kann. Demgegenüber besitzt indes der Kartoffel-Carboxypeptidase-Inhibitor, welcher zu den Knotinen gerechnet wird, den kritischen Arginin-Aminosäurerest an der räumlich notwendigen Position (BLANCO-APARICIO *et al.*, 1998) und erklärt auf diese Weise seine Affinität zum EGF-Rezeptor.

### **4.4.4 Kofaktorbindung im Vergleich mit anderen PLP-Enzymen**

Die strukturell am nächsten verwandten Proteine ACCS aus Apfel (CAPITANI *et al.*, 1999) und AroAT aus *Pyrococcus horikoshii* (MATSUI *et al.*, 2000) zeigen große Übereinstimmungen in Bezug auf die mit PLP interagierenden Aminosäurereste. Zu denen in Alliinase gegenüber beiden Enzyme konservierten Positionen zählen D225 (D230 in ACCS bzw. D199 in AroAT), N207 (N202 bzw. N171), Y228 (Y233 bzw. Y202), K251 (K273 bzw.

## Diskussion

K233), R259 (R281 bzw. R241) und S250 (S272 bzw. S232) (Abb. 4.7a,b). Demgegenüber sind nur in ACCS die Aminosäurereste Y165 (Y145 in ACCS) und T133 (T121) (Abb. 4.7a) sowie in AroAT die Positionen V227 (V201) und Y92\* des Nachbarmonomers (Y59\*) (Abb. 4.7b) konserviert. In beiden verwandten PLP-Enzymen ist V132 der Alliinase zu Beginn der PLP-Phosphat-bindenden  $\alpha$ -Helix durch ein Alanin ersetzt (A120 in ACCS bzw. A96 in AroAT, Abb. 4.7a,b). Innerhalb der Aminotransferase-Subklasse I der Faltungsklasse I von PLP-Enzymen (SCHNEIDER *et al.*, 2000) findet sich jedoch ebenso in Cystalysin (KRUPKA *et al.*, 2000) ein Valin (V99) an dieser Stelle wieder. Die mit einem Threonin besetzte Position 248 in Alliinase ist in ACCS bzw. AroAT durch S270 bzw. G230 vertreten (Abb. 4.7a,b). Letztere Aminosäure ist allerdings zu weit entfernt für einen direkten Kontakt zum Kofaktorphosphat, weshalb in AroAT (MATSUI *et al.*, 2000) ein Wassermolekül den entsprechenden Platz der Hydroxylgruppe von T248 in Alliinase bzw. S270 in ACCS (CAPITANI *et al.*, 1999) einnimmt (nicht gezeigt). Der zu Y92\* äquivalente Aminosäurerest Q83\* in ACCS (CAPITANI *et al.*, 1999) erreicht das PLP-Phosphat auch nur über ein Brückenwassermolekül (nicht gezeigt) und verdeutlicht wiederum das Bestreben des Kofaktors, alle verfügbaren Bindungsplätze der „Phosphat-Bindungstasche“ bestmöglich - falls nötig auch mit Wassermolekülen -



**Abb. 4.7** PLP-Bindung im Vergleich mit ACCS und AroAT. Stereostabdarstellungen von überlagerten PLP-bindenden Aminosäureresten sowie PLP von Alliinase (PDB: 1LK9; graue C-Atome, gelbe C-Atome in PLP) mit den äquivalenten Positionen von ACCS aus Apfel (PDB: 1B8G; CAPITANI *et al.*, 1999; hellblaue C-Atome) (a) bzw. AroAT aus *Pyrococcus horikoshii* (PDB: 1DJU, MATSUI *et al.*, 2000; grüne C-Atome) (b). Die Aminosäurereste von ACCS und AroAT sind beschriftet, wobei \* auf das Nachbarmonomer verweist.

## Diskussion

abzudecken (DENESYUK *et al.*, 2002). Nur in der L-Histidinolphosphat-Aminotransferase (HPAT; SIVARAMAN *et al.*, 2001), einem Vertreter der zuvor erwähnten Aminotransferase-Subklasse I (SCHNEIDER *et al.*, 2000), ist die zu T248 (Alliinase) äquivalente Position auch mit einem Threonin (T211) besetzt. In der zum Vergleich herangezogenen substratfreien Struktur von ACCS aus Apfel (CAPITANI *et al.*, 1999) liegen die Aminosäurereste T198 und D230 (entsprechen T203 und D225 in Alliinase) mit ihren Seitenketten  $> 4 \text{ \AA}$  vom Kofaktor entfernt und sind nicht in der Lage, Interaktionen mit diesem einzugehen (Abb. 4.7a). Bei Bindung eines Substratmoleküls und Ausbildung des externen Aldimins kippt der PLP-Ring allerdings mit dem C4A-Atom nach außen und dem N1- sowie C2A-Teil nach innen, worauf D230 und T198 in Kontakt zu PLP gelangen (CAPITANI *et al.*, 2002) und sich eine sehr ähnliche Bindungssituation zu PLP wie in Alliinase einstellt (nicht gezeigt).

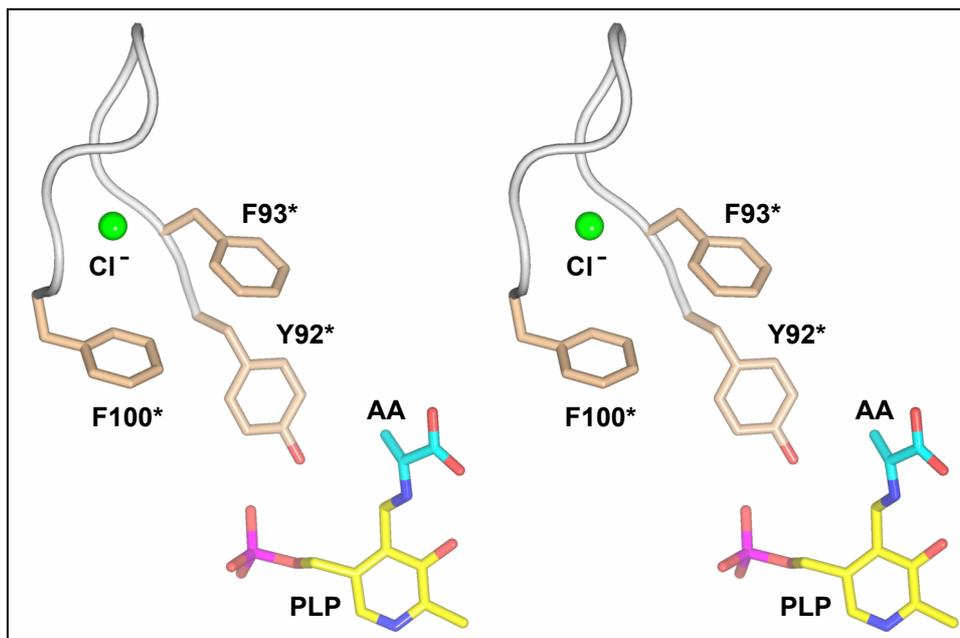
Trotz der um eins weniger konservierten PLP-bindenden Aminosäurereste von AroAT (8 aus 13) gegenüber ACCS (9 aus 13) in Bezug auf Alliinase, ist die dreidimensionale Überlagerung der PLP-bindenden Aminosäurereste von AroAT samt PLP mit der Alliinase leicht besser (Abb. 4.7b,a), wie durch die kleineren Werte der rms-Abweichungen von  $1,06 \text{ \AA}$  bzw.  $1,18 \text{ \AA}$  für AroAT bzw. ACCS mit Alliinase deutlich wird. Dazu wurden jeweils dreizehn  $C_{\alpha}$ -Positionen, zwei Hauptkettenpeptidbereiche (132-133 nach Alliinasezählung) und ein PLP-Molekül überlagert. Demgegenüber erbringt die  $C_{\alpha}/C_{\alpha}$ -Überlagerung der PLP-bindenden Domänen von ACCS (Aminosäuren 85-320; CAPITANI *et al.*, 2002) bzw. AroAT (Aminosäuren 62-284; MATSUI *et al.*, 2000) mit Alliinase ein umgekehrtes Ergebnis, nach dem die rms-Abweichungen  $1,63 \text{ \AA}$  bzw.  $1,74 \text{ \AA}$  bei 162 bzw. 164 überlagerten Aminosäureresten betragen.

### **4.4.5 Funktion der Chlorid-Ionen**

Durch die Bindung eines Chlorid-Ions im Schleifenabschnitt 94-100 werden der N- und C-Terminus dieses Kettenbereichs miteinander verbrückt. Dies führt primär zur nachhaltigen Stabilisierung der Schleifenkonformation mit einer *cis*-Pro-Peptidbindung vor P96. Des weiteren orientiert die Chloridbindungsschleife die drei hydrophoben Aminosäureseitenketten von Y92, F93 und F100 zum aktiven Zentrum des Nachbarmonomers (Abb. 4.8). Die drei Seitenketten kreieren ihrerseits einen zusammenhängenden, lösungsmittelzugänglichen hydrophoben Oberflächenbereich in der Nähe des aktiven Zentrums. Es steht zu vermuten, daß diese Oberfläche maßgeblich an der Bindung der hydrophoben Allylseitenkette des Substrates beteiligt ist (vergleiche Kapitel 4.4.8). Die aus biochemischer Sicht bekannte NaCl-Abhängigkeit der Alliinaseaktivität und -dimerkonstitution (KREST & KEUSGEN, 1999b; KÜTTNER, 1999) wird überzeugend durch das in der Kristallstruktur gefundene Chlorid-Ion

## Diskussion

erklärt. Unter NaCl- bzw. konkret Cl<sup>-</sup>-Mangel kann die Stabilisierung der Schleifenregion 93-100 nicht mehr aufrecht erhalten werden. Der Verlust der Enzymaktivität läßt sich durch die eventuell nicht mehr in vollem Umfang zur Substratbindung rekrutierten hydrophoben Aminosäurereste 92, 93 und 100 erklären, welche jeweils an den vormals fixierten Enden der Schleife liegen. Das Alliinasedimer weist im Bereich der Chloridbindungsschleife wichtige Interaktionspunkte zwischen beiden Monomeren auf, deren Verlust ohne Zweifel auch Auswirkungen auf die Dimerkonstitution haben dürfte. Zu den am Dimeraufbau beteiligten Aminosäuren zählt vor allem N95 innerhalb der Schleife, das eine kurze Wasserstoffbrückenbindung (2,92 Å bzw. 2,81 Å; vergleiche Anhang 7.3, Tab. 7.4) mit seiner Seitenkette zum Hauptkettensauerstoff von C41 des Nachbarmonomers ausbildet. Darüber hinaus sind auch die Positionen S91 und Y92 am N-Terminus der Schleife in Kontakten (2,58 Å bzw. 3,10 Å; vergleiche Anhang 7.3, Tab. 7.4) zur N-terminalen Domäne des Nachbarmonomers verwickelt. Es ist anzunehmen, daß die Destabilisierung des Dimers unter Chloridmangel auch Einfluß auf die Alliinaseaktivität hat und somit beide Effekte in Zusammenhang stehen.



**Abb. 4.8** Rekrutierung hydrophober Aminosäureseitenketten zum benachbarten aktiven Zentrum. Stereodarstellung der Chloridbindungsschleife (graues Proteinrückgrat) mit den Aminosäureseitenketten von Y92\*, F93\* und F100\* (Stabmodelle mit beigefarbenen C-Atomen) und dem Chlorid-Ion (grüne Kugel) aus Monomer A der Kristallform IV sowie des aktiven Zentrums von Monomer B mit dem Kofaktor PLP und gebundenem Inhibitor AA (Stabmodelle mit gelben bzw. hellblauen C-Atomen). Das Symbol \* markiert Positionen aus Monomer A.

Unbeantwortet bleibt die Frage nach der physiologischen Bedeutung der Chloridabhängigkeit von Alliinase. So könnte in einem chloridarmen Milieu die Aktivität gemindert bzw. in einer chloridreichen Umgebung verstärkt werden. Die Bindung von Chlorid-Ionen wurde schon in zwei anderen Fällen bei PLP-Enzymen registriert (BURKHARD *et al.*, 2000; KIELKOPF & BURLEY, 2002). Die zur PLP-Faltungsklasse II zählende OASS bindet das Chlorid-Ion an einer allosterischen Position, welche zwischen beiden Monomeren des Dimers liegt (BURKHARD *et al.*, 2000). Das durch eine Arg- und eine Asn-Seitenkette sowie einen Hauptkettenstickstoff und zwei Wassermoleküle gebundene Chlorid-Ion führt bei der OASS zu einer inhibierten Konformation (BURKHARD *et al.*, 2000). Die Autoren nehmen an, daß vom Chlorid-Ion die mögliche Bindungsstelle des für OASS bekannten physiologischen Inhibitors Sulfid ( $S^{2-}$ ) besetzt wird (BURKHARD *et al.*, 2000). Das zweite Beispiel einer Chloridbindung bei PLP-Enzymen wurde für die Threonin-Aldolase (TA, KIELKOPF & BURLEY, 2002) bekannt, die wie Alliinase zur Faltungsklasse I gehört. Das Chlorid-Ion ist in TA zwischen zwei Monomeren des Tetramers durch zwei äquivalente Hauptkettenstickstoffe sowie zwei Wassermoleküle gebunden und erfüllt quartärstrukturstabilisierende Aufgaben (KIELKOPF & BURLEY, 2002) - ähnlich wie in Alliinase. Die Bindungsstelle in TA befindet sich jedoch in der zentralen Domäne (KIELKOPF & BURLEY, 2002) in der Schleife, welche zur Alliinaseregion zwischen  $\alpha$ -Helix H5 und  $\beta$ -Faltblattstrang S10 analog ist (vergleiche Abb. 3.22b). Einen physiologischen Zusammenhang zur Chloridbindung wissen die Autoren der TA-Struktur jedoch nicht zu berichten und so beschränkt sich ihre Aussage auf den Fakt, daß TA auch in Gegenwart hoher Chloridkonzentrationen ( $> 250 \mu\text{M}$ ) aktiv ist (KIELKOPF & BURLEY, 2002).

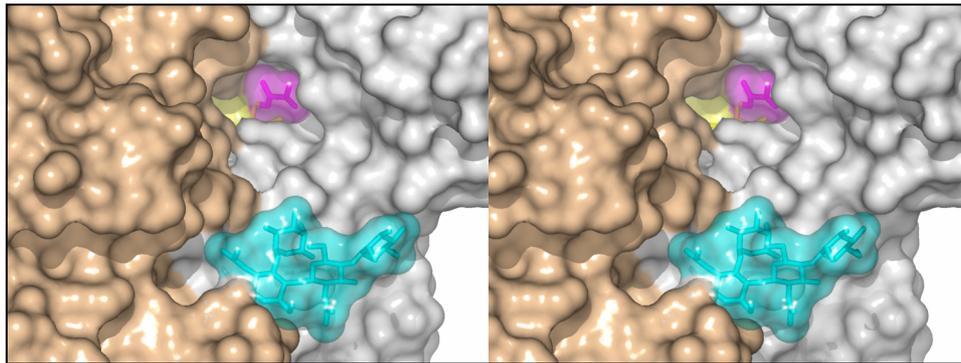
#### **4.4.6 Funktion der Sulfat- und Phosphat-Ionen**

Die insgesamt elf identifizierten Sulfatbindungsstellen in der Struktur von Kristallform IV lassen angesichts der mit über 3 M ungewöhnlich hoch vorliegenden  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration einen eher artifiziellen denn physiologischen Charakter vermuten. Die Bedeutung der Sulfat-Ionen als unterstützendes Moment zur Ausbildung von Kristallkontakte ist hingegen durch die Sulfat-Positionen 3 und 4 belegt (vergleiche Abb. 3.44c,d). In der Kristallform III wird bei Abwesenheit von Sulfat die erste der aus der  $P2_12_12_1$ -Struktur bekannten Sulfatbindungsstellen durch ein unbekanntes tetraedrisches Ion - wahrscheinlich Phosphat - besetzt. Diese Bindungsstelle, gebildet durch den Hauptketten- und Seitenkettenstickstoff von K77 sowie Hauptkettenstickstoff von E78 (vergleiche Abb. 3.44a), läßt die Frage unbeantwortet, ob vielleicht auch 100 mM Sulfat zur Besetzung ausreicht.

#### 4.4.7 Funktion der Zuckerketten

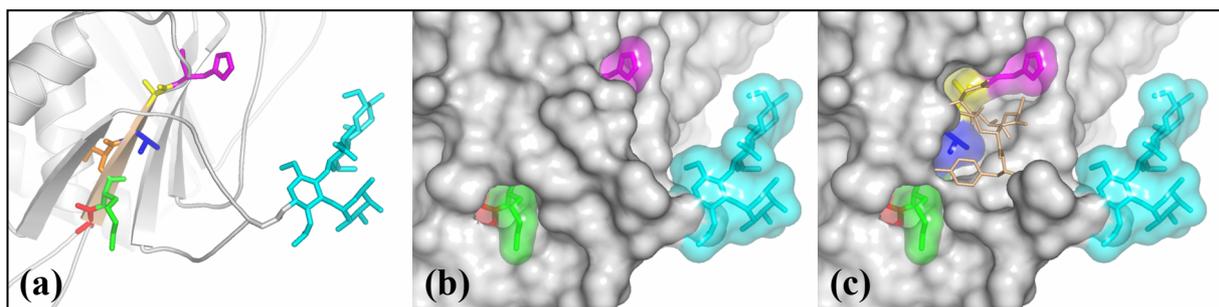
Von den drei unterschiedlichen, in der Kristallstruktur interpretierten Glykosylierungsstellen der Alliinase wurde die Position N146 bereits vorher identifiziert (RABINKOV *et al.*, 1995). Die Zuckerbindungsstellen an N191 und N328 waren zuvor nur bei der Zwiebel-Alliinase beobachtet worden (LANCASTER *et al.*, 2000a). Allerdings vermuteten schon SMEETS *et al.* (1997a) eine 2-3fache Glykosylierung der mit dem Lektin *Allium sativum*-Agglutinin I (ASA-I) interagierenden Alliinase. Nicht auszuschließen, wenngleich aber eher fraglich, ist die Nutzung der vierten möglichen Glykosylierungsstelle N19. Da in Kristallform III die Seitenkette von N19 einen Kristallkontakt ausbildet, würde der mögliche Glykanrest in seiner eventuell flexiblen Konformation stabilisiert und in der Kristallstruktur sichtbar - doch dieses trifft nicht zu (nicht gezeigt). Die unterschiedlich definierte Länge der Glykane geht wahrscheinlich nur auf Kristallpackungsphänomene zurück und spiegelt nicht die reale Konstitution wider. Indiz dafür ist z.B. der N146-Glykanrest der A-Kette, welcher deutlich kürzer als sein Pendant des B-Monomers ausfällt.

Die drei Glykanreste der Alliinase stellen mit Sicherheit die Kontaktstellen zum alliinasebindenden Lektin ASA-I (RABINKOV *et al.*, 1995) dar. Insbesondere der N328-Zuckerrest ist aufgrund seiner vom Enzym fortzeigenden Konformation am besten zur Interaktion mit dem Lektin befähigt. Jedoch wären auch die beiden anderen Glykane an N146 und N191 zugänglich für ASA-I. Die vorhergesagte Ausbildung von hochstabilen Alliinase-ASA-I-Netzwerken (SMEETS *et al.*, 1997a) ließe sich durch die Beteiligung aller drei Zuckerketten räumlich gut erklären. So decken die Glykane verschiedene Molekülseiten der Alliinase ab und das Lektin hält mit zwei bzw. drei Zuckerbindungsstellen (CHANDRA *et al.*, 1999; RAMACHANDRAIAH *et al.*, 2002) ausreichend Interaktionsmöglichkeiten bereit. Neben der ASA-I-Bindung wirkt das N146-Glykan auch strukturstabilisierend auf das Alliinasedimer, wie die intermolekularen Interaktionen beweisen (vergleiche Kapitel 3.6.5.3) und wie es von anderen Proteinen bekannt ist (siehe Referenzen in TAYLOR & DRICKAMER, 2003). Darüber hinaus steht der N146-Zuckerrest am Eingang zum aktiven Zentrum des Nachbarmonomers und hat so Kontrolle auf den Zutritt eingehender Substratmoleküle (Abb. 4.9). Das Glykan könnte bei real größerer Länge und hoher Flexibilität ausgedehntere Oberflächenbereiche abdecken und so zur Modulation der Enzymaktivität führen. Damit würde sich auch eine Erklärung der unterschiedlichen Alliinaseaktivitäten lokaler Knoblauchvarietäten ergeben, welche somit auf die Divergenz der Zuckerketten zurückginge. Eine weitere funktionelle Beteiligung ergibt sich für den Glykanrest an N191. Dieser liegt räumlich sehr nahe zum  $\beta$ -Faltblattstrang S10 mit den Aminosäureresten S156...H161 (Abb. 3.10a), welche von TSCHERNYCHEV *et al.* (2000) als das



**Abb. 4.9** N146-Glykanrest am Eingang des aktiven Zentrums des Nachbarmonomers. Stereodarstellung der molekularen Alliinaseoberfläche (Monomer A in beige, Monomer B in grau) mit hinter transparenter Oberfläche als Stabmodelle verdeutlichtem N146-Glykanrest des Monomers A (hellblau) sowie PLP (gelb) und AA (violett).

Epitop eines menschlichen Alliinase-Antikörpers identifiziert wurde. Diese Autoren vermuteten zwar für den N146-Glykanrest - aufgrund seiner sequentiellen Nähe von nur neun Aminosäuren zu S156 - eine Rolle bei der Antikörperbindung. Doch angesichts der vorliegenden Kristallstruktur ist diese nunmehr der N191-Zuckerkette zuzuweisen und nicht dem auf der epitopabgewandten Molekülseite liegenden N146-Glykan (nicht gezeigt). Das Epitop ist in der nativen Struktur nur unvollständig mit Teilen der Hauptkette von S156 sowie den Seitenketten von K157 und H161 für einen Antikörper zugänglich (Abb. 4.10b). Erst nach Entfernen der den zentralen Bereich des Epitops überlagernden Aminosäurereste N185-Y189 aus der Schleife zwischen den  $\beta$ -Faltblattsträngen S11 und S12 (Abb. 4.10c) könnte der Antikörper auch auf die Positionen V159 und z.T. S160 zugreifen. Es ist allerdings fraglich, inwieweit diese tatsächlich zur Alliinasebindung notwendig sind und nicht Artefakte der verwendeten



**Abb. 4.10** Alliinase-Antikörper-Epitop. (a) Proteinrückgratdarstellung des B-Monomers der Kristallform III mit dem beige hervorgehobenen  $\beta$ -Faltblattstrang S10, welcher das Epitop (Aminosäuren S156...H161 [TSCHERNYCHEV *et al.*, 2000] als verschiedenfarbige Stabmodelle) beinhaltet, sowie dem N191-Glykan (N191 und Glykan als graue bzw. hellblaue Stabmodell). (b) Molekulare Oberfläche der Alliinase, wobei hinter transparenten Bereichen das Antikörper-Epitop und das N191-Glykan als Stabmodelle verdeutlicht sind. (c) Wie zuvor, jedoch unter Auslassung der molekularen Oberfläche der Aminosäuren N185...Y189, welche allerdings als beige Stabmodelle dargestellt wurden.

Phagendisplaymethode mittels Peptidfragmenten (TSCHERNYCHEV *et al.*, 2000) sind, da auch native Alliinase durch den Antikörper erkannt wird (TSCHERNYCHEV *et al.*, 1995). Allerdings könnte in diesem Fall das N191-Glykan selbst an der Antikörper-Interaktion beteiligt sein und zur Bindungsaffinität beitragen.

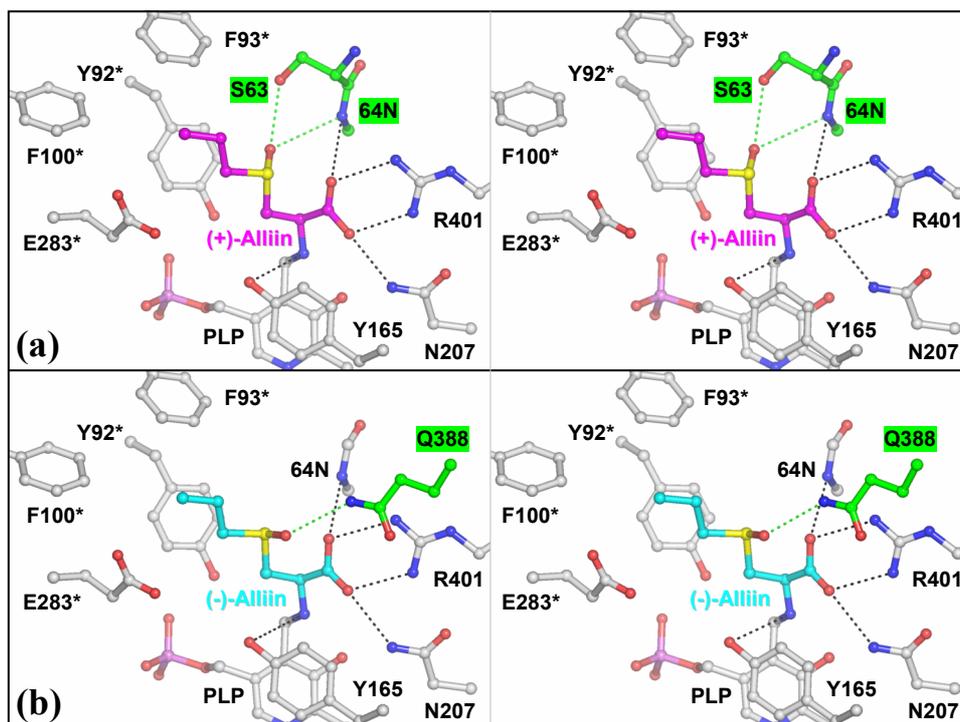
#### **4.4.8 Substratbindungsmodell und Reaktionsmechanismus**

##### **4.4.8.1 Substratbindungsmodell**

Anhand des im aktiven Zentrum gefundenen AA-Moleküls, welches ein Fragment des zur Kristallisation verwendeten Inhibitors S-Ethyl-L-cystein (JANSEN *et al.*, 1989b) darstellt, läßt sich der Bindungsmodus des nativen Substrats Alliin ableiten. Hierbei sind die Positionen der Carboxylgruppe sowie des C $\alpha$ - und N-Atoms von AA feste Ausgangspunkte zur Substratmodellierung mit der allylsubstituierten Cysteinseitenkette als unbekannte Größe. Nach kovalenter Bindung des Substrates mit seiner Aminogruppe in Form einer Schiff'schen Base an das C4A-Atom des Kofaktors (Abb. 4.11a,b) kommt es zur Ausbildung des externen Aldimins (BRAUNSTEIN & GORYACHENKOVA, 1984). Die wichtigste nicht-kovalente Substratwechselwirkung in PLP-Enzymen stellt die Salzbrücke zwischen der Substrat-Carboxyleinheit und der Guanidinogruppe eines invarianten Argininrests dar (JOHN, 1995), wie sie mit R401 in Alliinase verwirklicht ist (Abb. 4.11a,b; Abstände jeweils 2,94 Å bzw. 2,74 Å). Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung (3,09 Å) zur Carboxylgruppe des Alliins steuert der Hauptkettenstickstoff von G64 bei (Abb. 4.11), wie auch schon mit A54 bzw. A46 eines Inhibitor-Komplexes von ACCS aus Tomate (HUI *et al.*, 2001) bzw. Apfel (CAPITANI *et al.*, 2002, 2003b) gezeigt wurde. Ein zusätzlicher Kontakt mit der Alliin-Carboxylgruppe wird in Alliinase durch die Seitenkette von N207 (2,93 Å) realisiert (Abb. 4.11a,b). Auch von dieser Interaktion wurde bereits in der Komplexstruktur von inhibierter Apfel-ACCS mit dem Äquivalent N202 bei gleicher Länge der Wasserstoffbrückenbindung (2,93 Å) berichtet (CAPITANI *et al.*, 2002). Die Substrat-Aminogruppe wird zusätzlich durch eine schwache Wasserstoffbrückenbindung (3,49 Å) zu Y165 stabilisiert (Abb. 4.11a,b), die bei Apfel-ACCS im Komplex mit einem Substratanalogon noch kürzer (2,88 Å) zum äquivalenten Aminosäurerest Y145 ausfällt (CAPITANI *et al.*, 2003b). Eine ausgestreckte Konformation des Alliin-Moleküls ist aufgrund der Sulfoxidfunktion der Seitenkette sehr unwahrscheinlich. In der *trans*-Konformation der O<sub>2</sub>C-C $\alpha$ -C $\beta$ -S $\gamma$ -Einheit würde der Sauerstoff am S $\gamma$  sowohl zu sterischen Überschneidungen mit Y165 als auch elektrostatischen Abstoßungen mit der PLP-Phosphatgruppe sowie mit E283\* des Nachbarmonomers führen (nicht gezeigt). Statt dessen wäre in der partiell überdeckt stehenden Konformation ( $\angle$  O<sub>2</sub>C-C $\alpha$ -C $\beta$ -S $\gamma$  = 45°, Abb. 4.11a,b) die räumliche Komplikation

## Diskussion

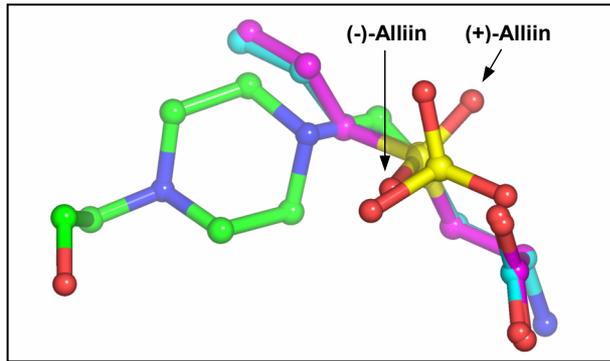
mit Y165 verhindert und das Sulfoxid mindestens 5,6 Å bzw. 7 Å weit von der E283\*-Carboxyl- bzw. PLP-Phosphatgruppe entfernt (E283\*: 5,8 Å / 6,0 Å bzw. 5,6 Å / 6,3 Å für (+/-)-Alliin; PLP-O2P: 7,0 Å / 8,1 Å (+/-)-Alliin). Eine dem E283\* entsprechende Position existiert in den nahverwandten Enzymen ACCS (CAPITANI *et al.*, 1999; HUAI *et al.*, 2001) und AroAT (MATSUI *et al.*, 2000) nicht. Allerdings befindet sich in HPAT (SIVARAMAN *et al.*, 2001) und Adenosylmethionin-8-amino-7-oxononoat-Aminotransferase (AMAONAT; ALEXEEV *et al.*, nur in der Proteindatenbank unter 1DTY publiziert) mit D85 bzw. D147 ein Aspartat des gleichen Monomers auf räumlich ähnlicher Position, doch erfüllt dieses keine substratabstoßende Funktion. Von HPAT ist bekannt, daß D85 die positive Histidinseitenkette des Substrates bindet (SIVARAMAN *et al.*, 2001), bei AMAONAT steht indes noch eine Bestätigung für die Substraterkennung durch D147 aus. Bedingt durch die umgeklappte Konformation des Alliins, interagiert die Allylseitenkette mit einem von den Aminosäureresten Y92\*, F93\* und F100\* des Nachbarmonomers gebildeten, hydrophoben Oberflächenbereich (Abb. 4.11a,b). Unterstützung erhält das Modell durch die Beobachtung, daß die S-Alk(en)yl-L-cysteine mit zunehmender Länge der hydrophoben Seitenkette (Methyl > Ethyl > Propyl > t-Butyl) stärker die Alliinasereaktion hemmen (JANSEN *et al.*, 1989b) und somit die Nutzung eines hydrophoben



**Abb. 4.11** *Substratbindungs-Modell.* Stereodarstellung in Kugelstabmodellweise des aktiven Zentrums von Monomer B (Kristallform IV) mit modelliertem (+)-Alliin- (a) bzw. (-)-Alliin-Molekül (b). Standard-Wasserstoffbrückenbindungen des Alliins zu umgebenden Aminosäureresten sind durch gepunktete Linien verdeutlicht. Die für die Erkennung des chiralen Sulfoxids des Alliins verantwortlichen Aminosäurereste sind mit ihren C-Atomen, Interaktionen sowie Beschriftungen grün hervorgehoben.

## Diskussion

Bindungsbereiches seitens der Alliinase implizieren. Die Orientierung der Seitenketten von Y92\*, F93\* und F100\* wird durch die Bindung eines Chlorid-Ions gewährleistet, welches eine physiologische Bedeutung der Aminosäurereste unterstreicht. Unter NaCl-Mangel sinkt die Alliinaseaktivität ab (KREST & KEUSGEN, 1999b), und es steht zu vermuten, daß dieses Ausdruck für die unzureichend ausgebildete hydrophobe Bindungsoberfläche für den Allylrest aufgrund des fehlenden stabilisierenden Chlorid-Ions ist. In Cystalysin existiert mit entsprechend Y64\*, L17 und F273\* auch ein hydrophober Oberflächenbereich (KRUPKA *et al.*, 2000), von dem aber noch nicht im Hinblick auf Substratbindung berichtet wurde. Die zwei verschiedenen Alliin-Isomere mit (+)- bzw. (-)-Konfiguration am Sulfoxid werden im Bindungsmodell durch jeweils andere Aminosäuren stereospezifisch erkannt. Das (+)-Isomer steht mit seinem Schwefelsauerstoff in Wasserstoffbrückenbindungen zu der Seitenkette von S63 (2,88 Å) und dem Hauptkettenstickstoff von G64 (3,36 Å) (Abb. 4.11a). Demgegenüber ist das Sulfoxid des (-)-Alliins lediglich durch eine schwache Wechselwirkung (3,57 Å) mit Q388 gekennzeichnet (Abb. 4.11b). Aus der stärkeren Bindung des (+)-Isomers könnte sich die etwa vier- bis fünfmal höhere Reaktionsgeschwindigkeit der Alliinase gegenüber (+)-Alliin (KREST & KEUSGEN, 1999a) erklären. Die für die (+)-Konfiguration selektive Aminosäure S63 ist auch in anderen C-S-Lyasen wiederzufinden: In Cystathionin- $\gamma$ -Synthasen mit S326 (CLAUSEN *et al.*, 1998) bzw. S388 (STEEGBORN *et al.*, 1999), in Cystathionin- $\beta$ -Lyasen (CBL) mit S339 (CLAUSEN *et al.*, 1996) bzw. S405 (BREITINGER *et al.*, 2001) und in Methionin- $\gamma$ -Lyase (MGL) mit S340 (MOTOSHIMA *et al.*, 2000) liegt das S63 nur räumlich, in MalY mit S36 (CLAUSEN *et al.*, 2000a) auch sequentiell, wenngleich eine Position weiter, konserviert vor. Bei den PLP-Enzymen ACCS (Apfel) und AroAT ist das Serin durch die hydrophoben Aminosäuren V45 (CAPITANI *et al.*, 1999) bzw. I36 (MATSUI *et al.*, 2000) ausgetauscht. Der für die Bindung des (-)-Alliin verantwortliche Aminosäurerest Q388 ist in keinem der PLP-Enzyme aus Klasse I als Glutamin konserviert. Jedoch finden sich für diese Position in HPAT mit R362 (SIVARAMAN *et al.*, 2001) sowie in Phosphoserin-Aminotransferase mit H328 (HESTER *et al.*, 1999) auch Aminosäuren mit ähnlich distanzüberbrückenden Seitenketten, die zudem eine Wasserstoffbrückenbindung mittels NH-Funktion ausbilden können. Für die strukturnächsten Enzyme AroAT und ACCS (Apfel) ist diese Möglichkeit mit V348 (MATSUI *et al.*, 2000) bzw. S393 (CAPITANI *et al.*, 1999) nicht oder sehr eingeschränkt gegeben. Das vorgestellte Bindungsmodell mit der Lokalisierung des Sulfoxidsauerstoffs fernab der PLP-Phosphatgruppe und E283\* wird durch den Bindungsmodus des HEPES-Moleküls bekräftigt. Dessen Sulfonylgruppe zeigt strukturelle Ähnlichkeit zum Sulfoxid-Racemat des Alliins (Abb. 4.12).

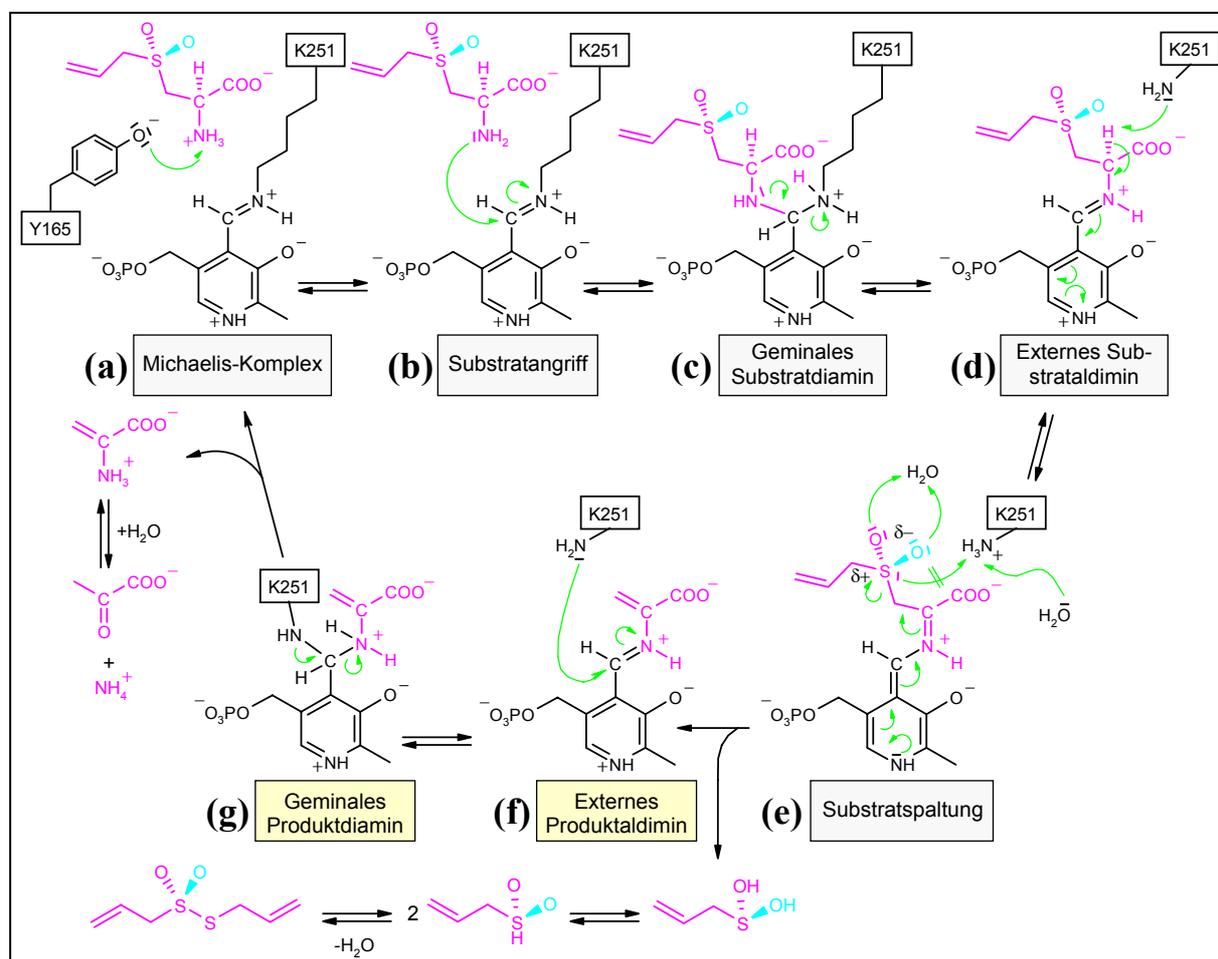


**Abb. 4.12** *Substrat-Sulfoxid-Ähnlichkeit von HEPES.* Kugelstabsdarstellung von HEPES (grüne C-Atome) mit überlagertem Modellssubstrat ((+)-Alliin mit violetten und (-)-Alliin mit hellblauen C-Atomen). Der zum jeweiligen Alliin-Isomer zugehörige Sulfoxidsauerstoff ist mit einem Pfeil markiert.

#### 4.4.8.2 Reaktionsmechanismus

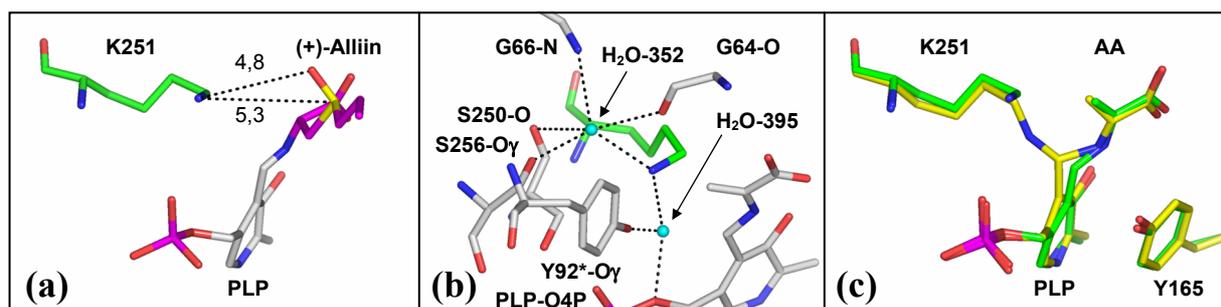
Nach Bindung von Alliin liegt dessen Aminogruppe wahrscheinlich noch protoniert vor, weil das pH-Optimum von Alliinase bei pH 6,5 (RABINKOV *et al.*, 1994) liegt. In diesem Zustand ist allerdings kein freies Elektronenpaar an der Aminogruppe verfügbar, wie es zum nukleophilen Angriff auf die Schiff'sche Base des internen Kofaktor-K251-Aldimins nötig ist. Es bedarf daher eines Partners zur Protonenabstraktion von der Alliin-Aminogruppe. In dieser Funktion sehen MESSERSCHMIDT *et al.* (2003) bei einer Reihe von Ihnen strukturell aufgeklärten C-S-Lyasen (siehe Referenzen in MESSERSCHMIDT *et al.*, 2003) den mit dem Kofaktor in Stapelwechselwirkung stehenden Tyrosinrest. Analog würde in Alliinase die Aminogruppe des Alliins durch Y165 deprotoniert (Abb. 4.13a). Das Vorliegen von Y165 als Phenolat-Anion könnte durch den positiven Helixdipol von  $\alpha$ -Helix H5 (166-174), trotz des neutralen pH-Wertes, begünstigt sein. Zur Herabsetzung des pK-Wertes der phenolischen OH-Gruppe des Tyrosins könnte auch die Stapelwechselwirkung mit dem Kofaktor beitragen. Nach dem Angriff der Aminogruppe des Alliins (Abb. 4.13b) kommt es zunächst zur Ausbildung eines geminalen Substratdiamins (Abb. 4.13c). Diese Form eines geminalen Substratdiamins wurde bereits in den Kristallstrukturen der ebenso zur PLP-Enzymklasse I gehörenden HPAT (SIVARAMAN *et al.*, 2001) und der Serin-Hydroxymethyltransferasen aus Kaninchen (SCARSDALE *et al.*, 1999) und Maus (SZEKENYI *et al.*, 2000) gefunden. Mit der Ausbildung des nun externen Aldimins ist der Kofaktor nicht mehr kovalent an die Alliinase gebunden (Abb. 4.13d). Die freiwerdende Seitenkette von K251 greift nun das  $C_{\alpha}$ -Proton des Alliins nukleophil an und führt mit der Abstraktion des Protons zum Entstehen eines chinoiden Zwischenzustandes (Abb. 4.13e). An diesem Punkt im Reaktionsverlauf kommt die spezifische Alliinasereaktivität zum Tragen. In anderen C-S-Lyasen überträgt der mit dem  $C_{\alpha}$ -Substratproton beladene, sonst kofaktorbindende Lysinrest (K251 in Alliinase) ein Proton auf das Schwefelatom des Substrates und leitet die C-S-Bindungsspaltung ein (MESSERSCHMIDT *et al.*, 2003; und Referenzen darin). Aufgrund der charakteristischen

Substratbindung in Alliinase läge das  $N\zeta$ -Atom von K251 im Falle eines externen Aldimins mit mindestens 4,8 Å bzw. 5,3 Å (Abb. 4.14a) zu weit entfernt, um die Protonenübertragung auszuführen. Im übrigen ist die Nukleophilie des Schwefels im Sulfoxid durch den elektronegativeren Sauerstoff geschwächt und seine Partialladung dadurch außerdem positiv (Abb. 4.13e). Vielmehr fungiert der Sulfoxidsauerstoff selbst mit seiner negativen Partialladung als Protonenakzeptor, wobei ein Wassermolekül des Lösungsmittels als Protonenlieferant geeignet erscheint (Abb. 4.13e). Erwähnt sei an dieser Stelle, daß in Kristallform IV an der Sulfonylgruppe des zum Substratmodell ähnlich bindenden HEPES-Molekül ein solches Wassermolekül in der Elektronendichte zu beobachten war (vergleiche Abb. 3.33). Allerdings bleibt nach diesem Reaktionsschritt K251 protonenbeladen zurück und wirft damit ein Problem für die bevorstehende Wiederausbildung der Schiff'schen Base zum Kofaktor auf, weil für diese ein freies Elektronenpaar am Ly-



**Abb. 4.13** Vorhergesagte Alliinase-Reaktion. Die möglichen Schritte (a-g) sind in Strichform dargestellt. Dabei wurden das Substrat und daraus abgeleitete Verbindungen farblich hervorgehoben (violett, (+)-Alliin), wobei für das (-)-Konformer nur der Sulfoxidsauerstoff (hellblau) wiedergegeben ist. Hellgelb unterlegte Reaktionsschritte sind durch Kristallstrukturen belegt. Grüne Pfeile markieren nukleophile Angriffe. Die Zeichnung ist Abb. 3 zur C-S-Lyase Cystalysin (KRUPKA *et al.*, 2000) nachempfunden.

sin benötigt wird. In den Kristallstrukturen beider Alliinase-Kristallformen ist oberhalb der Seitenkette von K251 ein Wassermolekül (H<sub>2</sub>O-352) und zusätzlich in Monomer A von Kristallform III auch ein Wassermolekül hinter den Kofaktor (H<sub>2</sub>O-395) in der Alliinase eingeschlossen (Abb. 4.14b; vergleiche Abb. 3.46a). Beide Wassermoleküle sind in Monomer A von Kristallform III mit Abständen von 2,71 Å (H<sub>2</sub>O-352) bzw. 2,83 Å (H<sub>2</sub>O-395) in ausgezeichneter Zugriffsmöglichkeit durch das N $\zeta$ -Atom von K251 (Abb. 4.14b) und könnten das überzählige Proton von K251 übernehmen. Eine Beteiligung von H<sub>2</sub>O-395 ist wahrscheinlicher, da ein positives Hydronium-Ion durch das nahegelegene Kofaktorphosphat besser abgeschirmt wäre als H<sub>2</sub>O-352 oberhalb der K251-Alkylkette durch Wasserstoffbrücken mit zwei Hauptkettensauerstoffen, einer Serin-OH-Gruppe sowie einem Hauptkettenstickstoff (Abb. 4.14b). Für den nächsten Reaktionsschritt müßte das gebildete Hydronium-Ion ausgestoßen werden, da seine Position wieder der K251-Seitenkette vorbehalten wäre. Durch die Nichtverfügbarkeit des kofaktorbindenden Lysins für die Protonenübertragung auf den Schwefel im Substrat würde sich die Hemmung der Alliinase durch S-Alk(en)yl-L-cysteine (STOLL & SEEBECK, 1949) erklären. Bei diesen erfolgt zwar eine Bindung über die hydrophobe Alk(en)ylseitenkette an die hydrophobe Oberfläche (Y92\*, F93\*, F100\*) im aktiven Zentrum der Alliinase, wie die mit der Kettenlänge ansteigende Inhibitionswirkung (JANSEN *et al.*, 1989b) verdeutlicht. Der nichtoxidierte Schwefel ist jedoch nicht ausreichend nukleophil, um einem Wassermolekül des Lösungsmittels das Proton zu entreißen. Zumindest verläuft diese Reaktion bei Bindung eines Deoxo-Derivats sehr viel langsamer ab, wie die in der Kristallstruktur der Alliinase beobachtete Substratspaltung nahelegt. Das Prinzip der Alliinase zur Verhinderung einer sonst bei C-S-Lyasen typischen



**Abb. 4.14** Externes Produktaldimin und geminales Produktdiamin der Kristallform III. (a) Substratmodell von (+)-Alliin mit PLP und K251 aus Monomer A mit möglichen Abständen (gestrichelt, Einheit Å) der K251-Aminogruppe zum Schwefel-/Sauerstoffatom der Sulfoxidgruppe. (b) Wassermoleküle (H<sub>2</sub>O-395, H<sub>2</sub>O-352; hellblaue Kugeln) in Wasserstoffbrückenbindungsreichweite (< 3,5 Å) zur Aminogruppe von K251 (grüne C-Atome) in Monomer A mit Bindungspartnern (graue C-Atome, \* = Nachbarmonomer, gestrichelte Interaktionslinien). (c) Überlagerung von externem Produktaldimin (Monomer A, grüne C-Atome) mit geminalem Produktdiamin (Monomer B, gelbe C-Atome) bei dargestelltem Kofaktor PLP sowie Intermediat AA und Aminosäureresten K251 und Y165.

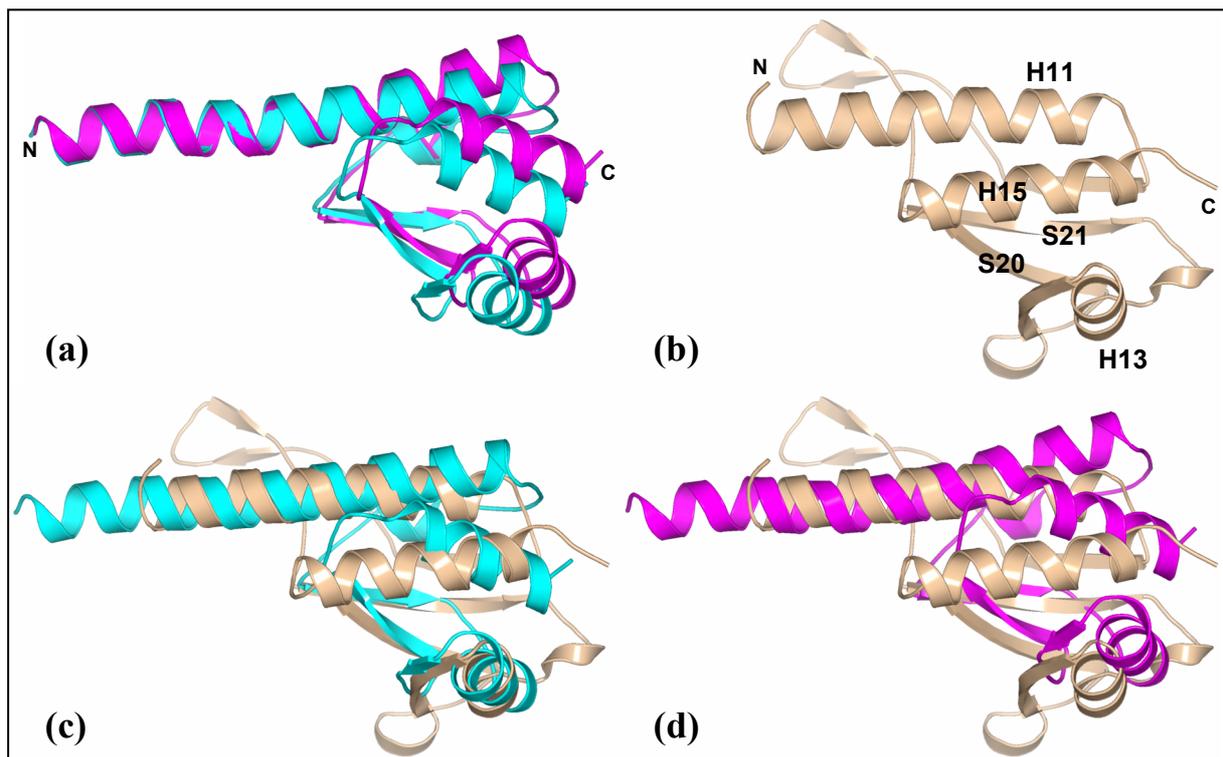
## Diskussion

Hauptreaktion und damit der Begünstigung einer möglichen Nebenreaktion erinnert an das Reaktionsmuster der C-S-Lyase CsdB. Dieses Enzym spaltet bevorzugt Selenocystein gegenüber Cystein (siehe Referenzen in MIHARA *et al.*, 2002). Im aktiven Zentrum von CsdB wird einem Cysteinrest, welcher in Cysteinlyasen dieser Gruppe für die Spaltung verantwortlich ist, der Zugriff auf das Substrat verwehrt (MIHARA *et al.*, 2002). Somit wird der Hauptreaktionsweg über das Substrat Cystein blockiert und nur das Selenocystein kann aufgrund seiner höheren Instabilität auch ohne besagten Cysteinrest gespalten werden (MIHARA *et al.*, 2002). In Alliinase wird analog die klassische Rolle des sonst kofaktorbindenden K251 blockiert und die Cysteinsulfoxide erscheinen ihrer Reaktivität wegen ähnlich zum Selenocystein. Nach Spaltung der C<sub>β</sub>-S-Bindung verbleibt AA als externes Produktaldimin am Kofaktor gebunden zurück (Abb. 4.13f). In der Kristallstruktur von Form III ist diese Reaktionsstufe in Monomer A festgehalten (vergleiche Abb. 3.46a). Das freigesetzte Allylsulfensäure-Molekül kondensiert außerhalb des aktiven Zentrums mit anderen Molekülen gleichen Typs zu Allicin weiter (Abb. 4.13). Im nächsten Reaktionsschritt wird die Vollendung eines Alliinasezyklus vorbereitet. Dafür attackiert die mit einem freien Elektronenpaar ausgestattete Seitenkette von K251 das C4A-Atom des Kofaktors und bildet zunächst ein geminales Produktdiamin aus (Abb. 4.13g). Im Vergleich von externem Aldimin und geminalem Diamin zeigt sich eine Kippung des PLP-Rings um ca. 15° (graphisch visuelle Messung) zur Lösungsmittelseite hin, wobei der mit dem Kofaktor in Stapelwechselwirkung stehende Aminosäurerest Y165 in seiner Orientierung kaum verändert ist (Abb. 4.14c). Auch in der ACCS beobachteten CAPITANI *et al.* (2002) eine PLP-Ringkipfung von ca. 16°. Allerdings handelte es sich dort um den Übergang von internem zu externem Aldimin, und der PLP-Ring führte eine Translation von ca. 1,1 Å hin zum konservierten Asp-Rest 230 (D225 in Alliinase) aus, welcher erst dadurch eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem N1-Pyridiniumstickstoff des Kofaktors ausbilden konnte (CAPITANI *et al.*, 2002). In Alliinase wird die relative Lage des Kofaktors zu D225 jedoch nicht signifikant geändert, infolge dessen sind auch die N1-Ringpositionen der beiden Kofaktorzustände identisch (Abb. 4.14c), und die starke Wasserstoffbrücke zu D225 ist mit ca. 2,6 Å Länge stets präsent (nicht gezeigt). Ein geminales Produktdiamin wurde bisher in keiner anderen Kristallstruktur eines PLP-Enzyms bestätigt, doch in Alliinase findet sich in Kristallform III und IV mit Monomer B diese instabile Zwischenstufe wieder. Es ist nicht ersichtlich, weshalb die Alliinasereaktion im Kristall auf dieser Stufe angehalten wurde. Möglicherweise bedarf es für den abschließenden Schritt der Ausbildung des anfänglichen internen Aldimins (Abb. 4.13a) einer räumlichen Reorganisation, welche durch Interaktionen innerhalb des Kristallgitters blockiert ist. Schließlich wird das geminale Substratdiamin zugun-

sten des internen Aldimins aufgelöst, und es diffundiert ein AA-Molekül vom aktiven Zentrum ab, das wahrscheinlich außerhalb zu Pyruvat und Ammonium hydrolysiert wird (Abb. 4.13).

#### 4.4.9 „Offene“ oder „geschlossene“ Konformation?

Die PLP-abhängigen Enzyme der Faltungsklasse I gehen bei Substratbindung von einer vormals „offenen“ (ohne Substrat) zu einer „geschlossenen“ (mit Substrat) Konformation über, wie zuerst an AAT gezeigt wurde (MCPHALEN *et al.*, 1992a,b). Dabei verändert sich die Orientierung der C-terminalen Domäne (Abb. 4.15a) in Bezug auf die zentrale, PLP-bindende Domäne: Die C-terminale Domäne führt eine Schließbewegung in Richtung der zentralen Domäne aus, wobei im Falle der AAT aus Schweinemitochondrien der resultierende Winkelschluß bis zu 13° beträgt (MCPHALEN *et al.* 1992b). Durch den Vergleich der „offenen“ bzw. „geschlossenen“ Konformation der Schweinemitochondrien-AAT (Abb. 4.15a; MCPHALEN *et al.* 1992a,b) mit Alliinase können Rückschlüsse über den Konformationsstatus des Knoblauchenzym gezogen werden. Bei vorheriger Überlagerung der zentralen Domänen von Alliinase und AAT



**Abb. 4.15** „Offen/Geschlossen“-Strukturvergleich von Alliinase mit AAT. Proteinrückgratdarstellungen der C-terminalen Domänen der überlagerten „offenen“ (violett; PDB: 7AAT; MCPHALEN, *et al.*, 1992a) und „geschlossenen“ (hellblau; PDB: 1AMA; MCPHALEN, *et al.*, 1992b) Konformation von Schweinemitochondrien-AAT (Aminosäurereste 313-410) in (a), der Alliinase (Kristallform III, Monomer A, Aminosäurereste 310-425) in (b) sowie der jeweils mit der „geschlossen“- bzw. „offen“-AAT-Form (hellblau bzw. violett) überlagerten Alliinase (beige) in (c) bzw. (d). In (a)+(b) sind die Termini der Moleküle sowie in (b) ferner die im Text erwähnten Sekundärstrukturelemente der Alliinase beschriftet.

## Diskussion

läßt sich die C-terminale Domäne der Alliinase (Abb. 4.15b) in beiden Kristallformen (III + IV) am besten mit der „geschlossen“-Konformation der AAT überlagern, wie die höheren Winkelrotationswerte für die „offen“-Form belegen (Tab. 4.1). Besonders auffällig wird die konformationelle Ähnlichkeit von Alliinase zur „geschlossen“-Form von AAT mit den  $\alpha$ -Helices H11, H13 und H15 sowie den  $\beta$ -Faltblattsträngen S20 und S21 (vergleiche Abb. 4.15b,c), die in der „offenen“ Konformation der AAT signifikant verschoben sind (vergleiche Abb. 4.15b,d). Das Vorliegen der „geschlossenen“ Alliinasestruktur kann durch die im aktiven Zentrum gebundenen Inhibitormoleküle AA und HEPES erklärt werden. Dabei fällt auf, daß in Kristallform IV das A-Monomer etwas schlechter mit der „geschlossen“-Form von AAT zur Deckung gebracht werden kann, ausgedrückt durch einen leicht größeren Rotationswinkel (Tab. 4.1). Als mögliche Ursache wäre das fehlende AA-Molekül im aktiven Zentrum des A-Monomers der P<sub>2</sub><sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>-Kristallform anzusehen, welches im B-Monomer sowie den beiden Untereinheiten der P<sub>2</sub><sub>1</sub>-Kristallform dagegen vorgefunden wurde. Aus den fast identischen Winkelabweichungen von Monomer B der Kristallform IV und beider Monomere der Form III gegenüber der „geschlossenen“ Konformation der AAT (Tab. 4.1) ergibt sich die Schlußfolgerung, daß in Alliinase hauptsächlich das gebundene AA zur Ausbildung der „geschlossen“-Form verantwortlich ist. Das Monomer A der P<sub>2</sub><sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>-Kristallform verlor wahrscheinlich infolge der geringeren Anzahl von Kristallkontakten und somit größeren Beweglichkeit (höhere Temperaturfaktoren) nach der Kristallisation das metastabile AA-Molekül, wobei sich die C-terminale Domäne wieder etwas von der zentralen Domäne fortbewegen konnte, jedoch durch die übrigen Kristallkontakte in der noch „geschlossen“-Konformation arretiert wurde. Die durch eine höhere Anzahl von Kristallkontakten und geringere Beweglichkeit (niedrigere Temperaturfaktoren) geprägten Monomere B von Kristallform IV bzw. A und B von Kristallform III behielten das Spaltprodukt AA hingegen bei und somit auch die leicht bessere konformationelle Ähnlichkeit zur „geschlossenen“ Konformation der AAT. Die

**Tab. 4.1** Winkelabweichungen der Alliinase-Kristallformen III, IV zur „offenen“ und „geschlossenen“ Konformation von AAT.

	„offen“-AAT	„geschl.“-AAT	Form III-Mon.B	Form IV-Mon.A
Alli. III-Mon.A	14,0°	7,0°	1,2°	-
Alli. III-Mon.B	12,8°	7,2°	-	-
Alli. IV-Mon.A	12,6°	9,2°	-	1,2°
Alli. IV-Mon.B	13,2°	7,6°	-	-
„offen“-AAT	-	12,8°	-	-

weniger „geschlossene“ Konformation des A-Monomers aus Kristallform IV geht einher mit der größeren Anzahl von zwischen zentraler und C-terminaler Domäne gelegenen, oberflächenfernen Wassermolekülen. Es ist vorstellbar, daß diese im Proteininneren an der Domänenübergangszone gefundenen Wassermolekülaggregate in der „offen“-Konformation aufgebaut und in der „geschlossen“-Konformation z.T. aufgelöst werden. Ihnen fiel die Funktion einer räumlichen Pufferzone zu, welche je nach Konformationszustand mit der notwendigen Anzahl verborgener, strukturstabilisierender Wassermoleküle (TAKANO *et al.*, 2003 sowie Referenzen darin) angefüllt wäre.

#### 4.4.10 Ursachen der Dihedralwinkelabweichungen

Die in Alliinase beobachteten Abweichungen der Dihedralwinkel von standardmäßigen  $\phi, \psi$ - (noch erlaubte Gebiete im RAMACHANDRAN-Plot) oder  $\omega$ -Winkeln ( $> 3 \sigma$  bzw.  $11,2^\circ$  Differenz zu *trans/cis*) bzw. das Auftreten von *cis*Pro anstelle von *trans*Pro lassen sich fast alle auf strukturelle Gegebenheiten derselben Aminosäure oder seiner Vorgänger/Nachfolgerpositionen zurückführen (Anhang 7.6, Tab. 7.11). So sind R89, Y92, F93, P96 bzw. P163, P208, H232, T234, Y363, W365, T387 (von denen P96, P163 und P208 in *cis* vorliegen) an Interaktionen zwischen den Monomeren eines Dimers bzw. zwischen der N-terminalen/zentralen bzw. C-terminalen Domäne beteiligt. Sie gewährleisten auf diese Weise die Stabilität des Dimers bzw. sind mitbestimmend für den „offen/geschlossen“-Zustand des Monomers. R213 in Monomer B könnte aufgrund zweier Kristallkontakte seiner Seitenkette zur Veränderung des Peptidbindungswinkels veranlaßt worden sein. Allerdings gibt es auch eine Interaktion seines Hauptkettenstickstoffatoms mit S204. Im weiteren besitzen Y92 und T387 ungewöhnliche  $\omega$ -Winkel, die sich mit der Notwendigkeit zur bestmöglichen Bindung des Kofaktors bzw. des Substrates durch den Aminosäurerest selbst (Y92) oder seines Nachbarn (T387 $\rightarrow$ Q388) erklären lassen. Die *cis*-Konformation von P96 läßt sich anhand einer Bindungsfunktion der Schleife 94-100 für Chlorid-Ionen ableiten.

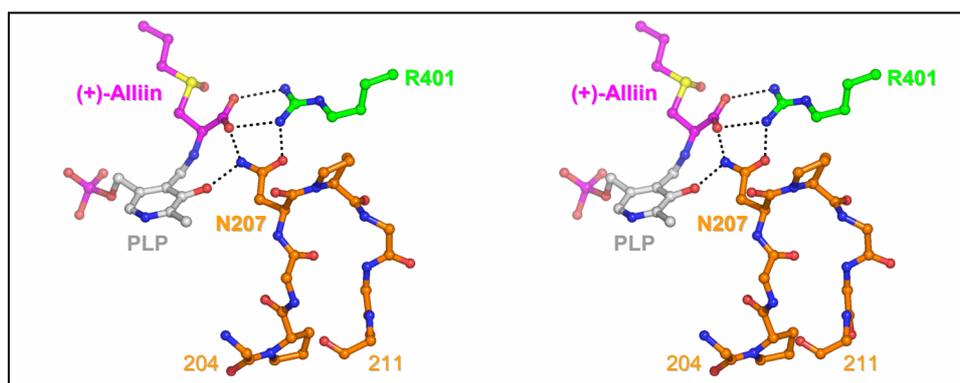
#### 4.4.11 Bedeutung der „angespannten“ Schleife S204 $\rightarrow$ L211

Dieser an der Übergangszone von zentraler und C-terminaler Domäne gelegene, torsional „angespannte“ Schleifenbereich weist dihedrale Peptidbindungswinkel auf, die teilweise mehr als fünf Standardabweichungen vom planaren Zustand abweichen. Neben den Wasserstoffbrückenbindungen der Seitenkette von P207 mit dem Kofaktor und dem möglichen Substrat (Abb. 4.16) besteht für *cis*P208 zudem ein van-der-Waals-Kontakt zu *cis*P163. Die Aminosäure P163, gelegen zwischen dem  $\beta$ -Faltblattstrang S10 und der  $\alpha$ -Helix H6 (nicht

## Diskussion

gezeigt), ist ferner an Kontakten mit Aminosäureresten der C-terminalen Domäne (vergleiche Kapitel 4.4.10) beteiligt. In Anbetracht dieser Interaktionen läßt sich schlußfolgern, daß die „angespannte“ Schleife Einfluß auf die Konformationsänderung („offen/geschlossen“) während des Reaktionszyklus ausübt. Das A-Monomer der Alliinase weist etwas geringere Werte der  $\omega$ -Winkelabweichungen auf als das B-Monomer (Anhang 7.7, Tab. 7.12). Unter der Annahme, daß Monomer B eine stärker „geschlossene“ Konformation darstelle als Monomer A, würde sich ableiten, daß sich der tatsächliche „offene“ Konformationszustand der Alliinase durch geringere  $\omega$ -Winkelabweichungen von der Norm ausgezeichnet. Bei Substratbindung ginge die Alliinase in den „geschlossen“-Zustand über, wobei dieser in der Schleife S204→L211 zu torsionaler Spannung mit ungewöhnlichen  $\omega$ -Winkeln führen würde. Nach Substratspaltung und Diffusion der Endprodukte aus dem aktiven Zentrum würde die „angespannte“ Schleife mit der in den abnormen  $\omega$ -Winkeln gespeicherten Energie als ein treibendes Moment zur Erlangung der „offenen“-Konformationszustands dienen.

Die P<sub>21</sub>-Kristallstruktur der Alliinase ist durch geringere  $\omega$ -Winkelabweichungen in der „angespannten“ Schleife charakterisiert. Zudem zeigt das B-Monomer leicht höhere Normdifferenzwerte als das A-Monomer (Anhang 7.7, Tab. 7.12), obwohl es keine Unterschiede in Bezug der Ähnlichkeit zum „offenen“ oder „geschlossenen“ Konformationszustand der AAT gibt. Höhere  $\omega$ -Winkelabweichungen scheinen demzufolge nicht zwingend mit einem „geschlossenen“ Status der Alliinase verbunden zu sein. Die geringen  $\omega$ -Differenzen der Kristallform III zum Typ IV lassen sich durch ein stringenteres Strukturverfeinerungsregime erklären, das von einer geringeren Wichtung der experimentellen Daten (Faktor = 0,25 anstatt 0,6) ausging und



**Abb. 4.16** „Angespannte“ Schleife S204→L211. Stereodarstellung von S204→L211, PLP, (+)-Alliin und R401 als Kugelstabmodelle. In der „angespannten“ Schleife sind zur besseren Übersichtlichkeit nur P205, N207 sowie P208 mit ihren Seitenketten wiedergegeben. Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen (+)-Alliin, R401, PLP und N207 sind als schwarze Punktlinien verdeutlicht.

## Diskussion

daher die  $\omega$ -Winkel stärker mit 0 bzw. 180° fixierte. Ein Vergleich mit anderen anderen PLP-Enzymen ergab, daß die „angespannte“ Schleife auch in weiteren Vertretern der Faltungsklasse I anzutreffen ist. Meist sind die Abweichungen der  $\omega$ -Winkel jedoch weniger stark ausgeprägt und zwischen den Enzymen ist keine eindeutige Abhängigkeit von der Auflösung oder dem verwendeten Verfeinerungsprogramm erkennbar (Anhang 7.7, Tab. 7.12). Die beiden Proline P205 und P208 aus Alliinase finden sich in äquivalenter Weise auch bei der AroAT aus *Pyrococcus horikoshii* (MATSUI *et al.*, 2000), der Tyrosin-Aminotransferase (TAT) aus *Trypanosoma cruzi* (BLANKENFELDT *et al.*, 1999), der HPAT aus *Escherichia coli* (SIVARAMAN *et al.*, 2001), der AAT aus *Thermus thermophilus*, *Pyrococcus horikoshii* und *Phormidium lapideum* (NAKAI *et al.*, 1999; URA *et al.*, 2001; KIM *et al.*, nur PDB: 1J32), dem Cystalytin aus *Treponema denticola* (KRUPKA *et al.*, 2000), der Threonin-3-phosphat-Decarboxylase aus *Salmonella enteria* (CHEONG *et al.*, 2002), der ACCS aus Apfel und Tomate (CAPITANI *et al.*, 1999; HUAI *et al.*, 2001), der CBL aus *Arabidopsis thaliana* (BREITINGER *et al.*, 2001), der MGL aus *Pseudomonas putida* (MOTOSHIMA *et al.*, 2000), der Cystathionin- $\gamma$ -Synthase (CGS) aus *Escherichia coli* und Tabak (CLAUSEN *et al.*, 1998; STEEGBORN *et al.*, 1999) sowie der Cystathionin- $\gamma$ -Lyase (CGL) aus Bäckerhefe (MESSERSCHMIDT *et al.*, 2003) wieder. Nur im Falle der CGL (MESSERSCHMIDT *et al.*, 2003) bzw. der MGL (PDB: 1GC0; zwei der vier Monomere; MOTOSHIMA *et al.*, 2000) tritt das erste bzw. das zweite Prolin (P205 bzw. P208 in Alliinase) nicht in der *cis*- sondern der *trans*-Konformation auf (Anhang 7.7, Tab. 7.12). Jeweils nur ein Prolin ist dagegen in den betreffenden Schleifen der PLP-Enzyme AAT aus Huhn, Schwein, Bäckerhefe und *Escherichia coli* (MCPHALEN *et al.*, 1992a; MALASHKEVICH *et al.*, 1995; RHEE *et al.*, 1997; JEFFEREY *et al.*, 1998; OKAMOTO *et al.*, 1994), CBL aus *Escherichia coli* (CLAUSEN *et al.*, 1996), AroAT aus *Paracoccus denitrificans* (OKAMOTO *et al.*, 1998) sowie TAT aus *Escherichia coli* (KO *et al.*, 1999) wiederzufinden, welches stets nach einer *cis*-Peptidbindung folgt (Anhang 7.7, Tab. 7.12). Mit Ausnahme von CBL (CLAUSEN *et al.*, 1996) handelt es sich um das zweite, P208 in Alliinase entsprechende Prolin (Anhang 7.7, Tab. 7.12). Interessanterweise bilden die Tyrosin-Phenol-Lyase aus *Citrobacter freundii* (ANTSON *et al.*, 1993) und die Tryptophanase aus *Proteus vulgaris* (ISUPOV *et al.*, 1998) eine nicht-Prolin-*cis*-Peptidbindung vor der Aminosäureposition aus (Anhang 7.7, Tab. 7.12), welche P205 in Alliinase gleichkommt. Hervorzuheben mit ähnlich hohen  $\omega$ -Winkelabweichungen in der „angespannten“ Schleife wie die Alliinase ist die strukturell am nächsten verwandte AroAT aus *Pyrococcus horikoshii* (MATSUI *et al.*, 2000). Dort weichen das zweite *cis*Pro schon bis zu 19° sowie fünf weitere Peptidbindungen mit 10° und mehr von

der Planarität ab (Anhang 7.7, Tab. 7.12). In der AAT aus *Escherichia coli* gibt es in der „geschlossenen“ Konformation (PDB: 1ART; OKAMOTO *et al.*, 1994) mit  $\omega = 22^\circ$  für die Peptidbindung vor P195 (entspricht P208 in Alliinase) einen um mehr als  $10^\circ$  höheren Wert gegenüber der „offenen“ Konformation (PDB: 1ARS; OKAMOTO *et al.*, 1994) (Anhang 7.7, Tab. 7.12) und belegt so die Annahme größeren torsionalen Stresses in der „angespannten“ Schleife der „geschlossenen“ Enzymform. Demgegenüber ist aber zu erwähnen, daß die Kristallstrukturen von AAT des Schweins den umgekehrten Effekt verdeutlichen. Hier zeigt die „offene“ Konformation leicht größere, bei höherer Auflösung zunehmende  $\omega$ -Winkelabweichungen von  $2^\circ$  bzw.  $7^\circ$  gegenüber der „geschlossenen“ für die betreffende Peptidbindung (RHEE *et al.*, 1997) (Anhang 7.7, Tab. 7.12).

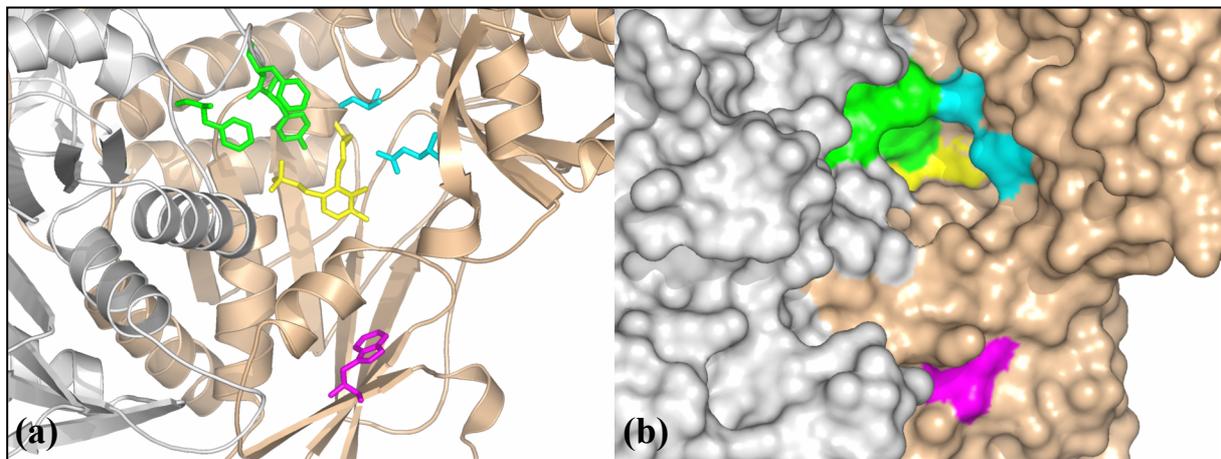
Anhand kristallographischer Mutationsstudien an AAT aus *Escherichia coli* konnte gezeigt werden, daß von den *cis*-Peptidbindungen vor P138 und P195 (entsprechen P163 und P208 in Alliinase) nur P195 bei Austausch gegen Alanin in der *cis*-Konformation verbleibt (BIROLO *et al.*, 1999). Ferner hat die Mutation P195A auch Einfluß auf das „offen/geschlossen“-Gleichgewicht und verschiebt es in Richtung der „offenen“ Konformation (BIROLO *et al.*, 1999). Diese Erkenntnisse unterstützen die Hypothese von einem durch die „angespannte“ Schleife dirigierte Mechanismus zur Kontrolle der „offen/geschlossen“-Konformation.

#### **4.5 Einfluß von W182 auf die Enzymreaktion?**

Für die Aminosäure W182 sagten JIN *et al.* (2001) eine Beteiligung im aktiven Zentrum bzw. der Substratbindungsstelle voraus. Dieser Vorschlag ist angesichts der nunmehr bekannten Alliinase-Raumstruktur jedoch als äußerst fraglich anzusehen. So liegt W182 mindestens  $11,5 \text{ \AA}$  vom Kofaktor, mehr als  $17,6 \text{ \AA}$  vom nächsten Aminosäurerest (Y92\*) der hydrophoben Substratbindungsstelle sowie wenigstens  $19,4 \text{ \AA}$  bzw.  $14,2 \text{ \AA}$  von den Substratspezifität gebenden Aminosäuren S63 und Q388 entfernt (Abb. 4.17). JIN *et al.* (2001) modifizierten die Tryptophane mittels des Reagens N-Bromosuccinimid (NBS). Sie glaubten durch den Vergleich der Trp-Modifikationen nach 20 Sekunden NBS-Einwirkung mit bzw. ohne Zugabe des Alliinase-Inhibitors SEC und 8-sekündiger NBS-Inkubation ohne SEC-Zusatz W182 zweifelsfrei als Aminosäurerest des aktiven Zentrums identifiziert zu haben. Ihre Schlußfolgerung aus dem 8-Sekunden-Experiment ging davon aus, daß die nach 7 Sekunden NBS-Zugabe (ohne SEC) vollständig inhibierte Alliinaseaktivität einzig auf die Modifikation von Trp-Resten zurückzuführen sei. Jedoch wird auch eingeräumt, daß NBS auch SEC oxidativ modifizieren kann (JIN *et al.*, 2001). Somit könnte der im 20-Sekunden-Experiment unter

## Diskussion

SEC-Anwesenheit vorgespiegelte Modifikationsschutz von W182 ein Artefakt sein, welcher im 500fach molaren Überschuß von SEC zur Alliinase gegenüber dem nur 300fach molaren Überschuß von NBS zur Alliinase zu suchen ist. Die von JIN *et al.* (2001) eingeräumte Möglichkeit der Oxidation von SEC durch NBS zum Alliinasesubstrat SEC-Sulfoxid (SECS) übersieht den Fakt, daß dadurch NBS nur noch unzureichend zur Trp-Modifikation zur Verfügung steht. Eine Spaltung von SECS durch Alliinase und der folglich aufgehobene Schutz für Aminosäurereste im aktiven Zentrum spielt dabei keine Rolle mehr. Im abschließenden 8-Sekunden-Experiment ohne SEC-Zusatz wurde W182 modifiziert und daraufhin fälschlich als ein Aminosäurerest des aktiven Zentrums bezeichnet, der nun oberflächenzugänglich ist (JIN *et al.*, 2001).



**Abb. 4.17** W182 in Relation zum aktiven Zentrum. (a) Darstellung von W182 (violett), der Aminosäurereste der hydrophoben Substratbindungsstelle (Y92\*, F93\* und F100\*; \* = Nachbarmonomer; grün), der für die Stereoselektivität verantwortlichen Aminosäurereste S63 und Q388 (hellblau) sowie dem internen Kofaktoraldimin (gelb) als Stabmodelle zusammen mit einer Wiedergabe des Proteinrückgrats der Alliinase (A-Kette = grau, B-Kette = beige). (b) Wie zuvor, jedoch als Darstellung der molekularen Oberfläche.

### 4.6 Mutagenesevorschläge zur Veränderung der Alliinasespezifität

Das Ziel einer modifizierten Substratspezifität für Alliinase könnte mit verschiedenen Ansätzen verfolgt werden: So bildet zunächst die (+/-)-Selektivität des Sulfoxides den offensichtlichsten Startpunkt (Tab. 4.2 → Ia,b). Daran reiht sich die Aufhebung der Sulfoxidbeschränkung und die Akzeptanz von z.B. S-Allyl-L-cystein als Alliinasesubstrat (Tab. 4.2 → II). Des weiteren bietet die molekulare Erkennung der hydrophoben Alk(en)yl-Seitenkette Raum für weitere Mutageneseversuche (Tab. 4.2 → III). Letztendlich ließe sich durch zusätzlich ausgebildete intramolekulare Wechselwirkungen der Chlorid-Bindungsschleife die Cl<sup>-</sup>-Abhängigkeit der Alliinase aufheben bzw. zumindest dämpfen (Tab 4.2 → IV).

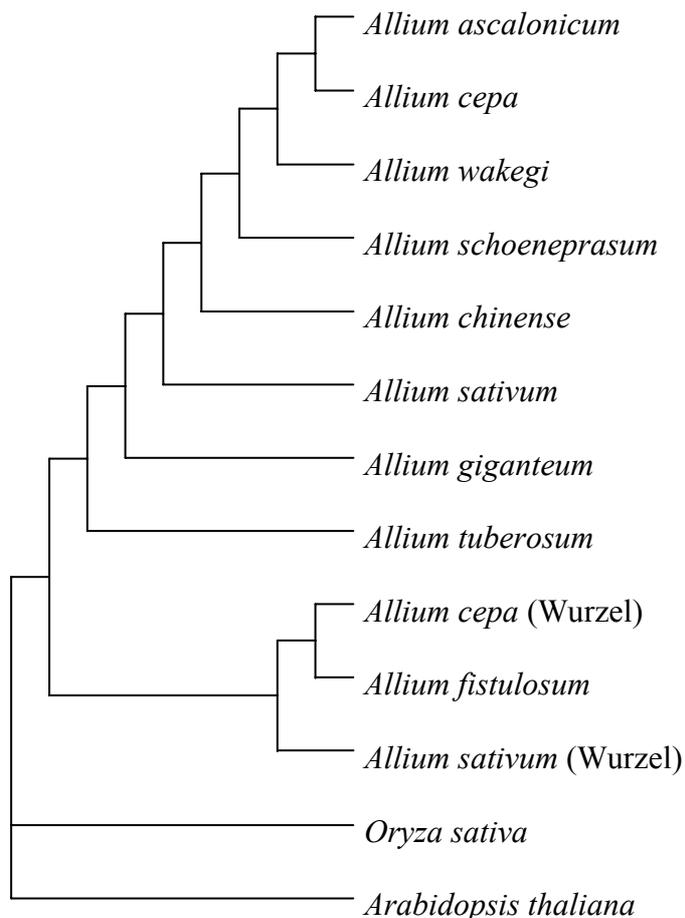
**Tab. 4.2** Mutagenesekonzepte zur Veränderung der Alliinase-Substratspezifität.

ursprüngliche Aminosäure	neue Aminosäure	Effekt
<b>Ia. Verbesserung der (+)-Alliin-Selektivität</b>		
Q388	N,G	Schwächung (größerer Abstand) [N] bzw. kompletter Ausfall [G] der H-Brücke zu (-)-Alliin
S63	T	Zusätzliche hydrophobe Kontaktfläche für Alliin-Allylkette
F93	Y	Stabilisiert S63 (mögliche H-Brücke: Y93-OH zu S63-O $\gamma$ )
<b>Ib. Verbesserung der (-)-Alliin-Selektivität</b>		
Q388	H,K,R	Sukzessive Stärkung (positive Aminosäureseitenkette, kürzere Distanz) [H $\rightarrow$ K $\rightarrow$ R] der H-Brücke zu (+)-Alliin
S63	A,G	Starke Schwächung (statt OH $\cdots$ O-Interaktion nur van-der-Waals-Interaktion der Form CH $\cdots$ O) [A] bzw. Wegfall [G] der H-Brücke zu (+)-Alliin
F393	Y,H	Stabilisiert Q388 (mögliche H-Brücke: Y393-OH bzw. H393-N $\epsilon$ 2 zu Q388-O $\epsilon$ 1)
<b>II. Aufhebung der Sulfoxidspezifität</b>		
E283	D,G	Weniger intensive Sulfoxidabstoßung (größerer Abstand) [D] bzw. völlige Freigabe der sterischen Behinderung des Sulfoxids [G]
Y92	Q <sup>a</sup>	Veränderung der hydrophoben zu einer mehr hydrophilen Substratbindungsfläche, wodurch S-Alk(en)yl-L-cysteine nicht mehr in umgeklappter Konformation binden und nun durch K251-Protonentransfer gespalten werden können
F93	S,D	
F100	S,D	
<b>III. Veränderung der Spezifität für hydrophobe Substratseitenketten</b>		
Y92	Q <sup>a</sup> ,K,R	Einführung polarer [S], negativer [D,E] oder positiver [H,K,R] Aminosäureseitenketten zur Erkennung von Substraten mit hydrophilen Seitenbereichen (z.B. Bindung und Spaltung von Cystathionin)
F93	S,D,E,H,K,R	
F100	S,D,E,H,K,R	
<b>IV. Kompensation der Cl<sup>-</sup>-Anhängigkeit</b>		
F93,V97	C,C	Einführung einer intra-molekularen Disulfidbrücke in der Chloridbindungsschleife
V275	H	H-Brücke bzw. van-der-Waals-Kontakt zu N99-O bzw. N99-C $\beta$
G106	R	Ausbildung einer H-Brücke mit S98-O

<sup>a</sup> = In ACCS ist der zu Y92 der Alliinase äquivalente Aminosäurerest durch Q ersetzt (CAPITANI *et al.*, 1999; HUAI *et al.*, 2001) und über ein Brückenwassermolekül noch zur PLP-Phosphatbindung befähigt.

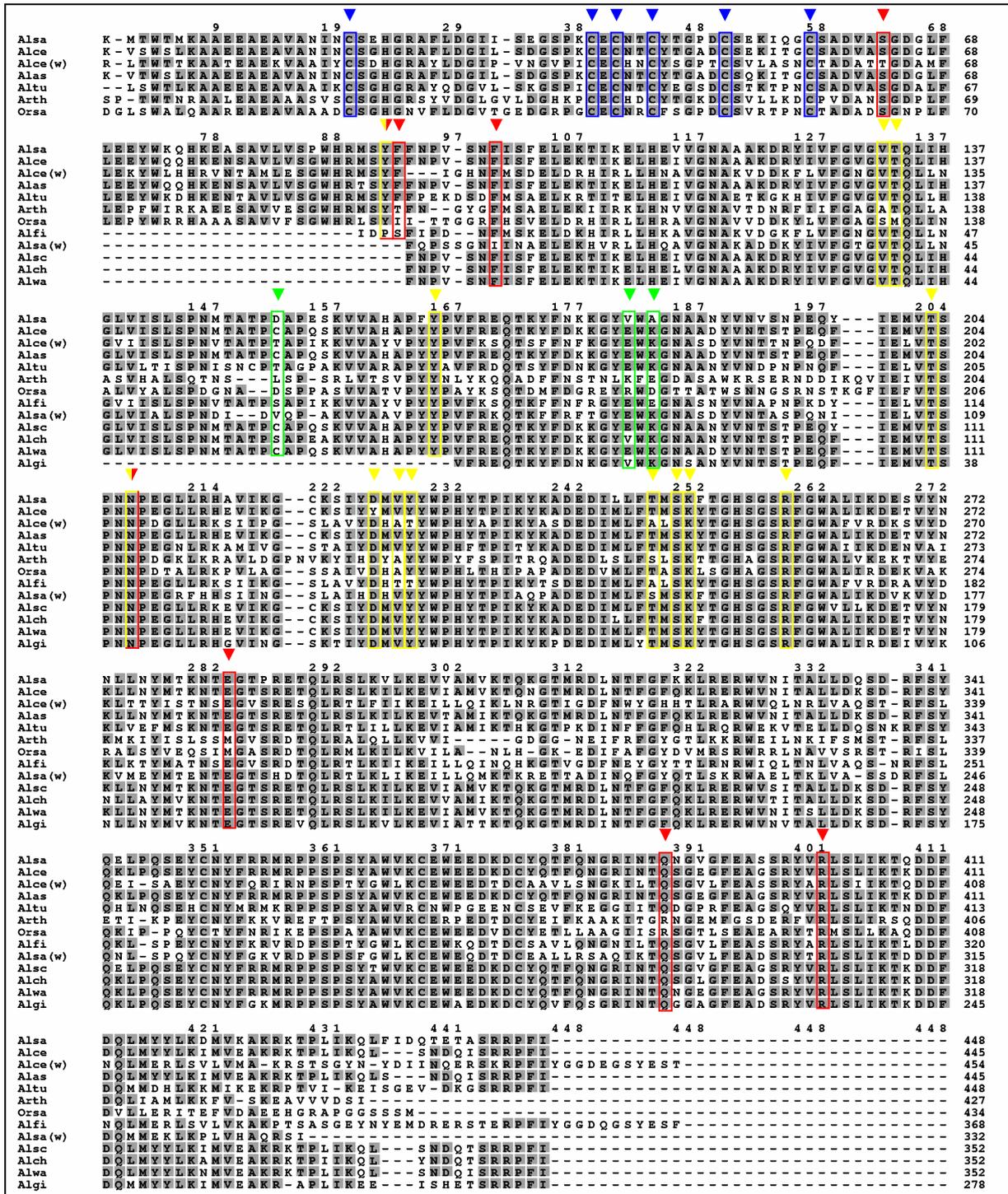
#### 4.7 Sequenzvergleich Alliinasen

Die bislang zumindest in der Primärstruktur bekannten Alliinasen sind zueinander homolog, wie die Sequenzidentitäten von 45 % bis über 99 % belegen (Anhang 7.8, Tab. 7.13). Die Enzyme aus *Oryza sativa* (Reis) und *Arabidopsis thaliana* sind zueinander und mit den *Allium*-Alliinasen am wenigsten verwandt (Abb. 4.18), wie maximale Sequenzidentitäten von 52 % dokumentieren (Anhang 7.8, Tab. 7.13). Unter den *Allium*-Alliinasen liegt die sequentielle Identität bei mindestens 55 % (Anhang 7.8, Tab. 7.13). Es fällt auf, daß innerhalb der Enzyme aus *Allium*-Pflanzen die Vertreter aus *A. fistulosum*, *A. cepa* (Wurzel) und *A. sativum* (Wurzel) eine von den übrigen der Gattung abgetrennte Gruppe darstellen (Abb. 4.18). Die Verwandtschaft zwischen den Wurzelenzymen von *A. sativum* und *A. cepa* ist nachvollziehbar, hingegen ist die Zuordnung von *A. fistulosum* überraschend und läßt vermuten, daß Wurzelmaterial bei der Isolierung zum Einsatz kam. Bei den verbleibenden *Allium*-Alliinasen nimmt der Verwandtschaftsgrad von *A. tuberosum* ausgehend zu *A. giganteum* über *A. sativum*, *A. chinense*, *A. schoenoprasum*, *A. wakegi*, *A. ascalonicum* und *A. cepa* weiter zu (Abb. 4.18).



**Abb. 4.18** Dendrogramm der sequenzbekannten Alliinasen verschiedener Pflanzen. Erstellt nach Resultaten des Programms *UW-GCG v9.0* (DEVEREUX *et al.*, 1984).

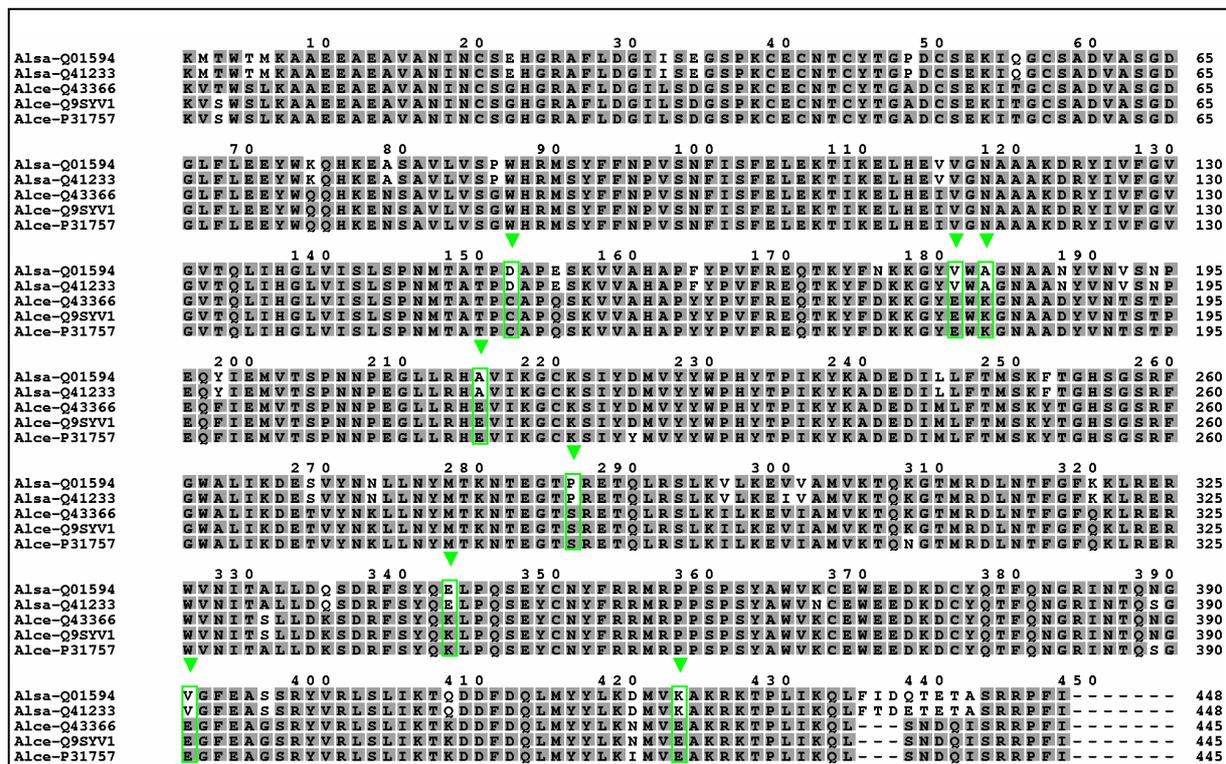
Die sechs Cysteine der aus dem Knoblauchenzym bekannten EGF-ähnlichen Domäne sind in allen bekannten N-terminalen Sequenzen von Alliinasen konserviert (Abb. 4.19). Sie



**Abb. 4.19** Sequenzvergleich von Alliinasen verschiedener Pflanzen. Die in mehr als der Hälfte aller verfügbaren Sequenzen konservierten Aminosäuren sind grau schattiert. Spezielle Positionen sind farblich codiert umrahmt und mit ▼ verdeutlicht (blau: Cys der EGF-ähnlichen Domäne, rot: substrat-, gelb: kofaktorbindende, gelb/rot: substrat- und kofaktorbindende, grün: in der Knoblauch-Alliinase (VANDAMME *et al.*, 1992) zu anderen Alliinasen spezielle variable Aminosäurereste). Alsa, Alce, Alas, Altu, Arth, Orsa, Alfi, Alsc, Alch, Alwa, Algi = mit den jeweils ersten beiden Buchstaben abgekürzte lateinische Pflanzennamen (siehe Abb. 4.18), (w) = Wurzel.

## Diskussion

belegen so für Pflanzen, die nicht der Gattung *Allium* angehören - wie *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana* - eine übergreifende Bedeutung der EGF-ähnlichen Domäne für die Funktion der Alliinase. Von den kofaktorbindenden Aminosäureresten sind Y165, T203, N207, D225, S250, K251 und R259 strikt konserviert (Abb. 4.19). Die anscheinend in *Allium cepa* zu Tyr ausgetauschte Position D225 (Abb. 4.19) geht sehr wahrscheinlich auf einen Sequenzierungsfehler zurück, da die Tyr- und Asp-Codons nur in der ersten Position differieren und weitere *Allium cepa*-Sequenzen für diese Aminosäure ein Asp vorweisen (Abb. 4.20). Y92 ist bis auf die Ausnahme *Allium fistulosum* (Y→P) auch in den übrigen Alliinasen invariant (Abb. 4.19). Weiterhin gut sind in den gegebenen Enzymsequenzen die Positionen V132, T133, V227, Y228 und T248 konserviert, wobei Austausche in *Oryza sativa* (V132A, V227A, V132S), *Arabidopsis thaliana* (T133M, V227A, T248S), *Allium cepa*<sub>Wurzel</sub> (V227A, Y228T, T248A) sowie *Allium fistulosum* (V227T, Y228T, T248A) häufiger und in *Allium sativum*<sub>Wurzel</sub> (T248S) seltener auftreten (Abb. 4.19). In der Klasse der substratbindenden Aminosäuren sind bei allen Alliinasen N207 und R401 unveränderlich (Abb. 4.19). Noch sehr gut bis gut konserviert sind S63 (T in *Allium cepa*<sub>Wurzel</sub>), Y92 (siehe zuvor) und F100 (I in



**Abb. 4.20** Sequenzvergleich der Alliinasen aus *Allium sativum* und *Allium cepa*. Konservierte Aminosäurereste sind grau hinterlegt dargestellt. Signifikante Aminosäureaustausche (ungeladene → polare/geladene, positiv geladene ↔ negativ geladene Aminosäure oder Cystein-Einführung) sind grün umrahmt und mit einem Dreieck oberhalb versehen hervorgehoben. Alsa = *Allium sativum*, Alce = *Allium cepa* (mit Angabe der Identifikationsnummern aus der SWISS-PROT-Datenbank (O'DONOVAN *et al.*, 2002)).

## Diskussion

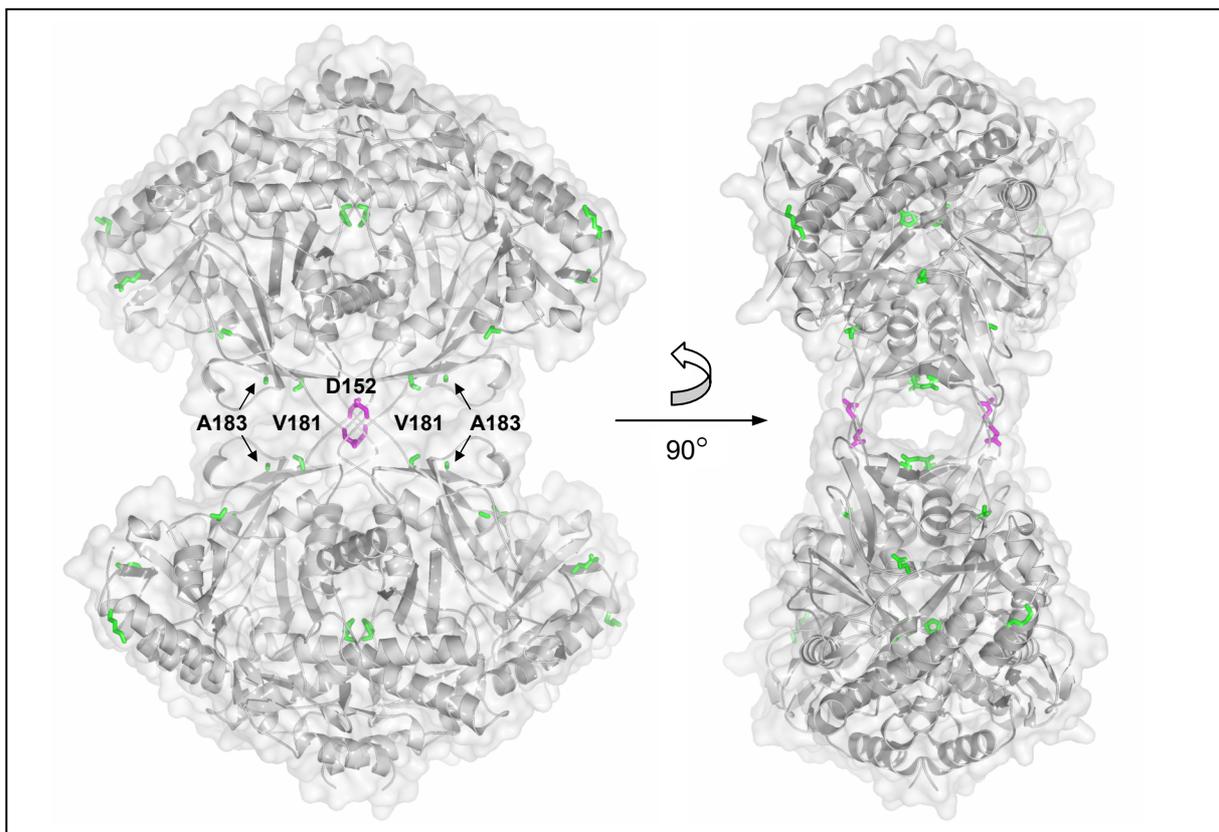
*Allium sativum*<sub>Wurzel</sub>) bzw. E283 (M in *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana*), Q388 (R in *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana*) und F93 (T, I oder S in *Allium tuberosum*, *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana*) (Abb. 4.19). Demzufolge ist es möglich, daß die Alliinasen von *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana* keine Spezifität mehr gegenüber (+)-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxiden vorweisen, da ihnen eine größere Anzahl der nach dem Modell spezifität-verleihenden Aminosäuren wie F93, E283 und Q388 nicht mehr in adäquater Weise zur Verfügung stehen.

Angesichts der von *Bacillus subtilis* beschriebenen Alliinase-Aktivität (MURAKAMI, 1960) wäre in dessen Genom eine zur Alliinase homologe Sequenz zu erwarten gewesen. Jedoch erbrachte eine Suche mittels des BSORF-Internetservers (<http://bacillus.genome.ad.jp>) als Treffer mit der höchsten Sequenzidentität von 24 % (260 überlappende Aminosäuren) lediglich das als CBL bezeichnete Gen „yjcJ“. Es ist daher anzunehmen, daß die von MURAKAMI (1960) festgestellte Aktivität auf dieses Enzym zurückfällt.

Die mit 90 % hohe Sequenzidentität der Alliinasen aus *Allium sativum* und *Allium cepa* (Anhang 7.8, Tab. 7.13) könnte es ermöglichen, spezifische physiologische Unterschiede der einzelnen Enzyme anhand bestimmter Aminosäureaustausche zu erklären. So stellt sich die Frage, ob das mit pH 7,5 um eine pH-Einheit höhere pH-Optimum des Enzyms aus *Allium cepa* (SCHWIMMER & MAZELIS, 1963) gegenüber pH 6,5 des Vertreters aus Knoblauch (MAZELIS & CREWS, 1968) auf einen veränderten Aminosäurerest im aktiven Zentrum zurückzuführen ist. Allerdings liegt keine der 42 veränderten Positionen (Abb. 4.20) selbst in Bindungsreichweite zum Kofaktor- oder des möglichen Substratmoleküls bzw. mit diesen interagierenden Aminosäureresten (nicht gezeigt). Ein trotzdem möglicher Erklärungsversuch bezieht sich auf die Position F164, welche in der Alliinase von *Allium cepa* durch ein Tyr vertreten ist. Wie im Kapitel 4.4.8.2 erläutert wurde, muß der nach F164 folgende Aminosäurerest Y165 als Phenolat-Anion vorliegen, um die Substrat-Aminogruppe deprotonieren zu können, worauf die Enzymreaktion beginnt. Ferner wurde verwiesen, daß das positive Helixdipolmoment der ab Position 166 beginnenden  $\alpha$ -Helix H6 zur Stabilisierung eines Y165-Phenolat-Anions beitragen könnte. Käme ein zweiter zur Ausbildung eines Anions befähigter Aminosäurerest in Reichweite des Helixdipols von  $\alpha$ -Helix H6 mit F164Y hinzu, so könnte ein Teil des positiven Helixdipols durch das zweite Phenolat-Anion an F164Y kompensiert werden und zur Ausbildung des ursprünglichen Phenolat-Anions an Y165 generell ein höherer pH-Wert nötig sein. Auf Basis dieser Vorstellung ließe sich das höhere pH-Optimum der Alliinase aus *Allium cepa* deuten. Eine weitere Interpretation wäre für den tetrameren Quartärzustand des Enzyms aus *Allium cepa* (NOCK & MAZELIS, 1987) anhand der Aminosäure-

## Diskussion

austausche zur dimeren Alliinase aus *Allium sativum* möglich. Von den in der Bindungseigenschaft ihrer Seitenkette signifikant veränderten Aminosäurepositionen (D152C, V181E, A183K, A215E, P286S, E343K, V391E, K423E; Abb. 4.20) ist zunächst D152C auffällig. Im Enzym von *Allium cepa* befinden sich die beiden Cysteinreste 152 eines Dimers in der zentralen Domäne wahrscheinlich oberflächenexponiert wieder. Sie liegen in der Schleife zwischen  $\alpha$ -Helix H5 und  $\beta$ -Faltblattstrang S10 und könnten intermolekulare Disulfidbrückenbindungen mit den Cysteinresten 152 eines anderen Dimers ausbilden und so zur Rekrutierung eines Tetramers führen (Abb. 4.21) (NOCK & MAZELIS, 1987). Die von Aminosäuren mit kurzen hydrophoben hin zu langgestreckten geladenen Seitenketten ausgetauschten Positionen V181E und A183K könnten komplementär zum gegenüberliegenden Dimer eines möglichen Tetramers Salzbrücken ausbilden und daher ebenso ausschlaggebend für die höheren Oligomerisierungszustand der Alliinase aus *Allium cepa* sein (Abb. 4.21). Ob der tetramere Zustand allerdings in der vorgestellten Weise (Abb. 4.21) real existiert, kann letztendlich nur die Kristallstruktur des Enzyms klären. Dagegen spricht zunächst jedoch die Beobachtung von anderen



**Abb. 4.21** *Spekulatives Tetramer-Modell der Alliinase aus Allium cepa.* Zwei Dimere der Alliinase aus *Allium sativum* dienten als Vorlage zum Tetramermodell und sind dabei als Proteinrückgrate mit der molekularen Oberfläche (transparent) wiedergegeben. Signifikante Aminosäureaustausche zwischen den Enzymen aus *Allium sativum* und *Allium cepa* sind in Form der Aminosäuren von *Allium sativum* als Stabmodelle (grün, außer D152 = violett) zu sehen.

## Diskussion

tetrameren C-S-Lyasen wie z.B. CBL und CGS (CLAUSEN *et al.*, 1996; CLAUSEN *et al.*, 1998), die sich mit der gegenüberliegenden Molekülseite wie im Modell von *Allium cepa* zu einem Tetramer verbinden (nicht gezeigt). Die ebenfalls als Tetramer identifizierte Alliinase aus *Allium fistulosum* (FUJITA *et al.*, 1990) besitzt zudem kein Cystein an der äquivalenten Position von D152 und ferner zwei Glutamate an den zugehörigen Positionen V181 und A183 anstatt des Paares Glu und Lys wie in der Alliinase von *Allium cepa* (Abb. 4.19). Die Sequenzen der Enzyme von *Allium ascalonicum*, *Allium schoenoprasum* und *Allium wakegi* enthalten indes das gleiche Charakteristikum eines Cys, Glu und Lys an den äquivalenten Positionen D152, V181 und A183 der Alliinase aus *Allium sativum*. Von ihnen ist bislang nicht bekannt, ob sie als Dimere oder Tetramere vorliegen, doch sollte sich eine Rolle der intermolekularen Disulfid- und Salzbrücken bei der Tetramerisierung des Enzyms aus *Allium cepa* bewahrheiten, so ist anzunehmen, daß auch die Alliinasen aus *Allium ascalonicum*, *Allium schoenoprasum* und *Allium wakegi* tetramer vorliegen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die C-S-Lyase Alliinase wurde aus frischen Knoblauchknollen bis zur Homogenität in hochaktiver Form gereinigt, wobei Mikroheterogenität in der IEF festzustellen war.

Das native Enzym konnte in vier monoklinen bzw. orthorhombischen Formen kristallisiert werden, die im Kristall die Mikroheterogenität des nativen Proteins beibehielten. Angesichts dessen ist das Vorliegen verschiedener Glykosylierungsstufen am wahrscheinlichsten. Die ersten zwei quaderförmigen Kristallformen ( $P2_1$  und  $C222_x$ ) wuchsen simultan bei Verwendung von Polyethylenglykolen als Fällungsmittel im sauren Milieu. Bei Zugabe von NaCl zum Ansatz kam es unter sonst identischen Bedingungen zur Ausbildung der dritten Kristallform ( $P2_1$ ), von der ein Datensatz mit maximaler Diffraktionsauflösung von 1,9 Å gesammelt wurde. Die vierte, bipyramidale Kristallform ( $P2_12_12_1$ ) wurde in Anwesenheit hoher Ammoniumsulfat-Konzentrationen ( $> 3$  M) in einem breiten pH-Bereich gezüchtet und lieferte einen vollständigen Datensatz mit maximaler Diffraktionsauflösung von 1,5 Å. Die drei Polyethylenglykol-Kristallformen sind in Bezug auf Einheitszellparameter und Molekülpackungen miteinander verwandt.

Das kristallographische Phasenproblem wurde mittels der SIRAS-Methode und einem mit Kaliumtetrachloroaurat kokristallisierten  $P2_12_12_1$ -Kristall gelöst. Die Struktur wurde in  $P2_12_12_1$  bei 1,53 Å Auflösung und einem  $R_{\text{faktor}}$  / freiem  $R_{\text{faktor}}$  von 19,2 / 22,1 % bzw. in  $P2_1$  bei 1,87 Å Auflösung und einem  $R_{\text{faktor}}$  / freiem  $R_{\text{faktor}}$  von 19,8 / 25,9 % verfeinert.

Die dreidimensionale Alliinasestruktur zeigt ein Homodimer mit den Abmessungen 101 Å x 73 Å x 61 Å. Das Monomer ist aus drei Domänen aufgebaut: eine N-terminale, zentrale und C-terminale Domäne. Der N-terminale Bereich enthält eine neuartige EGF-ähnliche Domäne, die vom kanonischen Typ in der Disulfidverknüpfung abweicht. Die A-EGF-Domäne offenbart Strukturverwandtschaft mit HB-EGF, wobei die erste N-terminale Disulfidbrücke in A-EGF fehlt, allerdings C-terminal eine zusätzliche besteht. Möglicherweise stellt die A-EGF-Domäne den Interaktionspartner eines bisher unbekanntes Alliinaserezeptors dar. Eventuell steht die A-EGF-Domäne auch im Zusammenhang mit pharmakologischen Knoblauchwirkungen, die noch nicht mit konkreten Inhaltsstoffen in Beziehung gebracht wurden. Die zentrale und C-terminale Domäne entsprechen zusammen der Klasse I der PLP-Enzyme, wobei AroAT bzw. ACCS die strukturnächsten Vertreter darstellen.

Im Bereich der N-terminalen Domäne befindet sich eine Bindungsstelle für Chlorid, wodurch ein an Intermonomer-Interaktionen beteiligtes *cis*-Pro-Schleifenelement und die Ori-

## Zusammenfassung

entierung von drei hydrophoben Aminosäureseitenketten (Y92, F93, F100) zum aktiven Zentrum des Nachbarmonomers hin stabilisiert werden. Y92, F93 und F100 bilden einen hydrophoben Oberflächenbereich zur Substratbindung aus. Somit ist strukturell die NaCl-Abhängigkeit der Alliinase in Bezug auf Dimerstabilität und Enzymaktivität bewiesen.

Von den drei gefundenen N-Glykosylierungsstellen (N146, N191, N328) wird für die N191-Zuckerkette eine Beteiligung bei der Interaktion mit dem menschlichen Alliinase-Antikörper angenommen.

Die Alliinasestruktur stellt mehr eine „geschlossene“ denn eine „offene“ Konformation dar, verglichen mit AAT. Ursache dessen sind möglicherweise die gebundenen Inhibitormoleküle HEPES und AA.

Dem von AA abgeleiteten Substratbindungsmodell zufolge spielen die Aminosäuren S63 bzw. Q388 bei der stereoselektiven Erkennung von (+)- und (-)-Alliin, E283 bei der Substratorientierung sowie Y92, F93 und F100 bei der Bindung der Allyl-Substratgruppe entscheidende Rollen. K251 befindet sich zu weit vom Substrat-Sulfoxid entfernt für die bekannte, konventionelle Initiation der C-S-Spaltungsreaktion bei C-S-Lyasen. Dagegen könnte ein Lösungsmittelwassermolekül ein Proton auf das Sulfoxid des Substrates übertragen und die C-S-Lyasereaktion auslösen. So wird die inhibitorische Wirkung der Alk(en)yl-L-cysteine erklärt, da deren Schwefelatom weniger nukleophil ist als der elektroneivere Sulfoxid-Sauerstoff.

In der Übergangsregion zwischen zentraler und C-terminaler Domäne konzentrieren sich *trans*- und *cis*-Pro-Reste sowie höhere Abweichungen der  $\omega$ -Dihedralwinkel mit den größten Abweichungen in der Schleife S204→L211. Diese „angespannte“ Schleife ist in weiteren PLP-Enzymen der Klasse I unterschiedlich, z.T. ähnlich „angespannt“ ausgeprägt und könnte eine regulative Aufgabe beim Übergang der „offenen“ zur „geschlossenen“ Konformation erfüllen.

Die Mutagenesevorschläge zur Veränderung der Alliinasespezifität belaufen sich großteils auf die Modifizierung von S63, Q388, Y92, F93, F100 und E283.

Die bislang nur sequenzbekannten Alliinasen anderer Pflanzen besitzen alle das Muster einer EGF-ähnlichen Domäne. Hingegen sind manche der die Substratspezifität definierenden Aminosäuren in den Enzymen aus *Arabidopsis thaliana* und Reis nicht vorhanden und legen den Verlust der (+)/(-)-Sulfoxidselektivität für diese Alliinasen nahe. Anhand der wenigen Austausche zwischen *Allium sativum* und *Allium cepa* wurde ein Modell zur Ausbildung der für *Allium cepa*-Alliinase vermuteten Tetramerstruktur mittels intermolekularer Disulfidbrücken entwickelt.

## 6. LITERATUR

- AGARWAL, K.C. (1996). Therapeutic actions of garlic constituents. *Med. Res. Rev.*, 16, 111-124.
- ALEXANDER, F.W., SANDMEIER, E., MEHTA, P.K. & CHRISTEN, P. (1994). Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  families. *Eur. J. Biochem.*, 219, 953-960.
- ALEXEEV, D., ALEXEEVA, M., BAXTER, R.L., CAMPOPIANO, D., WEBSTER, S.P. & SAWYER, L. (1998). The crystal structure of 8-amino-7-oxononanoate synthase: a bacterial PLP-dependent, acyl-CoA-condensing enzyme. *J. Mol. Biol.*, 284, 401-419.
- ALMRUD, J.J., OLIVEIRA, M.A., KERN, A.D., GRISHIN, N.V., PHILLIPS, M.A. & HACKERT, M.L. (2000). Crystal structure of human ornithine decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding. *J. Mol. Biol.*, 295, 7-16.
- ANTSON, A.A., DEMIDKINA, T.V., GOLLNICK, P., DAUTER, Z., VON TERSCH, R.L., LONG, J., BEREZHNOY, S.N., PHILLIPS, R.S., HARUTYUNYAN, E.H. & WILSON, K.S. (1993). Three-dimensional structure of tyrosine phenol-lyase. *Biochemistry*, 32, 4195-4206.
- APITZ-CASTRO, R., CABRERA, S., CRUZ, M.R., LEDEZEMA, E. & JAIN, M.K. (1983). Effects of garlic extract and of three pure components isolated from it on human platelet aggregation, arachidonate metabolism, release reaction, and platelet ultrastructure. *Thromb. Res.*, 32, 155-169.
- ASCENZI, P., BOLOGNESI, M., CATALUCCI, D., PASCARELLA, S., RUOPPOLO, M. & RIZZI, M. (1998). Leech anti-hemostatic proteins share the T-knot scaffold, a disulfide-reinforced structural motif. *Biol. Chem.*, 379, 1387-1389.
- BAIROCH, A. & APWEILER, R. (1999). The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 1999. *Nucleic Acids Res.*, 27, 49-54.
- BANNER, D.W., D'ARCY, A., CHENE, C., WINKLER, F.K., GUHA, A., KONINGSBERG, W.H., NEMERSON, Y. & KIRCHHOFER, D. (1996). The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature*, 380, 41-46.
- BARANOWSKI, T., ILLINGWORTH, B., BROWN, D.H. & CORI, C.F. (1957). The isolation of pyridoxal-5-phosphate from crystalline muscle phosphorylase. *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 16-21.
- BECK, K., HUNTER, I. & ENGEL, J. (1990). Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.*, 4, 148-160.
- BEGLOVA, N., BLACKLOW, S.C., TAKAGI, J. & SPRINGER, T.A. (2002). Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat. Struct. Biol.*, 9, 282-287.
- BERMAN, H.M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T.N., WEISSIG, H., SHINDYALOV, I.N. & BOURNE, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, 28, 235-242.
- BERTOLDI, M., CELLINI, B., CLAUSEN, T. & VOLTATTORNI, C.B. (2002). Spectroscopic and kinetic analyses reveal the pyridoxal 5'-phosphate binding mode and the catalytic features of *Treponema denticola* cystalysin. *Biochemistry*, 41, 9153-9164.
- BIJVOET, J.M. (1949). Phase determination in direct Fourier synthesis of crystal structures. *Proc. Acad. Sci. Amst.*, B52, 313-314.
- BIROLO, L., MALASHKEVICH, V.N., CAPITANI, G., DE LUCA, F., MORETTA, A., JANSONIUS, J.N. & MARINO, G. (1999). Functional and structural analysis of *cis*-proline mutants of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase. *Biochemistry*, 38, 905-913.
- BLANKENFELDT, W., NOWICKI, C., HUNTER, G.R., MONTEMARTINI-KALISZ, M., KALISZ, H.M. & HECHT, H.J. (1999). Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* tyrosine aminotransferase: a substrate specificity is influenced by cofactor binding mode. *Protein Sci.*, 8, 2406-2417.
- BLANCO-APARICIO, C., MOLINA, M.A., FERNÁNDEZ-SALAS, E., FRAZIER, M.L., MAS, J.M., QUEROL, E., AVILÉS, F.X. & DE LLORENS, R. (1998). Potato carboxypeptidase inhibitor, a T-knot protein, is an epidermal growth factor antagonist that inhibits tumor cell growth. *J. Biol. Chem.*, 273, 12370-12377.
- BLOCK, E., AHMAD, S., JAIN, M.K., CRECELY, R.W., APITZ-CASTRO, R. & CRUZ, M.R. (1984). (E,Z)-Ajoene: a potent antithrombotic agent from garlic. *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 8295-8296.
- BLOCK, E. (1992). Die Organoschwefelchemie der Gattung *Allium* und ihre Bedeutung für die organische Chemie des Schwefels. *Angew. Chem.* 104, 1158-1203.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- BORK, P., DOWNING, A.K., KIEFFER, B. & CAMPBELL, I.D. (1996). Structure and distribution of modules in extracellular proteins. *Qt. Rev. Biophys.*, 29, 119-167.
- BRANDL, M., WEISS, M.S., JABS, A., SÜHNEL, J. & HILGENFELD, R. (2001). C-H $\cdots$  $\pi$ -interactions in proteins. *J. Mol. Biol.*, 307, 357-377.
- BRANDSTETTER, H., KÜHNE, A., BODE, W., HUBER, R., VON DER SAAL, W., WIRTHENSOHN, K. & ENGH, R.A. (1996). X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa. Implication for drug design and substrate recognition. *J. Biol. Chem.*, 271, 29988-29992.

## Literatur

- BRAUNSTEIN, A.E. & GORYACHENKOVA, E.V. (1984). The  $\beta$ -replacement-specific pyridoxal-*P*-dependent lyases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 56, 1-89.
- BREITINGER, U., CLAUSEN, T., EHLERT, S., HUBER, R., LABER, B., SCHMIDT, F., POHL, E. & MESSERSCHMIDT, A. (2001). The three-dimensional structure of cystathionine  $\beta$ -lyase from *Arabidopsis thaliana* and its substrate specificity. *Plant Physiol.*, 126, 631-642.
- BRICOGNE, G. (1991). A maximum-likelihood theory of heavy-atom parameter refinement in the isomorphous replacement method. In *Isomorphous replacement and anomalous scattering* (WOLF, W., EVANS, P.R., & LESLIE, A.G.W.). CCP4 Daresbury study weekend, nos. DL/SCI/R32, ISSN 0144-5677. Daresbury Laboratory, Warrington (Großbritannien).
- BRÜNGER, A.T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, 355, 472.
- BRÜNGER, A.T., KURIYAN, J. & KARPLUS, M. (1987). Crystallographic R-factor refinement by molecular dynamics. *Science*, 235, 458-460.
- BRÜNGER, A.T., ADAMS, P.D., CLORE, G.M., DELANO, W.L., GROS, P., GROSSE-KUNSTLEVE, R.W., JIANG, J.S., KUSZEWSKI, J., NILGES, M., PANNU, N.S., READ, R.J., RICE, L.M., SIMONSON, T. & WARREN, G.L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D*, 54, 905-921.
- BRUNNER, R. (1941). Untersuchungen über eine glykosidische Substanz aus *Allium sativum*. Firmenarchiv Novartis AG (Basel, Schweiz), Bestand Sandoz H-105.029, *Allium-Berichte*.
- BUERGER, M.J. (1964). The precession method. Wiley, New York (NY, USA).
- BURKHARD, P., RAO, G.S.J., HOHENESTER, E., SCHNACKERZ, K.D., COOK, P.F., JANSONIUS, J.N. (1998). Three-dimensional structure of O-acetylserine sulfhydrylase from *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.*, 283, 121-133.
- BURKHARD, P., TAI, C.H., JANSONIUS, J.N. & COOK P.F. (2000). Identification of an allosteric anion-binding site on O-acetylserine sulfhydrylase: structure of the enzyme with chloride bound. *J. Mol. Biol.*, 303, 279-286.
- BURKHARD, P., DOMINICI, P., BORRI-VOLTATTORNI, C., JANSONIUS, J.N. & MALASHKEVICH, V.N. (2001). Structural insight into Parkinson's disease treatment gained from drug-inhibited dopa decarboxylase. *Nat. Struct. Biol.*, 8, 963-967.
- CAMPBELL, I.D. & BORK, P. (1993). Epidermal growth-factor like modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3, 385-392.
- CAO, X, ROGERS, S.W., BUTLER, J., BEEVERS, L. & ROGERS, J.C. (2000). Structural requirements for ligand binding by a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Cell*, 12, 493-506.
- CAPITANI, G., HOHENESTER, E., FENG, L., STORICI, P., KIRSCH, J.F. & JANSONIUS, J.N. (1999). Structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in the biosynthesis of the plant hormone ethylene. *J. Mol. Biol.*, 294, 745-756.
- CAPITANI, G., MCCARTHY, D.L., GUT, H., GRÜTTER, M.G. & KIRSCH J.F. (2002). Apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in complex with the inhibitor L-aminoethoxyvinylglycine. Evidence for a ketimine intermediate. *J. Biol. Chem.*, 277, 49735-49742.
- CAPITANI, G., DE BIASE, D., AURIZI, C., GUT, H., BOSSA, F. & GRÜTTER, M.G. (2003a). Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. *EMBO J.*, 22, 4027-4037.
- CAPITANI, G., ELIOT, A.C., GUT, H., KHOMUTOV, R.M., KIRSCH J.F. & GRÜTTER, M.G. (2003b). Structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in complex with an amino-oxy analogue of the substrate: implications for substrate binding. *Biochim. Biophys. Acta*, 1647, 55-60.
- CARPENTER, G., KING, L. JR. & COHEN, S. (1978). Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations *in vitro*. *Nature*, 276, 409-410.
- CARPENTER, G. & COHEN, S. (1990). Epidermal growth factor. *J. Mol. Biol.*, 265, 7709-7712.
- CAVALLITO, C.J., BAILEY, J.H. & BUCK, J.S. (1945). The antibacterial principle of *Allium sativum*. III. Its precursor and „essential oil of garlic“. *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 1032-1033.
- CCP4 (1994) - siehe COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4 (1994).
- CHANDRA, N.R., RAMACHANDRAIAH, G., BACHHAWAT, K., DAM, T.K., SUROLIA, A. & VIJAYAN, M. (1999). Crystal structure of a dimeric mannose-specific agglutinin from garlic: quaternary association and carbohydrate specificity. *J. Mol. Biol.*, 285, 1157-1168.
- CHEN, C.C.H., ZHANG, H., KIM, A.D., HOWARD, A., SHELDRIK, G.M., MARIANO-DUNNAWAY, D. & HERZBERG, O. (2002). Degradation pathway of the phosphonate ciliate: crystal structure of 2-aminoethylphosphonate transaminase. *Biochemistry*, 41, 13162-13169.
- CHEONG, C.G., BAUER, C.B., BRUSHABER, K.R., ESCALANTE-SEMERENA, J.C. & RAYMENT, I. (2002). The three-dimensional structure of L-threonine-O-3-phosphate decarboxylase from *Salmonella enterica* (CobD). *Biochemistry*, 41, 4798-4808.
- CHITARRA, V., HOLM, I., BENTLEY, G.A., PÊTRES, S. & LONGACRE, S. (1999). The crystal structure of C-terminal merzoite surface protein 1 at 1.8 Å resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. *Mol. Cell.*, 3, 457-464.
- CHRISTEN, P. & MEHTA, P.K. (2001). From cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Chem. Rec.*, 1, 436-447.

## Literatur

- CLARK, S.A. (1993). Molecular cloning of a cDNA encoding alliinase from onion (*Allium cepa* L.). *Dissertation*. University of Canterbury, Christchurch (Neuseeland).
- CLAUSEN, T., HUBER, R., LABER, B., POHLENZ, H.D. & MESSERSCHMIDT, A. (1996). Crystal structure of the pyridoxal-5'-phosphate dependent cystathionine  $\beta$ -lyase from *Escherichia coli* at 1.83 Å. *J. Mol. Biol.*, 262, 202-224.
- CLAUSEN, T., HUBER, R., MESSERSCHMIDT, A., POHLENZ, H.D. & LABER, B. (1997). Slow-binding inhibition of *Escherichia coli* cystathionine  $\beta$ -lyase by L-aminoethoxyvinylglycine: a kinetic and X-ray study. *Biochemistry*, 36, 12633-12643.
- CLAUSEN, T., HUBER, R., PRADE, L., WAHL, M.C. & MESSERSCHMIDT, A. (1998). Crystal structure of *Escherichia coli* cystathionine  $\gamma$ -synthase at 1.5 Å Resolution. *EMBO J.*, 17, 6827-6838.
- CLAUSEN, T., SCHLEGEL, A., PEIST, R., SCHNEIDER, E., STEEGBORN, C., CHANG, Y.-S., HAASE, A., BOURENKOV, G.P., BARTUNIK, H.D. & BOOS, W. (2000a). X-ray structure of MalY from *Escherichia coli*: a pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme acting as a modulator in mal gene expression. *EMBO J.*, 19, 831-842.
- CLAUSEN, T., KAISER, J.T., STEEGBORN, C., HUBER, R. & KESSLER, D. (2000b). Crystal structure of the cystine C-S-lyase from *Synechocystis*: stabilization of cysteine persulfide for FeS cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 3856-3861.
- COHEN, G.E. (1997). ALIGN: a program to superimpose protein coordinates, accounting for insertions and deletions. *J. Appl. Cryst.*, 30, 1160-1161.
- COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D*, 50, 760-763.
- COOKE, R.M., WILKINSON, A.J., BARON, M., PASTORE, A., TAPPIN, M.J., CAMPBELL, I.D., GREGORY, H. & SHEARD, B. (1987). The solution structure of human epidermal growth factor. *Nature*, 327, 339-341.
- COWTAN, K. (1994). 'dm': an automated procedure for phase improvement by density modification. *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography*, 31, 34-38.
- CULLIS, A.F., MUIRHEAD, H., PERUTZ, M.F., ROSSMANN, M.G. & NORTH, A.C.T. (1961). The Structure of haemoglobin VIII. A three-dimensional fourier synthesis at 5.5 Å resolution determination of the phase angles. *Proc. R. Soc. London A*, 265, 15-38.
- CUPP-VICKERY, J.R., URBINA, H. & VICKERY, L.E. (2003). Crystal structure of IscS, a cysteine desulfurase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 330, 1049-1059.
- DAUSCH, J.G. & NIXON, D.W. (1990). Garlic: a review of its relationship to malignant disease. *Prev. Med.*, 19, 346-361.
- DAVIS, L.E., SHEN, J. & CAI, Y. (1990). Antifungal activity in human cerebrospinal fluid and plasma after intravenous administration of *Allium sativum*. *Antimicrob. Agents Chemotherap.*, 34, 651-653.
- DELANO, W.L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System (2002). DeLano Scientific, San Carlos (CA, USA). <http://www.pymol.org>.
- DENESSIOUK, K.A., DENESYUK, A.I., LEHTONEN, J.V., KORPELA, T. & JOHNSON, M.S. (1999). Common structural elements in the architecture of the cofactor-binding domains in unrelated families of pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Proteins*, 35, 250-261.
- DENESYUK, A.I., DENESSIOUK, K.A., KORPELA, T. & JOHNSON, M.S. (2002). Functional attributes of the phosphate group binding cup of pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *J. Mol. Biol.*, 316, 155-172.
- DEVEREUX, J., HAEBERLI, P. & SMITHIES, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acid Res.*, 14, 387-395.
- DRENTH, J. (1994). *Principles of protein X-ray crystallography*. 1<sup>st</sup> edition. Springer, New York (NY, USA).
- DOKEN, H., KAMINISHI, A., OHYA, T., NOMURA, K. & KITA, N. (2001). Alliinase cDNA cloning from *Allium* species by RT-PCR. *SWISS-PROT/TrEMBL Database* (<http://us.expasy.org/sprot/sprot-top.html>), ID Q94EJ9.
- DOWNING, A.K., KNOTT, V., WERNER, J.M., CARDY, C.M., CAMPBELL, I.D. & HANDFORD, P.A. (1996). Solution structure of a pair of Calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders. *Cell*, 85, 597-605.
- DU, X., GU, M., WEISEL, J.W., NAGASWAMI, C., BENNETT, J.S., BOWDITCH, R. & GINSBERG, M.H. (1993). Long range propagation of conformational changes in integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . *J. Biol. Chem.*, 268, 23087-23092.
- DURBIN, R.D. & UCHYTIK, T.F. (1971). Purification and properties of alliin lyase from the fungus *Penicillium comrymbiferum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 229, 518-520.
- EADS, J.C., BEEBY, M., SCAPIN, G., YU, T.W. & FLOSS, H.G. (1998). The crystal structure of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) synthase. *Biochemistry*, 38, 9840-9849.
- EBERS, G.M. (1875). *Papyrus Ebers. Das hermetische Buch über die Arzneimittel der alten Ägypter in hieratischer Schrift, 2 Bände*. Leipzig. Neuauflage 1987, Biblio-Verlag, Osnabrück.
- EGEN-SCHWIND, C., ECKARD, R., JEKAT, F.W. & WINTERHOFF, H. (1992). Pharmacokinetics of vinylthiins, transformation products of allicin. *Planta Med.*, 58, 8-13.
- ELBL, G. (1991). Chemisch-biologische Untersuchungen pflanzlicher Inhibitoren des Angiotensin I-converting Enzyme (ACE), insbesondere die der Arzneipflanzen *Lespedeza capitata* (Michx.) und *Allium ursinum* (L.). *Dissertation*. Universität München.

## Literatur

- ELLENBERGER, T.E., BRANDL, C.J., STRUHL, K. & HARRISON, S.C. (1992). The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*, 71, 1223-1237.
- ELLMORE, G.S. & FELDBERG, R.S. (1994). Alliin lyase localization in bundle sheaths of garlic clove (*Allium sativum*). *Amer. J. Bot.* 81, 89-94.
- ESWARAMOORTHY, S., GERCHMAN, S., GRAZIANO, V., KYCIA, H., STUDIER, F.W., SWAMINATHAN, S. (2003). Crystal structure of a yeast hypothetical protein. *Acta Crystallogr. D*, 59, 127-135.
- FALQUET, L., PAGNI, M., BUCHER, P., HULO, N., SIGRIST, C.J., HOFMANN, K. & BAIROCH, A. (2002). The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.*, 30, 235-238.
- FANG, F., LI, H., CUI, W. & DONG, Y. (1999). Treatment of hepatitis caused by cytomegalovirus with allitridin injection-an experimental study. *J. Tongji Med. Univ.*, 19, 271-274.
- FELDBERG, R.S., CHANG, S.C., KOTIK, A.N., NADLER, M., NEUWIRTH, Z., SUNDSTROM, D.C. & THOMPSON, N.H. (1988). *In vitro* mechanism of inhibition of bacterial cell growth by alliin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32, 1763-1768.
- FENWICK, G.R. & HANLEY, A.B. (1985). The genus *Allium*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 22, 199-377.
- FERNANDEZ, F.J., VEGA, M.C., LEHMANN, F., SANDMEIER, E., GEHRING, H., CHRISTEN, P. & WILMANN, M. (2004). Structural studies of the catalytic reaction pathway of a hyperthermophilic histidinol-phosphate aminotransferase. *J. Biol. Chem.*, 279, 21478-21488.
- FEIX, J. (1995). *Herodot Historien*. Artemis & Winkler Verlag, München.
- FRENCH, G.S. & WILSON, K.S. (1978). On the treatment of negative intensity observations. *Acta Crystallogr. A*, 34, 517-527.
- FRIEDEL, G. (1913). Sur les symétries cristallines que peut révéler la diffraction des rayons Röntgen. *Comptes Rendus Acad. Sci. Paris* 157, 1533-1536 [franz.].
- FRITZ, H. (1992). Industrielle Arzneimittelherstellung: Die pharmazeutische Industrie in Basel am Beispiel der Sandoz AG. Kapitel 2.3 - Einführung weiterer Spezialitäten auf den internationalen Märkten. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- FUENFTES-PRIOR, P., IWANAGA, Y., HUBER, R., PAGILA, R., RUMENNIK, G., SETO, M., MORSE, J., LIGHT, D.R. & BODE, W. (2000). Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature*, 404, 518-525.
- FUJI, T., MAEDA, M., MIHARA, H., KURIHARA, T., ESAKI, N. & HATA, Y. (2000). Structure of a NifS homologue: X-ray structure analysis of CsdB, an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase. *Biochemistry*, 39, 1263-1273.
- FUJITA, M., ENDO, M. & SANO, M. (1990). Purification and characterization of alliin lyase from Welsh onion, *Allium fistulosum* L. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1077-1079.
- GAO, G.-H., LIU, W., DAI, J.-X., WANG, J.-F., HU, Z., ZHANG, Y. & WANG, D.-C. (2001). Solution structure of PAFP-S: a new knotin-type antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*. *Biochemistry*, 40, 10973-10978.
- GALLAGHER, D.T., GILLILAND, G.L., XIAO, G., ZONDLO, J., FISHER, K.E., CHINCHILLA, D. & EISENSTEIN, E. (1998). Structure and control of pyridoxal phosphate dependent allosteric threonine deaminase. *Structure*, 6, 465-475.
- GALLWITZ, H., BONSE, S., MARTINEZ-CRUZ, A., SCHLICHTING, I., SCHUMACHER, K. & KRAUTH-SIEGEL, R.L. (1999). Ajoene is an inhibitor and subversive substrate of human glutathione reductase and *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase: crystallographic, kinetic, and spectroscopic studies. *J. Med. Chem.*, 11, 364-372.
- GARRETT, T.P.J., MCKERN, N.M., LOU, M., ELLEMAN, T.C., ADAMS, T.E., LOVRECH, G.O., ZHU, H.-J., WALKER, F., FRENKEL, M.J., HOYNE, P.A., JORISSON, R.N., NICE, E.C., BURGESS, A.W. & WARD, C.W. (2002). Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor  $\alpha$ . *Cell*, 110, 763-773.
- GARRIDO-FRANCO, M., EHLERT, S., MESSERSCHMIDT, A., MARINKOVIC, S., HUBER, R., LABER, B., BOURENKOV, G.P. & CLAUSEN, T. (2000). Structure and function of threonine synthase from yeast. *J. Biol. Chem.*, 277, 12396-12405.
- GOFF, A.G., RICKE, D., LAN, T.-H., PRESTING, G., WANG, R., DUNN, M., GLAZEBROOK, J., SESSIONS, A., OELLER, P., VARMA, H., HADLEY, D., HUTCHISON, D., MARTIN, C., KATAGIRI, F., LANGE, B.M., MOUGHAMER, T., XIA, Y., BUDWORTH, P., ZHONG, J., MIGUEL, T., PASZKOWSKI, U., ZHANG, S., COLBERT, M., SUN, W.-L., CHEN, L., COOPER, B., PARK, S., WOOD, T.C., MAO, L., QUAIL, P., WING, R., DEAN, R., YU, Y., ZHARKIKH, A., SHEN, R., SAHASRABUDHE, S., THOMAS, A., CANNINGS, R., GUTIN, A., PRUSS, D., REID, J., TAVTIGIAN, S., MITCHELL, J., ELDRIDGE, G., SCHOLL, T., MILLER, R.M., BHATNAGAR, S., ADEY, N., RUBANO, T., TUSNEEM, N., ROBINSON, R., FELDHAUS, J., MACALMA, T., OLIPHANT, A. & BRIGGS, S. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 296, 92-100.
- GOKULAN, K., RUPP, B., PAVELKA, M.S. JR., JACOBS, W.R. JR. & SACCHETTINI, J.C. (2003). Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* diaminopimelate decarboxylase, an essential enzyme in bacterial lysine biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 278, 18588-18596.

## Literatur

- GORYACHENKOVA, E.V. (1952). [Das allucinbildende Knoblauchferment (Alliinase) - ein Protein mit Phosphopyridoxal]. *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, 87, 457-460 [russ.].
- GREGORIOU, M., NOBLE, M.E., WATSON, K.A., GARMAN, E.F., KRULLE, T.M., DE LA FUENTE, C., FLEET, G.W., OIKONOMAKOS, N.G. & JOHNSON, L.N. (1998). The structure of a glycogen phosphorylase glucopyranose spirohydantoin complex at 1.8 Å resolution and 100 K: the role of the water structure and its contribution to binding. *Protein Sci.*, 7, 915-927.
- GRISHIN, N.V., PHILLIPS, M.A. & GOLDSMITH, E.J. (1995). Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. *Protein Sci.*, 4, 1291-1304.
- GRISHIN, N.V., OSTERMAN, A.L., BROOKS, H.B., PHILLIPS, M.A. & GOLDSMITH, E.J. (1999). X-ray structure of ornithine decarboxylase from *Trypanosoma brucei*: the native structure and the structure in complex with  $\alpha$ -difluoromethylornithine. *Biochemistry*, 38, 15174-15184.
- HAHN, T. (1995). International tables for crystallography. Volume A, space-group symmetry, 4<sup>th</sup> edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (Niederlande).
- HAMAMOTO, A. & MAZELIS, M. (1986). The C-S lyases of higher plants. Isolation and properties of homogeneous cystine lyase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) buds. *Plant Physiol.*, 80, 702-706.
- HARDING, M.M. (2002). Metal-ligand geometry relevant to proteins and in proteins: sodium and potassium. *Acta Crystallogr. D*, 58, 872-874.
- HARKER, D. (1956). The determination of the phases of the structure factors of non-centrosymmetric crystals by the method of double isomorphous replacement. *Acta Crystallogr.* 9, 1-9.
- HARRIS, J.C., COTTRELL, S.L., PLUMMER, S. & LLOYD, D. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, 282-286.
- HARUYAMA, K., NAKAI, T., MIYAHARA, I., HIROTSU, K., MIZUGUCHI, H., HAYASHI, H. & KAGAMIYAMA, H. (2001). Structures of *Escherichia coli* histidinol-phosphate aminotransferase and its complexes with histidinol-phosphate and N-(5'-phosphopyridoxyl)-L-glutamate: double substrate recognition of the enzyme. *Biochemistry*, 40, 4633-4644.
- HARVEY, T.S., WILKINSON, A.J., TAPPIN, M.J., COOKE, R.M. & CAMPBELL, I.D. (1991). The solution structure of human transforming growth factor  $\alpha$ . *Eur. J. Biochem.*, 198, 555-562.
- HAYASHI, H., MIZUGUCHI, H. & KAGAMIYAMA, H. (1993). Rat liver L-aromatic amino acid decarboxylase: spectroscopic and kinetic analysis of the coenzyme and reaction intermediates. *Biochemistry*, 32, 812-818.
- HE, Z.H., FUJIKI, M. & KOHORN, B.D. (1996). A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 271, 19789-19793.
- HENDRICKSON, W.A. & KONNERT, J.H. (1980). Incorporation of stereochemical information into crystallographic refinement, in *Computing in Crystallography* (Diamond, R., Ramaseshan, S. & Venkatesan, K.), 13.01-13.23, Indian Institute of Science, Bangalore (Indien).
- HENNIG, M., GRIMM, B., CONTESTABILE, R., JOHN, R.A. & JANSONIUS, J.N. (1997). Crystal structure of glutamate-1-semialdehyde aminomutase: an  $\alpha_2$ -dimeric vitamin B6-dependent enzyme with asymmetry in structure and active site reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 4866-4871.
- HEITZ, A., LE-NGUYEN, D. & CHICHE, L. (1999). Min-21 and min-23, the smallest peptides that fold like cystine-stabilized  $\beta$ -sheet motif: design, solution structure, and thermal stability. *Biochemistry*, 38, 10615-10625.
- HESTER, G., STARK, W., MOSER, M., KALLEN, J., MARKOVIC-HOUSLEY, Z. & JANSONIUS, J.N. (1999). Crystal structure of phosphoserine aminotransferase from *Escherichia coli* at 2.3 Å resolution: comparison of the unligated enzyme and a complex with alpha-methyl-L-glutamate. *J. Mol. Biol.*, 286, 829-850.
- HILDER, V.A., POWELL, K.S., GATEHOUSE, A.M.R., GATEHOUSE, J.A., GATEHOUSE, L.N., SHI, P., HAMILTON, W.D.O., MERRYWEATHER, A., NEWELL, C., TIMANS, J.C., PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M. & BOULTER, D. (1995). Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgen. Res.*, 4, 18-25.
- HOERNLE, R. (1893-1897). The Bower Manuscript. Facsimile Lewes, Nagari transcript; Romanised transliteration and English translation with notes. Archaeological Survey of India, Calcutta (Indien).
- HOGG, T. (2001). Crystallographic investigations on ribosome-associated GTP-binding proteins. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena. <http://www.urmel-dl.de>.
- HOGG, T., KUTA SMATANOVA, I., BEZOUSKA, K., ULBRICH, N. & HILGENFELD, R. (2002). Sugar-mediated lattice contacts in crystals of a plant glycoprotein. *Acta Crystallogr. D*, 58, 1734-1739.
- HOHENESTER, E. & ENGEL, J. (2002) Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.*, 21, 115-128.
- HOLM, L. & SANDER, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.*, 233, 123-138.
- HOOFT, R.W.W., VRIEND, G., SANDER, C. & ABOLA, E.E. (1996). Errors in protein structures. *Nature*, 381, 272.
- HOWELL, P.L. & SMITH, G.D. (1992). Identification of heavy-atom derivatives by normal probability methods. *J. Appl. Cryst.*, 25, 81-86.
- HUAI, Q., XIA, Y., CHEN, Y., CALLAHAN, B., LI, N. & KE, H. (2001). Crystal structures of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase in complex with aminoethoxyvinylglycine and pyridoxal-5'-phosphate provide new insight into catalytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 276, 38210-38216.

## Literatur

- HUGHES, B.G. & LAWSON, L.D. (1991). Antimicrobial effects of *Allium sativum* L. (garlic), *Allium ampeloprasum* L. (elephant garlic) and *Allium cepa* L. (onion), garlic compounds and commercial garlic supplement products. *Phytother. Res.*, 5, 154-158.
- HUMPHRIES, M.J. (2000). Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.*, 28, 311-339.
- HYAMS, E. (1971). Plants in the service of man: 10000 years of domestication. Dent & Sons, London.
- IQBAL, M. & ATHAR, M. (1998). Attenuation of iron-nitrilotriacetate (Fe-NTA)-mediated renal oxidative stress, toxicity and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of rats with garlic oil. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 485-495.
- IMMIRZI, A. (1966). S. 399 in *Crystallographic Computing Techniques* (AHMED, F.R.), Munksgaard, Kopenhagen (Dänemark).
- ISUPOV, M.N., ANTONSON, A.A., DODSON, E.J., DODSON, G.G., DEMENTIEVA, I.S., ZAKOMIRDINA, L.N., WILSON, K.S., DAUTER, Z., LEBEDEV, A.A. & HARUTYUNYAN, E.H. (1998). Crystal structure of tryptophanase. *J. Mol. Biol.*, 276, 603-623.
- IWAMI, K. & YASUMOTO, K. (1980). Alliinase-like enzymes in fruiting bodies of *Lentinus edodes*: Their purification and substrate specificity. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2003-3004.
- JACOBSON, J., YAMAGUCHI, Y., MANN, L.K. & HOWARD, F.D. (1968). An alkyl-cysteine sulfoxide lyase in *Thulbaghia violacea* and its relation to other alliinase-like enzymes. *Phytochemistry*, 7, 1099-1108.
- JÄGER, J., MOSER, M., SAUDER, U. & JANSONIUS, J.N. (1994). Crystal structures of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase in two conformations. Comparison of an unliganded open and two liganded closed forms. *J. Mol. Biol.*, 239, 285-305.
- JANSEN, H., MÜLLER, B. & KNOBLOCH, K. (1989a). Characterization of an alliin lyase preparation from garlic (*Allium sativum*). *Planta Med.*, 55, 434-439.
- JANSEN, H., MÜLLER, B. & KNOBLOCH, K. (1989b). Alliin lyase from garlic, *Allium sativum*: Investigations on enzyme/substrate, enzyme/inhibitor interactions and on a new coenzyme. *Planta Med.*, 55, 440-445.
- JANSONIUS, J.N. (1998). Structure, evolution and action of vitamin B<sub>6</sub>-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8, 759-769.
- JEFFERY, C.J., BARRY, T., DOONAN, S., PETSKO, G.A. & RINGE, D. (1998). Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* cytosolic aspartate aminotransferase. *Protein Sci.*, 7, 1380-1387.
- JEFFREY, G.A. & SAENGER, W. (1994). Hydrogen bonding in biological structures. Springer Verlag, Berlin.
- JIN, Y.N. & CHOI, Y.-H. & YANG, C.-H. (2001). Identification of an essential tryptophan residue in alliinase from garlic (*Allium sativum*) by chemical modification. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 22, 68-76.
- JOHN, R.A. (1995). Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1248, 81-96.
- JONES, T.A., ZOU, J.Y., COWAN, S.W. & KJELDGAARD, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A*, 47, 110-119.
- KABSCH, W. (1976). A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Crystallogr. A*, 32, 922-923.
- KABSCH, W. & SANDER, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure. Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22, 2577-2637.
- KÄCK, H., SANDMARK, J., GIBSON, K., SCHNEIDER, G. & LINDQVIST, Y. (1999). Crystal structure of diaminopelargonic acid synthase: evolutionary relationships between pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *J. Mol. Biol.*, 291, 857-876.
- KAISER, J.T., CLAUSEN, T., BOURENKOW, G.P., BARTUNIK, H.-D., STEINBACHER, S. & HUBER, R. (2000). Crystal structure of a Nifs-like protein from *Thermotoga maritima*: implications for iron sulfur cluster assembly. *J. Mol. Biol.*, 297, 451-464.
- KAMATA, K., KAWAMOTO, H., HONMA, T., IWAMA, I. & KIM, S.H. (1998). Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 6630-6635.
- KAMINISHI, A. & KITA, N. (1999). Detection of Alliinase gene from total DNAs of *Amaryllidaceae* plants by PCR. *SWISS-PROT/TrEMBL Database* (<http://us.expasy.org/sprot/sprot-top.html>), ID Q9XFH5.
- KANDIL, O.M., ABDULLAH, T. & ELKADI, A. (1987). Garlic and the immune system in humans: its effect on natural killer cells. *Fed. Proc.*, 46, 441.
- KATSURA, Y., SHIROUZU, M., YAMAGUCHI, H., ISHITANI, R., NUREKI, O., KURAMITSU, S., HAYASHI, H. & YOKOYAMA, S. (2004). Crystal structure of a putative aspartate aminotransferase belonging to subgroup IV. *Proteins*, 55, 487-492.
- KAZARYAN, R.A. & GORYACHENKOVA, E.V. (1978). [Alliinase: purification and characterization]. *Biochimiya*, 43, 1905-1913 [russ.].
- KAZARYAN, R.A., KOCHERGINSKAYA, S.A. & GORYACHENKOVA, E.V. (1979). [Alliinase interactions with inhibitors]. *Bioorg. Khimiya*, 5, 1691-1699 [russ.].
- KENT, A.B., KREBS, E.G. & FISCHER, E.H. (1958). Properties of crystalline phosphorylase b. *J. Biol. Chem.*, 232, 549-558.
- KERN, A.D., OLIVEIRA, M.A., COFFINO, P. & HACKERT, M.L. (1999). Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases. *Structure*, 7, 567-581.

## Literatur

- KEUSGEN, M., SCHULZ, H., GLODEK, J., KREST, I., KRUGER, H., HERCHERT, N. & KELLER, J. (2002). Characterization of some *Allium* hybrids by aroma precursors, aroma profiles, and alliinase activity. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2884-2890.
- KIELKOPF, C.L. & BURLEY, S.K. (2002). X-ray structures of threonine aldolase complexes: structural basis of substrate recognition. *Biochemistry*, 41, 11711-11720.
- KIESEWETTER, H., JUNG, F., PINDUR, G., JUNG, E.M., MROWIETZ, C., WENZEL, E. (1991). Effect of garlic on thrombocyte aggregation, microcirculation, and other risk factors. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 29, 151-155.
- KITAMURA, N., SHIMOMURA, N., ISEKI, J., HONMA, M., CHIBA, S., TAHARA, S. & MIZUTANI, J. (1997). Cysteine-S-conjugate  $\beta$ -lyase activity and pyridoxal phosphate binding site of onion alliin lyase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1327-1330.
- KJELDGAARD, M., NISSEN, P., THIRUP, S. & NYBORG, J. (1993). The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation. *Structure*, 1, 35-50.
- KO, T.P., WU, S.P., YANG, W.Z., TSAI, H. & YUAN, H.S. (1999). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the *Escherichia coli* tyrosine aminotransferase. *Acta Crystallogr. D*, 55, 1474-1477.
- KOCH, H.P., JÄGER, W., HYSEK, J. & KÖRPERT, B. (1992). Garlic and onion extracts: *in vitro* inhibition of adenosine deaminase. *Phytother. Res.*, 6, 50-52.
- KOCH, H.P. & HAHN, G. (1988). *Knoblauch: Grundlagen der therapeutischen Anwendungen von Allium sativum L.*, 1. Auflage. Urban & Schwarzenberg, München.
- KOCH, H.P. & LAWSON, L.D. (1996). *Garlic - The science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species*, 2<sup>nd</sup> edition. Williams & Wilkins, Baltimore (MD, USA).
- KREST, I. & KEUSGEN, M. (1999a). Quality of herbal remedies from *Allium sativum*. Differences between alliinase from garlic powder and fresh garlic. *Planta Med.*, 65, 139-143.
- KREST, I. & KEUSGEN, M. (1999b). Stabilization and pharmaceutical use of alliinase. *Pharmazie* 54, 289-293.
- KREST, I., GLODEK, J. & KEUSGEN, M. (2000). Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3753-3760.
- KRUPKA, H.I., HUBER, R., HOLT, S.C. & CLAUSEN, T. (2000). Crystal structure of cystalysin from *Treponema denticola*: a pyridoxal 5'-phosphate-dependent protein acting as a haemolytic enzyme. *EMBO J.*, 19, 3168-3178.
- KUSSMAUL, W. (1945). Brief an Herrn Häfelfinger, Basel, 5.2.1945. Firmenarchiv Novartis AG, Bestand Sandoz H-211.001.
- KÜTTNER, E.B. (1999). Aufreinigung, Kristallisation und Strukturuntersuchungen des Enzyms Alliinase aus Knoblauch (*Allium sativum*). Diplomarbeit. Friedrich-Schiller-Universität, Jena. <http://www.urmel-dl.de>.
- KVANSAKUL, M., HOPF, M., RIES, A., TIMPL, R., HOHENESTER, E. (2001). Structural basis for the high-affinity interaction of nidogen-1 with immunoglobulin-like domain 3 of perlecan. *EMBO J.*, 20, 5342-5346.
- LANCASTER, J.E., SHAW, M.L., JOYCE, M.D., MCCALLUM, J.A. & MCMANUS, M.T. (2000a). A novel alliinase from onion roots. Biochemical characterization and cDNA cloning. *Plant Physiol.*, 122, 1269-1279.
- LANCASTER, J.E., SHAW, M.L. & WALTON, E.F. (2000b). S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides, alliinase and aroma in *Leucocoryne*. *Phytochemistry*, 55, 127-130.
- LANCASTER, J.E., FARRANT, J.F. & SHAW, M.L. (2000c). Effect of sulfur supply on alliinase, the flavor generating enzyme from onions. *J. Food Biochem.*, 24, 353-361.
- LANDSHUTER, J., LOHMÜLLER, E.-M. & KNOBLOCH, K. (1994). Purification and characterization of a C-S-lyase from *Ramson*, the wild garlic, *Allium ursinum*. *Planta Med.*, 60, 343-347.
- LASKOWSKI, R.A., MACARTHUR, M.W., MOSS, D.S. & THORNTON, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 26, 283-291.
- LAVAL, V., CHABANNES, M., CARRIÈRE, M., CANUT, H., BARRE, A., ROUGÉ, P., PONT-LEZICA, R. & GALAUD, J.-P. (1999). A family of *Arabidopsis* plasma membrane receptors presenting animal  $\beta$ -integrin domains. *Biochim. Biophys. Acta*, 1435, 61-70.
- LAWSON, L.D. & HUGHES, B.G. (1992). Characterization of the formation of Allicin and other thiosulfinates from garlic. *Planta Med.*, 58, 345-350.
- LAWSON, L.D. & WANG, Z.J. (1993) Pre-hepatic fate of the organosulfur compounds derived from garlic (*Allium sativum*). *Planta Med.*, 59, A688.
- LEE, B. & RICHARDS, F.M. (1971). The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.*, 55, 379-400.
- LEMAGUERES, P., IM, H., DVORAK, A., STRYCH, U., BENEDIK, M. & KRAUSE, K.L. (2003). Crystal structure at 1.45 Å resolution of alanine racemase from a pathogenic bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, contains both internal and external aldimine forms. *Biochemistry*, 42, 14752-14761.
- LE-NGUYEN, D., HEITZ, A., CHICHE, L., CASTRO, B., BOIGEGRAIN, R.A., FAVEL, A. & COLETTI-PREVIERO, M.A. (1990). Molecular recognition between serine proteases and new bioactive microproteins with a knotted structure. *Biochimie*, 72, 431-435.
- LIN, S.L. & NUSSINOV, R. (1995). A disulphide-reinforced structural scaffold shared by small proteins with diverse functions. *Nat. Struct. Biol.*, 2, 835-837.

## Literatur

- LIN, K., RATH, V.L., DAI, S.C., FLETTERICK, R.J. & HWANG, P.K. (1996). A protein phosphorylation switch at the conserved allosteric site in GP. *Science*, 273, 1539-1542.
- LINWEAVER, H. & BURK, D. (1934). Determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658-666.
- LINNÉ, C. (1770). *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus et differentiis*. I. Thomae de Trattner, Wien (Österreich).
- LO CONTE, L., CHOTHIA, C. & JANIN, J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J. Mol. Biol.*, 285, 2177-2198.
- LOUIE, G.V., YANG, W., BOWMAN, M.E. & CHOE, S. (1997). Crystal structure of the complex of Diphtheria toxin with an extracellular fragment of its receptor. *Mol. Cell*, 1, 67-78.
- LUN, Z.R., BURRI, C., MENZINGER, M. & KAMINSKY, R. (1994). Antiparasitic activity of diallyl trisulfide (Dasuansu) on human and animal pathogenic protozoa (*Trypanosoma* sp., *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*) in vitro, 74, 51-59.
- LUZATTI, V. (1952). Traitement statistique des erreurs dans la détermination des structures cristallines. *Acta Crystallogr. A*, 5, 802-810.
- MAASS, H.I. & KLAAS, M. (1995). Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 91, 89-97.
- MADSEN, D., JOHANSSON, P. & KLEYWEGT, G.J. (2002). Indonesia: An integrated sequence analysis system. <http://xray.bmc.uu.se/~dennis/>.
- MAHLER, P. & PASTERNY, K. (1924). Klinische Beobachtung über Insulinwirkung beim Diabetes mellitus. *Med. Klin.*, 11, 335-338.
- MALASHKEVICH, V.N., STROKOPYTOV, B.V., BORISOV, V.V., DAUTER, Z., WILSON, K.S. & TORCHINSKY, Y.M. (1995). Crystal structure of the closed form of chicken cytosolic aspartate aminotransferase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 247, 111-124.
- MANABE, T., HASUMI, A., SUGIYAMA, M., YAMAZAKI, M. & SAITO, K. (1998). Alliinase [S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide lyase] from *Allium tuberosum* (Chinese chive). *Eur. J. Biochem.*, 257, 21-30.
- MATTHEWS, B.W. (1968) The solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.*, 33, 491-497.
- MATSUI, I., MATSUI, E., SAKAI, Y., KIKUCHI, H., KAWARABAYASHI, H., URA, H., KAWAGUCHI, S., KURAMITSU, S. & HARATA, K. (2000). The molecular structure of hyperthermostable aromatic aminotransferase with novel substrate specificity from *Pyrococcus horikoshii*. *J. Biol. Chem.*, 275, 4871-4879.
- MATSUURA, H. (2001). Saponins in garlic as modifiers of risk of cardiovascular diseases. *J. Nutr.*, 131, 1000S-1005S.
- MAZELIS, M. (1963). Demonstration and characterization of cysteine sulfoxide lyase in the *Cruciferae*. *Phytochemistry*, 2, 15-22.
- MAZELIS, M. (1993). Catabolism of sulfur-containing amino acids. *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants*, 95-108, De Kok *et al.*, SPB Academic Publishing, The Hague (Niederlande).
- MAZELIS, M. & CREWS, L. (1968). Purification of the alliin lyase of garlic, *Allium sativum* L. *Biochem. J.*, 108, 725-730.
- MAZELIS, M. & CREVELING, L. (1975). Purification and properties of S-alkyl-cystein lyase from seedlings of *Acacia farnesia* Willd. *Biochem. J.*, 147, 485-491.
- MCPHALEN, C.A., VINCENT, M.G. & JANSONIUS, J.N. (1992a). X-ray structure refinement and comparison of three forms of mitochondrial aspartate aminotransferase. *J. Mol. Biol.*, 225, 495-517.
- MCPHALEN, C.A., VINCENT, M.G., PICOT, D., JANSONIUS, J.N., LESK, A.M. & CHOTHIA, C. (1992b). Domain closure in mitochondrial aspartate aminotransferase. *J. Mol. Biol.*, 227, 197-213.
- MPHERSON, A. (1999). *Crystallization of biological macromolecules*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour und New York (NY, USA).
- MEIER, M., JANOSIK, M., KERY, V., KRAUS, J.P. & BURKHARD, P. (2001). Structure of human cystathionine β-synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate dependent hemeprotein. *EMBO J.*, 20, 3910-3916.
- MELZIG, M.F., KRAUSE, E. & FRANKE, S. (1995). Inhibition of adenosine deaminase activity of aortic endothelial cells by extracts of garlic (*Allium sativum* L.). *Pharmazie*, 50, 359-361.
- MESSERSCHMIDT, A., WORBS, M., STEEGBORN, C., WAHL, M.C., HUBER, R., LABER, B. & CLAUSEN, T. (2003). Determinants of enzymatic specificity in the cys-met-metabolism PLP-dependent enzymes family: crystal structure of cystathionine γ-lyase from yeast and intrafamilial structure comparison. *Biol. Chem.*, 384, 373-386.
- MICHAELIS, L. & MENTEN, M.L. (1913). Kinetik der Invertasewirkung. *Biochem. Z.*, 49, 333-369.
- MIHARA, H., FUJII, T., KATO, S., KURIHARA, T., HATA, Y. & ESAKI, N. (2002). Structure of external aldimine of *Escherichia coli* CsdB, an IscS/NifS homolog: implications for its specificity toward selenocysteine. *J. Biochem.*, 131, 679-685.
- MIRELMAN, D., MONHEIT, D. & VARON, S. (1987). Inhibition of growth of *Entamoeba histolytica* by allicin, the active principle of garlic extract (*Allium sativum*). 156, 243-244.
- MOMANY, C., ERNST, S., GHOSH, R., CHANG, N.L. & HACKERT, M.L. (1995). Crystallographic structure of a PLP-dependent ornithine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a to 3.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 252, 643-655.

## Literatur

- MOTOSHIMA, H., INAGAKI, K., KUMASAKA, T., FURUICHI, M., INOUE, H., TAMURA, T., ESAKI, N., SODA, K., TANAKA, N., YAMAMOTO, M. & TANAKA, H. (2000). Crystal structure of the pyridoxal 5'-phosphate-dependent L-methionine  $\gamma$ -lyase from *Pseudomonas putida*. *J. Biochem. (Tokyo)*, 128, 349-354.
- MURAKAMI, F. (1960). [Studies on the nutritional value of *Allium* plants. XXXVII. Decomposition of alliin homologous by acetone-powdered enzyme preparation of *Bacillus subtilis*]. *Bitamin [Kyoto]*, 20, 131-135 [jap.].
- MURSHUDOV, G.N., VAGIN, A.A. & DODSON, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D*, 53, 240-255.
- NAKAI, T., OKADA, K., AKUTSU, S., MIYAHARA, I., KAWAGUCHI, S., KATO, R., KURAMITSU, S. & HIROTSU, K. (1999). Structure of *Thermus thermophilus* HB8 aspartate aminotransferase and its complex with maleate. *Biochemistry*, 38, 2413-2424.
- NAKAI, T., MIZUTANI, H., MIYAHARA, I., HIROTSU, K., TAKEDA, S., JHEE, K.H., YOSHIMURA, T. & ESAKI, N. (2000). Three-dimensional structure of 4-amino-4-deoxychorismate lyase from *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo)*, 128, 29-38.
- NAVAZA, J. (1994). *AMoRe*: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr. A*, 50, 157-163.
- NAVAZA, J. (2001). Implementation of molecular replacement in *AMoRe*. *Acta Crystallogr. A*, 57, 1367-1372.
- NOCK, L.P. & MAZELIS, M. (1986). The C-S Lyases of higher plants. Preparation and properties of homogeneous alliin lyase from garlic (*Allium sativum*). *Arch. Biochem. Biophys.*, 249, 27-33.
- NOCK, L.P. & MAZELIS, M. (1987). The C-S lyases of higher plants. Direct comparison of the physical properties of homogeneous alliin lyase of garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*). *Plant Physiol.*, 85, 1079-1083.
- NOMURA, J., NISHIZUKA, Y. & HAYAISHI, O. (1963). S-Alkylcysteinase: enzymatic cleavage of S-Methyl-L-cysteine and its sulfoxide. *J. Biol. Chem.*, 238, 1441-1446.
- O'DONOVAN, C., MARTIN, M.J., GATTIKER, A., GASTEIGER, E., BAIRICH, A. & APWEILER, R. (2002). High-quality protein knowledge resource: SWISS-PROT and TrEMBL. *Brief. Bioinform.*, 3, 275-284.
- OGISO, H., ISHITANI, R., NUREKI, O., FUKAI, S., YAMANAKA, M., KIM, J.-H., SAITO, K., SAKAMOTO, A., INOUE, M., SHIROUZU, M. & YOKOYAMA, S. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, 110, 775-787.
- OIKONOMAKOS, N.G., ZOGRAPHS, S.E., SKAMNAKI, V.T. & ARCHONTIS, G. (2002). The 1.76 Å resolution crystal structure of glycogen phosphorylase B complexed with glucose, and CP320626, a potential antidiabetic drug. *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 1313-1319.
- OKADA, K., HIROTSU, K., SATO, M., HAYASHI, H. & KAGAMIYAMA, H. (1997). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* branched-chain amino acid aminotransferase at 2.5 Å resolution. *J. Biochem. (Tokyo)*, 121, 637-641.
- OKAMOTO, A., HIGUCHI, T., HIROTSU, K., KURAMITSU, S. & KAGAMIYAMA, H. (1994). X-ray crystallographic study of pyridoxal 5'-phosphate-type aspartate aminotransferases from *Escherichia coli* in open and closed form. *J. Biochem. (Tokyo)*, 116, 95-107.
- OKAMOTO, A., NAKAI, Y., HAYASHI, H., HIROTSU, K. & KAGAMIYAMA, H. (1998). Crystal structures of *Paracoccus denitrificans* aromatic amino acid aminotransferase: a substrate recognition site constructed by rearrangement of hydrogen bond network. *J. Mol. Biol.*, 280, 443-461.
- OMI, R., GOTO, M., MIYAHARA, I., MIZUGUCHI, H., HAYASHI, H., KAGAMIYAMA, H. & HIROTSU, K. (2003). Crystal structures of threonine synthase from *Thermus thermophilus* HB8: conformational change, substrate recognition, and mechanism. *J. Biol. Chem.*, 278, 46035-46045.
- O'REILLY, M., WATSON, K.A., SCHINZEL, R., PALM, D. & JOHNSON, L.N. (1997). Oligosaccharide substrate binding in *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase. *Nat. Struct. Biol.*, 4, 405-427.
- OTWINOWSKI, Z. & MINOR, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.*, 276, 307-326.
- PALLAGHY, P.K., NIELSEN, K.J., CRAIK, D.J. & NORTON, R.S. (1994). A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded  $\beta$ -sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Prot. Sci.*, 3, 1833-1839.
- PANJIKAR, S. (2001). Crystallographic studies of bacterial single-stranded DNA-binding proteins. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena. <http://www.urmel-dl.de>.
- PARTHASARATHI, K. & SASTRY, C.A. (1959). Amino acid composition of common varieties of onion and garlic. *Indian J. Pharmacy*, 21, 283-285.
- PASTEUR, L. (1858). Mémoire sur la fermentation appelée lactique. *Mem. Soc. Imp. Sci. Agric. Lille*, 5, 13-26 [franz.].
- PATTERSON, A.L. (1934). A Fourier series method for the determination of the components of interatomic distances in crystals. *Phys. Rev.*, 46, 372-376.
- PEISACH, D., CHIPMAN, D.M., VAN OPHEM, P.W., MANNING, J.M. & RINGE, D. (1998). Crystallographic study of steps along the reaction pathway of D-amino acid amino-transferase. *Biochemistry*, 37, 4958-4967.
- PEREZ, H.A., ROSA, M.D.L. & APITZ-CASTRO, R. (1994). In vivo activity of ajoene against rodent malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38, 337-339.
- PERRAKIS, A., SIXMA, T.K., WILSON, K.S. & LAMZIN, V.S. (1997). wARP: improvement and extension of crystallographic phases by weighted averaging of multiple refined dummy atomic models. *Acta Crystallogr. D*, 53, 448-455.

## Literatur

- PETKOV, V., STOEV, V., BAKALOV, D. & PETEV, L. (1965). The Bulgarian drug Satal as a therapeutic agent in industrial lead poisoning. *Gig. Tr. Prof. Zabol.*, 9, 42-49 [russ.].
- PEUMANS, W.J., SMEETS, K., VAN NERUM, K., VAN LEUVEN, F. & VAN DAMME, E.J.M. (1997). Lectin and alliinase are the predominant proteins in nectar from leek (*Allium porrum* L.) flowers. *Planta*, 201, 298-302.
- PICOT, D., LOLL, P.J. & GARAVITO, R.M. (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*, 367, 243-249.
- PLETNEV, S.V., ANTONSON, A.A., SINITSYNA, N.I., DAUTER, Z., ISUPOV, M.N., HURS, E.N., FALIEV, N.G., WILSON, K.S., DODSON, G., DEMIDKINA, T.V. & ARUTYUNYAN, E.G. (1997). Crystallographic study of tyrosine phenol-lyase from *Erwinia herbicola*. *Crystallography reports*, 42, 809-819.
- POLTICELLI, F., PASCARELLA, S., BORDO, D., BOLOGNESI, M. & ASCENZI, P. (1999). The T-knot motif revisited. *Biol. Chem.*, 380, 1247-1250.
- PÖSCHL, E., MAYER, U., STETEFELD, J., BAUMGARTNER, R., HOLAK, T.A., HUBER, R. & TIMPL, R. (1996). Site-directed mutagenesis and structural interpretation of the nidogen binding site of the laminin  $\gamma$ 1 chain. *EMBO J.*, 15, 5154-5159.
- POWEL, K.S., GATEHOUSE, A.M.R., HILDER, V.A., VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., BOONJAWAT, J., HORSHAM, K. & GATEHOUSE, J.A. (1995). Different antimetabolic effects of related lectins towards nymphal stages of *Nilaparvata lugens*. *Entomol. Exp. Appl.*, 75, 61-65.
- RABINKOV, A., ZHU, X.-Z., GRAFI, G., GALINI, G. & MIRELMAN, D. (1994). Alliin lyase (alliinase) from Garlic (*Allium sativum*). Biochemical characterization and cDNA cloning. *Appl. Biochem. Biotech.*, 48, 149-171.
- RABINKOV, A., WILCHEK, M. & MIRELMAN, D. (1995). Alliinase (alliin lyase) from garlic (*Allium sativum*) is glycosylated at Asn<sup>146</sup> and forms a complex with a garlic mannose-specific lectin. *Glycoconj. J.*, 12, 690-698.
- RABINKOV, A., MIRO, T., KONSTANTINOVSKI, L., WILCHEK, M., MIRELMAN, D. & WEINER, L. (1998). The mode of action of alliin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1379, 233-244.
- RAHBÉ, Y., SAUVION, N., FEBVAY, G., PEUMANS, W.J. & GATEHOUSE, A.M.R. (1995). Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in pea aphids *Acyrtosiphon pisum*. *Entomol. Exp. Appl.*, 76, 143-155.
- RAMACHANDRAIAH, G., CHANDRA, N.R., SUROLIA, A. & VIJAYAN, M. (2002). Re-refinement using reprocessed data to improve the quality of the structure: a case study involving garlic lectin. *Acta Crystallogr. D*, 58, 414-420.
- RANDLE, W.M., LANCASTER, J.E., SHAW, M.L. SUTTON, K.H. & BUSSARD, M.L. (1995). Sulfur fertility affects flavour precursors and precursor intermediates in onion. *J. Am. Hort. Sci.*, 120, 1075-1081.
- RAO, Z., HANDFORD, P., MAYHEW, M., KNOTT, V., BROWNLEE, G.G. & STUART, D. (1995). The structure of Ca<sup>2+</sup>-binding epidermal growth factor-like domain: its role in protein-protein interactions. *Cell*, 82, 131-141.
- RAY, S.S., BONANNO, J.B., RAJASHANKAR, K.R., PINHO, M.G., HE, G., DE LENCASRE, H., TOMASZ, A. & BURLEY, S.K. (2002). Cocrystal structures of diaminopimelate decarboxylase: mechanism, evolution, and inhibition of an antibiotic resistance accessory factor. *Structure*, 10, 1499-1508.
- READ, R.J. (1986). Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Crystallogr. A*, 42, 140-149.
- REES, D.C. & LIPSCOMB, W.N. (1982). Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 160, 475-498.
- REES, L.P., MINNEY, S.F., PLUMMER, N.T., SLATOR, J.H. & SKYRME, D.A. (1993). A quantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 303-307.
- REGEL, E. (1875). Alliorum adhuc cognitorum monographia. *Acta Hort. Petrop.*, 3, 1-266.
- RENWICK, S.B., SNELL, K. & BAUMANN, U. (1998). The crystal structure of human cytosolic serine hydroxymethyltransferase: a target for cancer chemotherapy. *Structure*, 6, 1105-1116.
- RHEE, S., PARRIS, K.D., AHMED, S.A., MILES, E.W. & DAVIES, D.R. (1996). Exchange of K<sup>+</sup> or Cs<sup>+</sup> for Na<sup>+</sup> induces local and long-range changes in the three-dimensional structure of the tryptophan synthase  $\alpha_2\beta_2$  complex. *Biochemistry*, 35, 4211-4221.
- RHEE, S., SILVA, M.M., HYDE, C.C., ROGERS, P.H., METZLER, C.M., METZLER, D.E. & ARNONE, A. (1997) Refinement and comparisons of the crystal structures of pig cytosolic aspartate aminotransferase and its complex with 2-methylaspartate. *J. Biol. Chem.*, 272, 17293-17302.
- RIBOLDI-TUNNICLIFFE, A. & HILGENFELD, R. (1999). Cryocrystallography with oil - an old idea revived. *J. Appl. Cryst.*, 32, 1003-1005.
- RIBOLDI-TUNNICLIFFE, A., KÖNIG, B., JESSEN, S., WEISS, M.S., RAHFELD, J., HACKER, J., FISCHER, G. & HILGENFELD, R. (2001). Crystal structure of Mip, a prolylisomerase from *Legionella pneumophila*. *Nat. Struct. Biol.*, 8, 779-783.
- RO, H.S., HONG, S.P., SEO, H.J., YOSHIMURA, T., ESAKI, N., SODA, K., KIM, H.S. & SUNG, M.H. (1996). Site-directed mutagenesis of the amino acid residues in beta-strand III [Val30-Val36] of D-amino acid aminotransferase of *Bacillus* sp. YM-1. *FEBS Lett.*, 398, 141-145.
- RUDENKO, G., HENRY, L., HENDERSON, K., ICHTCHENKO, K., BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. & DEISENHOFER, J. (2002). Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science*, 298, 2353-2358.

## Literatur

- RUNDQVIST, C. (1909). Farmakokemisk undersökning af *Bulbus Allii*. *Farmaceutiskt notisblad*, 18, 323-333 [schwed.].
- RUNDQVIST, C. (1910). Pharmakochemische Untersuchung von *Bulbus Allii*. *Apotheker-Zeitung*, 25, 105.
- SAHA, S., BOYD, J., WERNER, J.M., KNOTT, V., HANFORD, P.A., CAMPBELL, I.D. & DOWNING, A.K. (2001). Solution structure of the LDL-receptor EGF-AB pair: a paradigm for the assembly of tandem calcium binding EGF domains. *Structure*, 9, 451-456.
- SAVAGE, C.R. JR., INAGAMI, T. & COHEN, S.J. (1972). The primary structure of epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, 247, 7612-7621.
- SCARSDALE, J.N., KAZANINA, G., RADAEV, S., SCHIRCH, V. & WRIGHT, H.T. (1999). Crystal structure of rabbit cytosolic serine hydroxymethyltransferase at 2.8 Å resolution: mechanistic implications. *Biochemistry*, 38, 8347-8358.
- SCARSDALE, J.N., RADAEV, S., KAZANINA, G., SCHIRCH, V. & WRIGHT, H.T. (2000). Crystal structure at 2.4 Å resolution of *E. coli* serine hydroxymethyltransferase in complex with glycine substrate and 5-formyl tetrahydrofolate. *J. Mol. Biol.*, 296, 155-168.
- SCHNEIDER, G., KÄCK, H. & LINDQVIST, Y. (2000). The manifold of vitamin B<sub>6</sub> dependent enzymes. *Structure*, 8, R1-R6.
- SCHWEINFURTH, G. (1887). Die letzten botanischen Entdeckungen in den Gräbern Ägyptens. *Botanische Jahrbücher der Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 1-16 (Engler, A.), Engelmann Verlag, Leipzig.
- SCHWERDT, W. (1949). Brief an Prof. Arthur Stoll, 26.10.1949. Firmenarchiv Novartis AG, Bestand Sandoz H-211.001.
- SCHWIMMER, S. & KJÆR, A. (1959). Purification and specificity of the C-S-lyase of *Albizia lophanta*. *Biochim. Biophys. Acta*, 42, 316-324.
- SCHWIMMER, S., CARSON, J.F., MAKOVER, R.U., MAZELIS, M. & WONG, F.F. (1960). Demonstration of alliinase in a protein preparation of onion. *Experientia*, 16, 449-450.
- SCHWIMMER, S. & MAZELIS, M. (1963). Characterization of alliinase of *Allium cepa* (Onion). *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 66-73.
- SEEBECK, E.F. (1944). 1. Bericht über *Allium*: *Allium sativum*. Übersicht über die Literatur. Firmenarchiv Novartis AG, Bestand Sandoz H-105.02, *Allium*-Berichte.
- SEEBECK, E.F. (1945a). 2. Bericht über *Allium*: Über schwefelfreie und schwefelhaltige kristallisierte Substanzen. Über eine stickstoffhaltige Fraktion. Firmenarchiv Novartis AG, Bestand Sandoz H-105.029, *Allium*-Berichte.
- SEEBECK, E.F. (1945b). 3. Bericht über *Allium*: Über eine kristallisierte, schwefelhaltige Substanz aus Bärlauch (*Allium ursinum*). Firmenarchiv Novartis AG, Bestand Sandoz H-105.029, *Allium*-Berichte.
- SEEBECK, E.F. (1945c). 4. Bericht über *Allium*: Untersuchungen über die Küchenzwiebel, *Allium cepa* L. Firmenarchiv Novartis AG, Bestand Sandoz H-105.029, *Allium*-Berichte.
- SEEBECK, E.F. (1946). 8. Bericht über *Allium*: Über die fermentative Spaltung von kristallisiertem, inaktiven Alliin zu einem Antibiotikum. Firmenarchiv Novartis AG, Bestand Sandoz H-105.029, *Allium*-Berichte.
- SEEBECK, E.F. (1947). 12. Bericht über *Allium*: Über die Konstitution von Alliin. Firmenarchiv Novartis AG, Bestand Sandoz H-105.029, *Allium*-Berichte.
- SHAW, J.P., PETSKO, G.A. & RINGE, D. (1997). Determination of the structure of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, 36, 1329-1342.
- SHEELA, C.G. & AUGUSTI, K.T. (1995). Antiperioxide effects of S-allyl cysteine sulphoxide isolated from *Allium sativum* Linn and guggulipid in cholesterol diet fed rats. *Indian J. Exp. Biol.*, 33, 337-341.
- SHIMADA, T., KUROYANAGI, M., NISHIMURA, M. & HARA-NISHIMURA, I. (1997). A pumpkin 72-kDa membrane protein precursor-accumulating vesicle has characteristics of a vacuolar sorting receptor. *Plant Cell. Physiol.*, 38, 1414-1420.
- SIEGEL, G., WALTER, A., ENGEL, S., WALPER, A. & MICHEL, F. (1999). Pleiotrope Wirkungen des Knoblauchs. *Wien. Med. Wochenschr.*, 149, 217-224.
- SIMON, D.R. (1932). Behandlung der Ruhrfolgen mit Allisatin. *Med. Klinik*, 3, 86-87.
- SINGH, U.P., PANDEY, V.N., WAGNER, K.G. & SINGH, K.G. (1990). Antifungal activity of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum* L.). *Can. J. Bot.*, 68, 1354-1356.
- SINGH, R.N., PRITHIVIRAJ, B., SINGH, U.P., SINGH, P.K. & WAGNER, K.G. (1996). Effect of ajoene on *Tetranychus urticae* Koch as compared with some pesticides. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, 103, 195-199.
- SINGH, U.P., PRITHIVIRAJ, B., SARMA, B.K., SINGH, M. & RAY, A.B. (2001). Role of garlic (*Allium sativum* L.) in human and plant diseases. *Indian J. Exp. Biol.*, 39, 310-322.
- SIVARAMAN, J., LI, Y., LAROCQUE, R., SCHRAG, J. D., CYGLER, M. & MATTE, A. (2001). Crystal structure of histidinol phosphate aminotransferase (HisC) from *Escherichia coli*, and its covalent complex with pyridoxal-5'-phosphate and L-histidinol phosphate. *J. Mol. Biol.*, 311, 761-776.
- SMEETS, K., VAN DAMME, E.J.M., VAN LEUVEN, F. & PEUMANS, W.J. (1997a). Isolation and characterization of lectins and lectin-alliinase complexes from bulbs of garlic (*Allium sativum*) and ramson (*Allium ursinum*). *Glycoconj. J.*, 14, 331-343.

## Literatur

- SMEETS, K., VAN DAMME, E.J.M. & PEUMANS, W.J. (1997b). Developmental regulation of lectin and alliinase synthesis in garlic bulbs and leaves. *Plant Physiol.*, 113, 765-771.
- SOMERS, W.S., TANG, J., SHAW, G.D. & CAMPHAUSEN, R.T. (2000). Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structure of P- and E-selectin bound to SLe<sup>x</sup> and PSGL-1. *Cell*, 103, 467-479.
- SPRANG, S. & FLETTERICK, R.J. (1979). The structure of glycogen phosphorylase alpha at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 131, 523-551.
- SRINIVASAN, N., SOWDHAMINI, R., RAMAKRISHNAN, C. & BALARAM, P. (1990). Conformations of disulfide bridges in proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 36, 147-155.
- STAMPER, G.F., MOROLLO, A.A., RINGE, D. & STAMPER, C.G. (1998). Reaction of alanine racemase with 1-aminoethylphosphonic acid forms a stable external aldimine. *Biochemistry*, 37, 10438-10445.
- STEEGBORN, C., MESSERSCHMIDT, A., LABER, B., STREBER, W., HUBER, R. & CLAUSEN, T. (1999). The crystal structure of cystathionine  $\gamma$ -synthase from *Nicotiana tabacum* reveals its substrate and reaction specificity. *J. Mol. Biol.*, 290, 983-996.
- STETEFELD, J., MAYER, U., TIMPL, R. & HUBER, R. (1996). Crystal structure of three consecutive laminin-type epidermal growth factor-like (LE) modules of laminin  $\gamma$ 1 chain harbouring the nidogen binding site. *J. Mol. Biol.*, 257, 644-657.
- STOKER, B. (1897). Dracula. Archibald Constable & Company, Westminster (Großbritannien).
- STOLL, A. (1940). Allisatin - Vortrag auf dem Kongreß für Blutkrankheiten in Osaka, März 1940. Firmenarchiv Novartis AG, Bestand Sandoz H-211.001, Allisatin.
- STOLL, A. (1949). Brief an Dr. Walther Schwerdt. Firmenarchiv Novartis AG, Bestand Sandoz H-211.001, Allisatin.
- STOLL, A. & SEEBECK, E.F. (1947). Über Alliin, die genuine Muttersubstanz des Knoblauchöls. *Experientia*, 3, 114-115.
- STOLL, A. & SEEBECK, E.F. (1949). Über die Spezifität der Alliinase und die Synthese mehrerer dem Alliin verwandter Verbindungen. 3. Mitteilung über *Allium*-Substanzen. *Helv. Chim. Acta*, 32, 866-876.
- STOLL, A. & SEEBECK, E.F. (1951). Chemical investigations on alliin, the specific principle of garlic. *Adv. Enzymol. Related Subj. Biochem.*, 11, 377-400.
- STORICI, P., CAPITANI, G., MULLER, R., SCHIRMER, T. & JANSONIUS, J.N. (1999a). Crystal structure of human ornithine aminotransferase complexed with the highly specific and potent inhibitor 5-fluoromethylornithine. *J. Mol. Biol.*, 285, 297-309.
- STORICI, P., CAPITANI, G., DE BIASE, D., MOSER, M., JOHN, R.A., JANSONIUS, J.N. & SCHIRMER, T. (1999b). Crystal structure of GABA-aminotransferase, a target for antiepileptic drug therapy. *Biochemistry*, 38, 8628-8634.
- SUETSUNA, K. (1998). Isolation and characterization of angiotension I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L. (garlic). *J. Nutr. Biochem.*, 9, 415-419.
- SUGIO, S., PETSKO, G.A., MANNING, J.M., SODA, K. & RINGE, D. (1995). Crystal structure of a D-amino acid aminotransferase: how the protein controls stereoselectivity. *Biochemistry*, 34, 9661-9669.
- SZEBENYI, D.M.E., LIU, X., KRIKSUNOV, I.A., STOVER, P.J. & THIEL, D.J. (2000). Structure of a murine cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase quinonoid ternary complex: evidence for asymmetric obligate dimers. *Biochemistry*, 39, 13313-13323.
- TAKANO, K., YAMAGATA, Y. & YUTANI, K. (2003). Buried water molecules contribute to the conformational stability of a protein. *Protein Eng.*, 16, 5-9.
- TAYLOR, M.E. & DRICKAMER, K. (2003). Introduction to glycobiology. Oxford University Press, New York (NY, USA).
- TCHERNYCHEV, B., RABINKOV, A., MIRELMAN, D. & WILCHEK, M. (1995). Natural antibodies to dietary proteins: the existence of natural antibodies to alliinase (Alliin lyase) and mannose-specific lectin from garlic (*Allium sativum*) in human serum. *Immunol. Lett.*, 47, 53-57.
- TCHERNYCHEV, B., RABINKOV, A., MIRON, T. & WILCHEK, M. (2000). Natural antibodies against alliinase in human serum and polyclonal antibodies elicited in rabbit share the same immunogenic determinants. *Immunol. Lett.*, 71, 43-47.
- TEPLYAKOV, A., OBLOMOVA, G., BADET-DENISOT, M.A. & POLIKARPOV, I. (1998). Involvement of the C terminus in intramolecular nitrogen channeling in glucosamine 6-phosphate synthase: evidence from a 1.6 Å crystal structure of the isomerase domain. *Structure*, 6, 1047-1055.
- THOMAZEAU, K., CURIEN, G., DUMAS, R. & BIOUS, V. (2001). Crystal structure of threonine synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Sci.*, 10, 638-648.
- TOH, H., URADE, Y. & TANABE, T. (1992). Molecular evolution of enzymes involved the arachidonic acid cascade. *Mediators Inflamm.*, 1, 223-233.
- TONEY, M.D., HOHENESTER, E., COWAN, S.W. & JANSONIUS, J.N. (1993). Dialkylglycine decarboxylase structure: bifunctional active site and alkali metal sites. *Science*, 261, 756-759.
- TRIVEDI, V., GUPTA, A., JALA, V.R., SARAVANAN, P., RAO, G.S.J., RAO, N.A., SAVITHRI, H.S. & SUBRAMANYA, H.S. (2002). Crystal structure of binary and ternary complexes of serine hydroxymethyltransferase from *Bacillus stearothermophilus*: insights into the catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.*, 277, 17161-17169.

## Literatur

- TRONRUD, D.E. (1997). TNT refinement package. *Methods Enzymol.*, 277, 306-319.
- TSAI, Y., COLE, L.L., DAVIS, L.E., LOCKWOOD, S.J., SIMMONS, V. & WILD, G.C. (1985). Antiviral properties of garlic: in vitro effects on influenza B, herpes simplex and coxsackie viruses. *Planta Med.*, 51, 460-461.
- TSUNO, S. (1958). [The nutritional value of *Allium* plants. XVI. Alliinase in *Allium* plants]. *Bitamin [Kyoto]*, 14, 659-664 [jap.].
- URA, H., HARATA, K., MATSUI, I. & KURAMITSU, S. (2001). Temperature dependence of the enzyme-substrate recognition mechanism. *J. Biochem. (Tokyo)*, 129, 173-178.
- URBINA, J.A., MARCHAN, E., LAZARDI, K., VISBAL, G., APITZ-CASTRO, R., GIL, F., AGUIRRE, T., PIRAS, M.M. & PIRAS, R. (1993). Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi* by ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic. *Biochem. Pharmacol.*, 45, 2381-2387.
- VAN DAMME, E.J.M., SMEETS, K., TORREKENS, S., VAN LEUVEN, F. & PEUMANS, W.J. (1992). Isolation and characterization of alliinase cDNA clones from garlic (*Allium sativum* L.) and related species. *Eur. J. Biochem.*, 209, 751-757.
- VRIEND, G. (1990). WHAT IF: a molecular modelling and drug design program. *J. Mol. Graph.*, 8, 52-56.
- VAGUINE, A.A., RICHELLE, J. & WODAK, S.J. (1999). SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with atomic model. *Acta Crystallogr. D*, 55, 191-205.
- WATANABE, N., SAKABE, K., SAKABE, N., HIGASHI, T., SASAKI, K., AIBARA, S., MORITA, Y., YONAHARA, K., TOYAMA & S., FUKUTANI, H. (1989). Crystal structure analysis of  $\omega$ -amino acid:pyruvate aminotransferase with a newly developed Weissenberg camera and an imaging plate using synchrotron radiation. *J. Biochem. (Tokyo)*, 105, 1-3.
- WEBER, I.T., JOHNSON, L.N., WILSON, K.S., YEATES, D.G., WILD, D.L. & JENKINS, J.A. (1978). Crystallographic studies on the activity of glycogen phosphorylase  $\beta$ . *Nature*, 274, 433-437.
- WEBER N.D., ANDERSEN, D.O., NORTH, J.A., MURRAY B.K., LAWSON, L.D. & HUGHES, B.G. (1992). In vitro virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Med.*, 58, 417-423.
- WEISS, M.S. (2001). Global indicators of X-ray data quality. *J. Appl. Cryst.*, 34, 130-135.
- WEISS, M.S. & HILGENFELD, R. (1997). On the use of the merging R factor as a quality indicator for X-ray data. *J. Appl. Cryst.*, 30, 203-205.
- WEN, G.Y., MATO, A., WISNIEWSKI, H.M., MALIK, M.N., JENKINS, E.C., SHEIKH, A.M. & KIM, K.S. (1995). Light and electron microscopic immunocytochemical localization of two major proteins in garlic bulb. *J. Cell. Biochem.*, 58, 481-489.
- WEYAND, M. & SCHLICHTING, I. (1999). Crystal structure of wild-type tryptophan synthase complexed with the natural substrate indole-3-glycerol phosphate. *Biochemistry*, 38, 16469-16480.
- WILSON, A.J.C. (1949). The probability distribution of X-ray intensities. *Acta Crystallogr.* 2, 318-321.
- WON, T. & MAZELIS, M. (1989). The C-S lyases of higher plants. Purification and characterization of homogenous alliin lyase of leek (*Allium porrum*). *Physiologia Plantarum*, 77, 87-92.
- YAO, M., OSE, T., SUGIMOTO, H., HORIUCHI, A., NAKAGAWA, A., YOKOI, D., MURAKAMI, T., HONMA, M., WAKATSUKI, S. & TANAKA, I. (2000). Crystal structure of l-aminocyclopropane-l-carboxylate deaminase from *Hansenula saturnus*. *J. Biol. Chem.*, 275, 34557-34565.
- YAMADA, T., KOMOTO, J., TAKATA, Y., OGAWA, H., PITOT, H.C. & TAKUSAGAWA, F. (2003). Crystal structure of serine dehydratase from rat liver. *Biochemistry*, 42, 12854-12865.
- YENNAWAR, N.H., DUNBAR, J.H., CONWAY, M., HUTSON, S.M. & FARBER, G.K. (2001). The structure of human mitochondrial branched-chain aminotransferase. *Acta Crystallogr. D*, 57, 506-515.
- YU, J., HU, S., WANG, J., KA-SHU WONG, G., LI, S., LIU, B., DENG, Y., DAI, L., ZHOU, Y., ZHANG, X., CAO, M., LIU, J., SUN, J., TANG, J., CHEN, Y., HUANG, X., LIN, W., YE, C., TONG, W., CONG, L., GENG, J., HAN, Y., LI, L., LI, W., HU, G., HUANG, X., LI, W., LI, J., LIU, Z., LI, L., LIU, J., QI, Q., LIU, J., LI, L., LI, T., WANG, X., LU, H., WU, T., ZHU, M., NI, P., HAN, H., DONG, W., REN, X., FENG, X., CUI, P., LI, X., WANG, H., XU, X., ZHAI, W., XU, Z., ZHANG, J., HE, J., ZHANG, J., XU, J., ZHANG, K., ZHENG, X., DONG, J., ZENG, W., TAO, L., YE, J., TAN, J., REN, X., CHEN, X., HE, J., LIU, D., TIAN, W., TIAN, C., XIA, H., BAO, Q., LI, G., GAO, H., CAO, T., WANG, J., ZHAO, W., LI, P., CHEN, W., WANG, X., ZHANG, Y., HU, J., WANG, J., LIU, S., YANG, J., ZHANG, G., XIONG, Y., LI, Z., MAO, L., ZHOU, C., ZHU, Z., CHEN, R., HAO, B., ZHENG, W., CHEN, S., GUO, W., LI, G., LIU, S., TAO, M., WANG, J., ZHU, L., YUAN, L. & YANG, H. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 296, 79-92.
- ZHANG, X., ROE, S.M., HOU, Y., BARTLAM, M., RAO, Z., PEARL, L.H. & DANPURE, C.J. (2003). Crystal structure of alanine:glyoxylate aminotransferase and the relationship between genotype and enzymatic phenotype in primary hyperoxaluria type I. *J. Mol. Biol.*, 331, 643-653.

## 7. ANHANG

### 7.1 Disulfidbrücken

**Tab. 7.1** Charakteristika der Alliinase-Disulfidbrücken.

Disulfidbrücke	Atome entlang Torsionswinkel $\alpha$	$\alpha$ [°]	$S_\gamma X-S_\gamma Y$ [Å]
Cys20-Cys39	$C_{\beta 20}-S_{\gamma 20}-S_{\gamma 39}-C_{\beta 39}$	-82,7 / -87,0 <sup>a</sup>	2,06 / 2,09 <sup>a</sup>
Cys41-Cys50	$C_{\beta 41}-S_{\gamma 41}-S_{\gamma 50}-C_{\beta 50}$	-85,0 / -82,3	2,05 / 2,12
Cys44-Cys57	$C_{\beta 44}-S_{\gamma 44}-S_{\gamma 57}-C_{\beta 57}$	-84,0 / -78,0	2,05 / 2,06
Cys368-Cys376	$C_{\beta 368}-S_{\gamma 368}-S_{\gamma 376}-C_{\beta 376}$	+72,1 / +74,9	2,09 / 2,12

<sup>a</sup> erste Angabe = Monomer A, zweite Angabe = Monomer B.

Die Torsionswinkel wurden mit dem Programm *PROCHECK* (LASKOWSKI, 1993) und die  $S_\gamma X-S_\gamma Y$ -Abstände mit dem Programm *O* (JONES *et al.*, 1991) für die Kristallform IV (P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>) ermittelt. Die Klassifizierung von links/rechts-gängigen Disulfidbrücken anhand  $\alpha$  (negativer/positiver Wert) richtete sich nach SRINIVASAN *et al.* (1990).

### 7.2 Intramolekulare Domänenkontakte

**Tab. 7.2** Intramolekulare Domänenkontakte, klassische Wasserstoffbrücken  $\leq 3,5$  Å.

N-terminale Domäne			C-terminale Domäne			Å	Zentrale Domäne			C-terminale Domäne			Å
His	23	Nδ1	Asp	409	Oδ2	2,72	Phe	164	N	Phe	393	O	3,04
Asn	42	Nδ2	Asp	409	Oδ2	2,74	Arg	169	Nη1	Glu	394	Oε2	3,01
Thr	43	O	Gln	413	Nε2	2,88	Arg	169	Nη1	Gly	392	O	2,95
Thr	43	Oγ1	Asp	410	Oδ1	2,60	Arg	169	Nη2	Gly	392	O	2,90
Gly	56	O	Arg	384	Nε	2,80	Asn	207	Oδ1	Arg	401	Nη1	2,87
Gly	56	O	Arg	384	Nη2	2,96	Asn	207	Nδ2	Arg	401	Nη1	3,24
Cys	57	O	Tyr	417	OH	2,68	Glu	209	O	Gln	342	Nε2	2,97
Ala	59	N	Arg	384	O	2,85	Tyr	228	OH	Tyr	363	OH	2,65
Ala	59	O	Asn	386	N	2,77	Pro	231	O	Arg	357	Nη1	2,89
Asp	60	O	Lys	406	Nζ	2,83	His	232	O	Ser	360	Oγ	2,70
Asp	60	Oδ1	Asn	386	Nδ2	3,05	His	232	O	Ser	360	O	3,14
Val	61	N	Asn	386	O	2,96	Thr	234	O	Arg	357	Nη1	3,36
Val	61	O	Ser	403	N	2,81	Ile	236	O	Asn	351	N	2,83
Ala	62	N	Asn	386	O	3,36	Lys	237	Nζ	Glu	348	Oε2	2,67
Ala	62	O	Gln	388	Nε2	3,23	Lys	308	Nζ	Tyr	352	O	2,78
Ala	62	O	Arg	401	Nη2	2,98	Gly	309	N	Thr	316	Oγ1	3,04
Ser	63	O	Ser	403	Oγ	2,80	Thr	310	O	Asp	313	N	3,06
Leu	67	N	Ile	405	O	3,15	Thr	310	Oγ1	Met	311	N	3,28
Phe	68	N	Ile	405	O	2,94	Thr	310	Oγ1	Arg	312	N	2,98
Phe	68	N	Lys	406	O	3,34							
Tyr	72	OH	Arg	312	O	2,74							
Tyr	72	OH	Leu	314	N	3,25							
Gln	75	O	Arg	312	Nη1	2,70							
Gln	75	O	Arg	312	Nη2	2,96							

Anhang

N-terminale Domäne			Zentrale Domäne			Å
Trp	73	Nε1	Thr	253	O	2,83
His	76	Nδ1	Glu	299	Oε2	2,66
Ser	80	Oγ	Lys	295	O	3,04
Tyr	92	O	Arg	287	Nη1	2,94
Ser	98	O	Ile	101	N	2,92
Ser	98	Oγ	Ile	101	O	2,81
Asn	99	O	Ile	101	N	3,11
Phe	100	O	Gln	290	Nε2	2,93

Unter einer klassischen Wasserstoffbrücke werden Kontakte des Typs O,N–H···O,N (JEFFREY & SAENGER, 1994) verstanden.

**Tab. 7.3** Intramolekulare Domänenkontakte, sonstige schwache Wechselwirkungen  $\leq 4$  Å.

N-terminale Domäne			C-terminale Domäne			Å	N-terminale Domäne			Zentrale Domäne			Å
Asn	42	Oδ1	Thr	407	Cγ2	3,62	Gly	64	O	Lys	251	Cε	3,30
Cys	44	Cβ	Gln	413	Oε1	3,84	Asp	65	Oδ1	Ser	256	Oγ	3,89
Tyr	45	Cε2	Asp	409	Oδ2	3,59	Gly	66	O	Gly	254	Cα	3,84
Tyr	45	Cε2	Gln	413	Nε2	3,53	Leu	69	Cδ1	Phe	252	O	3,40
Gly	56	Cα	Tyr	417	OH	3,42	Leu	69	Cδ1	Thr	253	C	3,54
Ser	58	Cα	Arg	384	O	3,24	Leu	69	Cδ1	Gly	254	N	3,64
Ala	59	N	Tyr	417	Cε2	3,64	Tyr	72	OH	Met	303	Cγ	3,88
Ala	59	O	Ile	385	Cα	3,61	Trp	73	Nε1	His	255	Cε1	3,52
Ala	59	Cβ	Gln	413	Cβ	3,86	Trp	73	Cη2	Val	296	Cγ1	3,59
Ala	59	Cβ	Leu	414	N	3,74	Trp	73	Cη2	Val	300	Cγ2	3,74
Asp	60	O	Asp	410	Oδ1	3,75	His	76	Cε1	Met	303	Sδ	3,81
Val	61	O	Arg	401	O	3,97	Ala	79	O	Lys	295	Nζ	3,69
Val	61	O	Leu	402	Cα	3,91	Ala	79	Cβ	Glu	299	Oε1	3,24
Val	61	Cγ2	Ile	385	Cγ2	3,87	Ser	80	Oγ	Glu	299	Cβ	3,14
Ala	62	Cβ	Thr	387	O	3,58	Ser	80	Oγ	Val	296	Cα	3,66
Ser	63	O	Lys	406	Cδ	3,54	Ala	81	O	Lys	295	Cε	3,30
Gly	64	Cα	Tyr	363	OH	3,39	Val	82	Cγ2	Leu	291	Cγ	3,79
Gly	64	Cα	Ile	405	Cδ1	3,87	Val	84	Cγ2	Leu	291	Cδ2	3,97
Gly	64	Cα	Ser	403	Oγ	3,88	His	88	Nε2	Leu	291	Cδ2	3,73
Gly	64	N	Arg	401	Nη2	3,71	Arg	89	Cβ	Arg	287	Cγ	3,73
Asp	65	O	Ile	405	O	3,19	Ser	91	O	Arg	287	Nη1	3,89
Asp	65	O	Lys	406	Cγ	3,46	Phe	94	Cε1	Ile	101	N	3,68
Gly	66	Cα	Ile	405	O	3,30	Phe	94	Cε1	Ser	102	N	3,62
Leu	67	Cβ	Thr	407	Cγ2	3,83	Phe	94	Cζ	Gln	290	Oε1	3,57
Phe	68	O	Phe	317	Cε1	3,62	Phe	94	Cζ	Arg	287	Cδ	3,41
Phe	68	Cβ	Arg	325	Nη1	3,78	Asn	99	Oδ1	Leu	275	Cδ1	3,70
Phe	68	Cδ2	Lys	321	Cβ	3,97	Asn	99	Nδ2	Tyr	271	OH	3,73
Phe	68	Cε2	Gly	318	Cα	3,71	Phe	100	C	Ile	101	Cβ	3,45
Phe	68	Cε2	Leu	322	Cγ	3,58	Phe	100	Cβ	Arg	287	Nη2	3,82
Leu	69	Cδ2	Leu	314	Cδ1	3,77	Phe	100	Cδ2	Gly	284	N	3,77
Leu	69	Cδ2	Phe	317	Cδ1	3,80	Phe	100	Cε2	Thr	279	Oγ1	3,64
Glu	71	Oε1	Lys	321	Cε	3,47	Phe	100	Cζ	Glu	283	Oε1	3,50
Glu	71	Oε1	Phe	317	Cζ	3,69							
Tyr	72	Cδ1	Phe	317	Cγ	3,69							
Tyr	72	Cε1	Asp	313	C	3,88							
Tyr	72	Cε1	Met	311	O	3,65							
His	76	Nδ1	Arg	312	Nη1	3,35							

## Anhang

Zentrale Domäne			C-terminale Domäne			Å	Zentrale Domäne			C-terminale Domäne			Å
Val	116	O	Tyr	352	Cδ1	3,59	Tyr	233	Cε1	Leu	322	Cδ1	3,36
Val	116	Cγ2	Asn	315	Nδ2	3,97	Tyr	233	Cδ1	Ser	362	Cβ	3,57
Ala	162	Cβ	Glu	394	O	3,82	Tyr	233	Cε1	Ile	405	Cγ2	3,90
Pro	163	Cα	Phe	393	O	3,08	Pro	235	N	Arg	357	Cζ	3,61
Phe	164	Cζ	Glu	394	Cδ	3,46	Pro	235	Cα	Cys	350	Sγ	3,95
Pro	166	Cδ	Phe	393	Cε2	3,56	Pro	235	Cγ	Glu	348	Oε1	3,53
Pro	166	Cγ	Gly	392	O	3,37	Ile	236	N	Cys	350	Sγ	3,35
Asn	207	Oδ1	Phe	393	Cε2	3,41	Lys	237	O	Asn	351	Nδ2	3,52
Asn	207	Oδ1	Tyr	363	Cε2	3,91	Lys	237	Cγ	Tyr	349	O	3,97
Pro	208	O	Tyr	363	Cδ2	3,49	Tyr	238	N	Asn	351	Nδ2	3,74
Pro	208	Cγ	Trp	365	Cδ2	3,32	Phe	252	O	Leu	314	Cδ2	3,45
Glu	209	O	Leu	344	Cδ2	3,54	Phe	252	Cε1	Asn	315	Oδ1	3,24
Glu	209	Cβ	Trp	365	Cδ1	3,91	Val	300	Cγ2	Trp	73	Cη2	3,74
Leu	211	Cδ2	Leu	344	Cδ2	3,75	Val	300	Cγ2	Leu	314	Cδ2	3,72
Tyr	228	Cε1	Ser	362	Oγ	3,58	Met	303	Cβ	Asp	313	Cα	3,94
Pro	231	O	Phe	319	Cβ	3,53	Val	304	Cγ2	Asp	313	Oδ1	3,81
Pro	231	Cβ	Phe	353	Cζ	3,98	Val	304	Cγ2	Tyr	352	OH	3,64
Pro	231	Cδ	Asn	315	Oδ1	3,30	Gln	307	Oε1	Arg	312	Cδ	3,62
Pro	231	Cγ	Tyr	352	Cδ2	3,65	Lys	308	Cα	Asp	313	Oδ2	3,61
His	232	Cα	Gly	318	C	3,88	Lys	308	Nζ	Arg	354	Nη1	3,91
His	232	Cα	Phe	319	N	3,61	Gly	309	N	Asp	313	Oδ2	3,61
His	232	O	Leu	322	Cδ1	3,62	Met	303	Cβ	Arg	312	O	3,27
His	232	Cε1	Asn	315	Oδ1	3,54	Val	304	Cγ2	Asn	315	Nδ2	3,39
His	232	Cε1	Leu	314	Cγ	3,95	Gln	307	O	Asp	313	Cβ	3,33
Tyr	233	Cα	Ser	360	O	3,24	Thr	310	O	Thr	316	Cβ	3,18

Als sonstige schwache Wechselwirkungen werden klassische Wasserstoffbrücken mit einer Länge  $> 3,5$  Å sowie Wasserstoffbrücken des Typs C–H $\cdots\pi$  (BRANDL *et al.*, 2001), als auch durch van-der-Waals-Kräfte bedingte Interaktionen (z.B. „hydrophobe“ Kontakte) und nicht zuletzt  $\pi\cdots\pi$ -Stapelwechselwirkungen aufgefaßt. Die Aminosäurereste, welche mehrere Interaktionen nach diesen Kriterien ausbilden, wurden jeweils nur mit dem Atompaar der kürzesten Wechselwirkungsdistanz wiedergeben. Ferner wurden die bereits unter den klassischen Wasserstoffbrücken ( $\leq 3,5$  Å) aufgeführten Aminosäurerestepartner mit weiteren möglichen Kontakten aus Übersichtsgründen hier nicht noch einmal aufgeführt. Die Grundlage zur Bestimmung der Interaktionen bildete Kristallform IV.

### 7.3 Intermolekulare Monomerkontakte

Bei der Auswahl und Zusammenstellung der Interaktionen in Kristalloform IV wurden die gleichen Maßstäbe in Bezug auf klassische Wasserstoffbrücken und sonstige schwache Wechselwirkungen angesetzt, wie im Kapitel 7.2 zu den jeweiligen Sektionen erörtert.

**Tab. 7.4** Intermolekulare Monomerkontakte, klassische Wasserstoffbrücken  $\leq 3,5 \text{ \AA}$ .

Monomer A			Monomer B			Å	Monomer A			Monomer B			Å
Thr	3	N	Glu	13	Oε2	2,71	Ser	91	Oγ	Asp	65	Oδ2	2,58
Thr	3	Oγ1	Glu	13	Oε1	2,73	Tyr	92	N	Asp	65	Oδ1	3,10
Thr	5	Oγ1	Glu	13	Oε2	2,67	Asn	95	Nδ2	Cys	41	O	2,81
Glu	11	Oε1	Lys	295	Nζ	2,93	Glu	104	Oε2	Ile	32	N	2,81
Glu	13	Oε1	Thr	3	Oγ1	2,94	Gln	134	N	Asn	281	O	3,49
Glu	13	Oε2	Thr	3	N	2,69	Gln	171	Nε2	Lys	280	O	2,90
Glu	13	Oε2	Thr	5	Oγ1	2,67	Lys	178	N	Asn	176	O	2,95
Asp	29	Oδ1	Arg	89	Nε	2,81	His	255	Nε2	Pro	86	O	2,72
Ile	32	N	Glu	104	Oε2	2,94	Ser	256	N	Met	90	O	2,88
Glu	40	Oε1	Arg	89	Nη1	2,94	Gly	257	N	Met	90	O	2,92
Glu	40	Oε2	Arg	89	Nη2	2,92	Gly	257	O	Arg	287	N	2,85
Cys	41	O	Asn	95	Nδ2	2,92	Ser	258	Oγ	Glu	288	Oε2	2,62
Asp	65	Oδ1	Tyr	92	N	3,09	Arg	259	Nε	Thr	282	O	2,83
Asp	65	Oδ2	Ser	91	Oγ	2,56	Arg	259	Nη2	Thr	282	O	3,10
Val	82	N	Val	84	O	3,14	Lys	280	O	Gln	171	Nε2	2,87
Val	82	O	Val	84	N	2,84	Asn	281	Oδ1	Asn	281	Nδ2	2,87
Val	84	N	Val	82	O	2,75	Asn	281	Nδ2	Asn	281	Oδ1	2,92
Val	84	O	Val	82	N	3,17	Thr	282	O	Arg	259	Nε	2,87
Ser	85	O	Arg	292	Nη2	2,93	Arg	287	N	Gly	257	O	2,89
His	88	O	Arg	292	Nη2	2,98	Glu	288	Oε1	Thr	289	Oγ1	3,07
His	88	Nε2	Asp	29	Oδ1	3,31	Glu	288	Oε2	Ser	258	Oγ	2,61
Arg	89	Nε	Asp	29	Oδ1	2,81	Glu	288	Oε2	Arg	292	Nη1	2,86
Arg	89	Nη1	Glu	40	Oε1	2,82	Thr	289	Oγ1	Glu	288	Oε1	3,29
Arg	89	Nη2	Glu	40	Oε2	2,83	Arg	292	Nη1	Glu	288	Oε2	2,83
Met	90	O	Ser	256	N	2,89	Arg	292	Nη2	Ser	85	O	2,99
Met	90	O	Gly	257	N	2,92	Arg	292	Nη2	His	88	O	2,91

**Tab. 7.5** Intermolekulare Monomerkontakte, sonstige schwache Wechselwirkungen  $\leq 4 \text{ \AA}$ .

Monomer A			Monomer B			Å	Monomer A			Monomer B			Å
Lys	1	O	Glu	13	Oε1	3,40	Thr	5	Oγ1	Ala	9	cβ	3,38
Met	2	Cα	Glu	13	Oε2	3,53	Met	6	sδ	Met	2	cγ	3,41
Met	2	Cε	Met	2	cβ	3,96	Lys	7	cγ	Glu	78	cγ	3,54
Met	2	Cε	Ala	9	cβ	3,44	Ala	8	O	Leu	83	cβ	3,80
Met	2	sδ	Met	6	cγ	3,84	Ala	8	cβ	Ala	81	O	3,56
Trp	4	O	Glu	78	Cα	3,34	Ala	9	C	Met	2	Cε	3,56
Trp	4	cδ1	Lys	77	Cε	3,68	Ala	9	cβ	Thr	5	Oγ1	3,34
Trp	4	Nε1	Glu	13	cγ	3,78	Glu	10	N	Met	2	Cε	3,56
Trp	4	cζ2	Ala	12	O	3,88	Ala	12	O	Trp	4	cζ2	3,86
Trp	4	cζ3	Ala	81	cβ	3,90	Ala	12	cβ	Leu	83	cβ	3,75

Anhang

Monomer A			Monomer B			Å
Glu	13	C $\gamma$	Trp	4	N $\epsilon$ 1	3,70
Glu	13	C $\delta$	Met	2	C $\epsilon$	3,52
Ala	16	C $\beta$	Trp	87	C $\zeta$ 2	3,83
Ala	16	C $\beta$	Trp	4	C $\zeta$ 2	3,88
Phe	27	C $\epsilon$ 1	Arg	89	N	3,37
Phe	27	C $\epsilon$ 1	Trp	87	O	3,62
Phe	27	C $\epsilon$ 1	His	88	C $\alpha$	3,80
Leu	28	C $\beta$	Leu	291	C $\delta$ 1	3,71
Leu	28	C $\delta$ 1	Leu	83	O	3,41
Leu	28	C $\delta$ 1	Val	82	C $\gamma$ 2	3,72
Asp	29	O	Glu	104	C $\gamma$	3,88
Asp	29	C $\beta$	Leu	294	C $\delta$ 2	3,53
Asp	29	O $\delta$ 1	His	88	C $\epsilon$ 1	3,34
Asp	29	O $\delta$ 2	Leu	291	C $\alpha$	3,79
Gly	30	N	Arg	89	N $\eta$ 2	3,62
Gly	30	O	Glu	104	C $\gamma$	3,53
Ile	31	C $\alpha$	Glu	104	O $\epsilon$ 2	3,51
Ile	31	C $\gamma$ 1	Phe	103	C $\delta$ 2	3,96
Glu	40	O $\epsilon$ 1	Asn	95	C $\beta$	3,48
Ser	63	O $\gamma$	Phe	93	C $\epsilon$ 2	3,80
Gly	64	O	Tyr	92	C $\epsilon$ 1	3,50
Asp	65	O $\delta$ 2	Phe	93	C $\delta$ 2	3,74
Leu	67	C $\delta$ 2	Ser	91	N	3,90
Leu	69	C	Met	90	C $\epsilon$	3,74
Glu	70	C $\alpha$	Met	90	S $\delta$	3,59
Glu	70	C $\gamma$	Trp	87	C $\beta$	3,97
Trp	73	C $\beta$	Pro	86	O	3,42
Trp	73	C $\delta$ 1	Met	90	C $\epsilon$	3,66
Lys	74	C $\gamma$	Trp	87	C $\delta$ 2	3,68
His	76	O	Pro	86	C $\gamma$	3,74
Lys	77	C $\alpha$	Pro	86	C $\gamma$	3,71
Lys	77	C $\delta$	Trp	87	C $\zeta$ 3	3,47
Lys	77	C $\epsilon$	Trp	4	C $\delta$ 1	3,80
Glu	78	C $\alpha$	Trp	4	O	3,38
Glu	78	C $\gamma$	Lys	7	C $\beta$	3,72
Ser	80	O $\gamma$	Pro	86	C $\beta$	3,03
Ala	81	C $\alpha$	Val	84	O	3,50
Ala	81	C $\alpha$	Pro	86	C $\delta$	3,89
Ala	81	O	Ala	8	C $\beta$	3,47
Val	82	O	Leu	83	C $\delta$ 2	3,85
Val	82	C $\alpha$	Ala	8	C $\beta$	4,00
Val	82	C $\gamma$ 2	Leu	28	C $\delta$ 1	3,75
Leu	83	O	Leu	28	C $\delta$ 1	3,31
Leu	83	C $\beta$	Ala	8	O	3,75
Leu	83	C $\delta$ 1	Ala	12	C $\beta$	3,66
Leu	83	C $\delta$ 2	Leu	83	C $\delta$ 2	3,90
Val	84	O	Ala	81	C $\alpha$	3,48
Val	84	C $\gamma$ 1	Arg	292	N $\epsilon$	3,51
Pro	86	C	Arg	292	N $\eta$ 2	3,47
Pro	86	O	Trp	73	C $\beta$	3,42
Pro	86	O	His	255	C $\epsilon$ 1	3,55

Monomer A			Monomer B			Å
Pro	86	C $\beta$	Ser	80	C $\beta$	3,60
Pro	86	C $\gamma$	Lys	77	C $\alpha$	3,74
Pro	86	C $\gamma$	His	76	O	3,67
Pro	86	C $\delta$	Ala	81	C $\alpha$	3,88
Trp	87	N	Arg	292	N $\eta$ 2	3,82
Trp	87	O	Phe	27	C $\epsilon$ 1	3,66
Trp	87	C $\beta$	Glu	70	C $\gamma$	3,95
Trp	87	C $\delta$ 2	Lys	74	C $\gamma$	3,67
Trp	87	C $\zeta$ 2	Ala	16	C $\beta$	3,70
Trp	87	C $\zeta$ 3	Lys	77	C $\gamma$	3,54
His	88	N $\delta$ 2	Phe	27	C $\delta$ 1	3,87
Arg	89	N	Phe	27	C $\epsilon$ 1	3,33
Arg	89	O	Gly	257	C $\alpha$	3,72
Arg	89	N $\eta$ 2	Gly	30	C $\alpha$	3,63
Met	90	O	His	255	C	3,73
Met	90	C $\beta$	Gly	254	O	3,22
Met	90	S $\delta$	Glu	70	C $\alpha$	3,58
Met	90	C $\epsilon$	Thr	253	O	3,52
Met	90	C $\epsilon$	Trp	73	C $\delta$ 1	3,74
Met	90	C $\epsilon$	Leu	69	C	3,70
Ser	91	C $\beta$	Leu	67	C $\delta$ 2	3,73
Tyr	92	C $\epsilon$ 1	Gly	64	O	3,46
Tyr	92	C $\epsilon$ 2	Arg	259	N $\eta$ 2	3,43
Tyr	92	N	Asp	65	O $\delta$ 2	3,62
Tyr	92	C $\epsilon$ 1	Ser	256	O $\gamma$	3,55
Tyr	92	OH	Ser	250	C $\beta$	3,52
Tyr	92	OH	Lys	251	N $\zeta$	3,86
Phe	93	C $\delta$ 2	Asp	65	O $\delta$ 2	3,77
Phe	93	C $\epsilon$ 2	Ser	63	O $\gamma$	3,51
Asn	95	C $\beta$	Glu	40	O $\epsilon$ 1	3,62
Phe	103	C $\delta$ 1	Ile	31	C $\gamma$ 1	3,68
Glu	104	C $\gamma$	Asp	29	O	3,89
Glu	104	O $\epsilon$ 2	Ile	31	C $\alpha$	3,30
Val	130	C $\gamma$ 1	Thr	282	C $\beta$	3,60
Thr	133	O $\gamma$ 1	Glu	283	C $\gamma$	3,85
Thr	133	C $\gamma$ 2	Asn	281	O	3,57
Thr	133	C $\gamma$ 2	Lys	280	O	3,77
Ile	141	C $\gamma$ 2	Tyr	174	OH	3,58
Thr	148	O $\gamma$ 1	Asn	176	N $\delta$ 2	3,60
Glu	170	O	Lys	280	C $\epsilon$	3,75
Tyr	174	C $\delta$ 2	Lys	280	C $\gamma$	3,62
Tyr	174	C $\epsilon$ 1	Asn	276	N $\delta$ 2	3,35
Tyr	174	OH	Tyr	277	C $\alpha$	3,23
Tyr	174	OH	Ile	141	C $\gamma$ 2	3,66
Phe	175	C $\epsilon$ 1	Tyr	277	C $\epsilon$ 1	3,34
Phe	175	C $\epsilon$ 2	Lys	280	O	3,90
Phe	175	C $\delta$ 1	Lys	177	N $\zeta$	3,50
Asn	176	O	Lys	178	C $\gamma$	3,23
Lys	177	C $\beta$	Lys	177	C $\epsilon$	3,27
Lys	177	C $\gamma$	Asn	176	O	3,14
Lys	177	C $\epsilon$	Tyr	174	O	3,18

Monomer A			Monomer B			Å
Lys	177	Nζ	Phe	175	C	3,88
Ser	250	Cβ	Tyr	92	OH	3,47
Lys	251	Nζ	Tyr	92	OH	3,66
Thr	253	O	Met	90	Cε	3,48
Gly	254	O	Met	90	Cβ	3,25
His	255	C	Met	90	O	3,76
Ser	256	Oγ	Tyr	92	Cε1	3,47
Gly	257	O	Pro	286	C	3,67
Ser	258	O	Pro	286	Cβ	3,30
Gly	257	Cα	Ser	91	O	3,25
Gly	257	Cα	Arg	89	O	3,64
Arg	259	Cγ	Pro	286	Cα	3,88
Arg	259	Nη1	Tyr	92	Cε2	3,49
Arg	259	Nη2	Glu	283	Cβ	3,58
Asn	276	Nδ2	Tyr	174	Cε1	3,40
Tyr	277	Cβ	Tyr	174	OH	3,32
Tyr	277	Cε1	Phe	175	Cε1	3,42
Tyr	277	OH	Asn	281	Nδ2	3,53
Lys	280	O	Thr	133	Cγ2	3,85
Lys	280	O	Phe	175	Cε2	3,90
Lys	280	Cγ	Tyr	174	Cδ2	3,69
Lys	280	Cε	Glu	170	O	3,64

Monomer A			Monomer B			Å
Asn	281	O	Gln	134	Cα	3,28
Asn	281	O	Thr	133	Cγ2	3,70
Asn	281	Nδ2	Tyr	277	OH	3,56
Thr	282	Cβ	Val	130	Cγ1	3,70
Glu	283	O	Arg	259	Nε	3,54
Glu	283	Cγ	Thr	133	Oγ1	3,84
Pro	286	Cα	Gly	257	O	3,47
Pro	286	Cα	Arg	259	Cγ	3,88
Pro	286	Cβ	Ser	258	O	3,36
Pro	286	Cβ	Thr	289	Oγ1	3,34
Pro	286	Cγ	Pro	286	Cγ	3,62
Glu	288	Cβ	Glu	288	Cβ	3,51
Glu	288	Oε2	Arg	292	Cβ	3,94
Thr	289	Oγ1	Pro	286	Cβ	3,31
Leu	291	Cα	Asp	29	Oδ2	3,81
Leu	291	Cδ1	Leu	28	Cβ	3,88
Arg	292	Nε	Val	84	Cγ1	3,43
Arg	292	Cζ	His	88	O	3,61
Arg	292	Nη2	Pro	86	C	3,53
Arg	292	Nη2	Trp	87	N	3,83
Leu	294	Cδ2	Asp	29	Cβ	3,52

## 7.4 ω-Dihedralwinkelabweichungen > 3 σ

**Tab. 7.6** Differenzen der ω-Winkel zu 180° bzw. 0° in Monomer A, B.

Aminosäure	92	93	206	207	208	213	232	234	363	365	387
Monomer A	11,3	(10,2)	(9,6)	18,2	12,3	(7,0)	12,9	(8,8)	(8,9)	(7,0)	(10,4)
Monomer B	(9,5)	11,3	11,9	24,5	16,0	11,3	13,1	13,9	12,6	12,5	11,9

Winkelabweichungen < 3 σ (Δ = 8,3° zum Mittelwert mit 177,1°, entsprechend Δ = 11,1° zu 180°) sind in Klammern vermerkt. Die Werte beziehen sich auf Kristallform IV.

## 7.5 Kristallkontakte

Bei der Auswahl und Zusammenstellung der Interaktionen wurden die gleichen Maßstäbe in Bezug auf klassische Wasserstoffbrücken und sonstige schwache Wechselwirkungen angesetzt, wie im Kapitel 7.2 zu den jeweiligen Sektionen erörtert.

In den folgenden Tabellen bezeichnen die Buchstaben A oder B nach einer Aminosäurerestnummer das jeweilige Alliinase monomer A oder B.

### 7.5.1 Kristallform III (P2<sub>1</sub>)

**Tab. 7.7** Kristallkontakte Kristallform III, klassische Wasserstoffbrücken  $\leq 3,5 \text{ \AA}$ .

Aminosäure 1			Aminosäure 2			Å
Asn	19A	Nδ2	Gln	55B	O	2,98
Glu	34A	Oε2	His	161B	Nε2	2,38
Gly	35A	N	Ala	187B	O	2,80
Gln	55A	Nε2	Ala	187A	O	3,35
Gln	75A	Nε2	Asn	382B	Oδ1	3,50
Asp	123A	Oδ2	Asn	194B	Nδ2	2,65
Asp	152A	O	Lys	423A	Nζ	3,22
Asp	152A	Oδ1	Tyr	349B	OH	2,78
Lys	157A	Nζ	Asp	420A	Oδ1	3,47
Asn	191A	O	Arg	384A	Nε	2,95

Aminosäure 1			Aminosäure 2			Å
Gln	197A	Nε2	Asp	420A	O	3,23
Tyr	198A	OH	Asp	420A	Oδ2	2,58
Glu	268A	Oε1	Glu	78B	Oε1	2,51
Lys	305A	O	Glu	268B	Oε1	2,57
Lys	305A	Nζ	Asp	267B	Oδ2	3,41
Lys	305A	Nζ	Glu	268B	Oε1	2,94
Asp	334A	O	Met	356B	N	2,70
Glu	343A	Oε2	Gln	346B	Nε2	2,89
Glu	34B	Oε1	His	214B	Nε2	2,47
Gly	47B	N	Asx	191B	O25	3,05

**Tab. 7.8** Kristallkontakte Kristallform III, sonstige schwache Wechselwirkungen  $\leq 4 \text{ \AA}$ .

Aminosäure 1			Aminosäure 2			Å
Met	6A	Cγ	Glu	268A	Oε2	3,98
Met	6A	Cε	Asn	272A	Oδ1	3,75
Asn	19A	Nδ2	Ile	54B	Cγ2	3,58
Ile	32A	Cγ2	Asn	188B	O	3,64
Ile	32A	Cγ2	Ala	187B	O	3,91
Ile	32A	Cδ1	Val	190B	Cγ2	3,59
Gly	35A	Cα	Tyr	189B	O	3,39
Gly	35A	C	Val	190B	Cγ2	3,73
Gly	35A	O	Asx	191B	O5	3,74
Ser	36A	N	Val	190B	Cγ2	3,83
Ser	36A	Oγ	Asx	191B	C5	3,60
Gln	55A	Nε2	Asn	188A	Cα	3,47
Gly	56A	Cα	Val	190A	O	3,15
Lys	77A	Nζ	Gln	378B	Oε1	3,82
Pro	96A	Cβ	Asx	191B	O11	3,67
Lys	122A	O	Glu	196B	Oε2	3,71
Pro	154A	Cγ	Lys	423A	O	3,31

Aminosäure 1			Aminosäure 2			Å
Val	192A	Cγ1	Tyr	416A	OH	3,62
Ser	193A	Cβ	Asn	382A	O	3,02
Ser	193A	Oγ	Gly	383A	Cα	3,43
Asn	194A	Oδ1	Ala	424A	Cβ	3,85
Asn	194A	Nδ2	Asp	420A	O	3,92
Gln	197A	Nε2	Ala	424A	Cα	3,65
Thr	306A	Cγ2	Glu	268B	Oε2	3,13
Lys	320A	Cδ	Lys	427B	Nζ	3,68
Gln	335A	O	Tyr	349B	Cε2	3,65
Ser	336A	O	Met	356B	Cγ	3,32
Asp	337A	Cα	Met	356B	Sδ	3,65
Glu	34B	O	Asp	241B	Cβ	3,62
Glu	34B	Oε1	Tyr	238B	Cε1	3,12
Glu	34B	Oε1	Glu	242B	Oε2	3,95
Gly	35B	Cα	Asp	241B	Oδ2	3,54
Thr	46B	Oγ1	Asx	191B	C25	2,88
Gly	47B	Cα	Asx	191B	O25	3,08

Die Aminosäurebezeichnung Asx ist stellvertretend für einen glykosylierten Asn-Rest. Ferner handelt es sich bei den genannten Atomen um Atome des angehängten Zuckerrests und nicht des ursprünglichen Asn-Rests.

7.5.2 Kristallform IV (P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>)

Tab. 7.9 Kristallkontakte Kristallform IV, klassische Wasserstoffbrücken ≤ 3,5 Å.

Aminosäure 1			Aminosäure 2			Å
Lys	7A	Nζ	Lys	237B	O	2,80
Glu	34A	Oε1	Arg	323B	Nε	2,72
Glu	34A	Oε1	Arg	323B	Nη2	2,59
Gly	35A	O	Ser	347B	Oγ	2,66
His	214A	Nε2	Gln	55B	O	2,75
Lys	239A	Nζ	Asp	420B	Oδ1	2,97
Lys	239A	Nζ	Asp	420B	Oδ2	3,07
Asp	241A	N	Gln	55B	Oε1	2,96
Glu	242A	N	Gln	55B	Oε1	2,95

Aminosäure 1			Aminosäure 2			Å
Asn	351A	Nδ2	Asn	382B	O	3,34
Arg	354A	Nη1	Lys	425B	O	2,38
Arg	354A	Nη1	Arg	426B	O	3,15
Arg	354A	Nη2	Lys	425B	O	2,56
Arg	213B	Nη1	Lys	305B	O	3,05
Arg	213B	Nη2	Thr	306B	O	3,38
His	214B	O	Gln	307B	Nε2	3,13
Ala	215B	O	Gln	307B	Nε2	3,21

Aminosäure 1		Å	Sulfat-Ion		Å	Aminosäure 2				
Ala*	187B	Cβ	3,56	Sul	3	O1	2,75	Arg	354B	Nη2
His	161B	Nε2	2,72	Sul	3	O2				
				Sul	3	O3	2,85	Lys	308B	Nζ
				Sul	3	O3	3,03	Arg	354B	Nη1
				Sul	4	O1	2,69	Arg	384B	Nη1
Lys	237A	Nζ	2,62	Sul	4	O2				
				Sul	4	O3	3,06	Arg	384B	Nη2

\* Ala-187B bildet einen van-der-Waals-Kontakt mit Sul-3 aus.

Tab. 7.10 Kristallkontakte Kristallform IV, sonstige schwache Wechselwirkungen ≤ 4 Å.

Aminosäure 1			Aminosäure 2			Å
Lys	7A	Cε	Asn	351B	Oδ1	3,59
Glu	10A	Oε1	Tyr	349B	Cε1	3,43
Ile	32A	Cδ1	Ser	347B	Cβ	3,41
Ile	32A	Cγ2	Gln	346B	O	3,80
Glu	34A	O	Pro	358B	Cδ	3,72
Glu	34A	Oε1	Val	327B	Cγ2	3,92
Gly	35A	Cα	Gln	346B	O	3,36
Gly	35A	Cα	Pro	358B	N	3,57
Gly	35A	O	Met	356B	Cβ	3,25
Ser	36A	Oγ	Met	356B	Cβ	3,84
Ala	120A	Cβ	Tyr	416B	OH	3,90
Ser	193A	Cβ	Glu	34B	Oε1	3,18
Pro	195A	Cγ	Pro	48B	Cγ	3,69
His	214A	Cδ2	Ile	54B	Cγ2	3,47
Lys	218A	O	Pro	48B	Cδ	3,50
Lys	218A	C	Gly	47B	Cα	3,81
Lys	218A	Cδ	Thr	46B	Oγ1	3,68
Gly	219A	Cα	Glu	52B	Cγ	3,80
Tyr	224A	Cδ2	Gln	55B	Nε2	3,45
Met	226A	Sδ	Gln	55B	Nε2	3,36
Lys	237A	O	Arg	384B	Cδ	3,40

Aminosäure 1			Aminosäure 2			Å
Tyr	238A	Cγ	Gly	56B	Cα	3,35
Tyr	238A	Cδ2	Arg	384B	Cζ	3,86
Lys	239A	Cε	Tyr	416B	OH	3,61
Ala	240A	Cβ	Gln	55B	Oε1	3,37
Asp	241A	Oδ2	Tyr	416B	OH	3,82
Glu	242A	Oε2	Lys	53B	O	3,56
Leu	245A	Cδ2	Gln	55B	Oε1	3,82
Arg	338A	Nη2	Ala	149B	O	3,68
Tyr	349A	Cδ1	Asn	382B	Nδ2	3,37
Arg	354A	Nη2	Glu	372B	Oε1	3,91
Arg	354A	Nη2	Trp	370B	Cζ3	3,84
Glu	372A	Cβ	Thr	150B	Cγ2	3,99
Asn	382A	Nδ2	Pro	151B	Cγ	3,77
Lys	107B	Nζ	Gln	346B	Cγ	3,97
Glu	111B	Oε2	Glu	343B	Cβ	3,56
Val	190B	Cβ	Gly	309B	O	3,61
Val	190B	Cγ1	Lys	308B	O	3,95
Leu	212B	O	Thr	306B	Cγ2	3,05
Val	216B	O	Thr	310B	Cγ2	3,40
Val	216B	Cγ1	Thr	306B	O	3,95

## 7.6 Ursachen ungewöhnlicher Dihedralwinkel

Tab. 7.11 Mögliche Ursachen von Dihedralwinkelabweichungen.

Positionen	Dihedralwinkelmerkmal	Erklärung bzw. Interaktionen ( $\leq 4 \text{ \AA}$ )
89, 92, 93, 96	$\Delta \omega > 3 \sigma$ , $\varphi, \psi$ (R89) in den noch- erlaubten Gebieten des Ramachandran-Plots, $\omega$ in <i>cis</i> (P96)	R89 <sub>Ne</sub> ...D29* <sub>O<math>\delta</math>1</sub> R89 <sub>N<math>\eta</math>1/N<math>\eta</math>2</sub> ...E40* <sub>O<math>\epsilon</math>1/O<math>\epsilon</math>2</sub> M90 <sub>O</sub> ...S256* <sub>N</sub> /G257* <sub>N</sub> S91 <sub>O<math>\gamma</math></sub> ...D65* <sub>O<math>\delta</math>2</sub> Y92 <sub>N</sub> ...D65* <sub>O<math>\delta</math>1</sub> , Y92 <sub>OH</sub> ...PLP* <sub>O<math>2</math>P</sub> Chloridbindung (Cl...F94 <sub>N</sub> /S98 <sub>N</sub> /F100 <sub>N</sub> )
163	$\omega$ in <i>cis</i> (P163)	F164 <sub>N</sub> ...F393 <sub>O</sub>
206-208, 213	$\Delta \omega > 3 \dots 5 \sigma$ $\omega$ in <i>cis</i> (P205, P208)	N207 <sub>N<math>\delta</math>2</sub> ...PLP-O3/AA <sub>OXT A</sub> , N207 <sub>O<math>\delta</math>1/N<math>\delta</math>2</sub> ...R401 <sub>N<math>\eta</math>1</sub> , N207 <sub>O<math>\delta</math>1</sub> ...F393 <sub>C<math>\epsilon</math>2</sub> /Y363 <sub>C<math>\epsilon</math>2</sub> P208 <sub>O</sub> ...Y363 <sub>C<math>\delta</math>2</sub> , P208 <sub>C<math>\gamma</math></sub> ...W365 <sub>C<math>\delta</math>2</sub> E209 <sub>O</sub> ...L344 <sub>C<math>\delta</math>2</sub> , E209 <sub>C<math>\beta</math></sub> ...W365 <sub>C<math>\delta</math>1</sub> R213 <sub>N<math>\eta</math>1/N<math>\eta</math>2</sub> ...K305 <sup>#</sup> <sub>O</sub> /T306 <sup>#</sup> <sub>O</sub> (nur Monomer B) R213 <sub>N</sub> ...S204 <sub>O<math>\gamma</math></sub>
232, 234	$\Delta \omega > 3 \sigma$	P231 <sub>O</sub> ...F319 <sub>C<math>\beta</math></sub> , P231 <sub>C<math>\beta</math></sub> ...F353 <sub>C<math>\zeta</math></sub> , P231 <sub>C<math>\delta</math></sub> ...N315 <sub>O<math>\delta</math>1</sub> , P231 <sub>C<math>\gamma</math></sub> ...Y352 <sub>C<math>\delta</math>2</sub> , P231 <sub>O</sub> ...R357 <sub>N<math>\eta</math>1</sub> H232 <sub>C<math>\alpha</math></sub> ...G318 <sub>C</sub> , H232 <sub>C<math>\alpha</math></sub> ...F319 <sub>N</sub> , H232 <sub>O</sub> ...L322 <sub>C<math>\delta</math>1</sub> , H232 <sub>C<math>\epsilon</math>1</sub> ...N315 <sub>O<math>\delta</math>1</sub> , H232 <sub>O</sub> ...S360 <sub>O<math>\gamma</math></sub> Y233 <sub>C<math>\alpha</math></sub> ...S360 <sub>O</sub> T234 <sub>O</sub> ...R357 <sub>N<math>\eta</math>1</sub>
363, 365	$\Delta \omega > 3 \sigma$	Y363 <sub>OH</sub> ...Y228 <sub>OH</sub> , Y363 <sub>OH</sub> ...G64 <sub>C<math>\alpha</math></sub> , Y363 <sub>C<math>\delta</math>2</sub> ...P208 <sub>O</sub> W365 <sub>C<math>\delta</math>2</sub> ...P208 <sub>C<math>\gamma</math></sub> , W365 <sub>C<math>\delta</math>1</sub> ...E209 <sub>C<math>\beta</math></sub>
387	$\Delta \omega > 3 \sigma$	N386 <sub>N</sub> ...A59 <sub>O</sub> , N386 <sub>O</sub> ...V61 <sub>N</sub> , N386 <sub>O</sub> ...A62 <sub>N</sub> T387 <sub>O</sub> ...A62 <sub>C<math>\beta</math></sub> Q388 <sub>N<math>\epsilon</math>2</sub> ...A62 <sub>O</sub> , Q388 <sub>N<math>\epsilon</math>2</sub> ...HEPES <sub>O<math>3</math>S</sub>

Berücksichtigt wurden in Kristallform IV die möglichen Interaktionen der genannten Aminosäuren sowie der direkten Vorgänger- oder Nachfolgerpositionen. \* bezeichnet die Aminosäurereste und Kofaktormoleküle des Nachbarmonomers und # die eines anderen Dimers im Kristallverband.

7.7  $\omega$ -Winkel der „angespannten“ Schleife von PLP-Klasse I-EnzymenTab. 7.12  $\omega$ -Dihedralwinkel der „angespannten“ Schleife von PLP-Klasse I-Enzymen.

Enzym	Organismus	N207 <sup>a</sup>	Referenz				Kettenpositionen / Aminosäurereste <sup>e</sup> / $\omega$ -Winkel [°] <sup>f</sup>							Mon. <sup>g</sup>	
			PDB	Auf. <sup>b</sup>	Verfein. <sup>c</sup>	Konf. <sup>d</sup>	204	205	206	207	208	209	210		211
Alliinase	Knoblauch	N207					SER	PRO	ASN	ASN	PRO	GLU	GLY	LEU	
			1LK9	1,53	REFMAC	g	-4,1	-176,8	170,4	18,2	-167,7	174,6	176,6	175,1	A
							-9,8	-179,1	168,1	24,5	-164,0	173,0	175,5	171,8	B
			(P2 <sub>1</sub> )	1,87	REFMAC	g	-2,7	-176,0	172,3	13,2	-169,4	175,5	177,2	178,9	A
						-6,0	-174,9	170,2	17,5	-169,8	174,6	176,4	175,7	B	
AroAT	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	N171	MATSUI <i>et al.</i> , 2000				168	169	170	171	172	173	174	175	
							SER	PRO	CYS	ASN	PRO	THR	GLY	ALA	
			1DJU	2,10	X-PLOR	"o"	-4,5	-170,3	169,4	15,5	-171,7	-168,9	-178,5	168,3	A
							-11,0	-170,6	169,4	19,1	-169,9	-171,9	-178,4	169,8	B
TAT	<i>Trypanosoma cruzi</i>	N188	BLANKENFELDT <i>et al.</i> , 1999				185	186	187	188	189	190	191	192	
							ASN	PRO	SER	ASN	PRO	CYS	GLY	SER	
			1BW0	2,80	REFMAC	"o"	-5,3	-172,1	169,7	10,8	-172,9	-177,7	-179,2	177,5	A
							-4,6	-174,2	172,2	12,4	-174,0	-176,2	-179,0	178,1	B
HPAT	<i>Escherichia coli</i>	N157	SIVARAMAN <i>et al.</i> , 2001; HARUYAMA <i>et al.</i> , 2001				154	155	156	157	158	159	160	161	
							SER	PRO	ASN	ASN	PRO	THR	GLY	GLN	
			1FG7	1,50	CNS	"o"	0,1	-177,5	176,2	0,9	-176,4	176,1	-178,1	178,2	A
			1GEX	2,20	X-PLOR	"g"	0,2	-178,6	177,2	0,7	-176,7	177,2	-178,2	179,3	A
AAT	<i>Thermus thermophilus</i>	N175	NAKAI <i>et al.</i> , 1999				172	173	174	175	176	177	178	179	
							SER	PRO	ASN	ASN	PRO	THR	GLY	ALA	
			1BJW	1,80	X-PLOR	"o"	0,2	-174,7	174,2	1,3	-176,6	-178,2	-179,7	177,7	A
							-0,5	-174,3	172,9	1,8	-175,2	-179,0	-179,4	177,4	B
							-0,1	-175,2	174,5	0,5	-175,1	179,6	-179,5	177,4	A
			1BKG	2,60	X-PLOR	"g"	-0,5	-175,0	175,1	0,3	-176,6	-179,8	-179,2	177,4	B
							0,0	-175,3	175,3	1,2	-175,6	179,9	-179,8	177,5	C
							-0,2	-174,6	175,1	0,5	-175,4	-178,8	-179,3	177,8	D
AAT	<i>Phormidium lapideum</i>	N174	KIM <i>et al.</i> , noch nicht publiziert				171	172	173	174	175	176	177	178	
							THR	PRO	SER	ASN	PRO	THR	GLY	MET	
			1J32	2,10	CNS	"o"	-0,4	-177,1	173,3	1,0	-176,0	-179,0	179,8	179,6	A
							-0,7	-175,5	173,3	0,9	-176,9	-178,3	-179,5	-179,8	B
AAT	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	N171	URA <i>et al.</i> , 2001				168	169	170	171	172	173	174	175	
							SER	PRO	CYS	ASN	PRO	THR	GLY	ALA	
			1GD9	1,80	X-PLOR	"o"	-0,4	-176,3	173,8	1,3	-176,0	-178,3	179,3	178,8	A
							0,3	-176,6	174,3	0,1	-176,3	-177,7	-179,8	177,9	B
			1GDE	1,80	X-PLOR	"g"	-0,5	-176,6	173,9	1,0	-174,8	-178,8	-180,0	178,2	A
							-0,3	-176,9	174,5	0,5	-175,9	-177,4	-179,4	178,0	B

Cystalsin	<i>Treponema denticola</i>	N175	KRUPKA <i>et al.</i> , 2000				172	173	174	175	176	177	178	179	
							SER	PRO	HIS	ASN	PRO	VAL	GLY	ARG	
			1C7N	1,80	CNS	"o"	-0,2	-178,0	178,1	0,9	-178,6	179,0	179,4	175,7	A
							0,2	-176,9	178,0	0,2	-177,5	178,5	-179,8	175,4	B
							0,2	-176,9	177,7	1,1	-177,4	178,1	179,8	175,6	C
							0,1	-177,0	177,8	0,6	-178,6	178,5	179,5	175,7	D
							-0,3	-176,9	178,3	0,8	-178,2	178,4	179,5	176,1	E
							0,0	-177,6	177,8	1,3	-176,9	177,6	179,6	175,3	F
							-0,4	-177,3	178,2	2,0	-177,6	178,8	179,4	176,2	G
							-0,3	-177,8	177,3	1,0	-177,7	178,4	-179,9	176,0	H
			1C7O	2,50	CNS	"g"	-0,2	-177,4	177,6	0,4	-179,9	179,0	-179,3	176,2	A
							-0,6	-177,5	176,5	1,0	-177,5	179,0	179,0	175,6	B
							-0,3	-177,3	177,9	0,8	-177,6	179,7	179,3	176,5	C
							0,1	-177,4	177,3	0,2	-176,9	177,8	179,3	175,5	D
							-0,5	-178,1	178,2	0,4	-178,4	178,6	179,9	176,9	E
							-0,2	-178,0	178,0	1,3	-177,8	179,0	179,6	176,3	F
							0,2	-177,8	178,3	0,6	-178,4	178,7	179,0	176,5	G
							0,2	-177,7	178,0	0,6	-177,4	178,3	-179,8	174,5	H
T3PD	<i>Salmonella enterica</i>	N157	CHEONG <i>et al.</i> , 2002				154	155	156	157	158	159	160	161	
							THR	PRO	ASN	ASN	PRO	THR	GLY	LEU	
			1LKX	1,80	CNS	"o"	-0,1	-178,1	177,5	2,4	-173,1	-179,7	-176,6	179,1	A
ACCS	Apfel	N202	CAPITANI <i>et al.</i> , 1999, 2002, 2003				199	200	201	202	203	204	205	206	
							ASN	PRO	SER	ASN	PRO	LEU	GLY	THR	
			1B8G	2,37	X-PLOR	"o"	-0,1	-177,2	175,5	1,0	-176,3	-180,0	-179,1	177,2	A
							0,0	-176,7	174,7	1,1	-176,2	-179,3	-179,6	177,1	B
			1M7Y	1,60	CNS	"g"	0,0	-177,6	173,6	1,0	-177,0	-179,2	-179,8	177,9	A
1M4N	2,01	CNS	"g"	0,2	-177,3	173,6	0,7	-178,0	-179,9	180,0	177,6	A			
ACCS	Tomate	N209	HUAI <i>et al.</i> , 2001				206	207	208	209	210	211	212	213	
							ASN	PRO	SER	ASN	PRO	LEU	GLY	THR	
			1IAX	2,80	CNS	"o"	-0,4	-176,4	176,2	0,4	-177,9	180,0	-179,7	177,4	A
			1IAY	2,70	CNS	"g"	0,2	-178,4	177,1	0,7	-178,5	-179,9	-179,8	178,6	A
				0,0	-177,6	177,5	0,5	-178,4	-179,6	-179,7	178,4	B			
CBL	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(N228)	BREITINGER <i>et al.</i> , 2001				225	226	227	228	229	230	231	232	
							SER	PRO	THR	ASN	PRO	ARG	GLN	GLN	
			1IBJ	2,30	CNS	"g"	0,5	179,7	178,4	-0,3	-177,6	177,3	178,1	-176,1	A
				0,4	178,2	178,9	-0,1	-176,9	178,3	178,7	-176,6	B			
MGL	<i>Pseudomonas putida</i>	(N161)	MOTOSHIMA <i>et al.</i> , 2000				158	159	160	161	162	163	164	165	
							SER	PRO	ALA	ASN	PRO	ASN	MET	HIS	
			1GC0	1,70	CNS	"o"	0,1	-179,7	-178,7	-179,7	179,6	-179,5	179,0	-178,6	A
							0,1	-179,8	179,1	0,0	-179,0	-179,6	179,5	179,8	B
							0,0	-179,8	179,4	-0,1	-178,7	179,2	179,5	180,0	C
							0,1	-179,7	-178,9	-179,7	179,6	-179,7	178,8	-178,2	D
			1GC2	2,00	CNS	"o"	-0,1	-178,9	-179,1	180,0	-179,5	178,9	179,3	-179,1	A
							0,0	179,7	-177,0	-179,3	-178,2	-179,9	179,6	-178,9	B
							-0,1	-179,5	-178,0	-179,5	-179,1	178,4	179,5	-179,3	C
							-0,1	-179,1	-178,7	-179,7	-179,2	178,8	179,7	-179,3	D



Anhang

CBL	<i>Escherichia coli</i>	(S158)	CLAUSEN <i>et al.</i> , 1996 ; CLAUSEN <i>et al.</i> , 1997				155	156	157	158	159	160	161	162	
							SER	PRO	GLY	SER	ILE	THR	MET	GLU	
			1CL1	1,83	X-PLOR	"g"	-0,4	-180,0	179,3	178,1	-177,7	174,4	179,2	179,5	A
							-0,3	-179,9	178,8	178,6	-178,2	174,7	179,4	-179,7	B
			1CL2	2,20	X-PLOR	"g"	-1,6	178,8	179,8	177,4	-177,7	174,9	-179,3	178,8	A
AroAT	<i>Paracoccus denitrificans</i>	N194	OKAMOTO <i>et al.</i> , 199Z				191	192	193	194	195	196	197	198	
							CYS	CYS	HIS	ASN	PRO	THR	GLY	ALA	
			1AY4	2,33	X-PLOR	"o"	178,7	-179,3	179,1	0,4	-175,3	-177,9	-179,7	-177,4	A
							179,1	-178,7	178,7	0,9	-176,1	-177,7	-179,8	-177,7	B
			1AY8	2,30	X-PLOR	"g"	178,5	-178,3	178,3	0,4	-175,1	-177,9	179,1	-177,7	A
TAT	<i>Escherichia coli</i>	N194	KO <i>et al.</i> , 1999				191	192	193	194	195	196	197	198	
							CYS	CYS	HIS	ASN	PRO	THR	GLY	ALA	
			3TAT	3,50	X-PLOR	"o"	178,7	179,9	179,0	0,1	-179,1	-179,5	-179,8	-179,7	A
							178,8	180,0	179,0	0,0	-179,1	-179,5	-179,8	-179,7	B
							178,7	179,9	179,1	0,1	-179,1	-179,5	-179,8	-179,8	C
							178,8	179,9	179,0	0,2	-179,1	-179,5	-179,8	-179,7	D
							178,7	179,9	179,0	0,2	-179,1	-179,5	-179,8	-179,7	E
178,8	179,9	179,0					0,1	-179,1	-179,5	-179,8	-179,7	F			
TPL	<i>Citrobacter intermedius</i>	(N185)	ANTSON <i>et al.</i> , 1993				182	183	184	185	186	187	188	189	
							VAL	THR	VAL	ASN	LEU	ALA	GLY	GLY	
			1TPL	2,30	PROLSQ	"-PLP"	-4,1	179,7	-177,2	176,4	-177,0	179,0	178,9	178,1	A
TIL	<i>Proteus vulgaris</i>	(N194)	ISUPOV <i>et al.</i> , 1998				191	192	193	194	195	196	197	198	
							VAL	THR	CYS	ASN	SER	ALA	GLY	GLY	
			1AX4	2,10	REFMAC	"o"	-13,7	178,7	-171,4	-177,0	173,8	178,1	-175,4	-179,9	A
							-13,3	178,8	-171,3	-177,7	176,1	-179,9	-177,3	-175,8	B
							-15,7	-178,7	-171,4	-175,9	172,5	177,7	179,7	-179,4	C
-17,5	175,3	-171,7					-175,7	173,7	178,9	-177,8	-179,1	D			

<sup>a</sup> = Mit PLP-O3-Atom interagierendere Aminosäure, äquivalent zu N207 in Alliinase. Bei Wiedergabe in Klammern liegt die Aminosäureseitenkette nicht in Interaktionsreichweite ( $\leq 4 \text{ \AA}$ ) zum PLP.

<sup>b</sup> = Auflösungsgrenze laut PDB-Datei in  $\text{\AA}$ .

<sup>c</sup> = eingesetztes Verfeinerungsprogramm: *REFMAC* (MURSHUDOV *et al.*, 1997), *X-PLOR* (BRÜNGER *et al.*, 1987), *CNS* (BRÜNGER *et al.*, 1998), *PROLSQ* (HENDRICKSON & KONNERT, 1980), *TNT* (TRONRUD, 1997).

<sup>d</sup> = Konformation; o = offen, g = geschlossen, -PLP = ohne Kofaktor. Falls von den Autoren nicht explizit als „offen/geschlossen“ eingestuft, so wurde bei Bindung eines Heteromoleküls (z.B. Carboxyl, Sulfat, MES) im aktiven Zentrum diese in Anführungszeichen als „g“ definiert, bei Abwesenheit eines jeglichen Heteromoleküls als „o“ bzw. von PLP als „-PLP“.

<sup>e</sup> = Zur Alliinase konservierte Proline sind hellblau bzw. andere invariante Aminosäurereste grau hinterlegt.

<sup>f</sup> =  $\omega$ -Winkelabweichungen von  $\approx 7\text{-}10^\circ$  sind hellgelb bzw. bei  $> \approx 10^\circ$  orange schattiert.

<sup>g</sup> = Monomer.

## 7.8 Sequenzvergleiche von Alliinasen

Tab. 7.13 Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten von Alliinasen verschiedener Pflanzen.

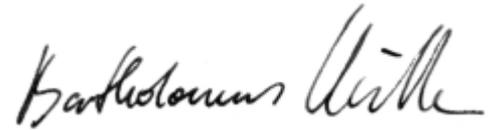
	<i>Allium ascalonicum</i>	<i>Allium cepa</i>	<i>Allium cepa</i> (Wurzel)	<i>Allium chinense</i>	<i>Allium fistulosum</i>	<i>Allium giganteum</i>	<i>Allium sativum</i>	<i>Allium sativum</i> (Wurzel)	<i>Allium schoenoprasum</i>	<i>Allium tuberosum</i>	<i>Allium wakegi</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oryza sativa</i>
<i>Allium ascalonicum</i>	-	98,4 98,9 445	58,7 66,7 445	94,3 66,7 352	61,7 70,6 327	86,0 89,2 279	89,9 92,6 448	62,3 70,4 328	96,6 97,4 352	70,2 76,3 448	98,6 98,9 352	47,9 58,9 426	51,0 59,1 428
<i>Allium cepa</i>	98,4 98,9 445	-	58,3 66,4 445	93,5 95,5 352	60,7 70,2 327	85,6 88,8 279	89,9 94,4 448	62,0 70,1 328	96,6 97,2 352	70,2 76,5 448	98,6 98,6 352	47,9 58,9 426	51,0 59,4 428
<i>Allium cepa</i> (Wurzel)	58,7 66,7 445	58,3 66,4 445	-	57,8 67,3 348	81,4 86,2 363	56,0 65,0 280	57,9 67,0 447	64,6 73,5 348	59,2 69,1 348	55,4 63,1 447	59,0 68,5 348	48,9 60,4 425	51,8 59,2 426
<i>Allium chinense</i>	94,3 95,7 352	93,5 95,5 352	57,8 67,3 348	-	60,7 69,9 327	85,6 90,3 279	91,5 93,2 355	61,1 69,1 328	92,9 95,5 352	67,4 76,1 351	93,5 95,5 352	45,3 57,5 334	49,5 59,6 329
<i>Allium fistulosum</i>	61,7 70,6 327	60,7 70,2 327	81,4 86,2 363	60,7 69,9 327	-	58,5 67,4 259	58,5 67,9 350	66,9 73,7 326	62,0 70,9 327	55,3 64,8 351	61,0 70,2 327	46,2 59,6 327	50,8 60,5 328
<i>Allium giganteum</i>	86,0 89,2 279	85,6 88,8 279	56,0 65,0 280	85,6 90,3 279	58,5 67,4 259	-	82,7 87,1 282	60,8 68,1 261	84,5 88,5 279	68,3 73,7 281	85,6 88,8 279	43,8 56,6 261	47,4 58,1 261
<i>Allium sativum</i>	89,9 92,6 448	89,9 94,4 448	57,9 67,0 447	91,5 93,2 355	58,5 67,9 350	82,7 87,1 282	-	59,9 67,9 328	91,2 93,5 355	67,2 75,7 449	91,2 93,5 355	47,7 59,2 426	49,3 58,7 428
<i>Allium sativum</i> (Wurzel)	62,3 70,4 328	62,0 70,1 328	64,6 73,5 328	61,1 69,1 328	66,9 73,7 326	60,8 68,1 261	59,9 67,9 328	-	61,4 70,1 328	55,5 63,6 335	62,0 70,4 328	47,5 59,9 326	50,6 61,5 330
<i>Allium schoenoprasum</i>	96,6 97,4 352	96,6 97,2 352	59,2 69,1 348	92,9 95,5 352	62,0 70,9 327	84,5 88,5 279	91,2 93,5 355	61,4 70,1 328	-	68,3 76,4 351	96,3 96,9 352	45,3 57,5 334	48,6 58,9 329
<i>Allium tuberosum</i>	70,2 76,3 448	70,2 76,5 448	55,4 63,1 447	67,4 76,1 351	55,3 64,8 351	68,3 73,7 281	67,2 75,7 449	55,5 63,6 335	68,3 76,4 351	-	68,9 76,4 354	45,4 55,8 435	47,5 57,4 427
<i>Allium wakegi</i>	98,6 98,9 352	98,6 98,6 352	59,0 68,5 348	93,5 95,5 352	61,0 70,2 327	85,6 88,8 279	91,2 93,5 355	62,0 70,4 328	96,3 96,9 352	68,9 76,4 354	-	46,5 58,8 334	49,2 58,9 329
<i>Arabidopsis thaliana</i>	47,9 58,9 426	47,9 58,9 426	48,9 60,4 425	45,3 57,5 334	46,2 59,6 327	43,8 56,6 261	47,7 59,2 426	47,5 59,9 326	45,3 57,5 334	45,4 55,8 435	46,5 58,8 334	-	48,5 59,0 455
<i>Oryza sativa</i>	51,0 59,1 428	51,0 59,4 428	51,8 59,2 426	49,5 59,6 329	50,8 60,5 328	47,4 58,1 261	49,3 58,7 428	50,6 61,5 330	48,6 58,9 329	47,5 57,4 427	49,2 58,9 329	48,5 59,0 455	-

Sequenzidentität [%] < 50 > 50 > 60 > 70 > 80 > 90

Die erste Zahl gibt den Wert der Sequenzidentität [%], die zweite den der Sequenzähnlichkeit [%] und schließlich die dritte die Anzahl der miteinander jeweils überlagerten Aminosäurereste an. Zur Berechnung der Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten wurden die kompletten in der SWISS-PROT-Datenbank (O'DONOVAN *et al.*, 2002) abgelegten Proteinsequenzen, einschließlich möglicher N-terminaler Führungs („leader“-) Sequenzen, überlagert. Die Farbwahl (Erklärung unterhalb der Tabelle) ermöglicht den schnelleren verwandtschaftlichen Überblick.

## 8. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der genannten Hilfsmittel und Literatur angefertigt zu haben.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Bartholomeus Küttner', written in a cursive style.

Jena, den 07. September 2004

(Bartholomeus Küttner)

## 9. LEBENS LAUF

### ***Persönliche Daten***

Name, Vornamen           Küttner, Edmund Bartholomeus  
Geburtsdatum:            28.10.1975  
Geburtsort:               Weimar  
Familienstand:           ledig  
Staatsangehörigkeit:     deutsch

### ***Schulbildung***

1982 - 1990               Polytechnische Oberschule A.S. Makarenkov (Weimar)  
1990 - 1992               Friedrich-Schiller-Gymnasium (Weimar)  
1992 - 1994               Hoffmann-von-Fallersleben-Gymnasium (Weimar)  
Abschluß: Abitur

### ***Weiterführende Ausbildung***

1994-1999                10-semestriges Diplomstudium für Biochemie und Molekularbiologie an der Friedrich-Schiller-Universität (Jena)  
7/1996                    Vordiplom  
11/1998 - 7/1999        Diplomarbeit unter Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld am Institut für Molekulare Biotechnologie e.V. (Jena) zum Thema „Aufreinigung, Kristallisation und Strukturuntersuchungen des Enzyms Alliinase aus Knoblauch (*Allium sativum*)“  
8/1999                    Diplom mit Abschluß Diplombiochemiker  
9/1999-5/2003          Angestellter der Abteilung Strukturbiologie/Kristallographie am Institut für Molekulare Biotechnologie e.V. (Jena) unter Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld  
seit 2/2000              Anfertigung der Dissertation an der Friedrich-Schiller-Universität (Jena) zum Thema „Die dreidimensionale Struktur von Alliinase aus Knoblauch in verschiedenen Kristallformen“ unter Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld  
seit 7/2003              Angestellter der Abteilung Strukturanalytik von Biopolymeren am Biotechnologisch-Biomedizinischen Zentrum der Gottfried-Wilhelm-Leibnitz-Universität (Leipzig) unter Prof. Dr. Norbert Sträter

## 10. DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld, möchte ich dafür danken, daß er mir mit der Röntgenstrukturanalyse von Biomakromolekülen das aus meiner Sicht interessanteste und zugleich faszinierendste Fachgebiet der Biochemie eröffnete. Für die mir gebotene Chance, sich in seiner Arbeitsgruppe mit einem strukturbioologischen Thema - der Alliinase - eingehend beschäftigen zu können, gebührt Prof. Hilgenfeld mein herzlicher Dank. Auch die weiteren Mitarbeiter der Abteilung Strukturbioogie-Kristallographie am Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena unterstützten mich bei meinen Arbeiten. So möchte ich vor allem Dr. Manfred S. Weiss hervorheben, dem ich zusammen mit Prof. Hilgenfeld meine Beschäftigung auf dem durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft geförderten Alliinase-Projekt, aber auch seine Hilfe bei fachlichen Fragen und Problemen verdanke. Darüber hinaus ist es mir ein Bedürfnis, Dr. Gottfried J. Palm, Dr. Tanis E. Hogg und Dr. Santosh Panjekar für ihre Mithilfe bei erfolgreichen Diffraktionsdatensammlungen zu danken, welche ausschlaggebend zur Lösung der Alliinasestruktur waren. Im weiteren möchte ich Dr. Jeroen R. Mesters für seine stets so freundliche Unterstützung bei fachlichen und technischen Detailfragen danken. Im weiteren haben sich Dr. Alan Riboldi-Tunnicliffe, Dr. Kanchan Anand, Astrid Rau, André Vogel, Tom Sicker, Dietmar Schwertner, Kristina Hartung, Silke Schulz, Barbara Härtl und Ulrike Gröbner als meine Kollegen Dank für ihren Rückhalt im Laboralltag verdient. Den Mitarbeitern Dr. Peter Schellenberg, Dr. Hans-Martin Striebel, Dr. Alexander Rapp und Gabriele Günther aus der Abteilung Einzelzell- und Einzelmolekültechniken am Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena bin ich für ihre Hilfe bei CD- und UV/Vis-Spektroskopiemessungen sehr dankbar. Ebenso Herrn Dr. Eckhard Birkner vom Institut für Physikalische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena sei für die Möglichkeit, CD-spektroskopische Messungen auszuführen, gedankt. Den vielen hilfsbereiten Mitarbeitern der Synchrotron-Beamlines von ESRF, DESY und ELETTRA muß ich einen besonderen Dank aussprechen, ohne deren Kompetenz die so wichtigen Diffraktionsdatensammlungen nicht möglich gewesen wären. Es ist mir ein Anliegen, den Mitarbeitern des Novartis Archivs in Basel mit Elisabeth Gantner, Walter Dettwiler und Hans-Peter Scheuner für ihre so herzliche Betreuung während meiner Archivrecherche zu danken. Im besonderen möchte ich hier die Hingabe von Herrn Dettwiler würdigen, der mir so bisher unbekannte Einblicke in die Alliinase-Historie und zudem den Zugriff auf eine originale Allisatin-Packung gewährte. Letztendlich konnte ich durch den Kontakt zu den Nachfahren des Alliinase-Entdeckers mit Maja Seebeck, Andi Seebeck und Prof. Dr. Thomas Seebeck den Kreis zum historischen Ursprung des Projektes in der Schweiz schließen - ein Ereignis, das mich mit besonderer Befriedigung erfüllt und für das ich Ewald Seebecks Kindern sehr danke. Meinen Freunden und meinen Familienangehörigen sei abschließend für ihre emotionale Unterstützung meiner Arbeiten warm und herzlich gedankt.